

<https://doi.org/10.17816/mechnikov201911411-17>

ЦИРКУЛИРУЮЩИЕ ОПУХОЛЕВЫЕ ДНК КАК СПЕЦИФИЧЕСКИЕ БИОМАРКЕРЫ ДЛЯ РАННЕЙ ДИАГНОСТИКИ И ПРОГНОЗА РАКА ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

А.А. Тармаев¹, О.А. Бейлерли²

¹ Харбинский медицинский университет, Провинция Хэйлунцзян, Харбин, Китай;

² ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Республика Башкортостан, Уфа

Для цитирования: Тармаев А.А., Бейлерли О.А. Циркулирующие опухолевые ДНК как специфические биомаркеры для ранней диагностики и прогноза рака поджелудочной железы // Вестник Северо-Западного государственного медицинского университета им. И.И. Мечникова. – 2019. – Т. 11. – № 4. – С. 11–17. <https://doi.org/10.17816/mechnikov201911411-17>

Поступила: 29.07.2019

Одобрена: 11.11.2019

Принята: 09.12.2019

♦ Аденокарциному поджелудочной железы считают одним из самых агрессивных видов рака, характеризующихся высокой летальностью и низкой пятилетней выживаемостью. В основном это связано с поздним выявлением. Сложное анатомическое расположение создает определенные трудности при применении методов визуализации и пункционной биопсии, а стандартные онкомаркеры не обладают высокой чувствительностью и специфичностью. Таким образом, поиск специфических биомаркеров для ранней диагностики и прогноза заболевания, а также мониторинга пациентов с раком поджелудочной железы в процессе лечения является приоритетной задачей для повышения выживаемости пациентов при этом смертельном заболевании. Жидкостная биопсия, которой в последнее время уделяют большое внимание, включающая исследование свободно циркулирующих опухолевых ДНК (ctDNA) в плазме или сыворотке крови, может стать эффективным дополнительным методом исследования. В обзоре рассмотрены данные, полученные в результате исследования ctDNA в качестве ранних и прогностических биомаркеров рака поджелудочной железы и мониторинга заболевания во время лечения.

♦ **Ключевые слова:** циркулирующие опухолевые ДНК; биомаркер; аденокарцинома поджелудочной железы.

CIRCULATING TUMOR DNA AS SPECIFIC BIOMARKERS FOR EARLY DIAGNOSIS AND PROGNOSIS OF PANCREATIC CANCER

A.A. Tarmaev¹, O.A. Beylerli²

¹ Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang Province, China;

² Bashkir State Medical University, Ufa, Republic of Bashkortostan, Russia

For citation: Tarmaev AA, Beylerli OA. Circulating tumor DNA as specific biomarkers for early diagnosis and prognosis of pancreatic cancer. *Herald of North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov*. 2019;11(4):11-17. <https://doi.org/10.17816/mechnikov201911411-17>

Received: July 29, 2019

Revised: November 11, 2019

Accepted: December 9, 2019

♦ Pancreatic adenocarcinoma is considered one of the most aggressive cancers with high mortality and low 5-year survival rate. This is mainly due to its late detection. Complex anatomical location creates certain difficulties for imaging and puncture biopsy methods, while standard tumor markers do not have high sensitivity and specificity. Thus, the search for specific biomarkers for early diagnosis and prognosis of the disease, as well as monitoring patients with pancreatic cancer during treatment, is a priority to improve patient survival in this terminal disease. Liquid biopsy, which has recently gained a lot of attention including the study of free-circulating tumor DNA (ctDNA) in plasma or serum, is a promising additional method of research. In this review, we will consider the latest findings from the ctDNA study as early and prognostic biomarkers for pancreatic cancer and monitoring the disease during treatment.

♦ **Keywords:** ctDNA; biomarker; pancreatic adenocarcinoma.

Введение

Аденокарцинома поджелудочной железы (АКПЖ) — злокачественная опухоль, на которую, по статистическим данным, приходится 80 % всех видов новообразований этого органа. В 2018 г. только в Соединенных Штатах и Европе зарегистрировано 133 300 смертей [1, 2], обусловленных АКПЖ, которая занимает третье место как причина смерти от рака в США [3]. В России на конец отчетного 2018 г. количество больных со злокачественными образованиями составило 3 762 218, то есть 2,6 % населения страны, из них 19 837 случаев приходится на рак поджелудочной железы. Летальность при этом заболевании составляет 39,9 % [4]. У пациентов с установленным диагнозом пятилетняя выживаемость зарегистрирована на уровне 5 % [1, 5]. Плохая выживаемость в основном объясняется отсутствием эффективных методов скрининга, поздней диагностикой, склонностью к раннему метастатическому распространению и резистентностью к системной терапии [6–8]. Приблизительно у 80 % пациентов АКПЖ диагностируют на III–IV стадиях, когда опухоль распространяется на чревный ствол, верхнюю брыжеечную артерию или находят отдаленные метастазы, в таких случаях хирургическое лечение уже нецелесообразно [4]. Даже пациенты, которым успешно выполнена хирургическая резекция, часто страдают от местного рецидива, метакронного метастазирования и резистентны к химиотерапии [9, 10].

