

ГБУЗ «Санкт-Петербургский
клинический научно-
практический центр
специализированных видов
медицинской помощи
(онкологический)»
(Санкт-Петербург, Россия)

РАСШИРЕНИЕ ВОЗМОЖНОСТЕЙ КЛИНИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ ЦИРКУЛИРУЮЩЕЙ ОПУХОЛЕВОЙ ДНК (цодНК)

ФГБУ «НМИЦ онкологии
им. Н.Н. Петрова»
Минздрава России
(Санкт-Петербург, Россия)

А.С. Жабина

EXPANDING THE CLINICAL USES OF CTDNA

А.С. Жабина

*Кандидат медицинских наук, врач отделения химиотерапии,
Санкт-Петербургский клинический научно-практический центр
специализированных видов медицинской помощи (онкологический);
научный сотрудник, научный отдел инновационных методов
терапевтической онкологии и реабилитации, НМИЦ онкологии
им. Н.Н. Петрова Минздрава России.
197758, Санкт-Петербург, п. Песочный, Ленинградская ул., д. 68А.*

A.S. Zhabina

*Candidate of Medicine, Physician of Chemotherapy Department, St. Petersburg Clinical
Research and Practical Center of Specialized Types for Medical Care (Oncological);
Researcher, Department of Innovative Methods of Therapeutic Oncology and
Rehabilitation, N.N. Petrov National Medical Research Center of Oncology.
197758, St. Petersburg, pos. Pesochniji, Leningradskaya ul., 68A.*

Большинство известных в настоящее время исследований касающихся изучения циркулирующей опухолевой ДНК связаны с поиском мутаций. Использование жидкой биопсии обсуждается в контексте неинвазивного получения материала, выявления мутаций, которые приводят к резистентности, терапевтического мониторинга и контроля над заболеванием у онкологических больных. Благодаря разработке методик с высокой чувствительностью определения большого количества генов удалось достигнуть больших успехов.

Ключевые слова: цодНК, мутации, резистентность, мониторинг заболевания.

The majority of currently available studies on the use of this circulating tumour DNA (ctDNA) deal with the detection of mutations. The analysis of cfDNA is often discussed in the context of the noninvasive detection of mutations that lead to resistance mechanisms and therapeutic and disease monitoring

in cancer patients. Indeed, substantial advances have been made in this area, with the development of methods that reach high sensitivity and can interrogate a large number of genes.

Keywords: cfDNA, mutation, resistance, disease monitoring.

Жидкая биопсия в онкологии

Анализ опухолевой ткани исторически является основой диагностики и классификации онкологических заболеваний. Достижения в области лабораторной и клинической онкологии значительно расширили спектр тестов для диагностических, прогностических мероприятий направленных на оптимальное терапевтическое воздействие. Благодаря новым геномным технологиям появилась эпоха прецизионной онкологической помощи. Это, в свою очередь, усилило потребность в высококачественном диагно-

стическом материале. Учитывая организационные и методологические трудности которые возникают при получении тканевой биопсии, открытие циркулирующей опухолевой ДНК (цодНК) в крови и дальнейшее развитие технологий по изучению «жидкой биопсии» представляется привлекательной возможностью для малоинвазивной диагностики. В отличие от получения образцов тканей, геномика опухоли на основе изучения образцов крови не ограничена частотой заборов или техническими сложностями в получении материала. Быстрое развитие анализа цодНК привело к прогрессу потенциального клинического применения данного метода.

Современное обследование и лечение пациентов включает изучение экспрессии различных белков, нарушений в структуре ДНК, РНК, генетических изменений, активности сигнальных путей, микроокружения, взаимодействия с иммунной системой и т.д. На протяжении многих десятилетий способ получения опухолевой ткани путем биопсии остается стандартным. С учетом гетерогенности опухоли и ее изменений на фоне терапии, часто стоит вопрос о проведении повторных биопсий.

