

**Федеральное государственное бюджетное учреждение  
«Национальный медицинский исследовательский центр онкологии  
имени Н.Н. Блохина»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации**

*На правах рукописи*

**ПОЛЯНСКАЯ ЕЛИЗАВЕТА МАКСИМОВНА**

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

3.1.6. Онкология, лучевая терапия

**ДИССЕРТАЦИЯ**

на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

**Научный руководитель:**  
доктор медицинских наук  
**Федянин Михаил Юрьевич**

Москва – 2023 г.

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	11
1.1. Биологические основы определения циркулирующей опухолевой ДНК.....	12
1.2 Методы определения цоДНК.....	13
1.3 Ранние работы, посвященные цоДНК.....	18
1.4 Конкордантность цоДНК и опухолевого материала.....	21
1.5 Роль цоДНК в скрининге.....	27
1.6 Прогностическая роль цоДНК при локализованных стадиях КРР.....	30
1.6.1 Роль цоДНК при локализованных стадиях КРР как маркера минимального резидуального заболевания.....	30
1.7 Роль цоДНК в лечении местнораспространенного рака прямой кишки.....	37
1.7.1 Неoadъювантная химиолучевая терапия рака прямой кишки.....	37
1.8 Метастатический колоректальный рак.....	40
1.8.1 ЦоДНК как предиктор прогрессирования после радикальных операций, проведенных по поводу метастатического КРР.....	40
1.8.2 Влияние на тактику лечения метастатического КРР.....	45
1.8.3 Оценка эффективности химиотерапии метастатического КРР.....	46
1.9 Продолжающиеся исследования.....	51
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	55
2.1. Дизайн исследования.....	55
2.2. Конечные точки и оцениваемые показатели.....	57
2.2.3 Формирование базы данных по пациентам, включенным в исследование.....	57

2.2.4	Определение циркулирующей опухолевой ДНК в образцах крови пациентов с КРР.....	58
2.2.5	Статистический анализ данных.....	60
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ.....		62
3.1	Анализ частоты и спектра мутаций, выявленных в блоках и циркулирующей в крови опухолевой ДНК при КРР.....	62
3.2	Оценка конкордантности мутационного статуса опухолевого материала и циркулирующей в крови опухолевой ДНК при КРР.....	69
3.3	Значение цоДНК как маркера МРЗ при I-III стадиях КРР.....	74
3.3.1.	Прогностическое значение цоДНК при I-III стадиях КРР.....	74
3.3.2	Влияние выявления цоДНК на выживаемость пациентов.....	79
3.3.3	Прогностическая роль динамики цоДНК до и после операции.....	85
3.3.4	Эффективность адъювантной химиотерапии в зависимости от выявления цоДНК.....	86
3.4	Значение цоДНК как маркера МРЗ при проведении метастазэктомий.....	87
3.4.1	Прогностическое значение цоДНК как маркера МРЗ при проведении метастазэктомий.....	87
3.4.2	Влияние выявления цоДНК на выживаемость пациентов после проведения метастазэктомий.....	93
3.4.3.	Прогностическое значение динамики цоДНК до и после операции при проведении метастазэктомий.....	95
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ.....		97
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....		104
ВЫВОДЫ .....		105
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....		106
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....		108

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность темы и степень её разработанности

По опубликованным данным мировой статистики GLOBOCAN в 2020 году колоректальный рак (КРР) вышел на третье место по заболеваемости и сохранил второе по смертности от злокачественных новообразований [112]. За 2020 год в мире было выявлено 1,88 миллиона новых случаев данной патологии (что составляет 10% от всех злокачественных опухолей, за исключением немеланомных опухолей кожи), а погибло ориентировочно 881 000 пациентов (9,4% от всех злокачественных опухолей, за исключением немеланомных опухолей кожи) [112]. При первичной постановке диагноза от 20 до 25% пациентов с КРР уже имеют отдаленные метастазы [103], а более 60% больных III–IV стадию, при этом медиана общей выживаемости (ОВ) в данной группе составляет в среднем 2,0 года (95% ДИ 1,4–2,1) [54]. 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 [48]. При этом 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 IIA и IIB составила 87% и 65%, а для IIIA, IIIB и IIIC стадии 90%, 72% и 53% соответственно. Для больных раком прямой кишки 5-летняя ОВ была ниже для I–III стадий: 88% для I стадии, 81% для IIA, 50% - IIB, 83% - IIIA, 72% - IIIB, 58% - IIIC, и составляла 13% при IV стадии заболевания [100].

Благодаря достижениям в области лечения КРР показатели выживаемости улучшаются - за последние 20 лет средняя продолжительность жизни выросла с полугода при проведении симптоматической терапии до 30 месяцев при проведении химиотаргетной терапии [54].

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 рака толстой кишки 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 [15, 16, 47, 109].

После проведения хирургического лечения по поводу резектабельных метастазов, прогрессирование выявляется более чем у 50 % пациентов после резекции очагов в печени [10] и 67% после резекции легких [29]. Однако в группах благоприятного прогноза медиана ОВ приближается к 5 годам у пациентов с одиночными метастазами в легкие или печень [29].

Сейчас основной системой для определения прогноза при КРР является классификация по системе TNM. Считается, что критерий Т имеет критически важное значение для прогнозирования выживаемости [59], при этом внутри каждой категории Т есть строгая корреляция с N стадией [46]. При оценке критерия N независимо от Т, при N+ по сравнению с N0 вероятность рецидива возрастает с 4,7 до 14% (ОР 3.00; 95% ДИ 1,23-7,32,  $p=0,013$ ) [99]. При этом индексы Т и N коррелируют с ОВ даже при метастатической болезни. По данным популяционного шведского исследования ( $n=49,096$ ) среди пациентов с M1, при значениях 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) [103].

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 и ряда клинических характеристик пациента предпринимались давно. Так, например, уже в 7-м издании UICC/AJCC были представлены подгруппы, учитывающие не только глубину инвазии опухоли в стенку кишечника и наличие метастазов в регионарные лимфоузлы, но и дифференцировку опухоли, работоспособность пациента, сопутствующие заболевания, наличие лимфоваскулярной инвазии [77].

К неблагоприятным факторам прогноза, определяющим необходимость проведения химиотерапии при II стадии заболевания, относят: низкую степень

дифференцировки, наличие лимфоваскулярной или периневральной инвазии, R1–2 объем резекции, операция на фоне кишечной непроходимости, неадекватный объем лимфодиссекции [40], tumor-budding (BD3) [67]. Дополнительно независимым фактором риска прогрессирования является повышение уровня РЭА после операции [136]. К факторам неблагоприятного прогноза так же принято относить правостороннюю локализацию опухоли (по сравнению с левосторонней при раке толстой кишки) и женский пол [5].

Прогноз выживаемости при IV стадии различается в зависимости от характера метастазирования. По результатам ранних исследований медиана ОБ при изолированном поражением печени меньше по сравнению метастатическим поражением легких (9 месяцев против 14). Наименее благоприятный прогноз наблюдается при метастазах в ЦНС (4 месяца) и кости (5,5 месяцев) [103]. Пациенты с перитонеальным канцероматозом так же относятся к прогностически неблагоприятной группе [41].

Относительно новым подходом является анализ влияния мутационных особенностей опухоли на прогноз. Мутации в *KRAS* связаны с низкой выживаемостью без прогрессирования (ОР 1,20; 95% ДИ 1,02-1,42;  $p=0,03$ ) и ОБ (ОР 1,41; 95% ДИ 1,17-1,70;  $p<0,001$ ). В частности, вариант *KRAS* G12C коррелировал с более низкой ОБ по сравнению с не мутированными опухолями (ОР 2,26; 95% ДИ 1,25-4,1;  $p=0,001$ ). Аналогичная тенденция для ОБ наблюдался в варианте мутации *KRAS* G13D ( $n=71$ , ОР 1,46; 95% ДИ 0,96-2,22;  $p=0,10$ ). Более частые варианты мутаций во 2 экзоне гена *KRAS*, такие как G12D ( $n=152$ , ОР 1,17; 95% ДИ 0,86-1,6,  $p=0,81$ ) и G12V ( $n=92$ , ОР 1,27; 95% ДИ 0,87-1,86,  $p=0,57$ ) не оказали существенного влияния на ОБ [82]. Аналогичные данные представлены в работе 2019 года, посвященной КРР с метастазами в легких, где наличие мутаций в генах *RAS* и *TP53* было связано с меньшей БРВ и ОБ, тогда как мутация в гене *APC* наоборот характеризовалась более длительной медианой ОБ (ОР 0,29; 95% ДИ 0,12-0,66;  $p=0,003$ ) [29]. Известно, что при метастатическом КРР мутация в гене *BRAF* ассоциирована с крайне агрессивным течением и плохим прогнозом с медианой ОБ 11,7 месяцев [8].

Таким образом, КРР представляет собой разнородную группу заболеваний, обусловленных широким спектром мутаций, в силу чего невозможно проведение универсальной молекулярно-опосредованной терапии. Для дальнейшего улучшения результатов лечения, необходимо изучение маркеров прогрессирования после проведенного радикального лечения и в процессе лекарственной терапии. В данном контексте представляет интерес изучение циркулирующей в крови опухолевой ДНК (цоДНК) как в качестве маркера резидуальной опухоли, так и маркеров резистентности к проводимой лекарственной терапии при раке толстой кишки.

Часть внеклеточной ДНК, циркулирующей в крови больных онкологическими заболеваниями, является опухолевым производным и называется циркулирующей опухолевой ДНК (цоДНК). ЦоДНК содержит геномные изменения, присущие опухоли, что позволяет проводить оценку опухолевой нагрузки в реальном времени используя в качестве субстрата плазму крови. Применение секвенирования следующего поколения (NGS) в совокупности с современными вычислительными методами, в последнее время позволило проводить генотипирование опухолей на основе цоДНК при различных типах рака. Увеличение чувствительности методов идентификации цоДНК привело к резкому росту исследований, изучающих ее роль в выявлении заболеваний на ранних этапах, диагностике рецидивов, оценке ответа на терапию и анализе формирования лекарственной устойчивости.

Обнаружение цоДНК является перспективным маркером минимального резидуального заболевания (МРЗ), определяемого как обнаружение цоДНК без других клинических признаков рецидива заболевания у пациентов, завершивших лечение. ЦоДНК может стать дополнительным критерием отбора пациентов для адъювантной химиотерапии, за счёт большей чувствительности к изменениям опухолевой нагрузки может помочь в подборе неоадъювантной терапии. При метастатическом заболевании цоДНК может предсказать ответ на проводимую химиотерапию, а также исследовать новые механизмы резистентности к таргетной терапии. Большой опыт в выявлении, анализе и интерпретации данным 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.

### **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.

### **Методология и методы исследования**

Диссертационная работа выполнена на базе НИИ клинической онкологии им. академика РАН и РАМН Н.Н. Трапезникова ФГБУ «НМИЦ онкологии им Н.Н. Блохина» Минздрава России совместно с лабораторией фармакогеномики Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук.

Для выполнения задач исследования было проведено проспективное нерандомизированное одноцентровое исследование. В работу были включены данные пациентов с морфологически верифицированным колоректальным раком с любой стадией заболевания, проходившие лечение в НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина в период с 2016 г. по 2021 г.

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. С целью анализа частоты и структуры мутаций и конкордантности мутационного профиля первичной опухоли и цоДНК был сформирован банк данных, включавших в себя серийные образцы крови и блоки первичной (или метастатической) опухоли пациентов с КРР. Вторая часть работы посвящена оценке чувствительности тест-системы по определению цоДНК в крови пациентов с различными стадиями КРР, а также выявлению взаимосвязей клиничко-морфологических параметров с наличием опухолевой ДНК в крови при КРР. Для оценки чувствительности тест-системы выполнялись заборы крови пациентов в следующих случаях: при локализованном заболевании до и после хирургического лечения, при местнораспространенном раке прямой кишки до проведения химиолучевой терапии и после хирургического лечения, при метастатическом раке – в случае метастазэктомии до и после хирургического лечения. Третья часть работы посвящена проспективному изучению прогностической роли цоДНК для выявления МРЗ при резектабельном КРР, а

также после проведения метастазэктомий. Статистический анализ результатов выполнялся при помощи программ Microsoft Excel 2016 и IBM SPSS Statistics v. 26., онлайн ресурса <https://www.medcalc.org>. Исследование проведено в рамках экспериментальной научной разработки приказу Министерства здравоохранения Российской Федерации.

### **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 генах 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 поведении метастазэктомий (ОР=6,7,  $p=0,01$ ). Пациенты с положительной 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.

### **Степень достоверности и апробация результатов**

Результаты, приведенные в диссертационной работе достоверны благодаря большому числу включенных пациентов, использованию современных методов

молекулярной диагностики, а также применению методики статистического анализа полученных данных.

Результаты проспективного исследования по оценке “Прогностической роли цоДНК при ранних стадиях рака толстой кишки” были доложены на конференции Российского общества клинической онкологии «Опухоли ЖКТ» в апреле 2022 года, “Прогностическая роль цоДНК у пациентов с локализованными стадиями опухолей ЖКТ” на IV Всероссийской конференции с международным участием «Опухолевые маркеры: молекулярно-генетические и клинические аспекты» в августе 2022 года.

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 N7 (опухолей гепатопанкреатобилиарной зоны), онкологического отделения хирургических методов лечения N11 (торакальной онкологии), молекулярно-биологической лаборатории отдела морфологической и молекулярно-генетической диагностики опухолей НИИ клинической онкологии им. академика РАН и РАМН Н.Н. Трапезникова ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России состоявшегося 21 июня 2022 года, протокол № 118.

### **Публикации по теме диссертации**

По теме диссертации опубликовано 9 научных работ, 2 из которых опубликованы в рецензируемых журналах, включённых Высшей аттестационной комиссией России в список изданий, рекомендуемых для опубликования основных научных результатов диссертации на соискание учёной степени кандидата наук.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1 Биологические основы определения циркулирующей опухолевой ДНК

Циркулирующая внеклеточная ДНК (цвДНК) представляет собой сильно фрагментированную ДНК, высвобождающуюся в кровоток в результате некроза, апоптоза клеток, а также активной секреции [8, 52]. Концентрации цвДНК у здоровых людей колеблются от 1 до 10 нг/мкл в плазме и в основном представлена материалом из апоптотических лейкоцитов [19]. Пациенты со злокачественными новообразованиями имеют более высокие уровни цвДНК, чем здоровые люди. Большинство фрагментов цвДНК состоят из 180-200 пар оснований. После высвобождения в кровоток цвДНК метаболизируется почками, печенью и селезенкой, при этом период полураспада цвДНК составляет от 16 минут до нескольких часов [36, 73, 123]. ЦоДНК, высвобождающаяся из опухолевых клеток, представляет собой небольшую долю от цвДНК, характеризующуюся наличием специфичных для опухоли геномных изменений. В крови здоровых людей с возрастом могут появляться новые мутации в клетках системы кроветворения, при разрушении которых высвобождается цвДНК. Это может быть неверно истолковано как цоДНК из опухолевых клеток. Razavi P. с соавт. при секвенировании ткани опухоли, цвДНК и лейкоцитов (n=124), выявили, что половина обнаруженных мутаций в цвДНК повторялись в лейкоцитах, а следовательно, эти мутации возникли в результате клональных изменений кроветворения, а не в первичной опухоли. Авторы пришли к выводу о необходимости секвенирования лейкоцитов для разделения мутаций в цвДНК [101]. В качестве субстрата для анализа цоДНК образцы плазмы предпочтительнее образцов сыворотки [37], из-за более низкого фонового уровня ДНК дикого типа [56, 67].

Жидкостная биопсия на основе цоДНК скомпрометирована низкой чувствительностью: у многих больных злокачественными опухолями в кровотоке она не обнаруживается. Доля пациентов с КРР у которых возможно выявить цоДНК закономерно зависит от объема опухоли и выявляется у 50% у пациентов с не

метастатическим заболеванием до почти 90% у пациентов с отдаленными метастазами [19].

По последним данным, временного повышения цоДНК в крови возможно добиться при помощи предоперационного облучения опухоли, но к выводам нужно относиться с осторожностью в виду малого числа наблюдений и отсутствия корреляции между концентрацией мутантной цоДНК и общей дозой ЛТ [52].

## 1.2 Методы определения цоДНК

Существуют различные подходы к поиску цоДНК – от определения метилирования отдельных генов и полногеномного метилирования, до анализа точечных мутаций и полногеномных исследований. (Single-locus or multiplexed assays, Targeted sequencing approaches, Genome-wide analysis) [91].

Подход, основанный на анализе метилирования, базируется на том, что гиперметилирование ДНК является часто встречающимся при КРР эпигенетическим изменением и также может быть обнаружено в образцах крови больных. Метилирование генов геликазоподобного фактора транскрипции (HLTF) и гиперпластического полипоза 1 (HPP1) было предложено в качестве прогностического биомаркера. В 2012 году были опубликованы результаты немецкого исследования (n=311) в котором метилирование генов HLTF и HPP1 в сыворотке крови достоверно коррелировало с размером опухоли и стадией заболевания, а было ассоциировано с более низкими показателями ОБ, а также являлось независимым негативным прогностическим фактором при IV стадии КРР (HLTF ОР 1.8, p = 0,0438, HPP1 ОР 1.6, p = 0,0495) [94]. В 2015 были опубликованы противоречивые данные низкой прогностической ценности маркеров метилирования при хорошей чувствительности на разных стадиях КРР. Из 353 пациентов с КРР, 230 (65.2 %), 232 (65.7 %), и 247 (70,0 %) имели гиперметилирование промоторов генов AGBL4, FLI1 и TWIST1 в цоДНК. У пациентов со стадиями I-III чувствительность любых двух или трех маркеров составляла 52,8–57,8% и 27,9–38,9%, а для IV стадии 73,0% и 55,6% соответственно [70]. Однако было отмечено, что гиперметилирование генов HLTF и HPP1

выявлялось значительно чаще у пациентов с повышенным уровнем ЛДГ (32% против 12%,  $p = 0,0005$  и 68% против 11%,  $p < 0,0001$  соответственно). Высокие уровни ЛДГ, а также метилирование HMTF и HPP1 были связаны с большим распространением заболевания и коррелировали с худшей выживаемостью [93]. Начиная с 2012 года публиковались данные исследований потенциала циркулирующего в крови маркера – метилирование гена SEPT9. Church TR с соавт. отметили рост чувствительности метода по мере увеличения стадии КРР (35.0% для I, 63.0% для II, 46.0% для III и 77.4% для IV) [28]. Тест на основании данного маркера (EPIproColon) в 2016 был одобрен FDA в качестве возможного варианта скрининга КРР.

Для определения мутаций в цодНК в настоящее время используются 2 принципиально разных методики – первая основана на выявлении мутаций, ранее обнаруженных в первичной ткани опухоли. Второй методикой является анализ всего генома или экзона для обнаружения изменения количества копий или точечных мутаций при помощи глубокого секвенирования (NGS).

Обнаружение мутаций, ранее обнаруженных в ткани первичной опухоли, проводится при помощи полимеразной цепной реакции ПЦР. Эти методы включают чувствительные методы на основе количественной ПЦР, (ARMS, COLD-PCR, RT-PCR), а также методы на основе цифровой ПЦР (ddPCR). При большой чувствительности и специфичности, низкой стоимости, минус этой стратегии заключается в необходимости подробного анализа мутационного статуса первичной опухоли.

В последнее время разработаны различные платформы для детекции цодНК при помощи ПЦР. MassARRAY - мультиплексная сверхчувствительная система обнаружения мутаций со средней пропускной способностью, основанная на MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization), по данным литературы достигает порога обнаружения 0,1%. Процесс включает мультиплексную ПЦР с последующим мутационно-специфичным обогащением. Захваченные и обогащенные образцы затем идентифицируют с помощью матричной лазерной ионизационной масс-спектрометрии [85].

Платформа droplet digital PCR (ddPCR – цифровая капельная ПЦР), использующая капельную систему водонепроницаемой эмульсии, напротив, предлагает простой рабочий процесс, лучшую чувствительность к специфичным аллелям, а также лучшую точность и воспроизводимость, чем стандартная количественная ПЦР [53]. Капельная цифровая ПЦР, способна обнаруживать низкоуровневые мутации с использованием образцов с низким содержанием нуклеиновых кислот и может выполнять количественное определение числа копий мутантных генов на фоне генов дикого типа при помощи аллель-специфичных зондов или праймеров. Однако возможности ddPCR ограничены количеством генов, определяемых за раз, а также тем фактом, что гены должны быть predeterminedены заранее [81].

Второй методикой является анализ всего генома или экзона для обнаружения изменения количества копий или точечных мутаций при помощи глубокого секвенирования (NGS). При таком подходе нет необходимости анализа образца первичной опухоли, однако для снижения числа ложноотрицательных результатов требуется больший объем цоДНК [79].

Первоначально для обнаружения цоДНК использовалось секвенирование по Сэнгеру, обладавшее низкой чувствительностью. Так как цоДНК представляет собой небольшую долю (1,0%) от общего количества цвДНК, стандартные методики секвенирования могут обнаруживать мутантные фрагменты опухоли только у пациентов со значительной опухолевой нагрузкой [33]. Благодаря достижениям в области технологии NGS разработано множество эффективных альтернатив секвенированию по Сэнгеру. Diehl и др. разработали методику под названием BEAMing (beads, emulsion, amplification, and magnetics). В этом методе сегмент ДНК амплифицируется с помощью праймеров, содержащих известные последовательности, а затем ковалентно связывается с магнитными сферами [35]. Newman и др. разработали еще один метод для количественного определения цоДНК под названием CAP-seq (Cancer personalized profiling by deep sequencing) - зондовую панель, состоящую из биотинилированных олигонуклеотидов ДНК, нацеленных на повторяющиеся мутированные области [88]. Новые методы обеспечивают значительно более высокую разрешающую способность для

обнаружения цоДНК. Они также отличаются высокой производительностью и меньшей стоимостью. Методы секвенирования "второго поколения" были необходимы для полной оценки клинического потенциала анализа цоДНК, однако они имеют свои ограничения. Во-первых, методы, основанные на методике NGS дают информацию примерно у половины пациентов на ранних стадиях заболевания, поэтому требуется дальнейшее улучшение чувствительности [128], кроме того, их применение в клинической практике ограничивается высокой стоимостью. Еще одной существенной проблемой NGS является сложность подготовки образцов и секвенирования [88]. В данный момент для преодоления проблем NGS разрабатываются методы секвенирования третьего поколения, рассчитанные на высокую чувствительность и относительную дешевизну [27].

В 2020 году Vessies D.C.L. провел сравнительный анализ четырех коммерческих платформ, которые обнаруживают мутации горячих точек в гене *KRAS* в цоДНК: цифровая капельная ПЦР (ddPCR), BioCartis Idylla, Roche COBAS z480 и Sysmex Beaming. Чувствительность платформы определялась с использованием образцов плазмы пациентов с метастатическим КРР и синтетических эталонных образцов, что устраняло различия в количестве анализируемой плазмы и методах выделения цоДНК. Распространенность изменений нуклеотидов *KRAS* была сопоставлена с широтой охвата конкретной платформы. Сравнение платформ показало, что ddPCR и BEAMing обнаруживают больше мутаций гена *KRAS* среди пациентов мКРР, чем Idylla и COBAS z480, Максимальная пропускная способность выборки была самой высокой для ddPCR и COBAS z480, Общие годовые затраты были самыми высокими для BEAMing и самыми низкими для Idylla и ddPCR. Чувствительность (при 50 нг ДНК мАФ 0,50%) ddPCR 100%, Idylla 50%, COBAS z480 38%, BEAMing 75% [126].

В заключение следует отметить, что, имея широкий диапазон методик для выбора оптимальной платформы по выявлению цоДНК следует принимать во внимание исследуемую популяцию, объем выборки для анализа, требуемую чувствительность применительно к клиническому или научному интересу и общую стоимость. Методы определения цоДНК кратко представлены в таблице 1.

**Таблица 1** – Методы определения цоДНК

Метод	Платформы*	Предел обнаружения	Плюсы	Минусы
ПЦР	COLD-PCR PNAs-LNA, ARMS, RT-PCR (MassARRAY Idylla)	0,1–1%	Низкая стоимость; простота выполнения	Низкая чувствительность; ограниченное количество изучаемых за раз генов; гены должны быть предопределены заранее
Цифровая ПЦР	ddPCR	<0,05%	Высокая чувствительность и специфичность; приемлемая стоимость; простота выполнения	Ограниченное количество изучаемых генов за один раз; гены должны быть предопределены заранее
NGS	Deep sequencing, TAM-seq, Safe-Seqs, CAPP-Seq, BEAMing cSMART, digital sequencing	0,01–2%	Позволяет одновременно анализировать большее количество генов	Широкий диапазон чувствительности в зависимости от используемой платформы NGS; более высокая стоимость

\* - ARMs – amplification refractory mutations system; BEAMing – bead emulsion amplification and magnetics; CAPP-Seq – cancer personalized profiling by deep sequencing; cSMART – circulating single molecule amplification and re-sequencing technology; COLD-PCR – co-amplification at lower denaturation temperature; ddPCR – droplet digital PCR (цифровая капельная полимеразно-цепная реакция); RT-PCR – real time PCR (ПЦР в реальном времени)

### 1.3 Ранние работы, посвященные цДНК

Несмотря на то, что внеклеточная ДНК в крови впервые была описана более 70 лет назад [138], аномалии у онкологических больных удалось описать лишь десятилетия спустя. В 1970-х годах были опубликованы результаты исследования Leon S., посвященного изучению цДНК у больных онкологическими заболеваниями разных локализаций, уровень свободной ДНК определялся в сыворотке крови 173 больных и у 55 здоровых лиц. В исследовании отмечены следующие особенности: более высокие уровни цДНК выявлялись в сыворотке крови пациентов с метастатическим заболеванием, при этом не было обнаружено корреляции между уровнем ДНК и размером или локализацией первичной опухоли. После проведения лучевой терапии было отмечено снижение концентрации цДНК, что, по-видимому, связано с уменьшением размеров опухоли, и наоборот, повышение уровня ДНК коррелировало с отсутствием ответа на лечение [68].

С начала 2000х годов с развитием технологий начинается новый этап изучения цДНК. В 2000 году M.S. Kopreski с соав. доказал возможности применения в группах риска скрининга на основе ДНК, выделенной из плазмы. В работе было показано достаточное для обнаружения количество внеклеточной мутированной ДНК, циркулирующей в плазме пациентов с предраковыми заболеваниями и КРР [61].

В 2009 году Puciarelli с соавторами при проведении количественной ПЦР в реальном времени (RT-PCR) (маркеры ALU-115, ALU-247) на образцах плазмы 136 пациентов с колоректальным раком, 24 пациентов с аденомами и 55 здоровых людей, пришел к выводу, что цДНК может играть роль маркера для первичного обнаружения и выявления прогрессирования заболевания. При установлении порогового значения на уровне 4,86 нг/мл чувствительность метода составила 78,52% (95% ДИ 70,6–85,1) и специфичность 86,08% (95% ДИ 76,4–92,8) при разделении пациентов с КРР и без (AUC: 0,860; 95% ДИ 0,81-0,90,  $p=0,0001$ ) [95].

С 2012 года появляются публикации, посвящённые маркерам метилирования генов *HLTF* и *HPP1* в сыворотке крови ( $n=311$ ), в которых их наличие достоверно

коррелировало с размером опухоли и стадией заболевания, а также позволяло выявить группу с худшим прогнозом среди пациентов с IV стадией [94]. В том же году публиковались данные по потенциалу маркера метилирования гена *SEPT9*. Church TR с соавт. на основании увеличения чувствительности маркера с ростом стадии КРР (35.0% для I, 63.0% для II, 46.0% для III и 77.4% для IV) [28] сделали вывод о главенствующем значении связи с сосудами в проникновении маркеров ДНК в кровь. Стоит заметить, что в данной ситуации скорее играет роль объем опухоли - чем больше гибель опухолевых клеток, тем больше ДНК попадает в кровоток, так как связь опухоли с сосудами есть практически всегда. Kinga Toth с соавт. представили данные наибольшей чувствительности *mSEPT9* для выявления правостороннего КРР (чувствительность 79.3%; 95% ДИ 69.6–87.1, специфичность 98.9%; 95% ДИ 94.1–100) [124]. Тест на основании данного маркера (EPIproColon) в 2016 был одобрен FDA в качестве возможного варианта скрининга КРР, подробнее об этом в разделе, посвященном скрининговому потенциалу цоДНК.

Spindler K.L. и др. проанализировав уровни цоДНК в плазме 229 больных, выявили снижение ОВ в группе с повышенным исходным уровнем цоДНК - медиана ОВ составила 10,2 месяца (95% ДИ 8,3-11,7) против 5,2 месяцев (95% ДИ 4,6-5,9), соответственно, ОР 1,78,  $p = 0,0006$ . Многофакторный анализ подтвердил независимое негативное прогностическое значение цоДНК (ОР 1.5; 95% ДИ 1.3-1.7) для каждого квартиля увеличения концентрации цоДНК [110].

Ранние работы (Таблица 2) показали потенциал цоДНК и заложили базу для проведения дальнейших исследований по поиску вариантов клинического применения цоДНК.

