

На правах рукописи

ПОПОВА АННА СЕРГЕЕВНА

**ВОЗМОЖНОСТИ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ ТЕЧЕНИЯ И
ИНДИВИДУАЛИЗАЦИИ ТЕРАПИИ РАКА ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ
НА ОСНОВАНИИ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК
ОПУХОЛИ**

14.01.12 – Онкология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой
степени кандидата медицинских наук

Москва – 2020

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

Научный руководитель:

доктор медицинских наук

Федянин Михаил Юрьевич

Официальные оппоненты:

Андреяшкина Ирина Ивановна, доктор медицинских наук, заместитель главного внештатного специалиста – онколога ДЗМ, ведущий научный сотрудник отделения химиотерапии государственного бюджетного учреждения здравоохранения г. Москвы «Московский клинический научно-практический центр имени А.С. Логинова Департамента здравоохранения г. Москвы»

Стрельников Владимир Викторович, доктор биологических наук, заведующий лабораторией эпигенетики федерального государственного бюджетного научного учреждения «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова»

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение дополнительного профессионального образования «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «1» апреля 2020 года в 13-00 часов на заседании диссертационного совета Д 001.017.01 на базе ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России по адресу: 115478, г. Москва, Каширское шоссе, д. 23.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России по адресу: 115478, г. Москва, Каширское шоссе, д. 24 и на сайте www.ronc.ru.

Автореферат разослан «__» _____ 2020 года

Ученый секретарь

диссертационного совета

доктор медицинских наук, профессор

Кадагидзе Заира Григорьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности

Рак поджелудочной железы (РПЖ) занимает значимое место в структуре смертности населения России от злокачественных новообразований. Особенности клинического течения, а также отсутствие скрининговых тестов приводят к тому, что РПЖ диагностируется в резектабельной стадии менее чем в 20% случаев (Stathis A. et al., 2010). Но даже в случае оперативного лечения прогрессирование заболевания возникает в 25-37% случаев (Breidert M. et al., 2014, Matsumoto I. et al., 2015). Главной причиной этого является наличие микрометастазов, которые не могут быть определены традиционными методами лучевой диагностики (Komo T. et al., 2016).

В последние годы все больший интерес уделяется поиску биомаркеров в попытке персонализировать и тем самым улучшить лечение и прогноз РПЖ. На основании полногеномного секвенирования 100 образцов РПЖ было выделено 4 молекулярных подтипа опухоли, одним из которых является так называемый «нестабильный» подтип, характеризующийся высокой частотой мутаций в генах системы гомологичной рекомбинации (ГР) ДНК (Waddell N. et al., 2015). По данным мировой литературы частота мутаций в генах *BRCA1/2* при РПЖ составляет около 5-8%, однако, большинство исследований включали европейскую популяцию пациентов, в том числе евреев Ашкенази. Применение препаратов платины позволило достичь улучшения выживаемости пациентов при *BRCA*-ассоциированном РПЖ (Aung K.L. et al., 2016, Golan T. et al., 2017, Lowery M.A. et al., 2011, Wattenberg M.M. et al., 2019). Было показано, что паттерн мутаций при РПЖ отличается от рака молочной железы (РМЖ) и рака яичников (РЯ), в связи с чем применение существующей на данный момент тест-системы может быть неинформативным при РПЖ.

Другим активно изучаемым подходом в диагностике и прогнозировании течения злокачественных новообразований в последние десятилетия является метод «жидкостной биопсии», включающий в себя определение циркулирующих опухолевых клеток, циркулирующей опухолевой ДНК (цоДНК) и циркулирующих опухолевых экзосом в крови пациентов (Alix-Panabières C. et al., 2013, Gold B. et al., 2015, Schwarzenbach H. et al., 2011). Данный метод особенно интересен при РПЖ в

связи с тем, что забор достаточного количества материала для генетического исследования не всегда удается выполнить в связи с техническими сложностями, обусловленными анатомическим расположением опухоли и выраженной десмопластической реакцией (Levy M. et al., 2019). Помимо этого биопсийный образец не может полностью отразить молекулярные характеристики заболевания в связи с его гетерогенностью (Cros J. et al., 2018).

Доказательство корреляции ответа опухоли на лечение и изменения уровня цоДНК было продемонстрировано на примере таких заболеваний, как РМЖ (Dawson S.-J. et al., 2013, Riva F. et al., 2016), рак легкого (Abbosh C. et al., 2017) и колоректальный рак (Siravegna G. et al., 2015, Tie J. et al., 2015). Прогностическая значимость цоДНК при РПЖ оценивалась, как правило, при распространенном процессе, и только в нескольких исследованиях – при резектабельном (Hadano N. et al., 2016, Nakano Y. et al., 2018, Pietrasz D. et al., 2017). После резекции опухоли отмечалось снижение уровня цоДНК, указывая на то, что предоперационная цоДНК у пациентов с РПЖ ранних стадий исходит из первичной опухоли. Тем не менее, в подгруппе пациентов цоДНК определялась и в послеоперационном периоде. Рецидив у данных пациентов встречался в 91% случаев, и медиана выживаемости без признаков заболевания (ВБПЗ) составила всего 5 месяцев (Groot V.P. et al., 2019).

Частота и структура мутаций в генах ГР в российской популяции больных РПЖ неизвестна. В этой связи представляется перспективным их изучение как с точки зрения эффективности препаратов платины и прогноза заболевания в зависимости от мутационного статуса, так и с точки зрения определения показаний для генетического тестирования пациентов. Определение цоДНК на разных этапах лечения РПЖ сможет позволить оценить ее способность в динамике отображать характеристики заболевания. Особенно интересным представляется сравнение уровня цоДНК до и после операции, что может предсказать эффективность проведенного лечения и прогноз заболевания.

Цель исследования

Улучшение результатов лечения рака поджелудочной железы путем прогнозирования течения и индивидуализации терапии, основываясь на молекулярно-биологических характеристиках опухоли.

Задачи исследования

1. Оценить частоту встречаемости мутаций генов системы ГР ДНК в российской популяции больных РПЖ.
2. Изучить различия клинических характеристик и отдаленные результаты лечения больных РПЖ в зависимости от мутационного статуса генов системы ГР ДНК.
3. Определить показания к генетическому тестированию пациентов на наличие мутаций в генах ГР ДНК.
4. Оценить чувствительность теста по выявлению цоДНК в плазме больных РПЖ.
5. Определить частоту мутаций, встречаемых в цоДНК в крови больных РПЖ, и зависимость уровня цоДНК от распространенности заболевания.
6. Оценить прогностическую значимость цоДНК у пациентов с резектабельным РПЖ.

Методы и методология исследования

Диссертационная работа состоит из двух частей. Первая часть посвящена изучению возможной прогностической и предиктивной значимости мутаций в генах ГР ДНК в российской популяции пациентов с РПЖ. Исследование основано на базе данных больных РПЖ онкологического отделения лекарственных методов лечения (химиотерапевтического) №2, получавших лечение и консультацию в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России с 2001 по 2019 гг. Биоматериал и клиническая информация 626 пациентов собирались как ретроспективно, так и проспективно. Данная часть работы выполнена совместно с лабораторией биочипов Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук в рамках экспериментального государственного задания Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Вторая часть посвящена вопросу значимости определения цоДНК при РПЖ. В исследование были включены 37 пациентов с резектабельным и 29 – с распространенным РПЖ. Проспективно собраны образцы крови пациентов на разных этапах лечения, а также опухолевый материал в случае его доступности.

