

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

*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

**ДИССЕРТАЦИЯ**

на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

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

**МОСКВА – 2020 г.**

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....	13
1.1. Прогностическая и предиктивная значимость мутаций генов гомологичной рекомбинации ДНК при раке поджелудочной железы .....	13
1.1.1. Роль системы гомологичной рекомбинации ДНК при раке поджелудочной железы .....	13
1.1.2. Частота встречаемости герминальных и соматических мутаций в генах системы гомологичной рекомбинации ДНК при раке поджелудочной железы .	15
1.1.3. Риск возникновения рака поджелудочной железы при наличии мутаций в генах <i>BRCA1/2</i> .....	18
1.1.4. Прогностическая и предиктивная значимость мутаций .....	19
генов системы гомологичной рекомбинации ДНК при раке поджелудочной железы .....	19
1.1.4.1. Эффективность препаратов платины при наличии мутаций в генах системы гомологичной рекомбинации ДНК при раке поджелудочной железы .	20
1.1.4.2. Эффективность и показания к применению PARP-ингибиторов при <i>BRCA</i> -ассоциированном раке поджелудочной железы.....	24
1.1.5. Показания к генетическому консультированию больных раком поджелудочной железы .....	26
1.2. Роль циркулирующей опухолевой ДНК при раке поджелудочной железы .	29
1.2.1. Частота обнаружения циркулирующей опухолевой ДНК при раке поджелудочной железы .....	30
1.2.2. Проблема конкордантности мутаций в циркулирующей опухолевой ДНК и первичной опухоли .....	35
1.2.3. Прогностическая значимость циркулирующей опухолевой ДНК при раке поджелудочной железы .....	36
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ .....	42
2.1. Дизайн исследования .....	42
2.2. Конечные точки и оцениваемые показатели.....	43
2.2.1. Первичная конечная точка .....	43
2.2.2. Вторичные конечные точки .....	43
2.3. Формирование базы данных по пациентам, включенным в исследование ..	44

2.4. Определение мутационного статуса генов системы гомологичной рекомбинации ДНК с помощью высокопроизводительного секвенирования ....	44
2.4.1. Формирование коллекции морфологического материала для генетического анализа.....	44
2.4.2. Проведение высокопроизводительного секвенирования с целью выявления всех мутаций в анализируемых генах системы гомологичной рекомбинации ДНК.....	45
2.5. Мета-анализ исследований, посвященных прогностической значимости определения циркулирующей опухолевой ДНК в крови пациентов с раком поджелудочной железы .....	46
2.6. Определение циркулирующей опухолевой ДНК в образцах крови пациентов раком поджелудочной железы.....	47
2.6.1. Формирование коллекции образцов ДНК из опухолевых тканей и крови	47
2.6.2. Определение опухоль-специфических соматических мутаций в циркулирующей ДНК плазмы крови и парафиновых блоках с помощью капельной цифровой ПЦР и высокопроизводительного секвенирования.....	49
2.7. Статистический анализ данных.....	53
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ .....	55
3.1. Мутации в генах гомологичной рекомбинации ДНК в российской популяции пациентов с раком поджелудочной железы .....	55
3.1.1. Результаты полноэкзомного секвенирования генов системы гомологичной рекомбинации ДНК при раке поджелудочной железы .....	55
3.1.2. Прогностическая и предиктивная значимость мутаций генов гомологичной рекомбинации ДНК при раке поджелудочной железы.....	55
3.1.2.1. Влияние мутаций в генах гомологичной рекомбинации ДНК на прогноз пациентов при резектабельном раке поджелудочной железы .....	56
3.1.2.2. Влияние мутаций в генах гомологичной рекомбинации ДНК на прогноз пациентов при местно-распространенном и метастатическом раке поджелудочной железы .....	59
3.1.2.3. Влияние возраста пациента и отягощенного наследственного анамнеза на наличие мутаций в генах гомологичной рекомбинации ДНК .....	65
3.2. Значимость определения циркулирующей опухолевой ДНК в плазме крови пациентов с раком поджелудочной железы .....	69

3.2.1. Результаты мета-анализа исследований, посвященных прогностической значимости определения циркулирующей опухолевой ДНК в крови пациентов с раком поджелудочной железы.....	69
3.2.2. 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 .....	73
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ.....	79
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	89
ВЫВОДЫ .....	90
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	91
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	93
ПРИЛОЖЕНИЯ .....	113

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность темы исследования и степень ее проработанности

Рак поджелудочной железы (РПЖ) занимает значимое место в структуре смертности населения России от злокачественных новообразований. Количество российских пациентов с впервые выявленным диагнозом РПЖ в 2018 году составило 19165, при этом в структуре смертности от злокачественных новообразований удельный вес данного заболевания составил 6,3% [1]. Особенности клинического течения, а также отсутствие скрининговых тестов приводят к тому, что РПЖ диагностируется в резектабельной стадии менее чем в 20% случаев [132]. Но даже в случае оперативного лечения прогрессирование заболевания возникает в 25-37% случаев [25; 92]. Главной причиной этого является наличие микрометастазов, которые не могут быть определены традиционными методами лучевой диагностики [77].

Результаты многочисленных исследований II/III фаз показали, что РПЖ характеризуется относительно низкой чувствительностью к системной терапии. Наилучшие результаты лечения метастатического РПЖ были представлены в исследованиях ACCORD и MPACT, в которых пациенты в случае хорошего соматического статуса получали химиотерапию по схеме FOLFIRINOX или комбинацию гемцитабина с наб-паклитакселом (паклитаксел+[альбумин]), соответственно. Медиана общей выживаемости (ОВ) в первом случае составила 11,1 мес., во втором – 8,5 мес. [37; 148]. В связи с вышеперечисленными причинами 5-летняя выживаемость для всех стадий составляет всего 9% [128].

В последние годы все больший интерес уделяется поиску биомаркеров в попытке персонализировать и тем самым улучшить лечение и прогноз РПЖ. Единственный валидированный при этом заболевании опухолевой маркер СА 19-9 имеет ограниченную чувствительность (79%) и специфичность (82%): его уровень может быть повышен при доброкачественных образованиях поджелудочной железы и обструкции желчных путей [68]. Помимо этого у 5-10% пациентов уровень данного маркера может быть в норме в связи с недостаточной

экспрессией антигенов системы Льюиса [161]. В связи с этим СА 19-9 является дополнением к инвазивным методам диагностики и самостоятельно для мониторинга течения заболевания не применяется.

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 [149]. Одними из ключевых генов ГР ДНК являются *BRCA1* и *BRCA2*, значимость которых хорошо изучена при раке молочной железы (РМЖ) и раке яичников (РЯ). Наличие мутаций в генах *BRCA1/2* дает возможность применения препаратов платины и PARP-ингибиторов у этой категории пациентов [48], что привело к их активному изучению при *BRCA*-ассоциированном РПЖ. 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 [20; 56; 85; 153]. На данный момент согласно рекомендациям NCCN и ASCO генетическое тестирование рекомендовано всем пациентам РПЖ, в связи с тем, что ни возраст, ни отягощенность анамнеза по онкологическим заболеваниям не показали корреляции с выявлением мутаций в генах ГР при РПЖ. Однако данный подход ограничен возможностями проведения молекулярно-генетического тестирования. Было показано, что паттерн мутаций при РПЖ отличается от РМЖ и 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 [18; 59; 122]. 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 [82]. Помимо этого биопсийный образец не может полностью отразить молекулярные характеристики заболевания в связи с его гетерогенностью [39].

Известно, что при РПЖ превалируют активирующие мутации таких генов, как *KRAS* и *TP53* [159]. Появление новых методов генетической диагностики, а именно капельной цифровой полимеразной цепной реакции (кцПЦР) и секвенирования нового поколения (СНП), позволило с высокой точностью оценивать наличие мутаций в циркулирующей ДНК (цДНК) [76; 138; 159]. Однако, открытым остается вопрос насколько точно молекулярные изменения в цоДНК соответствует мутационному статусу первичной опухоли. Малочисленные исследования, посвященные конкордантности мутационного статуса опухолевого материала и цоДНК, показали разнородные результаты. Во многом это связано с методологическими причинами. Чувствительность и специфичность цоДНК по данным различных авторов составляет 0-47% [29; 90; 91; 144] при применении ПЦР и секвенирования, 43-78% [75; 121] при применении кцПЦР.

Доказательство корреляции ответа опухоли на лечение и изменения уровня цоДНК было продемонстрировано на примере таких заболеваний, как РМЖ [42; 115], рак легкого [14] и колоректальный рак [131; 141]. Прогностическая значимость цоДНК при РПЖ оценивалась, как правило, при распространенном процессе, и только в нескольких исследованиях – при резектабельном [65; 99; 107]. 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 [62]. Таким образом, определение цоДНК в крови пациентов в процессе динамического наблюдения может позволить оценить ответ опухоли на лечение. Обнаружение цоДНК в крови пациентов в послеоперационном периоде

может свидетельствовать о необходимости применения многокомпонентных схем химиотерапии в адъювантном режиме.

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 и разработки доступной информативной тест-системы. 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 гомологичной рекомбинации ДНК в российской популяции больных раком поджелудочной железы.
2. Изучить различия клинических характеристик и отдаленные результаты лечения больных раком поджелудочной железы в зависимости от мутационного статуса генов системы гомологичной рекомбинации ДНК.
3. Определить показания к генетическому тестированию пациентов на наличие мутаций в генах гомологичной рекомбинации ДНК.
4. Оценить чувствительность теста по выявлению циркулирующей опухолевой ДНК в плазме больных раком поджелудочной железы.



5. Определить частоту мутаций, встречаемых в циркулирующей опухолевой ДНК в крови больных раком поджелудочной железы, и зависимость уровня циркулирующей опухолевой ДНК от распространенности заболевания.

6. Оценить прогностическую значимость циркулирующей опухолевой ДНК у пациентов с резектабельным раком поджелудочной железы.

### **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 в определенной когорте пациентов прогноз заболевания, а также эффективность препаратов платины и PARP-ингибиторов могут быть обусловлены статусом генов ГР ДНК. Проведенное нами исследование является одним из крупнейших по количеству включенных пациентов и проанализированных генов ГР ДНК. Также впервые определена частота и структура мутаций в 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.

### **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, а именно *ATM*, *BARD1*, *BRIP1*, *FANCC*, *FANCF*, *FANCI*, *FANCG*, *FANCM*, *FANCL*, *MRE11*, *NBN (NBS1)*, *RAD50*, *RAD51C*, *RAD51D*, *RAD52*, *RBBP8*, *RINT1*, не продемонстрировали своей прогностической и предиктивной значимости. Молодой возраст пациента и наличие отягощенного 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. Однако, структура выявленных мутаций при РПЖ отличается от таковой при РМЖ и РЯ, таким образом, существующая на данный момент панель по определению наиболее часто встречающихся мутаций в генах *BRCA1/2* не позволяет выявить большинства патогенных мутаций при РПЖ. 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. ЦоДНК была обнаружена в образцах крови пациентов, взятых до операции в 40% случаев, но не показала своей прогностической значимости. 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.

### **Методы и методология и исследования**

Диссертационная работа состоит из двух частей. Первая часть посвящена 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 применения метода цоДНК в клинической практике. 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 Российской академии наук.

### **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 распространенного процесса. Наличие цоДНК после хирургического лечения является негативным фактором ВБПЗ, что

может указывать на необходимость применения в данной группе пациентов многокомпонентных схем адъювантной химиотерапии.

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

Большое число больных, включенных в исследование, применение современных методов молекулярной диагностики, оценки эффективности терапии и методов статистического анализа делают полученные результаты достоверными.

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

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

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

#### 1.1.1. Роль системы гомологичной рекомбинации ДНК при раке поджелудочной железы

Геном наиболее подвержен повреждению во время репликации в связи с тем, что однонитевые разрывы могут стать двунитевыми и привести к коллапсу репликативной вилки. Двунитевые разрывы ДНК (ДРД) могут возникать как в процессе репликации ДНК, так и при воздействии ионизирующего излучения или генотоксических соединений. В клетках млекопитающих ДРД восстанавливаются с помощью системы ГР или нехомологичного соединения концов ДНК. ГР восстанавливает ДРД в процессе S и G2 фаз клеточного цикла, когда неповрежденная сестринская хроматида может являться матрицей для восстановления. Стабильность генома обеспечивается за счет распознавания дефекта последовательности ДНК киназами ATM и ATR, молекулами преобразования сигнала CHK2 и BRCA1 и эффекторами инициации репарации BRCA2 и RAD51. Помимо этого в системе имеются координаторы, такие как PALB2 и BRIP1. Мутации генов, кодирующих перечисленные белки, могут стать причиной синдрома наследственного РМЖ и РЯ. Таким образом, считается, что именно ГР подавляет канцерогенез [118].

Наиболее изученными генами, участвующими в ГР, являются *BRCA1* (17q21) и *BRCA2* (13q12.3), открытые в середине 90-х годов XX века [95; 156]. *BRCA1*, протеин массой 220 кДа, имеет RING-домен на N-конце, связывающий BARD1, в комплексе с которым *BRCA1* проявляет убиквитин-лигазную активность в отношении белков, участвующих в репарации ДНК. На C-конце располагается BRCT-домен, который является местом связывания многочисленных протеинов, фосфорилированных белком ATM. *BRCA2* является большим протеином массой 385 кДа, состоящим из N-концевого домена, длинного экзона с RAD51-связывающим сайтом и ДНК-связывающего домена на

С-конце. PALB2 напрямую связывает белки BRCA1 и BRCA2, последний в свою очередь необходим для привлечения рекомбиназы RAD51 к месту двунитевого разрыва. Помимо ГР BRCA1 участвует в других механизмах репарации ДНК, таких как негомологичное соединение концов и отжиг одиночной цепи, а также в активации контрольных точек клеточного цикла [118].

На момент написания работы в базах данных внесена информация о более 2000 мутаций в генах *BRCA1/2*. Большинство патогенных мутаций *BRCA*, приводящих к дефициту ГР, относятся к мутациям сдвига рамки считывания или мутациям в сайтах сплайсинга. Наиболее распространенной мутацией гена *BRCA1* является 5382insC, появившаяся у общего предка, жившего в Европе 400-500 лет назад. Данная мутация была описана первой как мутация основателя в популяции евреев Ашкенази. Также к часто встречаемым в популяции патогенным мутациям основателя относят 185delAG, локализирующуюся во 2 экзоне *BRCA1*, и 6174delT в гене *BRCA2* [73]. Роль мутаций, приводящих к потере функции генов *BRCA1* и/или *BRCA2*, наиболее изучена при РМЖ и РЯ в связи с более высокой частотой их встречаемости при данных заболеваниях. Риск развития РМЖ и РЯ повышен в случае наличия патогенных мутаций в генах *BRCA1/2* [106]. Помимо этого инактивация указанных генов и последующее нарушение репарации ДНК в опухолевых клетках может влиять на их чувствительность к цитотоксическим агентам, повреждающим цепь ДНК, а также к PARP-ингибиторам [53; 88].

Полногеномное секвенирование 100 пациентов с РПЖ показало разнообразие структурных перестроек ДНК и позволило авторам выделить 4 молекулярных подтипа РПЖ. Одним из них является так называемый «нестабильный» подтип, характеризующийся дефектами поддержания стабильности ДНК, в том числе ГР, что также опосредует чувствительность таких опухолей к платиновым агентам [149].

### 1.1.2. Частота встречаемости герминальных и соматических мутаций в генах системы гомологичной рекомбинации ДНК при раке поджелудочной железы

До 10% случаев РПЖ относятся к семейным, что определяется как наличие у пациента двух и более родственников первого порядка или трех и более родственников любого порядка с диагнозом РПЖ. Риск возникновения РПЖ в течение жизни при наличии отягощенного семейного анамнеза по данному заболеванию возрастает в 2,3-32 раза в зависимости от количества пораженных родственников. Среди семейных случаев важную роль играют герминальные мутации в генах *BRCA1*, *BRCA2*, *PALB2*, *ATM* и системы репараций неспаренных оснований ДНК [116; 158], при этом частота герминальных мутаций в гене *BRCA2* может достигать 17% [162].

В последние годы возрос интерес к определению мутаций в генах ГР при РПЖ в попытке индивидуализировать лечение пациентов. Как видно из таблицы 1, при РПЖ наиболее часто встречаются мутации в гене *BRCA2* (от 1,5% до 17,9%). В гене *BRCA1* мутации встречаются реже – от 0,34% до 10,8%, еще реже в *PALB2*, *ATM*, *CHEK2* и других генах ГР. Такие различия в частоте встречаемости мутаций в генах ГР среди представленных работ можно объяснить несколькими причинами. Первые исследования включали евреев Ашкенази, среди которых отмечена наиболее высокая частота мутаций *BRCA1/2* [41; 87]. Помимо этого ранние исследования были сфокусированы на поиске определенных мутаций, в то время как в последних работах проводилось полноэкзомное секвенирование, позволяющее определить все мутации в гене, в том числе с неизвестной клинической значимостью. Также различия могут быть обусловлены методологическими причинами, в том числе применяемыми базами данных. В исследовании Taskeuchi и соавт. значимость обнаруженных 13 герминальных мутаций в генах *BRCA1/2* и *PALB2* оценивалась у 42 пациентов с РПЖ с помощью 3 предиктивных программ: PolyPhen-2, SIFT и ClinVar. Только 1 из 11 мутаций, обнаруженных в гене *BRCA2*, оказалась патогенной согласно ClinVar, 2 мутации были описаны авторами впервые [139]. По результатам СНП в образцах опухоли

171 пациентов, относящихся к греческой популяции, было показано, что патогенные мутации в генах ГР (*BRCA1*, *BRCA2*, *CHEK2*, *PALB2*, *NBN*, *BAP1*) встречаются в 13,5% случаев, при этом патогенные мутации в генах *BRCA1* и/или *BRCA2* обнаружены у 15 пациентов (8,8%). Однако, в данном исследовании не было найдено ни одной патогенной мутации в соответствующих образцах герминальной ДНК [157]. В других же исследованиях соматические мутации в генах *BRCA1/2* либо не были обнаружены, либо встречались в 1-2% случаев [35; 112; 139; 149].

**Таблица 1** – Частота встречаемости мутаций в генах ГР ДНК при РПЖ

Автор, год (n пациентов)	Материал, метод исследования	<i>BRCA1</i>	<i>BRCA2</i>	<i>PALB2</i>	<i>ATM</i>	<i>CHEK2</i>
Ferrone et al, 2009 (n=145, евреи Ашкенази) [49]	Ткань ПЦР	2 (1,3%)	6 (4,1%)	-	-	-
Lucas et al, 2013 (n=37, евреи Ашкенази) [87]	Ткань ПЦР	4 (10,8%)	4 (10,8%)	-	-	-
Waddell et al, 2015 (n=100) [149]	Ткань СНП	2 (2%)	7 (7%)	2 (2%)	-	-
Grant et al, 2015 (n=290) [61]	Кровь СНП	1 (0,3%)	2 (0,7%)	0 (0%)	3 (1%)	-
Holter et al, 2015 (n=306) [66]	Кровь Секвенирование по Сэнгеру, МАЛЗ	3 (1%)	11 (3,6%)	0/79 (0%)	-	-
Salo-Mullen et al, 2015 (n=159) [120]	Ткань, кровь СНП	4/151 (2,7%)	13/151 (8,6%)	1/48 (2,1%)	-	-
Raphael et al, 2017 (n=149) [112]	Ткань, кровь СНП	0 (0%)	6 (4%)	2 (1,3%)	3 (2%)	-
Blair et al, 2018 (n=658) [23]	Ткань СНП	4 (0,6%)	18 (2,7%)	-	-	-



## Продолжение таблицы 1

Dudley et al, 2018 (n=124) [46]	Нет данных СНП	2 (1,6%)	7 (5,7%)	2 (1,6%)	4 (3,2%)	-
Aguirre et al, 2018 (n=71) [16]	Ткань СНП	2 (2,8%)	3 (5,6%)	1 (1,4%)	3 (5,6%)	1 (1,4%)
Sehdev et al, 2018 (n=36) [125]	Ткань СНП	2 (5,5%)	2 (5,5%)	1 (2,8%)	-	0 (0%)
Kondo et al, 2018 (n=28) [78]	Ткань СНП	1 (3,6%)	5 (17,9%)	0 (0%)	4 (14,3%)	1 (3,6%)
Lowery et al, 2018 (n=615) [86]	Ткань, кровь СНП	15 (2,4%)	35 (5,7%)	1 (0,2%)	11 (1,8%)	12 (2%)
Singhi et al, 2019 (n=3594) [130]	Ткань СНП	62 (2%)	154 (4%)	-	124 (3%)	-
Goldstein et al, 2020 (n=133) [60]	Кровь СНП	2 (1,5%)	2 (1,5%)	1 (0,8%)	3 (2,3%)	4 (3%)

МАЛЗ – мультиплексная амплификация лигированных зондов, ПЦР – полимеразная цепная реакция, СНП – секвенирование нового поколения

Распространенность мутаций в генах ГР в российской популяции пациентов исследовалась только одним коллективом авторов [2; 3]. В первой работе с помощью аллель-специфической ПЦР оценивалось наличие наиболее часто встречаемой в российской популяции мутации *BRCA1* 5382insC и *BRCA2* 6174delT в периферической крови пациентов с РПЖ, проживающих в Санкт-Петербурге и Ленинградской области. У 2 из 150 пациентов выявлена мутация *BRCA1*. Ни один из 22 пациентов, обследованных на присутствие мутации *BRCA2* 6174delT, не являлся её носителем. Анализ полной нуклеотидной последовательности экзонов гена *BRCA2* у 8 больных выявил 1 случай патогенной мутации, при этом был обнаружен новый аллель – 5197\_5198delTC [3]. В дальнейшей работе с помощью ПЦР в режиме реального времени оценивалось наличие дефектов аллелей, характерных для восточно-европейской популяции в *BRCA1*, *BRCA2*, *PALB2*, *CHEK2*, *NBN/NBS1*, *BLM*. Было показано, что мутации в гене *CHEK2* выявлены в 5 из 176 образцов (*CHEK2* 1100delC – 1,

CHEK2<sup>vs2+1G>A</sup> – 1, CHEK2<sup>R145W</sup> – 2, CHEK2<sup>5395</sup> – 1), в аллеле *NBS1* 657del5 – в 2 из 174 образцов. Мутаций в генах *PALB2* и *BLM* не обнаружено [2]. Таким образом, применение ПЦР-диагностики не позволяет судить о паттерне мутаций генов ГР в российской популяции пациентов с РПЖ. Также в данных работах не оценивалась прогностическая значимость выявленных мутаций и эффективность препаратов платины.

### **1.1.3. Риск возникновения рака поджелудочной железы при наличии мутаций в генах *BRCA1/2***

В нескольких исследованиях было показано, что риск развития РПЖ значимо увеличен среди носителей мутаций *BRCA1* (отношение рисков (ОР)=2,26, 95% доверительный интервал (95% ДИ) 1,26-4,06,  $p=0,004$ ) и *BRCA2* (ОР=3,51, 95% ДИ 1,87-6,58,  $p=0,0012$ ) [24; 140]. Risch и соавт. оценивали частоту мутаций в генах *BRCA1/2* среди 977 пациентов с РЯ, а также риск развития различных злокачественных образований в случае носительства мутации. При наличии мутации в *BRCA1* и *BRCA2* ОР для РПЖ составили 3,1 (95% ДИ 0,45-21) и 6,6 (95% ДИ 1,9-23), соответственно [114]. В крупном проспективном исследовании, включившем 5149 носителей мутации *BRCA1/2*, стандартизированное отношение заболеваемости РПЖ в случае мутаций *BRCA1* и *BRCA2* составило 2,55 (95% ДИ 1,03–5,31,  $p=0,04$ ) и 2,13 (95% ДИ 0,36–7,03,  $p=0,3$ ), соответственно [70]. Анализ родственников первой и второй степеней родства носителей мутации показал, что риск развития РПЖ выше в случае наличия в семье мутации гена *BRCA2*, а не *BRCA1* [133]. Также в ретроспективном исследовании Roch и соавт. было показано, что частота выявления образований поджелудочной железы выше среди пациентов с мутациями *BRCA2*, чем в общей популяции ( $n=47$ , 21% против 8%,  $p=0,0007$ ), независимо от семейного анамнеза [117]. Помимо этого было показано, что частота РПЖ в случае наличия мутации *BRCA2* значимо выше, чем в общей популяции, независимо от пола пациента (мужчины: скорректированное отношение заболеваемости (COЗ) 82,559; 95% ДИ 39,524-151,84;  $p<0,001$ ; женщины: COЗ 13,809; 95% ДИ 6,301-26,216;  $p<0,001$ ) [94].

### 1.1.4. Прогностическая и предиктивная значимость мутаций генов системы гомологичной рекомбинации ДНК при раке поджелудочной железы

Клиническая значимость мутаций генов *BRCA1/2* при РПЖ до сих пор четко не определена в связи с низкой частотой их встречаемости и разнородностью исследований. В исследовании Reiss и соавт. ОВ пациентов в случае наличия мутаций в генах *BRCA1*, *BRCA2* и *PALB2* или их отсутствия составила 21,8 мес. и 8,1 мес., соответственно (OR=0,35, 95% ДИ 0,2-0,62,  $p<0,001$ ) [113]. В исследовании Goldstein и соавт. пациенты с мутациями в генах репарации ДНК (*ATM*, *BRCA1/2*, *CDKN2A*, *CHEK2*, *ERCC4*, *PALB2*,  $n=15$ ) имели лучшую ОВ по сравнению с пациентами без мутаций (16,8 мес. против 9,1 мес.,  $p=0,03$ ) [60]. Однако, в другом крупном исследовании прогноз пациентов при наличии мутаций в *BRCA1/2* оказался хуже, чем при диком типе генов [23] (таблица 2).

**Таблица 2** – Прогностическая значимость мутаций в генах ГР при РПЖ

Автор, год (n пациентов)	Стадия заболевания	Медиана возраста (наличие мутации против ее отсутствия)	Медиана ВБП (наличие мутации против ее отсутствия)	Медиана ОВ (наличие мутации против ее отсутствия)
Ferrone et al, 2009 (n=145) [49]	I-IV	66 лет против 73 лет ( $p=0,6$ )	-	6 мес. против 16 мес. ( $p=0,35$ )
Blair et al, 2017 (n=658) [23]	I-III	-	8,4 мес. против 16,7 мес. ( $p<0,001$ )	20,2 мес. против 27,8 мес. ( $p=0,034$ )
Golan et al, 2017 (n=25) [55]	I-II	55,7 лет против 57,7 лет ( $p=0,4$ )	14,3 мес. против 12,0 мес. ( $p=0,303$ )	37,1 мес. против 38,8 мес. ( $p=0,838$ )
Reiss et al, 2018 (n=29) [113]	III-IV	-	-	21,8 мес. против 8,1 мес. (OR=0,35, 95% ДИ 0,2-0,62, $p<0,001$ )

## Продолжение таблицы 2

Sehdev et al, 2018 (n=36) [125]	IV	64,6 лет против 66 лет (p=0,002)	-	14 мес. против 5 мес. (OR=0,58; 95% ДИ 0,29-1,14, p=0,08)
Kondo et al, 2018 (n=28) [78]	I-IV	-	20,8 мес. против 1,7 мес. (p=0,049)	-
Lowery et al, 2018 (n=615) [86]	I-IV	-	-	53,3 мес. против 48,4 мес. (p=0,47)
Wattenberg et al, 2019 (n=26) [153]	III-IV	-	10,1 мес. против 6,9 мес. (OR=0,43; 95% ДИ 0,25-0,74, p=0,0068)	24,6 мес. против 18,8 мес. (p=0,0467)

95% ДИ – 95% доверительный интервал, ВВП – выживаемость без прогрессирования, ОВ – общая выживаемость, ОР – отношение рисков

Разнородность представленных результатов связана с различиями в размере и клинической характеристике выборок, методах и интерпретации клинической значимости обнаруженных мутаций. К примеру, в исследовании Ferrone и соавт. оценивалась прогностическая значимость трех мутаций основателя при РПЖ среди популяции евреев Ашкенази [49]. Также в исследовании Golan и соавт. 76% пациентов относились к данной популяции [55]. Как было сказано ранее, усовершенствование методов диагностики и применение СНП повысило частоту обнаружения мутаций в генах ГР. Помимо этого важную роль играет проведенное лечение, так как на примере РМЖ и РЯ было показано, что опухоли с дефицитом ГР более чувствительны к препаратам платины и PARP-ингибиторам. Это привело к изучению данных групп препаратов при *BRCA*-ассоциированном РПЖ.

