

DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-2-32-42



Прогностическое значение наличия в крови циркулирующей опухолевой ДНК как маркера минимального резидуального заболевания при колоректальном раке I–III стадии

Е.М. Полянская¹, М.Ю. Федянин^{1–3}, У.А. Боярских⁴, А.А. Кечин⁴, Е.А. Мороз¹, Е.А. Храпов⁴, И.П. Оскорбин⁴, Д.В. Шамовская⁴, В.А. Алиев¹, З.З. Мамедли¹, А.А. Трякин¹, М.Л. Филипенко⁴, С.А. Тюлядин¹

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24;

²ГБУЗ «Московский многопрофильный клинический центр «Коммунарка» Департамента здравоохранения г. Москвы»; Россия, 108814 Москва, пос. Сосенское, пос. Коммунарка, Сосенский Стан, 8;

³ФГБУ «Национальный медико-хирургический центр им. Н.И. Пирогова» Минздрава России; Россия, Москва 105203, ул. Нижняя Первомайская, 70;

⁴ФГБУН «Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук»; Россия, 630090 Новосибирск, проспект Академика Лаврентьева, 8

Контакты: Елизавета Максимовна Полянская Lazimira@mail.ru

Введение. Исследования, посвященные неметастатическому колоректальному раку, продемонстрировали прогностическое значение анализа циркулирующей опухолевой ДНК (цоДНК) после операции, что в перспективе позволит персонализировать как неоадьювантное, так и адьювантное лечение.

Цель исследования – изучить прогностическое значение статуса цоДНК до и после операции у пациентов с колоректальным раком I–III стадии.

Материалы и методы. В исследование были включены данные пациентов с морфологически верифицированным колоректальным раком I–III стадии, проходивших лечение в Национальном медицинском исследовательском центре онкологии им. Н.Н. Блохина в период с 2016 по 2021 г. Забор образцов крови осуществлялся до и после хирургического лечения (на 7–10-е сутки после операции). Минимально допустимая концентрация, при которой цоДНК в образце плазмы считали позитивной, – 0,4 копий мутантного ДНК в 1 мкл плазмы. Основным критерием эффективности являлась выживаемость без признаков болезни (ВБПБ).

Результаты. В исследование были включены 146 пациентов с колоректальным раком I–III стадии. Прогрессирование выявлено у 34 больных. Медиана времени наблюдения составила 22 мес (1–66 мес). Данные о прогрессировании заболевания получены для 119 пациентов. Положительный цоДНК-статус до операции выявлен у 55 (45 %) из 120 больных, после хирургического вмешательства – у 46 (38,6 %) из 119. В группе цоДНК+ медиана ВБПБ до операции составила 35 мес (95 % доверительный интервал (ДИ) 24,0–45,9), в группе цоДНК она не была достигнута (отношение рисков (ОР) 4,6; 95 % ДИ 2,0–10,4). Однолетняя ВБПБ в группах положительного и отрицательного статуса цоДНК оказалась равна 62 и 100 % соответственно ($p < 0,001$). При цоДНК+ медиана ВБПБ после операции составила 20 мес (95 % ДИ 8,1–31,9), при цоДНК– она не была достигнута (ОР 27,7; 95 % ДИ 6,6–116,6; $p < 0,001$). Пациенты с положительным статусом цоДНК после операции имели худшие показатели ВБПБ, несмотря на проведение адьювантной химиотерапии. При колоректальном раке II стадии и отрицательном цоДНК-статусе после операции в 100 % случаев прогрессирования заболевания не наблюдалось (независимо от проведения адьювантной химиотерапии).

Заключение. Наличие цоДНК до и после операции является негативным прогностическим фактором прогрессирования заболевания при колоректальном раке I–III стадии. Высокое негативное прогностическое значение цоДНК позволяет выбирать пациентов с заболеванием II стадии, не нуждающихся в проведении адьювантной химиотерапии.

Ключевые слова: операбельный колоректальный рак, рак I–III стадии, циркулирующая опухолевая ДНК, адьювантная химиотерапия

Для цитирования: Полянская Е.М., Федянин М.Ю., Боярских У.А. и др. Прогностическое значение наличия в крови циркулирующей опухолевой ДНК как маркера минимального резидуального заболевания при колоректальном раке I–III стадий. Успехи молекулярной онкологии 2022;9(2):32–42. DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-2-32-42.

The prognostic value of circulating in blood tumor DNA as a marker of minimal residual disease in stage I–III colorectal cancer

E.M. Polyanskaya¹, M.Yu. Fedyanin¹⁻³, U.A. Boyarskikh⁴, A.A. Kechin⁴, E.A. Moroz¹, E.A. Khrapov⁴, I.P. Oskorobin⁴, D.V. Shamovskaya⁴, V.A. Aliev¹, Z.Z. Mammadli¹, A.A. Tryakin¹, M.L. Filipenko⁴, S.A. Tyulendin¹

¹N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115478, Russia;

²Moscow Multidisciplinary Clinical Center “Kommunarka” of the Moscow Department of Health»; 8 Sosenskiy Stan, Moscow, Sosenskoye, Kommunarka 108814, Russia;

³N.I. Pirogov National Medical and Surgical Center, Ministry of Health of Russia; 70 Nizhnyaya Pervomayskaya St., Moscow 105203, Russia;

⁴Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences; 8 Akademiya Lavrentieva Prospekt, Novosibirsk 630090, Russia

Contacts: Elizaveta Maximovna Polyanskaya Lazimira@mail.ru

Introduction. Studies on non-metastatic colorectal cancer have demonstrated the prognostic role of circulating tumor (ctDNA) after surgery, and the ability to identify patients with the greatest risk of progression. This makes it possible in the future to personalize neoadjuvant and adjuvant treatment.

The study objective – to evaluate the correlation of the ctDNA status before and after surgery with a clinical outcome in patients with stage I–III colorectal cancer.

Materials and methods. The study included data from patients with morphologically verified colorectal cancer with stage I–III who were treated at the N.N. Blokhin National Oncology Research Center in the period from 2016 to 2021. Blood samples were collected before and after surgical treatment (on the 7–10th day after surgery). The minimum permissible concentration at which ctDNA in a plasma sample was considered positive was 0.4 copies of mutant DNA in 1 mL of plasma. The main criterion of effectiveness was disease-free survival (DFS). The presence of cDNA before and after surgery was a negative prognostic factor for progression in stage I–III of CRC. Patients with positive cDNA after surgery had worse DFS results despite adjuvant chemotherapy. Patients with stage II CRC with negative ctDNA, regardless of adjuvant CT after surgery, did not have disease progression in 100 % of cases.

