

Перспектива использования жидкостной биопсии в диагностике и лечении опухолей невыявленной первичной локализации

И. Б. Кононенко, М. Г. Филиппова, А. В. Снеговой, С. Л. Гуторов

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России;
Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 23

Контакты: Маргарита Геннадьевна Филиппова fmargarita@yandex.ru

Введение. Поиск и использование новых молекулярных прогностических и предиктивных маркеров, выявляемых методом жидкостной биопсии, направлены на определение молекулярно-биологических особенностей опухолей невыявленной первичной локализации (ОНПЛ), что должно способствовать более активному внедрению персонализированного подхода в терапии злокачественных новообразований и улучшению результатов лечения. Обзор посвящен системному анализу достижений в научных и клинических исследованиях по данной тематике.

Материалы и методы. В целях оценки современного состояния проблемы были осуществлены поиск и анализ актуальных данных по научным базам PubMed, Medline, РИНЦ и др.

Результаты. Представлено научное обоснование использования в клинической практике жидкостной биопсии для совершенствования лечения пациентов с ОНПЛ. Приведены результаты применения современных подходов к анализу образцов жидкостной биопсии при ОНПЛ. В частности, рассмотрены особенности использования в анализе циркулирующей свободной ДНК, циркулирующей опухолевой ДНК, циркулирующих опухолевых клеток. Обсуждены современные возможности определения тканевой специфичности с использованием жидкостной биопсии при ОНПЛ. Определены перспективы развития жидкостной биопсии для совершенствования диагностики, оценки прогноза заболевания, выбора стратегии лечения ОНПЛ.

Заключение. Обзор литературы подтверждает, что современные методы молекулярного профилирования опухолевых клеток, полученных как при жидкостной биопсии, так и в результате биопсии ткани, вносят значимый вклад в определение тканевой специфичности, молекулярных характеристик ОНПЛ для персонализированного подхода в целях совершенствования стратегии и улучшения результатов лечения пациентов с ОНПЛ.

Ключевые слова: опухоль невыявленной первичной локализации, жидкостная биопсия, циркулирующие опухолевые клетки, молекулярное профилирование, экспрессия генов, таргетная терапия

Для цитирования: Кононенко И. Б., Филиппова М. Г., Снеговой А. В., Гуторов С. Л. Перспектива использования жидкостной биопсии в диагностике и лечении опухолей невыявленной первичной локализации. Успехи молекулярной онкологии 2020;7(4):10–9.

DOI: 10.17650/2313-805X-2020-7-4-10-19



The prospect of using liquid biopsy in diagnosis and treatment strategy in patients with carcinomas of unknown primary

I. B. Kononenko, M. G. Filippova, A. V. Snegovoy, S. L. Gutorov

N. N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia;
23 Kashirskoe Shosse, Moscow 115478, Russia

Background. The search and use of new molecular prognostic and predictive markers of efficacy detected by liquid biopsy are aimed at understanding the biology of Carcinomas of Unknown Primary (CUP) and improving results of patient treatment. The review is devoted to advances in scientific and clinical research on this issue.

Materials and methods. In order to assess the current state of the problem, a search and analysis of relevant data of the scientific databases PubMed, Medline, RISC was carried out.

Results. The scientific rationale for the use of liquid biopsy in clinical practice to improve the treatment of cancer patients with CUP is presented. The results of the use of modern approaches to the analysis of fluid biopsy samples in CUP are presented. In particular, the features of using circulating free DNA, circulating tumor DNA, circulating tumor cells in the analysis are considered. The modern possibilities of determining tissue specificity using liquid biopsy in CUP are discussed. The prospects for the development of liquid biopsy for improving diagnostics, determining the prognosis of the disease, and choosing a strategy for treating CUP and the treatment monitoring have been determined.

Conclusion. A review of the literature confirms that modern methods of molecular profiling of tumor cells obtained both as a result of liquid biopsy and tissue biopsies will make a significant contribution to the determination of tissue specificity, molecular characteristics of CUP for a personalized approach in order to improve strategies and treatment outcomes for patients with CUP.

Key words: *carcinomas of unknown primary, liquid biopsy, circulating tumor cells, molecular profiling, gene expression, targeted therapy*

For citation: *Kononenko I.B., Filippova M.G., Snegovoy A.V., Gutorov S.L. The prospect of using liquid biopsy in diagnosis and treatment strategy in patients with carcinomas of unknown primary. Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology 2020;7(4): 10–9. (In Russ.).*

Введение

Опухоли невыявленной первичной локализации (ОНПЛ) – заболевание, проявляющееся метастатическим процессом, при котором первичный очаг невозможно установить ни на основании анамнеза, ни по результатам стандартных диагностических обследований [1]. По данным литературы, ОНПЛ занимают 7-е место по частоте встречаемости и 4-е место в структуре смертности среди всех злокачественных новообразований [2, 3]. Пациенты с ОНПЛ составляют от 3 до 5 % среди онкологических больных [4, 5]. У мужчин и женщин ОНПЛ встречаются приблизительно с одинаковой частотой и имеют прямую корреляцию с увеличением возраста, достигая максимума к 65 годам [6, 7].

Выявление определенных молекулярных характеристик в биологических жидкостях пациентов с ОНПЛ, свидетельствующих об определенном тканевом происхождении опухоли, должно способствовать улучшению диагностики первичного очага. Однако в настоящее время не разработана доказательная научная база для использования молекулярного профилирования опухоли на основании жидкостной биопсии и не существует стандартов для его применения в практике.

В обзоре приведен анализ данных по потенциальной эффективности жидкостной биопсии при ОНПЛ. Информативность этого метода продемонстрирована при многих злокачественных опухолях. Использование жидкостной биопсии позволяет не только идентифицировать генотип опухоли и индивидуализировать лечение, но и предсказать его эффективность.

