

DOI: <https://doi.org/10.23868/gc321225>

Жидкостная биопсия плазмы и желчи с выявлением внеклеточной опухолевой ДНК при протоковой аденокарциноме поджелудочной железы: пилотное исследование

М. Джайн¹, Д.П. Атаян², Т.И. Рахматуллин³, Т.Е. Дахтлер², П.А. Попов², П.П. Ким², Ю.В. Гонтарева², Л.М. Самоходская¹, В.И. Егоров², А.А. Камалов¹

¹ Медицинский научно-образовательный центр Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, Москва, Российская Федерация;

² Акционерное общество «Ильинская больница», Московская область, Российская Федерация;

³ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Российская Федерация

АННОТАЦИЯ

Введение. Жидкостная биопсия плазмы по внеклеточной опухолевой ДНК является одной из наиболее перспективных диагностических технологий при протоковой аденокарциноме поджелудочной железы, однако ввиду низкой концентрации данного биомаркера в плазме его выявляемость оказывается ниже ожидаемой. В то же время у ряда пациентов с данным заболеванием наблюдаются нарушения оттока желчи, при которых возможно взятие этого уникального биоматериала для анализа.

Цель исследования — сравнение диагностического потенциала жидкостной биопсии по внеклеточной опухолевой ДНК желчи и плазмы у пациентов с протоковой аденокарциномой.

Материал и методы. В пилотное исследование включены 15 пациентов с впервые выявленной протоковой аденокарциномой поджелудочной железы и нарушениями оттока желчи. Внеклеточную ДНК выделяли из 5 мл плазмы и 5 мл желчи. Анализ внеклеточной опухолевой ДНК проводили с использованием цифровой капельной ПЦР по мутациям гена *KRAS* G12A, G12C, G12D, G12R, G12S, G12V, G13D и Q61H (183A>C), Q61H (183A>T), Q61K, Q61L, Q61R. Порог ложноположительных капель определяли при анализе внеклеточной ДНК, выделенной из плазмы 15 здоровых добровольцев.

Результаты. В образцах желчи внеклеточная опухолевая ДНК была выявлена у 13 из 15 пациентов, в то время как среди образцов плазмы положительными оказались лишь 9 из 15. Причём не было ни одного случая, когда бы она выявлялась в плазме, но не в соответствующем образце желчи. Уровни опухолевой ДНК в желчи были статистически значимо выше, чем в плазме: 538,0 (4,1–1960,0) против 4,4 (0–27,6) копий/мл ($p=0,005$).

Заключение. Жидкостная биопсия желчи у пациентов с нарушениями её оттока может служить многообещающей альтернативой плазме благодаря содержанию большего количества внеклеточной опухолевой ДНК в данном биоматериале.

Ключевые слова: жидкостная биопсия; внеклеточная ДНК; цифровая капельная ПЦР; протоковая аденокарцинома поджелудочной железы; желчь; опухолевая ДНК.

Для цитирования:

Джайн М., Атаян Д.П., Рахматуллин Т.И., Дахтлер Т.Е., Попов П.А., Ким П.П., Гонтарева Ю.В., Самоходская Л.М., Егоров В.И., Камалов А.А. Жидкостная биопсия плазмы и желчи с выявлением внеклеточной опухолевой ДНК при протоковой аденокарциноме поджелудочной железы: пилотное исследование // Гены и клетки. Т. 18, № 1. С. 41–51. DOI: <https://doi.org/10.23868/gc321225>

DOI: <https://doi.org/10.23868/gc321225>

Tumor cell-free DNA detection-based liquid biopsy of plasma and bile in pancreatic ductal adenocarcinoma: a pilot study

Mark Jain¹, David P. Atayan², Tagir I. Rakhmatullin³, Tatyana E. Dakhtler², Pavel A. Popov², Pavel P. Kim², Julia V. Gontareva², Larisa M. Samokhodskaya¹, Vyacheslav I. Egorov², Armais A. Kamalov¹

¹ Medical Scientific and Educational Center, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation;

² Joint Stock Company "Ilyinsky Hospital", Moscow Region, Russian Federation;

³ Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

ABSTRACT

INTRODUCTION: Plasma liquid biopsy with tumor cell-free DNA detection is one of the most promising technologies in pancreatic ductal adenocarcinoma diagnosis. Due to low levels of this biomarker in plasma its detectability turns out to be lower than expected. However, some patients with this disease present with biliary obstruction, which enables collection of bile for tumor cell-free DNA analysis.

THE AIM: To comparison of diagnostic potential of cell-free tumor DNA detection-based liquid biopsy of plasma and bile in pancreatic ductal adenocarcinoma patients.

MATERIAL AND METHODS: The pilot study included 15 primary untreated pancreatic ductal adenocarcinoma patients with biliary obstruction. Cell-free DNA was isolated from 5 mL of plasma and 5 mL of bile. Tumor cell-free DNA detection was performed using digital droplet PCR with *KRAS* gene mutations analysis: G12A, G12C, G12D, G12R, G12S, G12V, G13D и Q61H (183A>C), Q61H (183A>T), Q61K, Q61L, Q61R. False-positive droplets threshold was established during the analysis of plasma cell-free DNA samples from 15 healthy volunteers.

RESULTS: Tumor cell-free DNA was detected in 13 out of 15 bile samples, whereas among paired plasma samples only 9 were positive. All plasma positive samples had a paired positive bile sample. Tumor cell-free DNA levels were statistically significantly higher in bile than in plasma: 538.0 (4.1–1960.0) vs. 4.4 (0–27.6) copies/mL ($p=0.005$).

CONCLUSION: Bile liquid biopsy in pancreatic ductal adenocarcinoma patients with biliary obstruction is a promising alternative to plasma analysis, due to higher concentrations of tumor cell-free DNA.

Keywords: liquid biopsy; cell-free DNA; digital droplet PCR; pancreatic ductal adenocarcinoma; bile; tumor DNA.

To cite this article:

Jain M, Atayan DP, Rakhmatullin TI, Dakhtler TE, Popov PA, Kim PP, Gontareva JV, Samokhodskaya LM, Egorov VI, Kamalov AA. Tumor cell-free DNA detection-based liquid biopsy of plasma and bile in pancreatic ductal adenocarcinoma: a pilot study. *Genes & cells*. 2023;18(1):41–51. DOI: <https://doi.org/10.23868/gc321225>

Received: 27.09.2022

Accepted: 01.12.2022

Published: 07.04.2023

ВВЕДЕНИЕ

В соответствии с результатами эпидемиологического исследования GLOBOCAN, в 2020 году во всём мире было выявлено 496 тыс. новых случаев протоковой аденокарциномы поджелудочной железы (ПАПЖ). Она занимает 14-е место среди всех онкологий по заболеваемости и 7-е место по смертности: ежегодно эта разновидность рака уносит жизни 466 тыс. пациентов [1]. Диагностика на ранних стадиях заболевания затруднена ввиду отсутствия специфических симптомов, что вместе с агрессивностью опухоли служит одной из основных причин низкой 5-летней выживаемости при ПАПЖ (до 5%) [2]. По оценкам экспертов, к 2030 году ПАПЖ может выйти на 2-е место по смертности среди всех онкологических заболеваний, уступая лишь раку лёгких [3].

