

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

Е.М. Полянская¹, М.Ю. Федянин¹⁻³, У.А. Боярских⁴, А.А. Кечин⁴, Е.А. Мороз¹, А.Н. Поляков¹, Н.Е. Кудашкин¹, Д.В. Подлужный¹, Е.А. Храпов⁴, И.П. Оскоробин⁴, Д.В. Шамовская⁴, В.А. Алиев¹, З.З. Мамедли¹, А.А. Трякин¹, М.Л. Филипенко⁴, С.А. Тюляндин¹

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

²ГБУЗ МКНЦ «Коммунарка» Департамента здравоохранения г. Москвы; Россия, 142770 Москва, ул. Сосенский стан, 8;

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

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

Контакты: Елизавета Максимовна Полянская Lazimira@mail.ru

Введение. Для улучшения результатов лечения пациентов с колоректальным раком (КРР) необходимо изучение маркеров прогрессирования после радикального лечения и в процессе химиотерапии. В данном контексте представляет интерес изучение циркулирующей в крови опухолевой ДНК (цоДНК).

Цель исследования – оценить чувствительность разработанной тест-системы по выявлению цоДНК и конкордантность выявленных изменений генетическим альтерациям в первичной опухоли у больных КРР.

Материалы и методы. В исследование включались пациенты с морфологически верифицированным КРР I–IV стадии, проходившие лечение в ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России в период с 2016 по 2021 г. Выделение ДНК из блока первичной опухоли осуществлялось при помощи набора QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (Qiagen, Германия). Перечень мутаций опухоли был определен при помощи полногеномного секвенирования (NGS). С целью обогащения NGS-библиотеки применялась мультиплексная полимеразная цепная реакция. Для секвенирования библиотек использовалась платформа MiniSeq (Illumina). Определение опухолевых специфических соматических мутаций в цоДНК из образцов плазмы крови проводилось с помощью ddPCR (цифровая капельная полимеразная цепная реакция).

Результаты. 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. Конкордантность между первичной опухолью и цоДНК для всех стадий составила 69,4 % (95 % доверительный интервал (ДИ) 62,2–76,0); для I–III стадий – 65,4 % (95 % ДИ 57,1–73,1), при отдаленных метастазах – 83,8 % (95 % ДИ 69,6–92,9). Конкордантность по гену *KRAS* для всех стадий – 78,3 % (95 % ДИ 66,7–87,3), для IV стадии – 90,9 % (95 % ДИ 64,7–99,0). Конкордантность по гену *BRAF* составила 70 % (95 % ДИ 39,4–90,7), для IV стадии – 75,0 % (95 % ДИ 28,4–97,2). Показатель совпадений возрастал для всех генов по мере увеличения критерия T, был наибольшим для категории Nx.

Выводы. В работе показана высокая чувствительность тест-системы по выявлению генетических альтераций в опухолевом материале и плазме крови. Конкордантность цоДНК и тканей первичной опухоли также оказалась удовлетворительной, особенно в отношении статуса генов *KRAS* и *BRAF* при метастатическом заболевании, что позволяет рассматривать ее в качестве альтернативы классическому определению мутаций в генах в опухолевом материале.

Ключевые слова: колоректальный рак, циркулирующая опухолевая ДНК, конкордантность

Для цитирования: Полянская Е.М., Федянин М.Ю., Боярских У.А. и др. Оценка конкордантности мутационного статуса опухолевого материала и циркулирующей в крови опухолевой ДНК при колоректальном раке. Тазовая хирургия и онкология 2022;12(1):27–34. DOI: 10.17650/2686-9594-2022-12-1-27-34.

Concordance between the tumor mutational status and circulating tumor DNA in patients with colorectal cancer

E.M. Polyanskaya¹, M.Yu. Fedyanin¹⁻³, U.A. Boyarskiikh⁴, A.A. Kechin⁴, E.A. Moroz¹, A.N. Polyakov¹, N.E. Kudashkin¹, D.V. Podluzhnyi¹, E.A. Khrapov⁴, I.P. Oskorobin⁴, D.V. Shamovskaya⁴, V.A. Aliev¹, Z.Z. Mamedli¹, A.A. Tryakin¹, M.L. Filipenko⁴, S.A. Tjulandin¹

¹N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115478, Russia;
²Moscow Clinical Research Center “Kommunarka”, Moscow Healthcare Department; 8 Sosenskiy stan St., Moscow 142770, 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, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences; 8 Akademika Lavrentyeva Prospekt, Novosibirsk 630090, Russia

Contacts: Elizaveta Maksimovna Polyanskaya Lazimira@mail.ru

Background. Circulating tumor DNA (ctDNA) may act as a potential biomarker for predicting disease progression in patients with colorectal cancer (CRC), which are radically cured or receiving chemotherapy.