#### **1.1.4.1. Эффективность препаратов платины при наличии мутаций в генах системы гомологичной рекомбинации ДНК при раке поджелудочной железы**

В доклинических исследованиях ксенографты РПЖ с мутациями *BRCA1/2* оказались более чувствительны к цисплатину в сравнении с ксенографтами с

диким типом генов [84]. В исследованиях на людях среди 5 пациентов с «нестабильным» геномом и/или наличием мутаций *BRCA1/2*, получавших гемцитабин и цисплатин, у двух пациентов был продемонстрирован полный ответ опухоли и у еще двух – частичный ответ согласно критериям RECIST 1.1. Эти результаты были подтверждены на ксенографтах, полученных из опухоли данных пациентов ( $p=0,007$ ) [149]. В другом исследовании были разработаны ксенотрансплантаты метастатических очагов пациентов с герминальными мутациями в генах *BRCA1/2* до начала лечения и в момент прогрессирования. Только ксенографт с дефицитом ГР от пациента, не получавшего ранее препараты платины и PARP-ингибиторы, был чувствителен к данным препаратам [58].

В работе Ferrone и соавт. проведен анализ трех мутаций основателя среди 145 пациентов с резектабельным РПЖ. Когорта пациентов относилась к популяции евреев Ашкенази, среди которых 5,5% являлись носителями мутации *BRCA1/2*. Значимой разницы в ОБ при наличии мутации или при диком типе генов найдено не было (6 мес. против 16 мес.,  $p=0,35$ ). Однако, результаты данного исследования тяжело интерпретировать, в связи с тем, что адъювантную химиотерапию и лучевую терапию получили только 40% и 28% пациентов, соответственно [49]. В другом многоцентровом ретроспективном исследовании большую часть пациентов составили евреи Ашкенази, при этом 32,7% случаев относились к семейным формам заболевания. Статистически значимой разницы в ОБ между пациентами с мутацией *BRCA1* или *BRCA2* не обнаружено. Медиана ОБ пациентов с III-IV стадиями заболевания, получавших режим с включением препаратов платины, оказалась значимо выше по сравнению с пациентами, получавшими бесплатиновые режимы: 22 мес. против 9 мес., соответственно ( $p=0,039$ ) [56]. Для резектабельных стадий данной закономерности обнаружено не было, однако отмечалась тенденция к лучшей медиане ВБПЗ при наличии мутации *BRCA1/2* (39,1 мес. против 12,4 мес,  $p=0,255$ ) [55].

В исследовании Lowery и соавт., включившем 15 пациентов с герминальными мутациями *BRCA1/2*, было показано, что применение платиносодержащих схем в первой линии терапии привело к полному или

частичному ответу опухоли в 83% случаев [85]. Этот показатель оказался намного выше, чем в исследовании ACCORD, опубликованном в том же году, где частота объективных эффектов (ЧОЭ) среди пациентов, получавших режим FOLFIRINOX, составила 31,6% [37]. В другом исследовании было показано, что пациенты (n=20), получавшие препараты платины в любую из линий паллиативной химиотерапии, имели медиану ОБ 15,3 мес. и 2-летнюю выживаемость 35%. Пациенты (n=13), получавшие другие препараты, имели медиану ОБ 8,3 мес. и 2-летнюю ОБ 0% [20]. Wattenberg с соавт. отметили более высокую ЧОЭ (58% против 21%) и медиану ВБП (10,1 мес. против 6,9 мес.) среди пациентов с герминальными мутациями *BRCA1/2* по сравнению с пациентами с диким типом генов. Пациенты с *BRCA*-ассоциированным РПЖ имели больший выигрыш от применения платины в первой линии химиотерапии по сравнению со второй линией (ЧОЭ 68% против 20%,  $p=0,0507$ ). Значимого различия в ЧОЭ и ВБП между *mBRCA* и контрольной группами не было отмечено при применении платины во второй и более линиях химиотерапии. Пять пациентов с мутациями (21%) имели прогрессирование на фоне лечения препаратами платины, трое из них получали препараты платины во второй и более линиях химиотерапии [153]. Схожие данные были получены в исследовании POLO, где прогрессирование на платиносодержащей химиотерапии имели 21,7% пациентов с герминальными мутациями *BRCA1/2* [54].

В ретроспективном исследовании Blair и соавт., включившем 658 случаев спорадического резектабельного РПЖ, мутации *BRCA1/2* были выявлены в 3% случаев. Значимых различий в клинических характеристиках пациентов с мутациями в генах ГР и с диким типом генов найдено не было. Наличие мутации *BRCA1/2* было ассоциировано с меньшей медианой ОБ (20,2 мес. против 27,8 мес.,  $p=0,034$ ) и ВБП (8,4 мес. против 16,7 мес.,  $p<0,001$ ) по сравнению с соответствующим контролем дикого типа генов, но в то же время платиносодержащая адъювантная химиотерапия значительно улучшала выживаемость пациентов с мутациями по сравнению с альтернативными режимами химиотерапии или ее отсутствием (31,0 мес. против 17,7 против 9,3

мес.,  $p < 0,001$ ) [23]. Двадцать девять пациентов с герминальными мутациями в *BRCA1*, *BRCA2* и *PALB2* и диагнозом РПЖ III-IV стадии сравнивались в соотношении 2:1 с пациентами с диким типом генов и нетестированными пациентами. В случае получения препаратов платины 1-летняя выживаемость пациентов с мутациями составила 94% по сравнению с 60% в контрольной группе [113].

В 10-20% случаев РПЖ имеется дефицит ГР в отсутствие мутаций в *BRCA1/2* (BRCAness). Данный фенотип может быть обусловлен наличием соматических мутаций в *BRCA1/2*, мутаций в других генах системы репарации повреждений ДНК, таких как *ATM*, *ATR*, *CHEK1*, *CHEK2*, *DSS1*, *RAD51*, *NBS1*, а также гиперметилованием промоторов с последующим эпигенетическим сайленсингом *BRCA1/2* [64]. Такие опухоли также могут быть чувствительны к препаратам платины и PARP-ингибиторам [93; 149]. Поэтому в некоторых исследованиях эффективность препаратов платины оценивалась не только относительно мутаций в генах *BRCA1/2*, но и учитывались другие гены ГР. Так, в работе Sehdev и соавт. 36 пациентов, прооперированных по поводу РПЖ, получили в первой линии химиотерапии режим FOLFIRINOX. Медиана ОВ оказалась выше у пациентов с герминальными и соматическими мутациями в генах репарации повреждений ДНК по сравнению с диким типом генов (14 мес. против 5 мес.), хотя статистической значимости достигнуто не было (ОР 0,58;  $p = 0,08$ ). Однако, многофакторная регрессионная модель Кокса показала значимое улучшение ОВ у пациентов с мутациями (скорректированное ОР=0,37, 95% ДИ 0,15-0,94,  $p = 0,04$ ) [125]. В японском исследовании оценивался вклад BRCAness у 17 больных РПЖ, получавших оксалиплатин-содержащую терапию. Медиана времени до констатации отсутствия эффекта терапии составила 294 и 52 дня в группе BRCAness и группе без BRCAness, соответственно ( $p = 0,027$ ) [79]. Та же группа исследователей показала более высокую выживаемость при применении оксалиплатина среди пациентов с мутациями в генах ГР (20,8 мес. против 1,7 мес.,  $p = 0,049$ ) [78].

Интересные результаты были получены в исследовании Fogelman и соавт., в котором оценивалась ОВ 549 пациентов с метастатическим РПЖ и неизвестным статусом генов *BRCA1/2*. У 36% пациентов семейный анамнез был отягощен по РПЖ, РМЖ или РЯ. Пациенты без отягощенного анамнеза имели худшую ОВ при получении препаратов платины в первой линии терапии, чем пациенты, которые их не получали (7,3 мес. против 8,4 мес.,  $p=0,005$ ), в то время как ОВ пациентов, имевших 3 и более родственников, страдающих *BRCA*-ассоциированным раком, и получавших в первой или второй линии химиотерапии препараты платины составила 21,7 мес. ( $p=0,004$ ) [50].

К минусам приведенных исследований можно отнести ретроспективную природу большинства из них и разнородность выборок. Причины, по которым пациенты с герминальными мутациями не получали препараты платины, не указывались, хотя противопоказаниями к назначению комбинированных схем лечения могут быть неудовлетворительный соматический статус пациента, наличие сопутствующих заболеваний, таких как почечная недостаточность, полинейропатия. Помимо этого многие пациенты, включенные в данные работы, получали лечение до публикации результатов исследования ACCORD. Таким образом, для определения показаний к применению препаратов платины при РПЖ требуются дальнейшие исследования на больших выборках пациентов.

#### **1.1.4.2. Эффективность и показания к применению PARP-ингибиторов при *BRCA*-ассоциированном раке поджелудочной железы**

Для репарации одонитевых разрывов ДНК необходимы ферменты семейства поли(АДФ-рибоза)-полимераз (PARP), которые обеспечивают доступ ферментам базовой эксцизионной репарации к месту разрыва. При ингибировании PARP и дефиците системы ГР в делящихся клетках возникают двунитевые разрывы ДНК. Таким образом, PARP-ингибиторы вызывают накопление повреждений в ДНК и, как следствие, смерть клетки.

В одном из первых исследований 2 фазы 23 пациента с герминальными мутациями в генах *BRCA1/2* получали олапариб после терапии гемцитабином.



ЧОЭ составила 21,7% независимо от применения препаратов платины, при этом стабилизация заболевания, длящаяся более 8 недель, была отмечена в 34,8% случаев [74]. В рандомизированном исследовании 3 фазы POLO оценивался олапариб в качестве поддерживающей терапии у пациентов с метастатическим РПЖ и герминальными мутациями *BRCA1/2* после успешной терапии препаратами платины. Медиана ВБП значимо выше в группе олапариба, чем в группе плацебо: 7,4 мес. против 3,8 мес., соответственно (ОР=0,53, 95% ДИ 0,35-0,82,  $p=0,004$ ), как и ЧОЭ (23,1% против 11,5%, ОР=2,3, 95% ДИ 0,89-6,76). Однако, не было отмечено значимых различий в ОБ. Данное исследование впервые показало эффективность таргетной терапии в отобранной популяции пациентов РПЖ [54]. В настоящее время идет набор в исследование 2 фазы эффективности олапариба при *BRCAness* фенотипе [57].

Исследование 2 фазы применения другого PARP-ингибитора рукапариба включило 19 пациентов с *BRCA*-ассоциированным местно-распространенным или метастатическим РПЖ, получавших одну или две линии химиотерапии. У 16 из 19 пациентов мутации в генах *BRCA1/2* являлись герминальными, у 3 – соматическими, при этом превалировали мутации *BRCA2* (78,9%). Исследование не достигло первичной конечной точки: уровень контроля болезни (частичный ответ или стабилизация длительностью 12 недель и более) составил 31,6%, ЧОЭ – 15,8% (95% ДИ 3,4-39,6%) [127]. В исследовании 2 фазы оценивается роль поддерживающей терапии рукапарибом при распространенном РПЖ с мутациями в генах *BRCA1*, *BRCA2*, *PALB2*, с отсутствием прогрессирования как минимум в течение 16 недель после платино-содержащей терапии. Согласно ранним результатам медиана ВБП составила 9 мес., а ЧОЭ – 37% [7].

При применении велипариба у пациентов с РПЖ III-IV стадии с мутациями в *BRCA1/2* или *PALB2* медиана ВБП составила 1,7 мес. (95% ДИ 1,57-1,83), ОБ – 3,1 мес. (95% ДИ 1,9-4,1). У 25% пациентов отмечена стабилизация заболевания продолжительностью более 4 мес. [86]. Добавление велипариба к гемцитабину и цисплатину в исследовании 2 фазы не привело к улучшению результатов лечения пациентов с герминальными мутациями *BRCA1/2* и *PALB2*. Однако, ЧОЭ в группе

пациентов, получавших гемцитабин с цисплатином, составила 65,2%, медианы ВБП и ОВ – 9,7 мес. (95% ДИ 4,2-13,6) и 16,4 мес. (95% ДИ 11,7-23,4), соответственно [101].

Таким образом, имеющиеся данные поддерживают применение платиносодержащей химиотерапии в первой линии у пациентов с *BRCA*-ассоциированным РПЖ, а при условии улучшения ОВ – последующую поддерживающую терапию PARP-ингибиторами, что дает по крайней мере 4 месяца стабилизации или ответа на лечение. Однако, как отмечено Wattenberg с соавт., более 40% пациентов с мутациями *BRCA1/2* не отвечают на платиновые агенты и до 20% имеют прогрессирование заболевания даже в первой линии терапии [153]. Очевидно, данная подгруппа опухолей с мутациями *BRCA1/2* не представляет типичный фенотип дефицита системы ГР.

Известно несколько механизмов приобретенной резистентности опухолевых клеток к препаратам платины, включая возникновение вторичных мутаций *BRCA1/2*, приводящие к восстановлению рамки считывания и экспрессии белков BRCA1 и BRCA2 [119; 136]. Проводимые исследования оценивают эффективность комбинации препаратов платины и PARP-ингибиторов, что может помочь преодолеть первичную резистентность у некоторых рефрактерных пациентов [100]. Также в настоящий момент ведутся исследования совместного применения PARP-ингибиторов с иммунотерапией и таргетными препаратами [64].

### **1.1.5. Показания к генетическому консультированию больных раком поджелудочной железы**

Исторически пациенты с РПЖ редко направлялись на консультацию генетика, в связи с дороговизной генетического анализа, отсутствием оптимальных тест-систем и четких рекомендаций по отбору кандидатов для генетического тестирования. К примеру, молодой возраст пациента не оказался признаком наличия мутации *BRCA1/2* (таблица 2). Среди популяции евреев Ашкенази медиана возраста пациентов при наличии мутации *BRCA1/2* составила

63,8 года, в то время как при диком типе генов – 70,0 лет ( $p=0,15$ ) [87]. В исследовании Salomullen и соавт. было показано, что ни один из пациентов с мутацией *BRCA2* не был моложе 50 лет [120].

Согласно рекомендациям NCCN прошлых лет тестирование генов *BRCA1/2* предлагалось проводить у пациентов с РПЖ при наличии 1 и более близких родственников, больных РЯ в любом возрасте или РМЖ в возрасте моложе 50 лет, либо при наличии 2 родственников с диагнозом РМЖ, РПЖ и рака предстательной железы (РПрЖ) в любом возрасте. Также определение мутаций *BRCA1/2* было показано всем евреям Ашкенази с диагнозом РПЖ. Однако, количество пациентов с патогенными герминальными мутациями, не имеющих отягощенного семейного анамнеза, оказалось выше ожидаемого [49; 78; 126; 143]. Среди 105 пациентов, относящихся к популяции евреев Ашкенази, 8 имели родственника первой степени родства с диагнозом РПЖ, при этом ни в одном из случаев не была найдена мутация основателя в генах *BRCA1/2*. В 34% случаев у родственника первой степени родства имелось *BRCA*-ассоциированное заболевание, чаще всего встречался РМЖ. Только в 5,6% (2 из 36) из этих случаев наблюдалась мутация основателя [49]. Анализ 32 генов предрасположенности к РПЖ (*BRCA2*, *ATM*, *CDKN2A*, *PALB2*, *MLH1*, *BRCA1* и *TP53*) показал, что только 15% носителей мутаций имели анамнез, указывающий на семейный синдром. Девять процентов (3 из 33) пациентов с герминальными мутациями имели семейный анамнез, отягощенный по РПЖ. Среди 33 пациентов у 18 был родственник первой или второй степени родства с диагнозом РМЖ, у 6 – с диагнозом РПрЖ, у 3 – с диагнозом РЯ. При этом, среди 818 пациентов с диким типом генов у 117 (14,3%) семейный анамнез был отягощен по РПЖ. Возраст пациентов с диагнозом РПЖ и наличием мутаций в генах предрасположенности к РПЖ составил  $60,8 \pm 10,6$  лет, что статистически значимо ниже, чем при отсутствии мутации –  $65,1 \pm 10,1$  лет ( $p=0,03$ ) [126]. Только в 20% случаев *BRCA*-ассоциированного РПЖ семейный анамнез был отягощен по данному заболеванию [143]. В другом исследовании среди пациентов с 3 и более родственниками с *BRCA*-ассоциированным раком наблюдалась тенденция к

наличию мутации (OR=4,53, 95% ДИ 0,86-23,85,  $p=0,08$ ) [60]. Также было показано, что наличие первично-множественных злокачественных опухолей не влияет на мутационный статус ( $p=0,06$ ) [113].

В нескольких исследованиях оценивались эффективность имевшихся на тот момент клинических рекомендаций по отбору пациентов для генетического тестирования. Например, в своем исследовании Holter с соавт. показали, что 57% пациентов не подходили под критерии генетического тестирования NCCN 2014 года, 64% не подходили под критерии Ontario MOHLTC (принадлежность к популяции евреев Ашкенази, диагноз РМЖ в возрасте моложе 35 лет, диагноз РЯ, наличие родственника с диагнозом РМЖ в возрасте моложе 60 лет и РЯ) [66]. В исследовании Lowery и соавт. 41,8% пациентов с патогенными герминальными мутациями не подходили под критерии генетического тестирования NCCN 2018 года. Семейный анамнез РПЖ не являлся предиктором наличия мутации *BRCA1/2*, а также ни один из носителей мутации не подходил под критерий синдрома семейного РПЖ [86].

К проблемам генетического тестирования следует отнести малую доступность его проведения и низкую приверженность пациентов полученным рекомендациям. Так, из 113 пациентов (28,3%), соответствующих критериям генетической диагностики EUROPAC, 8,8% пациентов были направлены в регионарный генетический центр для генетического тестирования, но только 4 из 10 пациентов действительно получили консультацию генетика. В 53,1% случаев ( $n=113$ ) пациенты подходили под критерии *BRCA*-тестирования. В 66 из 400 (16,5%) историй болезни не было данных о семейном анамнезе. Из всей популяции пациентов ( $n=400$ ) в данном исследовании герминальные мутации *BRCA2* были найдены только в 0,75% случаев [51]. Также нужно отметить, что недостатком всех исследований является тот факт, что оценка семейного анамнеза происходит на основании данных, предоставленных самим пациентом. Зачастую пациенты не могут достоверно указать наличие онкологического заболевания у родственников и в случае его наличия локализацию и возраст возникновения. Исследования, изучавшие точность семейного анамнеза, доложенного пациентом,

показали, что локализация процесса правильно указана в 78-95% случаев для родственников первой степени родства и в еще меньшем проценте для родственников второй степени родства – 53-67%, при этом чаще пациенты предоставляют недостаточное, чем избыточное, количество информации [89; 102; 160].

С появлением мультигенных панелей появилась возможность анализа всех генов, ассоциированных с РПЖ, что увеличило распространенность генетического тестирования. В связи с представленными выше данными в настоящее время NCCN рекомендует генетическое консультирование и рассмотрение тестирования для всех пациентов с диагнозом РПЖ [11]. Однако, данные рекомендации следует адаптировать для применения в России в связи с отсутствием данных о структуре мутаций ГР и их связи с отягощенностью семейного анамнеза в российской популяции пациентов РПЖ.

## **1.2. Роль циркулирующей опухолевой ДНК при раке поджелудочной железы**

В 1983 году Shapiro и соавт. впервые описали наличие опухолевой ДНК в крови пациентов с РПЖ. Радиоиммунологический анализ продемонстрировал, что концентрация ДНК значительно увеличена в сыворотке пациентов с РПЖ по сравнению с контрольной группой [163]. Vasioukhin и соавт. удалось успешно определить точковые мутации в гене *KRAS* в ДНК плазмы пациентов колоректальным раком, при этом мутации в ДНК плазмы соответствовали мутациям в ДНК опухоли [147]. В дальнейшем мутации в гене *KRAS* были обнаружены с помощью ПЦР в плазме и сыворотке пациентов с РПЖ [164; 165]. Последующие многочисленные исследования показали потенциальную клиническую значимость «жидкостной биопсии», что привело к активному изучению данного метода при множестве злокачественных новообразований [61].

На данный момент известно, что цоДНК составляет до 1% всей циркулирующей свободной ДНК и появляется в системном кровотоке при некрозе и апоптозе как клеток первичной опухоли и метастазов, так и циркулирующих опухолевых клеток (ЦОК) [45]. ЦоДНК отличается от остальной

цДНК размером фрагментов (размер цоДНК, выделяемой при некрозе опухолевых тканей, составляет около 10000 п.н., при апоптозе – 180-1000 п.н.) и вариантами генетических нарушений [97; 98]. Пациенты с онкологическими заболеваниями имеют более высокую концентрацию цоДНК в крови, чем здоровые люди, однако концентрация цоДНК среди пациентов может сильно различаться [67]. Уникальность данного подхода заключается в возможности неинвазивно диагностировать заболевание, а также в возможности оценивать молекулярные изменения, происходящие в опухоли в процессе лечения.

### **1.2.1. Частота обнаружения циркулирующей опухолевой ДНК при раке поджелудочной железы**

Секвенирование 596 образцов РПЖ в рамках проекта International Cancer Genome Consortium показало, что в 534 (90%) из них была определена как минимум одна мутация *KRAS*: 83%, 5,5% и 1,5% в кодонах 12, 61 и 13, соответственно. Наиболее частыми заменами в 12 кодоне являются G12D (51%), G12V (30%) и G12R (12%). Считается, что мутации в гене *KRAS* являются ранним событием в процессе канцерогенеза, так как встречаются в 90% случаев интраэпителиальной неоплазии поджелудочной железы [26]. В связи с высокой частотой мутаций *KRAS* при РПЖ большинство исследований посвящено определению именно этого гена в цоДНК.

В ранних исследованиях основным методом определения цоДНК являлась полимеразная цепная реакция – полиморфизм длин рестрикционных фрагментов (ПЦР-ПДРФ), с помощью которой *mKRAS* цоДНК определялась в 0-35% случаев [29; 91; 144]. Такая частота определения цоДНК в крови пациентов РПЖ связана с низкой чувствительностью метода, поскольку на него влияет количество нормальной ДНК. Разработка и применение более чувствительных методов исследования, таких как кцПЦР и СНП, позволило повысить частоту обнаружения цоДНК и оценивать ее клиническую значимость (таблица 3).

**Таблица 3** – Частота обнаружения цоДНК в крови пациентов РПЖ по данным мировой литературы

Автор, год (n пациентов)	Стадия заболевания	Метод исследования	цоДНК+
Castells et al, 1999 (n=44) [29]	I/II – 15, III/IV – 28, НД – 1	12 кодон <i>KRAS</i> ПЦР-ПДРФ	12 (27%)
Maire et al, 2002 (n=47) [90]	I – 5, II-III – 19, IV – 23	G12D <i>KRAS</i> ПЦР	22 (47%)
Uemura et al, 2004 (n=28) [144]	I-II – 10, III-IV – 18	<i>KRAS</i> ПЦР-ПДРФ	9/26 (35%)
Marchese et al, 2006 (n=30) [91]	I-IIA – 9, IIB-IV – 21	12 кодон <i>KRAS</i> ПЦР-ПДРФ	0 (0%)
Dabritz et al, 2009 (n=56) [40]	P – 25, MP и M – 23, НД – 8	12 кодон <i>KRAS</i> ПЦР с обратной транскрипцией	20 (36%)
Chen et al, 2010 (n=91) [30]	III – 29, IV – 62	12 кодон <i>KRAS</i> ПЦР	30 (33%)
Bettegowda et al, 2014 (n=155) [22]	I-III	<i>KRAS</i> ПЦР	72 (48%)
Infante et al, 2014 (n=160) [69]	IV	12 кодон <i>KRAS</i> BEAMing цПЦР	103/143 (72%)
Earl et al, 2015 (n=45) [47]	P – 10, MP – 8, M – 13	12 кодон <i>KRAS</i> кцПЦР	8/31 (26%)
Kinugasa et al, 2015 (n=75) [76]	I-II – 2, III-IV – 73	12 кодон <i>KRAS</i> кцПЦР	47 (62,7%)
Sausen et al, 2015 (n=51) [121]	II	<i>KRAS, BRAP, PIK3CA</i> кцПЦР	22 (43%)
Singh et al, 2015 (n=110) [129]	I-IV	12 кодон <i>KRAS</i> Вложенная ПЦР	34 (30,9%)
Takai et al, 2015 (n=259) [137]	I-IV	60-генная панель кцПЦР, СНП	I-III – 8/44 (18,2%) IV – 63/107 (58,9%)
Zill et al, 2015 (n=26) [159]	III – 3, IV – 23	54-генная панель СНП (Illumina Hi-Seq 2500)	22 (85%)

Brychta et al, 2016 (n=50) [27]	I/II – 41, III/IV – 9	12 кодон <i>KRAS</i> цПЦР	13/45 (29%)
Calvez-Kelm et al, 2016 (n=437) [28]	P – 39, MP – 143, M – 135, HD – 120	12, 13, 61 кодоны <i>KRAS</i> СНП	92 (21,1%)
Hadano et al, 2016 (n=105) [65]	I/II – 84, III/IV – 21	12 кодон <i>KRAS</i> кцПЦР	33 (31%)
Tjensvoll et al, 2016 (n=14) [142]	MP – 2, M – 12	12 кодон <i>KRAS</i> ПЦР с ПНК-зондами	10 (71%)
Adamo et al, 2017 (n=26) [15]	P – 6, MP – 5, M – 15	<i>KRAS</i> СНП, кцПЦР	P – 1/6 (16,7%), MP и M – 6/15 (40%)
Ako et al, 2017 (n=40) [17]	I-IV	12 кодон <i>KRAS</i> кцПЦР	19 (48%)
Cheng et al, 2017 (n=188) [32]	IV	<i>BRCA2</i> , <i>EGFR</i> , <i>KDR</i> , <i>ERBB2</i> и <i>KRAS</i> кцПЦР, СНП	<i>KRAS</i> – 136 (72,3%), <i>BRCA2</i> – 22 (11,7%), <i>KDR</i> – 26 (13,8%), <i>EGFR</i> – 25 (13,3%), <i>ERBB2</i> – 12 (6,4%)
Cohen et al, 2017 (n=221) [33]	I-II	12 и 61 кодоны <i>KRAS</i> СНП (Safe-SeqS)	66 (30%)
Del Re et al, 2017 (n=27) [43]	MP – 4, M – 23	<i>KRAS</i> кцПЦР	19 (70,4%)
Pietrasz et al, 2017 (n=135) [107]	P – 31, MP – 36, M – 68	Панель для исследования рака толстой кишки и легкого Ion кцПЦР, СНП	P – 6/31 (19%), MP и M – 50/104 (48%)
Pishvaian et al, 2017 (n=34) [108]	P – 6, M – 24, HD – 4	68- и 50-генная панель СНП (Illumina highSeq, 2500, IonTorrent PGM)	10 (29%)
Sefrioui et al, 2017 (n=52) [124]	P – 13, MP – 17, M – 22	<i>KRAS</i> кцПЦР	17/27 (63%)
Kim et al, 2018 (n=106) [75]	I-IV	<i>KRAS</i> кцПЦР	80 (80,5%)



Kruger et al, 2018 (n=54) [80]	III-IV	<i>KRAS</i> BEAMing	36 (67%)
Lin et al, 2018 (n=65) [83]	I-IV	<i>KRAS</i> кцПЦР	G12V – 20 (31%), G12D – 23 (35%), G12R – 9 (14%)
Nakano et al, 2018 (n=45) [99]	I-II	12 и 13 кодоны <i>KRAS</i> ПЦР с ПНК-зондами	До операции – 11 (24,4%), после операции – 20 (44,4%)
Perets et al, 2018 (n=17) [105]	IV	<i>KRAS</i> СНП	5 (29,4%)
Bernard et al, 2019 (n=194) [21]	P – 71, MP и M – 123	<i>KRAS</i> кцПЦР	P – 24/71 (34%), MP и M – 63/123 (53%)
Lee et al, 2019 (n=42) [81]	I-II	12,13, 61 кодоны <i>KRAS</i> СНП (SafeSeqS)	До операции – 23 (62,2%), после операции – 13 (37,1%)
Groot et al, 2019 (n=59) [62]	I-III	<i>KRAS</i> кцПЦР	29 (49%)
Patel et al, 2019 (n=112) [104]	P – 18, MP и M – 94	53-73-генная панель СНП	49 (44%)
Strijker et al, 2019 (n=58) [134]	IV	8-генная панель кцПЦР, СНП	26 (44,8%)
Watanabe et al, 2019 (n=78) [152]	I-IV	<i>KRAS</i> кцПЦР	I-II – 7/39 (17,9%), III-IV – 12/26 (46,2%)
Guo et al, 2020 (n=113) [63]	I-III	50-генная панель кцПЦР, СНП	43 (38,1%), m <i>KRAS</i> – 26 (23%)
Sugimori et al, 2020 (n=45) [135]	II-IV	12 кодон <i>KRAS</i> цПЦР	23 (51,1%)

КцПЦР – капельная цифровая полимеразная цепная реакция, М – метастатический РПЖ, MP – местно-распространенный РПЖ, НД – нет данных, ПНК – пептидно-нуклеиновая кислота, ПЦР-ПДРФ – полимеразная цепная реакция – полиморфизм длин рестрикционных фрагментов, Р – резектабельный РПЖ, СНП – секвенирование нового поколения

Была отмечена связь стадии заболевания с наличием цоДНК: в случае резектабельного РПЖ частота цоДНК, определяемая по мутациям в одном и более ассоциированных с опухолью генов, составила 19%, в случае же распространенного РПЖ – 48% [107]. Схожая тенденция была отмечена при применении кцПЦР и метода BEAMing – цоДНК была обнаружена в 55-86% случаев при IV стадии заболевания [69; 75; 76]. В трех крупных исследованиях с помощью СНП было также показано, что частота определения мутации *KRAS* в плазме крови значимо выше при распространенных стадиях заболевания [28; 107; 137]. В исследовании Sefrioui и соавт. была отмечена значимая разница уровня цоДНК: 43% для локализованных и 90% для распространенных стадий ( $p=0,002$ ), однако средние концентрации цоДНК значимо не отличались и составили  $73,8\pm45,6$ ,  $77,2\pm41,1$  и  $122,4\pm44$  нг/мл для локализованного, местно-распространенного и метастатического РПЖ, соответственно [124]. В исследовании Ако и соавт. концентрация ДНК в плазме пациентов с III-IV стадиями заболевания также оказалась выше, чем при I-II стадиях и составила 22,6 и 15 нг/мл, соответственно, однако, различие не достигло статистической значимости ( $p=0,27$ ) [17]. Фракция мутантного аллеля цоДНК по данным нескольких исследований также ассоциирована с клинической стадией РПЖ [150; 154]. В исследовании Strijker и соавт. объем опухоли, измеряемый с помощью МРТ или КТ, коррелировал с частотой вариантного аллеля цоДНК (коэффициент корреляции Спирмена  $\rho = 0,544$ ,  $p<0,001$ ), при этом цоДНК чаще определялась при большем объеме опухоли и наличии метастазов в печени [134]. Также было показано, что частота выявления *mKRAS* цоДНК в случае резектабельного РПЖ выше в образцах крови, взятых до операции, по сравнению с образцами, взятыми после нее [81; 99]. В другой работе анализ цоДНК 118 пациентов с метастатическим РПЖ выявил наличие соматических мутаций в *BRCA2* (11,7%), *KDR* (13,8%), *EGFR* (13,3%), 17 экзоне *ERBB2* (13,3%), 27 экзоне *ERBB2* (6,4%). Уровень мутаций *KRAS* составил 72,3% (136 из 188), при этом чаще всего встречалась мутация G12D (52,1%) [32].