Основные подходы в лечении онкологических заболеваний опираются на 2 принципа, оба из которых тесно связаны с концепцией «первичной опухоли». Первый заключается в необходимости диагностики первичной опухоли до появления метастазов в других органах. После выполнения радикального хирургического лечения в большинстве случаев пациенты получают дополнительное локальное и/или системное лечение в целях профилактики метастазирования. Второй принцип заключается в том, что локализация первичной опухоли или ее тканевое происхождение является ключевым фактором, определяющим выбор стратегии дальнейшей химиотерапии. В результате использования этих 2 принципов достигнут существенный прогресс в терапии целого ряда онкологических заболеваний и наблюдается постоянное снижение смертности от злокачественных новообразований.

Достижения последних 2 десятилетий в химиотерапии онкологических заболеваний связаны прежде

всего с появлением биологически направленной, так называемой таргетной терапии, которая позволила существенно увеличить продолжительность жизни пациентов при раке молочной железы, легкого, толстой кишки, предстательной железы и меланоме. Несмотря на заметные успехи в химиотерапии, достигнутые благодаря таргетной терапии и иммунотерапии, лечение метастатических форм заболеваний в большинстве случаев остается исключительно сложной задачей.

В настоящее время выбор стратегии химиотерапии ОНПЛ зависит от клинических проявлений. Из-за гетерогенности группы ОНПЛ отсутствует единое мнение по вопросам выбора «оптимальных» схем лечения, включая таргетную терапию и/или иммунотерапию, а также использования прогностических и предиктивных маркеров. Представленный обзор освещает текущие достижения по выявлению маркеров тканевой специфичности (ТС) и ряда молекулярных характеристик ОНПЛ, а также по развитию персонализированного подхода в целях совершенствования стратегии и улучшения результатов лечения больных.

Ограничения диагностических возможностей биопсий при опухолях невыявленной первичной локализации

Отсутствие международного консенсуса по определению и классификации ОНПЛ, а также их значительная гетерогенность ограничивают возможности исследований. В настоящее время «золотым стандартом» диагностики злокачественного новообразования и определения режима лечения онкологического заболевания является биопсия первичной опухоли. Однако при ОНПЛ существуют объективные ограничения как при получении образцов опухолевой ткани, так и при интерпретации результатов биопсий, позволяющих, как правило, получить малое количество материала. Также часто отсутствует уверенность, что полученный образец может в полной мере характеризовать весь молекулярный «ландшафт» опухоли [8]. Показано, что в пределах практически всех известных типов опухолей существуют как внутриопухолевая гетерогенность, так и клональные и субклональные вариации в ткани опухоли и метастазов больного [9].

Биоптаты тканей, взятые из отдельных метастатических образований, с меньшей вероятностью определяют происхождение опухоли с помощью иммуногистохимического анализа, чем таковые, взятые из первичной опухоли [10]. Однако биопсия опухоли является инвазивным методом диагностики, в ряде случаев трудно выполнимым и небезопасным для пациента и в рутинной практике обычно выполняется

только один раз для постановки диагноза. На фоне лекарственной терапии изменяется чувствительность опухолевых клеток к препаратам и формируются резистентные клоны опухолевых клеток, что требует повторного, иногда неоднократного, исследования опухоли для коррекции лечения. Для преодоления перечисленных ограничений в последние годы активно разрабатываются и внедряются в практику неинвазивные методы жидкостной биопсии.

Применение жидкостной биопсии при опухолях невыявленной первичной локализации

С момента установления факта присутствия опухолевого генетического материала в кровотоке возможность использования жидкостной биопсии для выявления клинически значимых биомаркеров опухоли приобрела большой исследовательский интерес [11]. Жидкостная биопсия имеет ряд преимуществ перед биопсией опухоли. В частности, она менее инвазивна, что упрощает получение необходимого количества образцов. В то же время жидкостная биопсия обладает потенциалом в плане совершенствования скрининга, диагностики, выбора стратегии лечения и мониторинга проводимой терапии. Прогресс в технологиях геномного анализа позволил обнаруживать малое количество генетического материала опухоли в крови, что повысило как чувствительность, так и специфичность проводимых анализов. Биомаркеры опухоли, получаемые из крови, включают циркулирующую опухолевую ДНК (цоДНК), опухолевые микроРНК, матричные РНК (мРНК) из опухолеассоциированных тромбоцитов, циркулирующие опухолевые клетки (ЦОК) с последующим анализом в них экспрессии ДНК, РНК и белка [11, 12].

Циркулирующая свободная ДНК и циркулирующая опухолевая ДНК

В множестве последних работ по жидкостной биопсии показана ее клиническая значимость для обнаружения биомаркеров при известных типах опухолей. В частности, мутации в гене *EGFR* при немелкоклеточном раке легкого в ДНК, содержащейся в плевральной жидкости и плазме крови, с высокой вероятностью предсказывают чувствительность или устойчивость к ингибиторам *EGFR* [13]. Результаты исследований роли жидкостной биопсии при ОНПЛ обобщены в табл. 1.

Циркулирующая опухолевая ДНК отражает молекулярные характеристики и происходящие физиологические процессы в опухоли в режиме реального времени. Пациенты с онкологическим заболеванием имеют гораздо большую концентрацию циркулирующей свободной ДНК (цсДНК) по сравнению с таковой у здоровых доноров из-за высокой пролиферативной активности опухолевых клеток и в результате их гибели. В связи с этим в нескольких исследованиях была изучена возможность использования цсДНК

в качестве биомаркера при различных типах онкологических заболеваний [14]. Было установлено, что определение характеристик цсДНК можно использовать для диагностики и раннего выявления заболевания, прогнозирования его развития (при использовании цсДНК в качестве суррогата опухолевой нагрузки), мониторинга реакции на лечение, а также в качестве индикатора рецидива и резистентности к терапии [15].