Одна из наиболее перспективных технологий диагностики ПАПЖ — жидкостная биопсия. Данный термин используется в качестве собирательного названия различных методов выявления опухолевых дериватов в биологических жидкостях организма, таких как кровь, моча, ликвор и др. Аналитическими мишенями жидкостной биопсии чаще всего выступает внеклеточная опухолевая ДНК (воДНК), однако активно изучаются экзосомальная ДНК, циркулирующие опухолевые клетки, различные РНК и «обученные опухоли» тромбоциты [4]. Чтобы отличить воДНК от внеклеточной ДНК (вДНК), для здоровых клеток применяют как анализ hot-spot-мутаций, характерных только для опухолевых клеток, так и анализ паттернов эпигенетической регуляции.

Известно, что при ПАПЖ в опухолевом биоматериале в 64–70% случаев встречаются мутации в гене *KRAS*, причём практически все нуклеотидные замены приходятся на кодоны 12, 13 и 61, что делает эти мутации удобной мишенью для анализа не только с помощью секвенирования, но и методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) [5, 6]. Благодаря этому жидкостная биопсия плазмы по воДНК при ПАПЖ стала активно изучаться, однако в ряде случаев у пациентов с известным генотипом опухоли выявить воДНК в плазме не удаётся. Причина этого — в целом низкое содержание вДНК в данном биоматериале: зачастую в 1 мл плазмы встречаются всего несколько молекул воДНК, что существенно повышает вероятность ложноотрицательного результата [7].

Теоретически более концентрированной в плане содержания воДНК альтернативой плазме может служить желчь ввиду малого объёма, возможности прямого контактирования с опухолью при её инвазии в желчные протоки и непрямого — через межклеточную жидкость. В 75–80% случаев опухоль локализуется в головке поджелудочной железы, и в большей части подобных случаев у пациентов наблюдаются нарушения оттока желчи, требующие дренирования желчных путей, что позволяет провести забор этого биоматериала [8, 9].

Цель пилотного исследования — сравнение диагностического потенциала жидкостной биопсии по воДНК желчи и плазмы у пациентов с ПАПЖ.

В качестве метода количественного анализа воДНК выбрана цифровая капельная ПЦР благодаря её устойчивости к ингибиторам ПЦР, присутствие которых ожидается при выделении нуклеиновых кислот из желчи, а также высокой аналитической чувствительности, превосходящей таковую в случае применения ПЦР в режиме реального времени и секвенирования нового поколения [10, 11].

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Дизайн пилотного исследования

Работа одобрена Локальным этическим комитетом Медицинского-научно-образовательного центра Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова (протокол № 12/21 13 декабря 2021 г.) по заявлению АО «Ильинская больница». Всеми участниками подписано добровольное информированное согласие. Включение пациентов проводилось в период с января 2022 по июнь 2022 г. на базе АО «Ильинская больница».

В пилотное исследование включено 15 пациентов с впервые выявленной первичной ПАПЖ и нарушениями оттока желчи. Морфологическую верификацию диагноза выполняли при помощи толстоигольной биопсии первичной опухоли или метастаза печени с гистологическим исследованием, при локализованных опухолях проводили эндосонографию с цитологическим анализом. Визуализацию и описание пространственных параметров злокачественного новообразования осуществляли с использованием КТ, МРТ и позитронно-эмиссионной томографии/КТ с ^{18}F ФДГ по показаниям. Во всех случаях определяли сывороточный уровень СА 19-9 (Ед/мл) методом иммуноферментного анализа.

В контрольную группу для установления порогового уровня ложноположительных капель при анализе воДНК методом цифровой капельной ПЦР вошли 15 здоровых добровольцев в возрасте 18–24 лет без жалоб на состояние здоровья и при отсутствии сведений о раке желудочно-кишечного тракта в семейном анамнезе. Клинико-демографическая характеристика участников исследования представлена в табл. 1. Все лабораторные манипуляции выполняли на базе Медицинского-научно-образовательного центра Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

Сбор и пробоподготовка биоматериала

У всех пациентов были собраны образцы периферической венозной крови в объёме 12 мл в пробирки с ЭДТА, после сбора биоматериал хранили при температуре 4 °С не более 4 ч, после чего кровь центрифугировали при 3000 g в течение 10 мин и плазму переносили

Таблица 1. Клинико-демографическая характеристика участников исследования**Table 1.** Clinical and demographic characteristics of study participants

Параметр Parameter	Группа ПАПЖ PDAC group, n=15	Здоровые добровольцы Healthy volunteers, n=15
Возраст, лет Age, years	64,6 (44,0–75,0)	21,6 (18,0–24,0)
Пол, n: Sex, n:		
• мужчин male	7	7
• женщин female	8	8
Локализация опухоли в поджелудочной железе, n: Tumor localization in pancreas, n:		
• головка head	11	Н/д N/a
• головка + тело head + body	3	Н/д N/a
• головка + тело + хвост head + body + tail	1	Н/д N/a
Размер опухоли, n: Tumor size, n:		
• >4 см >4 cm	7	Н/д N/a
• 2–4 см 2–4 cm	7	Н/д N/a
• <2 см <2 cm	1	Н/д N/a
Контакт опухоли с артериями, n Contact of tumor with arteries, n	11	Н/д N/a
Контакт опухоли с венами, n Contact of tumor with veins, n	13	Н/д N/a
Инвазия опухоли в желчные протоки, n Invasion of tumor into pancreatic ducts, n	14	Н/д N/a
Отдаленные метастазы, n Distant metastasis, n	3	Н/д N/a

Примечание: ПАПЖ — протоковая аденокарцинома поджелудочной железы, н/д — нет данных; возраст представлен в виде среднего (разброс).

Note: PDAC — pancreatic ductal adenocarcinoma, n/a — not available; age is presented as mean (range).

в чистые пробирки. Затем плазму вновь центрифугировали при 3000 г в течение 10 мин для осаждения оставшихся частиц и переносили в новые пробирки, которые замораживали при -80°C .

У всех включённых в исследование пациентов с ПАПЖ отмечались нарушения оттока желчи, в связи с чем им проводили наружное дренирование желчных путей или стентирование общего желчного протока с забором желчи. Цельную желчь замораживали при -80°C . Перед процедурой выделения ДНК, после разморозки, образцы желчи тщательно перемешивали пульс-вortexированием и подвергали двум циклам центрифугирования при тех же параметрах, что и кровь.