Биопсия опухоли и «жидкая» биопсия

За последние 20 лет стало понятно, что для многих опухолей в периферической крови (моче, слюне, стуле) может быть обнаружена опухолевая ДНК [1]. Впервые, циркулирующая ДНК была обнаружена в 1948 г. [2]. Большинство здоровых людей имеют низкую концентрацию ДНК в плазме крови по сравнению с повышенными значениями у больных с онкопатологией [3]. Shapiro и соавторы предложили использовать данные об уровне концентрации свободно циркулирующей ДНК в плазме крови в качестве клинического показателя для дифференциальной диагностики. Например, больные имеющие доброкачественные гастроэнтеральные заболевания, имеют более низкое среднее значение концентрации свободно-циркулирующей ДНК в плазме, чем пациенты со злокачественными новообразованиями [4]. Leon и соавторы показали, что больные с высоким уровнем цодНК имеют прогноз хуже, чем те, у кого уровень цодНК снизился после лечения [5]. В отличие от обычной биопсии исследование «жидкой биопсии» позволяет оценить большой спектр генетических aberrаций, имеющих в опухоли, так как в кровотоке попадают фрагменты из всех опухолевых очагов, находящихся в организме [6].

Ведется большое количество исследований цодНК, которые позволяют получить более полную информацию о характеристиках опухоли. Они могут быть измерены как количественно (для определения объема опухолевой массы, ее динамики на фоне терапии), так и качественно. Таким образом, данная методика представляется весьма перспективной для изучения

опухолей. Тем не менее, в этой зарождающейся области существуют многочисленные ограничения, связанные с биологической природой цодНК, а также неопределенность в отношении клинической валидности или полезности определенных подходов.

Возможности использования «жидкой» биопсии в клинической практике

Известно, что количество цодНК зависит от объема опухолевой массы, с увеличением количества опухолевых клеток, подвергшихся апоптозу и некрозу увеличивается и количество цодНК. Количество выделяемой в кровеносное русло цодНК зависит и от гистологического типа опухоли, размера опухолевых очагов и их васкуляризации, биологических особенностей опухоли, особенностей организма больного и технологических факторов, связанных с методикой определения. Наибольшую роль играет объем опухолевой массы, так как процесс фагоцитоза в опухолевой клетки менее эффективен, чем при физиологической гибели клеток. В результате, происходит накопление клеточного детрита и выделение опухолевой цодНК в кровеносное русло [7].

Для выделения цодНК из плазмы крови необходимы методики определения специфических для опухоли мутаций, отсутствующие в здоровых клетках. Например, мутация EGFR, используемая в качестве маркера, встречается только у 6–7% пациентов НМРЛ и не регистрируется при других опухолях [8]. Изучение цодНК в онкологии значительно упростилось за счет появления новых технологий, позволяющих определить цодНК даже при минимальном ее количестве, что позволяет выявлять цодНК при локализованных формах заболевания [9]. Последние десятилетия привнесло в практику возможность использования секвенирования следующего поколения (next generation sequencing, NGS) [10]. Основным недостатком этих методик является их высокая цена. В 2013 г. Murtaza и соавторы впервые применили методику NGS для мониторинга лечения больных. В исследовании было показано, что при формировании резистентности опухоли к проводимой терапии в периферической крови появляются опухоль-специфические последовательности ДНК [11]. В том же году, Venook и соавторы показали, что с помощью мультигенного теста возможно прогнозирование послеоперационного рецидива [12].

При выявлении цодНК методом полимеразной цепной реакции чувствительность метода технологически ограничена частотой ошибки ДНК-полимеразы (обычно равна 0,01%). При относительно меньшем содержании цодНК среди всей циркулирующей ДНК крови результат считается отрицательным [13].

Результаты анализа часто используются для принятия решений для выбора тактики лечения, а ложно-негативные результаты могут привести к серьезным последствиям.

Минимальная остаточная болезнь

Областью клинического применения количественного определения цоДНК может быть использование в качестве оценки терапии, выявления ранней резистентности или рецидива заболевания.

Наиболее важной областью применения определения цоДНК является выявление опухолевой ДНК в плазме крови после полной циторедукции или при достижении полного регресса. Исследования по прогнозированию послеоперационного рецидива на основе определения цоДНК в плазме крови были проведены для РМЖ, КРР. На ранних стадиях заболевания, хирургическое лечение позволяет излечить достаточно большую часть больных. К сожалению, у части пациентов возникает рецидив заболевания. Именно эта подгруппа больных выигрывает от назначения им системного лечения. Однако до настоящего времени нет эффективных методов исследований, позволяющих выявить среди больных, подвергшихся радикальному хирургическому лечению, тех, кто действительно излечен, и выявить тех, у которых сохраняется остаточная опухолевая болезнь. Имеющиеся в настоящее время прогностические признаки позволяют оценить лишь риск рецидива среди группы больных, но не в состоянии ответить на вопрос о наличии микрометастазов у конкретного пациента [14].