Работа выполнена совместно с лабораторией фармакогеномики Института химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения РАН.

Научная новизна

Поиск новых прогностических и предиктивных маркеров при РПЖ представляет большой интерес в связи с низкой эффективностью системной терапии при данном заболевании. В исследованиях было показано, что прогноз заболевания, а также эффективность препаратов платины и PARP-ингибиторов могут быть обусловлены статусом генов ГР ДНК. Проведенное нами исследование является одним из крупнейших в мире по количеству включенных пациентов и проанализированных генов ГР ДНК при РПЖ. Также впервые определена частота и структура мутаций в широком спектре генов ГР российской популяции пациентов с РПЖ. Полученные результаты позволили определить значимость генетического тестирования пациентов с РПЖ на наличие мутаций в генах *BRCA1*, *BRCA2* и *PALB2* в клинической практике.

В мировой литературе прогностическая значимость определения цоДНК на различных этапах как хирургического, так и системного лечения четко не определена в связи с разнородностью выборок и методологий анализа. Впервые в России нами проведено проспективное исследование по оценке влияния статуса цоДНК на прогноз пациентов с резектабельным РПЖ с помощью простой и воспроизводимой тест-системы, созданной в РФ.

Теоретическая и практическая значимость

Частота мутаций в генах ГР ДНК в российской популяции пациентов с РПЖ составила 12%, при этом половина из них пришлась на долю генов *BRCA1*, *BRCA2* и *PALB2*. Именно мутации в данных трех генах оказали влияние на чувствительность опухоли к платиносодержащей терапии. Мутации же в других проанализированных генах системы ГР не продемонстрировали своей прогностической и предиктивной значимости. Молодой возраст пациента и наличиеотягощенного семейного анамнеза по онкологическим заболеваниям не ассоциированы с наличием мутаций. В связи с этим всем пациентам с РПЖ рекомендовано тестирование на наличие мутаций в *BRCA1*, *BRCA2* и *PALB2* для определения оптимальной тактики лечения независимо от клинических характеристик и семейного анамнеза. Необходимо адаптировать

тест-системы, применяемые при РМЖ и РЯ, для генетического анализа при РПЖ перед его внедрением в рутинную практику.

Концентрация цоДНК в крови значимо выше при распространенном процессе, чем при резектабельном. Таким образом, концентрация цоДНК может отражать распространенность опухолевого процесса. Обнаружение цоДНК в крови пациентов после хирургического этапа лечения связано с худшим прогнозом независимо от проведения адъювантной химиотерапии. В данной когорте пациентов должна быть рассмотрена возможность применения в адъювантном режиме наиболее эффективной схемы химиотерапии. Необходимо дальнейшее изучение данного вопроса для определения оптимальных временных точек для забора образца крови в процессе лечения и динамического наблюдения, а также для определения прогностической значимости цоДНК при различных стадиях заболевания.

Личный вклад

Автором самостоятельно проведен сбор и анализ литературы, в том числе мета-анализ исследований, посвященных прогностической роли цоДНК в крови пациентов с РПЖ. Автор принимал участие в разработке дизайна и концепции исследования, а также непосредственно участвовал в ведении пациентов, включенных в исследование, оценивал эффективность проводимой терапии и отдаленные результаты лечения. Автор принимал участие в заполнении базы данных, включающую информацию о пациентах с РПЖ, получавших лечение в НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина. Автор провел статистический анализ и разработал практические рекомендации на основании полученных результатов.

Соответствие паспорту специальности

Основные положения, рекомендации и выводы диссертационной работы соответствуют паспорту специальности 14.01.12 – Онкология («медицинские науки») и области исследований п.2 «Исследования по изучению этиологии и патогенеза злокачественных опухолей, основанные на достижениях ряда естественных наук (генетики, молекулярной биологии, морфологии, иммунологии, биохимии и др.)», п.6 «Внедрение в клиническую практику достижений фармакологии в области

создания и использования цитостатиков, гормонов, биологически активных препаратов».

Положения, выносимые на защиту

С помощью секвенирования генов ГР ДНК в российской популяции пациентов РПЖ патогенные мутации определены в 12% случаев. Среди выявленных мутаций клиническое значение показали мутации в генах *BRCA1/2* и *PALB2*. При наличии мутаций в данных генах наибольшую эффективность имели схемы химиотерапии с добавлением препаратов платины. Существующая на данный момент тест-система для ПЦР-диагностики мутаций при РМЖ и РЯ не позволяет выявить все мутации при РПЖ. Генетический анализ на наличие мутаций в генах *BRCA1*, *BRCA2* и *PALB2* показан всем пациентам РПЖ независимо от клинико-морфологических характеристик и анамнеза.

Наиболее часто в цоДНК встречались мутации в генах *TP53* и *KRAS*. Концентрация цоДНК выше в случае наличия отдаленных метастазов. Наличие цоДНК после хирургического лечения является негативным фактором ВБПЗ, что может указывать на необходимость применения в данной группе пациентов многокомпонентных схем адъювантной химиотерапии.

Внедрение результатов исследования

Полученные в ходе работы результаты и предложенные рекомендации внедрены в клиническую практику НИИ клинической онкологии имени академика РАН и РАМН Н.Н. Трапезникова ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

Апробация

Апробация диссертационной работы состоялась 8 сентября 2020 года на совместной научной конференции онкологических отделений лекарственных методов лечения (химиотерапевтических) №1, №2, №3, №17, молекулярно-биологической лаборатории отдела морфологической и молекулярно-генетической диагностики опухолей, онкологических отделений хирургических методов лечения №2, №7 (опухолей гепатопанкреатобилиарной зоны), №6 (абдоминальной

онкологии), №13 НИИ клинической онкологии им. академика РАН и РАМН Н.Н. Трапезникова ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

Предварительные результаты генетического тестирования пациентов РПЖ и эффективности платиносодержащей химиотерапии были доложены в ходе доклада на конференции Российского общества клинической онкологии «Опухоли ЖКТ» в апреле 2019 года.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 9 научных работ, 4 из которых опубликованы в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России.

Объём и структура работы

Диссертация изложена на 115 страницах компьютерного текста, состоит из введения, 4 глав, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка литературы, содержащего 165 источников (5 отечественных и 160 зарубежных), и приложения. Работа иллюстрирована 19 рисунками и 11 таблицами.

СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОЙ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

В данное исследование включались пациенты с морфологически подтвержденным диагнозом РПЖ любой стадии, получившие консультацию или лечение в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, в период с 2001 по 2019 гг. С помощью программного обеспечения Microsoft Access и Microsoft Excel сформированы базы данных, содержащие информацию о клинико-морфологической характеристике заболевания включенных в исследование пациентов, проведенном лечении, данных об отягощенности семейного анамнеза по онкологическим заболеваниям и наличии первично-множественных опухолей.