**Таблица 2** – Ранние работы, посвященные роли цоДНК при КРР

Исследование, год	Число	Чувствительность	Специфичность	Прогностическое значение	Метод обнаружения цо ДНК
Puciarelli 2009 [95]	КРР N=136, аденомы N=24, контроль N=55	78,52; 95% ДИ 70,6–85,1	86,08; 95% ДИ 76,4–92,8		Количественная ПЦР (ALU-115, ALU-247)
Church TR, 2012 [28]		35% - I, 63% - II, 46% - III, 77,4% - IV			mSEPT9
Philipp, A.B 2012 [94]	N=311			IV: HLTF ОР 1,8; p = 0,0438, HPP1 ОР 1,6; p = 0,0495	Количественная ПЦР метилирование HLTF и HPP1
Kinga Toth, 2012 [124]	контроль N = 92 КРР N = 92	79.3%; 95% ДИ 69,6–87,1	98.9%; 95% ДИ 94,1–100		mSEPT9 Epi proColon
Spindler, K.L. 2015 [110]	контроль N = 100 КРР N = 229			ОВ 10,2 мес; 95% ДИ 8,3-11,7 против 5,2 мес; 95% ДИ 4,6-5,9, ОР 1,78, p = 0,0006	Количественная ПЦР KRAS
Lin P., 2015 [70]	N=353	I-III: 52,8–57,8 %, IV: 73,0 %			гиперметилирование промоторов AGBL4, FLI1 и TWIST1

#### 1.4 Конкордантность цоДНК и опухолевого материала

После обнаружения цоДНК в крови и доказательства ее негативного прогностического значения перед исследователями возник принципиальный вопрос: возможно ли считать определение цоДНК равнозначной традиционной биопсии?

По данным работ Frattini M. 2006 года мутация в гене *KRAS* обнаруживалась во внеклеточной ДНК у 43% больных с I-II стадией КРР [7].

В работе 2014 года С. Bettegowda и соавт. на основе материала 206 пациентов с метастатическим КРР оценивалась конкордантность мутационных изменений цоДНК и первичной опухоли (при этом конкордантность составила 95%,  $p < 0,0001$ ), при этом чувствительность цоДНК для выявления клинически значимых мутаций гена *KRAS* составила 87,2%, а специфичность - 99,2% [19]. В том же году на основании анализа статуса гена *KRAS* ( $n=35$ ) при помощи TaqMan Mutation Detection Assay (TMDA) у пациентов с метастатическим КРР, получавшим химиотерапию были получены низкие показатели чувствительности в 62% при 100% специфичности [107]. А по данным исследования Spindler, K.L. 2015 года ( $n=229$ ) общая согласованность мутационного статуса гена *KRAS* в плазме и опухоли наоборот была высокой (85%) [110]. Схожие данные показала работа Tie J того же года ( $n=52$ ) конкордантность мутационного статуса метастазов и цоДНК по гену *KRAS* составила 92,3% [120]. В 2015 году Liu F. и соавт. проанализировали конкордантности статуса гена *KRAS* между опухолью и цоДНК на материале от 27 пациентов после проведенной радикальной операции с помощью ПЦР с последующим секвенированием по Сэнгеру, а также NGS. При этом в отношении мутаций в цоДНК, была получена большая чувствительность при применении метода NGS, по сравнению с секвенированием по Сэнгеру. Чувствительность и специфичность для NGS в плазме крови составили 76,9% и 78,6% соответственно, при этом конкордантность составила 77,8% [71].

В работе Kidess-Sigal E, при помощи мутационного профилирования горячих точек генов *KRAS*, *BRAF* и *PIK3CA* были проанализированы цоДНК и ткани опухоли 23 образцов пациентов с КРР. 80% образцов крови пациентов были

положительными по цоДНК, по крайней мере, одна мутация была обнаружена в 78%. Было определено соответствие 78,2% для *KRAS*, 73,9% для *BRAF* и 91,3% для мутаций *PIK3CA* [58].

В 2014 году Thierry AR с соавторами опубликовал результаты слепого проспективного исследования по сравнению мутационного статуса *KRAS* и *BRAF*, полученных при анализе биопсийного материала опухолевой ткани и ДНК плазмы с использованием количественного метода ПЦР. Мутационный анализ проводился на образцах крови и тканей 106 пациентов. Анализ цоДНК показал 100% специфичность и чувствительность для мутации *BRAF V600E*. Для семи тестируемых точечных мутаций *KRAS* метод показал 98% специфичность и 92% чувствительность при конкордантности 96%. ЦоДНК была обнаружена у 100% пациентов с метастатическим колоректальным раком [86]. В 2017 году тот же коллектив авторов публикует результаты проспективного исследования (n=119), продолжающего предыдущую работу по цоДНК. Однако прошлого успеха повторить не удастся – работа демонстрирует умеренное соответствие показателей цоДНК и первичной опухоли (72%, 74% и 87% точности для экзона 2 *KRAS*, экзона 3, 4 *KRAS* и *BRAF V600E* соответственно). Меньшую конкордантность автор объясняет более высокой частотой мутаций, выявленных при анализе плазмы, отсутствием ограничения чувствительности (ранее порог >0,5%), а также влиянием дополнительных факторов, таких как использование биопсии, удаление первичной опухоли на момент забора крови и промежуток времени между взятием опухолевой ткани и крови [115]. В том же году работа Grasselli J, предоставила данные сопоставимой эффективности оценки конкордантности цоДНК по гену *KRAS* при помощи разных вариантов сочетания BEAMing и стандартной ПЦР в плазме и тканях при этом общая конкордантность составила 88,7% при сравнении плазмы и опухоли при помощи BEAMing, и 89,7% если анализ и плазмы был проведен при помощи BEAMing, а образец ткани – SoC [44]. А исследование Vidal J. показало общую конкордантность по гену *KRAS* в 93% [127]. По данным китайских коллег 2018 года, конкордантность при генотипировании *RAS/BRAF* мутаций в опухолевой ткани и цоДНК при помощи ПЦР ARMS и панели из 40 генов с

использованием NGS для всех генов составила 81,25%. [133] И еще одно исследование 2018 года (N=412) показало высокое соответствие между статусом RAS в плазме и опухолевой тканью у пациентов с колоректальным раком и метастазами в печени (95% ДИ 0,64-0,77), точность 85,2% (95% ДИ 81,4-88,5%) [16].

В работе Сао Н. 2020 при помощи панели NGS включавшей 605 генов на материале 43 пациентов с мКРР мутации TP53, APC, и KRAS были определены в 29 парах образцов плазмы и ткани первичной опухоли, конкордантность составила 81, 67, и 42% соответственно. Общая конкордантность по генам APC, RNF43, SMAD4, BRAD1, KRAS, RAF1, и TP53, составила 54.6% [24].

В 2020 году Gupta с соавторами провели ретроспективное сравнение анализа цоДНК (Guardant360-G360) и геномного профилирования биопсии опухоли (FoundationOne - F1) у пациентов с метастатическим колоректальным раком. В результате была получена высокая конкордантность по мутациям APC, TP53, KRAS, NRAS и BRAF в когортах, не получавших никакого лекарственного лечения и не получавших анти-EGFR терапию. Конкордантность изменений была на уровне 88%-92% [47]. В работе Lastraioli E. оценивались показатели конкордантности при метастатическом КРР по генам KRAS и NRAS, при этом показатели соответствия находились в интервале от 83 до 85% [44]. По данным одного из недавних исследований, в котором изучалось соответствие статуса RAS между OncoBEAM и биопсией тканей у 221 пациента с метастатическим КРР общая конкордантность составила 91% (95% ДИ 85-95%), при этом наибольшие показатели соответствия  $\geq 90\%$  наблюдались при изолированных метастазах в печень вне зависимости от размера очагов, с метастазами по брюшине или в легких с исходным наибольшим диаметром  $\geq 20$  мм [56].

В крупном исследовании 2021 года, посвященном оценке конкордантности статуса RAS в цоДНК у 433 пациентов с различными видами рака, общий показатель соответствия составил 85%. При этом показатель положительной согласованности изменений KRAS составил 57,1% против 27,4% (колоректальный рак по сравнению с неколоректальным раком;  $p = 0,01$ ). По данным работы Wang,

2021 (N=91 мКРР) обнаруженные молекулярные изменения были в высокой степени согласованы в цоДНК, ткани первичной опухоли и метастазах в печени ( $p > 0,05$ ) [130].

В 2021 году коллектив авторов во главе с Raghav K.P.S., на основании тестирования 353 пациентов с метастатическим КРР опубликовал данные по корреляции статуса HER2 между первичной опухолью и плазмой крови. При этом чувствительность, специфичность, положительные и отрицательные прогностические значения анализа цоДНК (по отношению к ткани) составили 83%, 74%, 61% и 90% соответственно [97]. По данным того же коллектива авторов (n=75) соответствие статуса HER2 между тканью и цоДНК составило 83%. [89]

В Корейском исследовании (272 образца от 62 пациентов), результаты которого были опубликованы на ASCO 2022, у 90,3% пациентов были обнаружены мутации цоДНК. Общее соответствие между мутациями цоДНК и опухолевых материалом составило 85%. У трех пациентов мутационные профили цоДНК полностью отличались от первичной опухоли, при дальнейшем анализе у этих пациентов был обнаружен второй рак толстой кишки [69].

Данные по конкордантности первичной опухоли и цоДНК резюмированы в таблице 3.

Таким образом, конкордантность цоДНК по мутационному статусу с первичной опухолью зависит от методики определения мутаций в цоДНК, набора генов, по которому сопоставимость была подсчитана, а также проведения системного лечения до забора материала. Мировые современные данные показывают высокую конкордантность жидкостной биопсии и первичной опухоли, что подтверждает возможность использования геномного анализа цоДНК в качестве альтернативы биопсии опухоли, однако, величина конкордантности зависит от стадии заболевания, распространенности и локализации метастазов.

Таблица 3 – Исследования по сопоставимости цоДНК и биопсии

Исследование, автор, год	n	Конкордантно сть	Чувствительно сть	Специфично сть	Маркер
C. Bettegowda, 2014 [19]	N=230 мККР	95%	87,2%	99,2%	<i>KRAS</i>
Sefrioui D., 2014 [107]	N=34 мККР	85%	62%	100%	<i>KRAS</i>
Thierry AR, 2014 [116]	N=106 мККР	100%	100%	100%	<i>BRAF</i>
		96%	98%	92%	<i>KRAS</i>
Tie J., 2015 [120]	N=53 мККР	92.3%	-	-	<i>KRAS</i>
Spindler, K.L., 2015 [110]	N=229 мККР	85%	-	-	<i>KRAS</i>
Liu F, 2015 [71]	N=27 мККР	77,8%	76,9%	78,6%	<i>KRAS</i>
Kidess-Sigal E, 2016 [58]	N=23 мККР	78,2%	-	-	<i>KRAS</i>
Thierry AR, 2017 [115]	N=23 мККР N=119 мККР	73,9%	-	-	<i>BRAF</i>
		91,3%	-	-	<i>PIK3CA</i>
		72%-74%			<i>KRAS</i>
Vidal J., 2017 [127]	N=119 N=115 мККР	87%	-	-	<i>BRAF</i>
		93%	-	-	<i>KRAS</i>

Grasselli J., 2017 [44]	N=146 мКРР	88,5%, - 89,7%	-	-	<i>KRAS</i>
Bachet J B., 2018 [16]	N=412 мКРР	$\kappa = 0,71$	точность 85,2%	-	<i>KRAS</i>
Yao J., 2018 [133]	N=76 мКРР	81.25%.	-	-	<i>KRAS,</i> <i>NRAS,</i> <i>BRAF</i>
Mardinian K., 2020 [78]	N=433 (рак ЖКТ, легких, ГМ и МЖ)  405 НРМР, МТС	85%	-	-	<i>KRAS</i>
van 't Erve, 2020 [38]	N=100 мКРР	93%	-	-	<i>KRAS,</i> <i>NRAS,</i> <i>BRAF</i>
Gupta R, 2020 [47]	N=75 мКРР	88%-92%	-	-	<i>APC,</i> <i>TP53,</i> <i>KRAS,</i> <i>NRAS u</i> <i>BRAF</i>
Cao H 2020 [24]	N=43 мКРР	54,6%	-	-	<i>APC,</i> <i>RNF43,</i> <i>SMAD4,</i> <i>BRAD1,</i> <i>KRAS,</i> <i>RAF1,</i> <i>TP53</i>

Lastraioli E., 2020 [63]	N=43 мКРР  N=31 мКРР	81%	-	-	<i>TP53</i>
Kagawa Y, 2021 [56]	N=31 мКРР  N=221 мКРР	83.33%;	-	-	<i>NRAS</i>
Dumbrava E.E. 2021[36]	N=68  (13 - КРР)  НРМР, мтс	72%	-	-	<i>PIK3CA</i>
Raghav K.P.S., 2021 [97]	N = 353 мКРР	-	83%	74%	<i>HER2</i>
Okamoto W., 2021 [89]	N = 75 мКРР	83%	-	-	<i>HER2</i>
Y. Lim, 2022 [69]	N=62 мКРР	86,5%	-	-	<i>NGS</i> панель 106 генов

мКРР – метастатический колоректальный рак, ЖКТ – желудочно-кишечный тракт, ГМ – головной мозг, МЖ- молочная железа, НРМР нерезектабельный местрораспространенный

### 1.5 Роль цоДНК в скрининге КРР

ЦоДНК показала большие перспективы в качестве биомаркера для раннего выявления рака. Несмотря на первоначальные неудачи при обнаружении предраковых заболеваний и ранних форм КРР на основании анализа метилированной формы *SEPT9* [11], в дальнейших работах метод показал свою эффективность, и в 2015 году тест EPIproColon базирующийся на обнаружении в крови метилированной формы гена *SEPT9*, был сначала одобрен китайским

Управлением по санитарному надзору для диагностики КРР [34], а в 2016 году FDA в качестве возможного варианта скрининга КРР для лиц, отказавшихся от стандартных скрининговых процедур. По данным Sun J (n=650) чувствительность теста mSEPT9 для определения КРР составила 73%, специфичность 94,5%, а для пациентов с полипами кишечника и аденомой чувствительность составила 17,1%, со специфичностью 94,5% [111].

Однако из-за низкого содержания цоДНК, особенно на ранних стадиях, ее трудно обнаружить с высокой точностью при сохранении низких затрат на секвенирование. В 2018 году группа исследователей из США во главе с Molparia B. представила данные пилотного исследования по обнаружению изменений числа копий соматических генов (large scale somatic copy numbers variations (CNVs)), которые вносят больший вклад в цоДНК, чем точечные мутации, определяемые с помощью секвенирования ДНК. У больных колоректальным раком на ранних стадиях удалось выявить соматические CNVs (n=25), что дало возможность впоследствии отличить их от контрольных образцов здоровых лиц (n=24). Авторам удалось получить специфичность 100% (нижняя граница ДИ: 86%) и чувствительность ~79% (95% ДИ: 63%-95%), но учитывая ограниченный размер выборки, результаты следует рассматривать с осторожностью [56].

В 2018 году WS Tsai на основании анализа данных 620 лиц, (438 с аденомой, полипами или КРР I-IV стадии и 182 здоровых контроля) представил данные по чувствительности циркулирующих в крови опухолевых клеток для выявления предраковых заболеваний толстой кишки на уровне 76,6%, при общей специфичности 97,3% [125].

В 2020 году группа китайских ученых опубликовала результаты исследования, посвященного использованию маркеров метилирования цоДНК в диагностике и прогнозировании колоректального рака. Для проверки эффективности их при скрининге пациентов с высоким риском КРР была использована проспективная когорта (801 пациент с колоректальным раком, 1021 здоровый контроль). Полученная модель диагностического прогноза с высокой точностью (площадь под кривой = 0,96) отличала пациентов с КРР от нормального

контроля. Прогностическая модель также эффективно предсказывала прогноз и выживаемость пациентов с КРР ( $p < 0,001$ ). На основании полученных данных цоДНК была создана молекулярная классификация КРР, в результате чего были выделены две подгруппы пациентов с КРР с достоверно различной ОВ ( $P = 0,011$  в валидационной когорте). При этом было отмечено, что маркер метилирования цоДНК (cg10673833) имел высокую чувствительность (89,7%) и специфичность (86,8%) при выявлении КРР и предраковых поражений в популяции высокого риска ( $n=1493$ ) [76].

В том же году японские исследователи представили выводы по наблюдательному скрининговому исследованию на основе генотипирования цоДНК и секвенированию опухолевой ткани (GI-SCREEN, 5621 пациент) при скрининге опухолей ЖКТ. Исследователям удалось сократить продолжительность скрининга (11 против 33 дней,  $p < 0,0001$ ) и улучшить показатель охвата популяции (9,5 против 4,1%,  $p < 0,0001$ ) без ущерба для эффективности лечения по сравнению с генотипированием тканей [59].

На ASCO 2021 были представлены данные по возможности применения мультимодального анализа LUNAR-2 включающего в себя определение соматических мутаций, метилирования опухоли и фрагментных паттернов в диагностике бессимптомного и раннего КРР. Для анализа были взяты образцы плазмы 434 пациентов (+271 здоровых контроля) с выявленным КРР до проведения хирургического лечения. Общая чувствительность для выявления КРР составила 91% (393/434), с высокой чувствительностью на всех стадиях; 88% Стадия I/II, 93% Стадия III при специфичности 94% (255/271). При этом не было различий в чувствительности при бессимптомном КРР (88%) по сравнению симптомным процессом (91%;  $p=0,4$ ). Так же была определена одинаковая чувствительность для выявления правостороннего и левостороннего КРР (93% против 90%;  $p=0,5$ ). Высокая чувствительность в бессимптомной когорте предполагает, что этот тест будет иметь клинически значимую эффективность при проведении скрининга в популяции со средним риском. В настоящее время проводится проспективное исследование для регистрации теста в качестве скринингового [64].

Перспективным представляется метод, основанный на оценке дифференциально метилированных областей, предварительно отобранных при помощи бисульфитного секвенирования всего генома с последующим анализом искусственным интеллектом. В исследовании 2021 года были взяты образцы плазмы 68 пациентов (18 пациентов с ранней стадией (I-II), и 16 с поздней стадией (III-IV) КРР, 34 здоровых контроля) перед колоноскопией в рамках стандартного скрининга на КРР, либо перед операцией по поводу первичного КРР. Разработанная панель показателей метилирования была использована при построении модели прогнозирования и проверена в тестовой когорте пациентов. Затем эта модель была применена к независимому набору испытуемых, включая 36 больных раком I-IV стадии и 159 здоровых контроля. При этом исследовательская модель правильно классифицировала 92% (33/36) пациентов с КРР. Чувствительность в зависимости от стадии варьировалась: 83% (5/6) для I стадии, 92% (11/12) для II стадии, 92% (12/13) для III стадии, и 100% (5/5) для IV стадии. Специфичность модели составила 97% (154/159). Этот метод при чувствительности 89% и специфичности 97% для ранних стадий (I-II) может послужить основой для высокоточного и минимально инвазивного скринингового теста на КРР [60].

Результаты последних исследований являются многообещающими для применения цодНК в скрининге, как малоинвазивного и эффективного метода, однако требуются дальнейшие исследования.

## **1.6 Прогностическая роль цодНК при локализованных стадиях КРР**

### **1.6.1 Роль цодНК при локализованных стадиях КРР как маркера минимального резидуального заболевания**

Большой интерес у исследователей вызывал вопрос, позволяет ли выявление цодНК после выполнения операций выявить пациентов с наибольшим риском рецидива и, кроме того, позволяет ли оценка цодНК в динамике выявить рецидив раньше других методов и подтвердить радикальность операции.

В 2014 году исследование С. Vettegowda и соавт. показало ограниченную чувствительность тестов по определению цодНК для локализованного рака,

(n=230) послеоперационное обнаружение цоДНК находилось в диапазоне от 10–15% у пациентов со II стадией заболевания до 50% у пациентов с IV стадией. [19] но последующие исследования показали лучшие результаты. По данным Phallen J и др., опубликованным в 2017 году, у пациентов с резектабельным колоректальным раком более высокий уровень предоперационной цоДНК ассоциировался с рецидивом заболевания и снижением ОВ [92]. В том же году Scholer LV с соавторами опубликовал результаты продольного когортного исследования (371 образец крови от 45 пациентов), в котором последовательный забор крови у 27 пациентов, оперированных по поводу КРР выявил наличие цоДНК во всех случаях при развитии рецидива (n=14) и ни в одном без него (n=12), (чувствительность и специфичность 100%). При этом обнаружение цоДНК позволяло выявить рецидив в среднем за 9,4 месяца до его появления по данным КТ. У 6 из 21 пациентов с локализованным заболеванием с положительной цоДНК в течение 3 месяцев после операции был зарегистрирован рецидив заболевания, так же они имели достоверно более короткие сроки безрецидивной выживаемости (БРВ) (ОР 37,7; 95% ДИ, 4,2–335,5;  $p < 0,001$ ) и 5 –летней ОВ (ОР 6,7; 95% ДИ 1,6–28,7;  $p < 0,01$ ), чем у пациентов отрицательных по цоДНК. Трехлетняя БРВ составила 0% для пациентов позитивных по цоДНК и 73% для пациентов негативных по цоДНК. Эти данные подтвердили, что обнаружение цоДНК связано с очень высоким риском рецидива [105].

В отечественном исследовании 2017 на основании анализа результатов анализа мутаций в генах RAS-каскада (KRAS, BRAF) в цоДНК пациентов с КРР до операции (n24) и их корреляции с прогнозом заболевания было выявлено, прогрессирование заболевания у 79% пациентов. Авторы так же пришли к выводу, что по цоДНК можно судить о степени радикальности хирургической операции (в группе больных с выявленными мутациями у 13 человек (76 %) зарегистрировано прогрессирование заболевания) [114].

По нашим собственным предварительным данным, опубликованным в 2020 году (n=271), удалось продемонстрировать прогностическую значимость

положительной цоДНК после операции у больных с ранними стадиями различных злокачественных новообразований, в том числе и при КРР [39].

В исследование Tie J. с соавторами, были включены 1046 образцов плазмы крови 230 пациентов с резецированным раком толстой кишки II стадии. Для определения цоДНК использовался метод широкого параллельного секвенирования. Среди пациентов не получавших адъювантную химиотерапию цоДНК в послеоперационном периоде выявлена у 14 из 178 (7,9%) пациентов, из которых 11 (79%) имели рецидив заболевания (при медиане наблюдения 27 месяцев); среди 164 пациентов с отрицательной цоДНК рецидив произошел только у 16 (9,8 %) (ОР, 18;95%, ДИ 7,9-40;  $p < 0,001$ ). У пациентов, получавших химиотерапию, наличие цоДНК после завершения химиотерапии также ассоциировалось с низкой БРВ (ОР 11; 95% ДИ от 1,8 до 68;  $p = 0,001$ ). Авторы пришли к выводу, что выявление цоДНК у пациентов со II стадией заболевания позволит принимать решение о назначении адъювантной химиотерапии [119]. Исследователи продолжили изучение цоДНК и МРЗ уже при III стадии колоректального рака - у 19 из 96 (20%) пациентов был выявлен рецидив заболевания при медиане наблюдения 21,1 месяца. ЦоДНК определялась в 21% проценте после проведения хирургического лечения и была ассоциирована со снижением БРВ (ОР, 3.8; 95% ДИ, 2.4-21.0;  $p < 0,001$ ), и в 17% после проведения адъювантной химиотерапии, при этом 3-летняя БРВ была значимо ниже - 30% против 77% в случаях, когда цоДНК не определялась (ОР, 6.8; 95% ДИ, 11.0-157.0;  $p < 0,001$ ) [118]. Аналогичные результаты были получены и в других исследованиях – таблица 4 [46, 81, 93, 106, 119].

На ASCO 2021 был доложен post-hoc анализ III фазы исследования IDEA-France в котором цоДНК была предложена в качестве основного прогностического фактора III стадии КРР. В ходе анализа цоДНК выявлялась по метилированию генов WIF1 и NPY методом ddPCR. Из 2010 рандомизированных пациентов образцы цоДНК были собраны после операции и до химиотерапии у 1017. Отрицательная цоДНК была у 877 пациентов (86,2%), у 140 положительная (13,8%). При медиане наблюдения 6,6 года 3-летняя БРВ составила 66,39% для

цоДНК позитивных пациентов и 76,71% для цоДНК негативных ( $p = 0,015$ ). ЦоДНК была подтверждена как независимый прогностический маркер для БРВ (OR= 1,55, 95% ДИ 1,13-2,12;  $p = 0,006$ ) и ОВ (OR = 1,65, 95% ДИ 1,12–2,43;  $p = 0,011$ ). Прогностическая значимость положительной цоДНК наблюдалась у пациентов, получавших адъювантное лечение в течение 3 месяцев и с индексом Т4 и/или N2, но не для тех, кому проводили терапию в течение 6 месяцев, и с опухолями Т1–3/N1 [113].

На ASCO GI 2022 года был представлен анализ исследования GALAXY – крупнейшей на настоящий момент работы, посвященной роли цоДНК при минимальном резидуальном заболевании (MP3). В исследование были включены данные 1365 пациентов, (из них 116 – I стадия, 478 - II, 503 - III и 268 пациентов с IV стадией с резекцией олигометастазов. В докладе была показана связь динамики цоДНК с улучшением клинических результатов у пациентов с MP3 - скорость снижения цоДНК была значительно выше при проведении адъювантной ХТ (57% (54/95) против 8% (7/93)  $p < 0,001$ ). Авторы приходят к выводу, что принятие решений о послеоперационном лечении с использованием анализа цоДНК поможет выявить пациентов, которые получают выигрыш от назначения адъювантной терапии при всех стадиях КРР. Стратегию адъювантной терапии, основанной на цоДНК планируется разработать в ходе текущих рандомизированных исследований VEGA и ALTAIR [62].

Самой интересной опцией в настоящее время является возможность назначения адъювантного лечения на основании анализа цоДНК. К примеру, тестирование на цоДНК пациентов после проведения радикальных операций с последующей рандомизацией при положительном результате на наблюдение и проведение адъювантной ХТ, подобные исследования проводятся не только при КРР, но и при немелкоклеточном раке легкого, в том числе и в нашей стране [1].

На конгрессе ASCO 2022 были доложены результаты крайне важного исследования DYNAMIC, посвященного данному вопросу. В нем проводилось сравнение отдаленных результатов ВБП 455 пациентов с радикально прооперированным раком толстой кишки II стадии между группой стандартной

АХТ и назначения АХТ в соответствии с результатом цоДНК через 4 и 7 недель после операции. В результате в экспериментальной группе значимо меньше больных потребовали проведения химиотерапии: 15,3% против 27,9% в контрольной группе. При этом двухлетняя ВВП между группами статистически значимо не различалась (93,5% против 92,4% в контрольной). Среди больных экспериментальной группы, не имевших циркулирующей опухолевой ДНК в крови и, соответственно, не получивших адъювантной терапии, трехлетняя БРВ составила 92,5%, при наличии циркулирующей опухолевой ДНК и проведении адъювантной терапии – 86,4% [117].

Таким образом, исследования, посвященные не метастатическому КРР продемонстрировали прогностическое влияние анализа цоДНК после проведенной операции. Способность анализа цоДНК стратифицировать пациентов в группы низкого и очень высокого риска делает возможной персонализацию как неoadъювантного [57] так и адъювантного лечения, где эскалация или деэскалация системной терапии потенциально может улучшить показатели выживаемости, и, что не маловажно, снизить финансовую и физическую токсичность лечения [86].