Objective: to evaluate the sensitivity of the investigated ctDNA detection assay and quantify the concordance of genomic alterations between ctDNA and matched primary tumor tissue of patients with CRC.

Materials and methods. We included patients with histologically confirmed stage I–IV CRC treated in N.N. Blokhin Cancer Research Center from 2016 to 2021. DNA was purified from tissue samples using QIAamp DNA formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) Tissue Kit (QIAGEN, Germany). Next-generation sequencing (NGS) technique was used to detect genetic mutations in primary tumor. ctDNA mutations were detected by droplet digital PCR.

Results. The sensitivity of platform (assay) for detecting genetic alterations in tissue samples was 97.82 %; in ctDNA – 51.20 % for all stages and 64.5 % for stage IV CRC. Across eight genes (*KRAS*, *TP53*, *APC*, *PIK3CA*, *BRAF*, *FBXW7*, *MB21D2*, and *SMAD4*) concordance between primary tumor and ctDNA was 69.4 % (95 % CI 62.2–76.0). Sensitivity for all stages is 51.2 % (95 % CI 45.8–56.6), for metastatic CRC 64.5 % (95 % CI 53.3–74.5). The concordance across all genes was 65.4 % (95 % CI 57.1–73.1) and 83.8 % (95 % CI 69.6–92.9) for stage I–III and stage IV CRC, respectively. The concordance rate between ctDNA and primary tumor tissue for *KRAS* alterations across all stages and stage IV CRC was 78.3 % (95 % CI 66.7–87.3) and 90.9 % (95 % CI 64.7–99.0), respectively. With increasing tumor stage (T), the number of matches raised across all genes with the highest number observed in Nx category.

Conclusion. The study indicates high concordance between tumor tissue and ctDNA, especially for *KRAS* and *BRAF* genes in patients with metastatic CRC, suggesting the clinical utility of ctDNA testing as a minimally invasive method and alternative to tissue biopsy.

Key words: colorectal cancer, circulating tumor DNA, concordance

For citation: 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.

Введение

По данным мировой статистики, в 2020 г. колоректальный рак (КРР) вышел на 3-е место по заболеваемости и сохранил 2-е место по смертности от злокачественных новообразований [1]. У большинства пациентов заболевание выявляется при I–III стадиях. При III и II стадиях с факторами риска рассматривается проведение адъювантной химиотерапии, однако она помогает лишь 12–18 % пациентов, т. е. более 80 % больных получают избыточное лечение [2, 3]. Таким образом, необходимо изучение маркеров высокого риска прогрессирования после проведенного радикального лечения. В данном контексте представляет интерес изучение циркулирующей в крови опухолевой ДНК (цодНК).

Циркулирующая внеклеточная ДНК (цвДНК) представляет собой сильно фрагментированную ДНК, высвобождающуюся в кровоток в результате некроза, апоптоза, а также активной секреции [4]. ЦодНК, высвобождающаяся из опухолевых клеток, представляет собой небольшую долю от цвДНК, характеризующуюся наличием специфичных для опухоли геномных изменений. ЦодНК отражает присутствующие в опухоли геномные изменения. Это позволяет проводить количественную и качественную оценку опухо-

левой нагрузки в реальном времени, используя в качестве субстрата плазму крови.

По данным литературы, доля пациентов с КРР, у которых возможно выявить цодНК, зависит от объема опухоли и составляет от 50 % у пациентов с нематастатическим заболеванием до почти 90 % у пациентов с отдаленными метастазами [5].