Для анализа мутаций в генах ГР с помощью высокопроизводительного секвенирования была сформирована коллекция из 477 образцов крови и 312 фиксированных формалином парафиновых блоков пациентов. Двадцать генов ГР, а именно *ATM*, *BARD1*, *BRCA1*, *BRCA2*, *BRIP1*, *FANCC*, *FANCF*, *FANCI*, *FANCG*, *FANCM*, *FANCL*, *MRE11*, *NBN (NBS1)*, *PALB2*, *RAD50*, *RAD51C*, *RAD51D*, *RAD52*,

RBBP8, *RINT1* проанализированы с помощью полноэкзомного секвенирования с применением секвенатора MiniSeq (Illumina), согласно протоколу «MiniSeq™ System Guide». Результаты высокопроизводительного секвенирования подтверждались секвенированием по Сенгеру. Далее выявленные мутации обработаны с помощью биоинформационного анализа. Результаты интерпретировались согласно рекомендациям ACMG 2015. Предсказательные алгоритмы InterVar, ClinVar, SIFT (Vaser R. et al., 2016), PolyPhen2 (Adzhubei I.A. et al., 2010), LRT (Chun S. et al., 2009), PROVEAN, M-CAP, DANN, MetaSVM и MetaLR применялись для определения клинической значимости выявленных мутаций.

Мета-анализ исследований, касающихся вопроса прогностической значимости цоДНК при РПЖ, был проведен согласно рекомендациям PRISMA (Moher D. et al., 2009). Источниками информации являлись базы данных PubMed, ASCO и ESMO. Критериями включения в исследование являлись полнотекстовые статьи и тезисы на русском и английском языках, опубликованные до февраля 2020 года. Были собраны следующие данные: число включенных пациентов, медиана ВБПЗ, выживаемости без прогрессирования (ВБП) и общей выживаемости (ОВ) с указанием отношения рисков (ОР) и 95% доверительного интервала (ДИ) при сравнении случаев наличия или отсутствия цоДНК в крови до и после операции по поводу резектабельного процесса и в процессе лечения в случае любой стадии заболевания. Мета-анализ проведен с применением программы Review Manager (RevMan), version 5.3.

Для выполнения второй части работы выполнялся забор крови 66 пациентов, в случае резектабельного РПЖ – до и после оперативного лечения. Проведен сбор архивного опухолевого материала удовлетворительного качества для выполнения генетического исследования. Оценивалась частота мутаций, встречаемых в цоДНК плазмы крови, и концентрация цоДНК в зависимости от стадии заболевания. Протокол приготовления таргетной библиотеки для определения опухолевых специфических соматических мутаций в ДНК опухолевых клеток и плазмы крови, а также проведения капельной цифровой ПЦР (кцПЦР) разработан в рамках научно-исследовательской работы «Разработка тест-системы для диагностики и мониторинга эффективности лечения злокачественных новообразований различной локализации на основе анализа циркулирующей в крови пациентов

опухолевой ДНК». Определение соматических мутаций в клинических образцах тканей опухоли и плазмы осуществляли при помощи высокопроизводительно секвенирования участков геномной ДНК, где располагаются наиболее частые мутации специфичные для РПЖ. При помощи аллель-специфической кцПЦР в образцах внеклеточной цоДНК, выделенных из плазмы крови пациентов, определялись полиморфные варианты генов *APC*, *BRAF*, *EGFR*, *KRAS*, *PIK3CA*, *SMAD4*, *TP53*.

Сравнительный анализ номинальных и порядковых переменных проводился критерием χ^2 , а также точным критерием Фишера. При применении критерия χ^2 в таблицах сопряжения 2x2 использована поправка Йейтса. Сравнительный анализ количественных переменных проводился с помощью критерия Манна-Уитни (для сравнения двух групп) или критерия Крускала-Уоллиса (для сравнения более двух групп) для ненормально распределенных выборок или Т-критерия для нормально распределенных выборок по критерию Шапиро-Уилка. Сравнительный анализ выживаемости проведен с помощью Логрангового теста. Расчет выживаемости проведен методом Каплана-Майера. Пороговое значение для возраста пациентов при анализе мутаций в генах ГР ДНК определялось с помощью построения ROC-кривой. Порогом статистической значимости являлось $p < 0,05$. Статистический анализ полученных результатов выполнен с использованием программ Microsoft Excel 2007 и IBM SPSS Statistics v. 20.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Результаты полноэкзомного секвенирования генов системы гомологичной рекомбинации ДНК при раке поджелудочной железы

С целью определения частоты и структуры мутаций в 20 генах ГР ДНК в российской популяции пациентов с РПЖ было выполнено полноэкзомное секвенирование ДНК, выделенной из образцов крови или архивного материала 626 пациентов. По результатам проведенного анализа патогенные мутации в гене *BRCA1* выявлены в 10 (1,6%) случаях, в *BRCA2* – в 20 (3,2%), в *PALB2* – в 5 (0,8%), в *ATM* – в 13 (2,1%), *BARD1* – в 2 (0,3%), *BLM* – в 1 (0,2%), *BRIP1* – в 1 (0,2%), *CHEK2* – в 4 (0,6%), в *FANCC* – в 2 (0,3%), в *FANCL* – в 1 (0,2%), в *FANCM* – в 2 (0,3%), в *NBN*

(*NBS1*) – в 11 (1,8%), в *RAD50* – в 1 (0,2%), в *RINT1* – в 1 (0,2%). Только 14,3% (5 из 35) выявленных с помощью секвенирования мутаций в генах *BRCA1/2* или *PALB2* могут быть обнаружены с помощью применяемых на данный момент тест-систем для ПЦР-диагностики.

Прогностическая и предиктивная значимость мутаций генов гомологичной рекомбинации ДНК при раке поджелудочной железы

Для оценки влияния обнаруженных при полноэкзомном секвенировании патогенных мутаций на прогноз заболевания и эффективность платиносодержащей терапии пациенты были разделены на три группы. В первую группу вошли пациенты с мутациями в генах *BRCA1/2* и *PALB2* в связи с имеющимися данными мировой литературы об их возможной клинической значимости. Во вторую группу вошли пациенты с мутациями в других генах ГР и в третью – без мутаций.

В анализ выживаемости пациентов резектабельным РПЖ включено 270 пациентов. Пациенты с мутациями в генах ГР, отличных от *BRCA1/2* и *PALB2*, чаще получали нео- и/или адъювантную химиотерапию по сравнению с остальными группами пациентов ($p=0,04$). Также были отмечены статистически значимые различия между сравниваемыми группами в радикальности операции ($p=0,04$). Что касается таких важных прогностических факторов, как пол, возраст пациента на момент постановки диагноза, наличие метастазов в регионарных лимфоузлах, диаметр и локализация первичной опухоли, степень ее дифференцировки, то статистически значимых различий между тремя группами пациентов найдено не было.

При медиане наблюдения в 18,2 месяцев (1-166,7 месяца) медиана ВБП в группе *BRCA1/2* и *PALB2*, группе других мутаций и группе дикого типа составила 8,9, 15,2 и 14,0 мес., соответственно (Рисунок 1). Статистически значимых различий между группами не выявлено ($p=0,89$).