**Таблица 4 – Исследования, посвященные цоДНК при локализованных стадиях как маркера МРЗ**

Исследование, год,	Число больных, популяция	Чувствительность	Положительная цоДНК до операции/ после операции	БРВ для цоДНК+ против цоДНК-	ОВ для цоДНК+ против цоДНК-	Метод обнаружения цоДНК
C. Bettegowda et al, 2014 [19]	N=230 KPP 64		47% - I ст, 55% - II ст, 69% - III ст – для всех опухолей ЦоДНК + (до лечения) - 73% KPP I-IV ст			Экзомное секвенирование, полногеномное секвенирование
Phallen J et al, 2017 [92]	KPP N=31	I-IV 83%		меньшая $p < 0,0001$	Меньшая $p < 0,0001$	TEC-Seq
Scholer LV et al, 2017 [105]	N=45 пациентов 371 образец	100%		ОР 37,7; 95% ДИ, 4.2–335.5; $P < 0,001$ )	ОР 6,7; 95% ДИ 1,6–28,7; $P < 0,01$ )	Safe-SeqS
Tie J et al, 2016 [119]	N=230 пациентов (1046 образцов плазмы) II стадия РТК		цоДНК+ у 7,9% без АХТ	ЦоДНК+ после АХТ ОР, 11; 95% ДИ от 1,8 до 68; $P = 0,001$ ).		Safe-SeqS
Tie J. et al, 2019 [118]	N=96 III стадия РТК		ЦоДНК + после операции в 21%, цоДНК+ после ХТ 17%	ОР, 3,52; $p = 0,004$ 30% против 77% (ОР, 6.8; 95% ДИ, 11.0-157.0; $P < .001$ ).		Safe-SeqS

Reinert T et al, 2019 [102]	N=130 пациентов (829 образцов плазмы)	87,5%	До операции цоДНК+ 88,5%			NGS на основе ПЦР
Lumish M.A. et al, 2021 [75]	N=KPP 39 из 62 (63%) II: 24 III: 15		цоДНК+ в 16% (II и III ст)			MSK-IMPACT FoundationOne, Guardant360 или MSK-ACCESS.
J.Taieb et al, 2021 [113]	N=1 345 post-hoc IDEA-France		цоДНК + у 140 (13,8%).	ОР, 3,8; 95% ДИ, 2,4- 21,0; P <0.001	ОР 1,65, 95% ДИ 1,12–2,43, P = 0,011)	WIF1 и NPY ddPCR
J. Gu et al, 2021 [45]	N=40 стадия I-III: 10%, 45%, 45%		До операции цоДНК+ в 78% После операции 16%	ОР 8,2; 95%ДИ 1,8-38,0; p=0,0016)	ОР 10,4; 95%ДИ 2,5-43,1; p<0,0001	NGS + Super-Seq
Eiji Oki et al, 2022 [90]	N=46 МРЗ II стадия КРР		До операции ЦоДНК+ 69,6% (95%ДИ 55,2,-81,0) После операции 34,8% (95%ДИ 22,7, 49,3)			NGS + SafeSEQ
S. McNamara et al, 2022 [80]	МРЗ II-III стадия КРР N=84	44%	17,4%	ВБПБ p= 0,0058 БРВ p = 0,0022, ОР = 7.098)	p = 0,0333	Roche AVENIO Сверхглубокое секвенирование
GALAXY Kotaka M et al, 2022 [62]	1365 пациентов 116 - I, 478 - II, 503- III		Клиренс цоДНК выше при проведении АХТ (57% (54/95) против 8% (7/93) p <0,001).	ВБПБ p= 0,0058 БРВ p = 0,0022, ОР = 7,098	p = 0,0333	Signatera bespoke multiplex-PCR + NGS

## **1.7 Роль цоДНК в лечении местнораспространенного рака прямой кишки**

Boysen с соавт. (n=75) в исследовании посвященном определению уровня цоДНК при помощи ddПЦР у пациентов с местнораспространенным раком прямой кишки (РПК), получавших предоперационную химиолучевую терапию обнаружили корреляцию между уровнем общей свободной ДНК клеток и стадией заболевания, а так же поражением регионарных лимфоузлов ( $p = 0,04$ ). Кроме того, была обнаружена тенденция к корреляции с риском рецидива после резекции локализованного РПК ( $p = 0,08$ ) [22].

Tie J в отдельном проспективном исследовании 2018 года изучала влияние цоДНК на отдаленные результаты у пациентов с местнораспространенным РПК (n=159). Серийные образцы плазмы были собраны до ХЛТ, через 4–6 недель после завершения ХЛТ и после операции. Применение адъювантной химиотерапии было оставлено на усмотрение врача, без учета результатов цоДНК. Соматические мутации в опухолевом образце определялись при помощи секвенирования 15 генов, обычно мутирующих при КРР, образцы плазмы анализировались при помощи Safe-SeqS на наличие соответствующей мутации, обнаруженной в первичной опухоли. ЦоДНК была обнаружена при постановке диагноза у 77% пациентов, но не была предиктором рецидива. А вот при обнаружении цоДНК после операции (12%) увеличивала риски рецидива в 11 раз (ОР 11;  $p < 0,001$ ), независимо от применения адъювантной ХТ. Анализ цоДНК позволил дополнительно разделить пациентов на группы с очень высоким и низким риском рецидива даже среди пациентов с низким риском (полный ответ: ОР 15;  $p < 0,01$ ) и более высокий риск (урN+: ОР 11;  $p < 0,001$ ) [122].

Таким образом, Tie J одной из первых показала предикторный и прогностический потенциал определения цоДНК при местнораспространенном КРР.

### **1.7.1 Неoadъювантная химиолучевая терапия рака прямой кишки**

Неoadъювантная химиолучевая терапия (ХЛТ) в настоящее время является основной стратегией в лечении местно-распространенного рака прямой кишки

(РПК), но только порядка 10-14% пациентов достигают полного патоморфологического ответа. По этой причине большое число исследований направлены на поиск возможных биомаркеров, способные предсказывать максимальных ответ опухоли на проведение неoadъювантной терапии.

Boysen с соавт. (n=75) в исследовании посвященном определению уровня цоДНК у пациентов с местнораспространенным РПК, получавших предоперационную химиолучевую терапию обнаружили корреляцию между уровнем общей свободной ДНК клеток и стадией заболевания, а так же поражением регионарных лимфоузлов ( $p = 0,04$ ). Кроме того, была обнаружена тенденция к корреляции с риском рецидива ( $p = 0,08$ ) [22].

Tie J. в отдельном проспективном исследовании 2018 года изучала влияние цоДНК на отдаленные результаты у пациентов с местнораспространенным РПК (n=159). Серийные образцы плазмы были собраны до ХЛТ, через 4–6 недель после завершения ХЛТ и после операции. Применение адъювантной химиотерапии было оставлено на усмотрение врача, без учета результатов цоДНК. Соматические мутации в опухолевом образце определялись при помощи секвенирования 15 генов, обычно мутирующих при КРР, образцы плазмы анализировались при помощи Safe-SeqS на наличие соответствующей мутации, обнаруженной в первичной опухоли. ЦоДНК была обнаружена при постановке диагноза у 77% пациентов, но не была предиктором рецидива. А вот при обнаружении цоДНК после операции (12%) увеличивала риски рецидива в 11 раз (ОР 11;  $p < 0,001$ ), независимо от применения адъювантной ХТ. Анализ цоДНК позволил дополнительно разделить пациентов на группы с очень высоким и низким риском рецидива даже среди пациентов с низким риском (полный ответ: ОР 15;  $p < 0,01$ ) и более высокий риск (урN+: ОР11;  $p < 0,001$ ) [122]. Таким образом, Tie J. одной из первых показала предикторный и прогностический потенциал определения цоДНК при местнораспространенном РПК.

По последним данным, применение предоперационного облучения вызывает транзиторное повышение цоДНК в крови [52]. Большое количество работ посвящено роли цоДНК в прогнозировании эффекта после проведения

неoadьювантной ХЛТ при местно-распространенном РПК. В исследование Khakoo S., были включены 47 пациентов с локализованным РПК, которым проводилась ХЛТ (n=243 серийных образца плазмы). В плазме крови с помощью капельной цифровой ПЦР отслеживали до трех соматических мутаций. При этом показатели обнаружения цоДНК составили: 74% (n = 35/47) до лечения, 21% (n = 10/47) в середине ХЛТ, 21% (n = 10/47) после завершения ХЛТ и 13% (n = 3/23) после операции. При медиане наблюдения 26,4 месяца ВВП была короче у пациентов с обнаруживаемой цоДНК после завершения ХЛТ (ОР 7,1; 95% ДИ 2,4-21,5; P <0,001). Наличие цоДНК в середине ХЛТ предсказывало появление метастазов со 100% чувствительностью и 83,3% специфичностью [57].

В исследование из Китая, представленное на ESMO2021, было включено 103 пациента с местнораспространенным РПК (СТ3-4/N0-2, M0), получавших неoadьювантную ХЛТ с последующей тотальной мезоректумэктомией. Образцы плазмы брались на исходном уровне, во время и после ХЛТ, анализ проводился при помощи NGS, охватывающей 422 гена с анализом 6-mer 5'-концевых повторов. Чувствительность и специфичность при прогнозировании в группе, не достигшей полного клинического ответа, составили  $0,95 \pm 0,05$  и  $0,85 \pm 0,04$ , а точность  $0,93 \pm 0,03$ . Авторы пришли к выводу, что подобная тактика позволит выявить группу пациентов, у которой возможна реализация подхода “наблюдай и жди” - без проведения хирургического этапа лечения [131]. Исследования, посвященные цоДНК при неoadьювантной химиолучевой терапии местнораспространенного РПК, резюмированы в Таблице 5.

Дальнейшее изучение роли цоДНК может помочь определить группу пациентов, которой возможно проведение тактики “наблюдай и жди” без увеличения рисков рецидива, а также предсказать ответ на лечение.

**Таблица 5** – Исследования посвященные роли цоДНК при неoadьювантной химиолучевой терапии местнораспространенного РПК

Исследование, год	число больных	Динамика цоДНК	Выявление рецидива при цоДНК+	Метод
Tie J., 2018 [122]	N=159	До лечения цоДНК(+) 77%, после операции 12%	ОР 11; p < 0,001, независимо от применения АХТ	Safe-SeqS

Khakoo S., 2020 [57]	N=47 243 образца плазмы	До лечения цоДНК(+) 74%, 21% в середине ХЛТ, 21% после завершения ХЛТ и 13% (n = 3/23) после операции	Прогнозирование мтс при цоДНК(+) в середине ХЛТ – чувствительность 100%, специфичность 83,3%	ddPCR
Y. Wang, 2021 [131]	N=103		Чувствительность и специфичность при прогнозировании в группе, не достигшей полного клинического ответа 0,95±0,05 и 0,85±0,04, точность 0,93±0,03.	NGS
E.N. Imyanitov, 2021 [52]	N=9	Повышение цоДНК после ЛТ		ddPCR

### 1.8 Метастатический колоректальный рак

В настоящее время опубликовано значительное число работ, посвященных роли цоДНК при метастатическом КРР. Диапазон применения широко варьируется от определения МРЗ после проведения метастазэктомий при IV стадии заболевания до оценки эффективности проведения химиотерапии, и попытки прогнозирования ответа на химиотерапию в соответствии с изменяющимся мутационным профилем опухоли.

По результатам метаанализа проведенного в 2017 году на основании 10 исследований, включивших в общей сложности 1076 пациентов с метастатическим КРР, была выявлена четкая прогностическая ценность цоДНК. При этом была показана значительно более высокая смертность (ОР = 2,39, 95% ДИ 2,03-2,82,  $p < 0,001$ ) для пациентов с цоДНК выше медианы [109].

#### 1.8.1 ЦоДНК как предиктор прогрессирования после радикальных операций, проведенных по поводу метастатического КРР

В настоящее время расширяются показания для проведения локальных вариантов лечения метастазов КРР в печени и легких, при этом потребность в

прогностических маркерах для пациентов, проходящих такое лечение, в настоящее время не удовлетворена.

Для подтверждения повышенного риска рецидива на основании цоДНК Scholer LV с соавторами было выполнено исследование, включившее больных КРР с метастатическим поражением печени, прошедших хирургическое лечение. Образцы крови были взяты у 23 пациентов в течение 3 месяцев после операции. Авторы подтвердили, что пациенты с положительной цоДНК имели крайне высокий риск прогрессирования (ОР 4.9; 95% ДИ, 1.5–15.7;  $P = 0,007$ ). Рецидив заболевания был выявлен в 100% пациентов позитивных по цоДНК ( $n=7$ ) и в 50% для цоДНК негативных пациентов (большое число ложно негативных результатов объяснялось применением 1 маркера для обнаружения цоДНК) [105]. Аналогичные результаты сообщаются и в других работах – таблица 6 [14, 17, 44, 66, 75, 121, 130]. По предварительным итогам Японского исследования GALAXY, опубликованным в 2022 году, уровень цоДНК в образцах зависел от проведения адъювантной химиотерапии. В данное исследование было включено 268 пациентов с IV стадией КРР после резекции олигометастазов (20% всей выборки), при этом скорость снижения цоДНК была значительно выше при проведении адъювантной ХТ при всех стадиях [62]. Представляет интерес возможность раннего выявления послеоперационного МРЗ с помощью измерения цоДНК раньше ПЭТ КТ и без повышения РЭА [132].

По совокупности представленных данных мы можем сделать вывод, что наличие послеоперационной цоДНК остается независимым неблагоприятным прогностическим фактором и негативно коррелирует с БРВ после корректировки на известные прогностические патологические факторы и применения адъювантной химиотерапии. Анализ цоДНК может позволить не только отобрать пациентов для проведения локального лечения при метастатическом заболевании, но также может быть использован для определения рациональной персонализированной адъювантной терапии. Однако, для принятия решений после метастазэктомий, необходимы дальнейшие исследования по оптимальному внедрению анализа цоДНК в клиническую практику.

**Таблица 6** – Исследования посвященные роли цоДНК для выявления МРЗ при метастатическом КРР

Исследование, год, число больных, популяция	Чувствительность/специфичность	ЦоДНК+ после операции	ОВ при цоДНК+	Прогрессирование при цоДНК+	Метод обнаружения цоДНК
Scholer LV., 2017 [105] N=45 пациентов 371 образцов крови КРР с мтс в печени	Рецидив заболевания был выявлен в 100% цоДНК+ (n=7) и в 50% для цоДНК -			ОР 4,9; 95% ДИ, 1,5–15,7; p = 0,007	Массивное параллельное секвенирование (1 маркер)
Spindler KG., 2017 [109] Метаанализ 10 исследований N= 1076			ОР = 2,39, 95% ДИ 2,03-2,82, P <0,001		7 количественных ПЦР, 2 BEAMing 1 ddPCR
Boysen A., 2020 [23] T=35	У 49% цоДНК+ после операции развился рецидив (95%ДИ 95–NA),			При цоДНК- медиана времени до рецидива не была достигнута (p = 0.03).	ddPCR и платформа MassARRAY

## Продолжение таблицы 6

Lee S., 2021 [65] N=58	цоДНК+ в 29% после проведения хирургического лечения на 1 этапе  в 19,4% после предварительной химиотерапии.				Сверхглубокое NGS
Loupakis F. 2021 [74] N=112	96,7% с цоДНК+ прогрессировали	цоДНК+ после операции 54,4%	ОР: 16,0; 95% ДИ от 3,9 до 68,0; p = 0.001	Прогрессирование [ОР]: 5,8; 95% ДИ от 3,5 до 9,7; p 0,001).  ВБПБ (ОР: 5,78; 95% ДИ (3,34- 10,0%; p= 0,001).	NGS
Tie J. 2021 [121] N=54 пациента (380 образцов)	ЦоДНК + у 85% до лечения и у 24% пациентов после операции	40,93-кратное (с 19,10 до 87,73, P < 0,001) снижение доли мутантных аллелей цоДНК после НАХТ	ОР 4,2; 95% ДИ 1,5-11,8; p < 0,001	БРВ при цоДНК+ после операции (ОР 6,3; 95% ДИ 2,58-15,2; p < 0,001)  цоДНК+ в конце лечения: БРВ (ОР 14,9; 95% ДИ 4,94-44,7; p < 0,001)	Safe-SeqS

## Продолжение таблицы 6

Wang De-S, 2021 [130] N=91		цоДНК+ против цоДНК- после резекции метастазов 79,4% против 41,7%, после АХТ 77,3% против 40,7%.			NGS
Chee B., 2021[26]	PPV цоДНК+ при выявлении рецидива после операции 92%. Чувствительность 85%, специфичность 89%			ОР 7,7; 95% ДИ 2,6- 22,5; p <0,001	Интегрированный геномный и эпигеномный анализ (Guardant Reveal, Guardant Health)
GALAXY Kotaka M, 2022 [62] N=268 после резекции олигометастазов		скорость снижения цоДНК выше при проведении АХТ при всех стадиях (57% против 8% p <0,001)			Signatera bespoke multiplex-PCR NGS
M.A. Gouda, 2022 [43] N=24 пациента	ЦоДНК+ до операции 42,9%, после операции 16,7%.			Не влияло на БРВ (p>0,6)	ddPCR (BioRad)

### 1.8.2 Влияние на тактику лечения метастатического КРР

В проспективном нерандомизированном исследовании, проведенном Bhangu JS с соавт., оценивалась динамика aberrантного метилирования генов *SEPT9*, *DCC*, *BOLL*, и *SFRP2* у пациентов с метастазами колоректального рака в печень (n=34). Уровни маркеров метилирования коррелировали с исходным объемом опухоли и ответом на лечение, при этом маркеры метилирования демонстрировали более сильную корреляцию с объемом опухоли, чем РЭА и СА 19-9, а изменение их уровня в динамике позволило с высокой чувствительностью и специфичностью разделить пациентов по принципу операбельности уже после 1 цикла неoadьювантной химиотерапии (чувствительность от 82% до 91% и специфичность от 95% до 100%, при этом маркером с самой высокой специфичностью (100%) был SEPT9) [20].

Интересной представляется перспектива отбора пациентов с перитонеальными метастазами колоректального рака для гипертермической внутрибрюшинной химиотерапии (CRS-HIPEC) на основании исследования уровня предоперационной цоДНК. В исследовании Veagan JJ (n=30) посредством проведения NGS и ddPCR, обнаружение цоДНК было связано со снижением БРВ после CRS-HIPEC (медиана 6,0 месяцев против медианы, не достигнутой, P = 0,016). Авторы пришли к выводу, что наличие цоДНК может быть признаком occultных метастазов или повышенного метастатического потенциала опухоли, и, как следствие, демонстрирует возможность использования цоДНК в качестве предоперационного маркера рецидива [18].

Еще одной перспективной областью для применения цоДНК является изучение особенностей метастазирования в разные органы. В работе Vando изучалось влияние сайта метастазирования на цоДНК у пациентов метастатическим КРР с метастазами в 1 органе. В анализ были включены данные 138 человек (49 метастазы только в печень, 15 только в лимфатические узлы, 27 только по брюшине и 47 в легких). Конкордантность статуса RAS /BRAF составила 93,9% для печени, 80,0% для лимфатических узлов, 56,0% для брюшины и 65,9%

для легких. А при метастазах только в легких или только по брюшине были наименьшие показатели субклональной эволюции в цоДНК [17].

### **1.8.3 Оценка эффективности химиотерапии метастатического КРР**

По данным литературы наличие цоДНК при КРР (как и при раке молочной железы и меланоме) коррелирует с объемом опухолевой массы [4], в том числе оцениваемой по критериям RECIST. В исследовании Tie J с коллегами (n=52), значительное снижение уровня цоДНК (медиана в 5,7 раза;  $P < 0,001$ ) наблюдаемое до начала 2-го цикла, что коррелировало с ответом по КТ через 8-10 недель (OR= 5,25 при 10-кратном снижении уровня цоДНК;  $p = 0,016$ ). Значительное снижение ( $\geq 10$ -кратное) до начала 2-го цикла химиотерапии было связано с тенденцией к увеличению ВВП (14,7 против 8,1 мес.; OR 1,87;  $p = 0,266$ ). Это позволило исследователям сделать вывод, что ранние изменения цоДНК во время первой линии химиотерапии предсказывают более позднее прогрессирование [120].

В одном из крупнейших проспективных исследований 2017 года AIO-KRK-0207 были проанализированы уровни цоДНК (метилирование гена HPP1) у 467 пациентов с метастатическим КРР. При этом обнаружение цоДНК до начала лечения коррелировало с более низкой ОВ (OR 51.86; 95% ДИ 1,37–2,53), а снижение уровня цоДНК ниже порогового значения через 2-3 недели после первого введения комбинированной химиотерапии показало более высокую ОВ (при HPP (+) до и (-) после против HPP (-) до и после OR 1,41; ДИ 1.00-2.01, при любом значении HPP до и (+) после против HPP (-) до и после OR 2,60; ДИ 1.86-3.64). Авторы пришли к выводу, что обнаружение цоДНК HPP1 может быть использовано в качестве прогностического маркера раннего ответа [49].

В исследовании Lim с соавт., (272 образца от 62 пациентов), результаты которого были опубликованы на ASCO2021, профиль цоДНК использовался для мониторинга изменений на фоне химиотерапии первой линии. Образцы крови были взяты до и во время химиотерапии и после каждого четырех циклов до прогрессирования заболевания. ЦоДНК была выделена при помощи NGS (панель включала 106 генов). У 90,3% пациентов были обнаружены мутации цоДНК. Во время первого наблюдения у большинства (98,0%) пациентов наблюдалось

снижение цоДНК по сравнению с исходным уровнем. Клиренс цоДНК был достигнут у 40 (78,4%) пациентов и был связан с более длительной выживаемостью без прогрессирования (медиана БРВ 11,8 месяцев при клиренсе цоДНК (+) против 4,7 месяцев при отрицательном клиренсе цоДНК,  $p < 0,001$ ). Выявление изменений цоДНК предшествовало радиологическому прогрессированию у 25 (58,1%) пациентов в среднем за 3,3 месяца. При прогрессировании были обнаружены различные устойчивые мутации и амплификации генов из которых 7 (16,3%) пациентов благодаря вновь выявленным мутациям могут быть потенциальными кандидатами на таргетную терапию или клинические испытания [69].

Последовательный мониторинг циркулирующей опухолевой ДНК при метастатическом колоректальном раке выявляет динамический профиль возможных изменений, и таким образом может помочь в усовершенствовании механизмов принятия решений о тактике лечения для отдельных пациентов. Анализ исчезновения мутаций из цоДНК может предоставить основание для реиндукции схемы таргетной терапии [2]. Исследования роли цоДНК для оценки эффективности ХТ при метастатическом КРР приведены в таблице 7.

**Таблица 7** – Исследования посвященные роли цоДНК при оценке эффективности ХТ при метастатическом КРР

Исследование, год, число больных, популяция	Связь с прогрессированием, динамика изменений	Общая выживаемость при цоДНК+	Метод обнаружения цоДНК
Herbst A, 2017 [49] N=467 мКРР		цоДНК+ до лечения ОВ (ОР 51,86; 95% ДИ 1,37–2,53)	Флюоресцентная ПЦР
Tie J [120] n=52 мКРР	снижение ( $\geq 10$ -кратное) увеличивало ВБПБ (14,7 против 8,1 мес; ОР 1,87; $p = 0,266$ ).		NGS

Сао Н 2020 [24] N=43 мКРР	Изменение мутационного статуса плазмы крови коррелировало с прогрессированием заболевания.		NGS 605-генов
Wang C., 2020 [129] мКРР MSS (n=18)	повышение уровня цоДНК в 4-недельный период времени предсказывало прогрессирование опухоли через 2 месяца		NGS (Guardant360)
Holm M., 2020 [50] N=10 мКРР mKRAS	цоДНК+ ранний признак прогрессирования		ddPCR, Idylla
CLIMB360 J. Garcia-Corbacho, 2022 [42] 45 мКРР (321 всего)	Появление клинически значимых мутации у 13 пациентов (MSI-H(1), ATM(2), BRCA2(3), EGFR(1), ERBB2(2), MET(1), PIK3CA(3))		NGS (Guardant360)
Okamoto W., 2021 [89]	Медиана ВБПБ 3,1 месяца (1,4-5,6) в группе с позитивностью по HER2 в цоДНК.	ОВ 8,8 месяца (4,3-12,9) в группе с позитивностью по HER2 в цоДНК.	NGS
V. Zurlo, 2021 [137] N=70	Уровни цоДНК коррелировали с ростом метастазов (p=0,0019).		экзосомная ДНК
Loree J.M., 2021 [73] 406 мКРР	увеличение объема цоДНК из-за прогрессирования, изменения цоДНК отражающие клональную эволюцию в процессе терапии		NGS (Guardant360). 74 гена + MSI
Y. Lim, 2022 [69] N=62 (272 обр.) мКРР	медиана БРВ 11,8 месяцев при клиренсе цоДНК (+) против 4,7 месяцев при отрицательном клиренсе цоДНК, p <0,001).		NGS платформа 106 генов

Отдельной темой является возможность применения анализа цоДНК для оценки возможности реиндукции терапии анти EGFR [6]. В рамках многоцентрового исследования CHRONOS, посвященного назначению реиндукции анти-EGFR терапии на основании мониторинга мутационного статуса RAS, BRAF и EGFR в цоДНК, были проанализированы данные 27 больных с диким типом генов RAS и BRAF в цоДНК после проведения анти-EGFR терапии в любой линии, у которых сначала был достигнут объективный ответ, а затем зарегистрировано прогрессирование. При этом контроль заболевания удалось добиться у 59% больных (95% ДИ 41-78%). Медиана ВВП составила 16 недель, а средняя продолжительность ответа - 17 недель. Исследователи пришли к выводу, что повторный анализ жидкой биопсии с антителами против EGFR приводит к дальнейшим объективным ответам у трети пациентов и генотипирование опухолевой ДНК в крови может быть рекомендовано к включению в рекомендации для подбора поздних линий химиотерапии [104]. Сходные результаты отмечаются в ряде других исследований [19, 21, 31, 47, 96, 98] (Таблица 8).

Таким образом, еще одной перспективной опцией можно считать использование цоДНК в качестве субстрата геномной информации для прогнозирования эффективности терапии.

**Таблица 8** – Исследования, посвященные роли цоДНК при оценке эффективности ХТ при метастатическом КРР

Исследование, год	число больных, популяция	Проведенное лечение	Результаты	Метод обнаружения цоДНК
Bettegowda С., 2014 [19]	n=24 мКРР	анти-EGFR терапия	у 96% пациентов с прогрессированием заболевания после объективного ответа на анти-EGFR терапию, появились мутации в генах MAPK-киназного пути.	ddPCR, NGS

Cremolini C, 2019 [31]	N=27 мКРР wtRAS и wtBRAF	Иринотекан+ анти-EGFR терапия	Мутации RAS обнаружены у 48%. При частичном ответе мутаций RAS не обнаружено. wtRAS в цоДНК ВБП 4,0 против 1,9 месяцев с mRAS; ОР 0,44; 95% ДИ 0,18-0,98; p= 0,03.	ddPCR, NGS
Gupta R, 2020 [47]	N=75 мКРР	анти-EGFR терапия	появление множества новых изменений, влияющих на путь EGFR: мутации EGFR и RAS, а также амплификации генов MET, RAS и BRAF.	ddPCR, NGS
Sartore-Bianchi A., 2021 [104]	N=16 мКРР mRAS	1-3 линии без анти-EGFR терапии	Медиана ВБП 8,2 месяца (95% ДИ 4,5 – 11,8) с wtRAS в цоДНК, по сравнению с 3,5 месяцами (95% ДИ 2,1 – 4,9) у пациентов с mRAS в цоДНК (p < 0,001). Медиана ОВ 22,3 месяца (95% ДИ 17,3 - 27,3) с wtRAS в цоДНК, против 4,7 месяцев (95% ДИ 2,6 - 6,7, p = 0,013) с mRAS в цоДНК.	ddPCR, NGS
Bouchahda M., 2021 [21]	N=27 мКРР wtRAS и wtBRAF	анти-EGFR терапия	Контроль заболевания 59%; 95% ДИ 41-78%. Медиана ВБП 16 недель. Средняя продолжительность ответа 17 недель	ddPCR, NGS
M. Puzzone, 2021 [96]	N=26 мКРР wtRAS и wtBRAF	Реиндукция анти-EGFR терапии	эффективность цоДНК в качестве критерия молекулярного отбора для проведения реиндукции анти-EGFR терапии	PyroMark Q24 MDX), (ABI3130) (Idylla) и ddPCR (система QX200)

CALGB/SWOG 80405 2022 [98]	N=133 мКРР wtRAS и wtBRAF	Группа анти-EGFR терапии; Группа бевацизума ба	у 11 (15,3%) и 5 (8,2%) развились приобретенные альтерации (ОР 2,0, P = 0,29) в группах бевацизумаба и цетуксимаба соответственно	ddPCR, NGS
-------------------------------	------------------------------------	---	---	---------------

### 1.9 Продолжающиеся исследования

На момент написания литературного обзора проводился ряд исследований, результаты которых еще не получены (Таблица 9).

MEDOCC-Create – из Нидерландов, посвященное выявлению пациентов с минимальной остаточной болезнью после операции по поводу II стадии КРР. Планировалось изучить подгруппу, состоящую из 1320 пациентов с II стадией без показаний к проведению адъювантной химиотерапии, которые должны быть рандомизированы 1:1 в экспериментальную и контрольную группы. Обнаружение цоДНК проводится с использованием платформы PGDX elio™. Пациентам с обнаруживаемой цоДНК будет предложено проведение АХТи, в то время как пациенты без цоДНК и контрольная группа будут проходить стандартное наблюдение. Планируется получить данные о предикторной роли цоДНК при II стадии без других факторов риска и анализ влияния адъювантной ХТ на рецидивы в популяции высокого риска по данным цоДНК [106].

Схожий дизайн имеет исследование COBRA. На базе такой же популяции пациентов (рак толстой кишки II стадии без традиционных факторов высокого риска прогрессирования) (N=1408) исследователи из США и Канады предполагают сравнить наблюдение (Группа А) или проспективное тестирование на цоДНК (группа В) с помощью панели GuardantHealth LUNAR. Пациенты в группе В с обнаруженной цоДНК будут проходить 6-месячную АХТ (FOLFOX). Для всех пациентов в группе А статус цоДНК будет проанализирован ретроспективно. Первичными конечными точками является БРВ [84].

Параллельно идет набор в исследование TRACC, в котором планируется сравнить принятие решений о тактике лечения больных на основании наличия цоДНК, с принятием решений в соответствии со стандартом медицинской помощи. В исследование планируется включить 810 пациентов с высоким риском II или III стадии КРР после проведения операции и положительным по цоДНК. Пациенты рандомизируются в соотношении 1:1 для получения либо стандартного лечения, либо АХТ на основании цоДНК: у пациентов с отрицательной цоДНК после операции объем химиотерапии уменьшается до 3 месяцев. При повторном обнаружении цоДНК через 3 месяца, пациенты получают 3 месяца САРОХ. Основной конечной точкой является 3-летняя выживаемость без признаков болезни [13].