Например, для больных КРР при выявлении цоДНК после резекции первичной опухоли в течение 2–5 лет развивались рецидивы, в то же время, у пациентов без обнаружения цоДНК после хирургического лечения, при сопоставимых сроках наблюдения рецидива заболевания не отмечено [15].

Возможно, в будущих исследованиях, будут применяться персонализированные наборы для конкретного пациента с целью повышения чувствительности и специфичности тестов. Таким образом, выявление цоДНК у больных с ранними формами заболевания может помочь прогнозировать ранний рецидив заболевания, предупредить который возможно, путем проведения профилактической лекарственной терапии.

Метастатические формы или распространенное солидное заболевание

Для оценки эффективности терапии, в настоящее время в качестве стандарта, используют лучевые методы визуализации (компьютерная томография, магнитно-резонансная томография, ультразвуковое исследование и т. д.), а также динамика опухолевых маркеров (ПСА, РЕА, ХГЧ СА125, СА15.3, СА19.9 и т.д.). Преимуществом определения цоДНК является короткий период полужизни в плазме крови (около 2-х часов), что дает возможность оценить динамику изменений через несколько часов. Также, учитывая что «жидкая биопсия» выявляет соматические мутации только в опухоли, это исключает ложнополо-

жительные результаты. Ведется большое количество исследований, где на основании роста концентрации цоДНК прогнозировалось увеличение объема опухолевой массы и прогрессирование заболевания и, наоборот, при получении эффекта на фоне терапии или удалении опухоли происходило резкое падение уровня цоДНК. Такие исследования с успехом проведены у больных КРР, РМЖ [16, 17]. Определение цоДНК может использоваться и для стратификации рисков пациентов по группам риска.

Давно известно, что на фоне проводимой терапии возникает резистентность опухоли за счет появления генетических изменений или нарушений сигнальных путей. Для выявления механизмов резистентности, в настоящее время, необходимо выполнение повторной тканевой биопсии, однако часто приходится сталкиваться с трудностями получения новых образцов, достаточного объема опухолевого материала. Еще одно направление, где возможно использование цоДНК – это выявление механизмов резистентности и «раннего прогрессирования» на фоне лекарственной терапии. Резистентность связанная с генетическими изменениями описана для некоторых солидных опухолей [18]. Таким образом, определение цоДНК может быть использовано для мониторинга в процессе таргетной терапии и своевременного изменения лечения при необходимости.

Уже известно, что более чем у 50% больных НМРЛ резистентность к ингибиторам тирозинкиназы эпидермального фактора роста (EGFR) развивается за счет мутации Т790М. Изначально, эти данные использовались при изучении рутинных биопсий опухолей, после прогрессирования на анти-EGFR-терапии. В последующих исследованиях было показано, что мутация Т790М может быть обнаружена в плазме крови. Среди солидных опухолей это первый пример изучения резистентности к терапии по плазме крови, без рутинной биопсии [19].

Похожее исследование проведено для больных КРР. На фоне терапии моноклональными антителами против EGFR (цетуксимаб, панитумумаб) возникает вторично резистентность ассоциированная с развитием мутации KRAS и амплификации MET. Появление мутированных вариантов цоДНК может предшествовать клиническому прогрессированию на несколько месяцев вперед. Еще одним открытием явилось то, что у одного пациента могут возникать множественные приобретенные мутации в процессе лечения, которые также можно обнаружить при анализе цоДНК [20].

Большинство современных исследований основывается на выявлении уже известных мутаций, в том числе мутаций резистентности к определенным препаратам. В исследовании Murtaza и соавторов, проведенном в 2013 г. на 6 пациентах, страдающих раком молочной железы, яичников и легкого проводилось изучение цоДНК путем полного секвенирования. Наблюдение осуществлялось в течении 1–2 лет в

Таблица 1.