Медианы ОВ пациентов также статистически значимо не различались между сравниваемыми группами и составили 23,4 мес. для группы с мутациями *BRCA1/2* или *PALB2*, 22,4 мес. для группы других мутаций ГР и 22,4 мес. для группы с диким типом генов ГР ($p=0,77$, Рисунок 2).

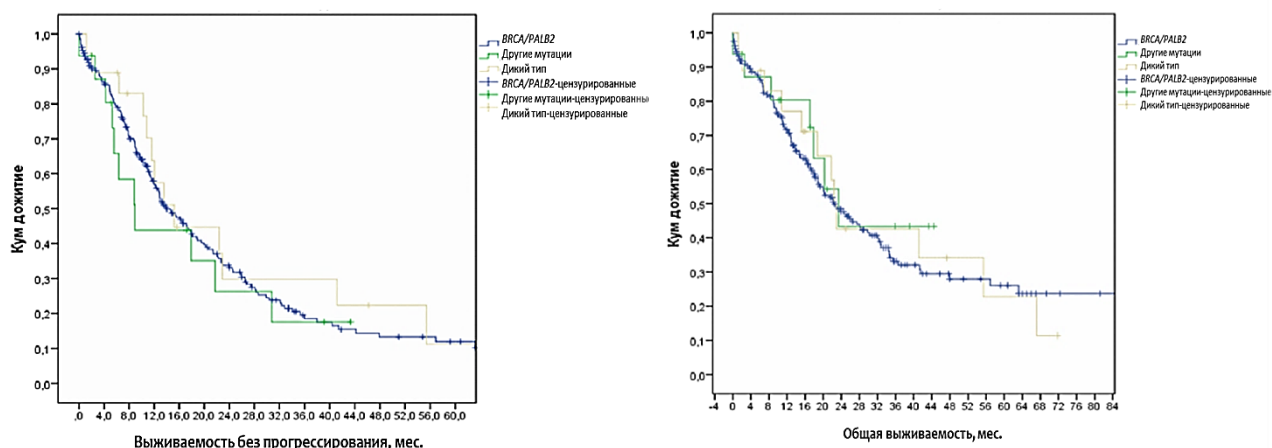


Рисунок 1 – ВБП пациентов с резектабельным РПЖ в зависимости от мутационного статуса генов ГР

Рисунок 2 – ОВ пациентов с резектабельным РПЖ в зависимости от мутационного статуса генов ГР

Однолетняя выживаемость для пациентов с мутациями в генах *BRCA1/2* и *PALB2* составила 80,4%, для пациентов с мутациями в других генах ГР – 77% и для пациентов с диким типом генов ГР – 71,7%.

В анализ выживаемости в случае местно-распространенного или метастатического РПЖ включены 356 пациентов. Группы не различались между собой по основным характеристикам. Статистически значимых различий по доле пациентов, получавших платиносодержащую терапию как в первой линии ($p=0,52$), так и за весь период лечения ($p=0,46$) не выявлено.

Частота объективных эффектов (ЧОЭ) при применении препаратов платины в первой линии химиотерапии в группе мутаций *BRCA1/2* и *PALB2* оказалась выше, чем в остальных группах, и достигла 54,5% ($n=6$), в то время как в группе мутаций в других генах ГР – 30,8% ($n=4$) и в группе дикого типа генов ГР – 17,4% ($n=21$, $p=0,01$). Что касается эффективности режимов первой линии химиотерапии без препаратов платины, то ЧОЭ для группы с мутациями *BRCA1/2* и *PALB2*, группы с мутациями в других генах ГР и группы с диким типом генов составила 25% ($n=1$), 50% ($n=3$) и 15,1% ($n=11$), соответственно ($p=0,05$).

При медиане наблюдения 11 мес. (1-101 мес.), медианы ВБП в первой группе в случае получения первой линии химиотерапии с включением или без препаратов платины составили 12,7 и 8,3 мес., соответственно (OR=0,09, 95% ДИ 0,02-0,46, $p<0,01$; Рисунок 3). Медиана ОВ также оказалась выше в случае включения

препаратов платины в схему химиотерапии и составила 22,9 мес., в то время как в случае применения бесплатинового режима – 9,0 мес. (OR=0,23, 95% ДИ 0,06-0,91, $p=0,04$; Рисунок 4).

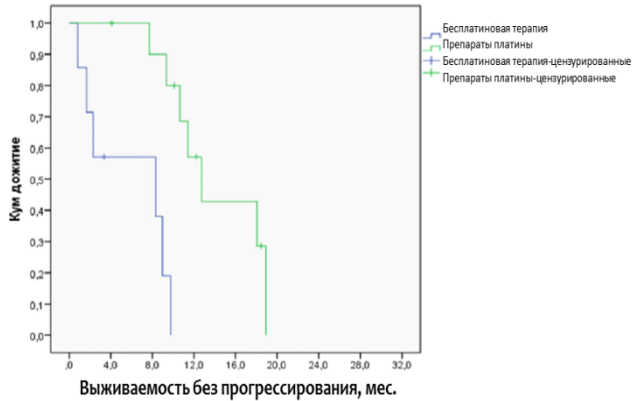


Рисунок 3 – ВБП пациентов с мутациями *BRCA1/2* и *PALB2* в зависимости от применения препаратов платины в первой линии химиотерапии

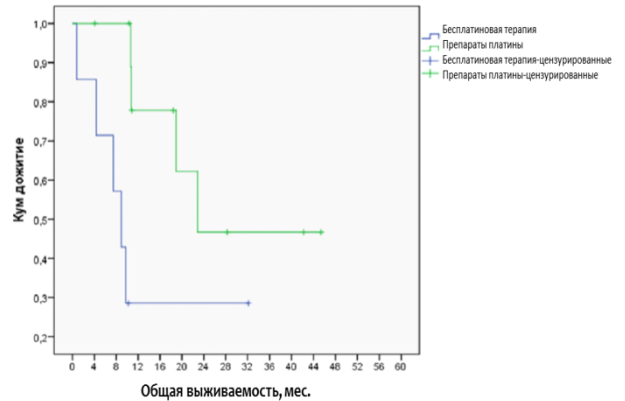


Рисунок 4 – ОВ пациентов с мутациями *BRCA1/2* и *PALB2* в зависимости от применения препаратов платины в первой линии химиотерапии

Во второй группе пациентов ВБП и ОВ оказались, наоборот, ниже в случае применения препаратов платины по сравнению с бесплатиновой терапией: 7,8 и 10,9 мес. (OR=2,46, 95% ДИ 0,85-7,13, $p=0,1$; Рисунок 5) и 16,2 и 22,9 мес. (OR=4,71, 95% ДИ 0,95-23,37, $p=0,06$; Рисунок 6), соответственно.