В связи с приведенными выше данными одной из гипотез является то, что чем выше опухолевая нагрузка, тем выше частота определения цоДНК в крови пациента. Улучшение методов диагностики, а также количества определяемых генов, ассоциированных с опухолью, сможет повысить частоту обнаружения цоДНК. Однако насколько точно цоДНК может отражать молекулярный статус опухоли остается вопросом.

### **1.2.2. Проблема конкордантности мутаций в циркулирующей опухолевой ДНК и первичной опухоли**

Как и в случае частоты определения цоДНК, конкордантность мутационного статуса во многом зависит от применяемого метода исследования и качества анализируемого материала. Так, в работе Sefrioui и соавт. при сравнении парных образцов опухолевой ткани и плазмы крови 27 пациентов конкордантность мутационного статуса *KRAS* составила 70,4%. У 3 пациентов мутация *KRAS* была обнаружена в цоДНК, но не была обнаружена в опухоли. Авторы отмечают, что на полученный результат мог повлиять низкий процент опухолевых клеток в материале [124]. Также при выполнении микродиссекции возможно загрязнение образца опухоли стромальной тканью с диким типом *KRAS* [47].

В исследовании Kinugasa и соавт. частота мутаций *KRAS* оценивалась в 75 парных образцах опухолевой ткани и цоДНК: G12V встречалась в 28 (37,3%) и 26 (34,6%), G12D – в 22 (29,3%) и 29 (38,6%), G12R – в 6 (8,0%) и 4 (5,3%) случаях, соответственно. Конкордантность мутаций в ДНК опухолевой ткани и ДНК крови составила 77,3% [76]. В нескольких исследованиях мутационный статус опухолевого образца и соответствующего образца плазмы совпадал в 100% случаев [65; 81; 83]. В другом исследовании конкордантность статуса *KRAS* была значимо выше между цоДНК и метастазами, чем между цоДНК и образцами первичной опухоли (72% против 39%,  $p=0,010$ ), различие для *TP53* оказалось незначимым. При этом уровни конкордантности для *KRAS* и *TP53* оказались выше, в случае забора крови в промежуток до 6 месяцев после операции (55 и 65%, соответственно), чем через 6 месяцев и более (41% и 47%, соответственно),

однако, различия не достигли статистической значимости [104]. Для мутаций *KRAS* с частотой  $\geq 1\%$  конкордантность между центром опухоли и инвазивным фронтом опухоли и между первичной опухолью и метастазом составила 94,7% и 90,9%, соответственно [152].

Таким образом, различие результатов обусловлено не только особенностями методологии и анализа мутаций в цоДНК и первичной опухоли, но и возможным вкладом метастазов в общий пул цоДНК и гетерогенности опухолевой ткани.

### **1.2.3. Прогностическая значимость циркулирующей опухолевой ДНК при раке поджелудочной железы**

Пилотное исследование Earl и соавт. показало, что обнаружение мутации *KRAS* в плазме 45 пациентов с РПЖ различных стадий значимо коррелирует с худшей ОВ (60 дней при *mKRAS* и 772 дня при *wtKRAS* цоДНК). Однако, частота обнаружения *mKRAS* цоДНК в данном исследовании с помощью метода кцПЦР составила всего 26% (8/31), при этом в большинстве случаев при метастатическом процессе [47]. В другом же исследовании мутации в 12 кодоне *KRAS* не показали своей прогностической значимости, в отличие от уровня определяемой цоДНК в плазме крови пациентов. Высокий уровень цоДНК ( $>62$  нг/мл) был ассоциирован с более низкой ОВ ( $p=0,002$ ), наличием сосудистой инвазии ( $p=0,03$ ) и метастазов ( $p=0,001$ ). Высокий уровень цоДНК в подгруппе прооперированных пациентов также показал свою прогностическую значимость: медиана ОВ составила 2 мес. для высокого уровня цоДНК против 11 мес. для низкого уровня ( $\leq 62$  нг/мл) ( $p=0,022$ , ОР=2,6, 95% ДИ 1,0-6,7) [129].

Sefrioui и соавт. провели прямое сравнение диагностической значимости тонкоигольной аспирационной биопсии под контролем УЗИ, онкомаркера СА 19-9, ЦОК и цоДНК у 68 пациентов с солидными опухолями поджелудочной железы (РПЖ – 52, другие злокачественные опухоли – 8, доброкачественные новообразования – 10). Чувствительность и специфичность биопсии составили 73% и 88%, ЦОК – 67% и 80%, цоДНК – 65% и 75% и онкомаркера СА 19-9 – 79% и 93%. ЦоДНК оказался единственным маркером, ассоциированным с ОВ

(медиана ОБ 5,2 мес. при обнаружении цоДНК в плазме крови против 11 мес. при отсутствии цоДНК,  $p=0,01$ ) [124].

Среди пациентов с распространенным РПЖ ( $n=104$ ) цоДНК определялась в 48% случаев с частотой мутантного аллеля 6,1% (0,1-65,4). В большинстве случаев была обнаружена мутация в гене *KRAS* ( $n=43$ ), реже встречались мутации в таких генах как *TP53* ( $n=23$ ), *SMAD4* ( $n=8$ ), *NRAS* ( $n=2$ ), *PIK3CA* ( $n=1$ ) и *STK11* ( $n=1$ ). Наличие цоДНК в плазме пациентов с распространенным заболеванием было значимо ассоциировано с худшей ОБ (ОР=1,96,  $p=0,007$ ). Пациенты с мутациями в других генах помимо *KRAS* также имели худший прогноз, но различие не достигло статистической значимости (медиана ОБ 3,1 мес. для мутаций *KRAS* и 8,6 мес. для мутаций *KRAS* и других генов,  $p=0,128$ ) [107]. В подгрупповом анализе было показано, что в случае низкой концентрации мутации *KRAS* и низком процентном содержании ДНК с мутацией *KRAS* отмечены более длительные медианы ВБП (12,6 мес. против 4,7 мес.,  $p=0,001$ ; 8,7 мес. против 5,1 мес.,  $p=0,003$ ) и ОБ (13,0 мес. против 8,0 мес.,  $p=0,001$ ; 12,6 мес. против 8,0 мес.,  $p=0,006$ ), чем в случае высокой концентрации и высокого процентного содержания *mKRAS* ДНК, однако, в группах местно-распространенного и метастатического РПЖ данной ассоциации не выявлено [75]. В одном из исследований наличие мутации *KRAS* G12D в плазме, сыворотке, ткани пациентов с III-IV стадиями РПЖ не коррелировало с ОБ, в то время как прогноз пациентов с мутацией G12V был значимо хуже, чем у пациентов без мутации ( $p<0,01$ ) [17], что было подтверждено в других работах [32; 76]. В когорте 118 пациентов с метастатическим РПЖ независимыми факторами, связанным с ОБ, оказались мутация *KRAS* G12V ( $p=0,019$ , ОР=1,45), а также мутация в 17 экзоне гена *ERBB2* ( $p=0,035$ , ОБ=1,61), уровень СА19-9 ( $p=0,022$ , ОР=0,71), СА-125 ( $p=0,007$ , ОР=0,62), проведение химиотерапии ( $p=0,011$ , ОР=0,52) и количество метастазов ( $p=0,023$ , ОР=0,67) [32]. Напротив, в исследовании Pietrasz и соавт. в подгруппе пациентов с мутацией *KRAS* в цоДНК значимого различия в ОБ в зависимости от подтипа мутации *KRAS* найдено не было [107].

В исследовании Lee и соавт. цоДНК оценивалась в 37 случаях до операции и в 35 случаях после. Обнаруженные мутации в цоДНК соответствовали мутациям в опухоли в 100% случаев. Частота определения цоДНК после операцию снизилась на 23% по сравнению с показателем до операции. Определяемые уровни цоДНК как до, так и после операции, оказались негативными факторами ВБПЗ и ОБ [87]. Watanabe и соавт. оценивали уровень *mKRAS* цоДНК в процессе терапии 78 пациентов с диагнозом РПЖ. Наличие *mKRAS* цоДНК до операции и уровень СА19-9 не влияли на ВБПЗ (16,9 против 32,4 мес.,  $p=0,38$ , 16,9 против 17,1 мес.,  $p=0,7$ ). Среди 39 прооперированных пациентов появление *mKRAS* цоДНК в процессе наблюдения было ассоциировано с неблагоприятным прогнозом заболевания ( $p<0,001$ ) в отличие от однократного определения цоДНК до операции [162].

Хотя результаты исследований относительно корреляции цоДНК и прогноза пациентов разнятся, в большинстве исследований показана значимость мутации *KRAS*, определяемой в цоДНК, в качестве фактора неблагоприятного прогноза (таблица 4).

**Таблица 4** – Прогностическая значимость цоДНК при РПЖ

Автор, год	Стадия заболевания	Время взятия образца	Прогноз (цоДНК+ против цоДНК-)
Castells et al, 1999 (n=44) [29]	I-II – 15, III-IV – 28, НД – 1	До начала лечения	Вероятность дожития 17% против 41% в 6 мес., 0% против 24% в 12 мес. ( $p<0,005$ ).
Maire et al, 2002 (n=47) [90]	I – 5, II-III – 19, IV – 23	-	Нет корреляции с ОБ.
Chen et al, 2010 (n=91) [30]	III – 29, IV – 62	До начала лечения	ОБ: 3,9 мес. против 10,2 мес. ( $p<0,001$ ).
Dabritz et al, 2009 (n=56) [40]	P – 25, МР и М – 23, НД – 8	В процессе лечения	Нет корреляции с ОБ.

Infante et al, 2014 (n=160) [69]	IV	В процессе лечения	Нет корреляции с ОВ.
Earl et al, 2015 (n=45) [47]	P – 10, MP – 8, М – 13	До начала лечения	ОВ: 60 дней против 772 дней (ОР=12,2, p=0,0002).
Kinugasa et al, 2015 (n=75) [76]	I-II – 2, III-IV – 73	До начала лечения	ОВ: 276 дней против 413 дней (p=0,02), при G12V KRAS: 210 дней против 410 дней (p=0,006).
Singh et al, 2015 (n=110) [129]	I-IV	До начала лечения	ОВ: 3 мес. при цоДНК >62 нг/мл против 11 мес. при цоДНК <62 нг/мл (ОР=3,4, 95% ДИ 3,0-8,5, p=0,002). KRAS+ цоДНК не ассоциирована с ОВ (ОР=0,8, 95% ДИ 0,48-1,3, p=0,398).
Takai et al, 2015 (n=259) [137]	I-IV (IV – 62,9%)	До начала лечения	ОВ: 9 мес. против 24 мес. (p<0,0001).
Sausen et al, 2015 (n=51) [121]	II	До начала и в процессе лечения	ВБП: 7,9 мес. против 15,2 мес. (p=0,015).
Hadano et al, 2016 (n=105) [65]	I-II – 84, III-IV - 21	До операции	ОВ: 13,6 мес. против 27,6 мес. (p<0,0001).
Pishvaian et al, 2016 (n=34) [108]	P и MP – 6, М – 24, HD – 4	В процессе лечения	Наличие цоДНК ассоциировано с более низкой ОВ (p=0,045).
Tjensvoll et al, 2016 (n=14) [142]	MP – 2, М – 12	До начала и в процессе химиотерапии	Относительный уровень цоДНК до начала лечения ассоциирован с более низкими ВБП (ОР=1,287, p=0,014) и ОВ (ОР=1,433, p=0,010).
Pietrasz et al, 2017 (n=135) [107]	P – 31, MP – 36, М – 68	До начала химиотерапии, до и после операции	ОВ при MP и М: 6,5 против 19,0 мес., (p<0,001), при P: 19,3 против 32,2 мес. (p=0,027).

Van Laethem et al, 2017 (n=60) [146]	II – 2, III – 10, IV – 68	До начала лечения	ВБП: 5,3 против 8,8 мес. (p=0,002), ОВ: 6,6 против 18,2 мес. (p=0,001).
Adamo et al, 2017 (n=26) [15]	P – 6, MP – 5, M – 15	До начала лечения	ВБП: 60 дней против 197 дней (p=0,018, OP=2,889, 95% ДИ 1,2-7,3).
Sefrioui et al, 2017 (n=52) [124]	P – 13, MP – 17, M – 22	До начала лечения	ОВ: 5,2 мес. против 11,0 мес. (p=0,01).
Cheng et al, 2017 (n=188) [32]	IV	До начала лечения	ОВ при G12V KRAS: 4,7 мес. против 6,0 мес. (p=0,019, OP=1,45).
Del Re et al, 2017 (n=27) [43]	MP – 4, M – 23	До начала I линии химиотерапии	Нет корреляции с ВБП и ОВ до начала лечения.
Perets et al, 2018 (n=17) [105]	IV	До лечения	ОВ: 8 мес. против 37,5 мес. (p<0,004).
Patel et al, 2019 (n=112) [104]	P – 18, MP и M – 94	До и после операции, в процессе лечения	Высокий уровень цоДНК – негативный фактор ОВ (6,3 против 11,7 мес., p=0,001) при IV стадии. Наличие мутации KRAS и TP53 в цоДНК не связано с ОВ.
Seet et al, 2019 (n=23) [123]	IV	До начала и в процессе лечения	mKRAS и mSMAD цоДНК – негативный фактор ОВ (OP 4,2, 95% ДИ 1,6-10,4, p=0,01 для mKRAS; OP 2,8, 95% ДИ 0,9-8,65, p=0,01 для mSMAD).
Strijker et al, 2019 (n=58) [134]	IV	До лечения	ОВ: 3,2 мес. против 8,4 мес. (p=0,005).
Sugimori et al, 2019 (n=47) [135]	II-IV	В процессе лечения	ВБП: 308,5 дней против 168 дней (p=0,07).



Watanabe et al, 2019 (n=78) [152]	I-IV	До операции и в процессе лечения	mKRAS цоДНК – прогностический фактор независимо от хирургического лечения ( $p<0,001$ ).
Guo et al, 2020 (n=113) [63]	I-III	До операции	ВБПЗ: 9,2 против 18,9 мес. ( $p=0,001$ ), ОВ: 17,1 против 26,3 мес. ( $p=0,002$ ).

ВБП – выживаемость без прогрессирования, ВБПЗ – выживаемость без признаков заболевания, М – метастатический РПЖ, МР – местно-распространенный РПЖ, НД – нет данных, ОВ – общая выживаемость, Р – резектабельный РПЖ

Ранее проведенные мета-анализы подтвердили, что цоДНК является важным прогностическим фактором [31; 38]. Однако, к их недостаткам можно отнести малое количество и гетерогенность включенных исследований, отсутствие анализа значимости цоДНК, обнаруженной в крови пациентов до и после хирургического лечения. Роль цоДНК при резектабельном процессе оценивалась только в нескольких работах, в связи с чем остается открытым вопрос необходимости определения цоДНК до и после операции.

Таким образом, по данным мировой литературы возможной практической значимостью при РПЖ обладают мутации в генах ГР ДНК и цоДНК в крови пациентов. В связи с отсутствием достаточных данных о частоте и структуре мутаций в генах ГР ДНК в российской популяции пациентов РПЖ, а также необходимостью дальнейших проспективных исследований по определению цоДНК в крови и ее способности отображать молекулярные изменения в опухоли в процессе лечения, нами было инициировано собственное исследование.

## **ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

Диссертационная работа выполнена на базе онкологического отделения лекарственных методов лечения (химиотерапевтического) №2 НИИ клинической онкологии им. академика РАН и РАМН Н.Н. Трапезникова ФГБУ «НМИЦ онкологии им Н.Н. Блохина» Минздрава России совместно с лабораторией биочипов Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии науки и лабораторией фармакогеномики Института химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения РАН. Исследование состоит из двух частей. Первая часть посвящена определению частоты, структуры мутаций в генах ГР ДНК с помощью СНП у пациентов с РПЖ, а также оценке прогностической и предиктивной значимости генетического статуса. Во второй части проведен анализ чувствительности тест-системы по определению цоДНК в крови пациентов РПЖ различных стадий с проспективным изучением прогностической роли цоДНК при резектабельном РПЖ. Исследование проведено в рамках экспериментального государственного задания Министерства здравоохранения Российской Федерации.

### **2.1. Дизайн 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. К критериям исключения относились морфологический диагноз неэпителиальной опухоли поджелудочной железы, билиарного рака, метастаза опухоли иной локализации и отсутствие образцов крови, архивного материала, удовлетворяющих требованиям выполнения генетического анализа.

Для анализа мутаций в генах ГР с помощью высокопроизводительного секвенирования была сформирована коллекция образцов крови и опухоли пациентов. Для каждого пациента собраны необходимые данные, а именно клинико-морфологическая характеристика заболевания, полученное лечение и его эффективность, семейный и персональный анамнез.

С целью оценки прогностической и предиктивной значимости дефицита ГР проведен ретроспективный анализ выживаемости пациентов. Определение показаний к генетическому тестированию пациентов РПЖ на предмет наличия мутаций в генах ГР выполнено с помощью серии корреляционных и регрессионных анализов.

Для выполнения второй части работы выполнялся забор крови 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. Сформирована база данных, включающая необходимые клинические характеристики пациентов, а также информацию о проводимом лечении и его непосредственных и отдаленных результатах для оценки прогностической значимости цоДНК.

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

### **2.2.1. Первичная конечная точка**

Первичной конечной точкой первой части исследования явилась частота мутаций в генах ГР при РПЖ. Первичной конечной точкой второй части работы явилась частота определения цоДНК в крови пациентов с РПЖ.

### **2.2.2. Вторичные конечные точки**

К вторичным конечным точкам исследования относились:

1. Паттерн мутаций генов ГР ДНК при РПЖ.
2. Клинико-морфологическая характеристика РПЖ при наличии патогенных мутаций в генах ГР ДНК.
3. Семейный и персональный анамнез, возраст пациентов при наличии патогенных мутаций в генах ГР ДНК.
4. Влияние наличия или отсутствия мутаций в генах ГР на ВБП и ОВ пациентов в зависимости от режима химиотерапии.

5. Влияние наличия цоДНК в крови на ВБПЗ и ОВ пациентов с резектабельным РПЖ.

### **2.3. Формирование базы данных по пациентам, включенным в исследование**

С помощью программного обеспечения Microsoft Access и Microsoft Excel сформированы базы данных, содержащие информацию о клинικο-морфологической характеристике заболевания включенных в исследование пациентов, проведенном лечении, данных об отягощенности семейного анамнеза по онкологическим заболеваниям и наличии первично-множественных опухолей. Необходимая информация собиралась на основании медицинской документации, опроса пациентов и телефонных контактов. Анализ отдаленных результатов также проводился на основании имеющейся медицинской документации, телефонных контактов, запросов в диспансеры и ЗАГС.

### **2.4. Определение мутационного статуса генов системы гомологичной рекомбинации ДНК с помощью высокопроизводительного секвенирования**

#### **2.4.1. Формирование коллекции морфологического материала для генетического анализа**

У большинства пациентов, подходивших под критерии включения в исследование, выполнялся забор крови в вакутайнеры с ЭДТА объемом 4 мл. В случае проведенного хирургического лечения были отобраны фиксированные фармалином парафиновые (FFPE) блоки, извлеченные из архива ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России или предоставленные пациентом в случае лечения в другом учреждении. Морфологом выделялись участки с опухолевой и нормальной тканью, выполнялась нарезка данного материала для последующего генетического анализа. В состав коллекции морфологического материала вошли 477 образцов крови и 312 FFPE-блоков. При отсутствии образца крови в анализ включался парафиновый блок с нормальной тканью.

#### **2.4.2. Проведение высокопроизводительного секвенирования с целью выявления всех мутаций в анализируемых генах системы гомологичной рекомбинации ДНК**

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. Праймеры для амплификации локусов выбранных генов конструировались с помощью программы Clone Manager («Scientific & Educational Software», США) и приложений Primer-BLAST («NCBI», США). Последовательности исследуемых генов получены из базы данных «NCBI» (США). После ПЦР целевых локусов ДНК полученный продукт очищался от праймеров, после чего выполнялось его секвенирование по Сенгеру с помощью набора реактивов ABI PRISM® BigDye™ Terminator v. 3.1 с последующим анализом продуктов реакции на автоматическом секвенаторе Applied Biosystems 3730 DNA Analyzer.

Далее выявленные мутации обработаны с помощью биоинформационного анализа. Из полученных прочтений были вырезаны последовательности адаптеров [8], и было исключено загрязнение ридов бактериями. Все прочтения были сопоставлены с эталонным геномом человека GRCh37.75 (Ensembl). На следующем этапе из анализа были удалены ПЦР-клоны. Калибровка оценки базового качества проведена с помощью GATK4 (версия 4.0.8.1) [12]. Соматические мутации (SNV и indels) оценивались в программе Mutect2 [10]. VCF анализировались при помощи GATK Filter Mutect Calls. Полученный список соматических вариантов, прошедших фильтры, был аннотирован с использованием Annovar [10]. Были использованы базы данных о частотах аллелей в популяции (gnomAD genomic, 1000 Genomes Project, Kaviar, ESP 6500,

ExAC). В дальнейший анализ вошли варианты с частотой встречаемости менее 1%. Далее были исключены варианты, локализованные в низкоконсервативных участках генома, что оценивалось по базам данных phastCons для позвоночных и млекопитающих. Список вариантов был отфильтрован в соответствии с минимальным порогом покрытия считывания (20 считываний) и для герминальных, и для соматических вариантов. Были исключены SNV мотивы polyN, такие как GGGTG> GGGGG, CCCCCG> CCCCC. Результаты СНП интерпретировались согласно рекомендациям ACMG 2015. Предсказательные алгоритмы InterVar, ClinVar, SIFT [13], PolyPhen2 [6], LRT [9], PROVEAN, M-CAP, DANN, MetaSVM и MetaLR применялись для определения клинической значимости выявленных мутаций. Патогенными считались мутации, указанные как патогенные в нескольких источниках, а также приводящие к потере белком функции. Вероятно патогенными считались мутации, если по трем предсказательным алгоритмам они классифицировались как патогенные или вероятно патогенные.

## **2.5. Мета-анализ исследований, посвященных прогностической значимости определения циркулирующей опухолевой ДНК в крови пациентов с раком поджелудочной железы**

Мета-анализ исследований, касающихся вопроса прогностической значимости цоДНК при РПЖ, был проведен согласно рекомендациям PRISMA [96]. Источниками информации являлись базы данных PubMed, ASCO и ESMO. Поиск статей в PubMed осуществлялся с помощью следующих ключевых фраз: "circulating tumor dna", "ctdna", "liquid biopsy", "serum dna", "plasma dna", "cell free nucleic acids", "pancreatic neoplasms", "pancreatic cancer" и "pancreatic tumor". Запрос в поисковиках ASCO и ESMO был выполнен с включением ключевых слов "circulating dna" или "ctdna" в сочетании с "pancreatic cancer".

Критериями включения в исследование являлись полнотекстовые статьи и тезисы на русском и английском языках, опубликованные до февраля 2020 года. Для оценки прогностической значимости включались исследования, в которых

имелась информация о частоте выявления цоДНК в крови и ее связи с ВБП и ОВ пациентов. Обзоры литературы, редакционные статьи, дизайны исследования, описание молекулярно-генетического метода и другие публикации, не содержащие собственных результатов, были исключены из исследования. Также к критериям исключения относились:

- количество включенных в исследование пациентов 10 и менее;
- включение в исследование пациентов с клинически диагностированным РПЖ или доброкачественными опухолями поджелудочной железы;
- определение уровня цоДНК или фракции мутантных генов в крови пациентов;
- отсутствие данных по продолжительности жизни пациентов или указания ОР смерти и/или прогрессирования заболевания и 95% ДИ к этому показателю.

Названия и абстракты статей были просмотрены двумя независимыми онкологами для выявления исследований, которые потенциально могли бы соответствовать критериям включения и исключения. Далее изучались полные тексты потенциально подходящих статей. Были собраны следующие данные: число включенных пациентов, медиана ВБПЗ, ВБП и ОВ с указанием ОР и 95% 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.

## **2.6. Определение циркулирующей опухолевой ДНК в образцах крови пациентов раком поджелудочной железы**

### **2.6.1. Формирование коллекции образцов ДНК из опухолевых тканей и крови**

В архиве ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России были подобраны FFPE-блоки (n=64), полученные при биопсии или резекции первичной опухоли пациентов, чья кровь забиралась для анализа цоДНК. Опухолевый материал должен был содержать не менее 10% опухолевых клеток. ДНК выделяли референтным набором QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (Qiagen,

Германия). Минимально допустимой концентрацией ДНК в образце считали 0,6 нг/мкл. Для двух образцов концентрация ДНК оказалась менее минимально допустимой, в связи с чем они были исключены из последующего анализа.

Перспективно осуществлялся забор крови у 66 пациентов в вакутайнеры объемом 10 мл с ЭДТА. В случае резектабельных стадий (n=37) – до и после хирургического лечения в течение 7-30 дней. В случае неоперабельных стадий – перед началом противоопухолевого лечения и при первом оценочном визите. Далее вакутайнеры хранились при комнатной температуре не более 3 ч до центрифугирования для отделения плазмы. Центрифугирование вакутайнеров проводили в течение 15 минут в клинической центрифуге при ускорении 2000-2500×g при комнатной температуре. Далее полученную плазму отбирали, оставляя в вакутайнере около 4 мм плазмы над форменными элементами для предотвращения захвата лейкоцитов. Отобранную плазму помещали в чистую пробирку объемом 10-15 мл и повторно центрифугировали в течение 15 минут при ускорении 2000-2500×g при комнатной температуре. После этого повторно отбирали плазму и, не затрагивая осадок, переносили ее в чистую пробирку объемом 10-15 мл, которую хранили при температуре -50-80°C. Большая часть образцов плазмы была получена согласно этому протоколу. Однако, при последующем анализе оказалось, что качество полученной плазмы не всегда удовлетворительное. Поэтому часть образцов была собрана с использованием специальных вакутайнеров, содержащих добавки, которые ингибируют разрушение ядродержащих клеток крови (Roche Cell-Free DNA Collection Tubes® (Roche) и PAXgene Blood ccfDNA Tubes (Qiagen)). После забора крови пробирки хранили при комнатной температуре, далее помещали в стандартный конверт курьерской почты и отправляли в лабораторию для анализа с соблюдением температурного режима хранения. Время доставки в этом случае составляло от 3 до 9 дней. Далее, в лаборатории, пробирки подвергали двойному центрифугированию с параметрами рекомендованными производителем, отбирали плазму, замораживали и хранили при -70°C до момента проведения анализа. ДНК из 4 мл плазмы выделяли референтным набором QIAamp Circulating



Nucleic Acid Kit (Qiagen). Концентрация ДНК определялась с помощью количественной ПЦР с использованием набора KAPA Library Quantification Kit (Roche Holding, Швейцария) согласно инструкции фирмы-производителя. Минимально допустимой считалась концентрация ДНК 0,3 нг/мкл, максимально допустимой – 10 нг/мкл.