Вопросу оценки чувствительности и конкордантности первичной опухоли и цодНК посвящен ряд исследований. Результаты их представлены в табл. 1. Как видно из таблицы, чувствительность выявления цодНК варьирует от 60 до 100 %, а конкордантность с первичной опухолью составляет от 72 до 100 %, что могло определяться методологией определения цодНК и стадией заболевания. Таким образом, цодНК позволяет с высокой для диагностического теста частотой выявлять мутационные изменения, а их сопоставимость с изменениями в первичной опухоли позволяет заменять последний в качестве материала для мутационного анализа по определению биомаркеров эффективности таргетной терапии при метастатическом заболевании.

Совместно с коллегами из лаборатории фармакогеномики Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН была разработана

Таблица 1. Исследования, посвященные сопоставимости цоДНК и биопсии
Table 1. Studies comparing the concordance between ctDNA and biopsy

Исследование Study	Число больных, популяция Number of patients, population	Конкордантность, % Concordance, %	Чувствительность, % Sensitivity, %	Специфичность, % Specificity, %	Маркер Marker
C. Bettgowda et al., 2014 [5]	n = 230 мКРР mCRC	95 ($\kappa_{in} = 0,8$; $p < 0,0001$)	87,2	99,2	KRAS
D. Sefrioui et al., 2014 [6]	n = 35 мКРР mCRC	–	62	100	KRAS
A.R. Thierry et al., 2014 [7]	n = 106 мКРР mCRC	100	100	100	BRAF
		96	98	92	KRAS
J. Tie et al., 2015 [8]	n = 53 мКРР mCRC	92,3	–	–	KRAS
K.L. Spindler et al., 2015 [9]	n = 229 мКРР mCRC	85	–	–	KRAS
F. Liu et al., 2015 [10]	n = 27 мКРР mCRC	77,8	76,9	78,6	KRAS
E. Kidess-Sigal et al., 2016 [11]	n = 23 мКРР mCRC	78,2	–	–	KRAS
		73,9			BRAF
		91,3			PIK3CA
A.R. Thierry et al., 2017 [12]	n = 119 мКРР mCRC	72–74	–	–	KRAS
		87			BRAF
J. Vidal et al., 2017 [13]	n = 115 мКРР mCRC	93 %, $\kappa_{in} = 0,844$ (95 % CI 0,746–0,941)	–	–	KRAS
J. Grasselli et al., 2017 [14]	n = 146 мКРР mCRC	88,5–89,7	–	–	KRAS, BEAMing, SoC
J.B. Bachet et al., 2018 [15]	n = 412 мКРР mCRC	$\kappa = 0,71$ (95 % CI 0,64–0,77)	Точность 85,2 % (95 % CI 81,4–88,5) Ассигуа 85,2 % (95 % CI 81,4–88,5)	–	KRAS
J. Yao et al., 2018 [16]	n = 76 мКРР mCRC	81,25	–	–	KRAS, NRAS, BRAF
K. Mardinian et al., 2020 [17]	n = 433 (рак ЖКТ, легких, ГМ и МЖ) 405 НРМР, метастатический (GI cancer, lung cancer, brain cancer, breast cancer) 405 URLA, metastatic	85	–	–	KRAS
I. van't Erve et al., 2020 [18]	n = 100 мКРР mCRC	93	–	–	KRAS, NRAS, BRAF
R. Gupta et al., 2020 [19]	n = 75 мКРР mCRC	88–92	–	–	APC, TP53, KRAS, NRAS, BRAF
E. Lastraioli et al., 2020 [20]	n = 31 мКРР mCRC	85,18; $\kappa_{in} = 0,13$	–	–	KRAS
		83,33; $\kappa_{in} = 0,42$			NRAS
Y. Kagawa et al., 2021 [21]	n = 221 мКРР mCRC	91 (95 % CI 85–95)	–	–	KRAS
E.E. Dumbrava et al., 2021 [22]	n = 68 (13 – КРР) НРМР, метастатический (13 – CRC) URLA, metastatic	72 (49/68); $\kappa = 0,38$	–	–	PIK3CA

Примечание. мКРР – метастатический колоректальный рак; ЖКТ – желудочно-кишечный тракт; ГМ – головной мозг; МЖ – молочная железа; НРМР – нерезектабельный местно-распространенный; CI – доверительный интервал; цоДНК – циркулирующая опухолевая ДНК.

Note. mCRC – metastatic colorectal cancer; GI – gastrointestinal; URLA – unresectable locally advanced; CI – confidence interval; ctDNA – circulating tumor DNA.