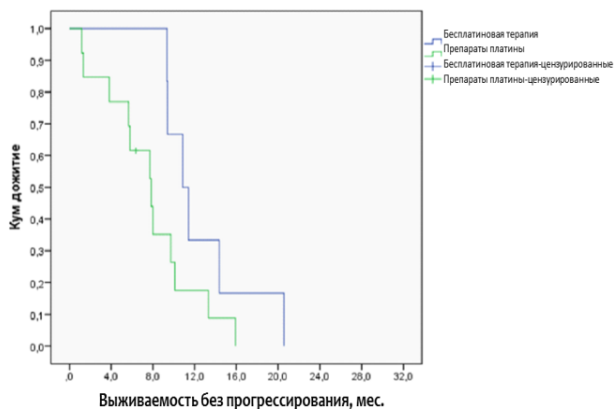


Рисунок 5 – ВБП пациентов с мутациями в генах ГР, отличных от *BRCA1/2* и *PALB2*, в зависимости от применения препаратов платины в первой линии химиотерапии

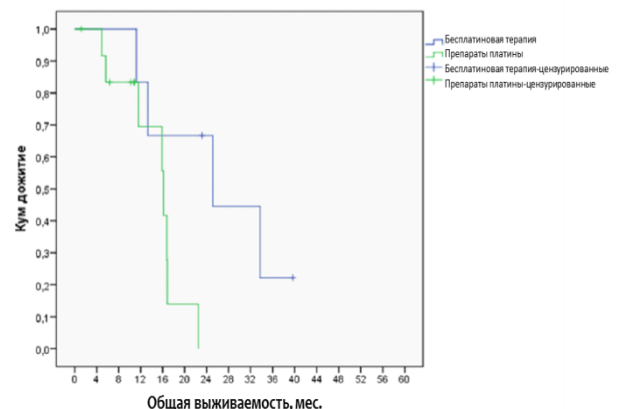


Рисунок 6 – ОВ пациентов с мутациями в генах ГР, отличных от *BRCA1/2* и *PALB2*, в зависимости от применения препаратов платины в первой линии химиотерапии

В случае дикого типа генов медианы ВБП статистически значимо не различались: 7,6 мес. для платиносодержащего режима и 6,6 мес. для бесплатинового режима (OR=0,84, 95% ДИ 0,64-1,09, $p=0,19$; Рисунок 7), в отличие от ОВ: 18,1 и 9,8 мес., соответственно (OR=0,56, 95% ДИ 0,41-0,75, $p<0,01$; Рисунок 8).

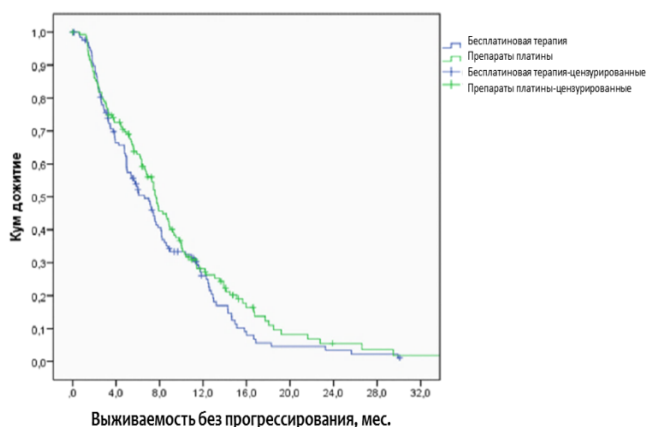


Рисунок 7 – ВБП пациентов с диким типом генов ГР в зависимости от применения препаратов платины в первой линии химиотерапии

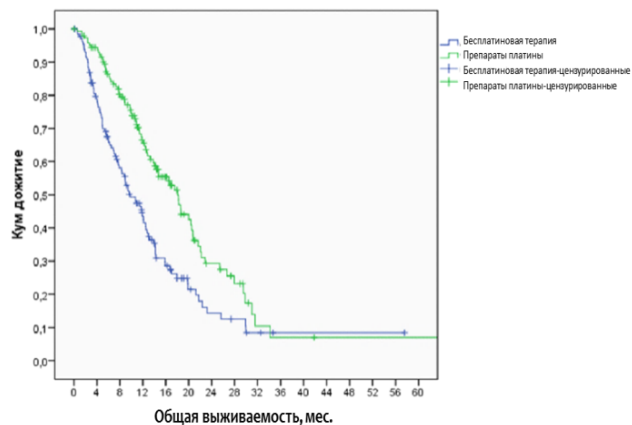


Рисунок 8 – ОВ пациентов с диким типом генов ГР в зависимости от применения препаратов платины в первой линии химиотерапии

Применение платиносодержащих препаратов в любой из линий химиотерапии также оказалось наиболее эффективным в группе пациентов с мутациями в генах *BRCA1/2* или *PALB2*: медиана ОВ при получении препаратов платины составила 22,9 мес., при получении других схем терапии – 9,0 мес. (OR=0,34, 95% ДИ 0,09-1,32, $p=0,12$). Продолжительность жизни пациентов с мутациями в генах ГР, отличных от *BRCA1/2* или *PALB2*, при использовании платиносодержащей терапии за весь период лечения оказалась несколько ниже, чем при ее отсутствии: медианы ОВ составили 13,3 и 16,8 месяцев, соответственно (OR=1,56, 95% ДИ 0,4-6,05, $p=0,52$). При отсутствии мутаций в генах ГР ОВ пациентов при применении препаратов платины в любой из линий терапии оказалась статистически значимо выше, чем при бесплатиновой терапии: медианы составили 18,2 и 8,8 мес., соответственно (OR=0,41, 95% ДИ 0,3-0,56, $p<0,01$).

Многофакторный регрессионный анализ Кокса показал, что только наличие метакронной *BRCA*-ассоциированной опухоли у пациента является независимым предиктором риска носительства мутации в генах *BRCA1/2* или *PALB2* (OR 5,83, 95%

ДИ 2,16-15,73, $p < 0,01$) в отличие от возраста менее 55 лет (ОР 1,44, 95% ДИ 0,66-3,14, $p = 0,35$). Однако при отсутствии метакронных опухолей в анамнезе доля пациентов с мутациями *BRCA1/2* или *PALB2* составила 4,7%, что является достаточной частотой для того, чтобы рекомендовать тестирование пациентам без первично-множественных злокачественных опухолей. Таким образом, имеющиеся факторы риска не позволяют отобрать группу пациентов, которым тестирование на наличие мутаций в генах *BRCA1/2* или *PALB2* не целесообразно.

Результаты мета-анализа исследований, посвященных прогностической значимости определения циркулирующей опухолевой ДНК в крови пациентов с раком поджелудочной железы

117 полных текстов статей и тезисов были просмотрены с целью оценки прогностической значимости цоДНК при РПЖ. В 32 публикациях не были указаны ОР смерти и/или прогрессирования и 95% ДИ, оценивалась прогностическая значимость уровня цоДНК, фракции мутантного аллеля или различных точковых мутаций, а также дизайн исследования предусматривал оценку прогностической значимости цоДНК в процессе лечения или наблюдения. Итого 17 исследований были включены в мета-анализ.

В 12 исследованиях оценивалось влияние цоДНК, выявленной до начала лечения, на ОВ пациентов вне зависимости от стадии и резектабельности заболевания. При этом отмечено влияние наличия цоДНК в крови на ОВ – ОР=2,21, 95% ДИ 1,35-3,33, $p = 0,001$ (Рисунок 9). Другими словами выявление цоДНК в крови пациентов в 2 раза увеличивало риск их смерти. Существенных систематических ошибок, связанных с публикациями, не отмечено.