Возможности использования цоДНК

Предопухоловая диагностика и мониторинг	Высокий риск развития опухоли у здоровых людей Современные скрининговые тесты являются инвазивными/дорогостоящими (например колоноскопия, низкодозная КТ) Подозрительные скрининговые тесты требуют инвазивного/трудоемкого/дорогостоящего подтверждения Здоровые носители генов наследственной предрасположенности к раку (BRCA1, BRCA2, NF1, TP53)
Минимальная остаточная болезнь	Рак головы и шеи после ХЛТ НМРЛ после хирургического лечения или адъювантной терапии КРР III ст после адъювантной ХТ или IV ст. после радикального хирургического лечения РМЖ с факторами высокого риска после стандартной терапии (неоадъювантная ХТ с последующим хирургическим лечением +/-ЛТ) РМЖ с высоким риском гормональных рецепторов после 5 лет эндокринной терапии Уротелиальный рак высокого риска после стандартной терапии Рак поджелудочной железы после панкреатодуоденэктомии Острый миелоидный или лимфобластный лейкоз после индукционной терапии Острый миелоидный или лимфобластный лейкоз после ТСК
Рецидивирующее или метастатическое заболевание	Распространенные солидные опухоли на фоне поддерживающей терапии, для выявления раннего прогрессирования (НМРЛ, рак яичников на фоне PARP ингибиторов, РМЖ на фоне антиHER2 терапии) Пациенты с полным ответом на фоне терапии ИКТ Оценка раннего ответа у «молекулярно не реагирующих» пациентов Платформенные исследования новообразования к лекарственным мишеням с последующим воздействием на них

процессе лечения [21]. Такой анализ позволил более широко изучить спектр генетических нарушений которые возникали в процессе лечения. Мониторинг в реальном времени может помочь принять ранние меры для повышения эффективности терапии.

Ведутся попытки предсказания иммунотерапевтического ответа путем оценки в периферической крови таких биомаркеров [22] как MSI и мутационная нагрузка (ТМВ). Полногеномное секвенирование цоДНК может позволить заменить ТМВ из опухолевой ткани на ТМВ крови (bТМВ). При этом необходимо помнить, что на уровень bТМВ влияет количество цоДНК, необходимость валидации для каждого анализа и показания [23, 24, 25]. Например, в 2-х рандомизированных исследованиях атезолизумаба по сравнению с химиотерапией у больных НМРЛ более высокие пороговые значения bТМВ соответствовали большей эффективности ИТК.

Особый интерес представляет собой изучение цоДНК при оценке ответа на терапию ИКТ, поскольку клинический и рентгенологический ответ при первой оценке могут вводить в заблуждение из-за задержки ответа или псевдопрогрессирования. Ранние изменения цоДНК могут дать дополнительную информацию для оценки эффекта терапии и выявления респондентов не отвечающих на терапию, даже при рентгенологической стабилизации заболевания. Од-

нако небольшое количество публикаций в настоящее время ограничивает возможности интерпретации этих результатов [26, 27].

Некоторые большие рандомизированные исследования напрямую сравнивали биомаркер изучаемый в крови и опухоли и выявили определенные сложности клинической оценки. Исследования бупалисиба и алпелисиба оценивали наличие PIK3CA как в опухолевой ткани так и в плазме крови [28].

В исследовании SOLAR-1 соответствие между мутационным статусом PIK3CA показало специфичность 97% (209 из 215 образцов), чувствительность 55% (179 из 328 образцов) в отношении цоДНК. В этих двух исследованиях, улучшение ВБП было выше, когда PIK3CA обнаруживали в крови, чем при выявлении в ткани. Отражают ли эти результаты преимущество одновременного тестирования или клинически значимые субклоны не присутствуют в одном образце опухоли или, что является более вероятным, обнаружение цоДНК обнаруживается у пациентов с большой опухолевой нагрузкой и следовательно имеющих худший прогноз до настоящего времени не определено [29, 30].

Сейчас можно найти большое количество исследований, изучающих роль цоДНК в различных направлениях в онкологии. Примеры таких исследований представлены в табл. 2.

Таблица 2.