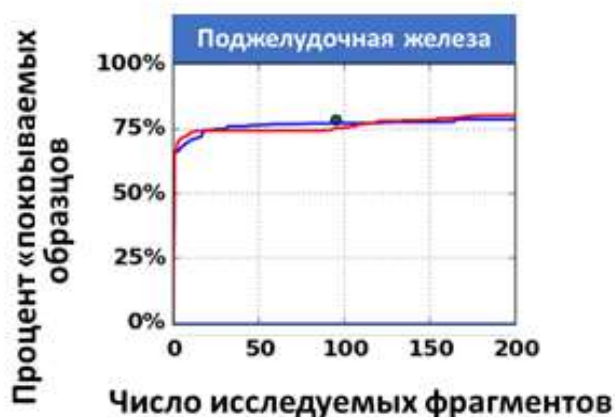
### **2.6.2. Определение опухоль-специфических соматических мутаций в циркулирующей ДНК плазмы крови и парафиновых блоках с помощью капельной цифровой ПЦР и высокопроизводительного секвенирования**

Протокол приготовления таргетной СНП-библиотеки для определения опухоль-специфичных соматических мутаций в ДНК опухолевых клеток и плазмы крови, а также проведения 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».

На первом этапе были выбраны информативные локусы генома человека, в которых локализуются соматические мутации, наиболее часто встречаемые в клетках 8 нозологий, одна из которых была РПЖ (Приложение 1). Для этого из базы данных COSMIC v.84 (<https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>) были выгружены данные, включающие в себя все соматические мутации, выявленные при полногеномных исследованиях опухолевой ткани. Все мутации идентифицировались по хромосоме и координате начала.

Далее мутации объединялись во все возможные неперекрывающиеся фрагменты длиной по 25 нуклеотидов (минимальный размер исследуемой области при длине ампликона 65 и длинах праймеров – 20 нуклеотидов). Это было сделано для того, чтобы в дальнейшем выбирать не отдельные мутации, которые имеют высокий вес, а регионы, общий вес мутаций в которых максимален. Наилучшим считался тот набор, в котором наименьшее число фрагментов покрывало мутации не менее 95% от всех образцов, у которых в данном районе

была найдена мутация. Затем фрагменты из лучших наборов объединялись в один. Каждый набор фрагментов был отсортирован по числу образцов, для которых была бы обнаружена соматическая мутация при исследовании данного локуса, и были построены графики накопления числа «покрываемых» образцов в зависимости от числа исследуемых фрагментов (рисунок 1).



**Рисунок 1** - Процент образцов (по вертикальной оси) из базы данных COSMIC, для которых была бы найдена хотя бы одна соматическая мутация при дизайне единой для всех заболеваний генной панели (синяя кривая), либо при дизайне генной панели специфичной для каждого заболевания (красная кривая) на примере РПЖ. По горизонтальной оси – число используемых фрагментов с длиной исследуемой области 25. Зеленая точка обозначает процент «покрываемых» образцов генной панелью, разработанной по окончании выполнения этапа.

Определение соматических мутаций в клинических образцах тканей опухоли и плазмы осуществляли при помощи высокопроизводительного секвенирования участков геномной ДНК, где располагаются наиболее частые мутации специфичные для РПЖ. Обогащение библиотек интересующими локусами ДНК осуществлялось при помощи мультиплексной ПЦР. Секвенирование библиотек выполняли на платформе MiniSeq (Illumina) при помощи набора реагентов High output. Анализ полученных данных осуществлялся с помощью разработанного программного обеспечения.

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* (таблица 5).

**Таблица 5** – Выявляемые мутации при помощи кцПЦР

Ген	Нуклеотидная замена	Аминокислотная замена
<i>APC</i>	c.2515G>A	p.Gly839Arg
<i>APC</i>	c.2613delA	p.Val872fs
<i>APC</i>	c.3890C>A	p.Ser1297*
<i>APC</i>	c.3902delC	p.Pro1301fs
<i>APC</i>	c.3927dupA	p.Gln1310fs
<i>APC</i>	c.4176C>A	p.Cys1392*
<i>BRAF</i>	c.1799T>A	p.Val600Glu
<i>EGFR</i>	c.2235-2249del15	
<i>EGFR</i>	c.2236_2250del15	
<i>EGFR</i>	c.2238_2252del15	
<i>EGFR</i>	c.2239_2248>C	
<i>EGFR</i>	c.2240_2254del15	
<i>EGFR</i>	c.2240_2257del18	
<i>EGFR</i>	c.2237_2253>TTGCT*	
<i>EGFR</i>	c.2237_2255>T*	
<i>EGFR</i>	c.2239_2256del18*	
<i>EGFR</i>	c.2238_2252del15*	
<i>EGFR</i>	c.2239_2257>GT*	
<i>EGFR</i>	c.2369C>T	p.Thr790Met
<i>EGFR</i>	c.2573T>G	p.Leu858Arg
<i>KRAS</i>	c.34G>A	p.Gly12Ser
<i>KRAS</i>	c.34G>C	p.Gly12Arg
<i>KRAS</i>	c.34G>T	p.Gly12Cys
<i>KRAS</i>	c.35G>A	p.Gly12Asp
<i>KRAS</i>	c.35G>C	p.Gly12Ala
<i>KRAS</i>	c.35G>T	p.Gly12Val
<i>KRAS</i>	c.38G>A	p.Gly13Asp
<i>KRAS</i>	c.183A>T	p.Gln61His

<i>KRAS</i>	c.436G>A	p.Ala146Thr
<i>PIK3CA</i>	c.263G>A	p.Arg88Gln
<i>PIK3CA</i>	c.1258T>C	p.Cys420Arg
<i>PIK3CA</i>	c.1624G>A	p.Glu542Lys
<i>PIK3CA</i>	c.1633G>A	p.Glu545Lys
<i>PIK3CA</i>	c.1634A>C	p.Glu545Ala
<i>PIK3CA</i>	c.1634A>G	p.Glu545Gly
<i>SMAD4</i>	c.1527G>T	p.Trp509Cys
<i>TP53</i>	c.329G>C	p.Arg110Pro
<i>TP53</i>	c.466C>T	p.Arg156Cys
<i>TP53</i>	c.701A>G	p.Tyr234Cys
<i>TP53</i>	c.733G>A	p.Gly245Ser
<i>TP53</i>	c.742C>T	p.Arg248Trp
<i>TP53</i>	c.924dupG	p.Pro309fs
<i>TP53</i>	c.997delC	p.Arg333fs

Fs – frameshift variant, \* – замена, приводящая к образованию стоп-кодона

Перед проведением тестирования было установлено наличие исследуемых соматических мутаций непосредственно в опухолях. Процедура анализа включала выделение ДНК из образцов клинического материала, оценку количества ДНК с помощью амплификации специфических фрагментов ДНК и гибридационно-флуоресцентной детекции, детекции соматических мутаций ДНК с помощью амплификации специфических фрагментов ДНК и гибридационно-флуоресцентной детекции. Реакция амплификации проводилась в реакционной смеси в присутствии специфичных к фрагментам ДНК олигонуклеотидных праймеров, флуоресцентно-меченых гидролизуемых проб и фермента Taq-полимеразы. Для пригодных образцов ДНК определялось наличие мутации и её процент в анализируемых образцах. Наличие конкретной мутации считалось установленным, если в образце присутствовала одна капля и более, которые соответствовали кластерам с мутантной ДНК положительного контроля со смесью для выявления конкретной мутации.

## 2.7. Статистический анализ данных

Сравнительный анализ номинальных и порядковых переменных проводился критерием  $\chi^2$ , а также точным критерием Фишера. При применении критерия  $\chi^2$  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.

ВБП рассчитывалось от даты начала лечения до прогрессирования заболевания или даты последнего наблюдения, ВБПЗ – от даты хирургического лечения до возникновения рецидива, ОВ – от даты начала лечения до даты смерти или последнего контакта с пациентами для цензурируемых наблюдений. 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. Взаимосвязь различных факторов и наличия цоДНК в крови пациентов оценивалась с помощью серии корреляционных и регрессионных анализов. Влияние признаков на прогноз заболевания оценивалось с помощью регрессионного анализа Кокса. Признаки, статистически значимо влиявшие на прогноз по данным однофакторных регрессионных анализов, анализировались в многофакторном регрессионном анализе с включением этих признаков. Если при многофакторном регрессионном анализе признак статистически значимо влиял на прогноз, то он расценивался как независимый прогностический фактор. Порогом статистической значимости являлось  $p < 0,05$ .

Для оценки прогностической значимости цоДНК при операбельных стадиях заболевания в рамках научно-исследовательской работы по разработке тест-системы для анализа цоДНК в крови пациентов в соответствии со статистической гипотезой требовалось включить 265 пациентов различных нозологий для получения различий в 1-годичных показателях выживаемости без признаков

болезни в 30% (с 60% до 90%), длительности набора пациентов течение 2 лет, при  $\alpha$  0,01 и мощности исследования 90%, потерей данных 10% пациентов. В настоящей работе представлены результаты подгруппового анализа для больных РПЖ. Статистический анализ полученных результатов выполнен с использованием программ Microsoft Excel 2007 и IBM SPSS Statistics v. 20.0.

При проведении мета-анализа, посвященному прогностической роли цоДНК при РПЖ, различия в ВБПЗ и ОВ представляли в виде ОР прогрессирования заболевания или смерти сравниваемых групп и 95% ДИ к данному показателю. Стандартную ошибку вычисляли из 95% ДИ. Статистический анализ включал в себя тест  $\chi^2$  для подтверждения однородности результатов включенных в анализ исследований. В отсутствие статистически значимой гетерогенности результатов исследований ( $p > 0,1$ ) метод «generic inverse variance» с фиксированным эффектом применяли для оценки ОР прогрессирования и смерти и построения 95% ДИ. Модель случайных эффектов применялась в случае гетерогенности результатов исследований. С целью исключения систематической ошибки, связанной с публикацией, был построен воронкообразный график (со значениями стандартной ошибки ( $\log$  ОР) по оси ординат и ОР по оси абсцисс). Мета-анализ выполнен с использованием программы «Review Manager» (RevMan) [Computer program]. Version 5.3. Copenhagen: The Nordic Cochrane Centre, The Cochrane Collaboration, 2014.

### ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

#### 3.1. Мутации в генах гомологичной рекомбинации ДНК в российской популяции пациентов с раком поджелудочной железы

##### 3.1.1. 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%). Таким образом, на долю генов *BRCA1/2* и *PALB2* пришлось 5,6% мутаций, на долю же других проанализированных генов ГР ДНК – 6,4%. При этом 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.

##### 3.1.2. 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.

### 3.1.2.1. Влияние мутаций в генах гомологичной рекомбинации ДНК на прогноз пациентов при резектабельном раке поджелудочной железы

В анализ выживаемости пациентов резектабельным РПЖ включено 270 пациентов. Результаты сравнения клинико-морфологических характеристик групп пациентов с мутациями в генах *BRCA1/2* и *PALB2*, с мутациями в других генах системы ГР и с диким типом генов ГР представлена в таблице 6.

**Таблица 6** – Сравнительная клинико-морфологическая характеристика пациентов резектабельным РПЖ в зависимости от мутационного статуса генов ГР

Параметр	Мутации в <i>BRCA1/2</i> и <i>PALB2</i> (n=16)	Мутации в остальных генах ГР (n=18)	Дикий тип генов ГР (n=236)	p
Мужской пол, n (%)	6 (37,5%)	9 (50%)	100 (42,4%)	0,75
Медиана возраста (мин-макс), лет	57 (34-76)	59 (44-75)	62 (30-80)	0,3
Параметр Т				0,16
1/2	5 (31,3%)	2 (11,1%)	33 (14%)	
3/4	11 (68,8%)	16 (88,9%)	199 (84,3%)	
Нет данных	0	0	2 (0,8%)	
Медиана диаметра первичной опухоли (мин-макс), мм	35 (10-55)	36 (15-50)	39 (5-100)	0,59
Метастазы в регионарных лимфоузлах, n (%)	7 (43,8%)	11 (61,1%)	96 (40,7%)	0,26
Степень дифференцировки				0,15
высокая	1 (6,3%)	0	30 (12,7%)	
умеренная	11 (68,8%)	16 (88,9%)	136 (57,6%)	
низкая	1 (6,3%)	2 (11,1%)	24 (10,2%)	
Нет данных	3 (18,8%)	0	46 (19,5%)	
Локализация первичной опухоли в головке железы, n (%)	12 (75%)	15 (83,3%)	183 (77,5%)	0,72
Медиана уровня онкомаркера СА 19-9 (мин-макс), Ед/мл	1785 (9-2798)	179 (3-259)	115 (1-7108)	0,59



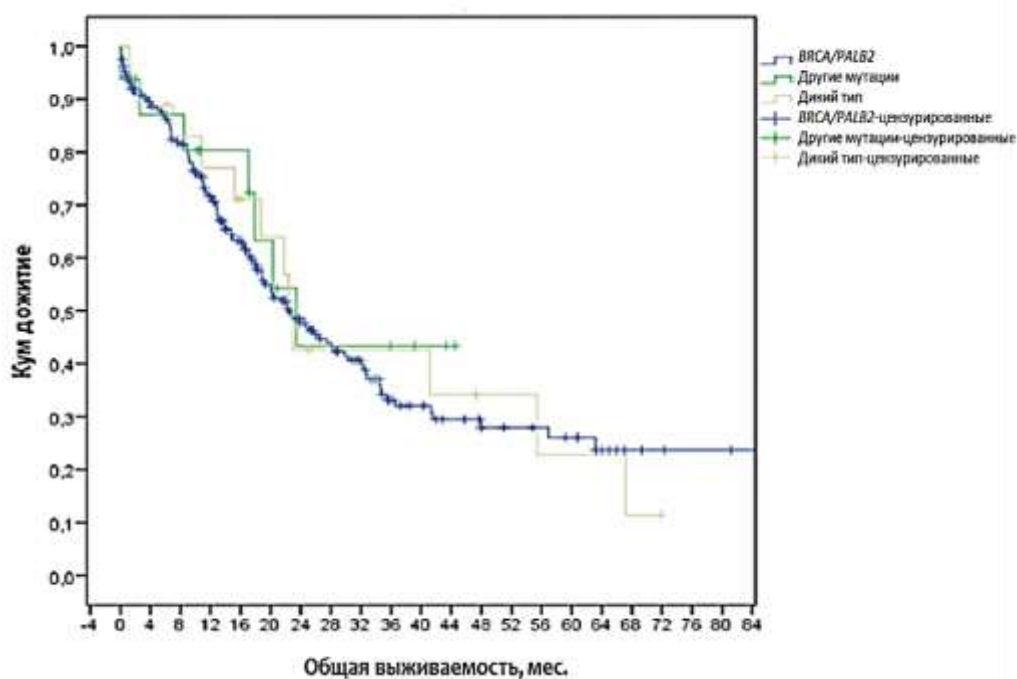
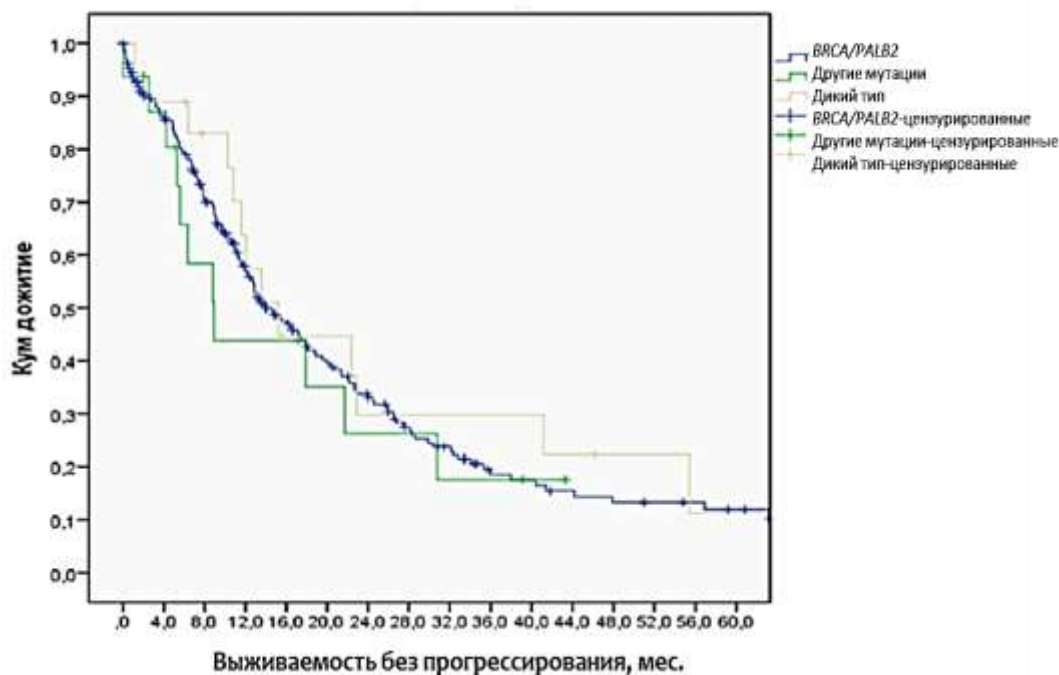
Нео- и/или адъювантная лекарственная терапия	9 (56,2%)	16 (88,9%)	141 (59,7%)	0,04
Радикальность операции, n (%)				
R0	8 (44,4%)	8 (44,4%)	116 (49,2%)	0,04
R1	5 (37,5%)	5 (27,8%)	67 (28,4%)	
R2	0	4 (22,2%)	14 (5,9%)	
Нет данных	5 (31,2%)	1 (5,6%)	39 (16,5%)	

ГР – гомологичная рекомбинация

Как видно из представленной таблицы, 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 2). 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 2** – ВБП и 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%.

### 3.1.2.2. Влияние мутаций в генах гомологичной рекомбинации ДНК на прогноз пациентов при местно-распространенном и метастатическом раке поджелудочной железы

В анализ выживаемости в случае местно-распространенного или метастатического РПЖ включены 356 пациентов. Как показано в таблице 7, группы не различались между собой по основным характеристикам.

**Таблица 7** – Сравнительная клинико-морфологическая характеристика пациентов с местно-распространенным и метастатическим РПЖ в зависимости от мутационного статуса генов ГР

Параметр	Мутации в <i>BRCA1/2</i> и <i>PALB2</i> (n=19)	Мутации в остальных генах ГР (n=22)	Дикий тип генов ГР (n=315)	p
Мужской пол, n (%)	6 (31,6%)	11 (50%)	155 (49,2%)	0,32
Медиана возраста (мин-макс), лет	57 (29-75)	62 (36-81)	62 (31-81)	0,1
Статус Карновского >70%, n (%)	7 (36,8%)	9 (40,9%)	123 (39%)	0,38
Параметр Т, n (%)				
1/2	1 (5,3%)	5 (22,7%)	31 (9,8%)	0,12
3/4	18 (94,7%)	17 (77,3%)	283 (89,8%)	
Нет данных	0	0	1 (0,3%)	
Метастазы в регионарных лимфоузлах, n (%)	11 (57,9%)	12 (54,5%)	160 (50,8%)	0,77
Наличие отдаленных метастазов, n (%)	12 (63,2%)	13 (59,1%)	179 (56,8%)	0,86
Наличие асцита, n (%)	0	1 (4,5%)	29 (9,2%)	0,3
Степень дифференцировки, n (%)				
высокая	2 (10,5%)	2 (9,1%)	18 (5,7%)	0,06
умеренная	4 (21,1%)	6 (27,3%)	66 (21%)	
низкая	5 (26,3%)	3 (13,6%)	22 (7%)	
Нет данных	8 (42,1%)	11 (50%)	209 (66,3%)	

Продолжение таблицы 7

Медиана уровня СА 19-9 (мин-макс), Ед/мл	343 (19-27000)	1512 (3-77283)	436 (0-215868)	0,5
Локализация первичной опухоли в головке поджелудочной железы, n (%)	11 (57,9%)	11 (50%)	184 (58,4%)	0,74

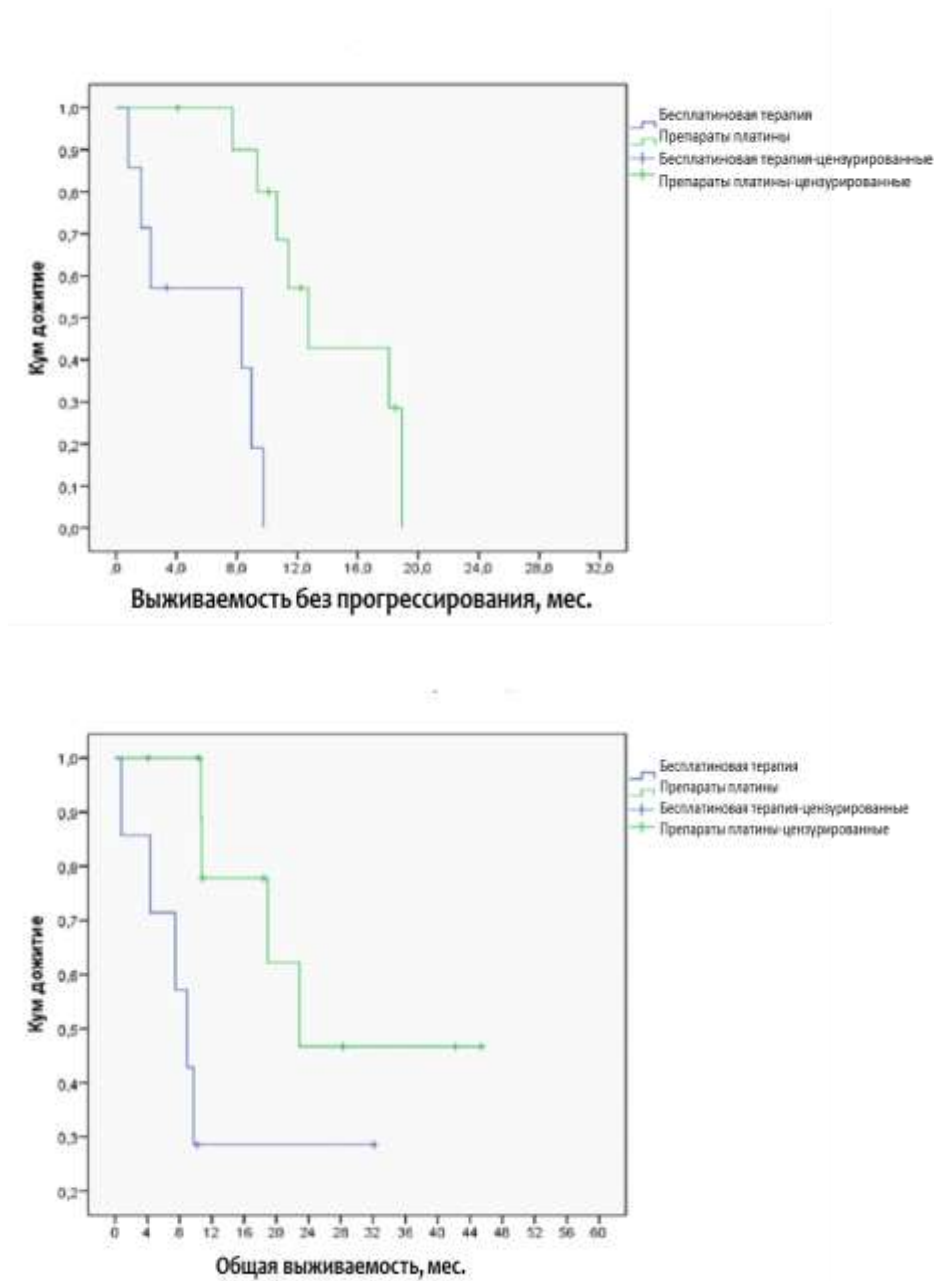
ГР – гомологичная рекомбинация

Мы проанализировали эффективность препаратов платины в зависимости от мутационного статуса пациентов. Из анализа исключены пациенты, получавшие симптоматическое лечение. Платиносодержащий режим в первой линии терапии получили 11 (57,9%) пациентов с мутациями *BRCA1/2* или *PALB2*, 13 (59,1%) пациентов с мутациями в других генах ГР и 144 (45,7%) пациента с диким типом генов ГР. За весь период лечения препараты платины получили 12 (63,2%) пациентов из первой группы, 15 (68,2%) – из второй и 167 (53%) – из третьей. 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.

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 ( $p=0,05$ ).

Далее были проанализированы ВБП и ОВ в зависимости от применения препаратов платины в первой линии химиотерапии и мутационного статуса пациентов. 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

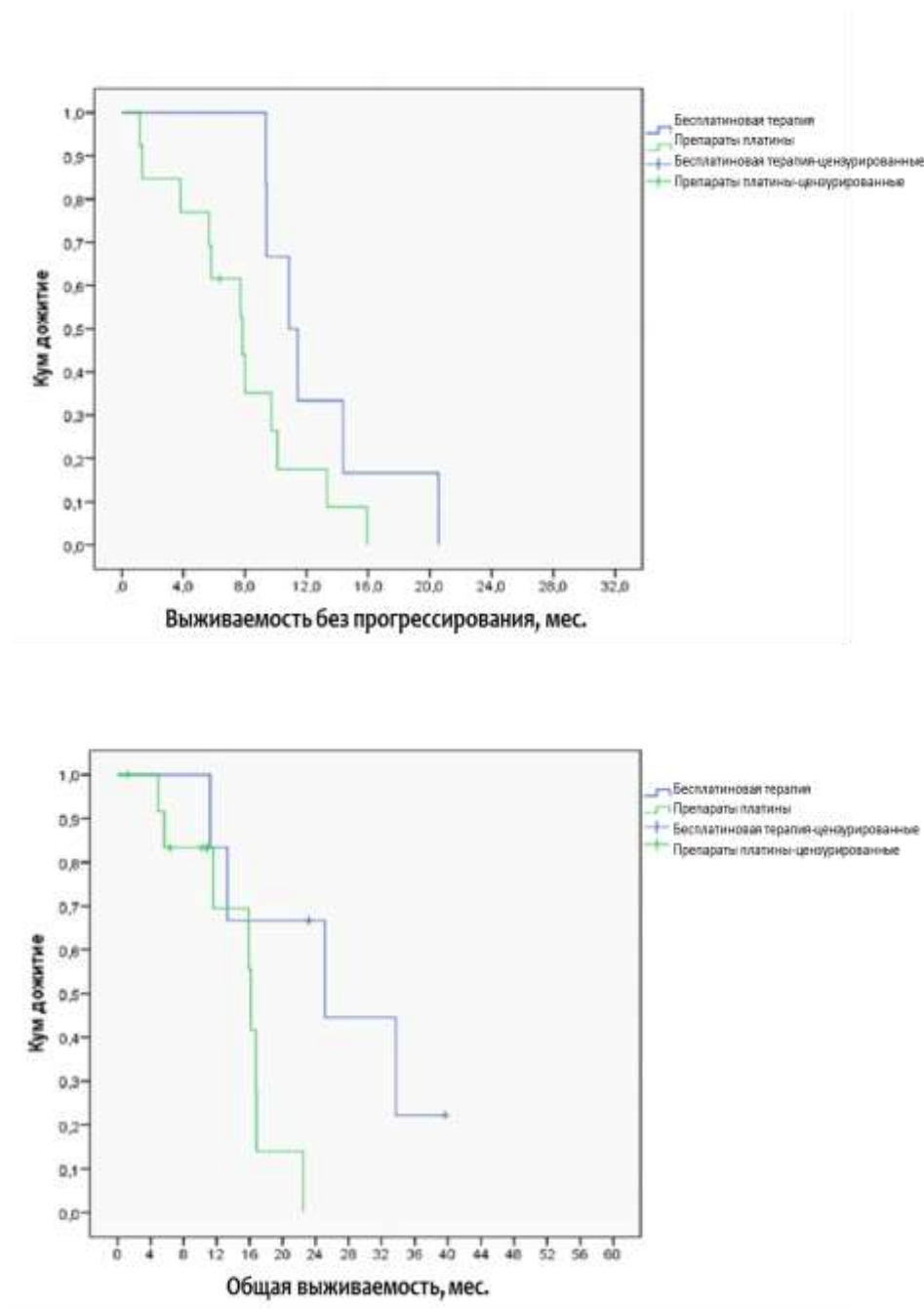
0,02-0,46,  $p < 0,01$ ). Медиана ОВ также оказалась выше в случае включения препаратов платины в схему химиотерапии и составила 22,9 мес., в то время как в случае применения бесплатинового режима – 9,0 мес. (OR=0,23, 95% ДИ 0,06-0,91,  $p=0,04$ ) (рисунок 3).