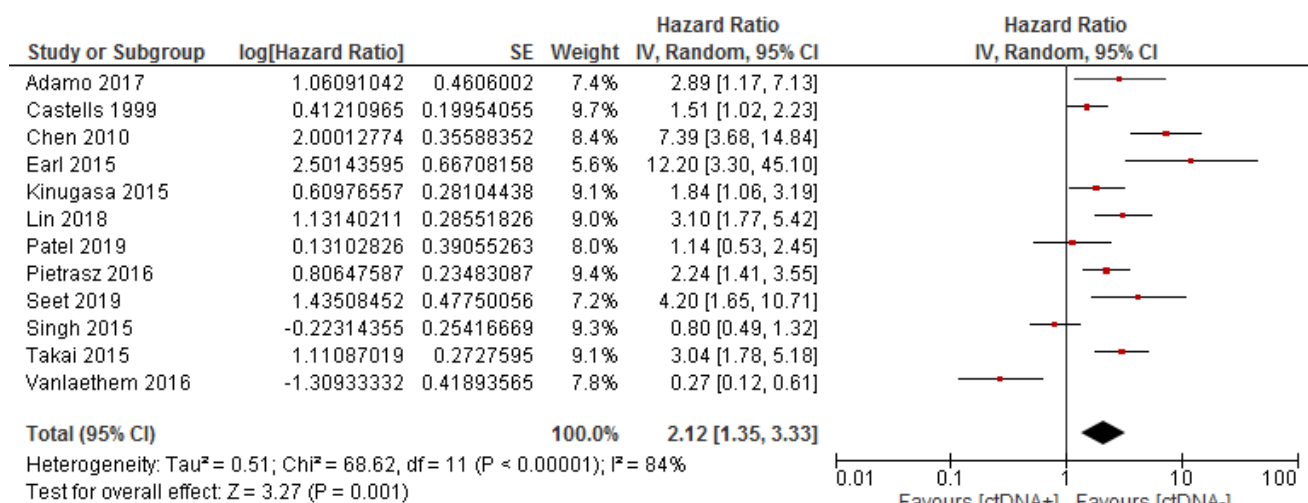


Рисунок 9 – График форест-плот мета-анализа исследований по изучению влияния на общую выживаемость наличия цоДНК в плазме крови при всех стадиях заболевания

В 3 исследованиях оценивалось влияние цоДНК, определяемой в крови, взятой до выполнения хирургического этапа лечения, на ВБПЗ. При этом выявлено негативное влияние наличия цоДНК в плазме крови перед хирургическим лечением на ВБПЗ – ОР=2,32, 95% ДИ 1,54-3,5, $p < 0,0001$ (Рисунок 10).

В 5 исследованиях оценивалось влияние цоДНК, определяемой до начала операции, на ОВ пациентов. При этом выявлено негативное влияние наличия цоДНК в плазме крови перед хирургическим лечением на ОВ – ОР=2,01, 95% ДИ 1,12-3,63, $p = 0,02$ (Рисунок 11). Существенных систематических ошибок, связанных с публикациями, не отмечено.

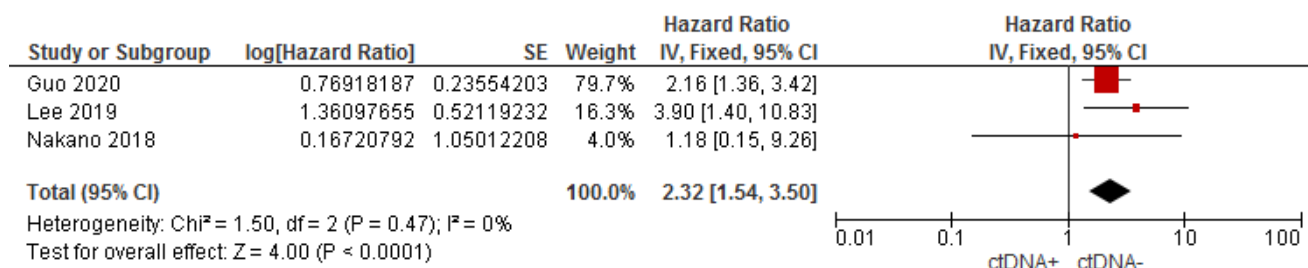


Рисунок 10 — График форест-плот мета-анализа исследований по изучению влияния наличия цоДНК в плазме крови перед хирургическим лечением на ВБПЗ

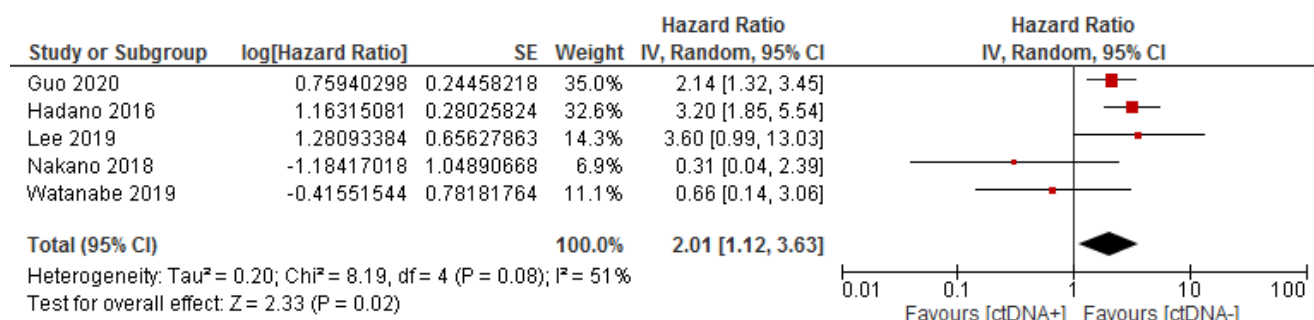


Рисунок 11 – График форест-плот мета-анализа исследований по изучению влияния наличия цоДНК в плазме крови перед хирургическим лечением на ОВ

В двух исследованиях представлены данные ВБПЗ при определении цоДНК в крови пациентов после операции. При этом выявлено негативное влияние наличия цоДНК в плазме крови после хирургического лечения на ВБПЗ – ОР=3,06, 95% ДИ 1,63-5,76, $p=0,0005$ (Рисунок 12).