Выделение ДНК

Нуклеиновые кислоты выделяли из 5 мл плазмы и 5 мл супернатанта желчи с использованием набора реагентов QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit (QIAGEN, Германия). Экстракцию проводили с добавлением РНК-носителя для повышения выхода нуклеиновых кислот [12]. Выделение ДНК из плазмы выполняли в строгом соответствии с инструкцией производителя, однако для супернатанта желчи протокол модифицировали: фаза лизиса биоматериала была увеличена на 30 мин. Объем элюирования ДНК составил 50 мкл.

Анализ ДНК

Количество вДНК и воДНК определяли с помощью автоматизированной системы для цифровой капельной ПЦР QX200 AutoDG (Bio-Rad, США) в соответствии с рекомендациями производителя. Для выявления воДНК использовали наборы олигонуклеотидных праймеров и зондов ddPCR KRAS G12/G13 Screening Kit и ddPCR KRAS Q61 Screening Kit (Bio-Rad, США), способные одновременно детектировать широкий спектр мутаций гена KRAS «в одной пробирке» без дискриминации между конкретными нуклеотидными заменами: G12A, G12C, G12D, G12R, G12S, G12V, G13D и Q61H (183A>C), Q61H (183A>T), Q61K, Q61L, Q61R соответственно. Амплификацию ДНК проводили на приборе CFX96 (Bio-Rad, США) с использованием следующего протокола: инкубирование при 95°C в течение 10 мин, 40 циклов денатурации при 94°C в течение 30 с и отжига/элонгации при 55°C в течение 60 с, инкубирование при 98°C в течение 10 мин. В реакционную смесь для цифровой капельной ПЦР вносили максимально допустимый объем раствора ДНК (9,9 мкл).

Общее количество вДНК определяли как сумму количества аллелей мутантного и дикого типа. Результаты цифровой капельной ПЦР представлены как в абсолютном виде (число копий на 1 мл биоматериала), так

и в виде фракции воДНК (уровень воДНК/общий уровень вДНК, %). Пороговое значение количества ложноположительных по мутантному аллелю капель эмульсии устанавливали в ходе анализа вДНК, выделенной из плазмы здоровых добровольцев.

Статистический анализ

Статистическую обработку данных проводили при помощи программного обеспечения SPSS Statistics 22.0 (IBM, США), проверку нормальности распределения — с использованием теста Шапиро–Уилка. Так как данные были распределены ненормально, использовали непараметрические статистические критерии. Для сравнения несвязанных выборок применяли критерий Манна–Уитни, для связанных — тест Вилкоксона. Для определения корреляции изучаемых данных использовали критерий Спирмена. Количественные данные представлены в виде $Me (Q1–Q3)$ — медиана и интерквартильный размах. Результаты статистического анализа считались значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В результате серии экспериментов по выявлению мутаций гена *KRAS* в образцах вДНК из плазмы здоровых добровольцев установлено, что максимальное значение ложноположительных капель с флуоресценцией,

соответствующей опухолевым молекулам ДНК, составило всего 1 каплю эмульсии. Таким образом, все результаты анализа воДНК из биоматериала пациентов с ПАПЖ, в которых выявлялась одна или менее положительная по мутациям гена *KRAS* капля эмульсии, считались негативными, т.е. уровень воДНК принимали равным нулю.

В образцах желчи воДНК выявлена у 13 из 15 пациентов, в то время как среди парных образцов плазмы положительными оказались лишь 9 из 15. Причём не было ни одного случая, когда бы воДНК выявлялась в плазме, но не в соответствующем образце желчи, что подтверждает превосходство желчи над плазмой как субстрата для жидкостной биопсии. Пример результатов цифровой капельной ПЦР при выявлении мутаций *KRAS* в образцах вДНК из плазмы и желчи представлен на рис. 1, *a* и 1, *b* соответственно. Кластеры, соответствующие каплям эмульсии, содержащим молекулы воДНК, уверенно отделяются от кластера с вДНК из нормальных клеток (дикий тип) и кластера с каплями эмульсии, где не произошла амплификация ДНК, что делает интерпретацию результатов выявления воДНК при жидкостной биопсии методом цифровой капельной ПЦР вполне однозначной. Стоит отметить, что все случаи успешного выявления воДНК приходились на мутации в кодонах 12 и 13 гена *KRAS*. Был лишь один образец, содержащий мутации как в кодонах 12 и 13, так и в кодоне 61.