В работе S. Kato и соавт. для мутационного профилирования ОНПЛ использовали цсДНК. По данным таргетного секвенирования 54–70 генов на 442 образцах, 80 % пациентов имели как минимум одно генетическое нарушение. Мутационный профиль был сопоставим с данными исследования профиля опухолевой ткани ОНПЛ и продемонстрировал гетерогенность, сходную с наблюдаемой для всех типов опухолей. У 1 пациента анализ серии образцов цоДНК, взятых в процессе лечения, показал динамические изменения в мутационном профиле, соответствующие первоначально ответу, а затем формированию резистентности к терапии [16]. Это указывает на возможность использования цоДНК не только для профилирования опухоли, но и для отслеживания механизмов устойчивости к лечению и раннего прогнозирования рецидива (до его выявления объективными методами). При ОНПЛ особенно важно на раннем этапе лечения получить информацию о резистентности к лекарственной терапии, что позволит своевременно поменять тактику и уменьшить риск тяжелых побочных эффектов.

Одним из ограничений анализа цсДНК является определение биологической значимости и патогенности обнаруживаемых мутаций с учетом того, что аналогичные мутации встречаются в цсДНК у здоровых лиц [17]. Помимо мутаций, эпигенетические изменения, такие как метилирование ДНК, модификация гистонов и микроРНК-опосредованная регуляция генов, обеспечивают контроль транскрипции и регулируют экспрессию генов без внесения структурных изменений. В последнее время появляется все больше данных о том, что изучение этих особенностей позволит обеспечить более качественный анализ ДНК и преодолеть неопределенность мутационного статуса за счет лучшей оценки экспрессии генов и их функционирования.

Известно, что наряду с мутациями эпигенетические модификации играют исключительно важную роль в инициации опухолевого роста, предрасположенности к злокачественным новообразованиям, а также специфичны для типа опухоли [18]. Эпигенетические биомаркеры уже начали использоваться в клинических условиях и оказались потенциально полезны для прогнозирования ТС при анализе опухолевого материала из ОНПЛ [19]. Несколько групп исследователей продемонстрировали, что эпигенетические изменения цоДНК можно рассматривать как прогностический и предиктивный маркер, а также для мониторинга ответа на лечение и выявления минимальной остаточной болезни [20].

Циркулирующие опухолевые клетки

Циркулирующие опухолевые клетки – первичные опухолевые или метастатические клетки, которые вошли в периферическое кровообращение в виде единичных клеток или клеточных кластеров, называемых циркулирующими микроэмболами опухоли [8]. Примечательно, что большинство ЦОК подвергаются некоторой стадии апоптоза в кровотоке, что является источником цоДНК [21, 22]. К возможным механизмам, лежащим в основе гематогенного распространения ЦОК из первичной и/или метастатической опухоли, относят пассивное выделение опухолью и перисосудистую инвазию, сопровождаемые эпителиально-мезенхимальным переходом (ЭМП) и нарушением межклеточного взаимодействия [23, 24]. Эпителиальные клетки при ЭМП теряют способность к межклеточным взаимодействиям, приобретают мобильность и инвазивный потенциал. ЦОК после ЭМП могут попадать в определенные опухолевые ниши и формировать метастазы с обратным переходом к фенотипу эпителиальных клеток. Однако лишь очень небольшая часть ЦОК способна впоследствии образовать отдаленный метастаз [8]. На генетическом материале ЦОК могут быть выполнены различные молекулярные исследования, включая анализ вариации числа копий различных генов, наличие активирующих мутаций, амплификаций и делеций, а также могут быть проведены эпигенетический и транскриптомный анализы.

Циркулирующие опухолевые клетки редко встречаются у здоровых лиц или у пациентов с доброкачественным заболеванием [25] и часто обнаруживаются при многих типах злокачественных новообразований. Количество присутствующих в крови ЦОК варьирует в зависимости от многих характеристик опухоли и пациента, а также зависит от технологической платформы, используемой для их обнаружения. ЦОК являются многообещающим источником информации при жидкостной биопсии. Важно, что результаты различных клинических исследований подтвердили, что наличие ЦОК в плазме пациента считается маркером плохого прогноза при многих типах онкологических заболеваний, особенно при раке молочной железы, толстой кишки и предстательной железы [26].

Пациенты с ОНПЛ часто имеют высокую опухолевую нагрузку и агрессивное клиническое течение с множественными метастазами, что позволяет предположить наличие у них относительно высокой частоты ЦОК, а также высокие уровни цоДНК, отражающие высокий уровень пролиферативной активности и гибели опухолевых клеток. Технологии, одобренные Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA), такие как CellSearch® (Veridex, Warren, США), RCCT (Janssen Diagnostics, США), используют для детекции ЦОК в крови антитела к эпителиальным молекулам клеточной адгезии (EpCam) или к цитокератинам 8, 18 и 19. Недостатком данных технологий является отсутствие

в панели маркеров стволовых клеток и опухолевых клеток, осуществивших ЭМП, а также маркеров возможных переходных состояний и атипичных субпопуляций ЦОК. Оценка различных характеристик ЦОК считается перспективной для изучения новых биомаркеров и мишеней для таргетной терапии. Особое клиническое значение имеет определение гетерогенности ЦОК, в частности субпопуляции стволовых опухолевых клеток и клеток с признаками ЭМП [27]. В нескольких исследованиях оценивали ЦОК у небольшого числа пациентов с ОНПЛ [16, 28–30]. В работе K. Komine и соавт. исследовали образцы крови 10 пациентов с ОНПЛ и обнаружили ЦОК в 50 % случаев. ЦОК чаще обнаруживали у пациентов, не получавших лечение, в то же время у пациента в процессе лечения было отмечено снижение их уровня [29]. В 2 исследованиях использовали платформу CellSearch® (см. табл. 1).