тест-система по выявлению цоДНК в плазме крови онкологических пациентов.

Цель исследования — оценить чувствительность данной тест-системы по выявлению цоДНК и конкордантности выявленных изменений генетическим альтерациям в первичной опухоли у больных КРР при различных стадиях заболевания.

Материалы и методы

Нами было проведено проспективное нерандомизированное одноцентровое исследование. Работа выполнена на базе НИИ клинической онкологии им. акад. Н.Н. Трапезникова ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России совместно с лабораторией фармакогеномики Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН. Исследование проведено в рамках экспериментального государственного задания Минздрава России. В исследование были включены данные пациентов с морфологически верифицированным КРР с любой стадией заболевания, которые проходили лечение в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России в период с 2016 по 2021 г. Критериями исключения являлись отсутствие морфологической верификации опухоли, опухоль червеобразного отростка, опухоли тонкой кишки, метастазы опухолей других локализаций, а также отсутствие образцов крови или доступности гистологического материала первичной опухоли для выполнения генетического анализа.

С целью определения конкордантности мутационного профиля первичной опухоли и цоДНК был сформирован банк данных, включавших серийные образцы крови и блоки первичной (или метастатической) опухоли пациентов с КРР.

Забор образцов крови пациентов осуществлялся при локализованном КРР до и после хирургического лечения (на 7–10-е сутки после операции); при местно-распространенном раке прямой кишки — до проведения химиолучевой терапии и после хирургического лечения; при метастатическом раке: в случае метастазэктомий — до и после хирургического лечения (на 7–10-е сутки после операции), в случае проведения химиотерапии — до начала 1-го курса лечения, при 1-м контрольном обследовании.

Были собраны информация о клинических факторах, морфологических характеристиках опухоли и данные по лечению и наблюдению.

Образцы тканевой опухолевой ДНК выделялись из фиксированных формалином парафиновых гистологических образцов опухоли, подобранных в архиве ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, полученных в результате диагностической биопсии, при резекции первичной опухоли или при удалении метастазов для пациентов, сдавших кровь на определение цоДНК. Основным требованием к гистологическому образцу было содержание опухо-

левых клеток в количестве не 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).

Образцы крови забирали в пробирки, содержащие антикоагулянт ЭДТА. Плазму выделяли в течение 2 ч после забора крови, путем центрифугирования в течение 15 мин в ультрацентрифуге со скоростью 1200xg при комнатной температуре. Полученную плазму при помощи пипетки переносили в пробирку Eppendorf без контакта с лейкоцитарным слоем — остаточный объем плазмы в 1-й пробирке не менее 10 мм. Пробирки маркировались уникальным кодом и далее хранились при температуре –20 °С. 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.

Перечень мутаций в образцах опухолевой ДНК в гистологическом материале был определен при помощи полногеномного секвенирования тех областей ДНК, где располагаются наиболее часто встречающиеся при злокачественных опухолях соматические 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*). С целью обогащения NGS-библиотеки применялась мультиплексная полимеразная цепная реакция. Для выполнения секвенирования библиотек использовались платформа MiniSeq (Illumina) и набор реагентов High output. Выявленные в опухолевом материале мутации в дальнейшем мониторировались в плазме крови.

Определение опухолевоспецифичных соматических мутаций в цоДНК проводилось с помощью капельной цифровой полимеразной цепной реакции. У каждого пациента для определения цоДНК анализировалось от 1 до 5 образцов плазмы.

Найденные в исследуемых образцах с опухолевой тканью толстой кишки соматические мутации сопоставлялись с информацией из базы данных COSMIC [23], содержащей данные о частоте встречаемости и терапевтической значимости соматических мутаций.

При расчете конкордантности положительными результатами считались те, где найденные в цоДНК мутации хотя бы в 1 из образцов плазмы совпадали с мутацией, определенной в блоке. Если мутаций не было определено ни в блоке, ни в плазме, такой результат тоже считался совпадением.

Статистический анализ данных. С целью улучшения конкордантности мутационного статуса опухолевого

материала и цоДНК с 80 до 93 %, при альфе 0,01 и мощности исследования 90 %, для выполнения статистической гипотезы необходимо было сравнить первичную опухоль и цоДНК как минимум у 90 больных. Статистический анализ результатов выполнялся при помощи программ Microsoft Excel 2016 и IBM SPSS Statistics v. 26.