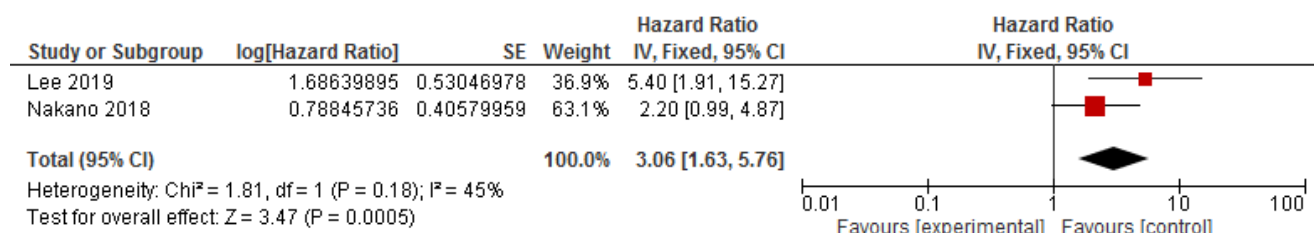


Рисунок 12 – График форест-плот мета-анализа исследований по изучению влияния наличия цоДНК в плазме крови после хирургического лечения на ВБПЗ

В трех исследованиях представлены данные об ОВ пациентов, у которых цоДНК сохранялась после операции. При этом выявлено негативное влияние наличия цоДНК в плазме крови после хирургического лечения на ОВ – ОР=3,39, 95% ДИ 2,12-5,44, $p<0,00001$ (Рисунок 13). Существенных систематических ошибок, связанных с публикациями, не отмечено.

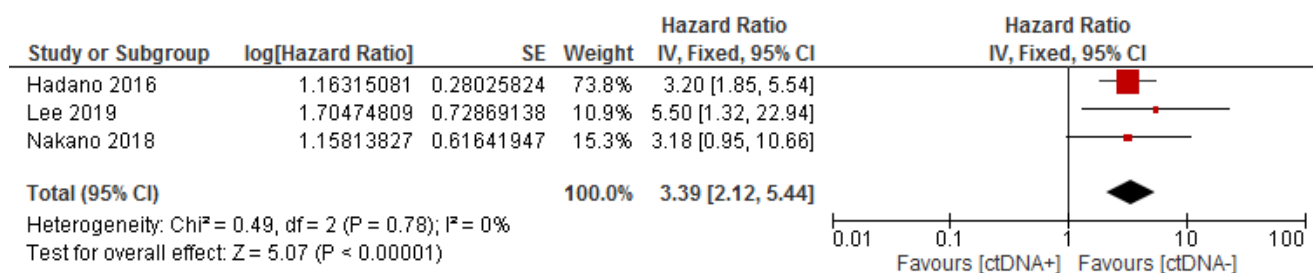


Рисунок 13 – График форест-плот мета-анализа исследований по изучению влияния наличия цоДНК в плазме крови после хирургического лечения на ОВ

Результаты проспективного исследования оценки чувствительности тест-системы, применяемой для определения мутаций в ДНК, и прогностической значимости циркулирующей опухолевой ДНК у больных резектабельным раком поджелудочной железы

Чувствительность тестирования, определяемая как доля образцов, в которых определялась хотя бы одна мутация, составила 64,4%. В 46 случаях при любом из заборов крови определялись мутации следующих генов: *TP53* – 30 (65,2%) случаев, *KRAS* – 7 (15,2%), *CDKN2A* – 6 (13,0%), *APC* – 1 (2,2%), *GNAS* – 1 (2,2%), *MB21D2* – 1 (2,2%). Медиана концентрации цоДНК в случае наличия метастазов на момент забора крови оказалась значимо выше, чем при резектабельном РПЖ (2,31 против 0 копий/мкл, $p=0,005$).

Для оценки влияния цоДНК на прогноз пациентов с резектабельным РПЖ были отобраны пациенты ($n=37$), которым выполнено хирургическое лечение, и забор крови осуществлялся до и после операции. В случае получения неoadъювантной терапии забор крови для исследования производился до ее начала.

У 76% пациентов отмечена II стадия заболевания, в 19% - III стадия и в 5% - I стадия. В 13,5% случаев пациенты получили неoadъювантную химиотерапию. В 15 (40,5%) случаях цоДНК была выявлена до операции: при I стадии – в 1 из 2 случаев, при II – в 11 из 28 случаев, при III – в 3 из 7 случаев. Не отмечено корреляции между стадией и наличием цоДНК до операции ($k -0,003$, $p=0,9$; $OR=0,9$, 95% ДИ 0,2-3,9, $p=0,9$), параметром T ($k -0,02$, $p=0,9$; $OR=0,9$, 95% ДИ 0,2-3,5, $p=0,9$) и параметром N ($k -0,14$, $p=0,4$; $OR=0,6$, 95% ДИ 0,2-2,1, $p=0,4$).

Медиана длительности наблюдения составила 9 мес. (1-17 мес.). Наличие цоДНК до операции не оказало влияние на ВБПЗ (OR=1,0, p=0,9) и ОВ (OR=0,02, p=0,4). Отрицательное значение цоДНК после операции определялось как отсутствие или снижение уровня мутантного аллеля до $\leq 2\%$. В 10 (27%) случаях цоДНК выявлена после операции. Медиана времени между операцией и взятием образца крови составило 7 дней (5-9 дней, $\sigma=0,6$). В случае определения цоДНК после операции отмечена связь со стадией заболевания (к 0,34, p=0,04; OR=5,4, 95% ДИ 1,01-28,5, p=0,05), параметром Т (к 0,4, p=0,014, OR=8,2, 95% ДИ 1,3-51,1, p=0,02). Не отмечено корреляции между наличием цоДНК после операции и параметром N (к 0,07, p=0,3), проведением неоадьювантной терапии (к 0,02, p=0,9; OR=1,1, 95% ДИ 0,3-4,6, p=0,9).

У 7 из 14 пациентов (50%) с наличием цоДНК и у 3 из 23 (13%) пациентов с отсутствием цоДНК после операции зарегистрировано прогрессирование заболевания (p=0,02), что сказалось на ВБПЗ (OR=2,9, 95% ДИ 1,01-8,5, p=0,04; рисунок 14), но не на показателе ОВ (OR=1,2, 95% ДИ 0,2-6,6, p=0,8; рисунок 15). 6-месячная ВБПЗ в группе наличия или отсутствия цоДНК после операции составила 66% и 91%, соответственно.

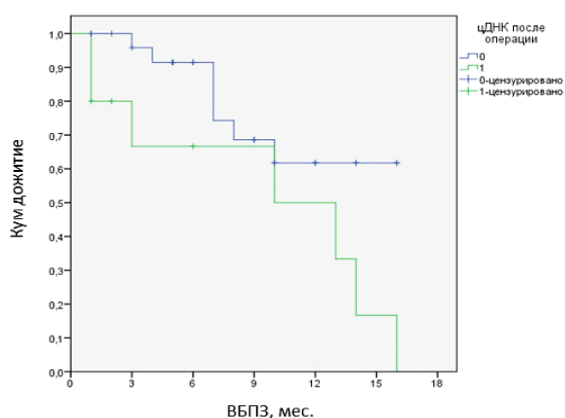


Рисунок 14 – ВБПЗ пациентов с резектабельным РПЖ при определении цоДНК после операции

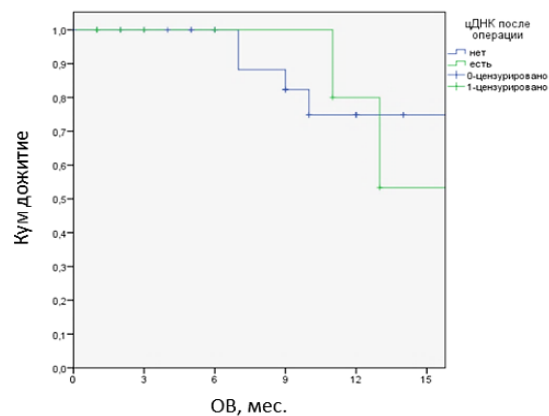


Рисунок 15 – ОВ пациентов с резектабельным РПЖ при определении цоДНК после операции

Наличие цоДНК после операции было связано с высокой частотой прогрессирования независимо от проведения адьювантной химиотерапии (Таблица 1).