В последнее время разработаны новые подходы к анализу ЦОК. Так, платформа RareCyte предназначена для комплексного сбора и идентификации ЦОК, позволяет проводить многопараметрическую оценку отдельных ЦОК и извлекать отдельные клетки для молекулярного анализа. Платформа имеет 4 интегрированных компонента: 1) разделение на основе отделения слоя лейкоцитов от эритроцитов и плазмы путем центрифугирования, позволяющего фракционировать клетки крови на основе различий их плавучей плотности, и выделение фракции ядерных клеток, включающей ЦОК, с последующим нанесением образца на предметные стекла микроскопа; 2) автоматическое многопараметрическое флуоресцентное окрашивание; 3) сканирование, анализ и просмотр изображений; 4) механический поиск ЦОК [31]. Высокоразрешающий анализ единичных клеток (the high-definition single-cell analysis, HD-SCA) сочетает выявление всей популяции ЦОК и редких опухоль-ассоциированных клеток и последующий геномный анализ для обнаружения отдельных субпопуляций с учетом молекулярных и морфологических особенностей [32]. Применение этих подходов к ОНПЛ должно улучшить выявление ЦОК при ОНПЛ, которые, согласно природе заболевания, возможно, потеряли свои эпителиальные маркеры.

На моделях *in vivo*, созданных из культивируемых ЦОК больных распространенным раком (легкого и меланомой), продемонстрировано высокое количество ЦОК [33, 34]. Эксплантаты, полученные из мелкоклеточного рака легкого, точно отражали реакции опухоли на химиотерапию, указывая на то, что они могут быть хорошими моделями для изучения механизмов резистентности опухолевых клеток к химиопрепаратам [35].

Таким образом, эти модели эксплантатов (CDX), полученные из ЦОК, можно использовать для разработки и тестирования новых лекарств, а также для изучения механизмов и закономерностей возникновения гетерогенности в опухоли [33]. В публикации

Таблица 1. Исследования методом жидкостной биопсии при ОНПЛ

Table 1. Liquid biopsy examinations in CUP

Источник Source	Метод Method	Исследуемая выборка Studied sample	Результаты Results
W.J. Allard и соавт., 2004 [25] W.J. Allard et al., 2004 [25]	Подсчет ЦОК (CellSearch®) CTC count (CellSearch®)	964 пациента со злокачественными новообразованиями (в том числе 11 случаев с ОНПЛ). 244 пациента с доброкачественными новообразованиями и здоровых лиц 964 patients with malignant tumors (including 11 cases of CUP). 244 patients with benign tumors and healthy individuals	ЦОК обнаружены в 52 % ($n = 27$) случаев ОНПЛ. Среднее количество ЦОК 16 ± 35 CTC found in 52 % ($n = 27$) of CUP cases. Mean CTC count 16 ± 35
К. Komine и соавт., 2014 [29] K. Komine et al. [29]	Подсчет ЦОК (CellSearch®) CTC count (CellSearch®)	10 пациентов с ОНПЛ (5 из которых до начала лечения) 10 patients with CUP (5 of them prior to treatment)	ЦОК – в 50 % случаев. Среднее количество ЦОК 3–207 (медиана 31). У 1 пациента наблюдалось уменьшение числа ЦОК в ходе терапии CTC in 50 % of cases. Mean CTC count 3–207 (median 31). In 1 patient CTC count decreased during therapy
G. Pentheroudakis, 2012 [30]	Детекция ЦОК с помощью иммунофлуоресценции CTC detection using immunofluorescence	24 пациента с ОНПЛ 24 patients with CUP	ЦОК – у 15 (62,5 %) пациентов, при этом их прогностическая ценность не выявлена CTC in 15 patients (62.5 %), prognostic value not established
S. Kato и соавт., 2017 [16] S. Kato et al., 2017 [16]	Анализ мутационного профиля цсДНК. Панели до 70 генов Analysis of cfDNA mutation profile. Panels up to 70 genes	442 пациента с ОНПЛ 442 patients with CUP	$TP53$ – 37,1 % $KRAS$ – 18,6 % $PIK3CA$ – 15,4 % $BRAF$ – 7,5 % MYC – 7,5 %. Изменение мутационного профиля цсДНК в ходе терапии зарегистрировано у 1 пациента Changes in cfDNA mutation profile detected in 1 patient

Примечание. ОНПЛ – опухоли невыявленной первичной локализации; ЦОК – циркулирующие опухолевые клетки; цсДНК – циркулирующая свободная ДНК.

Note. CUP – carcinoma of unknown primary; CTC – circulating tumor cells; cfDNA – circulating free DNA.

P. Torres-Ayuso и соавт. описан аналогичный подход с использованием клеточной культуры – эксплантат (patient-derived xenograft model, PDX), полученный из нейроэндокринной ОНПЛ пациента. Были проведены секвенирование следующего поколения, высокопроизводительный (high-throughput) анализ сигнальных путей и испытания на эффективность лекарственного средства. Драйверных мутаций не обнаружено. Однако полное секвенирование генома выявило амплификацию участков 3q и 5p, включающих гены *PIK3CA* и *RICTOR* соответственно. Анализ сигнальных путей выявил активацию пути АКТ. На основании этих данных эффективность ингибиторов *PIK3CA* и АКТ оценивали в культуре клеток, полученных при биопсии опухоли и в PDX. Ответная реакция на ингибитор АКТ AZD5363 наблюдалась как *in vitro*, так и *in vivo*, указывая на то, что лечение, приводящее к ингибированию серин-/треонинкиназы АКТ, может быть эффективным для данного пациента [36].

Определение тканевой специфичности с использованием жидкостной биопсии

Результаты недавних исследований при известных типах опухолей демонстрируют чувствительность и специфичность метода выявления рака с помощью жидкостных биопсий (см. табл. 1, табл. 2). Они включают генетическое и эпигенетическое профилирование цсДНК, окрашивание ЦОК и анализ мРНК опухолевых тромбоцитов [12, 37–43]. Многие из этих исследований были сосредоточены на раннем выявлении заболевания в поисках неинвазивного метода обнаружения рака, пригодного для скрининга. Однако очевидно, что выявление мутаций цсДНК надежнее при распространенном метастатическом процессе [44], в условиях более высокой опухолевой нагрузки и большего объема циркулирующего генетического опухолевого материала. Результаты исследования ТС демонстрируют чувствительность 60–98 % в зависимости от типа опухоли и молекулярного подхода [12, 37–41].