На ASCO GI 2022 года были представлены первые результаты исследования GALAXY – крупнейшей на настоящий момент работы, посвященной роли цоДНК при МРЗ, о которой рассказывалось в соответствующем разделе. Авторы приходят к выводу, что принятие решений о послеоперационном лечении с использованием анализа цоДНК поможет выявить пациентов, которые получают выигрыш от назначения адъювантной терапии при всех стадиях КРР, не исключая II. Стратегию адъювантной терапии, основанной на цоДНК планируется разработать в ходе текущих рандомизированных исследований VEGA и ALTAIR. [62] Задача исследования VEGA доказать, что тактика наблюдения в группе высокого риска II стадии, и низкого риска III стадии не хуже проведения адъювантной терапии при отсутствии цоДНК после операции [135]. Цель исследования ALTAIR в оставшейся группе пациентов с II/III и IV стадией с резектабельными метастазами при сохранении позитивной цоДНК после проведения стандартной адъювантной терапии лечения продемонстрировать превосходство трифлуридина/типирацила по сравнению с плацебо [134].

Целью еще одного текущего протокола является определение возможности оценки ответа опухоли с помощью цоДНК у пациентов с местно-распространенным РПК, проходящих тотальную НАХТ. Планируется исследование исходных данных цоДНК (в течение 1 недели до начала

неoadьювантной терапии), после 4 циклов, после 8 циклов и от 1 до 14 дней до тотальной мезоректумэктомии. Уровни цоДНК будут измеряться с помощью анализа Signatera, и реакция цоДНК будет определяться как снижение уровня более чем на 90% ниже исходного. Планируется оценить корреляцию между скоростью ответа, оцененной с помощью цоДНК и МРТ после 4 и 8 циклов терапии, а также корреляцию со скоростью достижения полного патоморфологического ответа [25].

Также анонсировано крупное многоцентровое проспективное наблюдательное исследование по изучению МРЗ при помощи цоДНК. Планируется включить 1000 пациентов с резектабельным КРР (II - IV стадии), которым проводится химиотерапия. Серийные образцы будут собираться в ключевые моменты времени до момента рентгенологического прогрессирования или до 5 лет наблюдения. Забор крови будет проводиться в начале исследования, после неoadьювантной терапии, после операции, во время и после адьювантной терапии в дополнение к каждому посещению для наблюдения. Образцы будут оцениваться ретроспективно с основной целью оценки чувствительности и специфичности послеоперационной МРЗ для рентгенологических рецидивов с использованием анализа Reveal компании Guardant Health. Другие ключевые цели включают оценку кинетики цоДНК при неoadьювантной и адьювантной терапии и корреляцию с результатами лечения [32].

**Таблица 9** – Продолжающиеся исследования посвященные роли цоДНК при колоректальном раке

Автор, год, число пациентов	Популяция пациентов	Метод обнаружения цо ДНК	Цель
MEDOCС-Create ScOPaa SJ [106] N=1320 образцов	II стадия КРР	PGDx elio™	предикторная роль цоДНК при II ст, анализ влияния адьювантной ХТ на рецидивы в популяции высокого риска по данным цоДНК

TRACC Anandappa, G. [13] N=810 пациентов 1621 образцов	С высоким риском II или III стадии КРР	NGS-based 22-gene colorectal panel	сравнить принятие решений о тактике лечения больных на основании наличия цоДНК, с принятием решений по стандарту медицинской помощи.
COBRA Morris, V.K.; [84] N=1408 образцов	КРР II стадии без признаков высокого риска	GuardantHe alth LUNAR	Пациенты в группе В с обнаруженной цоДНК будут проходить 6-месячную АХТ (FOLFOX). Для всех пациентов в группе А статус цоДНК будет проанализирован ретроспективно.
VEGA (часть исследования GALAXY) [84] N=1249	II стадия, высокий риск, низкий риск III стадии	Signatera	Доказать, что наблюдение не хуже адьюванта при отсутствии цоДНК после операции
ALTAIR (часть исследования GALAXY) [84] N=240	Стадия II/III, IV стадия с резектабельными метастазами	Signatera	Продемонстрировать превосходство трифлуридина/типирацила по сравнению с плацебо у пациентов с положительной цоДНК после стандартной адьювантной терапии
(MiRDA-C). A. Dasari, [32] N=1000	Резектабельный КРР (II - IV стадии), проходящие терапию с лечебной целью	Reveal	Оценка чувствительности и специфичности послеоперационного МРЗ для рентгенологических рецидивов. Оценка кинетики цоДНК при неoadьювантной и адьювантной терапии и корреляция с результатами
S. Chakrabarti, [25] N=30	Местно-распространенный РПК Тотальная неoadьювантная ХЛТ	Signatera	Возможности оценки ответа опухоли с помощью цоДНК у пациентов с местно-распространенным раком прямой кишки, проходящих тотальную неoadьювантную ХЛТ

## **ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

Работа выполнена на базе онкологического отделения лекарственных методов лечения (химиотерапевтического) №2, хирургического отделения №3 (колопроктологии), хирургического отделения N7 (опухолей гепатопанкреатобилиарной зоны) НИИ клинической онкологии им. академика РАН и РАМН 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. С целью анализа частоты и структуры мутаций и конкордантности мутационного профиля первичной опухоли и цоДНК был сформирован банк данных, включавших в себя серийные образцы крови и блоки первичной (или метастатической) опухоли пациентов с КРР.

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 экспериментального государственного задания Министерства здравоохранения Российской Федерации.

### **2.1 Дизайн исследования**

Для выполнения задач работы нами было проведено проспективное нерандомизированное одноцентровое исследование. Критериями включения в исследование было наличие у пациента морфологически верифицированного колоректального рака на любой стадии заболевания. Все пациенты проходили лечение в НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина в период с 2016 по 2021 гг.

Критериями исключения являлись: отсутствие морфологической верификации опухоли, опухоль червеобразного отростка, опухоли тонкой кишки, метастазы опухолей других локализаций, а также отсутствие образцов крови или гистологического материала первичной опухоли для выполнения генетического анализа, низкое качество материала, любые другие первично-множественные опухоли, за исключением синхронного КРР.

С целью анализа частоты и структуры мутаций и конкордантности мутационного профиля первичной опухоли и цоДНК был сформирован банк данных, включавших в себя серийные образцы крови и блоки первичной (или метастатической) опухоли пациентов с КРР.

При этом для оценки чувствительности тест-системы выполнялись заборы крови пациентов в следующих случаях:

- 1) при локализованном заболевании – до и после хирургического лечения;
- 2) при местнораспространенном раке прямой кишки - до проведения химиолучевой терапии и после хирургического лечения;
- 3) при метастатическом раке – в случае метастазэктомии до и после хирургического лечения, в случае проведения химиотерапии – до начала 1 курса лечения и при прогрессировании.

Оценивалась частота мутаций, встречаемых в цоДНК плазмы крови, а также концентрация цоДНК в зависимости от стадии заболевания и проведенного лечения. По каждому из пациентов была собрана информация о клинико-морфологических характеристиках опухоли, проведенному лечению и факту развития прогрессирования после проведенного лечения, оценка общей выживаемости. На основании этих данных была сформирована база данных.

## **2.2 Конечные точки и оцениваемые показатели**

Первичной конечной точкой работы была оценка частоты определения цоДНК в крови пациентов с КРР.

К вторичным конечным точкам исследования относились:

1. Оценка частоты выявления и спектр мутаций при КРР различных стадий.

2. Изучение взаимосвязи клинико-морфологических параметров с наличием цоДНК в плазме крови при КРР.

3. Изучение конкордантности мутационного статуса опухолевого материала и цоДНК при КРР.

4. Проспективная оценка прогностического влияния цоДНК на годовичную выживаемость без признаков болезни при различных стадиях КРР.

5. Проспективная оценка прогностического влияния цоДНК на общую выживаемость при различных стадиях КРР

6. Изучение эффекта противоопухолевого лечения в зависимости от наличия цоДНК при различных стадиях КРР.

### **2.2.3 Формирование базы данных по пациентам, включенным в исследование**

С помощью программного обеспечения Microsoft Excel 2016 была создана база данных, включавшая информацию о клинических данных пациентов, включенных в исследование, морфологическую характеристику опухоли, данные о проведенном лечении. Необходимая информация собиралась на основании доступной медицинской документации из электронного архива НМИЦ онкологии им Н.Н. Блохина, телефонных контактов с пациентами. Анализ отдаленных результатов был проведен на основании анализа данных электронной медицинской карты пациента НМИЦ онкологии им Н.Н. Блохина, телефонных контактов, запросов в диспансеры и ЗАГС.

### **2.2.4 Определение циркулирующей опухолевой ДНК в образцах крови пациентов с КРР**

#### **2.2.4.1 Формирование коллекции образцов ДНК из опухолевых тканей и крови**

Для выполнения задач диссертационной работы была сформирована коллекция парных образцов тканевой и циркулирующей опухолевой ДНК, полученных от пациентов КРР.

Образцы тканевой опухолевой ДНК выделялись из фиксированных формалином парафиновых гистологических образцов опухоли, подобранных в

архиве НМИЦ онкологии им Н.Н.Блохина, полученных в результате биопсии, при резекции первичной опухоли или при удалении метастазов для пациентов, сдавших кровь на определение цоДНК. Основным требованием к гистологическому образцу было содержание опухолевых клеток в образце менее 10%. После выделения участков с опухолевой тканью осуществлялась нарезка материала для последующего генетического анализа. Выделение ДНК осуществлялось при помощи набора QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (Qiagen, Германия).

Забор образцов крови пациентов осуществлялся при локализованном КРР до и после хирургического лечения (на 7-10 сутки после операции), при местнораспространенном раке прямой кишки до проведения химиолучевой терапии и после хирургического лечения, при метастатическом раке – в случае метастазэктомии до и после хирургического лечения (на 7-10 сутки после операции), в случае проведения химиотерапии – до начала 1 курса лечения, при первом контрольном обследовании.

ЦоДНК выделялась из образцов плазмы крови, полученных от пациентов на различных этапах заболевания. Образцы крови забирались в пробирки, содержащие антикоагулянт ЭДТА. Образцы плазмы выделялась в течение 2 часов после забора крови. Далее проводилось центрифугирование образцов в течение 15 минут в ультрацентрифуге со скоростью 1200xg при комнатной температуре. Полученная плазма при помощи пипетки переносилась в новую пробирку Eppendorf без контакта с лейкоцитарным слоем - остаточный объем плазмы в первой пробирке не менее 10 мм. Пробирки маркировались уникальным кодом и далее хранились при температуре -20°C.

Критериями пригодности образцов плазмы для включения в дальнейший анализ были: объем – не менее 4 мл, отсутствие гемолиза. Минимально допустимая концентрация ДНК в образце составляла 0,6 нг/мкл.

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 - 0,5 копий мутантного ДНК в 1 мкл плазмы.

#### **2.2.4.2 Определение опухоль-специфических соматических мутаций в циркулирующей ДНК плазмы крови и парафиновых блоках пациентов с КРР при помощи капельной цифровой ПЦР и высокопроизводительного секвенирования**

Определение опухоль-специфических соматических мутаций в цоДНК проводилось с помощью ddPCR. У каждого пациента для определения цоДНК анализировалось от 1 до 5 образцов плазмы.

Перечень мутации в образцах опухолевой ДНК опухоли был определен при помощи полногеномного секвенирования тех областей ДНК, где располагаются наиболее часто встречающиеся при КРР соматические мутации. С целью обогащения NGS-библиотеки применялась мультиплексная ПЦР. Для выполнения секвенирования библиотек использовалась платформа MiniSeq (Illumina) и набор реагентов High output.

Методика проведения цифровой капельной ПЦР для анализа соматических мутаций, выбранных по результатам массового параллельного секвенирования ДНК опухолевых клеток и плазмы крови была разработана совместно с лабораторией фармакогеномики ИХБФМ СО РАН в рамках проведения научно-исследовательской работы «Разработка тест-системы для диагностики и мониторинга эффективности лечения злокачественных новообразований различной локализации на основе анализа циркулирующей в крови пациентов опухолевой ДНК».

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 расчёте 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.

### **2.2.5 Статистический анализ данных**

При расчёте 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.

С целью улучшения конкордантности мутационного статуса опухолевого материала и циркулирующей в крови опухолевой ДНК с 80 до 93%, при альфе 0,01 и мощности исследования 90%, для выполнения статистической гипотезы необходимо было сравнить первичную опухоль и циркулирующую в крови опухолевую ДНК как минимум у 90 больных.

Для подтверждения прогностического влияния наличия в крови циркулирующей опухолевой ДНК на выживаемость без признаков болезни, для подсчёта статистической гипотезы необходимо принять во внимание, что количество больных с позитивных по цоДНК составит 10% от всей популяции, для получения различий в 1-годичных показателях выживаемости без прогрессирования с 60 до 90%, длительности исследования 2 года, при альфа 0,01 и мощности исследования 90%, потерей данных 10% пациентов, для выполнения статистической гипотезы необходимо было включить в исследование минимум 265 пациентов. Так как при промежуточном анализе данных получено, что цоДНК после операции выявляется у 20%, количество пациентов, которых необходимо включить в исследование уменьшилось до 119.

Минимально допустимой концентрацией ДНК в образце плазмы считали 0,3 нг/мкл, а максимальной 10 нг/мкл, из-за общего низкого количества цоДНК в крови, при превышении уровня в 10 нг/мкл, образцы считались контаминированными ДНК лейкоцитов.

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

Медиана времени наблюдения при анализе значимости цоДНК как маркера МРЗ рассчитывалась при помощи программного обеспечения EXCEL как середина множества интервалов от даты забора крови либо до даты зарегистрированного прогрессирования, в случае отсутствия прогрессирования, до даты последнего визита на основании электронной карты пациента, информации из ЗАГС, даты последнего контакта с пациентом по телефону.

Выживаемость без признаков болезни (ВБПБ) рассчитывалась как интервал от даты операции до регистрации прогрессирования, смерти или последней даты наблюдения, общая выживаемость (ОВ) рассчитывалась от даты начала лечения до даты последнего визита на основании электронной карты пациента, информации из ЗАГС, даты последнего контакта с пациентом по телефону или смерти пациента.

Расчет выживаемости проведен с помощью метода Каплана-Майера. Сравнительный анализ выживаемости оценен при помощи лог-рангового 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  $p < 0,05$ .

## ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

### 3.1 Анализ частоты и спектра мутаций, выявленных в блоках и циркулирующей в крови опухолевой ДНК при КРР

Всего в базу данных было внесена информация о 556 больных (1497 образцов плазмы) (Рисунок 1).

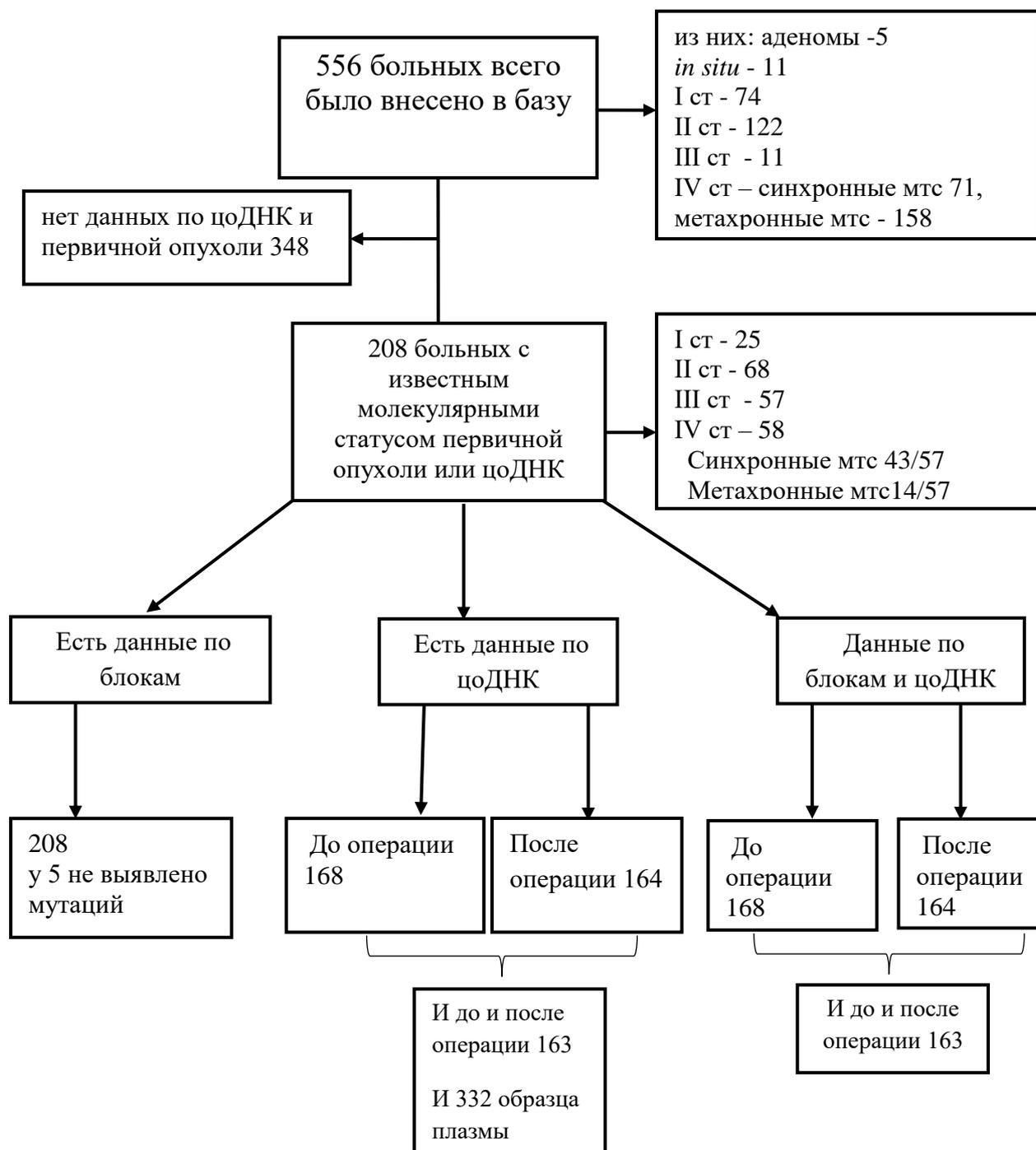


Рисунок 1 – Схема внесения образцов для формирования базы данных

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). Характеристика больных представлена в таблице 10, Остальные образцы от 345 пациентов не были доступны для анализа или качество образцов не позволяло провести анализ. Из 208 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 от 208 пациентов. Данные по цоДНК удалось получить в 332 образцах плазмы.

**Таблица 10** – Характеристика больных, включенных в анализ

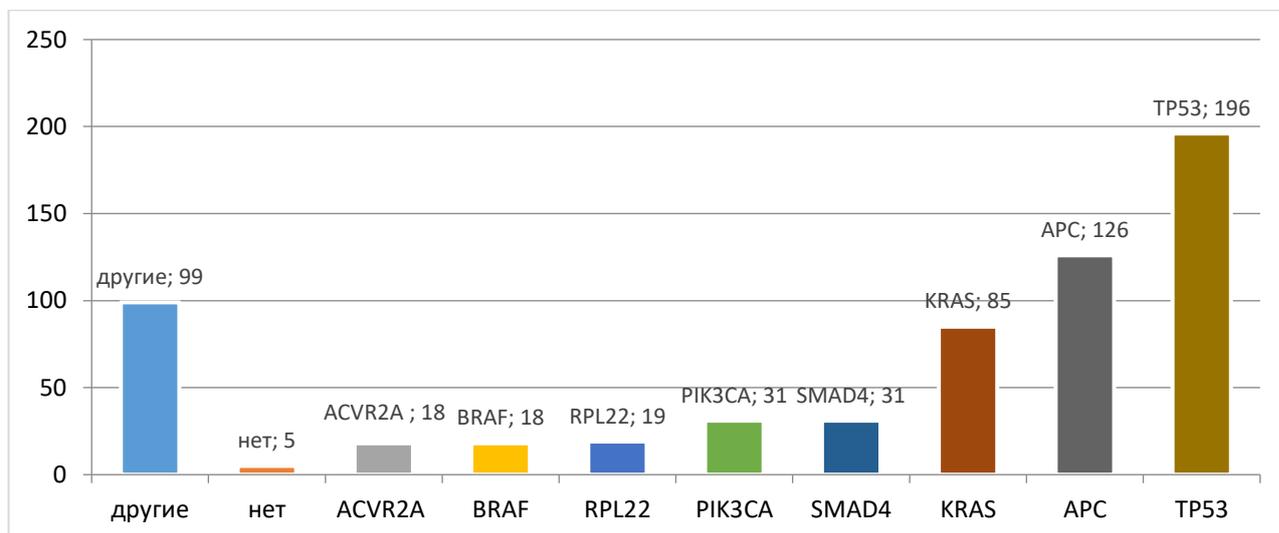
Характеристика	N(%)=208 (100%)
Возраст, в годах	
медиана	61 (23-87)
Пол: Женский	101 (48,6%)
Мужской	107 (51,4%)
Локализация	
Правая половина	56 (26,9%)
Левая половина	84 (40,4%)
Прямая кишка	68 (32,7%)
Гистологический тип опухоли	
Аденокарцинома	203 (97,6%)
Муцинозная аденокарцинома	5 (2,4%)
Степень дифференцировки	
Низкой степени злокачественности (G1-G2)	188 (90,4%)
Высокой степени злокачественности (G3-G4)	20 (9,6%)
Стадия	
I	25 (12,0%)
II	68 (32,7%)
III	58 (27,9%)

Метастатические	57 (27,4%)
синхронные	43/57 (75,4%)
метахронные	14/57 (24,6%)
Изолированные метастазы в легкие	4/57 (7,0%)
Изолированные метастазы в печень	24/57 (41,1%)
МРЗ после метастазэктомий	41/57 (72,0%)
Оценка эффективности ХТ	16/57 (28,0%)
T	
1	6 (2,9%)
2	26 (12,5%)
3	135 (64,9%)
4	38 (18,3%)
x	3 (1,4%)
N	
0	9 (4,74%)
1	107 (51,4%)
2	59 (28,43%)
x	33 (16,59%)
Первичное лечение, выполненное при заборе цоДНК	
химиотерапия	25 (12,0%)
лучевая терапия	8 (3,8%)
хирургия	175 (84,2%)

В материале блоков с опухолевой тканью при использовании разработанной тест системы 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, клиническая

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% (Рисунок 2).

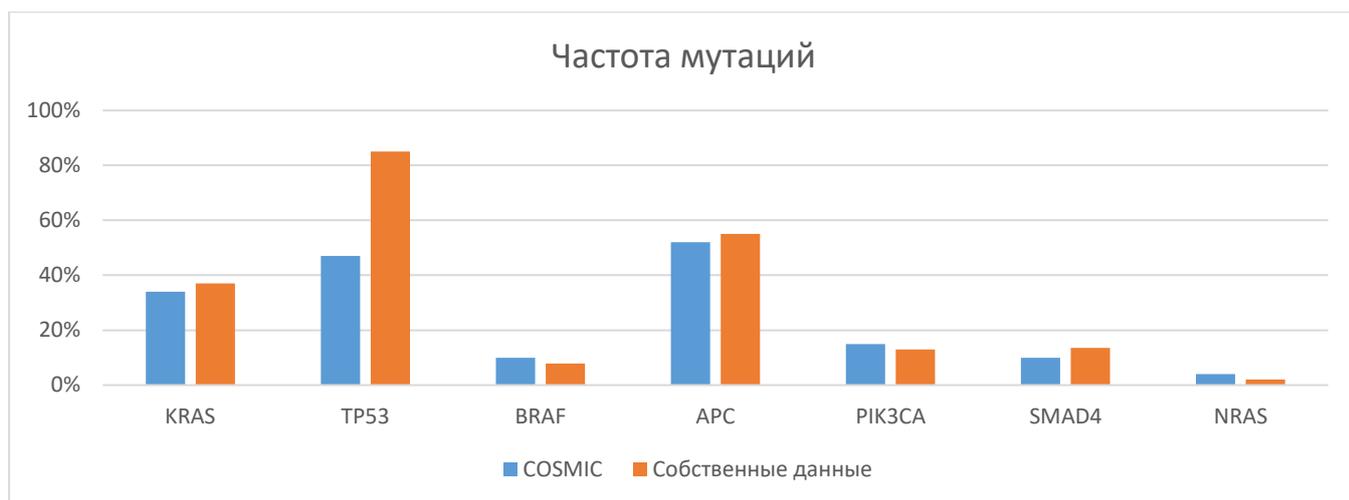


**Рисунок 2** – Распределение мутаций, найденных в образцах ДНК, которые были выделены из ткани опухоли

При сравнении встречаемости соматических мутаций с известной терапевтической значимостью в исследованных образцах тканей пациентов с КРР и базой COSMIC [30] (Рисунок 3), 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.

Разработанная тест система для выявления соматических мутаций имеет высокие показатели детекции ДНК-образцов. В 1 образце было определено 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)).

Данные по цвДНК удалось получить в 360 (из них в 28 образцах плазмы материала на определение мутаций не хватило из-за низкого покрытия NGS). Из 5 пациентов, у которых не было мутаций в блоке, в 8 образцах плазмы цвДНК было обнаружено, но в низких количествах <0,1 нг/мкл.



**Рисунок 3** – Сравнение встречаемости соматических мутаций, имеющих терапевтическое значение, в образцах рака толстой кишки из базы данных COSMIC и исследуемых образцах. По горизонтальной оси – соматические мутации, по вертикальной – доля образцов, содержащих данную соматическую мутацию

ЦвДНК была обнаружена в 66,7% (95% ДИ 59,7-73,1%) 124 из 186 в образцах до лечения, и в 59,8% (95% ДИ (52,4-66,9%)) – 104 из 174 образцов после операции. Суммарная чувствительность по выделению цвДНК составила 63,3% (95% ДИ (58,7-68,5%)) (228/360). Клиническая чувствительность тест системы для метастатического КРР составила 71,4% (95% ДИ (60,7-80,6%)).

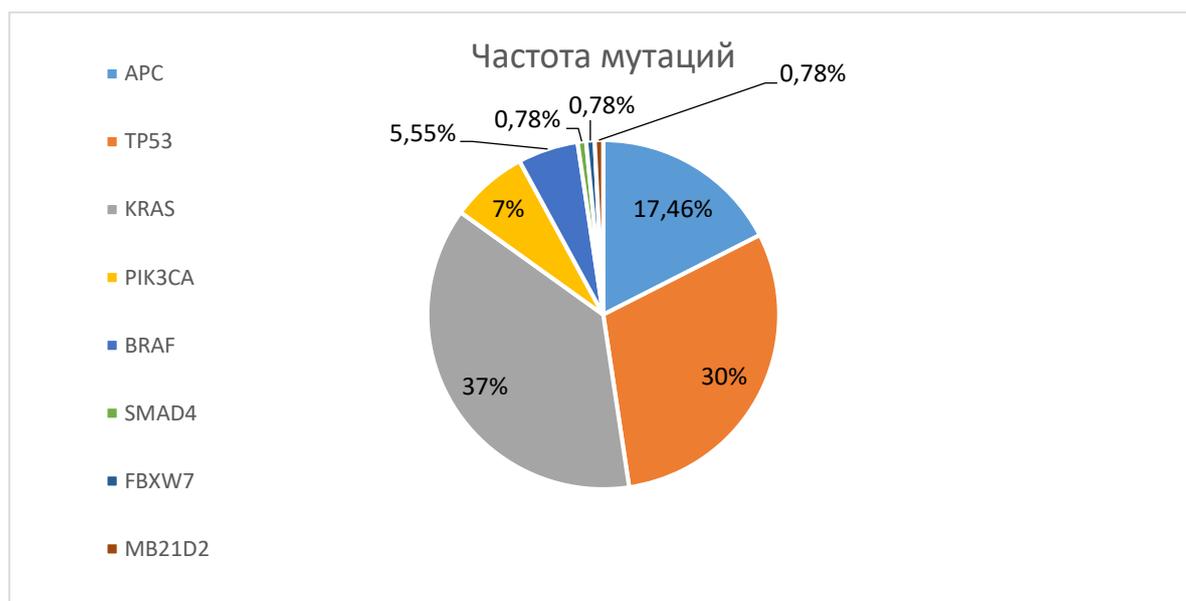
Для дальнейшего анализа цоДНК были отобраны 332 образца плазмы. Мутации в цоДНК были определены в 170 образцах плазмы: из них до лечения в 90 из 168 образцов и в 80 из 164 в плазме после проведенного лечения. Клиническая чувствительность для всех стадий 51,2% (95% ДИ 45,8-56,6%), для метастатического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

Максимальная чувствительность при определении цоДНК до лечения наблюдалось при Nx (87,5%, 95% ДИ 54,6-98,6%,  $p=0,013$ ). Наибольшая чувствительность при определении цоДНК до лечения наблюдалась при T4 (63,0%; 95% ДИ 44,2-79,1%, по сравнению с T1-3  $p=0,189$ ), при низкой дифференцировке опухоли (60,0%; 95% ДИ 35,3-81,2%,  $p=0,765$ ).

При этом показатели чувствительности статистически не различались в зависимости от проведенного на первом этапе лечения. При сравнении локализации первичной опухоли чувствительность была выше при

правостороннем расположении опухоли - 59,4% (95% ДИ 47,4-70,4%), для левосторонней 52,5% (95% ДИ 43,6-61,3%), для рака прямой кишки 46,3% (95% ДИ 37,7-55,2%), но статистически значимого различия не получено ( $p=0,088$ ).