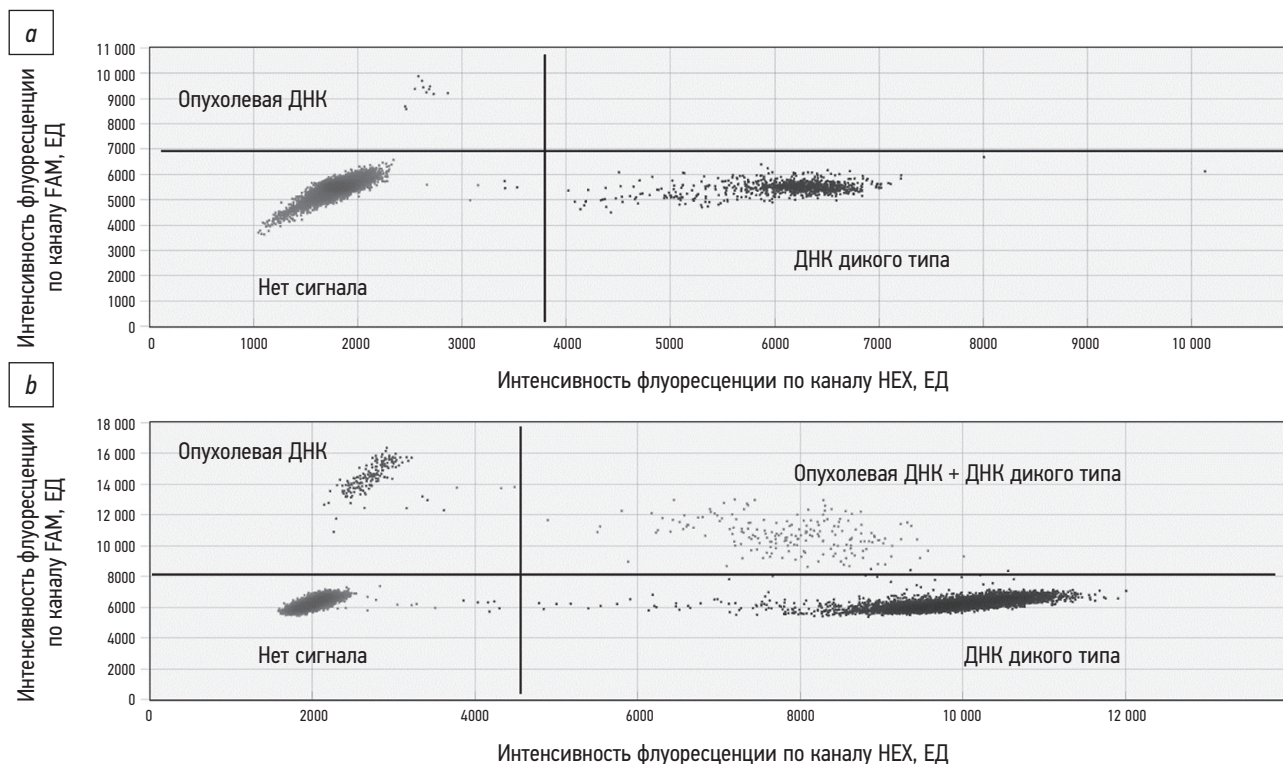


Рис. 1. Примеры результатов анализа внеклеточной ДНК в образцах биоматериала пациента с протоковой аденокарциномой поджелудочной железы: *a* — внеклеточная ДНК, выделенная из образца плазмы; *b* — внеклеточная ДНК, выделенная из образца желчи. Каждая точка на графике соответствует капле эмульсии, сгенерированной при проведении цифровой капельной ПЦР.
Fig. 1. Examples of cell-free DNA analysis output in samples from patients with pancreatic ductal adenocarcinoma: *a* — plasma cell-free DNA; *b* — bile cell-free DNA. Each dot on the graphs represents and emulsion droplet generated using digital droplet PCR.

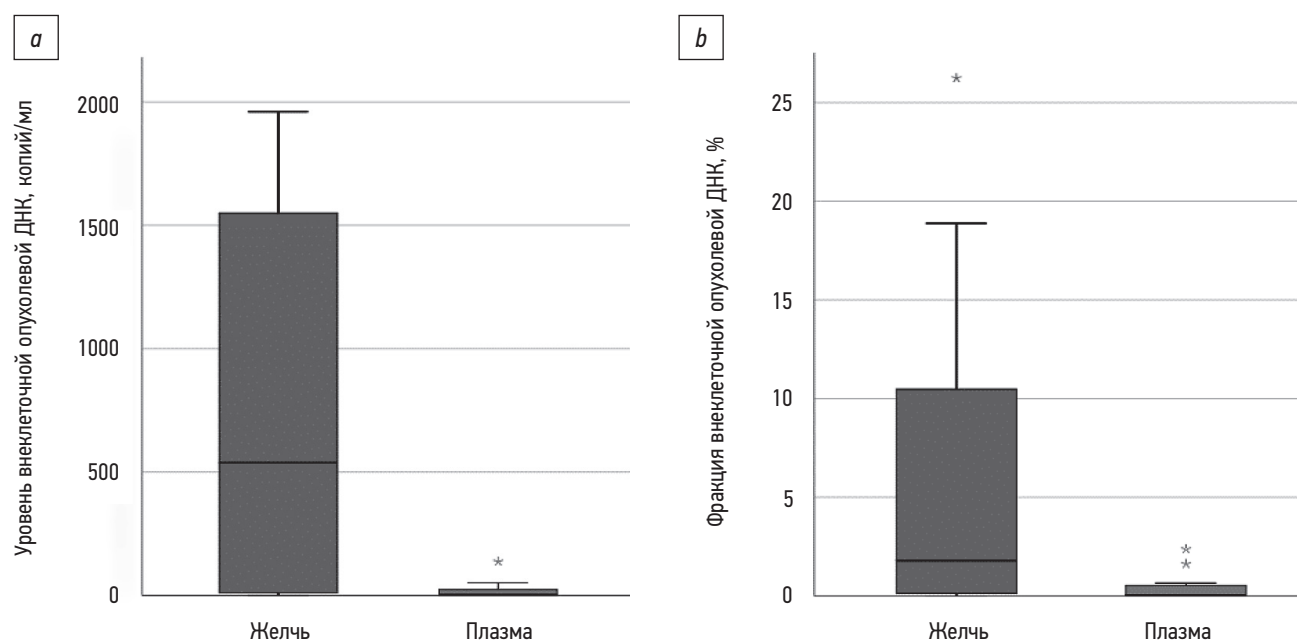


Рис. 2. Сравнение результатов количественного анализа внеклеточной опухолевой ДНК в парных образцах желчи и плазмы: *a* — представление данных в виде копий на 1 мл биоматериала; *b* — представление данных в виде фракции внеклеточной опухолевой ДНК от общего уровня внеклеточной ДНК, %. * — выбросы; для сохранения пропорций на рисунке 2, *a* скрыты выбросы со значениями 5380, 7560, 17 460 копий/мл.

Fig. 2. Comparison of cell-free tumor DNA analysis results in paired samples of plasma and bile: *a* — data presentation as copier per 1 ml of biomaterial; *b* — data presentation as fraction of cell-free tumor DNA in total cell-free DNA, %. * — to mark the outliers; outliers with exceptionally high values (5380, 7560, 17 460 copier/ml) were excluded to preserve the proportions of the diagram.

Разброс уровней содержания воДНК при количественном анализе был довольно выраженным. Так, в образцах воДНК из желчи количество воДНК варьировало от 1 до 17 460 копий/мл в абсолютных значениях и от 0,05 до 26,24% в виде доли воДНК от общего уровня воДНК, в то время как в воДНК из плазмы разброс составил 2,6–137,4 копий/мл и 0,04–2,37%. Впрочем, и по абсолютным значениям, и по фракции содержание воДНК в желчи было статистически значимо выше, чем в плазме: 538,0 (4,1–1960,0) против 4,4 (0–27,6) копий/мл ($p=0,005$) и 1,79 (0,07–11,74) против 0,05 (0–0,57)% ($p=0,009$) соответственно (рис. 2, *a* и 2, *b*). Корреляция между количествами воДНК в парных образцах желчи и плазмы статистически незначима ($p > 0,05$).

Связи количества воДНК как в желчи, так и в плазме с размером опухоли не выявлено ($p > 0,05$), равно как и не выявлено различий в количествах воДНК у пациентов с наличием и отсутствием клинически подтвержденного метастазирования ($p > 0,05$). Статистически значимой корреляции с уровнями сывороточного СА 19-9 также не обнаружено ($p > 0,05$).

ОБСУЖДЕНИЕ

Разработка подходов к ранней диагностике онкологических заболеваний — ключевая задача современной медицины, которая особенно актуальна для рака со столь высокими показателями смертности и поздней

выявляемостью, как ПАПЖ. Жидкостная биопсия рассматривается многими авторами как именно тот инструмент скрининга, который позволит решить вышеуказанную проблему [13, 14]. Впрочем, потенциал данной технологии к раннему выявлению опухолевых дериватов в биологических жидкостях является не только её преимуществом, но и ограничением.