**Рисунок 3** – ВБП и 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

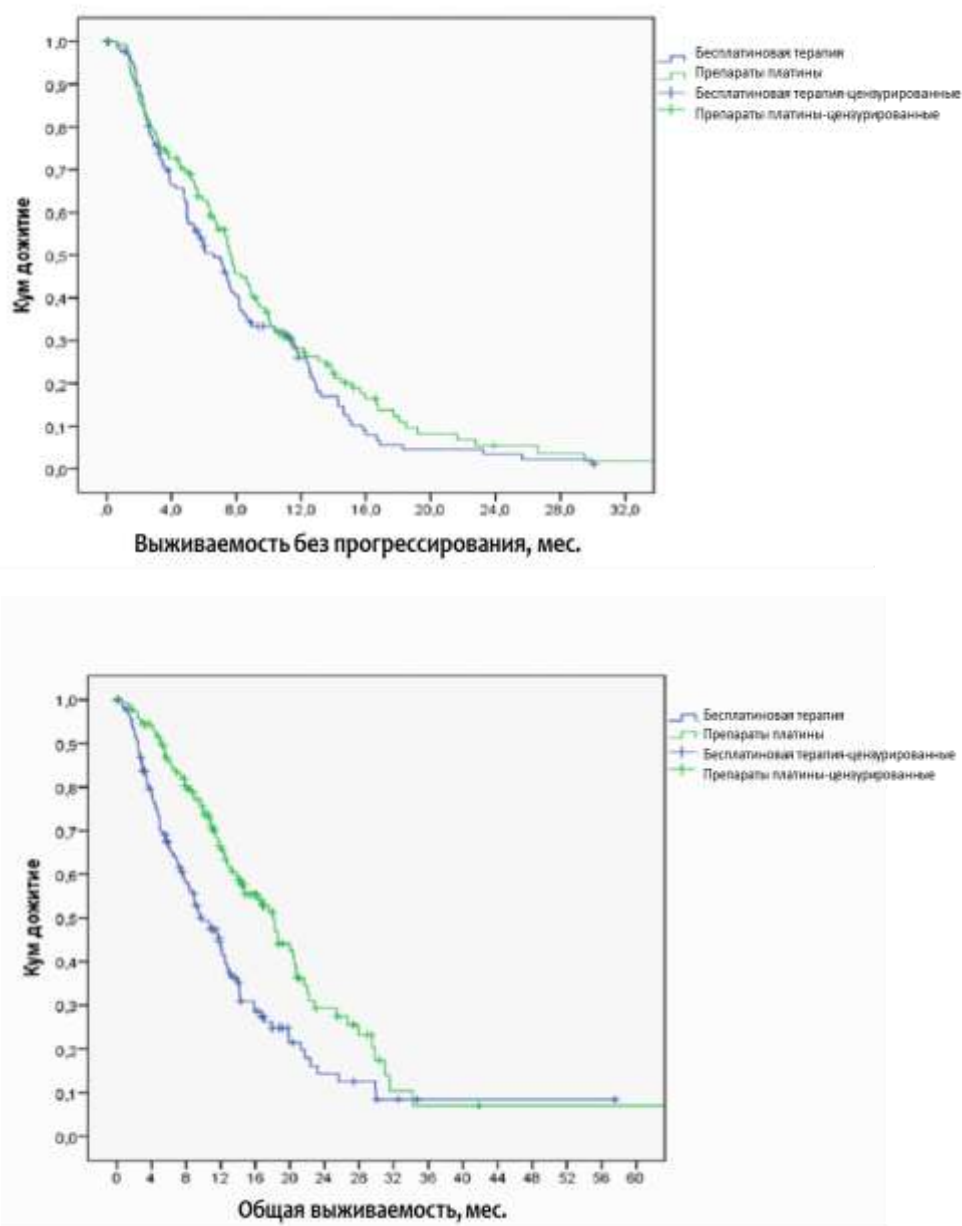
10,9 мес. (OR=2,46, 95% ДИ 0,85-7,13,  $p=0,1$ ) и 16,2 и 22,9 мес. (OR=4,71, 95% ДИ 0,95-23,37,  $p=0,06$ ), соответственно (рисунок 4).



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

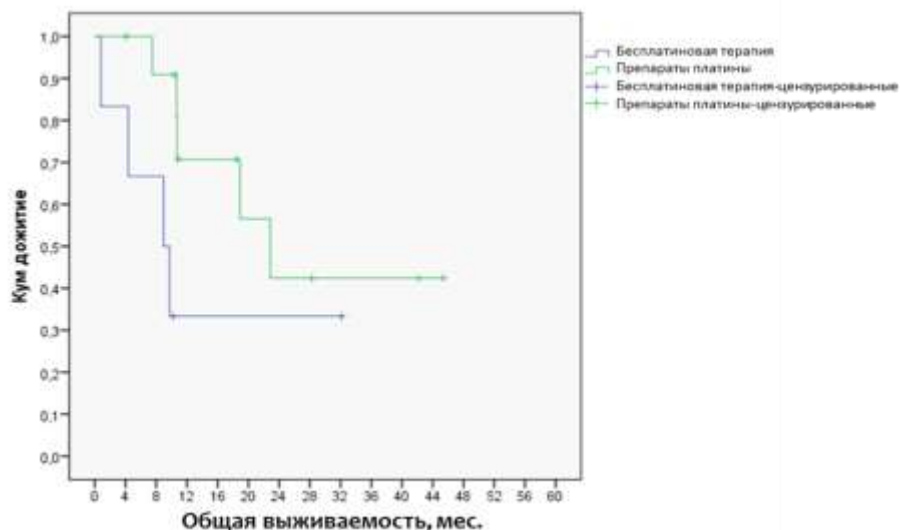
В случае дикого типа генов медианы ВБП статистически значимо не различались: 7,6 мес. для платиносодержащего режима и 6,6 мес. для

бесплатинового режима (OR=0,84, 95% ДИ 0,64-1,09,  $p=0,19$ ), в отличие от ОВ: 18,1 и 9,8 мес., соответственно (OR=0,56, 95% ДИ 0,41-0,75,  $p<0,01$ , рисунок 5).



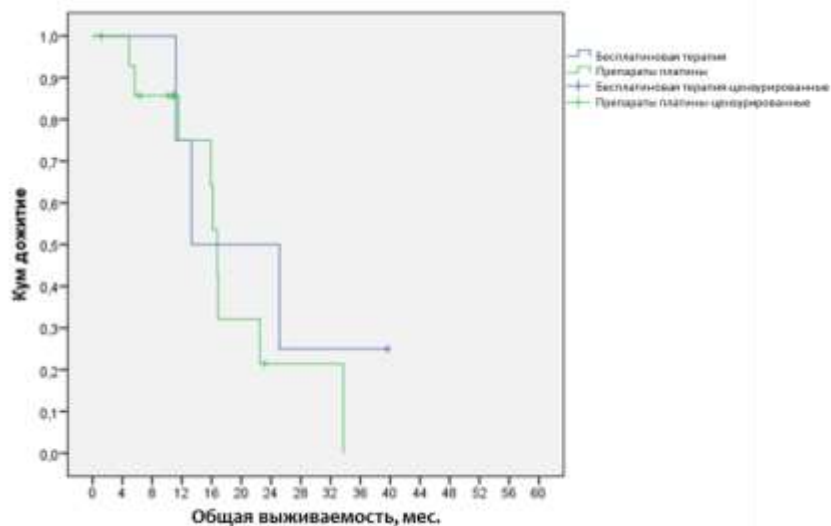
**Рисунок 5** – ВБП и ОВ пациентов с диким типом генов ГР в зависимости от применения препаратов платины в первой линии химиотерапии

Применение платиносодержащих препаратов в любой из линий химиотерапии также оказалось наиболее эффективным в группе пациентов с мутациями в генах *BRCA1/2* или *PALB2* (рисунок 6): 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,  $p=0,12$ ).



**Рисунок 6** – ОВ пациентов с мутациями в генах *BRCA1/2* или *PALB2* в зависимости от применения препаратов платины в любой из линий химиотерапии

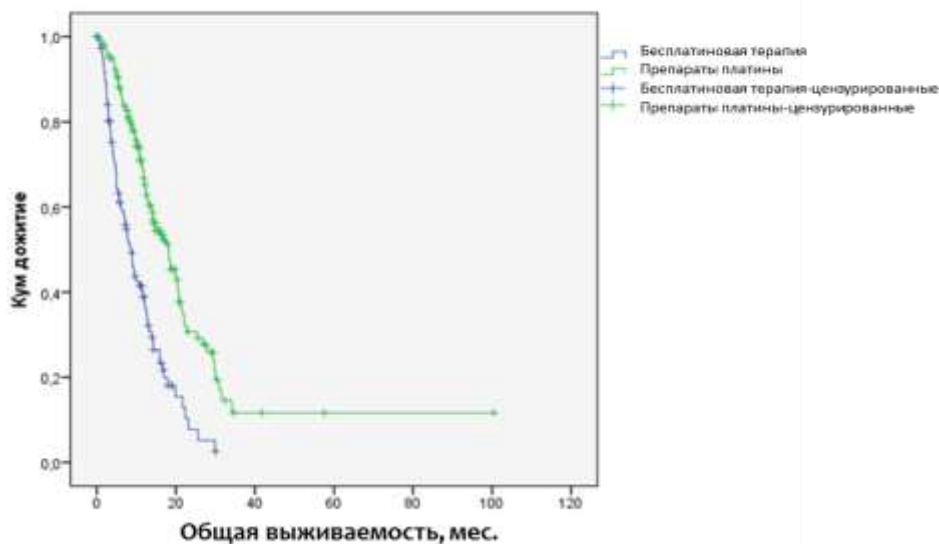
Продолжительность жизни пациентов с мутациями в генах ГР, отличных от *BRCA1/2* или *PALB2*, при использовании платиносодержащей терапии за весь период лечения оказалась несколько ниже, чем при ее отсутствии (рисунок 7): медианы ОВ составили 13,3 и 16,8 месяцев, соответственно (ОР=1,56, 95% ДИ 0,4-6,05,  $p=0,52$ ).



**Рисунок 7** – ОВ пациентов с мутациями в генах, отличных от *BRCA1/2* или *PALB2*, в зависимости от применения препаратов платины в любой из линий химиотерапии



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 (рисунок 8): медианы составили 18,2 и 8,8 мес., соответственно (OR=0,41, 95% ДИ 0,3-0,56,  $p<0,01$ ).



**Рисунок 8** – ОВ пациентов с диким типом генов ГР в зависимости от применения препаратов платины в любой из линий химиотерапии

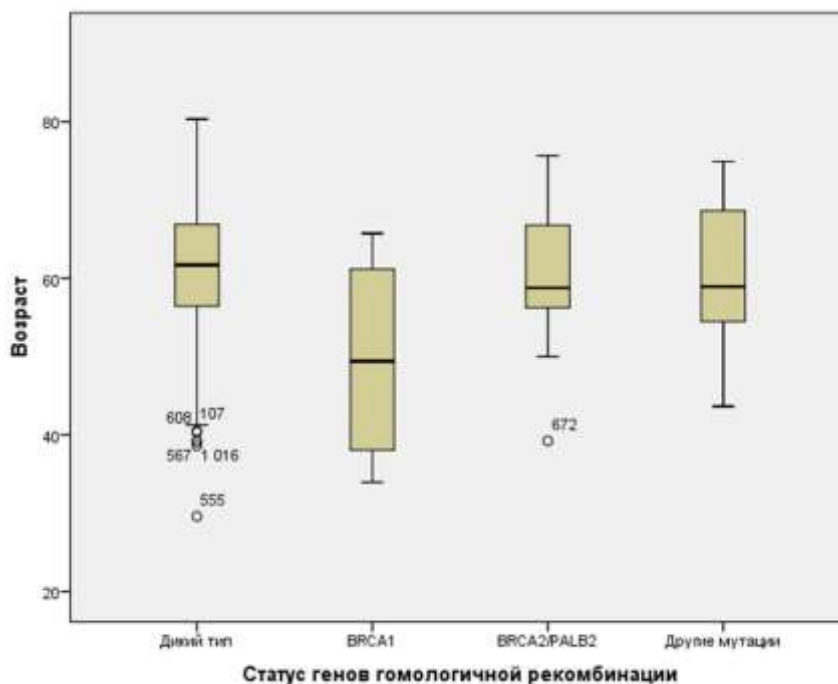
Однако, необходимо отметить, что при анализе применения препаратов платины в любой из трех линий химиотерапии существует риск ошибки, связанный с тем, что пациенты, получившие платиносодержащую схему лечения, имели больше линий химиотерапии, чем группа сравнения.

Таким образом, полученные данные указывают на то, что препараты платины наиболее эффективны в группе пациентов с мутациями в генах *BRCA1/2* или *PALB2*, что указывает на практическую значимость определения мутаций в данных генах.

### **3.1.2.3. Влияние возраста пациента и отягощенного наследственного анамнеза на наличие мутаций в генах гомологичной рекомбинации ДНК**

С целью определить показания к секвенированию генов ГР среди пациентов с РПЖ мы проанализировали как влияет возраст пациента на момент постановки

диагноза и онкологически отягощенный анамнез на наличие мутаций у 626 пациентов. На рисунке 9 представлено распределение пациентов по возрасту.



**Рисунок 9** – Коробочная диаграмма, указывающая распределение пациентов по возрасту на момент постановки диагноза РПЖ (горизонтальная линия на коробочных диаграммах – медиана, границы прямоугольников – квартили, границы линий – минимальные и максимальные значения, отдельными точками указаны значения возраста, существенно выбивающиеся из общей выборки с указанием порядкового номера пациента в базе)

В случае отсутствия мутаций в генах ГР медиана возраста составила 61 год (30-80 лет), в случае мутаций в генах ГР, отличных от *BRCA1/2* или *PALB2*, – 58 лет (44-75 лет). Более молодой возраст был отмечен среди пациентов с мутациями в гене *BRCA1*: медиана возраста составила 49 лет (34-66 лет). Однако, при мутациях в генах *BRCA2* и *PALB2* медиана возраста не отличалась от медианы возраста группы дикого типа генов ГР ДНК и составила 58 лет (39-76 лет).

Как видно из таблицы 8, риск выявления мутаций в генах *BRCA1/2* или *PALB2* повышен в 5,3 раз при наличии в анамнезе метакронных *BRCA*-ассоциированных опухолей. Пол пациента и отягощенность семейного анамнеза

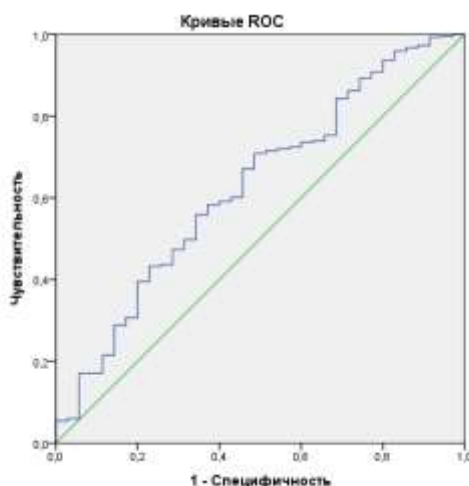
по *BRCA*-ассоциированным опухолям не показали влияния на риск носительства мутаций в генах *BRCA1/2* и *PALB2*.

**Таблица 8** – Влияние возраста и отягощенного семейного или персонального анамнеза по *BRCA*-ассоциированным опухолям на риск носительства мутаций в генах ГР

Фактор	Мутации в <i>BRCA1/2</i> или <i>PALB2</i>	
	ОР (95% ДИ)	p
Женский пол	1,67 (0,82-3,42)	0,16
Возраст	0,95 (0,92-0,99)	<0,01
Наличие родственников с РМЖ, РЯ, РПЖ или РПрЖ	1,56 (0,79-3,11)	0,2
Количество родственников с РМЖ, РЯ, РПЖ или РПрЖ		
0	--	0,3
1	2,03 (0,83-4,94)	0,12
2 и более	1,36 (0,62-2,96)	0,44
Наличие родственников 1ой степени родства с РМЖ, РЯ, РПЖ или РПрЖ	1,79 (0,90-3,54)	0,1
Наличие <i>BRCA</i> -ассоциированной метахронной опухоли	5,26 (1,99-13,96)	<0,01

95% ДИ – 95% доверительный интервал, ГР – гомологичная рекомбинация, ОР – отношение рисков, РМЖ – рак молочной железы, РПЖ – рак поджелудочной железы, РПрЖ – рак предстательной железы, РЯ – рак яичников

Помимо наличия метахронной *BRCA*-ассоциированной опухоли в анамнезе пациента возраст также оказался ассоциирован с повышенным риском носительства мутации в генах *BRCA1/2* и *PALB2*. Для определения порогового значения возраста построена ROC-кривая с зависимой переменной наличия мутации в генах *BRCA1/2* и *PALB2* и возраста в качестве проверяемой переменной (рисунок 10, таблица 9).



**Рисунок 10** – ROC-кривая, оценивающая влияние возраста на носительство мутаций в генах *BRCA1/2* или *PALB2*

**Таблица 9** – Статистика ROC-кривой по оценке влияния возраста на носительство мутаций в генах *BRCA1/2* или *PALB2*

Тестовая переменная	Площадь	Стд. ошибка	Значение p	95% ДИ	
				Нижняя граница	Верхняя граница
Возраст	0,63	0,05	0,12	0,53	0,72

При возрасте ниже 55 лет чувствительность составила 75,3% и специфичность 32,4%. В последующем данные факторы проанализированы в многофакторном регрессионном анализе Кокса, который показал, что только наличие метакронной *BRCA*-ассоциированной опухоли у пациента является независимым предиктором риска носительства мутации в генах *BRCA1/2* или *PALB2* (ОР 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.

### 3.2. Значимость определения циркулирующей опухолевой ДНК в плазме крови пациентов с раком поджелудочной железы

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

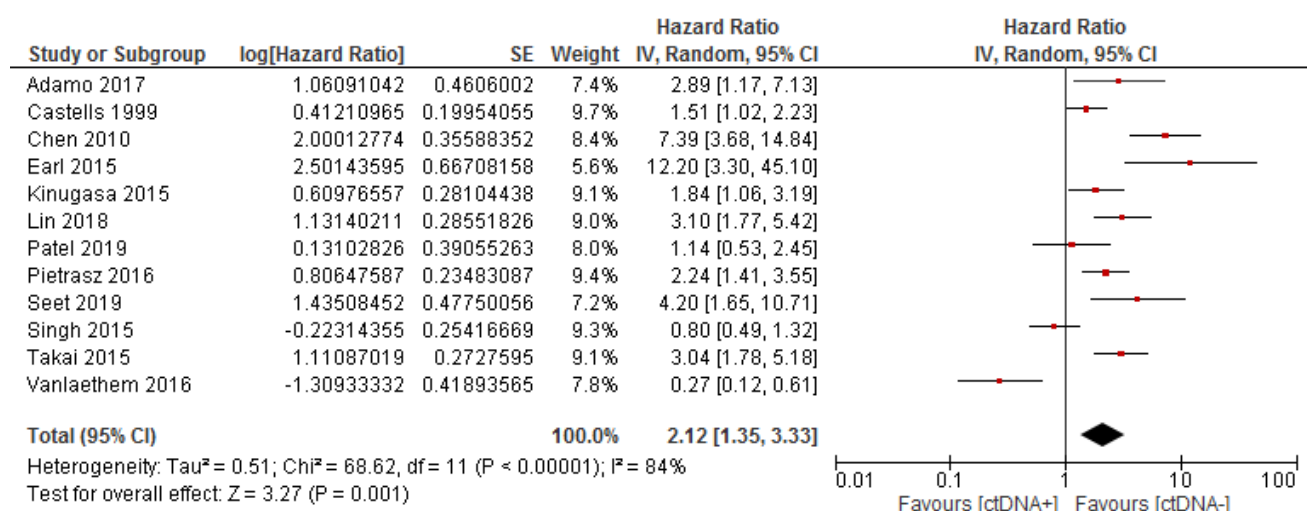
С целью оценки прогностической значимости цоДНК при РПЖ были просмотрены 117 полных текстов статей и тезисов. В 32 публикациях не были указаны ОР смерти и/или прогрессирования и 95% ДИ, оценивалась прогностическая значимость уровня цоДНК, фракции мутантного аллеля или различных точковых мутаций, а также дизайн исследования предусматривал оценку прогностической значимости цоДНК в процессе лечения или наблюдения. Итого 17 исследований были включены в мета-анализ (рисунок 11).



**Рисунок 11** – Стратегия поиска и отбора исследований для оценки прогностической значимости цоДНК при РПЖ

В 12 исследованиях оценивалось влияние цоДНК, выявленной до начала лечения, на ОВ пациентов вне зависимости от стадии и резектабельности заболевания. Выживаемость пациентов резектабельным РПЖ в зависимости от цоДНК, выявленной до и после хирургического лечения, оценивались в 5 и 3 исследованиях, соответственно. Характеристика и результаты включенных исследований представлена в таблицах 3 и 4.

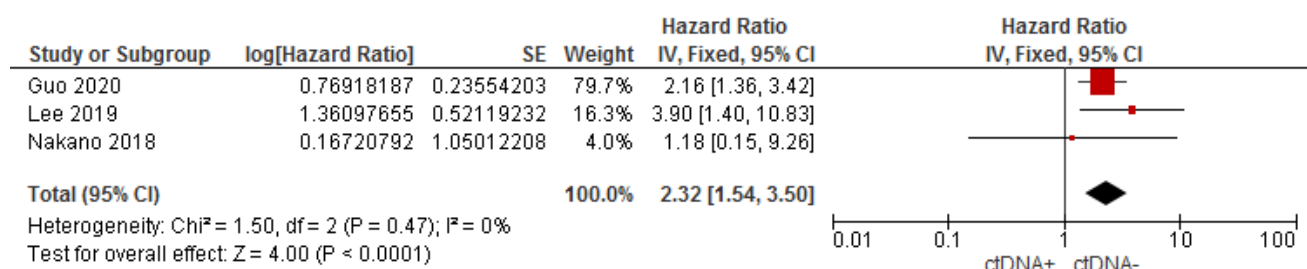
Тест на однородность результатов исследований, включенных в мета-анализ, показал наличие статистически значимых различий –  $p < 0,00001$  ( $I^2 = 84\%$ ), в связи с чем применялась модель случайных эффектов. При этом отмечено влияние наличия цоДНК в крови на ОВ –  $OR = 2,21$ , 95% ДИ 1,35-3,33,  $p = 0,001$  (рисунок 12). Другими словами выявление цоДНК в крови пациентов в 2 раза увеличивало риск их смерти. Существенных систематических ошибок, связанных с публикациями, не отмечено.



**Рисунок 12** – График форест-плот мета-анализа исследований по изучению влияния на общую выживаемость наличия цоДНК в плазме крови при всех стадиях заболевания

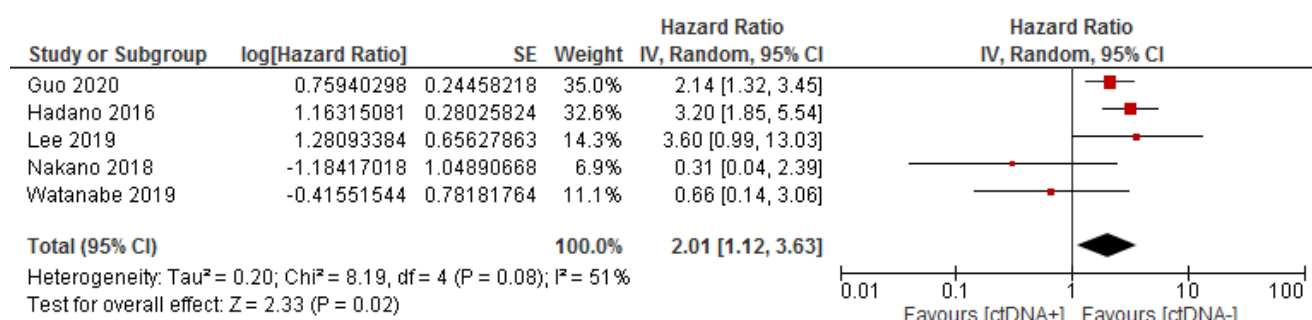
В 3 исследованиях оценивалось влияние цоДНК, определяемой в крови, взятой до выполнения хирургического этапа лечения, на ВВПЗ. Тест на однородность результатов исследований, включенных в мета-анализ, показал отсутствие статистически значимых различий –  $p = 0,47$  ( $I^2 = 0\%$ ), в связи с чем применялась модель с фиксированным эффектом. При этом выявлено негативное

влияние наличия цоДНК в плазме крови перед хирургическим лечением на ВБПЗ –  $OR=2,32$ , 95% ДИ 1,54-3,5,  $p<0,0001$  (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 перед хирургическим лечением на ВБПЗ

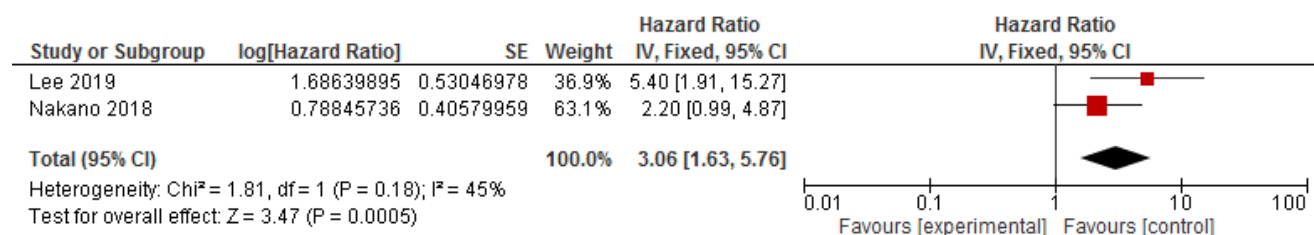
В 5 исследованиях оценивалось влияние цоДНК, определяемой до начала операции, на ОВ пациентов. Тест на однородность результатов исследований, включенных в мета-анализ, показал наличие значимых различий –  $p=0,08$  ( $I^2=51\%$ ), в связи с чем применялась модель случайных эффектов. При этом выявлено негативное влияние наличия цоДНК в плазме крови перед хирургическим лечением на ОВ –  $OR=2,01$ , 95% ДИ 1,12-3,63,  $p=0,02$  (рисунок 14). Существенных систематических ошибок, связанных с публикациями, не отмечено.



**Рисунок 14** — График форест-плот мета-анализа исследований по изучению влияния наличия цоДНК в плазме крови перед хирургическим лечением на ОВ

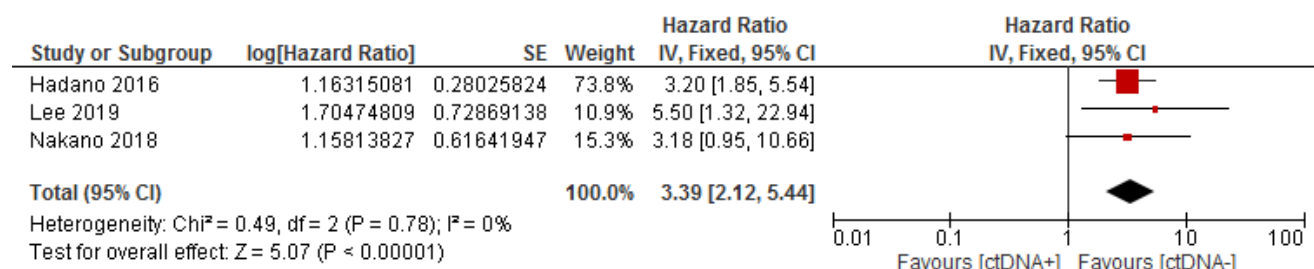
В двух исследованиях представлены данные ВБПЗ при определении цоДНК в крови пациентов после операции. Тест на однородность результатов

исследований, включенных в мета-анализ, показал отсутствие статистически значимых различий –  $p=0,18$  ( $I^2=45\%$ ), в связи с чем применялась модель с фиксированным эффектом. При этом выявлено негативное влияние наличия цоДНК в плазме крови после хирургического лечения на ВБПЗ –  $OR=3,06$ , 95% ДИ 1,63-5,76,  $p=0,0005$  (рисунок 15). Существенных систематических ошибок, связанных с публикациями, не отмечено.



**Рисунок 15** – 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. Тест на однородность результатов исследований, включенных в мета-анализ, показал отсутствие статистически значимых различий –  $p=0,78$  ( $I^2=0\%$ ), в связи с чем применялась модель с фиксированным эффектом. При этом выявлено негативное влияние наличия цоДНК в плазме крови после хирургического лечения на ОВ –  $OR=3,39$ , 95% ДИ 2,12-5,44,  $p<0,00001$  (рисунок 16). Существенных систематических ошибок, связанных с публикациями, не отмечено.