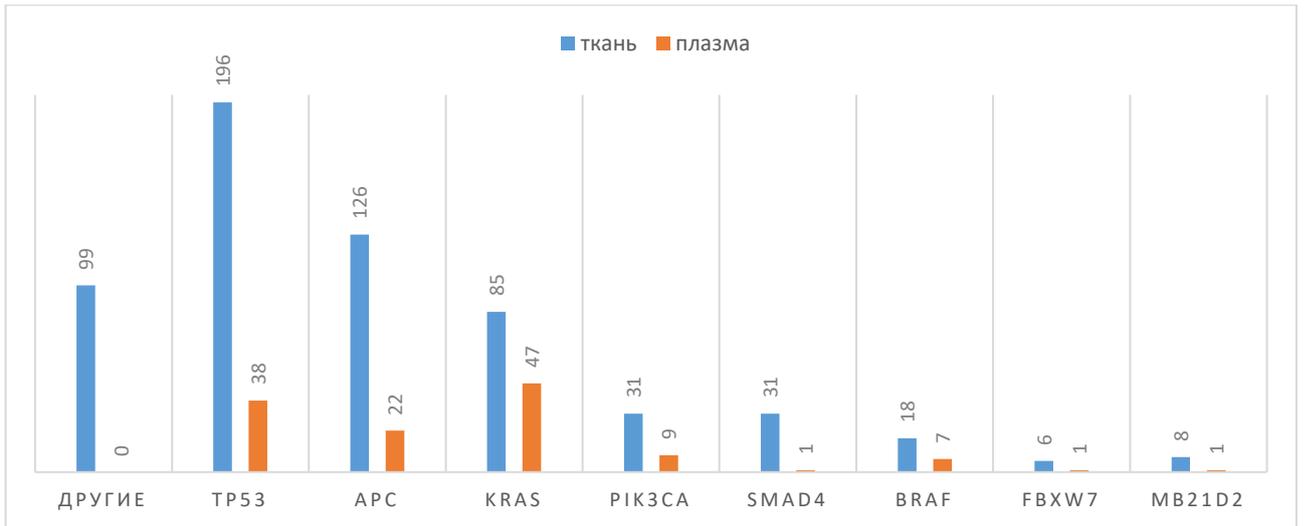
Всего в цоДНК удалось определить 126 мутации в 8 генах: *KRAS* (47 – 37,30%), *TP53* (38 – 30,16%), *APC* (22 – 17,46%), *PIK3CA* (9 – 7,14%), *BRAF* (7 – 5,55%) и по 1 (0,79%) *FBXW7*, *MB21D2*, *SMAD4* (Рисунок 4).



**Рисунок 4** – Распределение мутаций, найденных в образцах цоДНК

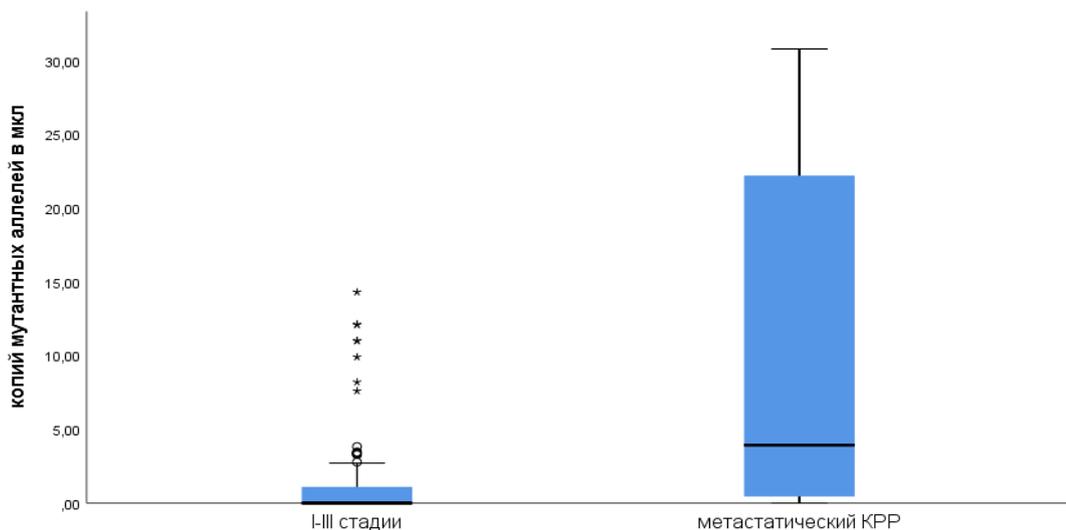
Все часто встречающиеся мутации удалось определить в цоДНК, при этом частота определения мутации *KRAS* была максимальна. Сравнение мутаций, в образцах первичной опухоли и в цоДНК представлены на рисунке 5.

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,  $p<0,001$ ) (Рисунок 6). Минимально допустимой концентрацией, при которой цоДНК в образце плазмы пациентов с I-III стадиями считали положительной, 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 положительной - 0,5 копий мутантного ДНК в 1 мкл плазмы.



**Рисунок 5** – Распределение мутаций, найденных в образцах ДНК из ткани опухоли и плазмы крови, по горизонтали встречающиеся мутации, по вертикали – абсолютное число определенных мутаций

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.



**Рисунок 6** – Распределение пациентов по концентрации цоДНК в плазме крови после операции (горизонтальная линия – медиана, границы прямоугольников – квартили, границы линий – 95% ДИ)

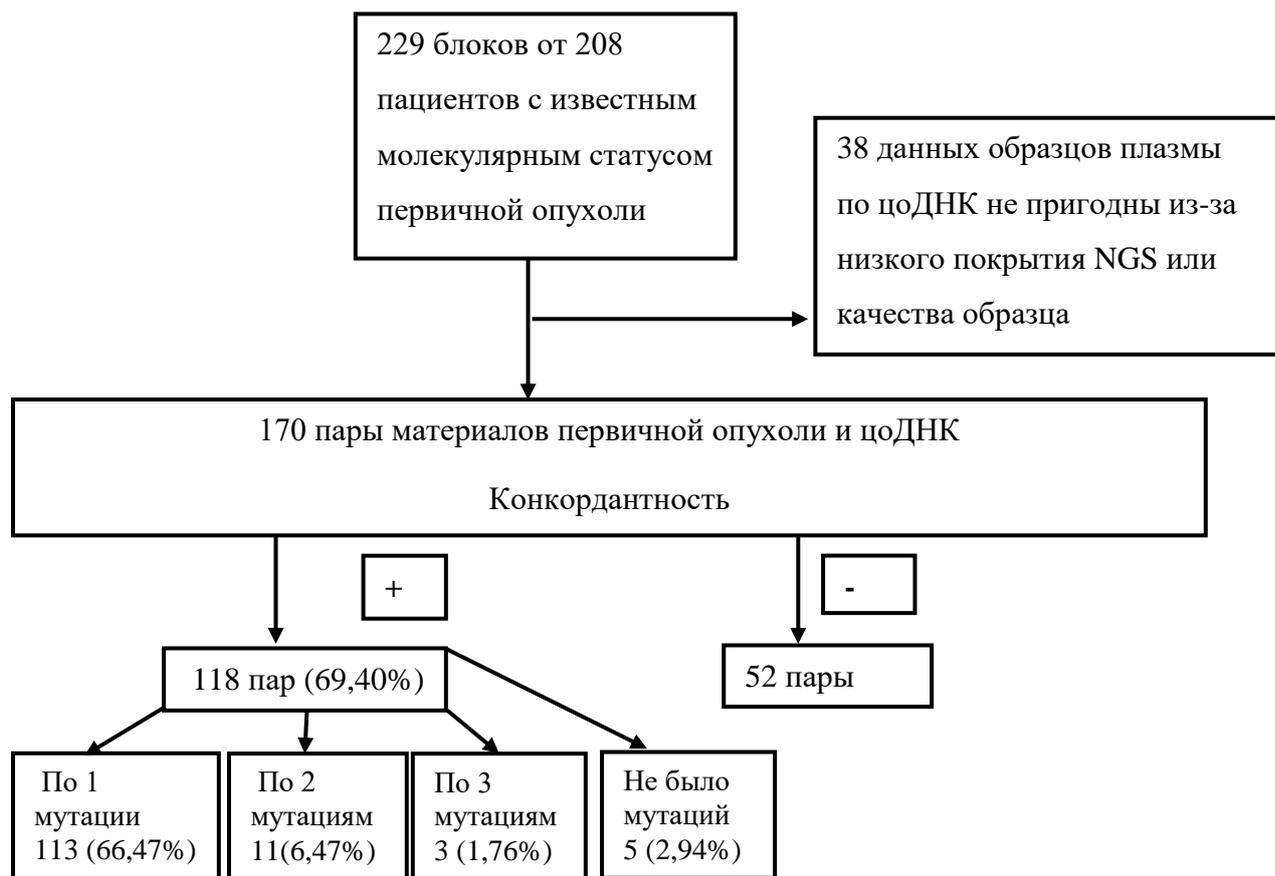
### 3.2 Оценка конкордантности мутационного статуса опухолевого материала и циркулирующей в крови опухолевой ДНК при КРР

При расчёте 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 по 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 (Рисунок 7).

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%). 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%) ( $p=0,030$ ) (Таблица 11).



**Рисунок 7** – Схема определения конкордантности

**Таблица 11** – 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%

Конкордантность по всем генам для ранних стадий (I-III) составила 65,4% (95% ДИ 57,1-73,1%) (Таблица 12).

**Таблица 12** – Конкордантность по всем генам

Стадия	Конкордантность по всем генам			
	Количество	% совпадения	95,0% Нижняя граница ДИ %	95,0% Верхняя граница ДИ %
I-III	87	65,4%	57,1%	73,1%
IV	31	83,8%	69,6%	92,9%

При анализе конкордантности по гену *KRAS* результаты были выше. Конкордантность для всех стадий составила 78,3% (95% ДИ 66,7-87,3%). Конкордантность для I стадии 71,4% (95% ДИ 35,2-93,5%), для II стадии 69,6% (95% ДИ 49,3-85,2%), для III стадии 84,2% (95% ДИ 63,6-95,3%), для IV стадии 90,9% (95% ДИ 64,7-99,0%) (Таблица 13).

**Таблица 13** – Конкордантность по гену *KRAS*

Стадия	Конкордантность по <i>KRAS</i>			
	Количество	% по строке	95,0% Нижняя граница ДИ %	95,0% Верхняя граница ДИ %
I	5	71,4%	35,2%	93,5%
II	16	69,6%	49,3%	85,2%
III	16	84,2%	63,6%	95,3%
IV	10	90,9%	64,7%	99,0%
Всего	47	78,3%	66,7%	87,3%

При анализе совпадений по гену *BRAF* конкордантность для всех стадий составила 75% (95% ДИ 39,4-90,7%). (Таблица 14) Конкордантность для всех стадий по гену *TP53* составила 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% (Таблицы 14-17).

**Таблица 14 – Конкордантность по гену BRAF**

Стадия	Конкордантность по BRAF			
	Количество	% по строке	95,0% Нижняя граница ДИ %	95,0% Верхняя граница ДИ %
I	1	100%	-	-
II	2	66,7%	17,7%	96,1%
III	1	50,0%	6,1%	93,9%
IV	3	75,0%	28,4%	97,2%
Всего	7	75,0%	39,4%	90,7%

**Таблица 15 – Конкордантность по гену APC**

Стадия	Конкордантность по APC			
	Количество	% по строке	95,0% Нижняя граница ДИ %	95,0% Верхняя граница ДИ %
I	2	28,6%	6,5%	64,8%
II	5	55,6%	25,4%	82,7%
III	5	55,6%	25,4%	82,7%
IV	10	100%	-	-
Всего	22	62,9%	46,3%	77,3%

**Таблица 16 – Конкордантность гену TP53**

Стадия	Конкордантность по TP53			
	Количество	% по строке	95,0% Нижняя граница ДИ %	95,0% Верхняя граница ДИ %
I	2	12,3%	6,5%	87,7%
II	13	40,7%	25,4%	80,1%
III	12	47,0%	25,4%	87,8%
IV	11	100%	-	-
Всего	38	71,7%	58,7%	82,4%

**Таблица 17 – Конкордантность гену PIK3CA**

Стадия	Конкордантность гену PIK3CA			
	Количество	% совпадения	95,0% Нижняя граница ДИ %	95,0% Верхняя граница ДИ %
I-III	4	57,1%	23,5%	86,1%
IV	5	83,3%	44,2%	98,1%
Всего	9	69,2%	42,3%	88,6%

При поиске критерия, при котором конкордантность будет наибольшей обнаружено, что 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%).

Величина конкордантности зависела от критерия N - для N2 82,1% (95% ДИ 65,2-92,8%) против N0 63,1% (95% ДИ 52,5-72,8%) ( $p=0,028$ ). Нужно отметить, что для категории Nx конкордантность была наибольшей 87,5% (95% ДИ 54,6-98,6%) что, очевидно, связано с большей распространенностью заболевания при неизвестных данных N, но статистической значимости получить не удалось из-за небольшого количества наблюдений с Nx ( $p = 0,096$ ).

Для генов BRAF и TP53 конкордантность при N2 была 100%, и для всех 4 генов: KRAS, BRAF, APC и TP53 100 % при Nx. Статистически значимого различия в конкордантности в зависимости от степени дифференцировки опухоли получено не было для G1-2 69% (95% ДИ 61,5-75,9%) против G3-G4 78,6% (95% ДИ 53,1%-93,6%) ( $p=0,440$ ), однако конкордантность для низкодифференцированных опухолей по KRAS, BRAF и TP53 составила 100%.

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.

### **3.3 Значение цоДНК как маркера МРЗ при I-III стадиях КРР**

#### **3.3.1 Прогностическое значение цоДНК при I-III стадиях КРР**

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 больных до операции и 10 после операции. При этом, 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%)). На первом этапе 92,5% больных было выполнено хирургическое лечение, у остальных была проведена НАХТ (4,8%) или ХЛТ (2,7%) по поводу местнораспространенного РПК.

Подробная характеристика больных представлена в таблице 18.

При выявлении положительной цоДНК после операции отмечена корреляция с критерием T (95% ДИ 0,05-0,24,  $p=0,041$ ) и N (95% ДИ 0,05-0,25,  $p=0,02$ ).

**Таблица 18** – Характеристика больных с I-III стадиями КРР, с данными в зависимости от статуса цоДНК

Характеристика больных с I-III КРР	Всего больных N (%)	С данными по цоДНК до операции N (%) = 120 (100%)			С данными по цоДНК после операции N (%) = 119 (100%)		
		цоДНК- 65 (54,2%)	цоДНК+ 55 (45,8%)	p	цоДНК- 73 (61,3%)	цоДНК+ 46 (38,6%)	p
Стадия AJCC (8-й пересмотр)							
I	25 (17,1%)	10 (15,4%)	9 (16,4%)	1,0	12 (16,4%)	7 (15,2%)	1,0
II	66 (45,2%)	27 (41,5%)	27 (49,1%)	0,63	36 (49,3%)	20 (43,5%)	0,74
ПА без факторов риска	33	14	7	0,35	16	6	0,6
ПА с 1 фактором риска	18	8	10	0,46	11	7	0,79
ПА с 2 и > факторами риска	8	4	5	0,73	6	3	1,0
ПВ	7	1	5	0,1	2	4	0,19
III	55 (37,7%)	28 (43,1%)	19(34,5%)	0,6	25 (34,3%)	19 (41,3%)	0,71
T							
1	6 (4,1%)	2 (3,1%)	3 (5,5%)	2 (3,1%)	3 (5,5%)	2 (4,3%)	1,0
2	27 (18,5%)	11 (16,9%)	9 (16,4%)	11 (16,9%)	9 (16,4%)	7 (15,2%)	0,8
3	96 (65,8%)	46 (70,7%)	35 (63,6%)	46 (70,7%)	35 (63,6%)	30 (65,2%)	0,88
4	17 (11,6%)	6 (9,2%)	8 (14,5%)	6 (9,2%)	8 (14,5%)	7 (15,3%)	0,22

Продолжение таблицы 18

N							
0	91 (65,8%)	38 (58,4%)	35 (63,6%)	38 (58,4%)	35 (63,6%)	28 (65,1%)	0,22
1	40 (27,4%)	21 (32,3%)	13 (23,6%)	21 (32,3%)	13 (23,6%)	12 (27,9%)	1,0
2	15 (10,3%)	6 (9,2%)	7 (12,7%)	6 (9,2%)	7 (12,7%)	6 (14%)	0,54
Возраст, в годах (медиана)	62 (28-87)	60 (22-87)	63 (35-81)	1,0	62 (22-87)	61 (37-82)	1,0
Пол Женский	72 (49,3%)	36 (55,4%)	25 (45,5%)	0,63	36 (49,3%)	21 (45,7%)	0,86
Мужской	74 (50,7%)	29 (44,6%)	30 (54,5%)	0,63	37 (50,7%)	25 (54,3%)	0,87
Локализация							
Правые отделы	37 (25,3%)	18 (27,7%)	11 (20%)	0,53	17 (23,3%)	10 (21,8%)	1,0
Левые отделы	61 (41,8%)	24 (36,9%)	23 (41,8%)	0,73	31 (42,5%)	18 (39,1%)	0,86
Прямая кишка	48 (32,9%)	23 (35,3%)	21 (38,2%)	0,86	25 (34,2%)	18 (39,1%)	0,72
Гистологический тип							
Аденокарцинома	142 (97,3%)	63 (96,9%)	54 (98,2%)	1,0	70 (95,9%)	46 (100%)	0,89
Муцинозная аденокарцинома	4 (2,7%)	2 (3,1%)	1 (1,8%)	1,0	3 (4,1%)	0 (%)	0,29
Степень дифференцировки							
G1-G2	133 (91,1%)	60 (92,3%)	50 (90,9%)	1,0	67 (91,8%)	44 (95,7%)	0,89
G3-G4	13 (8,9%)	5 (7,7%)	5 (9,1%)	1,0	6 (8,2%)	2 (4,3%)	0,7
Первичное лечение							
химиолучевая терапия	4 (2,7%)	2 (3,1%)	2 (3,6%)	1,0	2 (2,7%)	2 (4,3%)	0,64
химиотерапия	7 (4,8%)	3 (4,6%)	3 (5,5%)	1,0	3 (4,1%)	3 (6,5%)	0,67
хирургия	135 (92,5%)	60 (92,3%)	50 (90,9%)	1,0	68 (93,2%)	41 (89,1%)	0,89

Продолжение таблицы 18

НАХТ	11 (7,5%)	6 (9,4%)	4 (7,1%)	0,76	4 (5,5%)	6 (13%)	0,2
I стадия	1/25 (4%)	1/10	0/9	1,0	1/12	0/7	1,0
II стадия	5/66 (7,6%)	2/27	3/27	0,66	1/36	4/20	0,073
III стадия	5/55 (9%)	3/28	1/19	0,63	2/25	2/19	1,0
Режим							
XELOX (4 курсов)	8	3	2		1	4	
XELOX (8 курсов)	2	0	1		0	1	
FOLFOX (12курсов)	1	1	0		1	0	
АХТ	63 (43%)	29 (45,3%)	23 (41,1%)	0,87	26 (35,6%)	25 (54,2%)	0,24
II стадия	17/66(25,8%)	4/27	9/27	0,14	7/36	8/20	0,24
XELOX (4 к)	6	0	4		2	3	
XELOX (6-8 к)	5	1	2		0	3	
Капецитабин	6	3	2		5	1	
Нет данных о АХТ	5/66(7,6%)	0	1		0	1	
III стадия	46/55(83,6%)	25/28	14/19	0,35	19/25	17/19	0,82
XELOX (4 к)	27	16	10		13	10	
XELOX (6-8 к)	13	4	3		3	4	
FOLFOX (12 к)	1	1	0		1	0	
Капецитабин	5	4	0		2	2	
Отказались от АХТ	1/55 (1,8%)	0	1		0	1	
Нет данных о АХТ	8/55(14,5%)	3	5		6	2	

Положительные данные цоДНК до операции выявлены у 55 из 120 больных (45%), а после операции выявлены у 46 из 119 (38,6%) (Таблица 19).

**Таблица 19** – 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		

Данные о прогрессировании заболевания известны у 119 пациентов. Данные о прогрессировании в зависимости от статуса цоДНК при выявлении МРЗ в зависимости от стадии представлены в таблице 20.

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 до операции составила 72,7% (95% ДИ 54,5-86,7%), специфичность 64,4% (95% ДИ 53,4-74,4%), PPV 43,64% (95% ДИ 35,3-52,4%), NPV 86,2% (95% ДИ 77,7-91,7%), точность 66,7% (95% ДИ 57,5-75%).

**Таблица 20** – Прогрессирование в зависимости от статуса цоДНК при выявлении МРЗ по стадиям

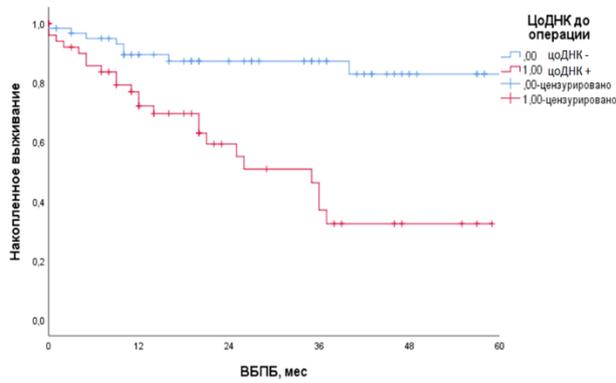
	Без прогрессирования	Прогрессирование	Всего
I стадия	статус цоДНК после операции		МРЗ в 35%
цоДНК-	13(72,2%)	0	20
цоДНК+	4(27,7%)	3(100%)	
p	0,025		
II стадия	цоДНК после операции		МРЗ в 35%
цоДНК-	36(83,7%)	0	56
цоДНК+	7(16,3%)	13(100%)	
p	<0,001		
III стадия	цоДНК после операции		МРЗ в 44%
цоДНК-	21(80,8%)	3(17,6%)	43
цоДНК+	5(19,2%)	14(82,4%)	
p	<0,001		

Чувствительность тест системы по определению цоДНК для выявления прогрессирования при I-III стадиях после операции составила 90,9% (95% ДИ 75,7-98,0%), 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%).

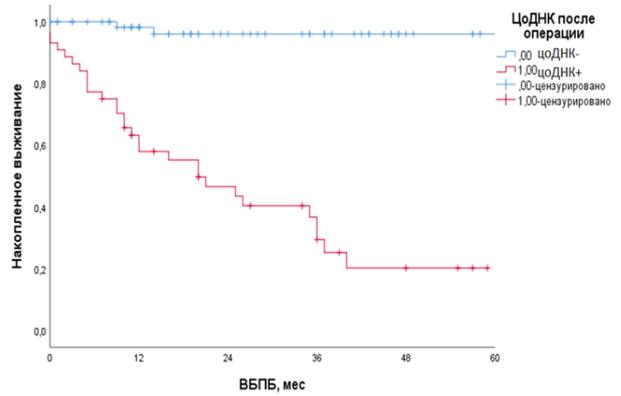
### 3.3.2 Влияние выявления цоДНК на выживаемость пациентов

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 8).

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 9).

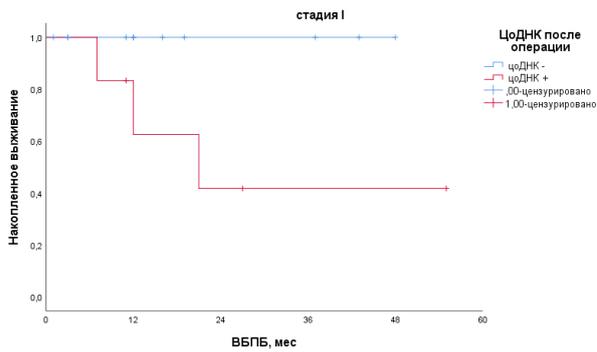


**Рисунок 8** – ВБПБ в зависимости от наличия цоДНК до операции при I-III стадиях

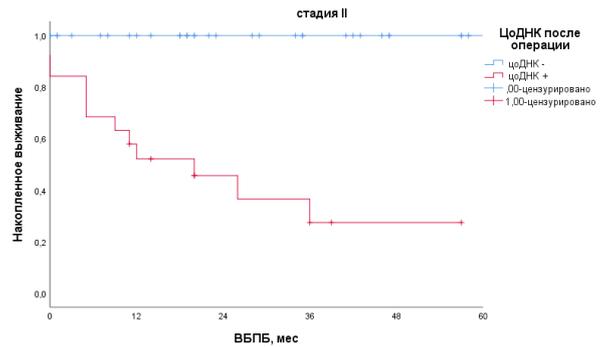


**Рисунок 9** – ВБПБ в зависимости от наличия цоДНК после операции при I-III стадиях

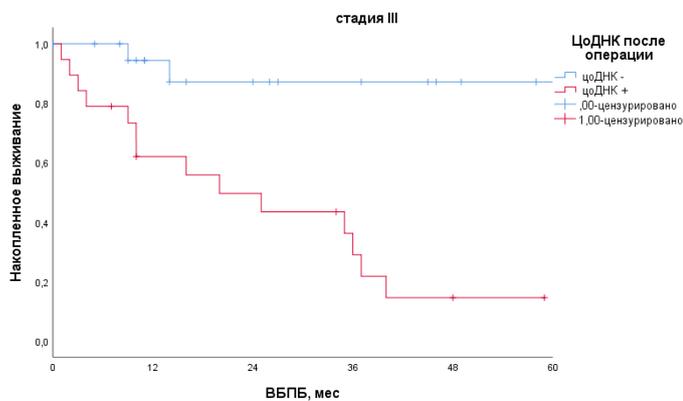
На графиках представлены данные ВБПБ отдельно для стадий I, II и III. (Рисунок 9-11)



**Рисунок 9** – ВБПБ в зависимости от наличия цоДНК после операции при I стадии



**Рисунок 10** – ВБПБ в зависимости от наличия цоДНК после операции при II стадии



**Рисунок 11** – ВБПБ в зависимости от наличия цоДНК после операции при III стадии

В таблице 21 представлены данные для I, II и III стадий по 1, 2, 3 годичной ВБПБ в зависимости от уровня цоДНК до и после операции.

**Таблица 21** – 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%

При однофакторного регрессионного анализа Кокса, на ВБПБ влияли стадия заболевания, T, N, цоДНК до и после операции – таблица 22.

При проведении многофакторного анализа наличие положительной цоДНК после операции явилось независимым предиктором прогрессирования для I-III стадии КРР ( $\beta$  3,048 ОР=21,07; 95% ДИ 4,85-91,54,  $p < 0,001$ )

**Таблица 22** – Результаты однофакторного анализа факторов, влияющих на ВБПБ при локализованном КРР

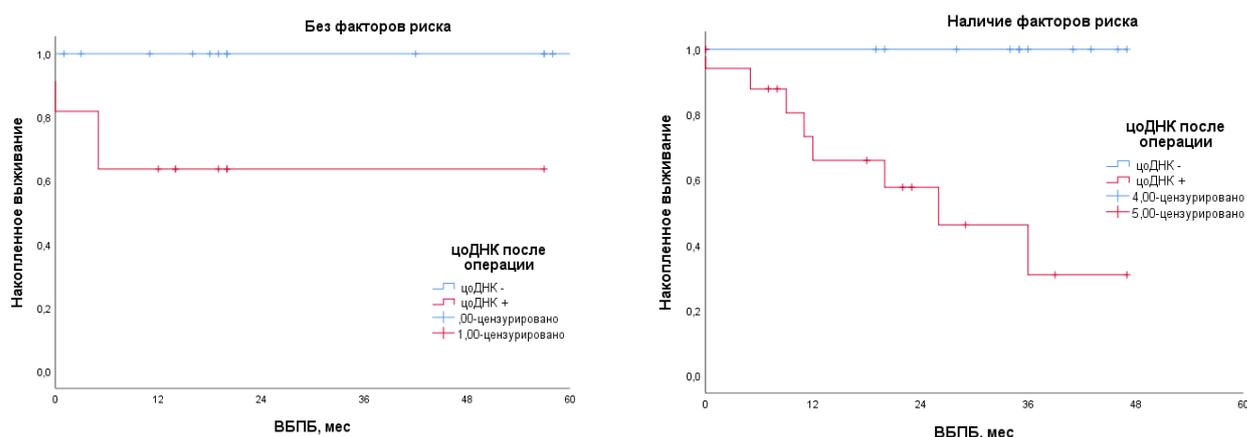
	B	P	ОР	ДИ 95,0% для ОР	
				Нижняя	Верхняя
T	0,424	0,186	1,527	0,816	2,860
N	0,262	0,531	1,299	0,573	2,948
Стадия	0,020	0,969	1,020	0,377	2,757
ЦоДНК до операции	0,786	0,072	2,196	0,932	5,172
ЦоДНК после операции	2,890	0,000	17,987	4,087	79,161

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 (OR=6,7; 95% ДИ 1,46-31,5,  $p<0,014$ ).