**Клинические исследования изучающие цоДНК в предраковых состояниях,
при МОБ, метастатических заболеваниях**

Исследование	Описание
B-FAST, 2a	мНМРЛ, терапия назначается на основании обнаружения изменений в плазме крови
CHRONOS	мКРР с диким типом мутаций RAS 2,3,4 экзонов, BRAV V600E полный или частичный регресс на фоне ХТ+антиEGFR терапия Наблюдение и контроль жидкой биопсии
plasmaMATCH, 2a	мРМЖ, проводится генотипирование цоДНК с помощью ПЦР. Терапия проводится согласно выявленным мишеням
PC-BETS, 2a	Кастрационно-резистентный РПЖ. Проводится генотипирование цоДНК с помощью NGS
DYNAMIC II, 3b	КРР II ст. Решение о назначении адъювантной терапии по результатам цоДНК
c-TRAK TN, 3a	ТНРМЖ получившие стандартное первичное лечение. Пациентам с положительной цоДНК назначалась терапия ИКТ
MSK исследование, 3a NCT03832569	Солидные опухоли с наличием MSI-H после хирургического лечения. При анализе цоДНК + назначение терапии пембролизумаб или плацебо в соотношении 1:1
SEPT9-CROSS	Пациенты с циррозом печени и без гепатоцеллюлярной карциномы подвергаются тестированию на mSEPT9 биомаркера
MSK исследование NCT03372902	Женщины с доброкачественными образованиями в молочной железе и рентгенографическими BI-RADS4 признаками. Проводится сбор анализов крови для дальнейшего секвенирования
SUMMIT	Участники в возрасте 50–77 лет. Группа А с высоким риском рака легких, группа В – вне зоны риска. В обеих группах заборы крови для анализа цоДНК
цоДНК как фактор стратификации скрининга рак легкого	На фоне стандартного скрининга рака легкого оценка цоДНК, с целью определения чувствительности и специфичности метода
LIBERATE-CHARM	Субъекты с известными или подозреваемыми синдромами наследственного рака. Оценка роли цоДНК в обнаружении рака

Заключение

Предполагается, что быстрое внедрение интегральных биомаркеров цоДНК в интервенционных клинических исследованиях приведет к выявлению полезных точек приложения и последующей интеграции в повседневную клиническую практику [31]. Результаты такого анализа позволяют получить информацию о специфических патологических процессах в организме больного. Большое значение анализ цоДНК может иметь при назначении таргет-

ной терапии, мониторинге опухолевого процесса, для выявления минимальной остаточной болезни, оценки молекулярной гетерогенности опухоли и выявления приобретенной лекарственной устойчивости. На ранних стадиях заболевания или при определении минимальной остаточной болезни, когда в плазме крови может присутствовать очень малое количество цоДНК, для ее детекции необходимо применять высокочувствительные методы анализа.

Список литературы:

1. *Alix-Panabières C., Schwarzenbach H., Pantel K.* Circulating tumor cells and circulating tumor DNA // *Annu Rev Med.* – 2012. – Vol. 63. – P. 199–215.
2. *Mandel P., Metais P.* Les acides nucleiques du plasma sanguin chez l'homme // *C R Seances Soc Biol Fil.* – 1948. – Vol. 142. – P. 241–3.
3. *Jung K., Fleischbacher M., Rabien A.* Cell-free DNA in the blood as a solid tumor biomarker – a critical appraisal of the literature // *Clin Chim Acta.* – 2010. – Vol. 411, № 21– 22. – P. 1611–1624.
4. *Shapiro B., Chakrabarty M., Cohn E.M., et al.* Determination of circulating DNA levels in patients with benign or malignant gastrointestinal disease // *Cancer.* – 1983. – Vol. 51, № 11. – P. 2116– 2120.
5. *Leon S.A., Shapiro B., Sklaroff D.M., et al.* Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy // *Cancer Res.* – 1977. – Vol. 37, № 3. – P. 646–650.
6. *Murtaza M., Dawson S.J., Tsui D.W., et al.* Non-invasive analysis of acquired resistance to cancer therapy by sequencing of plasma DNA // *Nature* 2013. – Vol. 497, № 7447. – P. 108–12.
7. *Stroun M., Lyautey J., Lederrey C., et al.* About the possible origin and mechanism of circulating DNA: Apoptosis and active DNA release // *Clin Chim Acta.* – 2001. – Vol. 313, № 1–2. – P. 139–142.