**Рисунок 16** – График форест-плот мета-анализа исследований по изучению влияния наличия цоДНК в плазме крови после хирургического лечения на ОВ

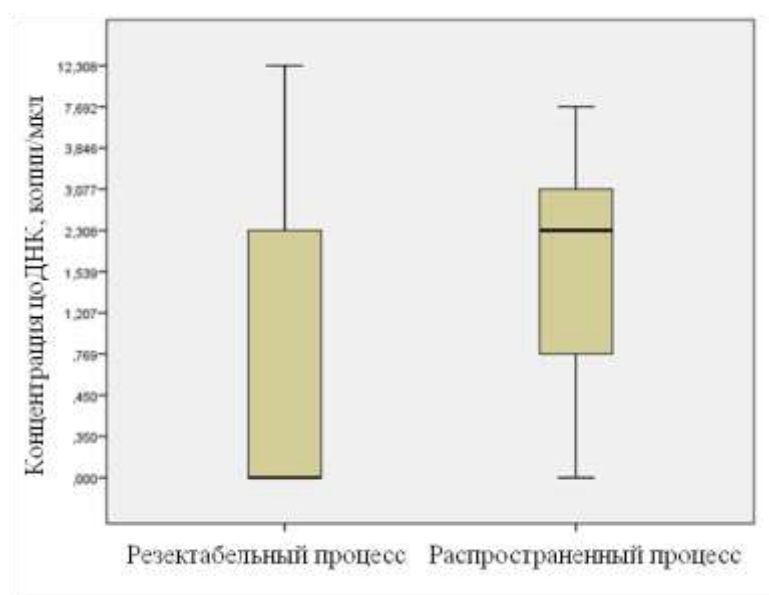


Полученные результаты показали, что наличие цоДНК в плазме крови как при локальном, так и при распространенном РПЖ, является негативным прогностическим фактором. Небольшое количество исследований, посвященных влиянию цоДНК на прогноз пациентов резектабельным РПЖ, отсутствие унифицированной методологии определения цоДНК в крови послужило поводом для проведения нами собственного исследования.

### **3.2.2. 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**

Достаточное количество опухолевого материала для выполнения анализа было обнаружено в 64 образцах первичной опухоли. В 62 из них концентрация ДНК была выше минимально допустимой 0,6 нг/мкл (при данной концентрации реакционная смесь для приготовления библиотеки содержит около 1000 копий генома). Чувствительность тестирования, определяемая как доля образцов, в которых определялась хотя бы одна мутация, составила 64,4%.

Минимально допустимой концентрацией ДНК в образце плазмы считали 0,3 нг/мкл, так как концентрация цоДНК в плазме не высока и при использовании более высокого порога исключалась почти треть образцов. Максимально допустимой концентрацией считали 10 нг/мкл. В случаях, когда наблюдается большая концентрация ДНК в образце, можно предположить контаминацию образца геномной ДНК лейкоцитов. Пороговое значение 10 нг/мкл было определено при сопоставлении распределения длин фрагментов ДНК в образце и концентрации ДНК. 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,  $p=0,005$ ) (рисунок 17).



**Рисунок 17** – Коробочная диаграмма, представляющая распределение пациентов по концентрации цоДНК в плазме крови (горизонтальная линия – медиана, границы прямоугольников – квартили, границы линий – минимальные и максимальные значения)

Для оценки влияния цоДНК на прогноз пациентов с резектабельным РПЖ были отобраны пациенты, которым выполнено хирургическое лечение, и забор крови осуществлялся до и после операции. В случае получения неоадьювантной терапии забор крови для исследования производился до ее начала. Характеристика 37 включенных пациентов представлена в таблице 10.

**Таблица 10** – Характеристика пациентов, прооперированных по поводу резектабельного РПЖ (n=37)

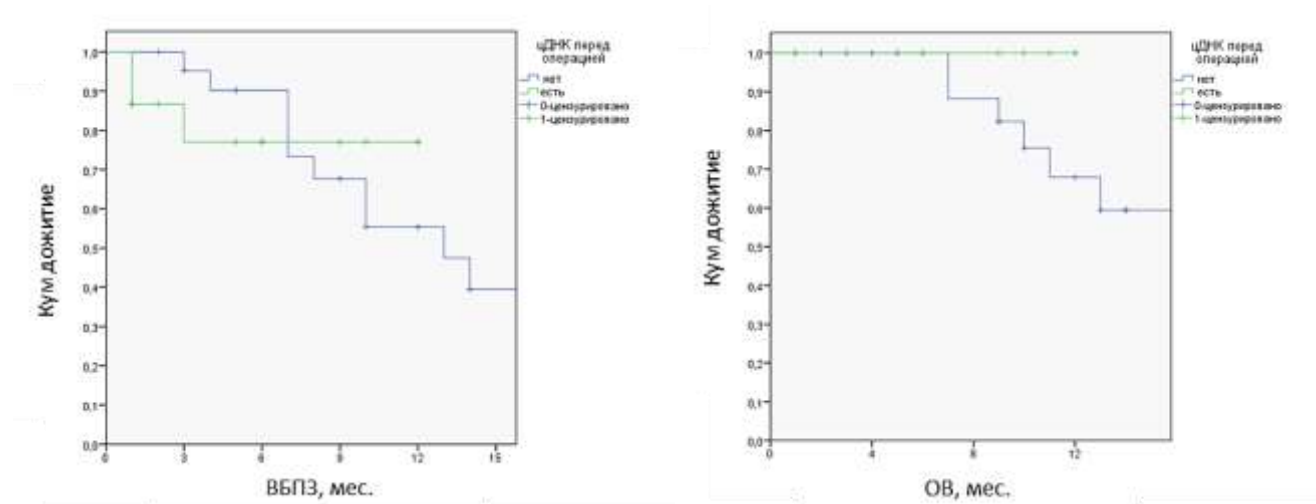
Параметр	Пациенты
Пол, n (%)	
Женщины	23 (62,2%)
Мужчины	14 (37,8%)
Стадия, n (%)	
I	2 (5,4%)
II	28 (75,7%)
III	7 (18,9%)

Продолжение таблицы 10

Параметр Т	
0	0
1	0
2	3 (8,1%)
3	28 (75,7%)
4	6 (16,2%)
Параметр N	
0	19 (51,4%)
1	18 (48,6%)
Проведенное лечение	
Лучевая терапия	0
Неoadъювантная химиотерапия	5 (13,5%)
Адъювантная химиотерапия	29 (78,4%)

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 Т ( $k = -0,02$ ,  $p=0,9$ ;  $OR=0,9$ , 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,  $p=0,4$ ).

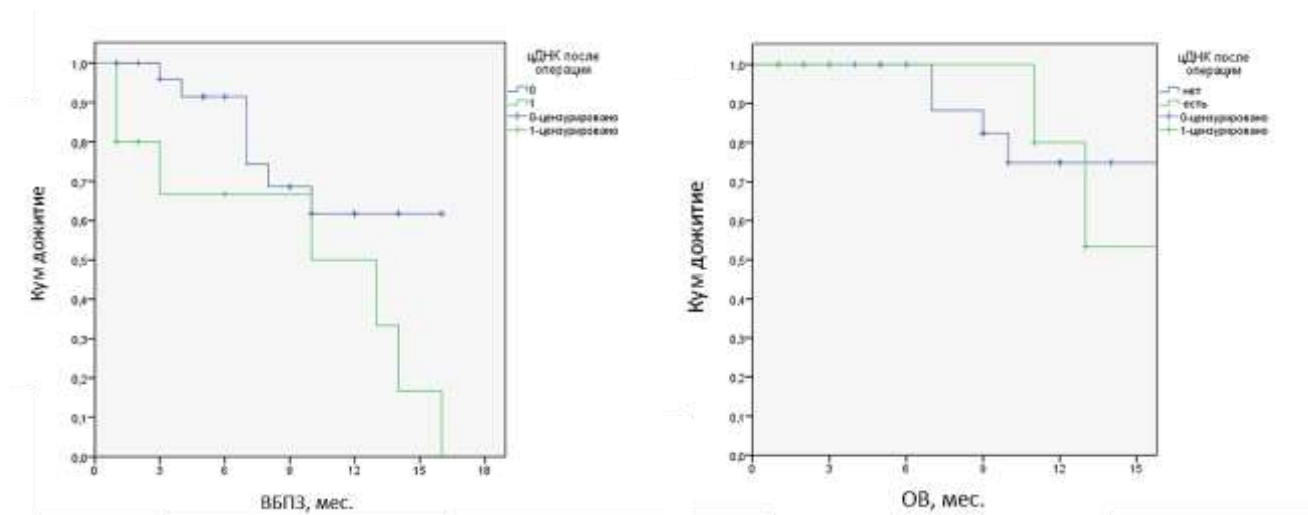
Медиана длительности наблюдения составила 9 мес. (1-17 мес.). Наличие цоДНК до операции не оказало влияние на ВБПЗ ( $OR=1,0$ ,  $p=0,9$ ) и ОВ ( $OR=0,02$ ,  $p=0,4$ ) (рисунок 18).



**Рисунок 18** – ВБПЗ и ОВ пациентов резектабельным РПЖ при определении цоДНК до операции

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 ( $k$  0,34,  $p=0,04$ ;  $OR=5,4$ , 95% ДИ 1,01-28,5,  $p=0,05$ ), параметром Т ( $k$  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 ( $k$  0,07,  $p=0,3$ ), проведением неоадьювантной терапии ( $k$  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,  $p=0,04$ ), но не на показателе ОВ ( $OR=1,2$ , 95% ДИ 0,2-6,6,  $p=0,8$ ) (рисунок 19). 6-месячная ВБПЗ в группе наличия или отсутствия цоДНК после операции составила 66% и 91%, соответственно.



**Рисунок 19** – ВБПЗ и ОВ пациентов резектабельным РПЖ при определении цоДНК после операции

Наличие цоДНК после операции было связано с высокой частотой прогрессирования независимо от проведения адъювантной химиотерапии (таблица 11).

**Таблица 11** – 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. Помимо этого высокая концентрация цоДНК в крови может указывать на распространенность процесса.

## ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ

В связи с низкой эффективностью системной терапии при РПЖ в последние годы активно изучаются возможные прогностические и предиктивные факторы с целью попытки индивидуализации терапии и улучшения результатов лечения. Полногеномное секвенирование образцов РПЖ позволило выделить 4 молекулярных подтипа, один из которых характеризуется дефицитом ГР и, как следствие, чувствительностью к препаратам платины [149]. Также было показано, что риск развития РПЖ повышен в случае носительства мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2* [24; 114; 140]. В связи с этим определение мутаций в генах ГР важно не только для определения тактики лечения пациента, но также для скрининга его родственников на вероятность носительства мутаций и наличия наследственного синдрома. Также известно, что структура мутаций при РПЖ отличается от РМЖ и РЯ: СНП позволило выявить мутации в генах ГР, таких как *BAP1*, *BRCA1*, *BRCA2*, *CHEK2*, *PALB2*, *NBN*, в 13,5% случаев [57; 168]. Нами была инициирована работа по определению частоты и структуры мутаций в генах ГР и оценке их практической значимости в российской популяции пациентов РПЖ. Данная часть работы проведена в рамках экспериментального государственного задания Министерства здравоохранения Российской Федерации, предварительные результаты которой были опубликованы ранее [4; 5].

Мы проспективно провели полноэкзомное секвенирование 20 генов ГР у 626 пациентов РПЖ. Частота мутаций в исследованных генах составила 12%, при этом чаще всего встречались мутации в гене *BRCA2* (3,2%). Следующими по частоте встречаемости мутаций оказались гены *BRCA1* (1,6%), *ATM* (2,1%), *NBN* (1,8%) и *PALB2* (0,8%), что соответствует данным мировой литературы [78; 120; 130; 149]. Мутации в остальных генах ГР встречались в единичных случаях. Только 14,3% выявленных с помощью высокопроизводительного секвенирования мутаций в генах *BRCA1/2* могут быть определены с помощью ПЦР. Таким образом, отличие паттерна мутаций в генах ГР ДНК при РПЖ от такового при РМЖ и РЯ указывает на неэффективность существующих на данный момент тест-

систем. В связи с низкой доступностью секвенирования на следующем этапе была поставлена задача определить значимость мутаций в генах ГР ДНК и показания к их определению.

Для оценки прогноза в зависимости от мутационного статуса пациенты были разделены на три группы: в первую группу вошли пациенты с мутациями в генах *BRCA1*, *BRCA2* и *PALB2*, во вторую группу – с мутациями в других генах ГР и в третью – пациенты с диким типом проанализированных генов. Подобное разделение обусловлено тем, что *BRCA1/2* и *PALB2* являются наиболее изученными генами ГР с клинической точки зрения. Данных о прогностической значимости других генов ГР недостаточно в связи с редкой частотой их определения. Так, в исследовании Sehdev и соавт. в 33,3% случаев (n=36) были выявлены герминальные или соматические мутации в *BRCA1* (19,4%), *BRCA2* (13,9%), *PALB2* (8,3%), *MSH2* (2,8%) и *FANCF* (2,8%). В остальных исследуемых генах (*CHEK1*, *CHEK2*, *RAD51*, *MLH1*, *ERCC1*, *ERCC4*, *PARP1*, *ATR* и *MDC1*) мутации не были обнаружены. Все пациенты были прооперированы и при прогрессировании в качестве терапии первой линии получили режим FOLFIRINOX. Медиана ОБ оказалась выше в случае наличия мутаций в генах ГР, чем при диком типе генов: 14 и 5 мес., соответственно, однако, различие не достигло статистической значимости (OR=0,58, 95% ДИ 0,29-1,14, p=0,08). При анализе ОБ пациентов с мутациями только в генах *BRCA1/2* медиана также оказалась выше, чем при диком типе генов ГР: 15 и 5 мес., соответственно (OR=0,64, 95% ДИ 0,32-1,29, p=0,17) [125]. В другое ретроспективное исследование были включены 133 пациента с метастатическим РПЖ, 95 из них получили в качестве первой линии терапии режим FOLFIRINOX и 38 – гемцитабин в комбинации с наб-паклитакселом (паклитаксел+[альбумин]). С помощью СНП герминальные мутации в генах *BRCA1* (n=2) и *BRCA2* (n=2) выявлены в 3% случаев. Также в низком проценте случаев выявлены мутации в других генах ГР: *ATM* (n=3), *PALB2* (n=1), *ERCC4* (n=2) и *CHEK2* (n=4). Медиана ОБ 10 пациентов с патогенной мутацией в генах *ATM*, *BRCA1*, *BRCA2*, *ERCC4*, *PALB2* оказалась выше по сравнению с пациентами с диким типом данных генов:



17,9 и 9,6 мес. ( $p=0,03$ ) [60]. Помимо этого имеются данные, что опухоли с мутациями в гене *ATM* могут не обладать фенотипом, характерным для опухолей с дефицитом ГР [155]. Результаты других исследований по оценке продолжительности жизни пациентов с дефицитом ГР оказались также противоречивы – одни авторы показали негативное влияние мутаций генов ГР на прогноз пациентов РПЖ [23], другие, напротив, представили улучшение прогноза в случае наличия мутаций [60; 113]. В нашем исследовании при оценке выживаемости трех групп пациентов с резектабельным РПЖ значимых различий не обнаружено: медианы ОБ 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 ( $p=0,77$ ). После публикации исследования ACCORD в рекомендации по лечению РПЖ в качестве терапии выбора при удовлетворительном статусе пациентов был включен оксалиплатин-содержащий режим FOLFIRINOX [37], однако, ограничением к применению данного режима является его высокая токсичность. Исследования III фазы комбинаций гемцитабина с цисплатином или оксалиплатином, 5-фторурацила с оксалиплатином не показали столь высокой эффективности в первой и второй линиях химиотерапии РПЖ [34; 52; 110]. Тем не менее, применение препаратов платины в отобранной группе пациентов с *BRCA*-ассоциированным РПЖ приводило к значимому улучшению выживаемости пациентов [23; 56; 153]. Помимо этого применение PARP-ингибитора олапариба при *BRCA*-ассоциированном РПЖ в качестве поддерживающей терапии после успешной платиносодержащей химиотерапии привело к статистически значимому улучшению ВБП и ЧОЭ по сравнению с плацебо [54]. Мы также проанализировали выживаемость пациентов с распространенным РПЖ в зависимости от мутационного статуса и получения препаратов платины в составе комбинированного лечения. ЧОЭ при применении препаратов платины в первой линии терапии в группе мутаций *BRCA1/2* и *PALB2* достигла 54,5%, в то время как в группе мутаций в других генах ГР – 30,8% и в группе дикого типа генов ГР – 17,4% ( $p=0,01$ ). Мутации в генах ГР ДНК также влияли на ЧОЭ при

использовании бесплатиновых режимов в первой линии химиотерапии распространенного РПЖ ( $p=0,05$ ). Применение в первой линии химиотерапии платиносодержащих схем лечения в группе пациентов с мутациями *BRCA1/2* и *PALB2* позволило достигнуть увеличения медианы ВБП с 8,3 мес. до 12,7 мес. ( $p<0,01$ ), а медианы ОВ с 9 мес. до 22,9 мес. ( $p=0,04$ ). Мутации в других генах ГР не оказали влияния на эффективность препаратов платины в первой линии терапии: медианы 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,  $p=0,1$ ) и 16,2 и 22,9 мес. ( $OR=4,71$ , 95% ДИ 0,95-23,37,  $p=0,06$ ), соответственно. При диком типе генов ГР медиана ОВ оказалась статистически значимо выше при применении платиновых агентов ( $OR=0,56$ , 95% ДИ 0,41-0,75,  $p<0,01$ ), однако, медианы ВБП для платиносодержащих и бесплатиновых режимов не различались ( $OR=0,84$ , 95% ДИ 0,64-1,09,  $p=0,19$ ). Применение препаратов платины в любой из линий химиотерапии в группе пациентов с мутациями в генах *BRCA1/2* и *PALB2* привело к увеличению продолжительности жизни пациентов: медиана ОВ при получении препаратов платины составила 22,9 мес., при получении других схем терапии – 9,0 мес., однако, различие не достигло статистической значимости ( $OR=0,34$ , 95% ДИ 0,09-1,32,  $p=0,12$ ). В группе пациентов с мутациями в генах ГР, отличных от *BRCA1/2* или *PALB2*, применение платиносодержащей схемы лечения за весь период лечения не привело к увеличению ОВ ( $OR=1,56$ , 95% ДИ 0,4-6,05,  $p=0,52$ ). При отсутствии мутаций в генах ГР медиана ОВ при применении препаратов платины в любой из линий лечения составила 18,2 мес., что статистически значимо выше, чем при бесплатиновой терапии – 8,8 мес. ( $OR=0,41$ , 95% ДИ 0,3-0,56,  $p<0,01$ ).

Согласно данным проведенного нами ранее систематического обзора и мета-анализа средневзвешенная медиана ОВ пациентов с распространенным РПЖ выше в случае сопутствующего дефицита ГР, чем при его отсутствии: 19,8 и 15,6 мес., соответственно. Применение платиновых агентов в плане терапии пациентов с мутациями в генах ГР привело к увеличению продолжительности жизни по сравнению с пациентами с диким типом генов: 23,8 и 17,1 мес., соответственно.

Если же пациенты при дефиците ГР не получали препараты платины за весь период лечения медиана выживаемости была ниже и составила 8,3 мес. против 12,0 мес. при отсутствии дефицита ГР [109]. Таким образом, генетическое тестирование пациентов РПЖ позволяет выделить группу пациентов, а именно с мутациями в генах *BRCA1/2* или *PALB2*, которые смогут получить наибольшую выгоду от применения препаратов платины.

В связи с низкой доступностью СНП нами была выполнена попытка определить критерии, на основании которых можно было бы рекомендовать пациентам генетическое тестирование. Пол пациента и отягощенность семейного анамнеза по *BRCA*-ассоциированным опухолям не показали влияния на риск носительства мутаций в генах *BRCA1/2* и *PALB2* в отличие от наличия в анамнезе *BRCA*-ассоциированной метахронной опухоли ( $p < 0,01$ ) и возраста пациента ( $p < 0,01$ ). Согласно результатам многофакторного анализа только наличие метахронной *BRCA*-ассоциированной опухоли у пациента явилось 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 (OR=1,44, 95% ДИ 0,66-3,14,  $p = 0,35$ ). Однако при отсутствии метахронных 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 *BRCA*-ассоциированных злокачественных опухолей. Полученные нами результаты не противоречат данным мировой литературы: медиана возраста пациентов с мутациями в генах *BRCA1/2* статистически не отличалась от данного показателя среди пациентов с диким типом генов ГР [49; 55; 120]. Наличие отягощенного семейного анамнеза или метахронных опухолей также не показали влияния на наличие мутаций *BRCA1/2* [60; 66; 86; 113]. В исследовании Goldstein и соавт. было выполнено секвенирование герминальной ДНК с применением 263-генной панели 133 пациентам с метастатическим РПЖ. Почти половина пациентов ( $n=56$ ) имели отягощенный семейный анамнез по *BRCA*-ассоциированным опухолям. Только среди пациентов, имевших трех и более родственников с *BRCA*-ассоциированной опухолью, наблюдалась

тенденция к наличию патогенной мутации в генах системы репарации ДНК (ОР=4,53, 95% ДИ 0,86-23,85,  $p=0,08$ ) [60]. Нужно помнить, что наследственный анамнез является субъективным критерием, и большая часть пациентов затрудняется ответить на вопрос о наличии онкологических заболеваний среди родственников. Как было показано в ряде исследований, локализацию первичной опухоли в случае заболевания родственника первой степени родства правильно указывали 78-95% пациентов, для второй степени родства показатель еще ниже – 53-67% [89; 102; 160]. Что касается ретроспективно собранных данных, то в большинстве случаев данные об отягощенности семейного анамнеза отсутствовали в электронных историях болезни. Таким образом, нам не удалось определить критерии, согласно которым тестирование на наличие мутаций в генах *BRCA1/2* или *PALB2* не показано. Согласно новым рекомендациям NCCN и ASCO генетическое консультирование рекомендовано всем пациентам РПЖ, однако, применение секвенирования ограничено дороговизной метода. В связи с тем, что на данный момент не существует тест-систем на основе ПЦР, которые бы позволили выявить релевантные мутации в генах ГР, представляется целесообразным проведение секвенирования лишь генов *BRCA1/2* и *PALB2*.

К недостаткам нашего исследования относится отсутствие разделения обнаруженных мутаций на герминальные и соматические. В исследовании Park и соавт. влияние химиотерапии первой линии с включением препаратов платины оценивалось отдельно в подгруппе с герминальными мутациями ( $n=52$ , 11,3%) и в подгруппе с соматическими мутациями ( $n=42$ , 9,1%) в генах ГР при распространенном РПЖ. Подгрупповой анализ показал, что медиана ОВ пациентов была выше в подгруппе пациентов с герминальными мутациями по сравнению с их отсутствием (медиана ОВ не достигнута против 17,9 мес., ОР=0,47,  $p=0,004$ ), однако, разницы в ОВ между группой соматических мутаций и дикого типа обнаружено не было (18,3 против 20,6 мес., ОР=1,12,  $p=0,666$ ) [103]. Также мы не оценивали в отдельности эффективность оксалиплатин- и цисплатин-содержащих режимов химиотерапии, так как почти все пациенты в нашем исследовании получали оксалиплатин-содержащие схемы химиотерапии.

В исследовании Wattenberg и соавт. оценивалась ЧОЭ при применении различных платиносодержащих схем среди пациентов с местно-распространенным и метастатическим РПЖ с мутациями в генах *BRCA1/2* или *PALB2*. ЧОЭ среди пациентов, получавших FOLFIRINOX, составила 60%, FOLFOX – 50% и гемцитабин в комбинации с цисплатином – 66,7% ( $p=0,814$ ). В контрольной же группе объективные эффекты наблюдались только при применении режима FOLFIRINOX [153]. Таким образом, наибольшую выгоду от применения препаратов платины имеют пациенты с дефицитом ГР независимо от интенсивности режима. Также требует дальнейшего изучения эффективность платиносодержащих режимов в адъювантном режиме при *BRCA*-ассоциированном резектабельном РПЖ.

К одной из важных проблем метода «жидкостной биопсии» является дискордантность мутационного статуса цоДНК и ДНК первичной опухоли. По данным проведенного нами мета-анализа выявлены различия в мутационном статусе цоДНК и опухолевого материала 16% ( $OR=0,84$ , 95% ДИ 0,78-0,90,  $p<0,00001$ ) (в печати). Полученные результаты можно объяснить несколькими причинами. Одной из методологических проблем является точность определения специфических мутаций в очень малом количестве копий цДНК среди большого количества цДНК дикого типа. Повышение концентрации цДНК наблюдается при множестве других болезней и после интенсивных тренировок [19; 111]. В связи с этим измерение общего уровня цДНК не имеет клинической значимости в связи с низкой чувствительностью такого метода [72]. Однако, появление новых технологий позволило определять опухоль-ассоциированные генетические и эпигенетические нарушения в цоДНК, давая возможность применять метод в диагностике и мониторинговании ответа на лечение. Мутации *KRAS* обнаруживались в цДНК в случае хронического панкреатита (4,3%,  $n=14$ ) и у здоровых людей (3,7%,  $n=6$ ), хоть и со значительно меньшей аллельной нагрузкой. Большинство мутаций *KRAS* в этом случае также локализовались в 12 кодоне [28]. К тому же отсутствуют стандартизированные репродуцируемые протоколы выделения ДНК из крови. К преаналитическим проблемам относятся

тип образца (плазма или сыворотка), процедура формирования коллекции (время до обработки цельной крови, тип пробирок для ее хранения, протокол центрифугирования) и метод изолирования и очистки цоДНК. Было показано, что количество ДНК, изолированной из сыворотки, было значительно выше, чем из плазмы [17; 145]. В основном это результат сворачивания крови и выброса ДНК клеток крови в процессе изолирования сыворотки. В связи с этим плазма является предпочтительным источником для выделения цоДНК. Если обработка образца совершается в течение 6 часов после взятия цельной крови, то для взятия образца могут подойти стандартные пробирки с ЭДТА. Однако, если процесс обработки откладывается до 48 часов, необходимы специальные пробирки с консервантом, стабилизирующим ядродержащие клетки, для снижения контаминации образца геномной ДНК, выделяющейся при лизисе лейкоцитов [151]. Также на данный момент рекомендовано хранить в замороженном виде изолированную плазму, а не цельную кровь [44].

Большое влияние на результат генетического тестирования оказывает гетерогенность опухоли, в связи с которой в кровь могут выбрасываться нуклеиновые кислоты различных опухолевых клонов. Так, в исследовании Adamo и соавт. у 8 пациентов были доступны различные области опухоли для выполнения СНП. Только в 2 случаях во всех образцах опухоли обнаруживалась мутация *KRAS* [15]. Хотя и было показано, что 90% пациентов с РПЖ имеют мутации *KRAS* в 12, 13 и 61 кодонах, также были обнаружены мутации в других кодонах, представленных в базе данных COSMIC для других типов злокачественных опухолей [28].

Чувствительность различных методик, позволяющих выявить мутации *KRAS* (отношение мутантного и дикого типа гена), отличается: для прямого секвенирования – 10-30%, для СНП – 10%, а для кцПЦР – 0,01%. Комбинация двух и более методов диагностики РПЖ (тонкоигольная аспирационная биопсия, ЦОК, цоДНК, СА 19-9) привела к увеличению чувствительности до 78%, а специфичности до 91% [124]. В другом исследовании анализ цоДНК совместно с СА 19-9 позволил повысить чувствительность диагностики до 91% [40].

Применение 54-генной панели СНП позволило повысить диагностическую точность цоДНК до 97,7% среди 17 пациентов со злокачественными опухолями панкреатобилиарной системы III-IV стадии [159].

Мы провели мета-анализ исследований, посвященных прогностической значимости цоДНК при РПЖ. Наличие цоДНК до начала лечения вне зависимости от распространенности заболевания увеличивало риск смерти пациентов в 2 раза ( $OR=2,21$ , 95% ДИ 1,35-3,33,  $p=0,001$ ). В случае резектабельного процесса выявление цоДНК как до, так и после хирургического лечения, негативно влияло на ВБПЗ ( $OR=2,32$ , 95% ДИ 1,54-3,5,  $p<0,0001$  и  $OR=3,06$ , 95% ДИ 1,63-5,76,  $p=0,0005$ , соответственно) и ОВ ( $OR=2,01$ , 95% ДИ 1,12-3,63,  $p=0,02$  и  $OR=3,39$ , 95% ДИ 2,12-5,44,  $p<0,00001$ , соответственно) пациентов. Мы провели собственное исследование прогностической значимости цоДНК при резектабельном процессе, в которое вошли 37 пациентов. Согласно полученным нами данным цоДНК перед операцией выявлена в 40,5% случаев. Такая низкая частота выявления цоДНК возможно связана с тем, что на данной группе пациентов проводилось отработка преаналитического этапа исследования. Наличие цоДНК до операции не оказало влияния на ВБПЗ ( $OR=1,0$ ,  $p=0,9$ ) и ОВ ( $OR=0,02$ ,  $p=0,4$ ) пациентов. После операции частота выявления цоДНК оказалась еще ниже и составила 27%, что соответствует данным литературы. Наличие цоДНК в плазме после операции оказалось статистически связано с более короткой ВБПЗ ( $OR=2,9$ , 95% ДИ 1,01-8,5,  $p=0,04$ ) независимо от проведения адъювантной химиотерапии. Однако, в связи с небольшими сроками наблюдения, определение цоДНК в крови пациентов после операции не показало влияния на ОВ пациентов ( $OR=1,2$ , 95% ДИ 0,2-6,6,  $p=0,8$ ). В качестве адъювантной терапии пациенты получали гемцитабин в монорежиме или гемцитабин с капецитабином. В 2018 году были опубликованы результаты исследования, показавшие более высокую эффективность модифицированного режима FOLFIRINOX в сравнении с монотерапией гемцитабином при резектабельном РПЖ. ВБПЗ оказалась на 8,8 месяцев больше при применении многокомпонентной схемы лечения (21,6 мес. против 12,8 мес.,  $OR=0,58$ , 95% ДИ 0,46-0,73,  $p<0,001$ ), а ОВ – 19 мес. (54,4 мес.