Results. The study included 146 patients with stage I–III colorectal cancer. Progression was detected in 34 patients. The median follow-up time was 22 months (0–66 months). Data on progression were known in 119 patients. Positive cDNA data were detected before surgery in 55 of 120 patients (45 %), after surgery in 46 of 119 (38.6 %). In the group with positive cDNA before surgery, the median DFS was 35 months (95 % confidence interval (CI) 24.0–45.9), in the group with negative cDNA before surgery, the median DFS was not achieved (hazard ratio (HR) 4.6; 95 % CI 2.0–10.4), 1-year DFS in the cDNA positive group was 62 % versus 100 % in the cDNA negative group ($p < 0.001$). In the group with positive cDNA after surgery, the median DFS was 20 months (95 % CI 8.1–31.9), in the group with negative cDNA was not achieved (HR 27.7; 95 % CI 6.6–116.6; $p < 0.001$). Patients with positive cDNA after surgery had worse DFS scores despite adjuvant chemotherapy. Patients with stage II CRC without ctDNA after surgery in 100 % did not have disease progression regardless of adjuvant CT.

Conclusion. The presence of cDNA before and after surgery was a negative prognostic factor of progression after surgical treatment at stage I–III. The high negative prognostic value of cDNA makes it possible to select patients with stage II who do not need adjuvant chemotherapy.

Key words: localized colorectal cancer, stage I–III cancer, circulating tumor DNA, adjuvant therapy

For citation: Polyanskaya E.M., Fedyanin M.Yu., Boyarskikh U.A. et al. The prognostic value of circulating in blood tumor DNA as a marker of minimal residual disease in stage I–III colorectal cancer. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2022;9(2):32–42. (In Russ.). DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-2-32-42.

ВВЕДЕНИЕ

По данным GLOBOCAN, в 2020 г. колоректальный рак (КРР) занял 3-е место среди злокачественных новообразований по заболеваемости и 2-е — по смертности [1]. В подавляющем большинстве случаев диагноз КРР удается поставить при I–III стадиях болезни, при которых для минимизации рисков прогрессирования необходимо рассматривать проведение адъювантной химиотерапии (ХТ). Данное лечение показано для всех пациентов с заболеванием II стадии (при наличии факторов неблагоприятного прогноза) и III стадии. Как известно, положительные результаты адъювантной ХТ наблюдаются лишь в 12–18 % случаев. Это означает, что более чем у 80 % пациентов ее проведе-

ние неоправданно [2–4]. Для оптимизации назначения этой терапии необходимо изучать маркеры высокого риска прогрессирования заболевания после радикального лечения.

Большой интерес у исследователей вызывает вопрос о том, позволяет ли выявление циркулирующей опухолевой ДНК (цоДНК) после операций определить минимальное резидуальное заболевание (МРЗ). Работы, посвященные неметастатическому КРР, продемонстрировали прогностическое значение анализа цоДНК после хирургического вмешательства. Также ее определение способствует выявлению пациентов с наибольшим риском прогрессирования заболевания. В перспективе это позволит персонализировать как

неoadьювантное [5], так и адьювантное лечение, провести эскалацию или деэскалацию системной терапии, что потенциально может улучшить показатели выживаемости и снизить токсичность лечения [6]. Все перечисленное определило актуальность создания тест-системы по выявлению цоДНК у онкологических пациентов. На 1-м этапе мы обнаружили высокую чувствительность разработанной совместно с коллегами из лаборатории фармакогеномики Института химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук тест-системы для выявления генетических альтераций в опухолевом материале и плазме крови [7]. Это позволило продолжить исследование по определению прогностической роли цоДНК в плазме крови после хирургического лечения при резектабельных стадиях КРР.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

На базе Научно-исследовательского института клинической онкологии им. Н.Н. Трапезникова Национального медицинского исследовательского центра онкологии им. Н.Н. Блохина Минздрава России совместно с лабораторией фармакогеномики Института химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук было проведено проспективное нерандомизированное одноцентровое исследование в рамках экспериментального государственного задания Минздрава России. В него были включены данные пациентов, которые проходили хирургическое лечение в Национальном медицинском исследовательском центре онкологии им. Н.Н. Блохина в период с 2016 по 2021 г.

Критерием включения в исследование был морфологически подтвержденный КРР I–III стадии, критериями исключения – отсутствие морфологической верификации злокачественного новообразования, опухоли червеобразного отростка, тонкой кишки, а также отсутствие образцов крови или недоступность гистологического материала первичной опухоли для выполнения генетического анализа. В случаях, когда пациентам проводили предоперационную ХТ или химиолучевую терапию, забор крови выполняли до предоперационного лечения. Его осуществляли при локализованном КРР до и после (на 7–10-е сутки после операции) хирургического вмешательства. По каждому пациенту была собрана информация о клинико-морфологических характеристиках опухоли, проведенному лечению и факту развития прогрессирования после терапии, а также определены показатели общей выживаемости.

Выделение ДНК из блока первичной опухоли осуществлялось при помощи набора QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (Qiagen, Германия). Мутации опухоли были определены с использованием секвенирования нового поколения (next generation sequencing, NGS). С целью обогащения NGS-библиотеки применяли мультиплексную полимеразную цепную реакцию (ПЦР).

Для секвенирования библиотек использовали платформу MiniSeq (Illumina, США) и набор реагентов High Output (Illumina, США). В общей сложности были исследованы мутации в 50 генах (*ACVR2A*, *AKT1*, *APC*, *B2M*, *BAX*, *BMPR2*, *BRAF*, *CBFB*, *CDH1*, *CDKN2A*, *CHEK2*, *CTNNA1*, *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*). Выявленные в опухолевом материале мутации в дальнейшем мониторировались в плазме крови. Опухольеспецифические соматические мутации в цоДНК из образцов плазмы крови определяли с помощью ddPCR. Минимально допустимой концентрацией, при которой цоДНК в образце плазмы считали позитивной, была концентрация 0,4 копий мутантного ДНК в 1 мкл плазмы. Более подробное описание процедуры анализа образцов ткани первичной опухоли и цоДНК представлено в ранее опубликованной нашей статье [7].

Основным критерием эффективности лечения являлись показатели выживаемости без признаков заболевания (ВБПБ), вторичными критериями – время до прогрессирования, общая выживаемость (ОВ), частота выявления цоДНК после хирургического лечения. Показатели ВБПБ рассчитывались от даты операции до дат прогрессирования заболевания, смерти от любой причины или последнего наблюдения, показатели ОВ – от даты начала лечения до даты последнего визита пациента к онкологу на основании электронной карты больного, информации из органов записи и актов гражданского состояния, последнего контакта с пациентом по телефону или смерти больного по любой причине.