8. Diehl F., Schmidt K., Choti M.A., et al. Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics // Nat. Med. – 2007. – Vol. 14, № 9. – P. 985–90.
9. Daniotti M., Vallacchi V., Rivoltini L., et al. Detection of mutated BRAFV600E variant in circulating DNA of stage III–IV melanoma patients // Int J. Cancer -2007. – Vol. 120, № 11. – P. 2439–44.
10. Cooke S., Campbell P. Circulating DNA and next-generation sequencing // Recent Results Cancer Res. – 2012. – Vol. 195. – P. 143–9.
11. Murtaza M., Dawson S.J., Tsui D.W., Rosenfeld N., et al. Non-invasive analysis of acquired resistance to cancer therapy by sequencing of plasma DNA // Nature. – 2013. – May 2. – Vol. 497. – P. 108–112.
12. Venook A.P., Niedzwiecki D., Lopatin M., Bertagnolli M.M. // Biologic Determinants of Tumor Recurrence in Stage II Colon Cancer: Validation Study of the 12-Genes Recurrence Score in Cancer and Leukemia Group B (CALGB) 9581 // J. Clin Oncol. 2013. – May 10. – Vol. 31, № 14. – P. 1775–1781.
13. Li M., Diehl F., Dressman D., et al. BEAMing up for detection and quantification of rare sequence variants // Nat. Met. 2006. – Vol. 3, № 2. – P. 95–7.
14. Жуков Н.В., Зарецкий А.Р., Лукьянов С. А., Румянцев С.А. Исследование циркулирующей опухолевой ДНК (жидкая биопсия) Перспективы использования в онкологии // Онкогематология. – Т. 9. – № 4 (2014). – P. 28–36.
15. Mouliere F., Robert B., Arnau Peyrotte E., et al. High fragmentation characterizes tumor-derived circulating DNA // PLoS One. – 2011. – Vol. 6, № 9. – P. e23418.
16. Forshaw T., Murtaza M., Parkinson C., et al. Noninvasive identification and monitoring of cancer mutations by targeted deep sequencing of plasma DNA // Sci Transl Med. – 2012. – Vol. 4, № 136. – P. 136ra68.
17. Shinozaki M., O'Day S.J., Kitago M., et al. Utility of circulating B-RAF DNA mutation in serum for monitoring melanoma patients receiving biochemotherapy // Clin. Cancer Res. – 2007. – Vol. 13, № 7. – P. 2068–74.
18. Pao W., Miller V.A., Politi K.A., et al. Acquired resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib is associated with a second mutation in the EGFR kinase domain // PLoS Med. – 2005. – Vol. 2, № 3. – P. e73.
19. Taniguchi K., Uchida J., Nishino K., et al. Quantitative detection of EGFR mutations in circulating tumor DNA derived from lung adenocarcinomas // Clin Cancer Res. – 2011. – Vol. 17, № 24. – P. 7808–7815.
20. Misale S., Yaeger R., Hobor S., et al. Emergence of KRAS mutations and acquired resistance to anti-EGFR therapy in colorectal cancer // Nature 2012. – Vol. 486. – P. 532–536.
21. Murtaza M., Dawson S.J., Tsui D.W., et al. Non-invasive analysis of acquired resistance to cancer therapy by sequencing of plasma DNA // Nature. – 2013. Vol. 497, № 7447. – P. 108–12.
22. Le D.T., et al. PD-1 Blockade in tumors with mismatch-repair deficiency // N. Engl. J. Med. – 2015. – Vol. 372. – P. 2509–2520.
23. Wang Z., et al. Assessment of blood tumor mutational burden as a potential biomarker for immunotherapy in patients with non-small cell lung cancer with use of a next-generation sequencing cancer gene panel // JAMA Oncol. – 2019. – Vol. 5. – P. 696–702.
24. Willis J., et al. Validation of microsatellite instability detection using a comprehensive plasma-based genotyping panel // Clin. Cancer Res. – 2019. – Vol. 25. – P. 7035–7045.
25. Gandara D.R., et al. Blood-based tumor mutational burden as a predictor of clinical benefit in non-small-cell lung cancer patients treated with atezolizumab // Nat. Med. – 2018. – Vol. 24. – P. 1441–1448.
26. Tie J., et al. Circulating tumor DNA as an early marker of therapeutic response in patients with metastatic colorectal cancer // Ann. Oncol. – 2015. – Vol. 26. – P. 1715–1722.
27. Riediger A.L., et al. Mutation analysis of circulating plasma DNA to determine response to EGFR tyrosine kinase inhibitor therapy of lung adenocarcinoma patients // Sci. Rep. – 2016. – Vol. 6. – P. 33505.
28. Baselga J., et al. Buparlisib plus fulvestrant versus placebo plus fulvestrant in postmenopausal, hormone receptor-positive, HER2-negative, advanced breast cancer (BELLE-2): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial // Lancet Oncol. – 2017. – Vol. 18. – P. 904–916.
29. Andre F., et al. SOLAR-1 study group. Alpelisib for PIK3CA-mutated, hormone receptor-positive advanced breast cancer // N. Engl. J. Med. – 2019. – Vol. 380. – P. 1929–1940.
30. Kalinsky K., Heguy A., Bhanot U.K., Patil S. & Moynahan M.E. PIK3CA mutations rarely demonstrate genotypic intratumoral heterogeneity and are selected for in breast cancer progression // Breast Cancer Res. Treat. – 2011. – Vol. 129. – P. 635–643.
31. David W., Scott V., Steven M., Lillian L.S. Circulating tumor DNA and liquid biopsy in oncology // Nature Cancer. – 2020. – Vol. 1. – P. 276–290.