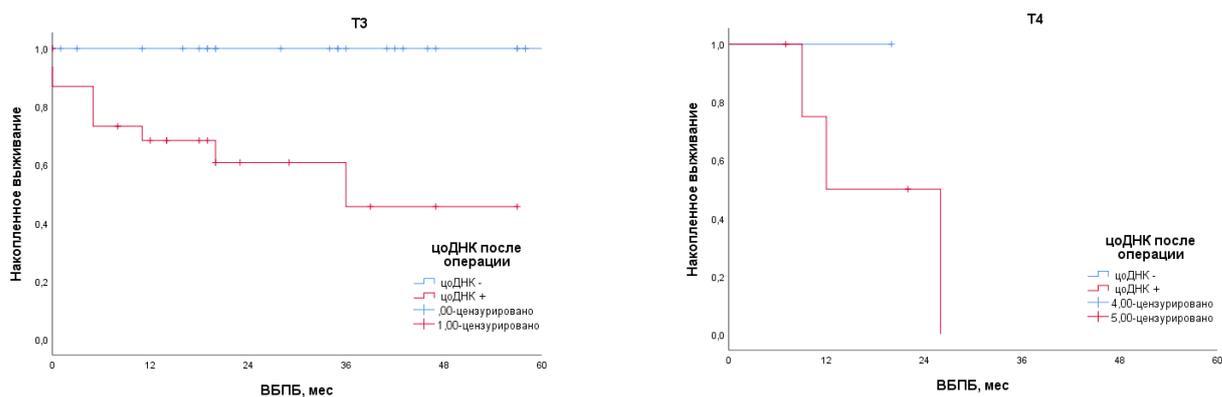
При проведении многофакторного анализа положительная цоДНК после операции явилась независимым предиктором прогрессирования для II стадии КРР ( $\beta$  1,9 OR=6,79; 95% ДИ 1,4-31,47,  $p<0,014$ ).

Для того, чтобы определить в какой группе больных определение цоДНК может выявить прогрессирование лучше традиционных факторов риска (ФР) больные были разделены на группы – без ФР, и с ФР. В каждой из групп был оценен статус цоДНК. Статистически значимых различий получить не удалось OR=1,3; 95% ДИ 0,9-1,7,  $p=0,12$ , однако даже при наличии факторов риска результаты для группы отрицательной цоДНК очень позитивные (Рисунок 12).



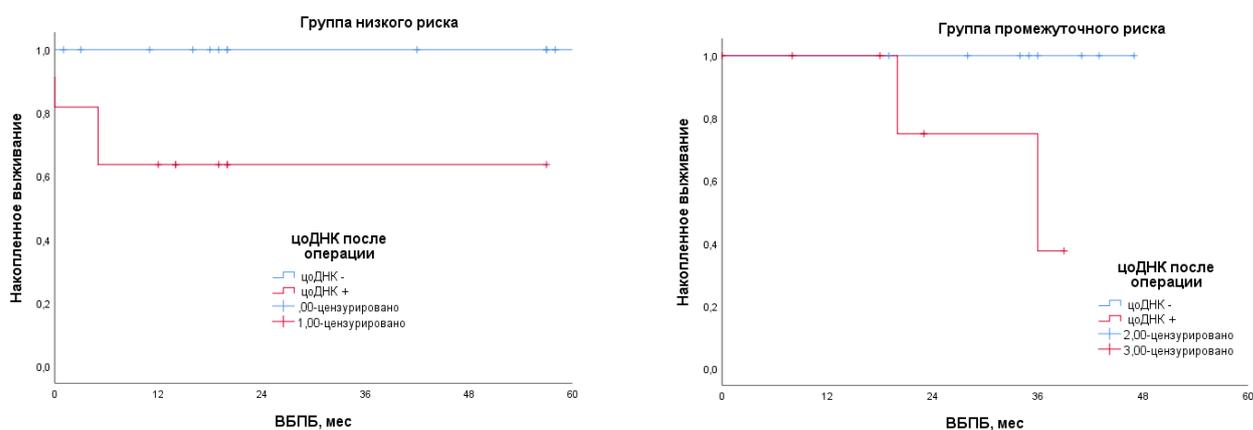
**Рисунок 12** – ВБПБ в зависимости от наличия цоДНК и факторов риска после операции при II стадии

Статистически значимых различий удалось добиться при разделении на группы по критерию T (в 1 группе больные с T3, во 2 T4, в каждой из групп также был оценен статус цоДНК). При этом OR составило 1,45; 95% ДИ 1,1-1,9,  $p=0,008$  (Рисунок 13).



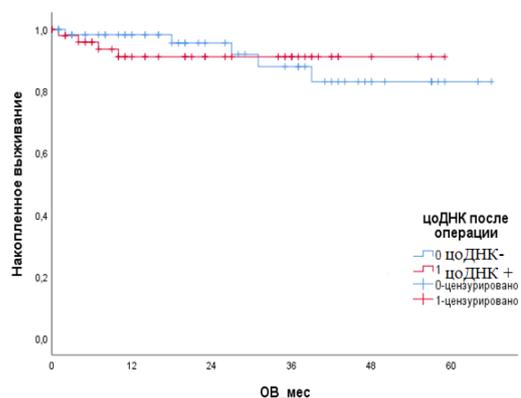
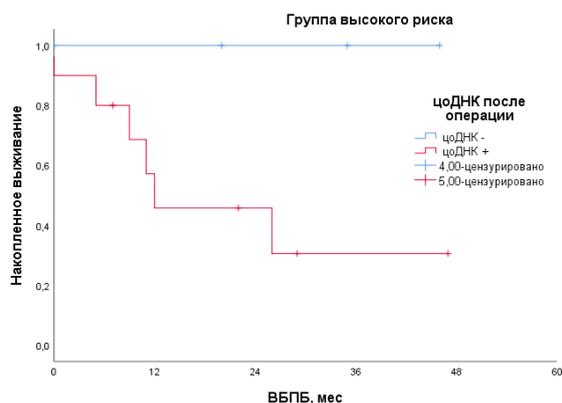
**Рисунок 13** – ВБПБ в зависимости от наличия цодНК при разделении на группы по критерию Т

Статистически значимых различий удалось добиться при разделении на 3 группы – низкого риска (без ФР), промежуточного риска (1 ФР) и группу высокого риска (2 и более ФР или Т4) (в каждой из групп также был оценен статус цодНК). При этом ОР составило 1,5; 95% ДИ 1,07-2,0,  $p=0,017$  (Рисунки 14-15).



**Рисунок 14** – ВБПБ в зависимости от наличия цодНК после операции при разделении на группу низкого, промежуточного и группу высокого риска

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 (Рисунок 16).



**Рисунок 15** – ВВПБ в зависимости от наличия цоДНК после операции при разделении на группы низкого, промежуточного и группы высокого риска

**Рисунок 16** – ОВ в зависимости от динамики цоДНК после операции при выявлении МРЗ при I-III стадиях

### 3.3.3 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:

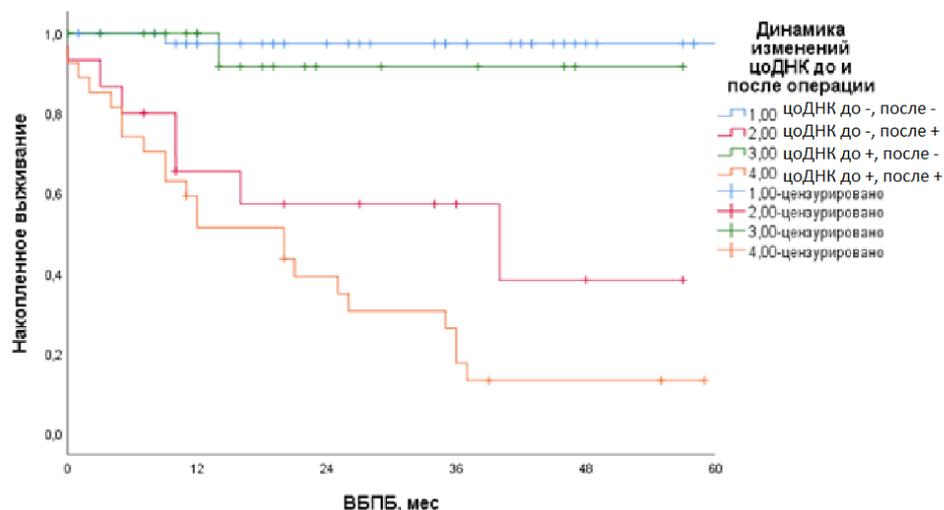
- 1) с отсутствием цоДНК и до и после операции,
- 2) с отсутствием цоДНК до операции, но появлением после,
- 3) с наличием цоДНК до операции, и отсутствием после,
- 4) с наличием цоДНК и до и после операции.

Данные динамики изменений цоДНК до и после операции имелись у 112 пациентов (Таблица 23).

**Таблица 23** – Динамика изменения цоДНК до и после операции

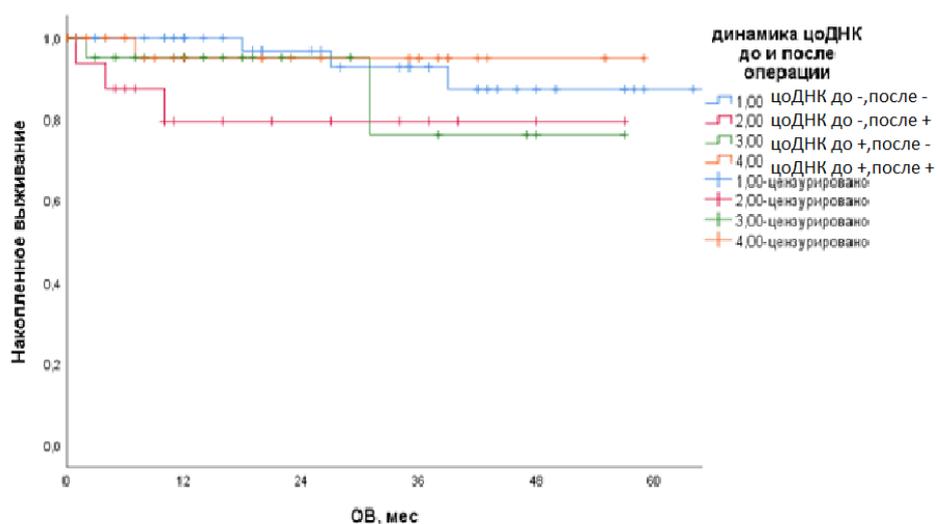
цоДНК до операции	цоДНК после операции	I стадия 18	II стадия 52	III стадия 42	Всего 112
-	-	7(38,9%)	22(42,3%)	16(38,1%)	45(40,2%)
-	+	2(11,1%)	5(9,6%)	9(21,4%)	16(14,3%)
+	-	4(22,2%)	12(23,1%)	7(16,7%)	23(20,5%)
+	+	5(27,8%)	13(25%)	10(23,8%)	28(25%)

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 17).



**Рисунок 17** – ВБПБ в зависимости от динамики цодНК до и после операции при I-III стадиях

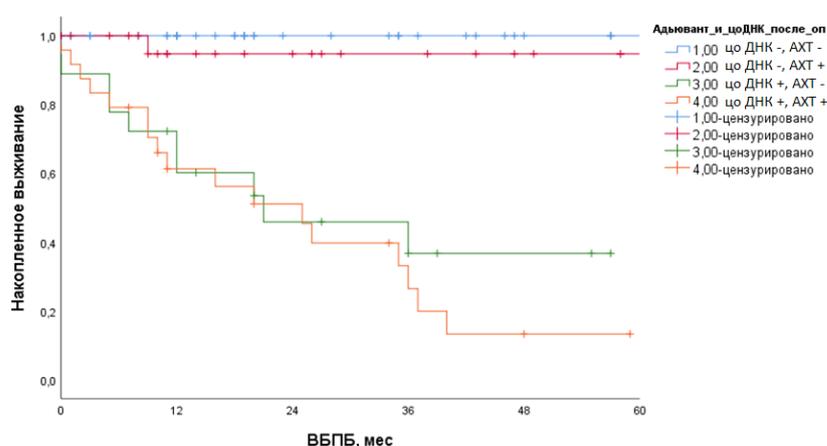
При I-III стадиях динамика изменения цодНК не влияла на ОВ (ОР 0,97; 95% ДИ 0,57-1,6,  $p = 0,91$ , что, скорее всего, связано с малым числом событий ( $n=9$ ) (Рисунок 18).



**Рисунок 18** – ОВ в зависимости от динамики цодНК до и после операции при выявлении МРЗ при I-III стадиях

### 3.3.4 Эффективность адъювантной химиотерапии в зависимости от выявления 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 (Таблица 24). 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 ( $p=0,34$ ) (Рисунок 19).

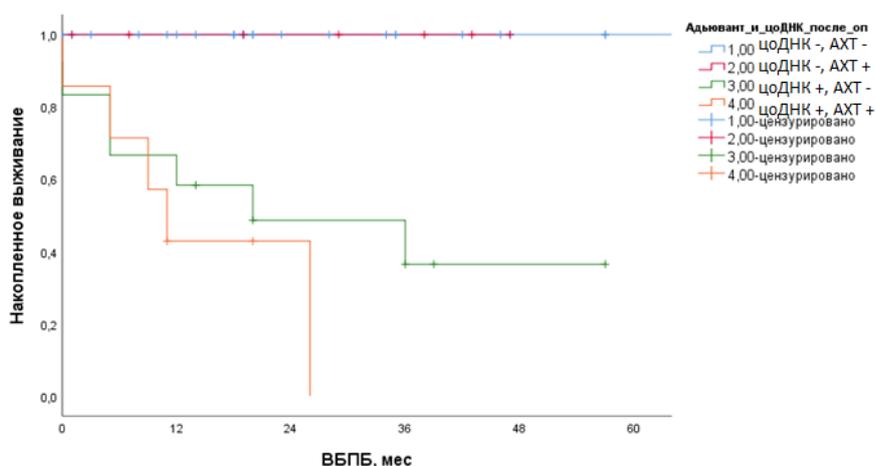


**Рисунок 19** – ВБПБ в зависимости от наличия цоДНК после операции и проведения АХТ при I-III стадиях

**Таблица 24** – Прогрессирование в зависимости от статуса цоДНК после операции и проведения адъювантной химиотерапии при I-III стадиях

	Без прогрессирования	Прогрессирование	Всего
цоДНК-, адъювантная ХТ -	40 (64,5%)	0	64
цоДНК-, адъювантная ХТ +	22 (35,5)	2 (100%)	
<b>P</b>	0,14		
цоДНК+, адъювантная ХТ -	9 (56,2%)	10 (37,1%)	43
цоДНК+, адъювантная ХТ +	7 (43,8)	17 (62,9%)	
<b>P</b>	0,34		

При II стадии значимых различий в ВБПБ в зависимости от назначения АХТ выявлено не было. Однако пациенты без цоДНК в 100% случаев не имели прогрессирования заболевания вне зависимости от проведения АХТ (Рисунок 20).



**Рисунок 20** – ВБПБ в зависимости от наличия цоДНК после операции и проведения адъювантной ХТ при II стадии

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. Хотя стоит отметить, что больной, отказавшийся от проведения АХТ, не имел цоДНК, и у него не случилось прогрессирование заболевания.

### 3.4 Значение цоДНК как маркера МРЗ при проведении метастазэктомий

#### 3.4.1 Прогностическое значение цоДНК как маркера МРЗ 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 и 83%) и метасинхронных метастазов (7 и 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 выявлены у 14 из 22 (63,6%) (Таблица 25).

**Таблица 25** – 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		

Характеристика больных представлена в таблице 26.

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- 100.0%), ( $p=0,0003$ ). В связи с этим дальнейший анализ проводился для статуса цоДНК после операции.

Таблица 26 – Характеристика больных с метастатическим КРР, включенных в анализ

Характеристика больных с метастатическим КРР	Всего больных N (%)	С данными по цоДНК до операции N (%)=22(100%)			С данными по цоДНК после операции N (%)=22 (100%)		
		цоДНК- 6 (27,3%)	цоДНК+ 16 (72,7%)	p	цоДНК- 8 (36,3%)	цоДНК+ 14 (63,6%)	p
Метастатические	57 (27,01%)						
Синхронные	43 (75,44%)						
Метахронные	14 (24,56%)						
Изолированные метастазы в легкие	4 (7%)						
Изолированные метастазы в печень	34 (59,65%)						
Полиметастазирование	22 (38,60%)						
МРЗ после метастазэктомий	41 (72%)	6	16		8	14	
Синхронные	34/41 (83%)	5(83,3%)	13(81,3%)	1,0	8(100%)	11(78,6%)	0,76
Метахронные	7/41 (17%)	1	3	1,0	0	3(21,4%)	0,53
Изолированные метастазы в печень	24/41 (58,5%)	3(50%)	11(84,6%)	1,0	6(75%)	9(64,3%)	1,0
Изолированные метастазы в легкие	4/41 (9,8%)	1(16%)	2(12,5%)	1,0	1(12,5%)	2(14,3%)	1,0
Изолированные метастазы в яичник	2/41 (4,9%)	0	0		0	0	
Метастазы по брюшине	5/41 (12,2%)	1(16%)	2(12,5%)	1,0	1(12,5%)	2(14,3%)	1,0

Метастазы в легкие и печень	5/41 (12,2%)	1(16%)	1(6,2%)	0,5	0	1(7,1%)	1,0
Метастазы в забрюшинные лимфоузлы	1/41 (2,4%)	0	0		0	0	
Оценка эффективности ХТ	16 (28%)						
Характеристика включенных в анализ МРЗ	N(%)=41	цoДНК-	цoДНК+	p	цoДНК-	цoДНК+	p
		6 (27,3%)	16 (72,7%)		8 (36,3%)	14 (63,6%)	
Возраст, в годах							
медиана	59 (36-78)	48 (37-76)	60 (36-78)	0,43	54 (37-78)	59 (36-78)	0,79
Пол							
Женский	22 (53,7%)	3(50%)	6(37,5%)	1,0	3(37,5%)	7(50%)	1,0
Мужской	19 (46,3%)	3(50%)	10(62,5%)	1,0	5(62,5%)	7(50%)	1,0
Локализация							
Правая половина	14 (34,1%)	1(16,6%)	8(50,0%)	0,64	2(25%)	6(42,9%)	0,68
Левая половина	15 (36,6%)	3(50,0%)	7(43,7%)	1,0	5(62,5%)	6(42,9%)	0,71
Прямая кишка	12 (29,3%)	2(33,3%)	1(6,3%)	0,23	1(12,5%)	2(14,2%)	1,0
Гистологический тип опухоли							
Аденокарцинома	40 (97,6%)	6(100%)	16(100%)	1,0	8(100%)	14(100%)	1,0
Муцинозная аденокарцинома	1 (2,4%)						

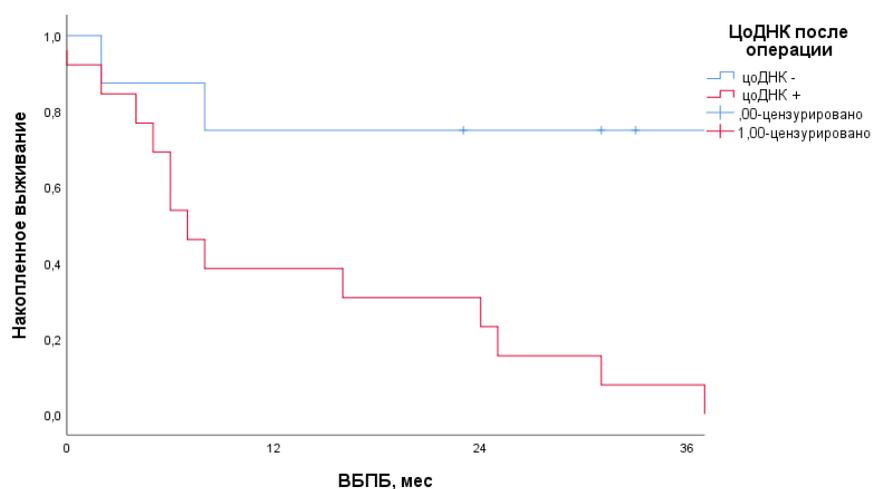
Степень дифференцировки								
Низкой степени злокачественности (G1-G2)	34 (82,9%)	6 (100%)	13(81,2%)	1,0	8 (100%)	11(78,6)	0,76	
Высокой степени злокачественности (G3-G4)	7 (17,1%)	0	3(18,8%)	0,55	0	3(21,4%)	0,53	
Первичное лечение при заборе цоДНК								
химиотерапия	7 (17,1%)	1(16,7%)	2(12,5%)	1,0	1(12,5%)	3(21,4%)	1,0	
хирургия	34 (82,9%)	5(83,3%)	14(87,5%)	1,0	7(87,5%)	11(78,6%)	1,0	
Химиотерапия								
НАХТ перед метастазэктомией	5 (12,2%)	1	2		1	3		
XELOX	3	1	0		1	1		
FOLFOX	1	0	1		0	1		
FOLFOXIRI	1	0	1		0	1		
АХТ после метастазэктомии	14 (34,1%)	4	9		6	8		
XELOX (6-8 курсов)	8/14	3	5		4	5		
FOLFOX (8-12 курсов)	3/14	0	2		1	1		
Капецитабин	3/14	1	2		1	2		

Химиотерапия 1 линии (после нерадикальной операции)	23 (56,2%)	2	7		2	6	
XELOX	4/23	0	2		0	2	
FOLFOX	9/23	2	3		2	3	
FOLFIRI	8/23	0	1		0	1	
FOLFOXIRI	1/23	0	0		0	0	
Иринотекан	1	0	1		0	0	
Таргетная терапия 1 линии (после нерадикальной операции)	9 (16,1%)	1	3		0	3	
Бевацизумаб	6/9	1	2		0	3	
Цетуксимаб	1/9	0	1		0	0	
Панитумумаб	1/9	0	0		0	0	
Афлиберцепт	1/9	0	0		0	0	
Нет данных	5 (12,1%)	0	0		0	0	

Чувствительность тест системы по определению цоДНК для выявления прогрессирования после операции при метастазэктомиях составила 100% (95% ДИ 76,8- 100,0%), специфичность 75,0% (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%).

### 3.4.2 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 21).



**Рисунок 21** – ВБПБ пациентов в зависимости от наличия цоДНК после операции при выявлении МРЗ при проведении метастазэктомий

Одногодичная ВБПБ в группе с положительной цоДНК составила 33%, в группе отрицательной цоДНК 75%. Двух годичная ВБПБ в группе с положительной цоДНК составила 16%, против 75% в группе отрицательной цоДНК (Таблица 27).

**Таблица 27** – ВБПБ в зависимости от цоДНК после проведения метастазэктомии

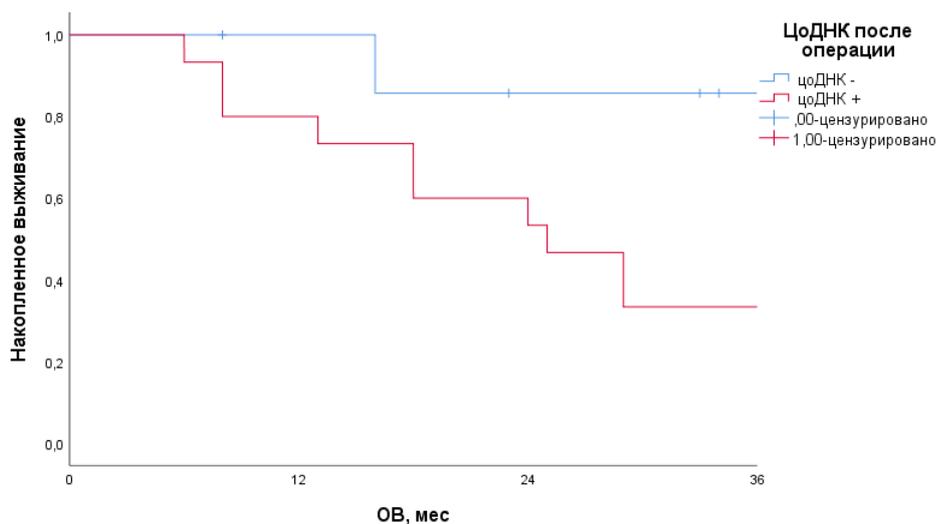
ВБПБ, % цоДНК+		
1-годовая	2-годовая	3-годовая
33%	16%	8%
ВБПБ, % цоДНК-		
1-годовая	2-годовая	3-годовая
75%	75%	75%

При однофакторном анализе, 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 ( $\beta$  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 группе 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 22).

Одногодичная общая выживаемость в группе с положительной цоДНК составила 78%, в группе отрицательной цоДНК 100%. 2-х годовичная БРВ в группе с положительной цоДНК составила 50%, против 85% в группе отрицательной цоДНК (Таблица 28).



**Рисунок 22** – ОВ пациентов в зависимости от наличия цодНК после операции при выявлении МРЗ при проведении метастазэктомий

**Таблица 28** – ОВ при положительной цодНК после проведения метастазэктомии

ОВ, % цодНК+		
1-годичная	2-годичная	3-годичная
78%	50%	28%
ОВ, % цодНК-		
1-годичная	2-годичная	3-годичная
100%	85%	85%

### 3.4.3 Прогностическое значение динамики цодНК до и после операции при проведении метастазэктомий

При разделении всех пациентов, которым проводился анализ цодНК для определения МРЗ при метастазэктомиях на группы в зависимости от динамики изменений цодНК до и после операции получились 4 категории:

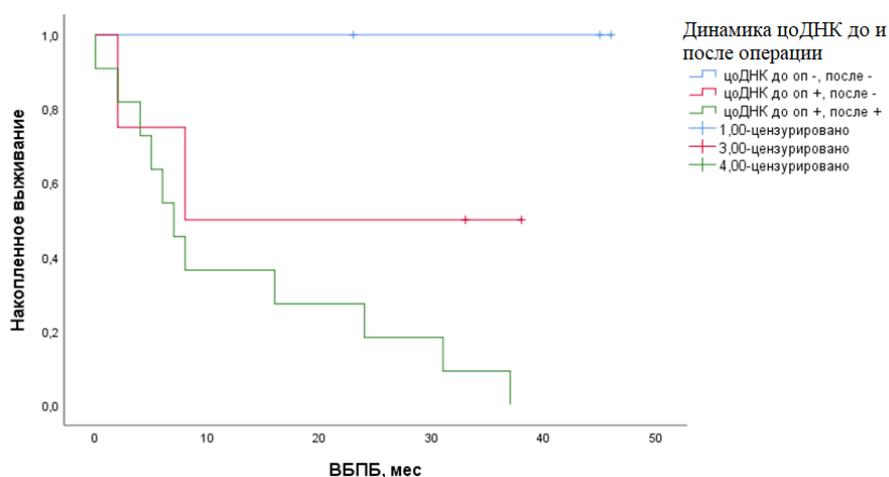
- 1) с отсутствием цодНК и до и после операции,
- 2) с отсутствием цодНК до операции, но появлением после,
- 3) с наличием цодНК до операции, и отсутствием после,
- 4) с наличием цодНК и до и после операции.

Данные динамики изменений цоДНК есть у 20 пациентов (Таблица 29).

**Таблица 29** – Динамика изменения цоДНК до и после операции

цоДНК до операции	цоДНК после операции	Всего 20
-	-	3(15%%)
-	+	0
+	-	4(20%)
+	+	13(65%)

При таком подходе удалось разделить пациентов на группы очень высокого риска прогрессирования при наличии цоДНК и до после операции - 4 группа, где медиана ББПБ составила 6,5 месяцев и группу без прогрессирования – у которых и до и после операции цоДНК была отрицательной (ОР 3,7; 95% ДИ 1,07-13,3,  $p=0,039$ ) (Рисунок 23).



**Рисунок 23** – ВБПБ в зависимости от динамики цоДНК до и после операции при выявлении МРЗ при проведении метастазэктомий

## ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ

### Чувствительность и конкордантность

По результатам нашего исследования чувствительность тест системы по выявлению генетических нарушений в опухолевом материале составила 97,82%, в цоДНК - 51,20% для всех стадий заболевания и 64,5% для метастатического КРР.

Удовлетворительная чувствительность теста для определения цоДНК в плазме крови позволила нам продолжить исследование для оценки прогностической роли выявления цоДНК в плазме крови после хирургического лечения при резектабельных стадиях заболевания. Показатель чувствительности был несколько ниже, чем в среднем по опубликованным данным, например, по данным WS Tsai чувствительность для циркулирующих в крови опухолевых клеток для выявления предраковых заболеваний толстой кишки находилась на уровне 76,6% [106]. Чувствительность зарегистрированного FDA теста *mSEPT9* для определения КРР составила 73% [95]. Вероятно, более низкие показатели чувствительности объясняются проблемами с забором, хранением и транспортировкой биообразцов в лабораторию, что требует более четкого соблюдения регламента заморозки и транспортировки. Так, например, в исследовании коллег из ФГБУ НМИЦ колопроктологии имени А.Н. Рыжих при анализе мутационного статуса *KRAS* при КРР при помощи цифровой капельной ПЦР в цоДНК выделенной из 1 мл плазмы, показали неудовлетворительные результаты. При этом при увеличении объема плазмы до 3 мл данные были сопоставимы с мировыми [9].

Согласно полученным данным, суммарная конкордантность для мутаций в генах *KRAS*, *TP53*, *APC*, *PIK3CA*, *BRAF*, *FBXW7*, *MB21D2*, *SMAD4* составила 69,4% (95% ДИ 62,2-76,0%) при всех стадиях заболевания. Конкордантность для ранних стадий (I-III) составила 65,4% (95% ДИ 57,1-73,1%), а для метастатического КРР 83,8% (95% ДИ 69,6-92,9%). Это согласуется с данными литературы, где показатель конкордантности находился в пределах от 72 до 100% [20, 37, 39, 45, 57, 59, 64, 71, 78, 110, 115, 116, 120, 133], при этом во всех исследованиях анализировались данные метастатического КРР за исключением 2 [36, 78], в которых помимо

метастатического были включены данные нерезектабельного местнораспространенного рака прямой кишки.