Так, в исследовании M.I. Hosen с соавт. удалось выявить воДНК при анализе биобанкированных за 10 лет до манифестации заболевания образцов мочи пациентов с раком мочевого пузыря [15]. Однако в клиническом исследовании, посвящённом оценке потенциала жидкостной биопсии к скринингу того или иного злокачественного новообразования, подобный результат у пациента без клинически подтверждённого заболевания был бы расценен как ложноположительный. Подтверждением тому является факт, что в подавляющем большинстве исследований по скринингу рака с применением жидкостной биопсии специфичность не достигает 100% и колеблется в диапазоне 80–90% [7, 14]. Оценка прогностического потенциала жидкостной биопсии в отношении клинической манифестации заболевания вполне возможна, однако требует проведения крупных проспективных исследований, в рамках которых необходимо многолетнее наблюдение за субъектами скрининга, или же расширенных программ биобанкирования материала от здоровых лиц с периодическим учётом результатов диспансеризации. Несомненно,

подобные значения специфичности могут объясняться не только случайным сверхчрезмерным выявлением воДНК, большой вклад оказывают и лабораторные ограничения, связанные с применением жидкостной биопсии, такие как вероятность контаминации образцов и выставление неоптимального порога отсечения ложноположительно-го сигнала. Авторами также используются разнообразные методики генетического анализа: от ПЦР в реальном времени до секвенирования нового поколения, каждая из которых обладает своими особенностями при работе с единичными молекулами воДНК в пробе [7, 14].

В представленном пилотном исследовании нам удалось подтвердить выдвинутую гипотезу и продемонстрировать, что жидкостная биопсия желчи при ПАПЖ повышает выявляемость воДНК по сравнению с анализом плазмы. Более того, уровень воДНК в желчи был многократно выше, что существенно снижает требования к чувствительности аналитической системы, открывая возможность применения и более доступных методов генетического анализа. Превосходящий плазму диагностический потенциал желчи продемонстрирован и для злокачественных новообразований желчных протоков и желчного пузыря [16, 17]: выявляемость воДНК в этом биоматериале была на 21–64% выше, чем в плазме, что согласуется с результатами нашего исследования.

Ключевой недостаток подобного подхода к жидкостной биопсии — высокая инвазивность сбора желчи. Злокачественные опухоли поджелудочной железы в целом характеризуются крайне поздней выявляемостью, и у 70% пациентов одним из первых симптомов при первичной постановке диагноза служит обструкция желчных путей, требующая дренирования [18]. Таким образом, в данной группе пациентов получение биоматериала сопряжено с рутинными процедурами. Может показаться, что у оставшихся 30% пациентов сбор желчи по своей инвазивности сопоставим с биопсией опухоли, однако это не так. Наиболее опасное осложнение как толстоигольной, так и тонкоигольной биопсии — распространение опухолевых клеток по ходу иглы [19, 20]. Чрескожная аспирация желчи, не затрагивающая новообразование, с куда меньшей вероятностью приведёт к подобным последствиям. Более того, при помощи дуоденального зондирования желчь и вовсе может быть собрана без нарушения целостности тканей [21]. Впрочем, необходимо признать, что из-за особенностей сбора данного биоматериала его применение для жидкостной биопсии при скрининге асимптоматических пациентов является малооправданным и, возможно, в данном случае предпочтение следует отдать плазме крови.

Обнаруженное отсутствие каких-либо значимых связей между результатами количественного анализа воДНК и клиническими параметрами в первую очередь может объясняться малым размером группы пациентов, однако существуют и другие факторы. Методы визуализации, использованные для оценки параметров

опухоли, отличаются субъективностью анализа. Мутации гена *KRAS* считаются ранним событием туморогенеза при ПАПЖ, но это не означает, что абсолютно все переродившиеся клетки в организме содержат изучаемую мутацию — в ходе генетической эволюции, сопряжённой с ростом, опухоль способна приобретать новые hot-spot-мутации [22]. Таким образом, уровень воДНК, определённый по одной конкретной мутации, может количественно отражать лишь малую долю опухолевых клеток, тогда как размер злокачественного новообразования по данным инструментальных методов визуализации, с которым оценивается корреляция, будет соответствовать всей видимой опухоли. Так, у одного из участников нашего исследования в желчи была выявлена воДНК одновременно по мутациям как в кодонах 12 и 13, так и в кодоне 61, причём в первом случае уровень воДНК был почти в 70 раз ниже (16 против 1140 копий/мл соответственно), тогда как уровень воДНК из нормальных клеток по этим кодонам был одинаковым. Похожие случаи мы наблюдали и при жидкостной биопсии мочи, когда уровни воДНК, определённые по разным мутациям в промоторе гена *TERT* у одного и того же пациента, различались в 4–15 раз [23]. Подтверждением вышеназванным особенностям сравнения результатов жидкостной биопсии с данными КТ служит тот факт, что в исследованиях, посвящённых оценке корреляции уровней воДНК с размером опухоли, если и выявлялась статистически значимая связь, то её сила была лишь средне-слабой (коэффициенты корреляции — 0,32–0,54) [4].

Впрочем, это совершенно не значит, что данные количественного анализа при жидкостной биопсии по воДНК малоинтересны с клинической точки зрения. Сильная сторона данной технологии — не столько определение уровня воДНК при первичной диагностике заболевания (в данном случае оно обладает в первую очередь качественной ценностью), сколько оценка динамики изменения уровня воДНК под влиянием того или иного вида терапии. Так, в ряде исследований по жидкостной биопсии продемонстрировано, что повышение уровней воДНК/наличие детектируемой воДНК в плазме значимо ассоциированы с выживаемостью при ПАПЖ как при хирургическом, так и при химиотерапевтическом лечении [24–26].

Ограничения исследования

В связи с пилотным характером представленного исследования размер групп пациентов был довольно ограниченным; воДНК выявлялась только по ряду мутаций в кодонах 12, 13 и 61 гена *KRAS*, что не позволяет покрыть всю популяцию пациентов с ПАПЖ, так как у некоторых лиц с данным заболеванием опухоль имеет генотип, отрицательный по мутациям в этом гене. Не проводилось секвенирование непосредственного опухолевого материала, полученного в ходе резекции/биопсии для сопоставления генотипов, однако полное отсутствие ложноположительных результатов при использовании

представленной технологии как в группе контроля, так и во время внутренних экспериментов с коммерческими контрольными образцами геномной ДНК в некоторой степени элиминировало необходимость сопоставления результатов жидкостной биопсии с данными секвенирования.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Жидкостная биопсия по внеклеточной опухолевой ДНК — один из наиболее многообещающих диагностических инструментов при протоковой аденокарциноме поджелудочной железы. Она обладает потенциалом как к раннему выявлению онкологического заболевания или рецидива, так и к контролю ответа на терапию. Однако на данном этапе развития технология ещё далека от внедрения в реальную клиническую практику ввиду методологической гетерогенности опубликованных исследований, высокой стоимости, отсутствия стандартизированных протоколов и завершённых крупных рандомизированных клинических исследований.