Таблица 1 – Частота прогрессирования заболевания в зависимости от статуса цоДНК после операции и проведения адъювантной химиотерапии

Статус цоДНК после операции	Нет прогрессирования	Прогрессирование	Всего
Независимо от проведения адъювантной химиотерапии			
цоДНК-	20 (87%)	3 (13%)	23 (62,2%)
цоДНК+	7 (50%)	7 (50%)	14 (37,8%)
р	0,02		
Отсутствие адъювантной химиотерапии			
цоДНК-	5 (100%)	0	5 (62,5%)
цоДНК+	1 (33,3%)	2 (66,7%)	3 (37,5%)
р	0,1		
Адъювантная химиотерапия			
цоДНК-	15 (68,2%)	7 (31,8%)	22 (75,8%)
цоДНК+	2 (28,6%)	5 (71,4%)	7 (24,2%)
р	0,08		

Большинство пациентов в качестве адъювантной химиотерапии получали режим гемцитабин или гемцитабин в сочетании с капецитабином. В связи с этим обнаружение цоДНК в крови пациентов после операции может указывать на необходимость более активного наблюдения за данной группой пациентов, а также применения более интенсивных режимов химиотерапии.

ВЫВОДЫ

- 1) По результатам полноэкзомного секвенирования 20 генов гомологичной рекомбинации ДНК частота патогенных мутаций в российской популяции пациентов с РПЖ составила 12%. Чаще всего мутации встречались в генах *BRCA2* (3,2%), *ATM* (2,1%), *NBN/NBS1* (1,8%), *BRCA1* (1,6%) и *PALB2* (0,8%).
- 2) Применение препаратов платины в первой линии терапии пациентов с местно-распространенным и метастатическим РПЖ привело к увеличению ВБП (ОР=0,09, 95% ДИ 0,02-0,46, $p<0,01$) и ОБ (ОР=0,23, 95% ДИ 0,06-0,91, $p=0,04$) в группе пациентов с мутациями в генах *BRCA1/2* и *PALB2*. Мутации в других генах гомологичной рекомбинации не влияли на прогноз пациентов и эффективность

препаратов платины, в связи с чем их определение в рутинной практике нецелесообразно.

3) Только наличие в анамнезе пациента первично-множественных *BRCA*-ассоциированных опухолей явилось независимым предиктором наличия мутаций в генах *BRCA1/2* или *PALB2* ($OR=5,83$, 95% ДИ 2,16-15,73, $p<0,01$), однако, при их отсутствии доля пациентов с мутациями в данных генах составила 4,7%. Генетическое консультирование на предмет наличия мутаций в генах *BRCA1/2* или *PALB2* рекомендовано всем пациентам с РПЖ.

4) Чувствительность тест-системы по выявлению цоДНК при РПЖ различных стадий составила 64,4%. Концентрация цоДНК при наличии метастазов выше, чем при локальном процессе (2,31 против 0 копий/мкл, $p=0,005$).

5) Наиболее часто в цоДНК, выделенной из плазмы крови пациентов, определялись мутации в генах *TP53* (65,2%), *KRAS* (15,2%) и *CDKN2A* (13,0%).

6) Наличие цоДНК в плазме пациентов до операции не показало влияния на ВБПЗ ($OR\ 1,0$, $p=0,9$) и ОВ ($OR=0,02$, $p=0,4$). Определение цоДНК в крови пациентов после операции является негативным фактором прогрессирования заболевания независимо от проведения адъювантной химиотерапии ($OR=2,9$, 95% ДИ 1,01-8,5, $p=0,04$).

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Среди пациентов с распространенным РПЖ применение платиносодержащих схем химиотерапии в группе мутаций *BRCA1/2* и *PALB2* позволяет значимо увеличить как ВБП, так и ОВ.

2. Возраст и отягощенность анамнеза пациента по *BRCA*-ассоциированным злокачественным новообразованиям не позволяют выделить группу пациентов, которым определение мутаций в генах *BRCA1/2* и *PALB2* не показано. Генетическое консультирование на предмет наличия мутаций в генах *BRCA1/2* или *PALB2* рекомендовано всем пациентам с РПЖ.

3. Метод ПЦР позволяет выявить только 14,3% мутаций в генах *BRCA1/2* и *PALB2*, в связи с чем рекомендовано их секвенирование. Исследование других генов ГР ДНК нецелесообразно, так как они не оказывают влияния на прогноз заболевания.

4. В случае распространенного заболевания концентрация цоДНК в крови пациентов выше, чем при локальном процессе. Таким образом, концентрация цоДНК в плазме крови пациентов может указывать на распространенность процесса.

5. Наличие цоДНК в плазме крови пациентов после операции является фактором негативного прогноза независимо от проведения адъювантной химиотерапии. Определение цоДНК при резектабельном РПЖ позволит выделить группу пациентов, нуждающихся в проведении наиболее эффективных схем химиотерапии в неадъювантном и адъювантном режиме с возможным проведением лучевой терапии.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Базин, И.С. Место химиотерапии в лечении локализованного рака поджелудочной железы / И.С. Базин, И.А. Покатаев, **А.С. Попова**, И.В. Базина, Я.Е. Чихарева // Злокачественные опухоли. – 2016. – №4. Спецвыпуск 1. – С. 20-25.
2. **Попова, А.С.** Комбинированные режимы химиотерапии при раке поджелудочной железы / **А.С. Попова**, И.А. Покатаев, С.А. Тюляндин // Медицинский совет. – 2017. – №6. – С. 62-70.
3. Покатаев, И.А. Герминальные мутации в генах гомологичной рекомбинации в популяции пациентов раком поджелудочной железы: опыт одного центра / И.А. Покатаев, **А.С. Попова**, И.С. Абрамов, М.А. Емельянова, Т.В. Наседкина, Л.Н. Любченко, И.С. Базин, Е.В. Артамонова, М.Ю. Федянин, С.Ф. Меньшикова, С.А. Тюляндин // Злокачественные опухоли. – 2018. – Т. 8. – №. 3. – С. 5-12.
4. Покатаев, И.А. Эффективность и безопасность индукционной химиотерапии по схеме FOLFIRINOX при погранично резектабельном и нерезектабельном раке поджелудочной железы / И.А. Покатаев, И.С. Базин, **А.С. Попова**, Д.В. Подлужный, А.Г. Котельников, И.В. Сагайдак, Н.Е. Кудашкин, И.А. Файнштейн, Р.К. Валиев, А.В. Назаренко, С.Б. Алиева, М.Г. Абгарян, И.А. Гладилина, М.Ю. Федянин, О.В. Сехина, Д.А. Чекини, Х.Х. Эльснукаева, С.А. Тюляндин // Злокачественные опухоли. – 2018. – Т. 8. – №. 1. – С. 38-47.