References

1. Alix-Panabières C., Schwarzenbach H., Pantel K. Circulating tumor cells and circulating tumor DNA. Annu Rev Med. 2012; 63: 199-215. doi: 10.1146/annurev-med-062310-094219.
2. Mandel P., Metais P. Les acides nucleiques du plasma sanguin chez l'homme. C R Seances Soc Biol Fil 1948; 142(3-4): 241-3. Corpus ID: 87044013.
3. Jung K., Fleischbacker M., Rabien A. Cell-free DNA in the blood as a solid tumor biomarker – a critical appraisal of the literature. Clin Chim Acta. 2010; 411 (21–22): 1611–1624. doi: 10.1016/j.cca.2010.07.032.
4. Shapiro B., Chakrabarty M., Cohn E.M., et al. Determination of circulating DNA levels in patients with benign or malignant gastrointestinal disease. Cancer. 1983; 51 (11): 2116–2120. doi: 10.1002/1097-0142(19830601)51:11<2116::aid-cncr2820511127>3.0.co;2-s.

5. Leon S.A., Shapiro B., Sklaroff D.M., et al. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res.* 1977; 37 (3): 646-650.
6. Murtaza M., Dawson S.J., Tsui D.W., et al. Non-invasive analysis of acquired resistance to cancer therapy by sequencing of plasma DNA. *Nature* 2013;497(7447):108–12. doi: 10.1038/nature12065. Epub. 2013. Apr 7.
7. Stroun M., Lyautey J., Lederrey C., et al. About the possible origin and mechanism of circulating DNA: Apoptosis and active DNA release. *Clin Chim Acta.* 2001; 313(1–2): 139-142. doi: 10.1016/s0009-8981(01)00665-9.
8. Diehl F., Schmidt K., Choti M.A., et al. Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. *Nat Med* 2007; 14(9): 985-90. doi: 10.1038/nm.1789. Epub. 2007. Jul 31.
9. Daniotti M., Vallacchi V., Rivoltini L., et al. Detection of mutated BRAFV600E variant in circulating DNA of stage III–IV melanoma patients. *Int J Cancer* 2007; 120(11): 2439-44. doi: 10.1002/ijc.22598.
10. Cooke S., Campbell P. Circulating DNA and next-generation sequencing. *Recent Results Cancer Res.* 2012; 195: 143-9. doi: 10.1007/978-3-642-28160-0_12.
11. Murtaza M., Dawson S.J., Tsui D.W., Gale D., Forshew T., Piskorz A.M., Parkinson C., Chin S.F., Kingsbury Z., Wong A.S., Marass F., Humpbray S., Hadfield J., Bentley D., Chin T.M., Brenton J.D., Caldas C., Rosenfeld N. Non-invasive analysis of acquired resistance to cancer therapy by sequencing of plasma DNA. *Nature.* 2013; May 2; 497(7447): 108-12. doi: 10.1038/nature12065. Epub. 2013. Apr 7.
12. Venook A.P., Niedzwiecki D., Lopatin M., Ye X., Lee M., Friedman P.N., Frankel W., Clark-Langone K., Millward C., Shak S., Goldberg R.M., Mahmoud N.N., Warren R.S., Schilsky R.L., Bertagnoli M.M. Biologic Determinants of Tumor Recurrence in Stage II Colon Cancer: Validation Study of the 12-Gene Recurrence Score in Cancer and Leukemia Group B (CALGB) 9581. *J Clin Oncol.* 2013, May 10; 31(14): 1775-81. doi: 10.1200/JCO.2012.45.1096. Epub. 2013. Mar 25.
13. Li M., Diehl F., Dressman D., et al. BEAMing up for detection and quantification of rare sequence variants. *Nat Met* 2006; 3(2): 95-7. doi: 10.1038/nmeth850.
14. Zhukov N.V., Zaretskiy A.R., Lukyanov S.A., Rumyantsev S.A. Circulating tumor DNA detection (liquid biopsy): prospects in oncology. *Oncohematology.* 2014; 9(4): 28-36. doi: org/10.17650/1818-8346-2014-9-4-28-36. (In Russ.).
15. Mouliere F., Robert B., Arnau Peyrotte E., et al. High fragmentation characterizes tumor-derived circulating DNA. *PLoS One.* 2011;6(9): e23418.
16. Forshew T., Murtaza M., Parkinson C., et al. Noninvasive identification and monitoring of cancer mutations by targeted deep sequencing of plasma DNA. *Sci Transl Med.* 2012; 4(136): 136ra68. doi: 10.1126/scitranslmed.3003726.