против 35 мес., ОР=0,64, 95% ДИ 0,48-0,86,  $p=0,003$ ) [36]. Однако, частота побочных эффектов 3 и 4 степени тяжести была выше при применении режима mFOLFIRINOX (75,9% и 52,9% при монотерапии гемцитабином), включая диарею, парестезии, слабость, сенсорную периферическую нейропатию, тошноту, рвоту, боли в брюшной полости и мукозит. Таким образом, наличие цоДНК после операции может говорить о необходимости более активного наблюдения за данной группой пациентов и применения многокомпонентных схем лечения в случае удовлетворительного состояния пациентов. В настоящее время продолжается работа по оценке влияния изменения цоДНК в процессе лечения на выживаемость пациентов при наличии отдаленных метастазов. Таким образом, необходимы дальнейшие проспективные исследования на больших выборках пациентов с целью разработки наиболее чувствительных методов определения цоДНК и определения оптимальных сроков забора образцов крови и условий их обработки и хранения.



## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Современные методы генетической диагностики позволяют изучать прогностическую и предиктивную роль молекулярных маркеров при РПЖ. Важность выделения прогностических групп обусловлена низкой чувствительностью данного заболевания к системной терапии. Исследование генов ГР позволяет определить пациентов, среди которых платиносодержащая терапия дает наилучшие результаты. Применение в первой линии терапии комбинированных схем с включением платиновых агентов привело к увеличению продолжительности жизни пациентов. Среди пациентов с распространенным РПЖ применение препаратов платины в первой линии терапии в группе мутаций *BRCA1/2* и *PALB2* позволило увеличить как ВБП, так и ОВ. Таким образом, внедрение в клиническую практику генетического консультирования всех больных РПЖ даст возможность выделить пациентов, которые могут получить наибольшую выгоду от применения препаратов платины.

«Жидкостная биопсия» интересна как с научной, так и с клинической точки зрения, в связи с тем, что может отображать характеристики опухоли в реальном времени. Медиана концентрации цоДНК в случае распространенного заболевания значимо выше, чем при локальном (2,31 против 0 копий/мкл,  $p=0,005$ ). Выявление цоДНК после хирургического лечения явилось негативным фактором ВБПЗ (ОР=2,9, 95% ДИ 1,01-8,5,  $p=0,04$ ). Определение цоДНК при резектабельном РПЖ позволит выделить группу пациентов, нуждающихся в проведении наиболее эффективных схем химиотерапии в неоадьювантном и адьювантном режиме с возможным проведением лучевой терапии.

## 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* (ОР=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 (ОР 1,0,  $p=0,9$ ) и ОБ (ОР=0,02,  $p=0,4$ ). Определение цоДНК в крови пациентов после операции является негативным фактором прогрессирования заболевания независимо от проведения адъювантной химиотерапии (ОР=2,9, 95% ДИ 1,01-8,5,  $p=0,04$ ).

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

95% ДИ – 95% доверительный интервал

*ATM* – ataxia telangiectasia mutated, ген, кодирующий серин/треонин-киназу АТМ

*ATR* – ataxia telangiectasia and Rad3 related, атаксия-телеангиэктазия и Rad3-родственный белок

*BARD1* – BRCA1-associated RING domain protein 1

*BRCA1* – breast cancer 1, ген, кодирующий белок BRCA1, участвующий в репарации ДНК

*BRCA2* – breast cancer 2, ген, кодирующий белок BRCA2, участвующий в репарации ДНК

*BRCT*-домен – BRCA1 C Terminus, С-концевой домен, связывающийся с фосфосерином или фосфотреонином в определенном белковом контексте

*BRIP1* – *BRCA1* interacting protein C-terminal helicase, ген, кодирующий хеликазу, взаимодействующую с BRCA1

*CHEK2* – checkpoint kinase 2, ген, кодирующий чекпоинт-киназу 2

Fs – frameshift variant, мутации сдвига рамки считывания

FFPE-блоки – фиксированные в формалине парафиновые блоки

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

*mKRAS* – mutated Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog, ген *KRAS* с мутацией

*PALB2* – partner and localizer of *BRCA2*, кодирует белок, входящий в состав комплекса репарации двунитевых разрывов

PARP – Poly (ADP-ribose) polymerase, Поли(АДФ-рибоза)-полимераза

*RAD51* – RAS associated with diabetes protein 51, ген, кодирующий рекомбиназу RAD51

RING-домен – Really Interesting New Gene, белковый структурный домен типа «цинкового пальца», который связывает два катиона цинка

RR – rate ratio, отношение уровней

*TP53* – tumor protein p53, ген, кодирующий опухолевый протеин p53

*wtKRAS* – wild type Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog, дикий тип гена *KRAS*

ВБП – выживаемость без прогрессирования

ВБПЗ – выживаемость без признаков заболевания

ГР – гомологичная рекомбинация

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ДРД – двунитевые разрывы дезоксирибонуклеиновой кислоты

кцПЦР – капельная цифровая полимеразная цепная реакция

ОВ – общая выживаемость

ОР – отношение рисков

ПЦР-ПДРФ – полимеразная цепная реакция – полиморфизм длин рестрикционных фрагментов

РМЖ – рак молочной железы

РПЖ – рак поджелудочной железы

РПрЖ – рак предстательной железы

РЭА – раковый эмбриональный антиген

РЯ – рак яичников

СОЗ – скорректированное отношение заболеваемости

СНП – секвенирование нового поколения

цДНК – циркулирующая дезоксирибонуклеиновая кислота

цоДНК – циркулирующая опухолевая дезоксирибонуклеиновая кислота

ЦОК – циркулирующая опухолевая клетка

ЧОЭ – частота объективных эффектов

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Каприн, А.В. Злокачественные новообразования в России в 2018 году (заболеваемость и смертность) / Каприн А.В. – 2019. – С. 250.
2. Кашинцев, А.А. Распространенность аутосомно-доминантных мутаций у больных раком поджелудочной железы // Детская медицина Северо-Запада. – 2018. – Т. 7. – № 1. – С. 146.
3. Кашинцев, А.А. Встречаемость мутаций в генах BRCA1 и BRCA2 у больных раком поджелудочной железы // Сибирский онкологический журнал. – 2013. – Т. 5. – № 59. – С. 39-44.
4. Покатаев, И.А. Герминальные мутации в генах гомологичной рекомбинации в популяции пациентов раком поджелудочной железы: опыт одного центра / Покатаев И.А., Попова А.С., Абрамов И.С., и др. // Злокачественные опухоли. – 2018. – Т. 3. – С. 5-12.
5. Покатаев, И.А. Консервативное лечение пациентов с местнораспространенным и метастатическим раком поджелудочной железы : дис. ... д-ра мед. наук: 14.01.12 / Покатаев Илья Анатольевич. – М., 2020. – 268 с.
6. Adzhubei I.A. A method and server for predicting damaging missense mutations. / I.A. Adzhubei, S. Schmidt, L. Peshkin, et al. // Nature methods. – 2010. – Vol. 7. – № 4. – P. 248-9.
7. Binder, K.A.R. Abstract CT234: A Phase II, single arm study of maintenance rucaparib in patients with platinum-sensitive advanced pancreatic cancer and a pathogenic germline or somatic mutation in *BRCA1*, *BRCA2* or *PALB2* / K.A.R. Binder, R. Mick, M. O'Hara, et al. // Clinical Trials Proceedings: AACR Annual Meeting 2019; March 29-April 3, 2019; Atlanta, GA. – American Association for Cancer Research, 2019. – Abstract CT234.
8. Bolger, A.M. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. / A.M. Bolger, M. Lohse, B. Usadel // Bioinformatics (Oxford, England). – 2014. – Vol. 30. – № 15. – P. 2114-20.

9. Chun, S. Identification of deleterious mutations within three human genomes. / S. Chun, J.C. Fay // *Genome research*. – 2009. – Vol. 19. – № 9. – P. 1553-61.
10. Cibulskis, K. Sensitive detection of somatic point mutations in impure and heterogeneous cancer samples. / K. Cibulskis, M.S. Lawrence, S.L. Carter, et al. // *Nature biotechnology*. – 2013. – Vol. 31. – № 3. – P. 213-9.
11. Daly, M.B. NCCN guidelines insights: genetic/familial high-risk assessment: breast and ovarian, version 1.2020 / Daly M. B. – 2019.
12. McKenna, A. The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. / A. McKenna, M. Hanna, E. Banks, et al. // *Genome research*. – 2010. – Vol. 20. – № 9. – P. 1297-303.
13. Vaser, R. SIFT missense predictions for genomes. / R. Vaser, S. Adusumalli, S.N. Leng, et al. // *Nature protocols*. – 2016. – Vol. 11. – № 1. – P. 1-9.
14. Abbosh, C. Phylogenetic ctDNA analysis depicts early-stage lung cancer evolution / C. Abbosh, N.J. Birkbak, G.A. Wilson, et al. // *Nature*. – 2017. – Vol. 545. – № 7655. – P. 446-451.
15. Adamo, P. Profiling tumour heterogeneity through circulating tumour DNA in patients with pancreatic cancer / P. Adamo, C.M. Cowley, C.P. Neal, et al. // *Oncotarget*. – 2017. – Vol. 8. – № 50. – P. 87221–87233.
16. Aguirre, A.J. Real-time Genomic Characterization of Advanced Pancreatic Cancer to Enable Precision Medicine / A.J. Aguirre, J.A. Nowak, N.D. Camarda, et al. // *Cancer Discovery*. – 2018. – Vol. 8. – № 9. – P. 1096-1111.
17. Ako, S. Utility of serum DNA as a marker for KRAS mutations in pancreatic cancer tissue / S. Ako, K. Nouse, H. Kinugasa, et al. // *Pancreatology*. – 2017. – Vol. 17. – № 2. – P. 285-290.
18. Alix-Panabières, C. Circulating Tumor Cells: Liquid Biopsy of Cancer / C. Alix-Panabières, K. Pantel // *Clinical Chemistry*. – 2013. – Vol. 59. – № 1. – P. 110-118.

19. Atamaniuk, J. Increased Concentrations of Cell-Free Plasma DNA after Exhaustive Exercise / J. Atamaniuk, C. Vidotto, H. Tschan, et al. // *Clinical Chemistry*. – 2004. – Vol. 50. – № 9. – P. 1668-1670.
20. Aung, K.L. Overall survival of patients with pancreatic adenocarcinoma and *BRCA1* or *BRCA2* germline mutation. / K.L. Aung, S. Holter, A. Borgida, et al. // *Journal of Clinical Oncology*. – 2016. – Vol. 34. – № 15\_suppl. – P. 4123-4123.
21. Bernard, V. Circulating Nucleic Acids Are Associated With Outcomes of Patients With Pancreatic Cancer / V. Bernard, D.U. Kim, F.A. San Lucas, et al. // *Gastroenterology*. – 2019. – Vol. 156. – № 1. – P. 108-118.e4.
22. Bettegowda, C. Detection of Circulating Tumor DNA in Early- and Late-Stage Human Malignancies / C. Bettegowda, M. Sausen, R.J. Leary, et al. // *Science Translational Medicine*. – 2014. – Vol. 6. – № 224. – P. 224ra24.
23. Blair, A.B. *BRCA1/BRCA2* Germline Mutation Carriers and Sporadic Pancreatic Ductal Adenocarcinoma / A.B. Blair, V.P. Groot, G. Gemenetzi, et al. // *Journal of the American College of Surgeons*. – 2018. – Vol. 226. – № 4. – P. 630-637.
24. Breast, Cancer Linkage Consortium T. Cancer Risks in *BRCA2* Mutation Carriers / T. Breast Cancer Linkage Consortium // *JNCI Journal of the National Cancer Institute*. – 1999. – Vol. 91. – № 15. – P. 1310-1316.
25. Breidert, M. Early recurrence of pancreatic cancer after resection and during adjuvant chemotherapy / M. Breidert, T. Keck, F. Makowiec, et al. // *Saudi Journal of Gastroenterology*. – 2012. – Vol. 18. – № 2. – P. 118-121.
26. Bryant, K.L. *KRAS*: feeding pancreatic cancer proliferation / K.L. Bryant, J.D. Mancias, A.C. Kimmelman, et al. // *Trends in Biochemical Sciences*. – 2014. – Vol. 39. – № 2. – P. 91-100.
27. Brychta, N. Detection of *KRAS* Mutations in Circulating Tumor DNA by Digital PCR in Early Stages of Pancreatic Cancer / N. Brychta, T. Krahn, O. von Ahsen // *Clinical Chemistry*. – 2016. – Vol. 62. – № 11. – P. 1482-1491.
28. Calvez-Kelm, F.L. *KRAS* mutations in blood circulating cell-free DNA: a pancreatic cancer case-control study / F.L. Calvez-Kelm, M. Foll, M.B. Wozniak, et al. // *Oncotarget*. – 2016. – Vol. 7. – № 48. – P. 78827-78840.

29. Castells, A. K- *ras* Mutations in DNA Extracted From the Plasma of Patients With Pancreatic Carcinoma: Diagnostic Utility and Prognostic Significance / A. Castells, P. Puig, J. Móra, et al. // Journal of Clinical Oncology. – 1999. – Vol. 17. – № 2. – P. 578-584.
30. Chen, H. K-ras mutational status predicts poor prognosis in unresectable pancreatic cancer / H. Chen, H. Tu, Z.Q. Meng, et al. // European Journal of Surgical Oncology (EJSO). – 2010. – Vol. 36. – № 7. – P. 657-662.
31. Chen, L. Prognostic value of circulating cell-free DNA in patients with pancreatic cancer: A systemic review and meta-analysis / L. Chen, Y. Zhang, Y. Cheng, et al. // Gene. – 2018. – Vol. 679. – P. 328-334.
32. Cheng, H. Analysis of ctDNA to predict prognosis and monitor treatment responses in metastatic pancreatic cancer patients: Clinical value of ctDNA in metastatic pancreatic cancer / H. Cheng, C. Liu, J. Jiang, et al. // International Journal of Cancer. – 2017. – Vol. 140. – № 10. – P. 2344-2350.
33. Cohen, J.D. Combined circulating tumor DNA and protein biomarker-based liquid biopsy for the earlier detection of pancreatic cancers / J.D. Cohen, A.A. Javed, C. Thoburn, et al. // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2017. – Vol. 114. – № 38. – P. 10202-10207.
34. Colucci, G. Randomized Phase III Trial of Gemcitabine Plus Cisplatin Compared With Single-Agent Gemcitabine As First-Line Treatment of Patients With Advanced Pancreatic Cancer: The GIP-1 Study / G. Colucci, R. Labianca, F. Di Costanzo, et al. // Journal of Clinical Oncology. – 2010. – Vol. 28. – № 10. – P. 1645-1651.
35. Connor, A.A. Association of Distinct Mutational Signatures With Correlates of Increased Immune Activity in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma / A.A. Connor, R.E. Denroche, G.H. Jang, et al. // JAMA Oncology. – 2017. – Vol. 3. – № 6. – P. 774-783.
36. Conroy, T. FOLFIRINOX or Gemcitabine as Adjuvant Therapy for Pancreatic Cancer / T. Conroy, P. Hammel, M. Hebbar, et al. // New England Journal of Medicine. – 2018. – Vol. 379. – № 25. – P. 2395-2406.



37. Conroy, T. FOLFIRINOX versus Gemcitabine for Metastatic Pancreatic Cancer / T. Conroy, F. Desseigne, M. Ychou, et al. // *New England Journal of Medicine*. – 2011. – Vol. 364. – № 19. – P. 1817-1825.
38. Creemers, A. Clinical value of ctDNA in upper-GI cancers: A systematic review and meta-analysis / A. Creemers, S. Krausz, M. Strijker, et al. // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*. – 2017. – Vol. 1868. – № 2. – P. 394-403.
39. Cros, J. Tumor Heterogeneity in Pancreatic Adenocarcinoma / J. Cros, J. Raffenne, A. Couvelard, et al. // *Pathobiology*. – 2018. – Vol. 85. – № 1-2. – P. 64-71.
40. Däbritz, J. Follow-Up Study of K-ras Mutations in the Plasma of Patients With Pancreatic Cancer: Correlation With Clinical Features and Carbohydrate Antigen 19-9 / J. Däbritz, R. Preston, J. Hänfler, et al. // *Pancreas*. – 2009. – Vol. 38. – № 5. – P. 534-541.
41. Dagan, E. Predominant Ashkenazi *BRCA1/2* Mutations in Families with Pancreatic Cancer / E. Dagan // *Genetic Testing*. – 2008. – Vol. 12. – № 2. – P. 267-271.
42. Dawson, S.-J. Analysis of Circulating Tumor DNA to Monitor Metastatic Breast Cancer / S.-J. Dawson, D.W.Y. Tsui, M. Murtaza, et al. // *New England Journal of Medicine*. – 2013. – Vol. 368. – № 13. – P. 1199-1209.
43. Del Re, M. Early changes in plasma DNA levels of mutant KRAS as a sensitive marker of response to chemotherapy in pancreatic cancer / M. Del Re, C. Vivaldi, E. Rofi, et al. // *Scientific Reports*. – 2017. – Vol. 7. – № 1. – P. 7931.
44. Dessel, L.F. van. Application of circulating tumor DNA in prospective clinical oncology trials - standardization of preanalytical conditions / L.F. van Dessel, N. Beije, J.C.A. Helmijr, et al. // *Molecular Oncology*. – 2017. – Vol. 11. – № 3. – P. 295-304.
45. Diaz, L.A. Liquid Biopsies: Genotyping Circulating Tumor DNA / L.A. Diaz, A. Bardelli // *Journal of Clinical Oncology*. – 2014. – Vol. 32. – № 6. – P. 579-586.

46. Dudley, B. Germline mutation prevalence in individuals with pancreatic cancer and a history of previous malignancy: Mutations in Selected Pancreatic Cancers / B. Dudley, E. Karloski, F.A. Monzon, et al. // *Cancer*. – 2018. – Vol. 124. – № 8. – P. 1691-1700.
47. Earl, J. Circulating tumor cells (CTC) and KRAS mutant circulating free DNA (cfDNA) detection in peripheral blood as biomarkers in patients diagnosed with exocrine pancreatic cancer / J. Earl, S. Garcia-Nieto, J.C. Martinez-Avila, et al. // *BMC Cancer*. – 2015. – Vol. 15. – № 1. – P. 797.
48. Farmer, H. Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy / H. Farmer, N. McCabe, C.J. Lord, et al. // *Nature*. – 2005. – Vol. 434. – № 7035. – P. 917-921.
49. Ferrone, C.R. *BRCA* Germline Mutations in Jewish Patients With Pancreatic Adenocarcinoma / C.R. Ferrone, D.A. Levine, L.H. Tang, et al. // *Journal of Clinical Oncology*. – 2009. – Vol. 27. – № 3. – P. 433-438.
50. Fogelman, D. Family history as a marker of platinum sensitivity in pancreatic adenocarcinoma / D. Fogelman, E.A. Sugar, G. Oliver, et al. // *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. – 2015. – Vol. 76. – № 3. – P. 489-498.
51. Fulton, A.J. Identification of patients with pancreatic adenocarcinoma due to inheritable mutation: Challenges of daily clinical practice / A.J. Fulton, A. Lamarca, C. Nuttall, et al. // *World Journal of Gastrointestinal Oncology*. – 2019. – Vol. 11. – № 2. – P. 102-116.
52. Gill, S. PANCREOX: A Randomized Phase III Study of Fluorouracil/Leucovorin With or Without Oxaliplatin for Second-Line Advanced Pancreatic Cancer in Patients Who Have Received Gemcitabine-Based Chemotherapy / S. Gill, Y.-J. Ko, C. Cripps, et al. // *Journal of Clinical Oncology*. – 2016. – Vol. 34. – № 32. – P. 3914-3920.
53. Godet, I. *BRCA1* and *BRCA2* mutations and treatment strategies for breast cancer / I. Godet, D. M. Gilkes // *Integrative Cancer Science and Therapeutics*. – 2017. – Vol. 4. – № 1.

54. Golan, T. Maintenance Olaparib for Germline *BRCA* -Mutated Metastatic Pancreatic Cancer / T. Golan, P. Hammel, M. Reni, et al. // *New England Journal of Medicine*. – 2019. – Vol. 381. – № 4. – P. 317-327.
55. Golan, T. Overall survival and clinical characteristics of *BRCA* mutation carriers with stage I/II pancreatic cancer / T. Golan, T. Sella, E.M. O'Reilly, et al. // *British Journal of Cancer*. – 2017. – Vol. 116. – № 6. – P. 697-702.
56. Golan, T. Overall survival and clinical characteristics of pancreatic cancer in *BRCA* mutation carriers / T. Golan, Z.S. Kanji, R. Epelbaum, et al. // *British Journal of Cancer*. – 2014. – Vol. 111. – № 6. – P. 1132-1138.
57. Golan, T. Phase II study of olaparib for *BRCAness* phenotype in pancreatic cancer. / T. Golan, G.R. Varadhachary, T. Sela, et al. // *Journal of Clinical Oncology*. – 2018. – Vol. 36. – № 4\_suppl. – P. 297.
58. Golan, T. Recapitulating the clinical scenario of *BRCA*-associated pancreatic cancer in pre-clinical models: *BRCAmut* PDAC in-vivo response to *PARPi* / T. Golan, C. Stossel, D. Atias, et al. // *International Journal of Cancer*. – 2018. – Vol. 143. – № 1. – P. 179-183.
59. Gold, B. Do Circulating Tumor Cells, Exosomes, and Circulating Tumor Nucleic Acids Have Clinical Utility? / B. Gold, M. Cankovic, L.V. Furtado, et al. // *The Journal of Molecular Diagnostics*. – 2015. – Vol. 17. – № 3. – P. 209-224.
60. Goldstein, J.B. Germline DNA Sequencing Reveals Novel Mutations Predictive of Overall Survival in a Cohort of Patients with Pancreatic Cancer / J.B. Goldstein, L. Zhao, X. Wang, et al. // *Clinical Cancer Research*. – 2020. – Vol. 26. – № 6. – P. 1385-1394.
61. Grant, R.C. Prevalence of Germline Mutations in Cancer Predisposition Genes in Patients With Pancreatic Cancer / R.C. Grant, I. Selander, A.A. Connor, et al. // *Gastroenterology*. – 2015. – Vol. 148. – № 3. – P. 556-564.
62. Groot, V.P. Circulating Tumor DNA as a Clinical Test in Resected Pancreatic Cancer / V.P. Groot, S. Mosier, A.A. Javed, et al. // *Clinical Cancer Research*. – 2019. – Vol. 25. – № 16. – P. 4973-4984.

63. Guo, S. Preoperative detection of KRAS G12D mutation in ctDNA is a powerful predictor for early recurrence of resectable PDAC patients / S. Guo, X. Shi, J. Shen, et al. // *British Journal of Cancer*. – 2020. – Vol. 122. – P. 857–867.
64. Gupta, M. Poly(ADP-Ribose) Polymerase Inhibitors in Pancreatic Cancer: A New Treatment Paradigms and Future Implications / M. Gupta, R. Iyer, C. Fountzilas // *Cancers*. – 2019. – Vol. 11. – № 12. – P. 1980.
65. Hadano, N. Prognostic value of circulating tumour DNA in patients undergoing curative resection for pancreatic cancer / N. Hadano, Y. Murakami, K. Uemura, et al. // *British Journal of Cancer*. – 2016. – Vol. 115. – № 1. – P. 59-65.
66. Holter, S. Germline *BRCA* Mutations in a Large Clinic-Based Cohort of Patients With Pancreatic Adenocarcinoma / S. Holter, A. Borgida, A. Dodd, et al. // *Journal of Clinical Oncology*. – 2015. – Vol. 33. – № 28. – P. 3124-3129.
67. Howell, J.A. The clinical role of circulating free tumor DNA in gastrointestinal malignancy / J.A. Howell, S.A. Khan, S. Knapp, et al. // *Translational Research*. – 2017. – Vol. 183. – P. 137-154.
68. Huang, Z. Diagnostic value of serum carbohydrate antigen 19-9 in pancreatic cancer: a meta-analysis / Z. Huang, F. Liu // *Tumor Biology*. – 2014. – Vol. 35. – № 8. – P. 7459-7465.
69. Infante, J.R. A randomised, double-blind, placebo-controlled trial of trametinib, an oral MEK inhibitor, in combination with gemcitabine for patients with untreated metastatic adenocarcinoma of the pancreas / J.R. Infante, B.G. Somer, J.O. Park, et al. // *European Journal of Cancer*. – 2014. – Vol. 50. – № 12. – P. 2072-2081.
70. Iqbal, J. The incidence of pancreatic cancer in *BRCA1* and *BRCA2* mutation carriers / J. Iqbal, A. Ragone, J. Lubinski, et al. // *British Journal of Cancer*. – 2012. – Vol. 107. – № 12. – P. 2005-2009.
71. Jones, S. Core Signaling Pathways in Human Pancreatic Cancers Revealed by Global Genomic Analyses / S. Jones, X. Zhang, D.W. Parsons, et al. // *Science*. – 2008. – Vol. 321. – № 5897. – P. 1801-1806.

72. Jung, K. Cell-free DNA in the blood as a solid tumor biomarker—A critical appraisal of the literature / K. Jung, M. Fleischhacker, A. Rabien // *Clinica Chimica Acta*. – 2010. – Vol. 411. – № 21-22. – P. 1611-1624.
73. Karami, F. A Comprehensive Focus on Global Spectrum of *BRCA1* and *BRCA2* Mutations in Breast Cancer / F. Karami, P. Mehdipour // *BioMed Research International*. – 2013. – Vol. 2013. – P. 1-21.
74. Kaufman, B. Olaparib Monotherapy in Patients With Advanced Cancer and a Germline *BRCA1/2* Mutation / B. Kaufman, R. Shapira-Frommer, R.K. Schmutzler, et al. // *Journal of Clinical Oncology*. – 2015. – Vol. 33. – № 3. – P. 244-250.
75. Kim, M.K. Prognostic Implications of Multiplex Detection of *KRAS* Mutations in Cell-Free DNA from Patients with Pancreatic Ductal Adenocarcinoma / M.K. Kim, S.M. Woo, B. Park, et al. // *Clinical Chemistry*. – 2018. – Vol. 64. – № 4. – P. 726-734.
76. Kinugasa, H. Detection of *K-ras* gene mutation by liquid biopsy in patients with pancreatic cancer: *K-ras* in Blood With Pancreatic Cancer / H. Kinugasa, K. Nouse, K. Miyahara, et al. // *Cancer*. – 2015. – Vol. 121. – № 13. – P. 2271-2280.
77. Komo, T. Prognostic Impact of Para-Aortic Lymph Node Micrometastasis in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma / T. Komo, Y. Murakami, N. Kondo, et al. // *Annals of Surgical Oncology*. – 2016. – Vol. 23. – № 6. – P. 2019-2027.
78. Kondo, T. Association between homologous recombination repair gene mutations and response to oxaliplatin in pancreatic cancer / T. Kondo, M. Kanai, T. Kou, et al. // *Oncotarget*. – 2018. – Vol. 9. – № 28. – P. 19817–19825.
79. Kondo, T. Impact of BRCAness on the efficacy of oxaliplatin-based chemotherapy in patients with unresectable pancreatic cancer. / T. Kondo, M. Kanai, T. Kou, et al. // *Journal of Clinical Oncology*. – 2017. – Vol. 35. – № 4\_suppl. – P. 250.
80. Kruger, S. Repeated mut*KRAS* ctDNA measurements represent a novel and promising tool for early response prediction and therapy monitoring in advanced pancreatic cancer / S. Kruger, V. Heinemann, C. Ross, et al. // *Annals of Oncology*. – 2018. – Vol. 29. – № 12. – P. 2348-2355.