Результаты

Всего в базу данных была внесена информация о 556 больных (1497 образцов плазмы). Из них критериям включения соответствовали 229 образцов первичной опухоли от 211 больных – 37,9 % (в том числе от 18 пациентов по 2 образца первичной опухоли). Таким образом, для проведения дальнейшего анализа были отобраны 229 образцов тканей и 471 образец плазмы 211 пациентов. Характеристика больных представлена в табл. 2.

Таблица 2. Характеристика больных, включенных в анализ, $n = 211$

Table 2. Characteristics of patients included in the study, $n = 211$

Показатель Parameter	Значение Value
Возраст, медиана, лет Median age, years	61 (22,67–87,45) стандартное отклонение 12,01 standard deviation 12.01
Пол, n (%): Sex, n (%): женский female мужской male	103 (48,88) 108 (51,18)
Локализация, n (%): Location, n (%): правые отделы ободочной кишки right colon левые отделы ободочной кишки left colon прямая кишка rectum	59 (27,96) 84 (39,81) 68 (32,22)
Гистологический тип опухоли, n (%): Histological tumor type, n (%): аденокарцинома adenocarcinoma муцинозная аденокарцинома mucinous adenocarcinoma нейроэндокринный рак G ₃ neuroendocrine cancer G ₃	205 (97,15) 5 (2,37) 1 (0,47)
Степень дифференцировки, n (%): Tumor differentiation grade, n (%): низкая степень злокачественности (G ₁ –G ₂) low grade (G ₁ –G ₂) высокая степень злокачественности (G ₃ –G ₄) high grade (G ₃ –G ₄) неизвестно unknown	188 (89,10) 22 (10,42) 1 (0,47)

Стадия, n (%): Stage, n (%): I II III метастатические: metastatic: синхронные synchronous метакронные metachronous изолированные метастазы в легкие lung metastases only изолированные метастазы в печень liver metastases only множественные метастазы multiple metastases минимальное резидуальное заболевание после метастазэктомии minimal residual disease after metastasectomy	26 (12,32) 70 (33,18) 58 (27,49) 57 (27,01) 43/57 (75,44) 14/57 (24,56) 3/57 (5,26) 34/57 (59,65) 22/57 (38,60) 46/57 (80,70)
Оценка эффективности химиотерапии, n (%) Efficacy of chemotherapy, n (%)	11/57 (19,30)
T, n (%): 1 2 3 4 x	7 (3,32) 28 (13,27) 135 (63,98) 121 (57,35) 3 (1,42)
N, n (%): 1 2 x	60 (28,43) 35 (16,59) 10 (4,74)
Первичное лечение выполнено при заборе циркулирующей опухолевой ДНК, n (%): The patient received primary treatment at the moment of sample collection for the analysis of circulating tumor DNA, n (%): химиотерапия chemotherapy лучевая терапия radiotherapy хирургия surgery	25 (11,85) 8 (3,79) 178 (84,36)

В материале блоков с опухолевой тканью обнаружены 620 соматических мутаций в 28 генах (*ACVR2A* – 18, *AKT1* – 2, *APC* – 126, *BAX* – 7, *BMPR2* – 10, *BRAF* – 18, *CDH1* – 2, *CDKN2A* – 11, *CTNNB1* – 1, *DOCK3* – 9, *EGFR* – 4, *FBXW7* – 6, *GATA3* – 2, *IDH1* – 3, *IRF5* – 4, *KRAS* – 85, *MB21D2* – 8, *NRAS* – 5, *PGM5* – 2, *PIK3CA* – 31, *RNF43* – 10, *RPL22* – 19, *SMAD4* – 31, *SPTA1* – 1, *TCF7L2* – 4, *TP53* – 196, *TTK* – 2, *XYLT2* – 3). В 5 случаях мутаций в блоке опухолевом материале не было определено (2,18 %). Таким образом, чувствительность тест-системы для выявления мутаций в ткани первичной опухоли составила 97,82 %.

Чаще всего встречались мутации в генах *TP53* – 85 % случаев, *APC* – 55 %, *KRAS* – 37 %, *SMAD4* – 13,5 %, *PIK3CA* – 13 %, *RPL22* – 8 %, *ACVR2A* – 7,8 %, *BRAF* – 7,8 %, *NRAS* – всего 2 % случаев.