Таблица 2. Исследования ТС опухоли на образцах, полученных из крови, при злокачественных опухолях различной локализации

Table 2. Studies of tumor TS in samples obtained from blood in malignant tumors of different sites

Источник Source	Метод Method	Исследуемая выборка Studied sample	Результаты Results
M.G. Best и соавт., 2015 [12] M.G. Best et al., 2015 [12]	ОАТ; профилирование мРНК ОАТ TEP, TEP mRNA profiling	55 здоровых доноров; 55 healthy donors; ЗНО различной локализации: MTs of varying sites: 60 случаев немелкоклеточного рака легкого; 60 cases of non-small-cell lung cancer; 41 – КРР; 41 – CRC; 39 – глиобластомы; 39 – glioblastoma; 35 – рака поджелудочной железы; 35 – pancreatic cancer; 39 – РМЖ; 39 – BC; 14 – ГБК 14 – HBC	Профили мРНК ОАТ, способных прогнозировать происхождение ткани по 6 типам первичных опухолей с медианной точностью 73 % TED mRNA profiles allowing to predict tissue origin for 6 types of primary tumors with median accuracy of 73 %
E.A. Klein и соавт., 2018 [37] E.A. Klein et al., 2018 [37]	цсДНК. Таргетное секвенирование следующего поколения (панель из 507 генов), анализ вариации числа копий, полногеномное бисульфитное секвенирование cfDNA. Targeted next generation sequencing (507 gene panel), copy number analysis, whole genome bisulfite sequencing	749 здоровых доноров; 749 healthy donors; 878 случаев ЗНО: 878 cases of MTs: 28 – КРР; 28 – CRC; 19 – рака пищевода; 19 – esophageal cancer; 5 – опухолей головы и шеи; 5 – head and neck tumors; 5 – ГБК; 5 – HBC; 73 – рака легкого; 73 – lung cancer; 17 – лимфомы; 17 – lymphomas; 11 – множественной миеломы; 11 – multiple myeloma; 10 – рака яичников; 10 – ovarian cancer; 10 – РПЖ 10 – PCa	Чувствительность метода – 60–90 % при обнаружении перечисленных типов опухолей (стадии I–III) Method sensitivity is 60–90 % for diagnosis of the listed tumor types (stages I–III)
J.D. Cohen и соавт., 2018 [38] J.D. Cohen et al., 2018 [38]	цсДНК. Панель из 16 генов и 8 экспрессируемых опухолью белков (CancerSEEK) cfDNA. Panel of 16 genes and 8 tumor-expressed proteins (CancerSEEK)	812 здоровых доноров 812 healthy donors; 626 случаев ЗНО различной локализации (рак яичников, легкого, печени, желудка, поджелудочной железы, пищевода, РМЖ, КРР) 626 cases of MTs of varying sites (ovarian, lung, liver, stomach, pancreatic, esophageal, BC, CRC)	Верифицирована ТС опухоли у 69–98 % пациентов Tumor TS verified in 69–98 % of patients
K. Sun и соавт., 2015 [39] K. Sun et al., 2015 [39]	цсДНК. Паттерны метилирования cfDNA. Methylation patterns	32 здоровых донора; 32 healthy donors; 29 пациентов с гепатоцеллюлярной карциномой 29 patients with hepatocellular carcinoma	Картирование паттернов метилирования цсДНК позволило отличить гепатоцеллюлярный источник опухолевого генетического материала cfDNA pattern mapping allowed to distinguish hepatocellular source of tumor genetic material
R. Lehmann-Werman и соавт., 2016 [40] R. Lehmann-Werman et al., 2016 [40]	цсДНК. Паттерны метилирования. Метилонные исследования Methylation patterns. Methylation analysis	47 здоровых доноров; 47 healthy donors; 42 больных раком поджелудочной железы 42 patients with pancreatic cancer	В цсДНК обнаружены паттерны метилирования гибели панкреатических клеток у 20 из 42 больных раком поджелудочной железы In cfDNA, methylation patterns of pancreatic cell death were observed in 20 of 42 patients with pancreatic cancer

Окончание табл. 2

End of table 2

Источник Source	Метод Method	Исследуемая выборка Studied sample	Результаты Results
S. Guo и соавт., 2017 [41] S. Guo et al., 2017 [41]	цсДНК. Паттерны метилирования cfDNA. Methylation patterns	75 здоровых доноров; 75 healthy donors; 29 случаев рака легкого; 29 cases of lung cancer; 30 случаев КРП 30 cases of CRC	ТС определена в 82,8 % образцов КРП и в 88,5 % образцов рака легкого TS determined in 82.8 % of CRC samples and in 88.5 % of lung cancer samples
Е. М. Matthew и соавт., 2016 [42] E. M. Matthew et al., 2016 [42]	Подсчет ЦОК (CellSearch®) CTC count (CellSearch®)	2 случая РМЖ; 2 cases of BC; 1 случай РПЖ 1 case of PCa	ИГХ-анализ ЦОК, способных определять происхождение ткани в РМЖ и РПЖ с использованием маркеров: СК7, СК20, ТТf-1, ER, ПСА IHC analysis of CTC allowing to determine tissue source in BC and PCa using CK7, CK20, TTF-1, ER, PSA markers
S. H. Lu и соавт., 2016 [43] S. H. Lu et al., 2016 [43]	Подсчет ЦОК (мультибиомаркерная платформа CellMax, CMx®) CTC count (multi-biomarker platform CellMax, CMx®)	12 здоровых доноров; 12 healthy donors; 13 случаев ЗНО различной локализации (рак легкого, толстой кишки, РПЖ) 13 cases of MTs of varying sites (lung, colon, PCa)	Специфичность метода неудовлетворительная: Unsatisfactory method specificity: была выявлена цсДНК у клинически здоровых лиц; ctDNA was detected in clinically healthy individuals; ТС верифицирована путем ИГХ-метода (маркеры СК7, СК20, ТТf-1, CDX2, ПСА) TS verified using IHC (CK7, CK20, TTF-1, CDX2, PSA markers)