Для подтверждения прогностического влияния наличия в крови цоДНК на показатели ВБПБ необходимо было принять во внимание, что количество больных с положительным цоДНК-статусом составит 10 % всей популяции. Следовательно, для изменения показателей 1-летней выживаемости без прогрессирования с 60 до 90 % при длительности исследования в 2 года, $\alpha = 0,01$, мощности исследования 90 %, потери данных 10 % пациентов для выполнения статистической гипотезы необходимо включить в исследование минимум 265 больных. Поскольку в ходе промежуточного анализа данных выявлено, что цоДНК после операции наблюдается у 20 % больных, число пациентов, которых необходимо включить в исследование, уменьшилось до 116. Расчет показателей выживаемости проведен с помощью метода Каплана–Майера, сравнительный анализ выживаемости – с использованием логрангового теста. Взаимосвязь определения цоДНК и различных факторов была оценена путем корреляционных и регрессионных анализов. Влияние признаков на прогноз заболевания оценивали с помощью

регрессионного анализа Кокса. Статистический анализ результатов выполняли с использованием программ Microsoft Excel 2016 и IBM SPSS Statistics v. 26, а также онлайн-ресурса <https://www.medcalc.org>.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Для оценки МРЗ контроль цоДНК проводили у 146 пациентов с заболеванием I–III стадии. У 33 из них было выявлено прогрессирование заболевания после операции. Медиана времени наблюдения составила 22 мес (1–66 мес). Распределение пациентов в зависимости от статуса цоДНК до и после операции представлено в табл. 1.

Мы проанализировали значимость цоДНК как маркера МРЗ. Статус цоДНК до операции был известен у 120 пациентов (у 19 (15,8 %) – с заболеванием I стадии, у 54 (45,0 %) – с заболеванием II стадии, у 47 (39,2 %) – с заболеванием III стадии), после операции – у 119 пациентов (у 20 (16,8 %) с заболеванием I стадии, у 56

(47,0 %) – с заболеванием II стадии, у 43 (36,2 %) – с заболеванием III стадии). До операции положительный цоДНК-статус выявлен у 55 из 120 (45 %) больных, после операции – у 46 из 119 (38,6 %) (табл. 2). Данные о прогрессировании заболевания были известны по 119 пациентам. Сведения о прогрессировании опухоли при выявлении МРЗ в зависимости от статуса цоДНК и стадии заболевания представлены в табл. 3.

У 24 из 33 (72,7 %) больных с прогрессированием заболевания до операции был выявлен положительный цоДНК-статус (95 % доверительный интервал (ДИ) 54,5–86,7 %). Отрицательный цоДНК-статус до операции обнаружен у 56 из 87 (64,4 %) пациентов без прогрессирования (95 % ДИ 53,4–74,4 %) ($p < 0,001$). У 30 из 33 (90,9 %) больных с прогрессированием заболевания после операции выявлен положительный цоДНК-статус (95 % ДИ 75,7–98,0 %), у 70 из 86 (81,4 %) больных без прогрессирования – отрицательный (95 % ДИ 71,5–88,9 %) ($p < 0,001$).

Таблица 1. Распределение пациентов с колоректальным раком (КРР) I–III стадии в зависимости от статуса циркулирующей опухолевой ДНК (цоДНК) до и после операции

Table 1. Distribution of patients with stage I–III colorectal cancer (CRC) depending on their circulating tumor DNA status (ctDNA) before and after surgery

Параметр Parameter	Всего пациентов (n = 146) Total number of patients (n = 146)	Статус цоДНК до операции (n = 120) Preoperative ctDNA status (n = 120)			Статус цоДНК после операции (n = 119) Postoperative ctDNA status (n = 119)		
		цоДНК– (n = 65; 54,2%) ctDNA– (n = 65; 54,2%)	цоДНК+ (n = 55; 45,8%) ctDNA+ (n = 55; 45,8%)	p	цоДНК– (n = 73; 61,3%) ctDNA– (n = 73; 61,3%)	цоДНК+ (n = 46; 38,6%) ctDNA+ (n = 46; 38,6%)	p
Стадия по классификации Tumor, Nodus и Metastasis (TNM) 8-го пересмотра, абс. (%): Tumor, nodus and metastasis (TNM) stage (8 th edition), abs. (%):							
I	25	10	9	1,0	12	7	1,0
II	66	27	27	0,63	36	20	0,74
IIA без факторов риска IIA without risk factors	33	14	7	0,35	16	6	0,6
IIA с 1 фактором риска IIA with 1 risk factor	18	8	10	0,46	11	7	0,79
IIA с ≥2 факторами риска IIA with ≥2 risk factors	8	4	5	0,73	6	3	1,0
IIIB	7	1	5	0,1	2	4	0,19
III	55	28	19	0,6	25	19	0,71
T-стадия, абс. (%): T stage, abs. (%):							
1	6 (4,1)	2 (3,1)	3 (5,5)	0,66	4 (5,5)	2 (4,3)	1,0
2	27 (18,5)	11 (16,9)	9 (16,4)	1,0	14 (19,2)	7 (15,2)	0,8
3	96 (65,8)	46 (70,7)	35 (63,6)	0,77	50 (68,5)	30 (65,2)	0,88
4	17 (11,6)	6 (9,2)	8 (14,5)	0,56	5 (6,8)	7 (15,3)	0,22
N-стадия, абс. (%): N stage, abs. (%):							
0	91 (65,8)	38 (58,4)	35 (63,6)	0,88	47 (64,4)	28 (65,1)	0,22
1	40 (27,4)	21 (32,3)	13 (23,6)	0,65	20 (27,4)	12 (27,9)	1,00
2	15 (10,3)	6 (9,2)	7 (12,7)	0,77	6 (8,2)	6 (14)	0,54
Возраст (медиана), лет Age (median), years	62 (28–87)	60 (22–87)	63 (35–81)	1,00	62 (22–87)	61 (37–82)	1,00