Данные по цвДНК удалось получить в 360 (из них в 28 образцах плазмы материала на определение мутаций не хватило из-за низкого покрытия NGS).

Для дальнейшего анализа цвДНК были отобраны 332 образца. Из них мутации в цвДНК были определены в 170 образцах плазмы (что является основанием для трактовки этой фракции цвДНК как цоДНК), из них в 90 образцах из 168 – до лечения и в 80 образцах из 164 – в плазме после проведенного лечения. Чувствительность для всех стадий – 51,2 % (95 % доверительный интервал (ДИ) 45,8–56,6), для метастатического КРР – 64,5 % (95 % ДИ 53,3–74,5). Наибольшая чувствительность при определении цоДНК до лечения наблюдалась при Т4 (63,0 % (95 % ДИ 44,2–79,1)), Nx (87,5 % (95 % ДИ (54,6–98,6))), при низкой дифференцировке опухоли (60,0 % (95 % ДИ 35,3–81,2)) и не различалась в зависимости от проведенного на 1-м этапе лечения.

Всего в цоДНК удалось определить 126 мутаций 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 %) – в генах *FBXW7*, *MB21D2*, *SMAD4*.

В каждом образце плазмы для выявления цоДНК определяли от 1 до 5 мутаций (среднее значение 1,37; 95 % ДИ 1,26–1,48), первоначально обнаруженных в блоке ткани первичной опухоли. Из 211 пар данные о цоДНК определены в 170 случаях. Из 170 пар конкордантность была выявлена в 118 парах. При этом 114 пар были конкордантны по хотя бы 1 мутации, при этом 11 – по 2 мутациям и 3 – по 3 мутациям. В 5 случаях мутаций не было определено ни в блоке, ни в плазме.

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: син-

хронными и метасинхронными) – 83,8 % (95 % ДИ 69,6–92,9) ($p = 0,030$) (табл. 3). Конкордантность по всем генам для ранних стадий (I–III) составила 65,4 % (95 % ДИ 57,1–73,1).

Конкордантность по мутационному статусу гена *KRAS* составила 78,3 % (95 % ДИ 66,7–87,3): 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). Из 5 случаев, в которых в первичном блоке была определена мутация в гене *NRAS*, ни в одном не проводилось поиска этой мутации в цоДНК, таким образом, данных по конкордантности для этого гена не представлено.

При анализе совпадений по гену *BRAF* конкордантность для всех стадий составила 70 % (95 % ДИ 39,4–90,7). 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 %.

При поиске критерия, при котором конкордантность будет наибольшей, обнаружено, что показатель совпадений возрастал для всех генов по мере увеличения критерия T ($p = 0,041$) (конкордантность для T4–81,5 % (95 % ДИ 64,1–92,6) против 57,1 % (95 % ДИ 23,5–86,1) для T1). 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 ($p = 0,028$): для N2 – 82,1 % (95 % ДИ 65,2–92,8) против 63,1 % при N0 (95 % ДИ 52,5–72,8). Следует отметить, что для категории Nx конкордантность была наибольшей – 87,5 % (95 % ДИ 54,6–98,6), что, по всей видимости, связано с большей распространенностью

Таблица 3. Конкордантность по всем генам в зависимости от стадии

Table 3. Concordance for all genes depending on the disease stage

Стадия Stage	Конкордантность по всем генам Concordance for all genes			
	Количество Number	Совпадение, % Concordance, %	95 % нижняя граница ДИ, % 95 % lower limit of CI, %	95 % верхняя граница ДИ, % 95 % upper limit of CI, %
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 Total	118	69,4	62,4	76,0

Примечание. ДИ – доверительный интервал.

Note. CI – confidence interval.

заболевания при неизвестных данных N. Для генов *BRAF* и *TP53* конкордантность при N2 была 100 %, и для всех 4 генов – *KRAS*, *BRAF*, *APC* и *TP53* – она составила 100 % при Nx. Показатель конкордантности для всех генов не был достоверно выше ($p = 0,440$) при низкодифференцированных опухолях: 69 % (95 % ДИ 61,5–75,9) при G₁₋₂ против 78,6 % (95 % ДИ 53,1–93,6) при G₃₋₄, но конкордантность для низкодифференцированных опухолей по *KRAS*, *BRAF* и *TP53* составила 100 %.