Более низкие показатели общей конкордантности в нашем исследовании объясняются большим процентом ранних стадий (I-III ст 154 (72,99%) против 57 метастатических (27,01%)). При этом числа выявленных совпадений составило 87/154 для ранних стадий и 31/57 для метастатических. При анализе данных конкордантности только для метастатического заболевания, мы получаем сопоставимые с данными литературы результаты: конкордантность по генам *KRAS* – 90,9% (95% ДИ 64,7%-99,0%), *BRAF* 75% (95% ДИ 28,4-97,2%), *PIK3CA* 83,3% (95% ДИ 44,2-98,1%), *TP53* и *APC* 100%. По нашим данным конкордантность выше, чем например в исследовании Dumbrava E.E. 2021 [36], где показатель конкордантности для *PIK3CA* при нерезектабельном и метастатическом раке составил 72%, а в работе Сао Н. конкордантность для мКРР по *TP53* составила 81%, по *APC* 67%, а показатели по *KRAS* были значительно ниже - 42% [24].

В большинстве работ приводятся данные конкордантности для 1 гена, чаще это ген *KRAS*. По нашим данным конкордантность по этому гену составила 78,3% (95% ДИ 66,7-87,3%) для всех стадий заболевания, и 90,9% (95% ДИ 64,7%-99,0%) для метастатического КРР.

При анализе нескольких генов показатели конкордантности ниже, например в исследовании Gupta R, 2020 [47] (N=75) сопоставимость по генам *APC*, *TP53*, *KRAS*, *NRAS* и *BRAF* при метастатическом КРР составляла 88%-92%. По нашим данным конкордантность для метастатического КРР по генам *KRAS*, *TP53*, *BRAF* и *APC* (*NRAS* в нашем исследовании не анализировался для определения конкордантности) составляла 75%-100% (при этом для *BRAF* 75%, для *KRAS* 90,9%, а для *TP53* и *APC* 100%). При анализе общей конкордантности по широкой панели генов в литературе ниже, чем в нашем исследовании, по результатам работы Сао Н. 2020, при оценке конкордантности по *APC*, *RNF43*, *SMAD4*, *BRAD1*, *KRAS*, *RAF1*, и *TP53* при метастатическом КРР составила 54.6% [24]. А в исследовании Lim 2022 года общее соответствие между мутациями цодНК и опухолевых

материалом при мКРР составило 85% - что согласуется с нашими результатами [69].

Таким образом в работе показана высокая конкордантность цоДНК и тканей первичной опухоли по всем генам, что позволяет говорить о высоких показателях валидности разработанной тест системы.

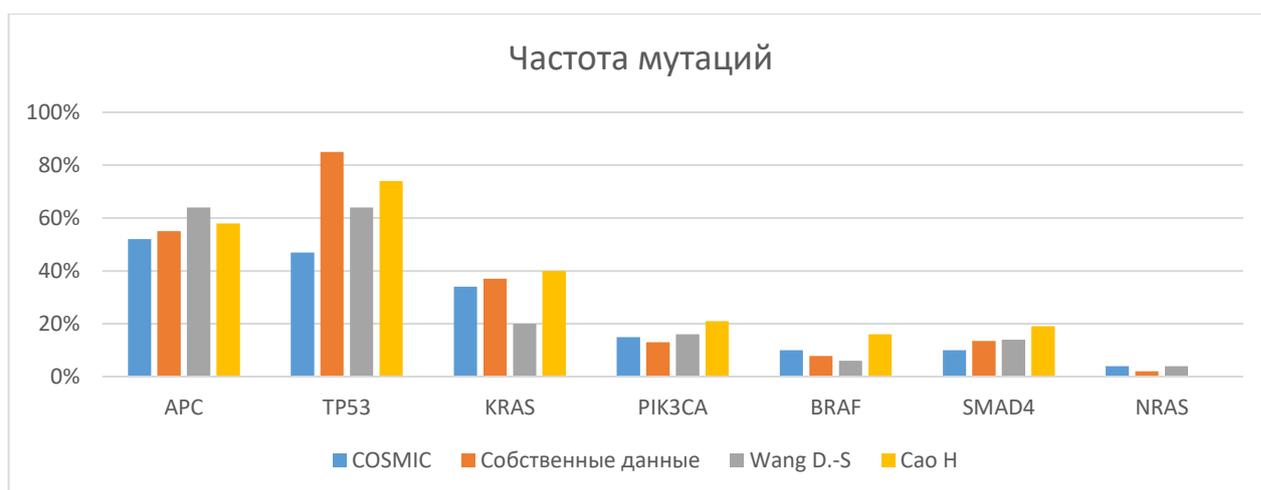
### **Частота встречаемости мутаций в ткани опухоли и цоДНК**

Клиническая чувствительность тест системы по выявлению генетических нарушений в опухолевом материале составила 97,82%, в цоДНК - 51,20% для всех стадий заболевания и 64,5% для метастатического КРР.

Таким образом, разработанная нами тест система для выявления соматических мутаций имеет высокие показатели детекции ДНК-образцов опухолевой ткани [3]. При сравнении встречаемости соматических мутаций с известной терапевтической значимостью в исследованных образцах тканей пациентов с КРР и базой COSMIC [30] выявились сопоставимые данные встречаемости наиболее распространенных при КРР мутаций: KRAS, BRAF, APC, SMAD4, PIK3CA и NRAS. По данным современной литературы, показатели встречаемости этих мутаций так же были крайне схожи [24, 129] (Рисунок 24).

Мутация TP53 по данным литературы является наиболее часто встречающейся при КРР, по нашим данным эти цифры оказались еще выше, что возможно связано с большим количеством ранних стадий в нашем исследовании.

Мутации RPL22, ACVR2A в базе данных COSMIC [30] встречаются чаще всего при раке толстой кишки, но не описаны, как наиболее часто встречающиеся для КРР, что скорее всего связано с давностью обновления базы COSMIC, а также большим количеством ранних стадий в нашем исследовании. Так, например, мутация ACVR2A по данным литературы встречается при ранних колоректальных неоплазиях и предраковых состояниях, ассоциированных с Линч-синдромом, семейным аденоматозным полипозом [12].



**Рисунок 24** – Сравнение встречаемости соматических мутаций в ткани, имеющих терапевтическое значение, в образцах рака толстой кишки из базы данных COSMIC, нашего и других исследований. По горизонтальной оси – соматические мутации, по вертикальной – доля образцов, содержащих данную соматическую мутацию

### **Прогностическое значение цоДНК как маркера МРЗ при I-III**

В нашем исследовании положительные данные цоДНК до операции выявлены у 45%, а после операции - у 38,6% при включении в анализ 25 больных (17,1%) с I стадией, 66 (45,2%) больных со II и 55 (37,7%) больных с III. И если частота выявления цоДНК до операции согласуются с ранними исследованиями [19], то частота выявления цоДНК после операции в нашем исследовании была выше [5]. Возможно это объясняется ранним забором крови для определения цоДНК после операции (медиана - на 7 сутки). Так, например, в работе Tie J. С соавторами [118] сроки забора крови после операции при III стадии КРР в среднем составляли 42 дня, при этом положительная цоДНК после операции определялась в 21%. С другой стороны в исследовании Оки с соавторами [90] несмотря на то, что забор крови после операции в среднем проводился через 46 недель (12-97) при II стадии КРР положительная цоДНК определялась в более высоком проценте случаев 34,8%. Также в исследовании S. McNamara, 2022 [80] при выявлении МРЗ с помощью сверхглубокого секвенирования ДНК, выделенной из плазмы крови при II-III стадиях КРР через 1-34 дня после R0-резекции, (медиана 7 дней)

чувствительность метода составила 44%, а специфичность 94%. Другим объяснением расхождения в частоте выявления цоДНК между исследованиями, может являться установкой порогового значения уровня цоДНК, принятого за положительный, а также методом определения цоДНК.

Как и в подавляющем числе других исследований [45, 80, 92, 102, 105 113, 118, 119] и применения различных тест-систем по выявлению цоДНК, нами также показано независимое прогностическое значение наличия цоДНК после операции.

Так при оценке прогностического значения цоДНК, как маркера МРЗ, при I-III стадиях положительная цоДНК после операции выявлена у 90,9 % (95% ДИ 75,7-98,0%) с прогрессированием заболевания. Отрицательная цоДНК после операции при отсутствии прогрессирования у 81,4% (95% ДИ 71,5-88,9%). Это согласуется с данными Reinert T, 2019 [102], где при положительной цоДНК чувствительность для определения рецидивов составила 87,5%. В отличие от других исследований частота выявления прогрессирования в группе цоДНК в нашей работы была выше, что обусловлено насыщением выборки пациентами с III стадией заболевания.

Рассматривая роль АХТ при различных значениях цоДНК, следует отметить, что в нашей работе проведение послеоперационного лечения не улучшало выживаемость пациентов независимо от стадии заболевания. Это несколько отличается от результатов других работ. Так при под анализе III фазы исследования IDEA-France, в которой проводилось сравнение 3 и 6 месяцев адъювантной химиотерапии при III стадии КРР в группе положительной цоДНК в группе благоприятного прогноза (pT1-3N1) проведение 6 месяцев адъювантного лечения улучшало показатели ВБПБ [113]. Тогда как в группе неблагоприятного прогноза эффективность адъювантной терапии в течение 6 месяцев была выше вне зависимости от уровня цоДНК. Такие различия могут быть обусловлены методом выявления цоДНК у французских исследователей (метилование генов WIF1 и NPY), и особенностями дизайна исследования – всем пациентам проводилась адъювантная терапия. Более приближены к нашей работе результаты поданализа исследования GALAXY, в котором проведение адъювантной химиотерапии при наличии цоДНК было эффективным вне зависимости от стадии болезни. С другой

стороны, при отсутствии цоДНК адьювантная терапия не улучшала результатов хирургического лечения, что согласуется и с нашими данными. Полученные результаты согласуются результатами Tie с соавт., [117, 119] и говорят в пользу возможного отказа от проведения адьювантной химиотерапии в группе с отрицательной цоДНК, как минимум, при II стадии КРР.

Нами также показано, что прогноз пациентов с наличием цоДНК после операции был негативным вне зависимости от уровня цоДНК до операции. Благоприятный прогноз при отсутствии цоДНК после операции реализовался независимо от уровня цоДНК до операции. Аналогичные находки описаны и в исследовании IDEA-France [113].

С другой стороны, ограничением нашего исследования является то, что оценка цоДНК в крови проводилась только после хирургического лечения, данных по цоДНК после окончания АХТ не было, как в post-hoc исследовании IDEA-France [113] и в исследовании GALAXY [62]. Поэтому мы не можем оценить снижение цоДНК после проведения АХТ, а, следовательно, влияние статуса цоДНК после проведения АХТ на ВБПБ.

Статистически значимых различий в ОВ в зависимости от уровня цоДНК не было найдено ни до (ОР 0,75; 95% ДИ 0,19-3,04,  $p=0,69$ ), ни после операции (ОР 1,39; 95% ДИ 0,37-5,2,  $p=0,62$ , в отличие от post-hoc анализа исследования IDEA-France, где при III стадии КРР положительная цоДНК влияла на ОВ (ОР = 1,65; 95% ДИ 1,12–2,43,  $p = 0,011$ ) [113]. В данном случае, это вероятно связано с малым числом событий в нашем исследовании ( $n=8$ ).

### **Прогностическое значение цоДНК как маркера МРЗ после проведения метастазэктомий**

В нашем исследовании положительные данные цоДНК до операции выявлены у 72,7%, а после операции у 63,6%, при включении в анализ 22 больных после проведения метастазэктомий. И снова, как и при локализованных формах заболевания частота выявления цоДНК до операции согласовалась как с данными ранних исследований [19], так и с последними результатами, опубликованными в

2021 году [121], то частота выявления цоДНК после операции в нашем исследовании была выше. Наиболее приближенные к нашему исследованию результаты послеоперационного обнаружения цоДНК получились у Loupakis F. 2021 [74], где - 54,4%. Возможно более высокое обнаружение цоДНК снова можно объяснить ранним забором крови для определения цоДНК после операции (медиана - на 7 сутки), а возможно в нашем исследовании больший процент больных имел нерадикальную операцию (57), что показало раннее прогрессирование (на 1 контроле) - 8 из 14 больных по данным медицинской документации проходили после операции лечебную химиотерапию 1 линии.

Данные чувствительности цоДНК для выявления прогрессирования после проведения метастазэктомий составила 100%, специфичности 75.0%, PPV 87,5%, NPV 100%, точность 90,9%. Что согласуется с данными Scholer LV., 2017[105], где рецидив заболевания был выявлен в 100% положительных по цоДНК, данными Loupakis F. 2021 [74], где 96,7% с цоДНК+ прогрессировали на момент анализа данных, а так же с исследованием Chee B., 2021[26], где положительное прогностическое значение положительного цоДНК при выявлении рецидива после операции составило 92%, а чувствительность и специфичность 85% и 89% соответственно.

Как и в подавляющем числе других исследований [23, 26, 74, 106, 121] и применения различных тест-систем по выявлению цоДНК, нами также показано независимое прогностическое значение наличия цоДНК после операции. Наличие цоДНК после операции при метастазэктомиях статистически значимо влияло на ОВ, что согласуется с данными исследования 2021 года крупнейшего специалиста по цоДНК Tie J. [121], в котором при положительной цоДНК после операции риски смерти были в 4,2 выше, чем при отрицательной цоДНК (95% ДИ 1,5-11,8;  $P < 0,001$ ), а так же с рядом других исследований [74], в том числе крупного метаанализа, включившего результаты в общей сложности 1076 пациентов с метастатическим КРР [109].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучение цоДНК в настоящее время является крайне перспективным разделом медицины и интересен ввиду возможности отображения молекулярных характеристик опухоли в реальном времени. Наше исследование показало высокую чувствительность разработанной тест системы по выявлению генетических альтераций как в опухолевом материале, так и в плазме крови, что можно применить в реальной клинической практике в качестве альтернативы традиционной биопсии при соблюдении правил транспортировки и хранения образцов.

Впервые в нашей стране нами было подтверждено тезис о том, что наличие цоДНК после операции является независимым прогностическим признаком прогрессирования при КРР.

При локализованных стадиях заболевания внедрение анализа цоДНК в клиническую практику позволит выделить пациентов с наибольшими рисками прогрессирования после выполнения хирургического лечения, при II стадии отобрать пациентов, которые не нуждаются в проведении адъювантной химиотерапии.

При метастатической болезни анализ цоДНК способен выделить потенциальных кандидатов для проведения хирургического лечения. Вопрос о возможности замены традиционной биопсии для планирования химиотерапевтического лечения в виду высокого соответствия мутационного статуса цоДНК и первичной опухоли (конкордантность была максимальной для метастатического КРР) требуется доказать в последующих исследованиях.

## 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 в отношении статуса генов KRAS (90,9%) и BRAF (75%) при метастатическом заболевании, что позволяет рассматривать ее в качестве альтернативы классического определения мутаций в генах 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 ББПБ, 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.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ARMs – amplification refractory mutations system

BEAMing – bead emulsion amplification and magnetics

CAPP-Seq – cancer personalized profiling by deep sequencing

cSMART – circulating single molecule amplification and re-sequencing technology;

COLD-PCR – co-amplification at lower denaturation temperature

ddPCR – droplet digital PCR (цифровая капельная полимеразно-цепная реакция)

KRAS – Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog, протоонкоген, представитель семейства белков Ras

MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization)

NGS – next generation sequencing (секвенирование следующего поколения)

NPV (Negative Predictive Value) - прогностическая ценность отрицательного результата

PNAs-LNA – peptide nucleic acid-locked nucleic acid

PPV (Positive Predictive Value) - прогностическая ценность положительного результата

Safe-Seq – safe sequencing system

SEPT9 – Septin-9

TAM-Seq – tagged-amplicon deep sequencing

АХТ – адъювантная химиотерапия

БРВ (PFS) - безрецидивная выживаемость (progression free survival)

ВБПБ (DFS) – выживаемость без признаков болезни (disease free survival)

ДИ – доверительный интервал

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

КРР – колоректальный рак

КТ – компьютерная томография

МРБ – минимальная резидуальная болезнь

НАХТ – неоадьювантная химиотерапия

ОВ (OS) – общая выживаемость

ОР – отношение рисков

ПЦР – полимеразная цепная реакция

РПК – рак прямой кишки

РТК – рак толстой кишки

ХЛТ – химиолучевая терапия

ХТ – химиотерапия

цoДНК – циркулирующая в крови опухолевая ДНК

цвДНК – циркулирующая (свободная) внеклеточная ДНК

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Лактионов, К.К. Роль жидкостной биопсии в выборе тактики лечения немелкоклеточного рака лёгкого / К.К. Лактионов, А.М. Казаков, К.А. Саранцева и др. // Вопросы онкологии. – 2020. – Т.66. – № 5. – С. 457-464.
2. Мартьянов, А.С. Молекулярно-генетическое тестирование рака толстой кишки: клинические аспекты / А.С. Мартьянов, Е.Ш.Кулигина, А. А. Романько и др. // Альманах клинической медицины. – 2022. – Т.50. – № 1. – С. 1-12.
3. 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 и др. // Тазовая хирургия и онкология. *Pelvic Surgery and Oncology*. – 2022. – Том. 12. – № 1. – С. 27-34.
4. Жуков, Н.В. Исследование циркулирующей опухолевой ДНК (жидкая биопсия). Перспективы использования в онкологии / Н.В. Жуков, А.Р. Зарецкий, С.А. Лукьянов и др. // Онкогематология. – 2014. – Том. 9. – № 4. – С. 28-36.
5. 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 и др. // Успехи молекулярной онкологии. – 2022. – Том. 9. – № 2. – С. 32-42.
6. Служев, М.И. Значение циркулирующей опухолевой Днк в оценке эффективности лечения метастатического колоректального рака / М.И. Служев, В.В. Семиглазов, Т.Ю. Семиглазова и др. // Сибирский онкологический журнал. 2021. – Том. 20. – № 5. – С. 149-161.
7. Тамкович, С.Н. Цирулирующие ДНК крови и их использование в медицинской диагностике / С.Н. Тамкович, В.В. Власов, П.П. Лактионов. // Молекулярная биология. – 2008. – Том. 42. – № 1. – С. 12-23.
8. Федянин, М.Ю. Колоректальный рак с мутацией в гене BRAF в Российской федерации: эпидемиология и клинические особенности. Результаты

многоцентрового исследования / М.Ю. Федянин, Х.М. Эльснукеева, И.А. Демидова и др. // Медицинский совет. – 2021. – № 4. – С. 52-63.

9. Шубин, В.П. поиск мутаций гена KRAS в циркулирующей опухолевой Днк при колоректальном раке разных стадий / В.П. Шубин, Ю.А. Шельгин, С.И. Ачкасов и др. – 2019. – Том. 65. – № 5. – С. 701-707.

10. Adam, R. Liver-MetSurvey: analysis of clinicopathologic factors associated with the efficacy of preoperative chemotherapy in 2,122 patients with colorectal liver metastases. / R. Adam, T. Aloia, J. Figueras. – 2006. – Vol. 24. – № 18Suppl. – P. 3521.

11. Ahlquist, D.A. The Stool DNA Test Is More Accurate Than the Plasma Septin 9 Test in Detecting Colorectal Neoplasia / D.A. Ahlquist, W.R. Taylor, D.W. Mahoney, et al. // Clinical Gastroenterology and Hepatology. – 2012. – Vol. 10. – № 3. – P. 272-277.e1.

12. Alquati, C. Discovering the Mutational Profile of Early Colorectal Lesions: A Translational Impact / C. Alquati, A. Prossomariti, G. Piazzzi, et al. // Cancers. – 2021. – Vol. 13. – № 9. – P. 2081.

13. Anandappa, G. TRACC: Tracking mutations in cell-free DNA to predict relapse in early colorectal cancer—A randomized study of circulating tumour DNA (ctDNA) guided adjuvant chemotherapy versus standard of care chemotherapy after curative surgery in patients with high risk stage II or stage III colorectal cancer (CRC). / G. Anandappa, N. Starling, C. Peckitt, et al. // Journal of Clinical Oncology. – 2020. – Vol. 38. – № 15\_suppl. – P. TPS4120-TPS4120.

14. André, T. Adjuvant Fluorouracil, Leucovorin, and Oxaliplatin in Stage II to III Colon Cancer: Updated 10-Year Survival and Outcomes According to *BRAF* Mutation and Mismatch Repair Status of the MOSAIC Study / T. André, A. de Gramont, D. Vernerey, et al. // Journal of Clinical Oncology. – 2015. – Vol. 33. – № 35. – P. 4176-4187.

15. Auclin, E. Subgroups and prognostication in stage III colon cancer: future perspectives for adjuvant therapy / E. Auclin, A. Zaanan, D. Vernerey, et al. // Annals of Oncology. – 2017. – Vol. 28. – № 5. – P. 958-968.

16. Bachet, J.B. RAS mutation analysis in circulating tumor DNA from patients with metastatic colorectal cancer: the AGEO RASANC prospective multicenter study / J.B. Bachet, O. Bouché, J. Taieb, et al. // *Annals of Oncology*. – 2018. – Vol. 29. – № 5. – P. 1211-1219.

17. Bando, H. Impact of a metastatic site on circulating tumor DNA (ctDNA) analysis in patients (pts) with metastatic colorectal cancer (mCRC). / H. Bando, Y. Nakamura, H. Taniguchi, et al. // *Journal of Clinical Oncology*. – 2021. – Vol. 39. – № 15\_suppl. – P. 3554-3554.

18. Beagan, J.J. Circulating Tumor DNA as a Preoperative Marker of Recurrence in Patients with Peritoneal Metastases of Colorectal Cancer: A Clinical Feasibility Study / J.J. Beagan, N.R. Sluiter, S. Bach, et al. // *Journal of Clinical Medicine*. – 2020. – Vol. 9. – № 6. – P. 1738.

19. Bettgowda, C. Detection of Circulating Tumor DNA in Early- and Late-Stage Human Malignancies / C. Bettgowda, M. Sausen, R.J. Leary, et al. // *Science Translational Medicine*. – 2014. – Vol. 6. – № 224.

20. Bhangu, J.S. Circulating Free Methylated Tumor DNA Markers for Sensitive Assessment of Tumor Burden and Early Response Monitoring in Patients Receiving Systemic Chemotherapy for Colorectal Cancer Liver Metastasis / J.S. Bhangu, A. Beer, M. Mittlböck, et al. // *Annals of Surgery*. – 2018. – Vol. 268. – № 5. – P. 894-902.

21. Bouchahda, M. Efficacy of an anti-EGFR after ctDNA conversion from mutated RAS status of metastatic colorectal cancer: Results of a pilot study. / M. Bouchahda, R. Saffroy, A. Karaboué, et al. // *Journal of Clinical Oncology*. – 2021. – Vol. 39. – № 15\_suppl. – P. e15574-e15574.

22. Boysen, A.K. Cell-free DNA levels and correlation to stage and outcome following treatment of locally advanced rectal cancer / A.K. Boysen, Y. Wettergren, B.S. Sorensen, et al. // *Tumour Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*. – 2017. – Vol. 39. – № 11. – P. 1010428317730976.

23. Boysen, A.K. Circulating tumor DNA as a marker of minimal residual disease following local treatment of metastases from colorectal cancer / A.K. Boysen, N.

Pallisgaard, C.S.A. Andersen, et al. // *Acta Oncologica*. – 2020. – Vol. 59. – № 12. – P. 1424-1429.

24. Cao, H. Circulating Tumor DNA Is Capable of Monitoring the Therapeutic Response and Resistance in Advanced Colorectal Cancer Patients Undergoing Combined Target and Chemotherapy / H. Cao, X. Liu, Y. Chen, et al. // *Frontiers in Oncology*. – 2020. – Vol. 10. – P. 466.

25. Chakrabarti, S. A prospective observational study to determine the feasibility of tumor response assessment by circulating tumor DNA (ctDNA) in patients with locally advanced rectal cancer (LARC) undergoing total neoadjuvant therapy (TNT). / S. Chakrabarti, E. McKenna, C. Oxencis, et al. // *Journal of Clinical Oncology*. – 2022. – Vol. 40. – № 4\_suppl. – P. TPS234-TPS234.

26. Chee, B. Circulating tumor derived cell-free DNA (ctDNA) to predict recurrence of metastatic colorectal cancer (mCRC) following curative intent surgery or radiation. / B. Chee, F. Ibrahim, M. Esquivel, et al. // *Journal of Clinical Oncology*. – 2021. – Vol. 39. – № 15\_suppl. – P. 3565-3565.

27. Cheng, F. Circulating tumor DNA: a promising biomarker in the liquid biopsy of cancer / F. Cheng, L. Su, C. Qian // *Oncotarget*. – 2016. – Vol. 7. – № 30. – P. 48832-48841.

28. Church, T.R. Prospective evaluation of methylated *SEPT9* in plasma for detection of asymptomatic colorectal cancer / T.R. Church, M. Wandell, C. Lofton-Day, et al. // *Gut*. – 2014. – Vol. 63. – № 2. – P. 317-325.

29. Corsini, E.M. Colorectal cancer mutations are associated with survival and recurrence after pulmonary metastasectomy / E.M. Corsini, K.G. Mitchell, R.J. Mehran, et al. // *Journal of Surgical Oncology*. – 2019. – P. jso.25630.

30. COSMIC, the Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer, is the world's largest and most comprehensive resource for exploring the impact of somatic mutations in human cancer [Электронный ресурс]. – URL: <https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic> (дата обращения: 08.02.2022).

31. Cremolini, C. Rechallenge for Patients With *RAS* and *BRAF* Wild-Type Metastatic Colorectal Cancer With Acquired Resistance to First-line Cetuximab and

Irinotecan: A Phase 2 Single-Arm Clinical Trial / C. Cremolini, D. Rossini, E. Dell'Aquila, et al. // *JAMA Oncology*. – 2019. – Vol. 5. – № 3. – P. 343.

32. Dasari, A. Minimal residual disease assessment in colorectal cancer (MiRDA-C). / A. Dasari, M. Abdelrahim, J.D. Acoba, et al. // *Journal of Clinical Oncology*. – 2022. – Vol. 40. – № 4\_suppl. – P. TPS236-TPS236.

33. Diaz, L.A. Liquid Biopsies: Genotyping Circulating Tumor DNA / L.A. Diaz, A. Bardelli // *Journal of Clinical Oncology*. – 2014. – Vol. 32. – № 6. – P. 579-586.

34. Dickinson, B.T. Molecular markers for colorectal cancer screening / B.T. Dickinson, J. Kisiel, D.A. Ahlquist, et al. // *Gut*. – 2015. – Vol. 64. – № 9. – P. 1485-1494.

35. Diehl, F. Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics / F. Diehl, K. Schmidt, M.A. Choti, et al. // *Nature Medicine*. – 2008. – Vol. 14. – № 9. – P. 985-990.

36. Dumbrava, E.E. PIK3CA mutations in plasma circulating tumor DNA predict survival and treatment outcomes in patients with advanced cancers / E.E. Dumbrava, S.G. Call, H.J. Huang, et al. // *ESMO Open*. – 2021. – Vol. 6. – № 5. – P. 100230.

37. El Messaoudi, S. Circulating cell free DNA: Preanalytical considerations / S. El Messaoudi, F. Rolet, F. Mouliere, et al. // *Clinica Chimica Acta*. – 2013. – Vol. 424. – P. 222-230.

38. Erve, I. van 't. Diagnostic Strategies toward Clinical Implementation of Liquid Biopsy RAS/BRAF Circulating Tumor DNA Analyses in Patients with Metastatic Colorectal Cancer / I. van 't Erve, M.J.E. Greuter, K. Bolhuis, et al. // *The Journal of Molecular Diagnostics*. – 2020. – Vol. 22. – № 12. – P. 1430-1437.

39. Fedyanin, M. A prospective study of prognostic role of plasma circulating tumor DNA (ctDNA) in patients (pts) with early-stage malignancies. / M. Fedyanin, U. Boyarskikh, E. Polyanskaya, et al. // *Journal of Clinical Oncology*. – 2020. – Vol. 38. – № 15\_suppl. – P. 3559-3559.

40. Figueredo, A. Adjuvant Therapy for Stage II Colon Cancer: A Systematic Review From the Cancer Care Ontario Program in Evidence-Based Care's Gastrointestinal Cancer Disease Site Group / A. Figueredo, M.L. Charette, J. Maroun, et al. // *Journal of Clinical Oncology*. – 2004. – Vol. 22. – № 16. – P. 3395-3407.

41. Franko, J. Treatment of Colorectal Peritoneal Carcinomatosis With Systemic Chemotherapy: A Pooled Analysis of North Central Cancer Treatment Group Phase III Trials N9741 and N9841 / J. Franko, Q. Shi, C.D. Goldman, et al. // *Journal of Clinical Oncology*. – 2012. – Vol. 30. – № 3. – P. 263-267.

42. Garcia-Corbacho, J. 92P First-results of the CLIMB360 study, a prospective molecular screening program across multiple cancer types based on circulating tumor DNA (ctDNA) / J. Garcia-Corbacho, I. Victoria Ruiz, L. Angelats, et al. // *Annals of Oncology*. – 2021. – Vol. 32. – P. S396-S397.