17. Shinozaki M., O'Day S.J., Kitago M., et al. Utility of circulating B-RAF DNA mutation in serum for monitoring melanoma patients receiving biochemotherapy. *Clin Cancer Res.* 2007; 13(7): 2068–74. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-06-2120.
18. Pao W., Miller V.A., Politi K.A., et al. Acquired resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib is associated with a second mutation in the EGFR kinase domain. *PLoS Med.* 2005; 2(3): e73. doi: 10.1371/journal.pmed.0020073.
19. Taniguchi K., Uchida J., Nishino K., et al. Quantitative detection of EGFR mutations in circulating tumor DNA derived from lung adenocarcinomas. *Clin Cancer Res.* 2011; 17(24): 7808-15. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-11-1712.
20. Misale S., Yaeger R., Hobor S., et al. Emergence of KRAS mutations and acquired resistance to anti-EGFR therapy in colorectal cancer. *Nature.* 2012; 486(7404): 532-6. doi: 10.1038/nature11156.
21. Murtaza M., Dawson S.J., Tsui D.W., et al. Non-invasive analysis of acquired resistance to cancer therapy by sequencing of plasma DNA. *Nature* 2013; 497(7447): 108–12. doi: 10.1038/nature12065.
22. Le D.T., et al. PD-1 Blockade in tumors with mismatch-repair deficiency. *N. Engl. J. Med.* 2015; 372: 2509-2520. doi: 10.1056/NEJMoa1500596.
23. Wang Z., et al. Assessment of blood tumor mutational burden as a potential biomarker for immunotherapy in patients with non-small cell lung cancer with use of a next-generation sequencing cancer gene panel. *JAMA Oncol.* 2019; 5: 696-702. doi: 10.1001/jamaoncol.2018.7098.
24. Willis J., et al. Validation of microsatellite instability detection using a comprehensive plasma-based genotyping panel. *Clin. Cancer Res.* 2019; 25: 7035-7045. doi:10.1001/jamaoncol.2018.7098.
25. Gandara D.R., et al. Blood-based tumor mutational burden as a predictor of clinical benefit in non-small-cell lung cancer patients treated with atezolizumab. *Nat. Med.* 2018; 24: 1441-1448. doi: 10.1038/s41591-018-0134-3.
26. Tie J., et al. Circulating tumor DNA as an early marker of therapeutic response in patients with metastatic colorectal cancer. *Ann. Oncol.* 2015; 26: 1715-1722. doi: 10.1093/annonc/mdv177.
27. Riediger A.L., et al. Mutation analysis of circulating plasma DNA to determine response to EGFR tyrosine kinase inhibitor therapy of lung adenocarcinoma patients. *Sci. Rep.* 2016; 6: 33505. doi: 10.1038/srep33505.
28. Baselga J., et al. Buparlisib plus fulvestrant versus placebo plus fulvestrant in postmenopausal, hormone receptor-positive, HER2-negative, advanced breast cancer (BELLE-2): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2017; 18: 904-916. doi: 10.1016/S1470-2045(17)30376-5.
29. Andre F., et al. SOLAR-1 study group. Alpelisib for PIK3CA-mutated, hormone receptor-positive advanced breast cancer. *N. Engl. J. Med.* 2019; 380: 1929-1940. doi: 10.1056/NEJMoa1813904
30. Kalinsky K., Heguy A., Bhanot U.K., Patil S. & Moynahan M.E. PIK3CA mutations rarely demonstrate genotypic intratumoral heterogeneity and are selected for in breast cancer progression. *Breast Cancer Res. Treat.* 2011; 129: 635-643. doi: 10.1007/s10549-011-1601-4.
31. David W., Scott V., Steven M., Lillian L.S. Circulating tumor DNA and liquid biopsy in oncology. *Nature Cancer.* 2020; 1: 276-290. doi.org/10.1038/s43018-020-0043-5.