Примечание. ТС – тканевая специфичность; ОАТ – опухоль-ассоциированные тромбоциты; мРНК – матричные РНК; ЗНО – злокачественные новообразования; КРП – колоректальный рак; РМЖ – рак молочной железы; ГБК – гепатобилиарная карцинома; цсДНК – циркулирующая свободная ДНК; РПЖ – рак предстательной железы; ЦОК – циркулирующие опухолевые клетки; ИГХ – иммуногистохимический; ПСА – простатический специфический антиген; цсДНК – циркулирующая опухолевая ДНК.

Note. TS – tissue specificity; ТЕР – tumor-educated platelets; mRNA – matrix RNA; MTs – malignant tumors; CRC – colorectal cancer; BC – breast cancer; HBC – hepatobiliary cancer; cfDNA – circulating free DNA; PCa – prostate cancer; CTC – circulating tumor cells; IHC – immunohistochemistry; PSA – prostate-specific antigen; ctDNA – circulating tumor DNA.

В этих исследованиях показано, что молекулярная характеристика опухоли с использованием жидкостной биопсии возможна, особенно при интенсивном метастатическом распространении. Прогнозирование ТС с помощью молекулярного профилирования при ОНПЛ активно обсуждается специалистами, но пока не применяется на практике. Кроме этого, типичное для таких пациентов наличие множественных метастазов, которые зачастую утрачивают очевидные «молекулярные признаки» для определения ТС, может увеличить гетерогенность цсДНК при ОНПЛ и сделать фенотипирование ЦОК малоинформативным. Несмотря на то что исследования в этой области очень интересны, практическую пользу использования любого из этих методов в отношении определения ТС у пациентов с ОНПЛ еще предстоит выяснить.

В ограниченных исследованиях, оценивающих роль цсДНК и ЦОК при ОНПЛ, продемонстрирована осуществимость использования методов, но о их клинической целесообразности пока судить рано. Классификаторы ТС с использованием жидкостной биопсии

показывают значительный потенциал для диагностики известных типов опухолей, но еще не применены к пациентам с ОНПЛ. Это может быть неопределимым в рационализации диагностического поиска при ОНПЛ и злокачественных новообразованиях неизвестной природы, а также в быстрой диагностике потенциально излечимых злокачественных новообразований, при которых диагностика является критической по времени, например герминогенных опухолей и лимфом. Наиболее полезными жидкостными биопсиями, скорее всего, будут те, которые позволят получать комплексные данные – не только для прогнозирования ТС, но и для обеспечения лучшего прогнозирования, выявления действенных мутаций и маркеров ответа на химиотерапию и/или иммунотерапию, а также для оценки чувствительности к терапии или мониторинга резистентности. Немногочисленные данные исследований при ОНПЛ, выполненных с использованием жидкостной биопсии, представлены в табл. 1.

В литературе опубликовано значительно больше результатов исследований, выполненных на образцах

крови для определения ТС злокачественных опухолей различных локализаций (см. табл. 2).

Заключение

Отсутствие надежных прогностических и предиктивных биомаркеров при ОНПЛ означает неприменимость научно обоснованного выбора терапии. Небольшая часть пациентов группы благоприятного прогноза ОНПЛ имеют хороший ответ на лечение и в результате достигают значимого увеличения выживаемости. Тем не менее большинство пациентов (около 80 %) относятся к группе неблагоприятного прогноза, они чаще имеют висцеральное распространение заболевания, большую опухолевую нагрузку, демонстрируют слабый ответ на стандартную химиотерапию и в настоящее время получают комбинированную химиотерапию на основе клинических и рентгенологических характеристик и ограниченной гистопатологической информации. Эмпирический подход не учитывает гетерогенность этих опухолей и подтверждает необходимость лучшей стратификации лечения.