В представленной работе продемонстрировано, что у пациентов с нарушением оттока желчи жидкостная биопсия этого биоматериала имеет преимущества перед анализом плазмы, которые заключаются в существенно больших частоте выявления внеклеточной опухолевой ДНК и самих уровнях данного биомаркера. Успех пилотного проекта позволяет приступить к основному исследованию, в рамках которого планируется расширение выборки пациентов; добавление новой группы больных с нарушениями оттока желчи, связанными с заболеваниями, требующими дифференциальной диагностики с протоковой аденокарциномой поджелудочной железы; внедрение новой технологии нормализации уровней внеклеточной опухолевой ДНК по экзогенному олигонуклеотиду, что позволит по-новому взглянуть на связь концентрации этого биомаркера с клиническими параметрами.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Источник финансирования. Работа выполнена в рамках Государственного задания Медицинского-научно-

образовательного центра Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Вклад авторов: М. Джайн, Л.М. Самоходская и В.И. Егоров разработали дизайн исследования; М. Джайн, Т.И. Рахматуллин, Ю.В. Гонтарева, П.П. Ким, Т.Е. Дахтлер и Д.П. Атаян выполняли эксперименты; М. Джайн, В.И. Егоров, П.А. Попов, Т.И. Рахматуллин, Д.П. Атаян и Т.Е. Дахтлер анализировали данные; М. Джайн подготовил рукопись с участием всех соавторов; А.А. Камалов, Л.М. Самоходская, В.И. Егоров, Ю.В. Гонтарева, П.П. Ким, Т.Е. Дахтлер и Д.П. Атаян предоставили критически важные реагенты и образцы; А.А. Камалов администрировал проект. Все авторы внесли достаточный вклад в работу, получение, анализ и интерпретацию данных исследования, написание и редактирование текста, а также подтвердили соответствие своего авторства международным критериям ICMJE и одобрили финальную версию рукописи.

ADDITIONAL INFORMATION

Funding source. The study was carried out within the state assignment of Medical Research and Educational Center of Lomonosov Moscow State University.

Competing interests. The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contribution: M. Jain, V.I. Egorov, and L.M. Samokhodskaya designed the study; M. Jain, T.I. Rakhmatullin, J.V. Gontareva, P.P. Kim, T.E. Dakhtler, and D.P. Atayan performed experiments; M. Jain, V.I. Egorov, P.A. Popov, T.I. Rakhmatullin, D.P. Atayan, and T.E. Dakhtler analyzed data; M. Jain wrote the manuscript with input from all authors; A.A. Kamalov, L.M. Samokhodskaya, V.I. Egorov, J.V. Gontareva, P.P. Kim, T.E. Dakhtler, and D.P. Atayan provided critical reagents and samples; A.A. Kamalov administrated the project. Thereby, all authors made a substantial contribution to the conception of the work, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the work, final approval of the version to be published and agree to be accountable for all aspects of the work in concordance with ICMJE criteria.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sung H., Ferlay J., Siegel R.L., et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries // *CA Cancer J Clin.* 2021. Vol. 71, N 3. P. 209–249. doi: 10.3322/caac.21660
2. Bengtsson A., Andersson R., Ansari D. The actual 5-year survivors of pancreatic ductal adenocarcinoma based on real-world data // *Sci Rep.* 2020. Vol. 10, N 1. P. 16425. doi: 10.1038/s41598-020-73525-y
3. Rahib L., Smith B.D., Aizenberg R., et al. Projecting cancer incidence and deaths to 2030: the unexpected burden of thyroid, liver, and pancreas cancers in the United States // *Cancer Res.* 2014. Vol. 74, N 9. P. 2913–2921.
4. Джайн М., Некрасова Л.А., Мещеряков О.А., и др. Жидкостная биопсия как инструмент контроля роста и метастазирования опухоли // *Технологии живых систем.* 2021. Т. 18, № 4. С. 21–33. doi: 10.18127/j20700997-202104-02