Окончание табл. 1

The end of table 1

Параметр Parameter	Всего пациентов (n = 146) Total number of patients (n = 146)	Статус цоДНК до операции (n = 120) Preoperative ctDNA status (n = 120)			Статус цоДНК после операции (n = 119) Postoperative ctDNA status (n = 119)		
		цоДНК– (n = 65; 54,2%) ctDNA– (n = 65; 54,2%)	цоДНК+ (n = 55; 45,8%) ctDNA+ (n = 55; 45,8%)	p	цоДНК– (n = 73; 61,3%) ctDNA– (n = 73; 61,3%)	цоДНК+ (n = 46; 38,6%) ctDNA+ (n = 46; 38,6%)	p
Пол, абс. (%): Sex, abs. (%):							
женский female	72 (49,3)	36 (55,4)	25 (45,5)	0,63	36 (49,3)	21 (45,7)	0,86
мужской male	74 (50,7)	29 (44,6)	30 (54,5)	0,63	37 (50,7)	25 (54,3)	0,87
Локализация, абс. (%): Tumor location, abs. (%):							
правые отделы толстой кишки right colon	37 (25,3)	18 (27,7)	11 (20)	0,53	17 (23,3)	10 (21,8)	1,00
левые отделы толстой кишки left colon	61 (41,8)	24 (36,9)	23 (41,8)	0,73	31 (42,5)	18 (39,1)	0,86
прямая кишка rectum	48 (32,9)	23 (35,3)	21 (38,2)	0,86	25 (34,2)	18 (39,1)	0,72
Гистологический тип опухоли, абс. (%): Histological tumor type, abs. (%):							
аденокарцинома adenocarcinoma	142 (97,3)	63 (96,9)	54 (98,2)	1,00	70 (95,9)	46 (100)	0,89
муцинозная аденокарцинома mucinous adenocarcinoma	4 (2,7)	2 (3,1)	1 (1,8)	1,00	3 (4,1)	0 (0)	0,29
Степень дифференцировки, абс. (%): Tumor grade, abs. (%):							
низкая степень злокачественности (G ₁₋₂) low grade (G ₁₋₂)	133 (91,1)	60 (92,3)	50 (90,9)	1,00	67 (91,8)	44 (95,7)	0,89
высокая степень злокачественности (G ₃₋₄) high grade (G ₃₋₄)	13 (8,9)	5 (7,7)	5 (9,1)	1,00	6 (8,2)	2 (4,3)	0,70

Таблица 2. Прогрессирование опухоли у пациентов с колоректальным раком I–III стадии (n = 119) при выявлении минимального резидуального заболевания (МРЗ) в зависимости от статуса циркулирующей опухолевой ДНК

Table 2. Disease progression in patients with stage I–III colorectal cancer (n = 119) and minimal residual disease (MRD) depending on their circulating tumor DNA (ctDNA) status

Статус цоДНК ctDNA status	Без прогрессирования, абс. (%) No progression, abs. (%)	С прогрессированием, абс. (%) Progression, abs. (%)	Статус цоДНК ctDNA status
До операции Preoperative			
цоДНК– ctDNA–	56 (64,4)	9 (27,3)	цоДНК– цоДНК+ ctDNA– ctDNA+
цоДНК+ ctDNA+	31 (35,6)	24 (72,7)	
После операции (МРЗ – 38%) Postoperative (MRD – 38%)			
цоДНК– ctDNA –	70 (81,4)	3 (9,1)	цоДНК– ctDNA–
цоДНК+ ctDNA+	16 (18,6)	30 (90,9)	

Таблица 3. Прогрессирование опухоли при выявлении минимально-го резидуального заболевания (МРЗ) в зависимости от статуса циркулирующей опухолевой ДНК (цОДНК) после операции и стадии заболевания

Table 3. Disease progression in patients with minimal residual disease (MRD) depending on their postoperative circulating tumor DNA (ctDNA) status and disease stage

Статус цОДНК ctDNA status	Без прогрессирования, абс. (%) No progression, abs. (%)	С прогрессированием, абс. (%) Progression, abs. (%)	<i>p</i>
I стадия (n = 20): Stage I (n = 20): цОДНК– ctDNA– цОДНК+ ctDNA+	13 (72,2) 4 (27,7)	0 (0) 3 (100)	0,025
II стадия (n = 56); МРЗ – 35%: Stage II (n = 56); МРЗ – 35%: цОДНК– ctDNA– цОДНК+ ctDNA+	36 (83,7) 7 (16,3)	0 (0) 13 (100)	<0,001
III стадия (n = 43); МРЗ – 44%: Stage III (n = 43); МРЗ – 44%: цОДНК– ctDNA– цОДНК+ ctDNA+	21 (80,8) 5 (19,2)	3 (17,6) 14 (82,4)	<0,001

Чувствительность тест-системы для определения цОДНК при выявлении прогрессирования при КРР I–III стадии до и после операции составила 72,7 % (95 % ДИ 54,5–86,7 %) и 90,9 % (95 % ДИ 75,7–98,0 %) соответственно, специфичность – 64,4 % (95 % ДИ 53,6–74,4 %) и 81,4 % (95 % ДИ 71,5–88,9 %) соответственно, прогностическая ценность положительного результата – 43,6 % (95 % ДИ 35,3–52,4 %) и 65,2 % (95 % ДИ 54,3–74,7 %) соответственно, прогностическая ценность отрицательного результата – 86,2 % (95 % ДИ 77,7–91,7 %) и 95,9 % (95 % ДИ 88,8–98,5 %) соответственно, точность – 66,7 % (95 % ДИ 57,5–75 %) и 84,0 % (95 % ДИ 76,2–90,1 %) соответственно.

Влияние выявления циркулирующей опухолевой ДНК на выживаемость пациентов. При оценке ВБПБ в зависимости от статуса цОДНК выявлено, что у пациентов с цОДНК+ до операции медиана этого показателя составила 35 мес (95 % ДИ 24–45,9), а у пациентов с цОДНК– она не была достигнута (ОР 4,6; 95 % ДИ 2,0–10,4) (*p* < 0,001) (рис. 1).

У пациентов с положительным цОДНК-статусом после операции медиана ВБПБ составила 20 мес (95 % ДИ 8,14–31,9), при отрицательном – она не была достигнута (ОР 27,7; 95 % ДИ 6,6–116,6) (*p* < 0,001) (рис. 2). При проведении многофакторного анализа наличие

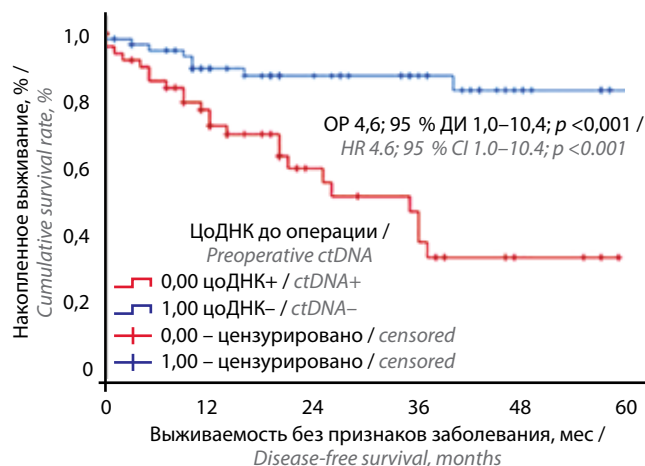


Рис. 1. Выживаемость без признаков заболевания в зависимости от наличия циркулирующей опухолевой ДНК до операции у пациентов с колоректальным раком I–III стадии. ОР – отношение рисков; ДИ – доверительный интервал; цОДНК – циркулирующая опухолевая ДНК
Fig. 1. Disease-free survival of patients with stage I–III colorectal cancer depending on their preoperative circulating tumor DNA status. HR – hazard ratio; CI – confidence interval; ctDNA – circulating tumor DNA