Поиск новых биомаркеров, в идеале получаемых при жидкостной биопсии, открывает перспективы в диагностике и лечении не только ОНПЛ, но и других типов опухолей. Определение биологического портрета метастатической опухоли на этой основе позволит лучше предсказывать чувствительность к химио-, таргетной и иммунотерапии. Однако для внедрения жидкостной биопсии в клиническую практику существует необходимость в надежных доказательствах. Включение в дизайн клинических исследований при ОНПЛ оценки биомаркеров, получаемых в результате жидкостной биопсии, является одной из важных задач современной онкологии. Такая технология позволит более детально изучить гетерогенность ОНПЛ на молекулярном уровне, а также обеспечить большую безопасность при меньшей инвазивности процедур. В НИИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина инициировано исследование, направленное на поиск надежных прогностических и предиктивных биомаркеров, позволяющих персонализировать диагностику и лечение пациентов с ОНПЛ.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Комаров И.Г., Комов Д.В. Метастазы злокачественных опухолей без выявленного первичного очага. Онкология. Справочник практического врача 2009; 750–57. [Komarov I.G., Komov D.V. Metastases of malignant tumors without an identified primary focus. *Onkologiya. Spravochnik prakticheskogo vracha* = *Oncology. Practitioner Handbook* 2009;750–57. (In Russ.)].
2. Pentheroudakis G., Briasoulis E., Pavlidis N. Cancer of Unknown Primary site: missing primary or missing biology? *Oncologist* 2007;12(4):418–25. DOI: 10.1634/theoncologist.12-4-418.
3. Pavlidis N., Pentheroudakis G. Cancer of unknown primary site: 20 questions to be answered. *Ann Oncol* 2010; 21(Suppl 7): vii303–7. DOI: 10.1093/annonc/mdq278.
4. Рак без выявленного первичного очага. Минимальные клинические рекомендации Европейского общества медицинской онкологии (ESMO). Редакторы русского перевода: С.А. Тюляндин, Д.А. Носов, Н.И. Переводчикова. М.: Издательская группа РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, 2010. 436 с. [The European Society of Medical Oncology (ESMO) Clinical Practice Guidelines on Cancers of Unknown Primary. Eds. of Russian translation: S.A. Tulyandin, D.A. Nosov, N.I. Perovodchikova. Moscow: Izatel'skaya gruppa RONC im. N.N. Blokhina RAMN, 2010. 436 p. (In Russ.)].
5. Blaszyk H., Hartmann A., Björnsson J. Cancer of unknown primary: clinicopathologic correlations. *APMIS* 2003;111:1089–94. DOI: 10.1111/j.1600-0463.2003.apm1111203.x.
6. Hillen H.F.P. Unknown primary tumours. *Postgr Med J* 2000;76:690–3. DOI: 10.1136/pmj.76.901.690.
7. Siegel R., Naishadham D., Ahmedin J. Cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 2012;62(1):10–29. DOI: 10.3322/caac.20138.
8. Thiele J.A., Bethel K., Králičková M. et al. Circulating tumor cells: fluid surrogates of solid tumors. *Ann Rev Pathol Mech Dis* 2017;12:419–47. DOI: 10.1146/annurev-pathol-052016-100256.
9. Gerlinger M., Rowan A.J., Horswell S. et al. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N Engl J Med* 2012;366:883–92. DOI: 10.1056/NEJMoa1113205.
10. Anderson G.G., Weiss L.M. Determining tissue of origin for metastatic cancers: meta-analysis and literature review of immunohistochemistry performance. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2010;18:3–8. DOI: 10.1097/PAI.0b013e3181a75e6d.
11. Alix-Panabières C., Schwarzenbach H., Pantel K. Circulating tumor cells and circulating tumor DNA. *Ann Rev Med* 2012;63:199–215. DOI: 10.1146/annurev-med-062310-094219.
12. Best M.G., Sol N., Kooi I. et al. RNA-Seq of tumor-educated platelets enables blood-based pancancer, multiclass, and molecular pathway cancer diagnostics. *Cancer Cell* 2015;28:666–76. DOI: 10.1016/j.ccell.2015.09.018.
13. Malapelle U., Sirena R., Jantus-Lewintre E. et al. Profile of the Roche cobas® EGFR mutation test v2 for nonsmall cell lung cancer. *Expert Rev Mol Diagn* 2017;17:209–15. DOI: 10.1080/14737159.2017.1288568.
14. Bardelli A., Pantel K. Liquid biopsies, what we do not know (yet). *Cancer Cell* 2017;31:172–9. DOI: 10.1016/j.ccell.2017.01.002.
15. Wan J.C.M., Garcia-Corbacho J., Mouliere F. et al. Liquid biopsies come of age: Towards implementation of circulating tumour DNA. *Nat Rev Cancer* 2017;17: 223–38. DOI: 10.1038/nrc.2017.7.
16. Kato S., Krishnamurthy N., Banks K.C. et al. Utility of genomic analysis in circulating tumor DNA from patients with carcinoma of unknown primary. *Cancer Res* 2017;77:4238–46. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-17-0628.
17. Martincorena I., Roshan A., Gerstung M. et al. High burden and pervasive positive selection of somatic mutations in normal human skin. *Science* 2015;348:880–6. DOI: 10.1126/science.aaa6806.
18. Feinberg A.P., Ohlsson R., Henikoff S. The epigenetic progenitor origin of human cancer. *Nat Rev Genet* 2006;7:21–33. DOI: 10.1038/nrg1748.
19. Moran S., Martínez-Cardús A., Sayols S. et al. Epigenetic profiling to classify cancer of unknown primary: a multicentre, retrospective analysis. *Lancet Oncol* 2016;17:1386–95. DOI: 10.1016/S1470-2045(16)30297-2.