81. Lee, B. Circulating tumor DNA as a potential marker of adjuvant chemotherapy benefit following surgery for localized pancreatic cancer / B. Lee, L. Lipton, J. Cohen, et al. // *Annals of Oncology*. – 2019. – Vol. 30. – № 9. – P. 1472-1478.
82. Levy, M. Basic techniques in endoscopic ultrasound-guided fine needle aspiration for solid lesions: Adverse events and avoiding them / M. Levy, L. Fujii // *Endoscopic Ultrasound*. – 2014. – Vol. 3. – № 1. – P. 35.
83. Lin, M. Circulating Tumor DNA as a Sensitive Marker in Patients Undergoing Irreversible Electroporation for Pancreatic Cancer / M. Lin, M. Alnaggar, S. Liang, et al. // *Cellular Physiology and Biochemistry*. – 2018. – Vol. 47. – № 4. – P. 1556-1564.
84. Lohse, I. BRCA1 and BRCA2 mutations sensitize to chemotherapy in patient-derived pancreatic cancer xenografts / I. Lohse, A. Borgida, P. Cao, et al. // *British Journal of Cancer*. – 2015. – Vol. 113. – № 3. – P. 425-432.
85. Lowery, M.A. An Emerging Entity: Pancreatic Adenocarcinoma Associated with a Known BRCA Mutation: Clinical Descriptors, Treatment Implications, and Future Directions / M.A. Lowery, D.P. Kelsen, Z.K. Stadler, et al. // *The Oncologist*. – 2011. – Vol. 16. – № 10. – P. 1397-1402.
86. Lowery, M.A. Prospective Evaluation of Germline Alterations in Patients With Exocrine Pancreatic Neoplasms / M.A. Lowery, W. Wong, E.J. Jordan, et al. // *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*. – 2018. – Vol. 110. – № 10. – P. 1067-1074.
87. Lucas, A.L. High Prevalence of BRCA1 and BRCA2 Germline Mutations with Loss of Heterozygosity in a Series of Resected Pancreatic Adenocarcinoma and Other Neoplastic Lesions / A.L. Lucas, R. Shakya, M.D. Lipsyc, et al. // *Clinical Cancer Research*. – 2013. – Vol. 19. – № 13. – P. 3396-3403.
88. Madariaga, A. Tailoring Ovarian Cancer Treatment: Implications of BRCA1/2 Mutations / A. Madariaga, S. Lheureux, A. Oza // *Cancers*. – 2019. – Vol. 11. – № 3. – P. 416.

89. Mai, P.L. Confirmation of Family Cancer History Reported in a Population-Based Survey / P.L. Mai, A.O. Garceau, B.I. Graubard, et al. // JNCI: Journal of the National Cancer Institute. – 2011. – Vol. 103. – № 10. – P. 788-797.
90. Maire, F. Differential diagnosis between chronic pancreatitis and pancreatic cancer: value of the detection of KRAS2 mutations in circulating DNA / F. Maire, S. Micard, P. Hammel, et al. // British Journal of Cancer. – 2002. – Vol. 87. – № 5. – P. 551-554.
91. Marchese, R. Low Correspondence Between K-ras Mutations in Pancreatic Cancer Tissue and Detection of K-ras Mutations in Circulating DNA: / R. Marchese, A. Muleti, P. Pasqualetti, et al. // Pancreas. – 2006. – Vol. 32. – № 2. – P. 171-177.
92. Matsumoto, I. Proposed preoperative risk factors for early recurrence in patients with resectable pancreatic ductal adenocarcinoma after surgical resection: A multi-center retrospective study / I. Matsumoto, Y. Murakami, M. Shinzeki, et al. // Pancreatology. – 2015. – Vol. 15. – № 6. – P. 674-680.
93. McCabe, N. Deficiency in the Repair of DNA Damage by Homologous Recombination and Sensitivity to Poly(ADP-Ribose) Polymerase Inhibition / N. McCabe, N.C. Turner, C.J. Lord, et al. // Cancer Research. – 2006. – Vol. 66. – № 16. – P. 8109-8115.
94. Mersch, J. Cancers associated with *BRCA 1* and *BRCA 2* mutations other than breast and ovarian: *BRCA* and Other Cancers / J. Mersch, M.A. Jackson, M. Park, et al. // Cancer. – 2015. – Vol. 121. – № 2. – P. 269-275.
95. Miki, Y. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene *BRCA1* / Y. Miki, J. Swensen, D. Shattuck-Eidens, et al. // Science. – 1994. – Vol. 266. – № 5182. – P. 66-71.
96. Moher, D. Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses: The PRISMA Statement / D. Moher // Annals of Internal Medicine. – 2009. – Vol. 151. – № 4. – P. 264.
97. Moriyama, H. Allelic imbalance and microsatellite instability in plasma DNA released from polyclonal pancreatic adenocarcinoma / H. Moriyama, N.

Matsubara, T. Kanbara, et al. // International Journal of Oncology. – 2002. – Vol. 21. – № 5. – P. 949-956.

98. Mouliere, F. Circulating tumor-derived DNA is shorter than somatic DNA in plasma / F. Mouliere, N. Rosenfeld // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2015. – Vol. 112. – № 11. – P. 3178-3179.

99. Nakano, Y. KRAS mutations in cell-free DNA from preoperative and postoperative sera as a pancreatic cancer marker: a retrospective study / Y. Nakano, M. Kitago, S. Matsuda, et al. // British Journal of Cancer. – 2018. – Vol. 118. – № 5. – P. 662-669.

100. O'Reilly, E.M. Phase 1 trial evaluating cisplatin, gemcitabine, and veliparib in 2 patient cohorts: Germline *BRCA* mutation carriers and wild-type *BRCA* pancreatic ductal adenocarcinoma: Pancreatic Cancer, PARP Inhibitor, Cisplatin / E.M. O'Reilly, J.W. Lee, M.A. Lowery, et al. // Cancer. – 2018. – Vol. 124. – № 7. – P. 1374-1382.

101. O'Reilly, E.M. Randomized, Multicenter, Phase II Trial of Gemcitabine and Cisplatin With or Without Veliparib in Patients With Pancreas Adenocarcinoma and a Germline *BRCA/PALB2* Mutation / E.M. O'Reilly, J.W. Lee, M. Zalupski, et al. // Journal of Clinical Oncology. – 2020. – P. JCO.19.02931.

102. Ozanne, E.M. Bias in the Reporting of Family History: Implications for Clinical Care / E.M. Ozanne, A. O'Connell, C. Bouzan, et al. // Journal of Genetic Counseling. – 2012. – Vol. 21. – № 4. – P. 547-556.

103. Park, W. Homologous recombination deficiency (HRD): A biomarker for first-line (1L) platinum in advanced pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC). / W. Park, W. Wong, K.H. Yu, et al. // Journal of Clinical Oncology. – 2019. – Vol. 37. – № 15\_suppl. – P. 4132.

104. Patel, H. Clinical correlates of blood-derived circulating tumor DNA in pancreatic cancer / H. Patel, R. Okamura, P. Fanta, et al. // Journal of Hematology & Oncology. – 2019. – Vol. 12. – № 1. – P. 130.



105. Perets, R. Mutant *KRAS* Circulating Tumor DNA Is an Accurate Tool for Pancreatic Cancer Monitoring / R. Perets, O. Greenberg, T. Shentzer, et al. // *The Oncologist*. – 2018. – Vol. 23. – № 5. – P. 566-572.
106. Petrucelli N. BRCA1- and BRCA2-Associated Hereditary Breast and Ovarian Cancer / N. Petrucelli, M.B. Daly, T. Pal. // *Gene Reviews*. – 1998. – P. 37.
107. Pietrasz, D. Plasma Circulating Tumor DNA in Pancreatic Cancer Patients Is a Prognostic Marker / D. Pietrasz, N. Pécuchet, F. Garlan, et al. // *Clinical Cancer Research*. – 2017. – Vol. 23. – № 1. – P. 116-123.
108. Pishvaian, M.J. A pilot study evaluating concordance between blood-based and patient-matched tumor molecular testing within pancreatic cancer patients participating in the Know Your Tumor (KYT) initiative / M.J. Pishvaian, R.J. Bender, L.M. Matrisian, et al. // *Oncotarget*. – 2017. – Vol. 8. – № 48. – P. 83446-83456.
109. Pokataev, I. Efficacy of platinum-based chemotherapy and prognosis of patients with pancreatic cancer with homologous recombination deficiency: comparative analysis of published clinical studies / I. Pokataev, M. Fedyanin, E. Polyanskaya, et al. // *ESMO Open*. – 2020. – Vol. 5. – № 1. – P. e000578.
110. Poplin, E. Phase III, Randomized Study of Gemcitabine and Oxaliplatin Versus Gemcitabine (fixed-dose rate infusion) Compared With Gemcitabine (30-minute infusion) in Patients With Pancreatic Carcinoma E6201: A Trial of the Eastern Cooperative Oncology Group / E. Poplin, Y. Feng, J. Berlin, et al. // *Journal of Clinical Oncology*. – 2009. – Vol. 27. – № 23. – P. 3778-3785.
111. Rainer, T.H. Circulating Nucleic Acids and Critical Illness / T.H. Rainer, N.Y.L. Lam // *Annals of the New York Academy of Sciences*. – 2006. – Vol. 1075. – № 1. – P. 271-277.
112. Raphael, B.J. Integrated Genomic Characterization of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma / B.J. Raphael, R.H. Hruban, A.J. Aguirre, et al. // *Cancer Cell*. – 2017. – Vol. 32. – № 2. – P. 185-203.e13.
113. Reiss, K.A. Retrospective Survival Analysis of Patients With Advanced Pancreatic Ductal Adenocarcinoma and Germline *BRCA* or *PALB2* Mutations / K.A. Reiss, S. Yu, R. Judy, et al. // *JCO Precision Oncology*. – 2018. – № 2. – P. 1-9.

114. Risch, H.A. Population BRCA1 and BRCA2 Mutation Frequencies and Cancer Penetrances: A Kin-Cohort Study in Ontario, Canada / H.A. Risch, J.R. McLaughlin, D.E.C. Cole, et al. // JNCI: Journal of the National Cancer Institute. – 2006. – Vol. 98. – № 23. – P. 1694-1706.
115. Riva, F. Clinical applications of circulating tumor DNA and circulating tumor cells in pancreatic cancer / F. Riva, O.I. Dronov, D.I. Khomenko, et al. // Molecular Oncology. – 2016. – Vol. 10. – № 3. – P. 481-493.
116. Roberts, N.J. Whole Genome Sequencing Defines the Genetic Heterogeneity of Familial Pancreatic Cancer / N.J. Roberts, A.L. Norris, G.M. Petersen, et al. // Cancer Discovery. – 2016. – Vol. 6. – № 2. – P. 166-175.
117. Roch, A.M. Are BRCA1 and BRCA2 gene mutation patients underscreened for pancreatic adenocarcinoma? / A.M. Roch, J. Schneider, R.A. Carr, et al. // Journal of Surgical Oncology. – 2019. – Vol. 119. – № 6. – P. 777-783.
118. Roy, R. BRCA1 and BRCA2: different roles in a common pathway of genome protection / R. Roy, J. Chun, S.N. Powell // Nature Reviews Cancer. – 2012. – Vol. 12. – № 1. – P. 68-78.
119. Sakai, W. Secondary mutations as a mechanism of cisplatin resistance in BRCA2-mutated cancers / W. Sakai, E.M. Swisher, B.Y. Karlan, et al. // Nature. – 2008. – Vol. 451. – № 7182. – P. 1116-1120.
120. Salo-Mullen, E.E. Identification of germline genetic mutations in patients with pancreatic cancer: Germline Mutations in Pancreatic Cancer / E.E. Salo-Mullen, E.M. O'Reilly, D.P. Kelsen, et al. // Cancer. – 2015. – Vol. 121. – № 24. – P. 4382-4388.
121. Sausen, M. Clinical implications of genomic alterations in the tumour and circulation of pancreatic cancer patients / M. Sausen, J. Phallen, V. Adleff, et al. // Nature Communications. – 2015. – Vol. 6. – № 1. – P. 7686.
122. Schwarzenbach, H. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients / H. Schwarzenbach, D.S.B. Hoon, K. Pantel // Nature Reviews Cancer. – 2011. – Vol. 11. – № 6. – P. 426-437.

123. Seet, A.O.L. Prognostic and predictive value of circulating tumour DNA (ctDNA) by amplicon-based next generation sequencing (NGS) of advanced pancreatic cancer (APC) in a phase I trial of oxaliplatin capecitabine and irinotecan (OXIRI) triplet chemotherapy. / A.O.L. Seet, S.P. Choo, D.W.-M. Tai, et al. // *Journal of Clinical Oncology*. – 2020. – Vol. 38. – № 4\_suppl. – P. 730-730.

124. Sefrioui, D. Diagnostic value of CA19.9, circulating tumour DNA and circulating tumour cells in patients with solid pancreatic tumours / D. Sefrioui, F. Blanchard, E. Toure, et al. // *British Journal of Cancer*. – 2017. – Vol. 117. – № 7. – P. 1017-1025.

125. Sehdev, A. Germline and Somatic DNA Damage Repair Gene Mutations and Overall Survival in Metastatic Pancreatic Adenocarcinoma Patients Treated with FOLFIRINOX / A. Sehdev, O. Gbolahan, B.A. Hancock, et al. // *Clinical Cancer Research*. – 2018. – Vol. 24. – № 24. – P. 6204-6211.

126. Shindo, K. Deleterious Germline Mutations in Patients With Apparently Sporadic Pancreatic Adenocarcinoma / K. Shindo, J. Yu, M. Suenaga, et al. // *Journal of Clinical Oncology*. – 2017. – Vol. 35. – № 30. – P. 3382-3390.

127. Shroff, R.T. Rucaparib Monotherapy in Patients With Pancreatic Cancer and a Known Deleterious *BRCA* Mutation / R.T. Shroff, A. Hendifar, R.R. McWilliams, et al. // *JCO Precision Oncology*. – 2018. – № 2. – P. 1-15.

128. Siegel, R.L. Cancer statistics, 2019 / R.L. Siegel, K.D. Miller, A. Jemal // *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. – 2019. – Vol. 69. – № 1. – P. 7-34.

129. Singh, N. High Levels of Cell-Free Circulating Nucleic Acids in Pancreatic Cancer are Associated With Vascular Encasement, Metastasis and Poor Survival / N. Singh, S. Gupta, R.M. Pandey, et al. // *Cancer Investigation*. – 2015. – Vol. 33. – № 3. – P. 78-85.

130. Singhi, A.D. Real-Time Targeted Genome Profile Analysis of Pancreatic Ductal Adenocarcinomas Identifies Genetic Alterations That Might Be Targeted With Existing Drugs or Used as Biomarkers / A.D. Singhi, B. George, J.R. Greenbowe, et al. // *Gastroenterology*. – 2019. – Vol. 156. – № 8. – P. 2242-2253.e4.

131. Siravegna, G. Clonal evolution and resistance to EGFR blockade in the blood of colorectal cancer patients / G. Siravegna, B. Mussolin, M. Buscarino, et al. // *Nature Medicine*. – 2015. – Vol. 21. – № 7. – P. 795-801.
132. Stathis, A. Advanced pancreatic carcinoma: current treatment and future challenges / A. Stathis, M.J. Moore // *Nature Reviews Clinical Oncology*. – 2010. – Vol. 7. – № 3. – P. 163-172.
133. Streff, H. Cancer Incidence in First- and Second-Degree Relatives of *BRCA1* and *BRCA2* Mutation Carriers / H. Streff, J. Profato, Y. Ye, et al. // *The Oncologist*. – 2016. – Vol. 21. – № 7. – P. 869-874.
134. Strijker, M. Circulating tumor DNA quantity is related to tumor volume and both predict survival in metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma / M. Strijker, E.C. Soer, M. Pastena, et al. // *International Journal of Cancer*. – 2020. – Vol. 146. – № 5. – P. 1445-1456.
135. Sugimori, M. Quantitative monitoring of circulating tumor DNA in patients with advanced pancreatic cancer undergoing chemotherapy / M. Sugimori, K. Sugimori, H. Tsuchiya, et al. // *Cancer Science*. – 2020. – Vol. 111. – № 1. – P. 266-278.
136. Swisher, E.M. Secondary *BRCA1* Mutations in *BRCA1*-Mutated Ovarian Carcinomas with Platinum Resistance / E.M. Swisher, W. Sakai, B.Y. Karlan, et al. // *Cancer Research*. – 2008. – Vol. 68. – № 8. – P. 2581-2586.
137. Takai, E. Clinical utility of circulating tumor DNA for molecular assessment in pancreatic cancer / E. Takai, Y. Totoki, H. Nakamura, et al. // *Scientific Reports*. – 2015. – Vol. 5. – № 1. – P. 18425.
138. Takai, E. Circulating tumor DNA as a liquid biopsy target for detection of pancreatic cancer / E. Takai, S. Yachida // *World Journal of Gastroenterology*. – 2016. – Vol. 22. – № 38. – P. 8480.
139. Takeuchi, S. Mutations in *BRCA1*, *BRCA2*, and *PALB2*, and a panel of 50 cancer-associated genes in pancreatic ductal adenocarcinoma / S. Takeuchi, M. Doi, N. Ikari, et al. // *Scientific Reports*. – 2018. – Vol. 8. – № 1. – P. 8105.

140. Thompson, D. Cancer Incidence in BRCA1 Mutation Carriers / D. Thompson, D.F. Easton // *Journal of the National Cancer Institute*. – 2002. – Vol. 94. – № 18. – P. 1358-1365.
141. Tie, J. Circulating tumor DNA as an early marker of therapeutic response in patients with metastatic colorectal cancer / J. Tie, I. Kinde, Y. Wang, et al. // *Annals of Oncology*. – 2015. – Vol. 26. – № 8. – P. 1715-1722.
142. Tjensvoll, K. Clinical relevance of circulating KRAS mutated DNA in plasma from patients with advanced pancreatic cancer / K. Tjensvoll, M. Lapin, T. Buhl, et al. // *Molecular Oncology*. – 2016. – Vol. 10. – № 4. – P. 635-643.
143. Toss, A. Hereditary Pancreatic Cancer: A Retrospective Single-Center Study of 5143 Italian Families with History of BRCA-Related Malignancies / A. Toss, M. Venturelli, E. Molinaro, et al. // *Cancers*. – 2019. – Vol. 11. – № 2. – P. 193.
144. Uemura, T. Detection of K- ras mutations in the plasma DNA of pancreatic cancer patients / T. Uemura, K. Hibi, T. Kaneko, et al. // *Journal of Gastroenterology*. – 2004. – Vol. 39. – № 1. – P. 56-60.
145. Umetani, N. Higher Amount of Free Circulating DNA in Serum than in Plasma Is Not Mainly Caused by Contaminated Extraneous DNA during Separation / N. Umetani, S. Hiramatsu, D.S.B. Hoon // *Annals of the New York Academy of Sciences*. – 2006. – Vol. 1075. – № 1. – P. 299-307.
146. Van Laethem, J.-L. Phase I/II Study of Refametinib (BAY 86-9766) in Combination with Gemcitabine in Advanced Pancreatic cancer / J.-L. Van Laethem, H. Riess, J. Jassem, et al. // *Targeted Oncology*. – 2017. – Vol. 12. – № 1. – P. 97-109.
147. Vasioukhin, V. Point mutations of the N-ras gene in the blood plasma DNA of patients with myelodysplastic syndrome or acute myelogenous leukaemia / V. Vasioukhin, P. Anker, P. Maurice, et al. // *British Journal of Haematology*. – 1994. – Vol. 86. – № 4. – P. 774-779.
148. Von Hoff, D.D. Increased Survival in Pancreatic Cancer with nab-Paclitaxel plus Gemcitabine / D.D. Von Hoff, T. Ervin, F.P. Arena, et al. // *New England Journal of Medicine*. – 2013. – Vol. 369. – № 18. – P. 1691-1703.

149. Waddell, N. Whole genomes redefine the mutational landscape of pancreatic cancer / N. Waddell, A.-M. Patch, D.K. Chang, et al. // *Nature*. – 2015. – Vol. 518. – № 7540. – P. 495-501.
150. Wang, Z.-Y. KRAS Mutant Allele Fraction in Circulating Cell-Free DNA Correlates With Clinical Stage in Pancreatic Cancer Patients / Z.-Y. Wang, X.-Q. Ding, H. Zhu, et al. // *Frontiers in Oncology*. – 2019. – Vol. 9. – P. 1295.
151. Ward Gahlawat, A. Evaluation of Storage Tubes for Combined Analysis of Circulating Nucleic Acids in Liquid Biopsies / A. Ward Gahlawat, J. Lenhardt, T. Witte, et al. // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2019. – Vol. 20. – № 3. – P. 704.
152. Watanabe, F. Longitudinal monitoring of KRAS-mutated circulating tumor DNA enables the prediction of prognosis and therapeutic responses in patients with pancreatic cancer / F. Watanabe, K. Suzuki, S. Tamaki, et al. // *PLOS ONE*. – 2019. – Vol. 14. – № 12. – P. e0227366.
153. Wattenberg, M.M. Platinum response characteristics of patients with pancreatic ductal adenocarcinoma and a germline BRCA1, BRCA2 or PALB2 mutation / M.M. Wattenberg, D. Asch, S. Yu, et al. // *British Journal of Cancer*. – 2019. – Vol. 122. – № 3. – P. 333-339.
154. Wei, T. Monitoring Tumor Burden in Response to FOLFIRINOX Chemotherapy Via Profiling Circulating Cell-Free DNA in Pancreatic Cancer / T. Wei, Q. Zhang, X. Li, et al. // *Molecular Cancer Therapeutics*. – 2019. – Vol. 18. – № 1. – P. 196-203.
155. Weigelt, B. The Landscape of Somatic Genetic Alterations in Breast Cancers From ATM Germline Mutation Carriers / B. Weigelt, R. Bi, R. Kumar, et al. // *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*. – 2018. – Vol. 110. – № 9. – P. 1030-1034.
156. Wooster, R. Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2 / R. Wooster, G. Bignell, J. Lancaster, et al. // *Nature*. – 1995. – Vol. 378. – № 6559. – P. 789-792.

157. Zarkavelis, G. Genetic mapping of pancreatic cancer by targeted next-generation sequencing in a cohort of patients managed with nab-paclitaxel-based chemotherapy or agents targeting the EGFR axis: a retrospective analysis of the Hellenic Cooperative Oncology Group (HeCOG) / G. Zarkavelis, V. Kotoula, G.-A. Kolliou, et al. // *ESMO Open*. – 2019. – Vol. 4. – № 5. – P. e000525.

158. Zhen, D.B. BRCA1, BRCA2, PALB2, and CDKN2A mutations in familial pancreatic cancer: a PACGENE study / D.B. Zhen, K.G. Rabe, S. Gallinger, et al. // *Genetics in Medicine*. – 2015. – Vol. 17. – № 7. – P. 569-577.

159. Zill, O.A. Cell-Free DNA Next-Generation Sequencing in Pancreatobiliary Carcinomas / O.A. Zill, C. Greene, D. Sebisano, et al. // *Cancer Discovery*. – 2015. – Vol. 5. – № 10. – P. 1040-1048.

160. Ziogas, A. Validation of family history data in cancer family registries / A. Ziogas, H. Anton-Culver // *American Journal of Preventive Medicine*. – 2003. – Vol. 24. – № 2. – P. 190-198.

161. Ballehaninna, U.K. The clinical utility of serum CA 19-9 in the diagnosis, prognosis and management of pancreatic adenocarcinoma: An evidence based appraisal / U.K. Ballehaninna, R.S. Chamberlain // *Journal of Gastrointestinal Oncology*. – 2012. – Vol. 3. – № 2. – P. 105-119.

162. Murphy, K.M. Evaluation of candidate genes MAP2K4, MADH4, ACVR1B, and BRCA2 in familial pancreatic cancer: deleterious BRCA2 mutations in 17% / K.M. Murphy, K.A. Brune, C. Griffin, et al. // *Cancer Research*. – 2002. – Vol. 62. – № 13. – P. 3789-3793.

163. Shapiro, B. Determination of circulating DNA levels in patients with benign or malignant gastrointestinal disease / B. Shapiro, M. Chakrabarty, E.M. Cohn, et al. // *Cancer*. – 1983. – Vol. 51. – № 11. – P. 2116-2120.

164. Sorenson, G.D. Soluble normal and mutated DNA sequences from single-copy genes in human blood / G.D. Sorenson, D.M. Pribish, F.H. Valone, et al. // *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention: A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*. – 1994. – Vol. 3. – № 1. – P. 67-71.

165. Yamada, T. Detection of K-ras gene mutations in plasma DNA of patients with pancreatic adenocarcinoma: correlation with clinicopathological features / T. Yamada, S. Nakamori, H. Ohzato, et al. // Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research. – 1998. – Vol. 4. – № 6. – P. 1527-1532.



## ПРИЛОЖЕНИЯ

### Приложение 1. Список анализируемых локусов ДНК

Обозначение локуса	Хромосома	Первая позиция локуса	Последняя позиция локуса
RPL22_1_15	1	6257782	6257816
NRAS_6_7	1	115256503	115256536
SPTA1_1_8	1	158592842	158592875
ACVR2A_2_9	2	148683681	148683706
NFE2L2_7_3	2	178098779	178098823
NFE2L2_3_9	2	178098942	178098981
SF3B1_1_3	2	198266808	198266837
BMPR2_1_8	2	203420099	203420134
EEF1B2_1_18	2	207025348	207025384
VHL_15_3	3	10191460	10191496
CTNNB1_5_2	3	41266093	41266137
DOCK3_3_19	3	51417591	51417636
OR5K3_3_12	3	98109938	98109972
PIK3CA_46_6	3	178916898	178916945
PIK3CA_23_1	3	178921540	178921574
PIK3CA_38_4	3	178927952	178927985
PIK3CA_36_4	3	178928064	178928092
PIK3CA_4_8	3	178936058	178936099
PIK3CA_32_2	3	178938898	178938939
PIK3CA_31_13	3	178952063	178952102
MB21D2_1_8	3	192516688	192516726
FBXW7_1_12	4	153249354	153249394
SEMA5A_7_13	5	9066611	9066645
APC_16_5	5	112173873	112173918
APC_24_29	5	112175176	112175218
APC_10_9	5	112175616	112175660
APC_4_7	5	112175925	112175965
TTK_2_3	6	80751872	80751911
ESR1_4_13	6	152419911	152419958
EGFR_4_4	7	55259498	55259541

EGFR_del15	7	55242463	55242501
IRF5_1_11	7	128587346	128587380
BRAF_4_21	7	140453123	140453165
BRAF_9_8	7	140481382	140481416
CDKN2A_4_9	9	21971023	21971067
CDKN2A_12_9	9	21971099	21971139
PGM5_1_6	9	70993086	70993129
PGM5_2_13	9	70993137	70993173
GATA3_1_5	10	8111391	8111432
GATA3_34_18	10	8111488	8111533
GATA3_33_16	10	8115710	8115733
GATA3_69_13	10	8115834	8115883
GATA3_44_6	10	8115909	8115957
GATA3_63_20	10	8115956	8115994
TCF7L2_4_20	10	114925307	114925335
TRIM48_2_7	11	55035840	55035884
PRPF19_1_15	11	60666745	60666787
KRAS_13_3	12	25380250	25380290
KRAS_5_14	12	25398269	25398312
FOXA1_1_13	14	38061215	38061255
NRXN3_1_13	14	79933740	79933780
AKT1_1_15	14	105246550	105246585
B2M_1_2	15	45003705	45003752
CDH1_5_12	16	68772192	68772235
TP53_374_17	17	7573965	7574004
TP53_164_9	17	7574007	7574050
TP53_367_18	17	7576842	7576883
TP53_264_6	17	7577016	7577061
TP53_321_12	17	7577064	7577112
TP53_15_13	17	7577113	7577159
TP53_48_4	17	7577498	7577548
TP53_97_20	17	7577546	7577594

TP53_415_9	17	7579552	7579594
TP53_360_10	17	7578174	7578216
TP53_77_5	17	7578216	7578260
TP53_85_2	17	7578258	7578294
TP53_131_1	17	7578353	7578403
TP53_27_6	17	7578401	7578441
TP53_170_26	17	7578438	7578484
TP53_240_1	17	7578489	7578527
TP53_188_10	17	7578525	7578566
TP53_303_12	17	7579294	7579337
TP53_363_6	17	7579343	7579382
TP53_380_5	17	7579385	7579436
TP53_397_22	17	7579455	7579500
TP53_338_1	17	7579502	7579547
ERBB2_3_18	17	37880211	37880248
ERBB2_1_8	17	37880967	37881010
XYLT2_2_20	17	48433959	48433994
RNF43_1_10	17	56435123	56435170
SMAD4_8_12	18	48591895	48591933
KEAP1_1_26	19	10600428	10600472
RPSAP58_1_12	19	24010293	24010324
RHPN2_1_3	19	33490450	33490501
BAX_1_6	19	49458933	49458977
GNAS_1_10	20	57484386	57484423
RUNX1_4_2	21	36252968	36253012
U2AF1_1_18	21	44524452	44524489
CHEK2_1_12	22	29091839	29091878
MED12_4_18	X	70339217	70339255
FAM39B_2_15	X	155252980	155253023