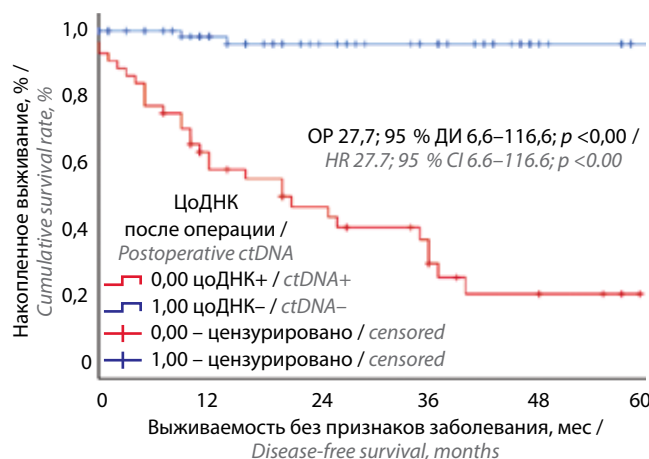


Рис. 2. Выживаемость без признаков заболевания в зависимости от наличия циркулирующей опухолевой ДНК после операции у пациентов с колоректальным раком I–III стадии. ОР – отношение рисков; ДИ – доверительный интервал; цОДНК – циркулирующая опухолевая ДНК
Fig. 2. Disease-free survival of patients with stage I–III colorectal cancer depending on their postoperative circulating tumor DNA status. HR – hazard ratio; CI – confidence interval; ctDNA – circulating tumor DNA

в крови цОДНК после операции явилось независимым предиктором прогрессирования заболевания при КРР I–III стадии (регрессионный β -коэффициент = 3,048; ОР 21,07; 95 % ДИ 4,85–91,54; *p* < 0,001).

В табл. 4 представлены показатели 1-, 2- и 3-летней ВБПБ при КРР I–III стадии в зависимости от уровня цОДНК в крови до и после операции.

Статистически значимых различий показателей ОВ в зависимости от уровня цОДНК до (ОР 0,75; 95 % ДИ 0,19–3,04; *p* = 0,69) и после операции (ОР 1,39; 95 % ДИ 0,37–5,20; *p* = 0,62) при КРР I–III стадии выявлено не было. В группе положительной цОДНК после операции умерли 4 пациента, в группе отрицательной цОДНК – также 4 пациента.

Прогностическая роль динамики циркулирующей опухолевой ДНК до и после операции. Пациенты, у которых выявляли наличие цоДНК для определения МРЗ, были разделены на 4 группы в зависимости от динамики изменений уровня цоДНК. В 1-ю группу вошли больные с отрицательным цоДНК-статусом

Таблица 4. Выживаемость без признаков болезни в зависимости от статуса циркулирующей опухолевой ДНК (цоДНК) до и после операции

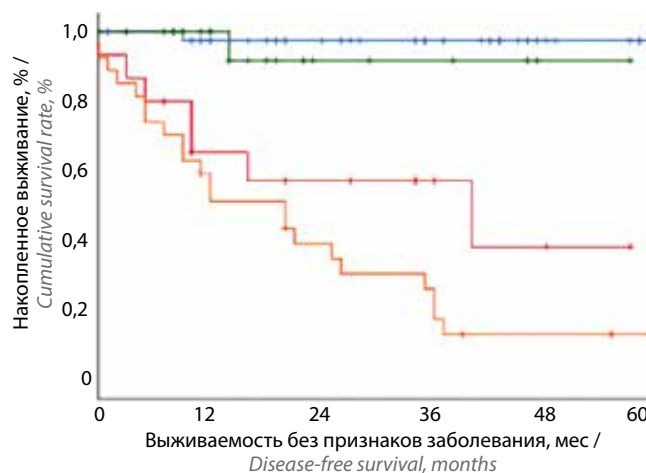
Table 4. Disease-free survival (DFS) depending on the circulating tumor DNA status (ctDNA) before and after surgery

Стадия Stage	1-летняя, % 1-year, %	2-летняя, % 2-year, %	3-летняя, % 3-year, %
ЦоДНК+ до операции ctDNA+ before surgery			
I	70	35	35
II	72	66	45
III	63	54	27
ЦоДНК– до операции ctDNA– after surgery			
I	100	100	100
II	91	91	91
III	84	78	78
ЦоДНК+ после операции ctDNA+ before surgery			
I	62	41	41
II	52	46	27
III	62	49	29
ЦоДНК– после операции ctDNA– after surgery			
I	100	100	100
II	100	100	100
III	94	87	87

Таблица 5. Изменение уровня циркулирующей опухолевой ДНК до и после операции

Table 5. Changes in the level of circulating tumor DNA before and after surgery

Циркулирующая опухолевая ДНК до операции Preoperative circulating tumor DNA status	Циркулирующая опухолевая ДНК после операции Postoperative circulating tumor DNA status	I стадия (n = 18), абс. (%) Stage I (n = 18), abs. (%)	II стадия (n = 52), абс. (%) Stage II (n = 52), abs. (%)	III стадия (n = 42), абс. (%) Stage III (n = 42), abs. (%)	Всего (n = 112), абс. (%) Total (n = 112), abs. (%)
–	–	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)



- 1,00 – цоДНК– до операции и после нее / ctDNA– before and after surgery
- 2,00 – цоДНК– до операции, цоДНК+ после нее / ctDNA– before surgery and ctDNA+ after surgery
- 3,00 – цоДНК+ до операции, цоДНК– после нее / ctDNA+ before surgery and ctDNA– after surgery
- 4,00 – цоДНК+ до операции, цоДНК+ после нее / ctDNA+ before and after surgery
- + 1,00 – цензурировано / censored
- + 2,00 – цензурировано / censored
- + 3,00 – цензурировано / censored
- + 4,00 – цензурировано / censored

Рис. 3. Выживаемость без признаков заболевания в зависимости от изменения уровня циркулирующей опухолевой ДНК до и после операции при колоректальном раке I–III стадии. ЦоДНК – циркулирующая опухолевая ДНК

Fig. 3. Disease-free survival of patients with stage I–III colorectal cancer depending on their changes in the circulating tumor DNA level before and after surgery. ctDNA – circulating tumor DNA

и до, и после операции, во 2-ю – те, у кого до операции он был отрицательным, а после нее стал положительным, в 3-ю – с наличием цоДНК до хирургического вмешательства и отсутствием после него, в 4-ю – с положительным цоДНК-статусом и до, и после операции. Данные о динамике цоДНК до и после хирургического вмешательства имелись у 112 пациентов (табл. 5).