20. Warton K., Mahon K.L., Samimi G. Methylated circulating tumor DNA in blood: power in cancer prognosis and response. *Endocr Relat Cancer* 2016;23(3):R157–71. DOI: 10.1530/ERC-15-0369.
21. Meng S., Tripathy D., Frenkel E.P. et al. Circulating tumor cells in patients with breast cancer dormancy. *Clin Cancer Res* 2004;10:8152–62. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-04-1110.
22. Bockhorn M., Roberge S., Sousa C. et al. Differential gene expression in metastasizing cells shed from kidney tumors. *Cancer Res* 2004;64:2469–73. DOI: 10.1158/0008-5472.can-03-0256.
23. Williamson S.C., Metcalf R.L., Trapani F. et al. Vasculogenic mimicry in small cell lung cancer. *Nat Commun* 2016;7:13322. DOI: 10.1038/ncomms13322.
24. Kwon M.C., Proost N., Song J.Y. et al. Paracrine signaling between tumor subclones of mouse SCLC: a critical role of ETS transcription factor Pea3 in facilitating metastasis. *Genes Dev* 2015;29(15):1587–92. DOI: 10.1101/gad.262998.115.
25. Allard W.J., Matera J., Miller M.C. et al. Tumor cells circulate in the peripheral blood of all major carcinomas but not in healthy subjects or patients with nonmalignant diseases. *Clin Cancer Res* 2004;10:6897–904. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-04-0378.
26. Pantel K., Alix-Panabières C. Liquid biopsy in 2016: circulating tumour cells and cell-free DNA in gastrointestinal cancer. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2017;14:73–74. DOI: 10.1038/nrgastro.2016.198.
27. Кайгородова Е.В. Циркулирующие опухолевые клетки: клиническое значение при раке молочной железы (обзор литературы). *Вестник РАМН* 2017;72(6):450–7. [Kaigorodova E.V. Circulating tumor cells: clinical significance in breast cancer (review). *Vestnik RAMN = Annals of the Russian Academy of Medical Sciences* 2017;72(6):450–7. (In Russ.)]. DOI: 10.15690/vramn833.
28. Murtaza M., Dawson S.J., Tsui D.W. et al. Non-invasive analysis of acquired resistance to cancer therapy by sequencing of plasma DNA. *Nature* 2013;497:108–12. DOI: 10.1038/nature12065.
29. Komine K., Inoue M., Otsuka K. et al. Utility of measuring circulating tumor cell counts to assess the efficacy of treatment for carcinomas of unknown primary origin. *Anticancer Res* 2014;34(6):3165–8.
30. Pentheroudakis G. CUP: looking for a missing primary site and its biology. *Ann Oncol* 2012;23(suppl 10):x278–81. DOI: 10.1093/annonc/mds318.
31. Eric P.K., Arturo B.R., Yao S. et al. The RareCyte® platform for next-generation analysis of circulating tumor cells. *Cytometry A* 2018;93(12):1220–5. DOI: 10.1002/cyto.a.23619.
32. Thiele J.A., Pitule P., Hicks J. et al. Single-cell analysis of circulating tumor cells. *Methods Mol Biol* 2019;1908:243–64. DOI: 10.1007/978-1-4939-9004-7_17.
33. Hodgkinson C.L., Morrow C.J., Li Y. et al. Tumorigenicity and genetic profiling of circulating tumor cells in small-cell lung cancer. *Nat Med* 2014;20:897–903. DOI: 10.1038/nm.3600.
34. Girotti M.R., Gremel G., Lee R. et al. Application of sequencing, liquid biopsies, and patient-derived xenografts for personalized medicine in melanoma. *Cancer Discov* 2016;6(3):286–99. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-15-1336.
35. Carter L., Rothwell D.G., Mesquita B. et al. Molecular analysis of circulating tumor cells identifies distinct copy-number profiles in patients with chemosensitive and chemorefractory small-cell lung cancer. *Nat Med* 2016;23(1):114–9. DOI: 10.1038/nm.4239.
36. Torres-Ayuso P., Sahoo S., Ashton G. et al. Signaling pathway screening platforms are an efficient approach to identify therapeutic targets in cancers that lack known driver mutations: a case report for a cancer of unknown primary origin. *NPJ Genomic Med* 2018;3:15. DOI:10.1038/s41525-018-0055-6.
37. Klein E.A., Hubbell E., Maddala T. et al. Development of a comprehensive cell-free DNA (cfDNA) assay for early detection of multiple tumor types: the circulating cell-free genome atlas (CCGA) study. *J Clin Oncol* 2018;36(15_suppl):12021. DOI: 10.1200/JCO.2018.36.15_suppl.12021.
38. Cohen J.D., Li L., Wang Y. et al. Detection and localization of surgically resectable cancers with a multi-analyte blood test. *Science* 2018;23:359(6378):926–30. DOI: 10.1126/science.aar3247.
39. Sun K., Jiang P., Chan K.C. et al. Plasma DNA tissue mapping by genome-wide methylation sequencing for noninvasive prenatal, cancer, and transplantation assessments. *Proc Natl Acad Sci USA* 2015;112:E5503–12. DOI: 10.1073/pnas.1508736112.
40. Lehmann-Werman R., Neiman D., Zemmour H. et al. Identification of tissue-specific cell death using methylation patterns of circulating DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 2016;113:E1826–34. DOI: 10.1073/pnas.1519286113.
41. Guo S., Diep D., Plongthongkum N. et al. Identification of methylation haplotype blocks AIDS in deconvolution of heterogeneous tissue samples and tumor tissue-of-origin mapping from plasma DNA. *Nat Genet* 2017;49:635–42. DOI: 10.1038/ng.3805.
42. Matthew E.M., Zhou L., Yang Z. et al. A multiplexed marker-based algorithm for diagnosis of carcinoma of unknown primary using circulating tumor cells. *Oncotarget* 2016;7:3662–76. DOI: 10.18632/oncotarget.6657.
43. Lu S.H., Tsai W.S., Chang Y.H. et al. Identifying cancer origin using circulating tumor cells. *Cancer Biol Ther* 2016;17:430–8. DOI: 10.1080/15384047.2016.1141839.
44. Bettegowda C., Sausen M., Leary R.J. et al. Detection of circulating tumor dna in early- and late-stage human malignancies. *Sci Transl Med* 2014;6:224ra24. DOI: 10.1126/scitranslmed.3007094.

Вклад авторов

И.Б. Кононенко: анализ научной работы, редактирование черновика рукописи;

М.Г. Филиппова: анализ научной работы, обзор литературы, составление черновика рукописи и оформление статьи;

А.В. Снеговой: разработка концепции научной работы, анализ научной работы, обзор литературы, составление черновика рукописи;

С.Л. Гуторов: анализ научной работы, критический пересмотр с внесением ценного интеллектуального содержимого, редактирование черновика рукописи.

Authors' contributions

I.B. Kononenko: analysis of scientific study, manuscript editing;

M.G. Filippova: analysis of scientific study, literature review, manuscript preparation and formatting;

A.V. Snegovoy: development of study concept, analysis of scientific study, literature review, manuscript preparation;

S.L. Gutorov: analysis of scientific study, critical review with addition of valuable intellectual content, manuscript editing.

ORCID авторов / ORCID of authors

И.Б. Кононенко / I.B. Kononenko: <https://orcid.org/0000-0002-7142-2986>

М.Г. Филиппова / M.G. Filippova: <https://orcid.org/0000-0002-1883-2214>

А.В. Снеговой / A.V. Snegovoy: <https://orcid.org/0000-0002-0170-5681>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Работа выполнена без спонсорской поддержки.

Financing. The work was performed without external funding.