Обсуждение

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. Это согласуется с данными литературы, где показатель конкордантности находился в пределах от 72 до 100 % [4, 6–10, 12, 14–16, 18–20, 23], при этом во всех исследованиях анализировались данные по метастатическому КРР за исключением 2 работ [15, 20], в которых, помимо метастатического КРР, были включены данные по нерезектабельным местно-распространенным опухолям (см. табл. 1).

Исследования, посвященные сопоставимости цоДНК и биопсии, представлены выше в табл. 1.

Более низкие показатели общей конкордантности в нашем исследовании объясняются большей долей ранних стадий (I–III стадия – 154 (72,99 %) против 57 (27,01 %) метастатических). При анализе данных конкордантности только для метастатического заболевания мы получаем сопоставимые с данными литературы результаты.

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 заболева-

ния и 90,9 % (95 % ДИ 64,7–99,0) для метастатического КРР. Такие результаты согласуются с данными 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 ≥ 90 % наблюдались при изолированных метастазах в печень вне зависимости от размера очагов, с метастазами по брюшине или в легких с исходным наибольшим диаметром ≥ 20 мм [9].

При анализе нескольких генов показатели конкордантности ниже, например в исследовании R. Gupta и соавт. (2020) [19] ($n = 75$) 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 %).

Выводы

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. Конкордантность цоДНК и тканей первичной опухоли также оказалась удовлетворительной, особенно в отношении статуса генов *KRAS* и *BRAF* при метастатическом заболевании, что позволяет рассматривать ее в качестве альтернативы классическому определению мутаций в генах в опухолевом материале плазмой крови для определения биомаркеров эффективности таргетной терапии.

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 Oncol* 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.
- 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.2015.63.42384.
- Hu Z., Chen H., Long Y. et al. The main sources of circulating cell-free DNA: apoptosis, necrosis and active secretion. *Crit Rev Oncol Hematol* 2021;157:103166. DOI: 10.1016/j.critrevonc.2020.103166.
- 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). DOI: 10.1126/scitranslmed.3007094.
- Sefrioui D., Vasseur N., Sesboué R. et al. Plasma cell-free DNA and fraction of circulating *KRAS* mutations as prognostic in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2014;32(3 Suppl):490. DOI: 10.1200/jco.2014.32.3_suppl.490.
- Thierry A.R., Mouliere F., El Messaoudi S. et al. Clinical validation of the detection of *KRAS* and *BRAF* mutations from circulating tumor DNA. *Nat Med* 2014;20(4):430–5. DOI: 10.1038/nm.3511.
- Tie J., Kinde I., Wang Y. et al. Circulating tumor DNA as an early marker of therapeutic response in patients with metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol* 2015;26(8):1715–22. DOI: 10.1093/annonc/mdv177.