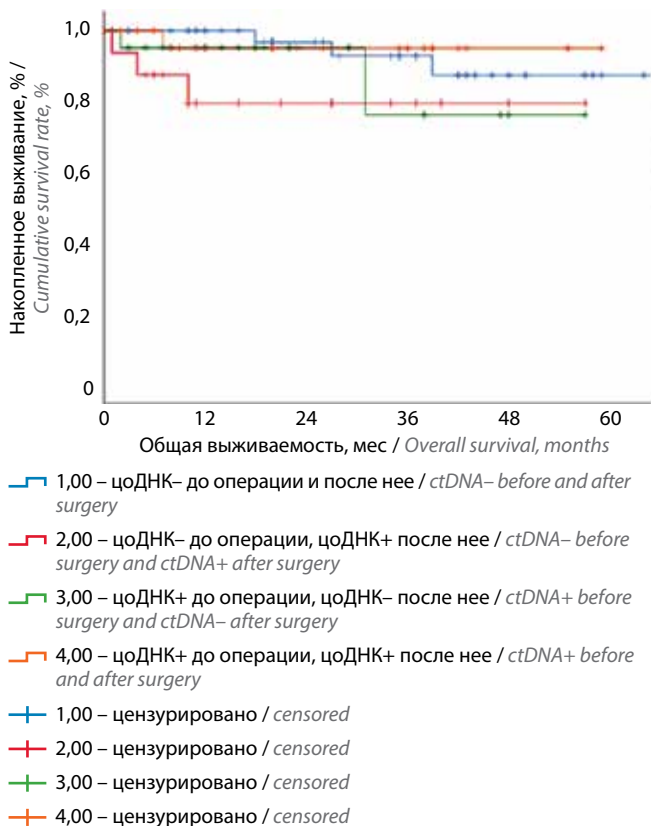


Рис. 4. Общая выживаемость пациентов с колоректальным раком I–III стадии в зависимости от динамики циркулирующей опухолевой ДНК до и после операции при выявлении минимального резидуального заболевания. ЦоДНК – циркулирующая опухолевая ДНК
Fig. 4. Overall survival of patients with stage I–III colorectal cancer and minimal residual disease depending on their dynamics of circulating tumor DNA (ctDNA) before and after surgery. ctDNA – circulating tumor DNA

В 1-й и 3-й группах медиана ВБПБ достигнута не была, во 2-й группе она составила 40 мес (95 % ДИ 0–84,3), в 4-й – 20 мес (95 % ДИ 9,2–30,8). Отношение рисков 2,6 (95 % ДИ 1,7–3,8; $p < 0,001$) (рис. 3). При заболевании I–III стадии динамика изменения цоДНК не влияла на ОВ (ОР 0,97; 95 % ДИ 0,57–1,6; $p = 0,91$), что, скорее всего, связано с небольшим числом событий ($n = 8$) (рис. 4).

Эффективность адъювантной химиотерапии в зависимости от выявления циркулирующей опухолевой ДНК после операции. У 105 пациентов с I–III стадией заболевания было оценено влияние цоДНК на ВБПБ после операции в зависимости от проведения адъювантной ХТ. У больных с отрицательным цоДНК-статусом не выявлено улучшения показателей ВБПБ при проведении адъювантной ХТ ($p = 0,16$). Медиана ВБПБ при отрицательной цоДНК вне зависимости от проведения адъювантной ХТ не была достигнута. У пациентов с положительным цоДНК-статусом также не было обнаружено статистически значимых различий в показателях ВБПБ ($p = 0,33$) (рис. 5).

При КРР II стадии значимых различий в ВБПБ в группе адъювантной ХТ и группе без ее использования выявлено не было. У всех пациентов с отрицательным

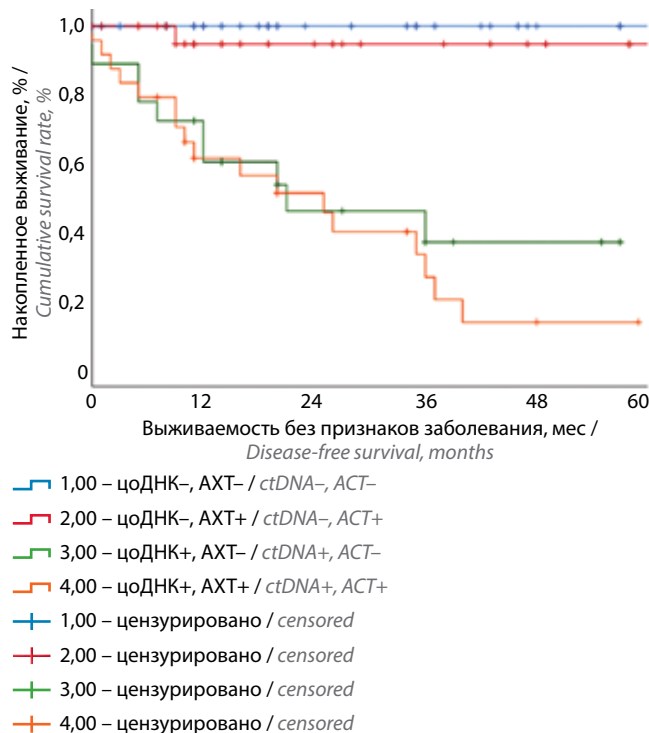


Рис. 5. Выживаемость без признаков заболевания в зависимости от наличия циркулирующей ДНК после операции и проведения адъювантной химиотерапии при колоректальном раке I–III стадии. АХТ – адъювантная химиотерапия; цоДНК – циркулирующая опухолевая ДНК
Fig. 5. Disease-free survival of patients with stage I–III colorectal cancer depending on their postoperative circulating tumor DNA status and adjuvant chemotherapy. ACT – adjuvant chemotherapy; ctDNA – circulating tumor DNA

цоДНК-статусом не наблюдалось прогрессирования заболевания независимо от проведения данной терапии (рис. 6).

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.