5. Tate J.G., Bamford S., Jubb H.C., et al. COSMIC: the catalogue of somatic mutations in cancer // *Nucleic Acids Res.* 2019. Vol. 47, N D1. P. D941–D947. doi: 10.1093/nar/gky1015
6. Tomczak K., Czerwińska P., Wiznerowicz M. The Cancer Genome Atlas (TCGA): an immeasurable source of knowledge // *Contemp Oncol (Pozn).* 2015. Vol. 19, N 1A. P. A68–A77. doi: 10.5114/wo.2014.47136
7. Zhu Y., Zhang H., Chen N., et al. Diagnostic value of various liquid biopsy methods for pancreatic cancer: a systematic review and meta-analysis // *Medicine (Baltimore).* 2020. Vol. 99, N 3. P. e18581. doi: 10.1097/MD.00000000000018581
8. Modolell I., Guarner L., Malagelada J.R. Vagaries of clinical presentation of pancreatic and biliary tract cancer // *Ann Oncol.* 1999. Vol. 10 (suppl. 4). P. 82–84.
9. Distler M., Kersting S., Rückert F., et al. Palliative treatment of obstructive jaundice in patients with carcinoma of the pancreatic head or distal biliary tree. Endoscopic stent placement vs. hepaticojejunostomy // *JOP.* 2010. Vol. 11, N 6. P. 568–574.
10. La Rocca F., Grieco V., Ruggieri V., et al. Superiority of droplet digital PCR over real-time quantitative PCR for JAK2 V617F allele mutational burden assessment in myeloproliferative neoplasms: a retrospective study // *Diagnostics (Basel).* 2020. Vol. 10, N 3. P. 143. doi: 10.3390/diagnostics10030143
11. Heredia-Soto V., Rodríguez-Salas N., Feliu J. Liquid biopsy in pancreatic cancer: are we ready to apply it in the clinical practice? // *Cancers (Basel).* 2021. Vol. 13, N 8. P. 1986. doi: 10.3390/cancers13081986
12. Shaw K.J., Thain L., Docker P.T., et al. The use of carrier RNA to enhance DNA extraction from microfluidic-based silica monoliths // *Anal Chim Acta.* 2009. Vol. 652, N 1–2. P. 231–233. doi: 10.1016/j.aca.2009.03.038
13. Smania M.A. Liquid biopsy for cancer screening, diagnosis, and treatment // *J Am Assoc Nurse Pract.* 2020. Vol. 32, N 1. P. 5–7. doi: 10.1097/JXX.0000000000000359
14. Uhe I., Hagen M.E., Ris F., et al. Cell-free DNA liquid biopsy for early detection of gastrointestinal cancers: a systematic review // *World J Gastrointest Oncol.* 2021. Vol. 13, N 11. P. 1799–1812. doi: 10.4251/wjgo.v13.i11.1799
15. Hosen M.I., Sheikh M., Zvereva M., et al. Urinary TERT promoter mutations are detectable up to 10 years prior to clinical diagnosis of bladder cancer: evidence from the Golestan Cohort Study // *EBio-Medicine.* 2020. Vol. 53. P. 102643. doi: 10.1016/j.ebiom.2020.102643
16. Gou Q., Zhang C.Z., Sun Z.H., et al. Cell-free DNA from bile outperformed plasma as a potential alternative to tissue biopsy in biliary tract cancer // *ESMO Open.* 2021. Vol. 6, N 6. P. 100275. doi: 10.1016/j.esmoop.2021.100275
17. Driescher C., Fuchs K., Haeberle L., et al. Bile-based cell-free DNA analysis is a reliable diagnostic tool in pancreatobiliary cancer // *Cancers (Basel).* 2020. Vol. 13, N 1. P. 39. doi: 10.3390/cancers13010039
18. Kruse E. Palliation in pancreatic cancer // *Surg Clin North Am.* 2010. Vol. 90, N 2. P. 355–364. doi: 10.1016/j.suc.2009.12.004
19. Mizuide M., Ryozaawa S., Fujita A., et al. Complications of endoscopic ultrasound-guided fine needle aspiration: a narrative review // *Diagnostics (Basel).* 2020. Vol. 10, N 11. P. 964. doi: 10.3390/diagnostics10110964
20. Nakatsubo R., Yamamoto K., Itoi T., et al. Histopathological evaluation of needle tract seeding caused by EUS-fine-needle biopsy based on resected specimens from patients with solid pancreatic masses: an analysis of 73 consecutive cases // *Endosc Ultrasound.* 2021. Vol. 10, N 3. P. 207–213. doi: 10.4103/EUS-D-20-00174
21. Hart P., Topazian M., Raimondo M., et al. Endoscopic pancreas fluid collection: methods and relevance for clinical care and translational science // *Am J Gastroenterol.* 2016. Vol. 111, N 9. P. 1258–1266. doi: 10.1038/ajg.2016.297
22. Luo J. KRAS mutation in pancreatic cancer // *Semin Oncol.* 2021. Vol. 48, N 1. P. 10–18. doi: 10.1053/j.seminoncol.2021.02.003
23. Jain M., Kamalov D., Tivtikyan A., et al. Urine TERT promoter mutations-based tumor DNA detection in patients with bladder cancer: a pilot study // *Mol Clin Oncol.* 2021. Vol. 15, N 6. P. 253. doi: 10.3892/mco.2021.2415
24. Watanabe F., Suzuki K., Tamaki S., et al. Longitudinal monitoring of KRAS-mutated circulating tumor DNA enables the prediction of prognosis and therapeutic responses in patients with pancreatic cancer // *PLoS One.* 2019. Vol. 14, N 12. P. e0227366. doi: 10.1371/journal.pone.0227366
25. Ako S., Kato H., Nouse K., et al. Plasma KRAS mutations predict the early recurrence after surgical resection of pancreatic cancer // *Cancer Biol Ther.* 2021. Vol. 22, N 10–12. P. 564–570. doi: 10.1080/15384047.2021.1980312
26. Del Re M., Vivaldi C., Rofi E., et al. Early changes in plasma DNA levels of mutant KRAS as a sensitive marker of response to chemotherapy in pancreatic cancer // *Sci Rep.* 2017. Vol. 7, N 1. P. 7931. doi: 10.1038/s41598-017-08297-z

REFERENCES

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2021;71(3):209–249. doi: 10.3322/caac.21660
2. Bengtsson A, Andersson R, Ansari D. The actual 5-year survivors of pancreatic ductal adenocarcinoma based on real-world data. *Sci Rep.* 2020;10(1):16425. doi: 10.1038/s41598-020-73525-y
3. Rahib L, Smith BD, Aizenberg R, et al. Projecting cancer incidence and deaths to 2030: the unexpected burden of thyroid, liver, and pancreas cancers in the United States. *Cancer Res.* 2014;74(9):2913–2921.
4. Jain M, Nekrasova LA, Meshcheriakov OA, et al. Liquid biopsy as a tool for tumor growth and metastasis formation control. *Technologies of Living Systems.* 2021;18(4):21–33. (In Russ). doi: 10.18127/j20700997-202104-02
5. Tate JG, Bamford S, Jubb HC, et al. COSMIC: the catalogue of somatic mutations in cancer. *Nucleic Acids Res.* 2019;47(D1):D941–D947. doi: 10.1093/nar/gky1015
6. Tomczak K, Czerwińska P, Wiznerowicz M. The Cancer Genome Atlas (TCGA): an immeasurable source of knowledge. *Contemp Oncol (Pozn).* 2015;19(1A):A68–A77. doi: 10.5114/wo.2014.47136
7. Zhu Y, Zhang H, Chen N, et al. Diagnostic value of various liquid biopsy methods for pancreatic cancer: a systematic review and meta-analysis. *Medicine (Baltimore).* 2020;99(3):e18581. doi: 10.1097/MD.00000000000018581
8. Modolell I, Guarner L, Malagelada JR. Vagaries of clinical

presentation of pancreatic and biliary tract cancer. *Ann Oncol*. 1999;10 suppl. 4:82–84.

9. Distler M, Kersting S, Rückert F, et al. Palliative treatment of obstructive jaundice in patients with carcinoma of the pancreatic head or distal biliary tree. Endoscopic stent placement vs. hepaticojejunostomy. *JOP*. 2010;11(6):568–574.