43. Gouda, M.A. 91P Liquid biopsy for detection of minimal residual disease after liver metastasectomy in stage IV colorectal cancer / M.A. Gouda, M.J. Overman, H.J. Huang, et al. // *Annals of Oncology*. – 2021. – Vol. 32. – P. S395-S396.

44. Grasselli, J. Concordance of blood- and tumor-based detection of RAS mutations to guide anti-EGFR therapy in metastatic colorectal cancer / J. Grasselli, E. Elez, G. Caratù, et al. // *Annals of Oncology*. – 2017. – Vol. 28. – № 6. – P. 1294-1301.

45. Gu, J. 458P Circulating tumor DNA analysis predicting recurrence risk in patients with stage I-III colorectal cancer / J. Gu, F. Lei, X. Wang, et al. // *Annals of Oncology*. – 2021. – Vol. 32. – P. S561.

46. Gunderson, L.L. Revised TN Categorization for Colon Cancer Based on National Survival Outcomes Data / L.L. Gunderson, J.M. Jessup, D.J. Sargent, et al. // *Journal of Clinical Oncology*. – 2010. – Vol. 28. – № 2. – P. 264-271.

47. Gupta, R. Guardant360 Circulating Tumor DNA Assay Is Concordant with FoundationOne Next-Generation Sequencing in Detecting Actionable Driver Mutations in Anti-EGFR Naive Metastatic Colorectal Cancer / R. Gupta, T. Othman, C. Chen, et al. // *The Oncologist*. – 2020. – Vol. 25. – № 3. – P. 235-243.

48. Hagggar, F.A. Colorectal cancer epidemiology: incidence, mortality, survival, and risk factors. / F.A. Hagggar, R.P. Boushey. – 2009. – Vol. 22. – № 04. – P. 191-197.

49. Herbst, A. Methylated free-circulating *HPP1* DNA is an early response marker in patients with metastatic colorectal cancer: Methylated free-circulating HPP1 DNA is a response marker / A. Herbst, N. Vdovin, S. Gacesa, et al. // *International Journal of Cancer*. – 2017. – Vol. 140. – № 9. – P. 2134-2144.

50. Holm, M. Detection of KRAS mutations in liquid biopsies from metastatic colorectal cancer patients using droplet digital PCR, Idylla, and next generation sequencing / M. Holm, E. Andersson, E. Osterlund, et al. // PLOS ONE. – 2020. – Vol. 15. – № 11. – P. e0239819.

51. Hu, Z. The main sources of circulating cell-free DNA: Apoptosis, necrosis and active secretion / Z. Hu, H. Chen, Y. Long, et al. // Critical Reviews in Oncology/Hematology. – 2021. – Vol. 157. – P. 103166.

52. Imyanitov, E.N. 1785P Tumor irradiation may improve the sensitivity of liquid biopsy: The analysis of RAS/RAF mutations in plasma obtained from radiotherapy-treated rectal cancer patients / E.N. Imyanitov, T.A. Laidus, F. Moiseyenko, et al. // Annals of Oncology. – 2021. – Vol. 32. – P. S1220.

53. Janku, F. MultiplexKRASG12/G13 mutation testing of unamplified cell-free DNA from the plasma of patients with advanced cancers using droplet digital polymerase chain reaction / F. Janku, H.J. Huang, T. Fujii, et al. // Annals of Oncology. – 2017. – Vol. 28. – № 3. – P. 642-650.

54. Joachim, C. Overall survival of colorectal cancer by stage at diagnosis: Data from the Martinique Cancer Registry / C. Joachim, J. Macni, M. Drame, et al. // Medicine. – 2019. – Vol. 98. – № 35. – P. e16941.

55. Jung, M. Changes in Concentration of DNA in Serum and Plasma during Storage of Blood Samples / M. Jung, S. Klotzek, M. Lewandowski, et al. // Clinical Chemistry. – 2003. – Vol. 49. – № 6. – P. 1028-1029.

56. Kagawa, Y. Combined Analysis of Concordance between Liquid and Tumor Tissue Biopsies for RAS Mutations in Colorectal Cancer with a Single Metastasis Site: The METABEAM Study / Y. Kagawa, E. Elez, J. García-Foncillas, et al. // Clinical Cancer Research. – 2021. – Vol. 27. – № 9. – P. 2515-2522.

57. Khakoo, S. MRI Tumor Regression Grade and Circulating Tumor DNA as Complementary Tools to Assess Response and Guide Therapy Adaptation in Rectal Cancer / S. Khakoo, P.D. Carter, G. Brown, et al. // Clinical Cancer Research. – 2020. – Vol. 26. – № 1. – P. 183-192.

58. Kidess-Sigal, E. Enumeration and targeted analysis of *KRAS*, *BRAF* and *PIK3CA* mutations in CTCs captured by a label-free platform: Comparison to ctDNA and tissue in metastatic colorectal cancer / E. Kidess-Sigal, H.E. Liu, M.M. Triboulet, et al. // *Oncotarget*. – 2016. – Vol. 7. – № 51. – P. 85349-85364.
59. Kim, M.J. Survival Paradox Between Stage IIB/C (T4N0) and Stage IIIA (T1-2N1) Colon Cancer / M.J. Kim, S.-Y. Jeong, S. Choi, et al. // *Annals of Surgical Oncology*. – 2015. – Vol. 22. – № 2. – P. 505-512.
60. Kinross, J.M. Accurate early-stage colorectal cancer detection through analysis of cell-free circulating tumor DNA (ctDNA) methylation patterns. / J.M. Kinross, P. Canal-Noguer, M. Chersicola, et al. // *Journal of Clinical Oncology*. – 2021. – Vol. 39. – № 15\_suppl. – P. 3606-3606.
61. Kopreski, M.S. Somatic Mutation Screening: Identification of Individuals Harboring K-ras Mutations With the Use of Plasma DNA / M.S. Kopreski // *Journal of the National Cancer Institute*. – 2000. – Vol. 92. – № 11. – P. 918-923.
62. Kotaka, M. Association of circulating tumor DNA dynamics with clinical outcomes in the adjuvant setting for patients with colorectal cancer from an observational GALAXY study in CIRCULATE-Japan / M. Kotaka, H. Shirasu, J. Watanabe, et al. // *Journal of Clinical Oncology*. – 2022. – Vol. 40. – № 4\_suppl. – P. 9.
63. Lastraioli, E. *KRAS* and *NRAS* mutation detection in circulating DNA from patients with metastatic colorectal cancer using BEAMing assay: Concordance with standard biopsy and clinical evaluation / E. Lastraioli, L. Antonuzzo, B. Fantechi, et al. // *Oncology Letters*. – 2020. – Vol. 21. – № 1. – P. 15.
64. Lee, J. Multimodal circulating tumor DNA (ctDNA) colorectal neoplasia detection assay for asymptomatic and early-stage colorectal cancer (CRC) / J. Lee, H.C. Kim, S.T. Kim, et al. // *Journal of Clinical Oncology*. – 2021. – Vol. 39. – № 15\_suppl. – P. 3536-3536.
65. Lee, S. Clinical Implication of Liquid Biopsy in Colorectal Cancer Patients Treated with Metastasectomy / S. Lee, Y.-S. Park, W.-J. Chang, et al. // *Cancers*. – 2021. – Vol. 13. – № 9. – P. 2231.

66. Lee, T.-H. Quantitation of genomic DNA in plasma and serum samples: higher concentrations of genomic DNA found in serum than in plasma / T.-H. Lee, L. Montalvo, V. Chrebtow, et al. // *Transfusion*. – 2001. – Vol. 41. – № 2. – P. 276-282.
67. Lee, V.W.K. Tumor budding and poorly-differentiated cluster in prognostication in Stage II colon cancer / V.W.K. Lee, K.F. Chan // *Pathology - Research and Practice*. – 2018. – Vol. 214. – № 3. – P. 402-407.
68. Leon, S.A. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy / S.A. Leon, B. Shapiro, D.M. Sklaroff, et al. // *Cancer Research*. – 1977. – Vol. 37. – № 3. – P. 646-650.
69. Lim, Y. Longitudinal monitoring of circulating tumor DNA (ctDNA) during disease course of metastatic colorectal cancer (mCRC). / Y. Lim, S. Kim, J.-K. Kang, et al. // *Journal of Clinical Oncology*. – 2022. – Vol. 40. – № 4\_suppl. – P. 189-189.
70. Lin, P.-C. Clinical Relevance of Plasma DNA Methylation in Colorectal Cancer Patients Identified by Using a Genome-Wide High-Resolution Array / P.-C. Lin, J.-K. Lin, C.-H. Lin, et al. // *Annals of Surgical Oncology*. – 2015. – Vol. 22. – № S3. – P. 1419-1427.
71. Liu, F. 2185 Detection of KRAS mutations in plasma from patients with metastatic colorectal cancer by the next-generation sequencing / F. Liu, C. Li, J. Zhao, et al. // *European Journal of Cancer*. – 2015. – Vol. 51. – P. S395.
72. Lo, Y.M.D. Rapid Clearance of Fetal DNA from Maternal Plasma / Y.M.D. Lo, J. Zhang, T.N. Leung, et al. // *The American Journal of Human Genetics*. – 1999. – Vol. 64. – № 1. – P. 218-224.
73. Loree, J.M. Serial circulating tumor DNA (ctDNA) monitoring in metastatic colorectal cancer (mCRC) reveals dynamic profile of actionable alterations. / J.M. Loree, J. Henry, K.P.S. Raghav, et al. // *Journal of Clinical Oncology*. – 2021. – Vol. 39. – № 15\_suppl. – P. 3572-3572.
74. Loupakis, F. Detection of Molecular Residual Disease Using Personalized Circulating Tumor DNA Assay in Patients With Colorectal Cancer Undergoing Resection of Metastases / F. Loupakis, S. Sharma, M. Derouazi, et al. // *JCO Precision Oncology*. – 2021. – № 5. – P. 1166-1177.

75. Lumish, M.A. Frequency of minimal residual disease as measured by ctDNA in mismatch repair deficient tumors following curative resection. / M.A. Lumish, G. Jayakumaran, M. Fox, et al. // *Journal of Clinical Oncology*. – 2021. – Vol. 39. – № 15\_suppl. – P. e14520-e14520.

76. Luo, H. Circulating tumor DNA methylation profiles enable early diagnosis, prognosis prediction, and screening for colorectal cancer / H. Luo, Q. Zhao, W. Wei, et al. // *Science Translational Medicine*. – 2020. – Vol. 12. – № 524. – P. eaax7533.

77. Mahar, A.L. Personalizing prognosis in colorectal cancer: A systematic review of the quality and nature of clinical prognostic tools for survival outcomes / A.L. Mahar, C. Compton, S. Halabi, et al. // *Journal of Surgical Oncology*. – 2017. – Vol. 116. – № 8. – P. 969-982.

78. Mardinian, K. Temporal and spatial effects and survival outcomes associated with concordance between tissue and blood *KRAS* alterations in the pan-cancer setting / K. Mardinian, R. Okamura, S. Kato, et al. // *International Journal of Cancer*. – 2020. – Vol. 146. – № 2. – P. 566-576.

79. Masfarré, L. ctDNA to Guide Adjuvant Therapy in Localized Colorectal Cancer (CRC) / L. Masfarré, J. Vidal, C. Fernández-Rodríguez, et al. // *Cancers*. – 2021. – Vol. 13. – № 12. – P. 2869.

80. McNamara, S. Detection of minimal residual disease (MRD) in colorectal cancer (CRC) patients UICC stage II/III by ultra-deep sequencing of cfDNA from post-surgery plasma. / S. McNamara, R.D. Patel, H.-P. Adams, et al. // *Journal of Clinical Oncology*. – 2022. – Vol. 40. – № 4\_suppl. – P. 26-26.

81. Mehrotra, M. Detection of somatic mutations in cell-free DNA in plasma and correlation with overall survival in patients with solid tumors / M. Mehrotra, R.R. Singh, S. Loghavi, et al. // *Oncotarget*. – 2018. – Vol. 9. – № 12. – P. 10259-10271.

82. Modest, D.P. Outcome according to *KRAS*-, *NRAS*- and *BRAF*-mutation as well as *KRAS* mutation variants: pooled analysis of five randomized trials in metastatic colorectal cancer by the AIO colorectal cancer study group / D.P. Modest, I. Ricard, V. Heinemann, et al. // *Annals of Oncology*. – 2016. – Vol. 27. – № 9. – P. 1746-1753.

83. Molparia, B. A feasibility study of colorectal cancer diagnosis via circulating tumor DNA derived CNV detection / B. Molparia, G. Oliveira, J.L. Wagner, et al. // PLOS ONE. – 2018. – Vol. 13. – № 5. – P. e0196826.

84. Morris, V.K. Phase II/III study of circulating tumor DNA as a predictive biomarker in adjuvant chemotherapy in patients with stage II colon cancer: NRG-GI005 (COBRA). / V.K. Morris, G. Yothers, S. Kopetz, et al. // Journal of Clinical Oncology. – 2020. – Vol. 38. – № 15\_suppl. – P. TPS4121-TPS4121.

85. Mosko, M.J. Ultrasensitive Detection of Multiplexed Somatic Mutations Using MALDI-TOF Mass Spectrometry / M.J. Mosko, A.A. Nakorchevsky, E. Flores, et al. // The Journal of Molecular Diagnostics. – 2016. – Vol. 18. – № 1. – P. 23-31.

86. Naidoo, M. ctDNA and Adjuvant Therapy for Colorectal Cancer: Time to Re-Invent Our Treatment Paradigm / M. Naidoo, P. Gibbs, J. Tie // Cancers. – 2021. – Vol. 13. – № 2. – P. 346.

87. Nakamura, Y. Clinical utility of circulating tumor DNA sequencing in advanced gastrointestinal cancer: SCRUM-Japan GI-SCREEN and GOZILA studies / Y. Nakamura, H. Taniguchi, M. Ikeda, et al. // Nature Medicine. – 2020. – Vol. 26. – № 12. – P. 1859-1864.

88. Newman, A.M. An ultrasensitive method for quantitating circulating tumor DNA with broad patient coverage / A.M. Newman, S.V. Bratman, J. To, et al. // Nature Medicine. – 2014. – Vol. 20. – № 5. – P. 548-554.

89. Okamoto, W. Pertuzumab plus trastuzumab and real-world standard of care (SOC) for patients (pts) with treatment refractory metastatic colorectal cancer (mCRC) with *HER2* ( *ERBB2* ) amplification (amp) confirmed by tumor tissue or ctDNA analysis (TRIUMPH, EPOC1602). / W. Okamoto, Y. Nakamura, T. Kato, et al. // Journal of Clinical Oncology. – 2021. – Vol. 39. – № 15\_suppl. – P. 3555-3555.

90. Oki, E. Plasma-informed minimal residual disease (MRD) assay: A multicenter prospective study in Japanese patients with stage II colorectal cancer. / E. Oki, K. Ando, Y. Hisamatsu, et al. // Journal of Clinical Oncology. – 2022. – Vol. 40. – № 4\_suppl. – P. 161-161.

91. Osumi, H. Clinical utility of circulating tumor DNA for colorectal cancer / H. Osumi, E. Shinozaki, K. Yamaguchi, et al. // *Cancer Science*. – 2019. – Vol. 110. – № 4. – P. 1148-1155.
92. Phallen, J. Direct detection of early-stage cancers using circulating tumor DNA / J. Phallen, M. Sausen, V. Adleff, et al. // *Science Translational Medicine*. – 2017. – Vol. 9. – № 403. – P. eaan2415.
93. Philipp, A.B. Circulating cell-free methylated DNA and lactate dehydrogenase release in colorectal cancer / A.B. Philipp, D. Nagel, P. Stieber, et al. // *BMC Cancer*. – 2014. – Vol. 14. – № 1. – P. 245.
94. Philipp, A.B. Prognostic role of methylated free circulating DNA in colorectal cancer / A.B. Philipp, P. Stieber, D. Nagel, et al. // *International Journal of Cancer*. – 2012. – Vol. 131. – № 10. – P. 2308-2319.
95. Pucciarelli, S. Cell-free circulating DNA as a promising marker of colorectal cancer detection and progression / S. Pucciarelli, M. Enzo, M. Agostini, et al. // *Journal of Clinical Oncology*. – 2009. – Vol. 27. – № 15\_suppl. – P. 11059-11059.
96. Puzzoni, M. 417P Liquid biopsy driven anti-EGFR rechallenge in metastatic colorectal cancer / M. Puzzoni, R. Giampieri, S. Mariani, et al. // *Annals of Oncology*. – 2021. – Vol. 32. – P. S543-S544.
97. Raghav, K.P.S. Assessment of HER2 ( *ERBB2* ) amplification (HER2amp) using blood-based circulating tumor DNA (ctDNA) next generation sequencing (NGS) and correlation with tissue-based testing in metastatic colorectal cancer (mCRC). / K.P.S. Raghav, Y. Nakamura, S. Marsoni, et al. // *Journal of Clinical Oncology*. – 2021. – Vol. 39. – № 15\_suppl. – P. 3589-3589.
98. Raghav, K.P.S. Circulating tumor DNA dynamics on front-line chemotherapy with bevacizumab or cetuximab in metastatic colorectal cancer: A biomarker analysis for acquired genomic alterations in CALGB/SWOG 80405 (Alliance) randomized trial. / K.P.S. Raghav, F.-S. Ou, A.P. Venook, et al. // *Journal of Clinical Oncology*. – 2022. – Vol. 40. – № 4\_suppl. – P. 193-193.
99. Rahbari, N.N. Molecular Detection of Tumor Cells in Regional Lymph Nodes Is Associated With Disease Recurrence and Poor Survival in Node-Negative Colorectal

Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis / N.N. Rahbari, U. Bork, E. Motschall, et al. // *Journal of Clinical Oncology*. – 2012. – Vol. 30. – № 1. – P. 60-70.

100. Rawla, P. Epidemiology of colorectal cancer: incidence, mortality, survival, and risk factors. / P. Rawla, T. Sunkara, A. Barsouk. – 2019. – Vol. 14. – № 2. – P. 89-103.

101. Razavi, P. High-intensity sequencing reveals the sources of plasma circulating cell-free DNA variants / P. Razavi, B.T. Li, D.N. Brown, et al. // *Nature Medicine*. – 2019. – Vol. 25. – № 12. – P. 1928-1937.

102. Reinert, T. Analysis of Plasma Cell-Free DNA by Ultradeep Sequencing in Patients With Stages I to III Colorectal Cancer / T. Reinert, T.V. Henriksen, E. Christensen, et al. // *JAMA Oncology*. – 2019. – Vol. 5. – № 8. – P. 1124.

103. Riihimäki, M. Patterns of metastasis in colon and rectal cancer / M. Riihimäki, A. Hemminki, J. Sundquist, et al. // *Scientific Reports*. – 2016. – Vol. 6. – № 1. – P. 29765.

104. Sartore-Bianchi, A. Phase II study of anti-EGFR rechallenge therapy with panitumumab driven by circulating tumor DNA molecular selection in metastatic colorectal cancer: The CHRONOS trial. / A. Sartore-Bianchi, F. Pietrantonio, S. Lonardi, et al. // *Journal of Clinical Oncology*. – 2021. – Vol. 39. – № 15\_suppl. – P. 3506-3506.

105. Schøler, L.V. Clinical Implications of Monitoring Circulating Tumor DNA in Patients with Colorectal Cancer / L.V. Schøler, T. Reinert, M.-B.W. Ørntoft, et al. // *Clinical Cancer Research*. – 2017. – Vol. 23. – № 18. – P. 5437-5445.

106. Schraa, S.J. Circulating tumor DNA guided adjuvant chemotherapy in stage II colon cancer (MEDOCC-CrEATE): study protocol for a trial within a cohort study / S.J. Schraa, K.L. van Rooijen, D.E.W. van der Kruijssen, et al. // *BMC Cancer*. – 2020. – Vol. 20. – № 1. – P. 790.

107. Sefrioui, D. Plasma cell-free DNA and fraction of circulating KRAS mutations as prognostic in patients with metastatic colorectal cancer. / D. Sefrioui, N. Vasseur, R. Sesboué, et al. // *Journal of Clinical Oncology*. – 2014. – Vol. 32. – № 3\_suppl. – P. 490-490.

108. Sobrero, A.F. A new prognostic and predictive tool for shared decision making in stage III colon cancer / A.F. Sobrero, A. Puccini, Q. Shi, et al. // *European Journal of Cancer*. – 2020. – Vol. 138. – P. 182-188.
109. Spindler, K.-L.G. Cell-Free DNA in Metastatic Colorectal Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis / K.-L.G. Spindler, A.K. Boysen, N. Pallisgård, et al. // *The Oncologist*. – 2017. – Vol. 22. – № 9. – P. 1049-1055.
110. Spindler, K.L.G. Circulating Free DNA as Biomarker and Source for Mutation Detection in Metastatic Colorectal Cancer / K.L.G. Spindler, N. Pallisgaard, R.F. Andersen, et al. // *PLOS ONE*. – 2015. – Vol. 10. – № 4. – P. e0108247.
111. Sun, J. The role of mSEPT9 in screening, diagnosis, and recurrence monitoring of colorectal cancer / J. Sun, F. Fei, M. Zhang, et al. // *BMC Cancer*. – 2019. – Vol. 19. – № 1. – P. 450.
112. Sung, H. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries / H. Sung, J. Ferlay, R.L. Siegel, et al. // *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. – 2021. – Vol. 71. – № 3. – P. 209-249.
113. Taieb, J. Prognostic Value and Relation with Adjuvant Treatment Duration of ctDNA in Stage III Colon Cancer: a *Post Hoc* Analysis of the PRODIGE-GERCOR IDEA-France Trial / J. Taieb, V. Taly, J. Henriques, et al. // *Clinical Cancer Research*. – 2021. – Vol. 27. – № 20. – P. 5638-5646.
114. Telysheva, E.N. The use of wild-type blocking allele-specific real-time polymerase chain reaction for the analysis of somatic mutations in RAS genes of circulating free DNA isolated from the blood plasma of patients with colorectal cancer / E.N. Telysheva, G.P. Snigireva // *Bulletin of Russian State Medical University*. – 2017. – № 4. – P. 13-18.
115. Thierry, A.R. Clinical utility of circulating DNA analysis for rapid detection of actionable mutations to select metastatic colorectal patients for anti-EGFR treatment / A.R. Thierry, S. El Messaoudi, C. Mollevi, et al. // *Annals of Oncology*. – 2017. – Vol. 28. – № 9. – P. 2149-2159.

116. Thierry, A.R. Clinical validation of the detection of KRAS and BRAF mutations from circulating tumor DNA / A.R. Thierry, F. Mouliere, S. El Messaoudi, et al. // *Nature Medicine*. – 2014. – Vol. 20. – № 4. – P. 430-435.

117. Tie, J. Adjuvant chemotherapy guided by circulating tumor DNA analysis in stage II colon cancer: The randomized DYNAMIC trial. / J. Tie, J. Cohen, K. Lahouel, et al. // *Journal of Clinical Oncology*. – 2022. – Vol. 40. – № 17\_suppl. – P. LBA100-LBA100.

118. Tie, J. Circulating Tumor DNA Analyses as Markers of Recurrence Risk and Benefit of Adjuvant Therapy for Stage III Colon Cancer / J. Tie, J.D. Cohen, Y. Wang, et al. // *JAMA Oncology*. – 2019. – Vol. 5. – № 12. – P. 1710.

119. Tie, J. Circulating tumor DNA analysis detects minimal residual disease and predicts recurrence in patients with stage II colon cancer / J. Tie, Y. Wang, C. Tomasetti, et al. // *Science Translational Medicine*. – 2016. – Vol. 8. – № 346.

120. Tie, J. Circulating tumor DNA as an early marker of therapeutic response in patients with metastatic colorectal cancer / J. Tie, I. Kinde, Y. Wang, et al. // *Annals of Oncology*. – 2015. – Vol. 26. – № 8. – P. 1715-1722.

121. Tie, J. Circulating tumor DNA dynamics and recurrence risk in patients undergoing curative intent resection of colorectal cancer liver metastases: A prospective cohort study / J. Tie, Y. Wang, J. Cohen, et al. // *PLOS Medicine*. – 2021. – Vol. 18. – № 5. – P. e1003620.

122. Tie, J. Circulating tumor DNA as a biomarker to guide therapy in post-operative locally advanced rectal cancer: the best option? / J. Tie, C. Semira, P. Gibbs // *Expert Review of Molecular Diagnostics*. – 2018. – Vol. 18. – № 1. – P. 1-3.

123. To, E.W.H. Rapid clearance of plasma Epstein-Barr virus DNA after surgical treatment of nasopharyngeal carcinoma / E.W.H. To, K.C.A. Chan, S.-F. Leung, et al. // *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*. – 2003. – Vol. 9. – № 9. – P. 3254-3259.

124. Tóth, K. Detection of Methylated SEPT9 in Plasma Is a Reliable Screening Method for Both Left- and Right-Sided Colon Cancers / K. Tóth, F. Sipos, A. Kalmár, et al. // *PLoS ONE*. – 2012. – Vol. 7. – № 9. – P. e46000.

125. Tsai, W.-S. Prospective clinical study of circulating tumor cells for colorectal cancer screening. / W.-S. Tsai, A. Nimgaonkar, O. Segurado, et al. // *Journal of Clinical Oncology*. – 2018. – Vol. 36. – № 4\_suppl. – P. 556-556.

126. Vessies, D.C.L. Performance of four platforms for KRAS mutation detection in plasma cell-free DNA: ddPCR, Idylla, COBAS z480 and BEAMing / D.C.L. Vessies, M.J.E. Greuter, K.L. van Rooijen, et al. // *Scientific Reports*. – 2020. – Vol. 10. – № 1. – P. 8122.

127. Vidal, J. Plasma ctDNA RAS mutation analysis for the diagnosis and treatment monitoring of metastatic colorectal cancer patients / J. Vidal, L. Muinelo, A. Dalmases, et al. // *Annals of Oncology*. – 2017. – Vol. 28. – № 6. – P. 1325-1332.

128. Vymetalkova, V. Circulating Cell-Free DNA and Colorectal Cancer: A Systematic Review / V. Vymetalkova, K. Cervena, L. Bartu, et al. // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2018. – Vol. 19. – № 11. – P. E3356.

129. Wang, C. Regorafenib and Nivolumab or Pembrolizumab Combination and Circulating Tumor DNA Response Assessment in Refractory Microsatellite Stable Colorectal Cancer / C. Wang, D. Chevalier, J. Saluja, et al. // *The Oncologist*. – 2020. – Vol. 25. – № 8. – P. e1188-e1194.

130. Wang, D.-S. Dynamic monitoring of circulating tumor DNA to predict prognosis and efficacy of adjuvant chemotherapy after resection of colorectal liver metastases / D.-S. Wang, H. Yang, X.-Y. Liu, et al. // *Theranostics*. – 2021. – Vol. 11. – № 14. – P. 7018-7028.

131. Wang, Y. 451P Utility of circulating free DNA 5'-end motif profile in the prediction of pathological response after neoadjuvant chemoradiotherapy in patients with locally advanced rectal cancer / Y. Wang, X. Fan, Y. Xu, et al. // *Annals of Oncology*. – 2021. – Vol. 32. – P. S558.

132. Weinberg, B.A. Early Detection of Circulating Tumor DNA Postoperatively Enables Discovery of Resectable Metastatic Disease in a Patient with Colon Cancer / B.A. Weinberg, E.R. Winslow, M. Bayasi, et al. // *Case Reports in Oncology*. – 2021. – Vol. 14. – № 3. – P. 1748-1753.

133. Yao, J. RAS/BRAF Circulating Tumor DNA Mutations as a Predictor of Response to First-Line Chemotherapy in Metastatic Colorectal Cancer Patients / J. Yao, W. Zang, Y. Ge, et al. // Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology. – 2018. – Vol. 2018. – P. 1-10.

134. Yukami, H. 113TiP Prospective observational study monitoring circulating tumour DNA in resectable colorectal cancer patients undergoing radical surgery: GALAXY study in CIRCULATE-Japan / H. Yukami, M. Saori, D. Kotani, et al. // Annals of Oncology. – 2020. – Vol. 31. – P. S1285-S1286.

135. Yukami, H. P-120 Prospective observational study monitoring circulating tumor DNA in resectable colorectal cancer patients undergoing radical surgery: GALAXY study in CIRCULATE-Japan (trial in progress) / H. Yukami, S. Mishima, D. Kotani, et al. // Annals of Oncology. – 2020. – Vol. 31. – P. S128-S129.

136. Zhou, H. Adjuvant chemotherapy benefits on patients with elevated carcinoembryonic antigen in stage IIA colon cancer: a SEER-based analysis / H. Zhou, S. Wang, Z. Cai, et al. // International Journal of Colorectal Disease. – 2022.

137. Zurlo, V. 469P Potential emergent role of liquid biopsy in clinical practice in metastatic colorectal cancer (mCRC) treatment / V. Zurlo, D. Lucchetti, F. Colella, et al. // Annals of Oncology. – 2021. – Vol. 32. – P. S566.

138. Mandel, P.M. Les acides nucleiques du plasma sanguine chez l'homme. / P.M. Mandel, P. Mqtais. – 1948. – № 142. – P. 241-243.