ОБСУЖДЕНИЕ

Были проанализированы данные 25 (17,1 %) пациентов с КРР I стадии, 66 (45,2 %) – с КРР II стадии и 55 (37,7 %) – с КРР III стадии. В нашем исследовании положительный цоДНК-статус до операции выявлен в 45 % случаев, после операции – в 38,6 %. Частота обнаружения цоДНК до операции согласуется с ранними исследованиями [8]. После операции в нашем исследовании данный показатель был выше. Возможно, это объясняется ранним забором крови для определения цоДНК после операции (медиана – на 7-е сутки). Так, например, в исследовании J. Tie и соавт. [9] средний срок забора крови после операции при КРР III стадии составил 42 дня. При этом положительный цоДНК-статус после операции определялся у 21 % пациентов. В исследовании E. Oki и соавт., [10] несмотря на то что забор крови после операции в среднем проводился через 46 нед (через 12–97 нед), при КРР II стадии положительный цоДНК-статус был

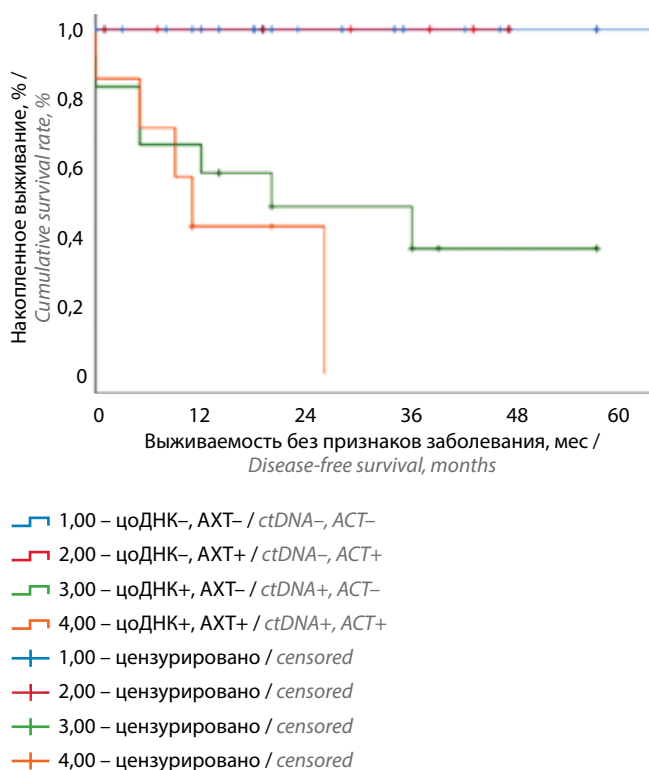


Рис. 6. Выживаемость без признаков заболевания в зависимости от наличия циркулирующей опухолевой ДНК после операции и проведения адъювантной химиотерапии при колоректальном раке II стадии
Fig. 6. Disease-free survival depending on the postoperative circulating tumor DNA status and adjuvant chemotherapy in patients with stage II colorectal cancer

обнаружен у большего числа больных – в 34,8 % случаев. Также в исследовании S. McNamara и соавт. [11], опубликованном в 2022 г., при выявлении МРЗ с помощью сверхглубокого секвенирования ДНК, выделенной из плазмы крови при КРР II–III стадии через 1–34 дня после R0-резекции (медиана 7 дней), чувствительность метода составила 44 %, специфичность – 94 %.

Еще одним объяснением расхождения данных о частоте выявления цоДНК может быть пороговое значение ее уровня, принятое за положительное, а также метод определения этого маркера. Как и в большинстве исследований [8–19], в ходе которых применялись различные тест-системы для определения цоДНК, в нашей работе показано независимое прогностическое значение наличия цоДНК после операции.

Так, в ходе оценки прогностического значения цоДНК как маркера МРЗ при КРР I–III стадии положительный цоДНК-статус после операции выявлен у 90,9 % пациентов с прогрессированием заболевания (95 % ДИ 77,7–97,4 %), отрицательный цоДНК-статус при отсутствии прогрессирования заболевания – у 81,4 % (95 % ДИ 72,6–89,0 %). Это согласуется с данными T. Reinert и соавт. [15]. В их исследовании при цоДНК+ чувствительность тест-системы для определения рецидивов составила 87,5 %. В отличие от других исследований частота выявления прогрес-

сирования в группе положительной цоДНК в нашей работе была выше, что обусловлено большим числом пациентов с заболеванием III стадии в выборке.

Мы проанализировали эффективность адъювантной терапии при различных значениях цоДНК. Было выявлено, что послеоперационное лечение не улучшало показатели выживаемости больных независимо от стадии заболевания. Эти данные несколько отличаются от результатов других работ. Так, в ходе поданализа исследования III фазы IDEA-France, в котором сравнивали эффективность адъювантной ХТ через 3 и 6 мес у пациентов с КРР III стадии, положительным цоДНК-статусом и благоприятным прогнозом (pT1–3N1), было выявлено, что проведение адъювантной ХТ в течение 6 мес улучшало показатели ВБПБ [17]. В группе больных с неблагоприятным прогнозом эффективность такой терапии была выше независимо от уровня цоДНК. Эти различия могут быть обусловлены методом выявления цоДНК, использованным французскими авторами (метилирование генов *WIFI* и *NPY*), и особенностями дизайна исследования (всем пациентам проводили адъювантную ХТ). Более приближены к полученным нами данным результаты поданализа исследования GALAXY. Оно показало, что адъювантная ХТ при положительном цоДНК-статусе была эффективной независимо от стадии заболевания. Однако при отрицательном цоДНК-статусе адъювантная ХТ не улучшала результаты хирургического лечения, что было показано и в нашей работе.

Полученные данные согласуются с результатами исследования J. Tie и соавт. [14] и свидетельствуют о возможности отказа от адъювантной ХТ в группе отрицательного цоДНК-статуса как минимум при КРР II стадии. Мы выявили, что прогноз пациентов с цоДНК+ после операции был плохим независимо от уровня этого показателя до операции. Аналогично при цоДНК– после операции независимо от уровня цоДНК до нее наблюдался благоприятный прогноз. Похожие результаты получены и в исследовании IDEA-France [17].

Статистически значимых различий в ОВ в зависимости от уровня цоДНК не было получено 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, согласно данным которого при КРР III стадии положительный цоДНК-статус имел негативное влияние на показатели ОВ (ОР 1,65; 95 % ДИ 1,12–2,43; $p = 0,011$) [17]. В данном случае это, скорее всего, связано с малым числом событий в нашем исследовании ($n = 8$).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Обнаружение цоДНК до и после операции является негативным прогностическим признаком прогрессирования при КРР I–III стадии. Наличие цоДНК после операции является независимым прогностическим признаком прогрессирования заболевания.