10. La Rocca F, Grieco V, Ruggieri V, et al. Superiority of droplet digital PCR over real-time quantitative PCR for JAK2 V617F allele mutational burden assessment in myeloproliferative neoplasms: a retrospective study. *Diagnostics (Basel)*. 2020;10(3):143. doi: 10.3390/diagnostics10030143

11. Heredia-Soto V, Rodríguez-Salas N, Feliu J. Liquid biopsy in pancreatic cancer: are we ready to apply it in the clinical practice? *Cancers (Basel)*. 2021;13(8):1986. doi: 10.3390/cancers13081986

12. Shaw KJ, Thain L, Docker PT, et al. The use of carrier RNA to enhance DNA extraction from microfluidic-based silica monoliths. *Anal Chim Acta*. 2009;652(1–2):231–233. doi: 10.1016/j.aca.2009.03.038

13. Smania MA. Liquid biopsy for cancer screening, diagnosis, and treatment. *J Am Assoc Nurse Pract*. 2020;32(1):5–7. doi: 10.1097/JXX.0000000000000359

14. Uhe I, Hagen ME, Ris F, et al. Cell-free DNA liquid biopsy for early detection of gastrointestinal cancers: a systematic review. *World J Gastrointest Oncol*. 2021;13(11):1799–1812. doi: 10.4251/wjgo.v13.i11.1799

15. Hosen MI, Sheikh M, Zvereva M, et al. Urinary TERT promoter mutations are detectable up to 10 years prior to clinical diagnosis of bladder cancer: evidence from the Golestan Cohort Study. *EBioMedicine*. 2020;53:102643. doi: 10.1016/j.ebiom.2020.102643

16. Gou Q, Zhang CZ, Sun ZH, et al. Cell-free DNA from bile outperformed plasma as a potential alternative to tissue biopsy in biliary tract cancer. *ESMO Open*. 2021;6(6):100275. doi: 10.1016/j.esmoop.2021.100275

17. Driescher C, Fuchs K, Haeblerle L, et al. Bile-based cell-free DNA analysis is a reliable diagnostic tool in pancreatobiliary cancer. *Cancers (Basel)*. 2020;13(1):39. doi: 10.3390/cancers13010039

18. Kruse E. Palliation in pancreatic cancer. *Surg Clin North Am*. 2010;90(2):355–364. doi: 10.1016/j.suc.2009.12.004

19. Mizuide M, Ryozaawa S, Fujita A, et al. Complications of endoscopic ultrasound-guided fine needle aspiration: a narrative review. *Diagnostics (Basel)*. 2020;10(11):964. doi: 10.3390/diagnostics10110964

20. Nakatsubo R, Yamamoto K, Itoi T, et al. Histopathological evaluation of needle tract seeding caused by EUS-fine-needle biopsy based on resected specimens from patients with solid pancreatic masses: an analysis of 73 consecutive cases. *Endosc Ultrasound*. 2021;10(3):207–213. doi: 10.4103/EUS-D-20-00174

21. Hart P, Topazian M, Raimondo M, et al. Endoscopic pancreas fluid collection: methods and relevance for clinical care and translational science. *Am J Gastroenterol*. 2016;111(9):1258–1266. doi: 10.1038/ajg.2016.297

22. Luo J. KRAS mutation in pancreatic cancer. *Semin Oncol*. 2021;48(1):10–18. doi: 10.1053/j.seminoncol.2021.02.003

23. Jain M, Kamalov D, Tivtikyan A, et al. Urine TERT promoter mutations-based tumor DNA detection in patients with bladder cancer: a pilot study. *Mol Clin Oncol*. 2021;15(6):253. doi: 10.3892/mco.2021.2415

24. Watanabe F, Suzuki K, Tamaki S, et al. Longitudinal monitoring of KRAS-mutated circulating tumor DNA enables the prediction of prognosis and therapeutic responses in patients with pancreatic cancer. *PLoS One*. 2019;14(12):e0227366. doi: 10.1371/journal.pone.0227366

25. Ako S, Kato H, Nouse K, et al. Plasma KRAS mutations predict the early recurrence after surgical resection of pancreatic cancer. *Cancer Biol Ther*. 2021;22(10–12):564–570. doi: 10.1080/15384047.2021.1980312

26. Del Re M, Vivaldi C, Rofi E, et al. Early changes in plasma DNA levels of mutant KRAS as a sensitive marker of response to chemotherapy in pancreatic cancer. *Sci Rep*. 2017;7(1):7931. doi: 10.1038/s41598-017-08297-z

ОБ АВТОРАХ

* Джайн Марк;

адрес: Россия, 119192, Москва, Ломоносовский пр-кт, д. 27, корп. 10;

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6594-8113>;

eLibrary SPIN: 3783-4441;

e-mail: jain-mark@outlook.com

Атаян Давид Павлович;

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9816-3008>;

eLibrary SPIN: 5378-4961;

e-mail: d.atayan@ihospital.ru

Рахматуллин Тагир Ирекович;

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4601-3478>;

e-mail: tagir.rakhmatullin@internet.ru

Дахтлер Татьяна Евгеньевна;

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2240-6381>;

eLibrary SPIN: 8496-7283;

e-mail: t.dakhtler@ihospital.ru

AUTHORS' INFO

* Mark Jain;

address: 27/10 Lomonosovsky avenue, 19234 Moscow, Russia;

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6594-8113>;

eLibrary SPIN: 3783-4441;

e-mail: jain-mark@outlook.com

David P. Atayan;

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9816-3008>;

eLibrary SPIN: 5378-4961;

e-mail: d.atayan@ihospital.ru

Tagir I. Rakhmatullin;

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4601-3478>;

e-mail: tagir.rakhmatullin@internet.ru

Tatyana E. Dakhtler;

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2240-6381>;

eLibrary SPIN: 8496-7283;

e-mail: t.dakhtler@ihospital.ru

Попов Павел Александрович, канд. мед. наук;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3300-7076>;
eLibrary SPIN: 1245-1005;
e-mail: p.popov@ihospital.ru

Ким Павел Петрович;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2022-9569>;
e-mail: p.kim@ihospital.ru

Гонтарева Юлия Викторовна;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4900-8997>;
e-mail: y.gontareva@ihospital.ru

Самоходская Лариса Михайловна, канд. мед. наук;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6734-3989>;
eLibrary SPIN: 5404-6202;
e-mail: slm@fbm.msu.ru

Егоров Вячеслав Иванович, д-р мед. наук;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8805-7604>;
eLibrary SPIN: 4487-1663;
e-mail: v.egorov@ihospital.ru

Камалов Армаис Альбертович, д-р мед. наук;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4251-7545>;
eLibrary SPIN: 6609-5468;
e-mail: priemnaya@mc.msu.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

Pavel A. Popov, MD, Cand. Sci. (Med.);
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3300-7076>;
eLibrary SPIN: 1245-1005;
e-mail: p.popov@ihospital.ru

Pavel P. Kim;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2022-9569>;
e-mail: p.kim@ihospital.ru

Julia V. Gontareva;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4900-8997>;
e-mail: y.gontareva@ihospital.ru

Larisa M. Samokhodskaya, MD, Cand. Sci. (Med.);
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6734-3989>;
eLibrary SPIN: 5404-6202;
e-mail: slm@fbm.msu.ru

Vyacheslav I. Egorov, MD, Dr. Sci. (Med.);
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8805-7604>;
eLibrary SPIN: 4487-1663;
e-mail: v.egorov@ihospital.ru

Armais A. Kamalov, MD, Dr. Sci. (Med.);
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4251-7545>;
eLibrary SPIN: 6609-5468;
e-mail: priemnaya@mc.msu.ru