9. Spindler K.L.G., Pallisgaard N., Andersen R.F. et al. Circulating free DNA as biomarker and source for mutation detection in metastatic colorectal cancer. *PLoS One* 2015;10(4):e0108247. DOI: 10.1371/journal.pone.0108247.
10. Liu F., Li C., Zhao J. et al. 2185 Detection of *KRAS* mutations in plasma from patients with metastatic colorectal cancer by the next-generation sequencing. *Eur J Cancer* 2015;51:S395. DOI: 10.1016/S0959-8049(16)31105-4.
11. Kidess-Sigal E., Liu H.E., Triboulet M.M. et al. 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. *Oncotarget* 2016;7(51):85349–64. DOI: 10.18632/oncotarget.13350.
12. Thierry A.R., El Messaoudi S., Mollevi C. et al. Clinical utility of circulating DNA analysis for rapid detection of actionable mutations to select metastatic colorectal patients for anti-EGFR treatment. *Ann Oncol* 2017;28(9):2149–59. DOI: 10.1093/annonc/mdx330.
13. Vidal J., Muinelo L., Dalmases A. et al. Plasma ctDNA *RAS* mutation analysis for the diagnosis and treatment monitoring of metastatic colorectal cancer patients. *Ann Oncol* 2017;28(6):1325–32. DOI: 10.1093/annonc/mdx125.
14. Grasselli J., Elez E., Caratù G. et al. Concordance of blood- and tumor-based detection of *RAS* mutations to guide anti-EGFR therapy in metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol* 2017;28(6):1294–301. DOI: 10.1093/annonc/mdx112.
15. Bachet J.B., Bouché O., Taieb J. et al. *RAS* mutation analysis in circulating tumor DNA from patients with metastatic colorectal cancer: the AGEO RASANC prospective multicenter study. *Ann Oncol* 2018;29(5):1211–9. DOI: 10.1093/annonc/mdy061.
16. Yao J., Zang W., Ge Y. et al. *RAS/BRAF* circulating tumor DNA mutations as a predictor of response to first-line chemotherapy in metastatic colorectal cancer patients. *Cancer J Gastroenterol Hepatol* 2018;2018:1–10. DOI: 10.1155/2018/4248971.
17. Mardinian K., Okamura R., Kato S., Kurzrock R. Temporal and spatial effects and survival outcomes associated with concordance between tissue and blood *KRAS* alterations in the pan-cancer setting. *Int J Cancer* 2020;146(2):566–76. DOI: 10.1002/ijc.32510.
18. Van't Erve I., Greuter M.J.E., Bolhuis K. et al. Diagnostic strategies toward clinical implementation of liquid biopsy *RAS/BRAF* circulating tumor DNA analyses in patients with metastatic colorectal cancer. *J Mol Diagn* 2020;22(12):1430–7. DOI: 10.1016/j.jmoldx.2020.09.002.
19. Gupta R., Othman T., Chen C. et al. Guardant360 circulating tumor DNA assay is concordant with FoundationOne next-generation sequencing in detecting actionable driver mutations in anti-EGFR Naive metastatic colorectal cancer. *Oncologist* 2020;25(3):235–43. DOI: 10.1634/theoncologist.2019-0441.
20. Lastraioli E., Antonuzzo L., Fantechi B. et al. *KRAS* and *NRAS* mutation detection in circulating DNA from patients with metastatic colorectal cancer using BEAMing assay: Concordance with standard biopsy and clinical evaluation. *Oncol Lett* 2020;21(1):15. DOI: 10.3892/ol.2020.12276.
21. Kagawa Y., Elez E., García-Foncillas J. et al. Combined analysis of concordance between liquid and tumor tissue biopsies for *RAS* mutations in colorectal cancer with a single metastasis site: The METABEAM study. *Clin Cancer Res* 2021;27(9):2515–22. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-20-3677.
22. Dumbrava E.E., Call S.G., Huang H.J. et al. *PIK3CA* mutations in plasma circulating tumor DNA predict survival and treatment outcomes in patients with advanced cancers. *ESMO Open* 2021;6(5):100230. DOI: 10.1016/j.esmoop.2021.100230.
23. 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. Available at: <https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>.

ORCID авторов / ORCID of authors

М.Ю. Федянин / M.Yu. Fedyanin: <https://orcid.org/0000-0001-5615-7806>
 А.А. Трякин / A.A. Tryakin: <https://orcid.org/0000-0003-2245-214X>
 Е.М. Полянская / E.M. Polyanskaya: <https://orcid.org/0000-0001-7193-1169>
 А.Н. Поляков / A.N. Polyakov: <https://orcid.org/0000-0001-5348-5011>
 Н.Е. Кудашкин / N.E. Kudashkin: <https://orcid.org/0000-0003-0504-585X>
 Д.В. Подлужный / D.V. Podluzhnyy: <https://orcid.org/0000-0001-7375-3378>
 З.З. Мамедли / Z.Z. Mamedli: <https://orcid.org/0000-0002-9289-1247>
 С.А. Тюляндин / S.A. Tjulandin: <https://orcid.org/0000-0001-9807-2229>

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

Финансирование. Исследование проведено в рамках экспериментального государственного задания Министерства здравоохранения Российской Федерации.
Financing. The study was performed within the framework of the experimental state task of the Ministry of Health of Russia.

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики. Протокол исследования одобрен локальным этическим комитетом, пациенты подписали информированное согласие перед забором крови.
Compliance with patient rights and principles of bioethics. The study protocol was approved by the local ethics committee, and patients signed an informed consent prior to blood sampling.

Статья поступила: 17.02.2022. **Принята к публикации:** 16.03.2022.
Article submitted: 17.02.2022. **Accepted for publication:** 16.03.2022.