У пациентов с положительным цодНК-статусом после операции наблюдались худшие показатели ВБПБ, несмотря на проведение адъювантной ХТ, тогда как у всех больных с КРР II стадии и отрицательным цодНК-статусом после операции прогрессирования заболева-

ния не было выявлено независимо от того, получали они адъювантную ХТ или нет. Эти результаты свидетельствуют о возможности отказа от проведения адъювантной ХТ в группе пациентов с отрицательным цодНК-статусом и КРР II стадии.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Sung H., Ferlay J., Siegel R.L., Ferlay J. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *Cancer J Clin* 2021;71(3):209–24. DOI: 10.3322/caac.21660.
- Auclin E., Zaanan A., Vernerey D. et al. Subgroups and prognostication in stage III colon cancer: future perspectives for adjuvant therapy. *Ann Oncol* 2017;28(5):958–68. DOI: 10.1093/annonc/mdx030.
- Sobrero A.F., Puccini A., Shi Q. et al. A new prognostic and predictive tool for shared decision making in stage III colon cancer. *Eur J Cancer* 2020;138:182–8. DOI: 10.1016/j.ejca.2020.07.031.
- André T., de Gramont A., Vernerey D. et al. 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. *J Clin Oncol* 2015;33(35):4176–87. DOI: 10.1200/JCO.2015.63.4238.
- Khakoo S., Carter P.D., Brown G. et al. MRI tumor regression grade and circulating tumor DNA as complementary tools to assess response and guide therapy adaptation in rectal cancer. *Clin Cancer Res* 2020;26(1):183–92. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-19-1996.
- Naidoo M., Gibbs P., Tie J. ctDNA and adjuvant therapy for colorectal cancer: time to re-invent our treatment paradigm. *Cancers* 2021;13(2):346. DOI: 10.3390/cancers13020346.
- Полянская Е.М., Федянин М.Ю., Боярских У.А. и др. Оценка конкурентности мутационного статуса опухолевого материала и циркулирующей в крови опухолевой ДНК при колоректальном раке. *Тазовая хирургия и онкология* 2022;12(1):27–34. [Polyanskaya E.M., Fedyanin M.Yu., Boyarskikh U.A. et al. Concordance between the tumor mutational status and circulating tumor DNA in patients with colorectal cancer. *Tazovaya Khirurgiya i Onkologiya = Pelvic Surgery and Oncology* 2022;12(1):27–34. (In Russ.). DOI: 10.17650/2686-9594-2022-12-1-27-34.
- 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(224):224ra24. DOI: 10.1126/scitranslmed.3007094.
- Tie J., Cohen J.D., Wang Y. et al. Circulating tumor DNA analyses as markers of recurrence risk and benefit of adjuvant therapy for stage III colon cancer. *JAMA Oncol* 2019;5(12):1710. DOI: 10.1001/jamaoncol.2019.3616.
- Oki E., Ando K., Hisamatsu Y. et al. Plasma-informed minimal residual disease (MRD) assay: A multicenter prospective study in Japanese patients with stage II colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2022;40(4_suppl):161. DOI: 10.1200/JCO.2022.40.4_suppl.161.
- McNamara S., Patel R.D., Adams H.P. et al. 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. *J Clin Oncol* 2022;40(4_suppl):26. DOI: 10.1200/JCO.2022.40.4_suppl.026.
- Phallen J., Sausen M., Adleff V. et al. Direct detection of early-stage cancers using circulating tumor DNA. *Sci Transl Med* 2017;9(403):eaan2415. DOI: 10.1126/scitranslmed.aan2415.
- Schöler L.V., Reinert T., Ørntoft M.B.W. et al. Clinical implications of monitoring circulating tumor dna in patients with colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2017;23(18):5437–45. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-17-0510.
- Tie J., Wang Y., Tomasetti C. et al. Circulating tumor DNA analysis detects minimal residual disease and predicts recurrence in patients with stage II colon cancer. *Sci Transl Med* 2016;8(346):346ra92. DOI: 10.1126/scitranslmed.aaf6219.
- Reinert T., Henriksen T.V., Christensen E. et al. Analysis of plasma cell-free dna by ultradeep sequencing in patients with stages I to III Colorectal Cancer. *JAMA Oncol* 2019;5(8):1124. DOI: 10.1001/jamaoncol.2019.0528.
- Lumish M.A., Jayakumar G., Fox M. et al. Frequency of minimal residual disease as measured by ctDNA in mismatch repair deficient tumors following curative resection. *J Clin Oncol* 2021;39(15_suppl):e14520. DOI: 10.1200/JCO.2021.39.15_suppl.e14520.
- Taieb J., Taly V., Henriques J. et al. 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. *Clin Cancer Res* 2021;27(20):5638–46. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-21-0271.
- Gu J., Lei F., Wang X. et al. Circulating tumor DNA analysis predicting recurrence risk in patients with stage I–III colorectal cancer. *Ann Oncol* 2021;32:S561. DOI: 10.1016/j.annonc.2021.08.979.
- Kotaka M., Shirasu H., Watanabe J. et al. 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. *J Clin Oncol* 2022;40(4_suppl):9. DOI: 10.1200/JCO.2022.40.4_suppl.009.

Вклад авторов

Е.М. Полянская: сбор и анализ данных, статистический анализ данных, написание текста статьи;
М.Ю. Федянин: разработка дизайна и концепции исследования, координация исследования, редактирование статьи;
У.А. Боярских, А.А. Кечин, Е.А. Храпов, И.П. Оскоробин, Д.В. Шамовская: определение цоДНК, мутационного статуса цоДНК и ткани первичной опухоли;
Е.А. Мороз: сбор гистологических образцов, проведение гистологических исследований первичной опухоли;
В.А. Алиев, З.З. Мамедли: хирургическое лечение больных, сбор биологических образцов, материала для анализа;
А.А. Трякин, С.А. Тюляндин: редактирование статьи;
М.Л. Филипенко: координирование исследования.

Authors' contribution

E.M. Polyanskaya: data collection and analysis, statistical data analysis, article writing;
M.Y. Fedyanin: development of the design and concept of the study, research coordination, article editing;
U.A. Boyarskikh, A.A. Kechin, E.A. Khrapov, I.P. Oskorobin, D.V. Shamovskaya: determination of DNA, mutational status of ctDNA and primary tumor tissue;
E.A. Moroz: collecting histological samples, conducting histological studies of the primary tumor;
V.A. Aliyev, Z.Z. Mammadli: surgical treatment of patients, collection of biological samples, material for analysis;
A.A. Tryakin, S.A. Tyulyandin: article editing;
M.L. Filipenko: coordination of research.

ORCID авторов / ORCID of authors

Е.М. Полянская / E.M. Polyanskaya: <https://orcid.org/0000-0001-7193-1169>
М.Ю. Федянин / M.Yu. Fedyanin: <https://orcid.org/0000-0001-5615-7806>
З.З. Мамедли / Z.Z. Mammadli: <https://orcid.org/0000-0002-9289-1247>
А.А. Трякин / A.A. Trykin: <https://orcid.org/0000-0003-0428-260X>
С.А. Тюляндин / S.A. Tyulyandin: <https://orcid.org/0000-0001-9807-2229>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Исследование проведено в рамках экспериментального государственного задания Минздрава России.
Financing. The study was conducted as part of an experimental state task of the Ministry of Health of Russia.

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики

Протокол исследования одобрен локальным этическим комитетом ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.
Все пациенты подписали информированные согласия перед забором крови.
Compliance with patient rights and principles of bioethics
The protocol of the study was approved by the local ethics committee of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia.
All patients signed informed consent before blood collection.