Методы диагностики, используемые для постановки диагноза, такие как компьютерная томография, магнитно-резонансная томография, эндосонография, определение уровня онкомаркеров СА19-9, РЭА, пункционная биопсия под УЗИ-наведением, которая до сих пор остается золотым стандартом, имеют ряд недостатков и ограничений. Основные минусы этих исследований — ограниченность применения, неудовлетворительная специфичность, зависимость точности исследования от стадии заболевания, отсутствие возможности отслеживать динамику опухолевого процесса в реальном времени. С помощью визуализирующих методов не удается обнаружить ранние поражения или провести различие между доброкачественными и злокачественными поражениями. Онкомаркеры не являются строго специфичными, так как их уровень в крови может повышаться в результате клинических ситуаций, не связанных с ростом и прогрессией опухоли, что, соответственно, ограничивает их применение. Пункционная биопсия поджелудочной

железы — это инвазивное исследование, для выполнения которого необходимы соответствующие навыки и умения, а цитологический анализ имеет высокий уровень ложных отрицательных результатов, по этой причине порой приходится повторять отбор проб. Анализ биопсийного материала не позволяет судить о динамике опухолевого процесса и об изменении чувствительности опухоли к терапии из-за гетерогенности опухолевой ткани. Таким образом, поиск специфических биомаркеров для ранней диагностики и прогноза заболевания, а также мониторинга пациентов с раком поджелудочной железы в процессе лечения составляет приоритетную задачу для повышения выживаемости пациентов при этом смертельном заболевании. Жидкостная биопсия, которой последнее время уделяют большое внимание и которую считают многообещающим методом, включает исследование свободно циркулирующих опухолевых ДНК (ctDNA) в плазме или сыворотке крови [11, 12].

Происхождение ctDNA

ctDNA — это двухцепочечная молекула, состоящая из небольших фрагментов (от 70 до 200 п. н.) и более крупных фрагментов с молекулярным весом до 21 а. е. м., которая встречается как в плазме, так и в сыворотке [13]. Хотя ДНК может активно высвобождаться из клеток как часть нормального метаболизма, у больных раком ее количество увеличивается от 4 до 40 раз и может достигать концентрации 1000 нг/мл в крови, тогда как у здоровых лиц концентрация бесклеточной ДНК не превышает 100 нг/мл [14, 15]. В основном ДНК попадает в кровотоки в результате апоптоза, некроза и прямого высвобождения в результате метаболизма клеток. При опухолевых заболеваниях наблюдается высокий клеточный обмен и, следовательно, повышенный запрограммированный апоптоз, что может объяснить более высокие уровни ctDNA в плазме по сравнению с другими физиологическими состояниями [13]. В результате высокого темпа роста опухолевой ткани в некоторых участках возникает стойкая гипоксия и, как следствие, некроз опухолевых клеток. Фагоцитоз некротических клеток макрофагами способствует высвобождению клеточных компонентов, в том числе фрагментов ДНК опухоли [16]. Помимо этого активное высвобождение ДНК опухолевыми клетками может происходить независимо от апоптоза и некроза. Это было продемон-

стрировано на лимфоцитах [17]. Теоретически ctDNA должны быстро разрушаться в кровеносном русле под действием нуклеаз. Тем не менее одним из механизмов, обеспечивающих длительную циркуляцию ДНК в крови, является упаковка нуклеинового материала в апоптотические тельца и нуклеосомы. Было показано, что олигонуклеосомные частицы в крови циркулируют в составе иммунных комплексов с анти-ДНК-антителами, и их содержание в крови коррелирует с клиническими параметрами развития заболевания. Доказано также, что нуклеиновые кислоты, высвобождаемые из клетки, могут циркулировать в составе комплексов с ДНК-связывающими белками (альбумин, иммуноглобулины М и G, фибронектин, лактоферрин). Другой механизм, поддерживающий уровень свободной ДНК в кровотоке, заключается в способности прикрепляться к поверхности клеточных элементов крови (эритроцитов и лейкоцитов) за счет ионных связей, а также посредством специализированных мембранных белков [18].

Недавние исследования, в основу которых легло полногеномное секвенирование ДНК плазмы крови, продемонстрировали, что ctDNA содержат последовательность всего генома опухоли, которая может отражать клональную эволюцию опухоли [11]. Это качество открывает возможность использования ctDNA для диагностики и мониторинга рака путем выявления специфических для опухоли генетических и эпигенетических мутаций. Новые технологии позволили улучшить качественный и количественный анализ ctDNA, а исследования злокачественных новообразований, проведенные за последние два десятилетия, свидетельствуют о возможности применения ctDNA в качестве дополнительного диагностического маркера.

Основные методы определения мутаций в ctDNA

Для определения генетической последовательности и выявления клинически значимых мутаций в геноме пациента разработаны разнообразные молекулярно-биологические методы. Однако наиболее комплексным подходом, обеспечивающим достоверный результат подобных исследований, является прямое определение нуклеотидной последовательности участков генома пациента, которое достигается путем секвенирования ДНК. Появление технологий массивного параллельного секвенирования позволило не только увеличить производи-

тельность и скорость прочтения до миллиардов пар оснований, но и существенно снизить стоимость анализа. Фракция циркулирующей опухолевой ДНК может составлять менее 1 % общей свободно циркулирующей ДНК, поэтому методы обнаружения должны обладать высокой чувствительностью и специфичностью [19]. В связи с этими требованиями наиболее эффективными оказались два метода — на основе секвенирования нового поколения (NGS — next generation sequencing) и цифровой капельной полимеразной цепной реакции (ПЦР) (ddPCR) [20, 21].

Цифровая капельная ПЦР представляет собой третье поколение технологии ПЦР. В отличие от ПЦР в реальном времени, хорошо известного количественного относительного метода, цифровая ПЦР является абсолютным, менее чувствительным к влиянию ингибиторов, методом измерения. Система ddPCR вычисляет количество молекул нуклеиновых кислот, инкапсулированных в дискретные капли водно-масляной эмульсии, волюмометрическим методом. Концентрация ДНК-мишени в исходном образце соответствует числу копий в микролитре, определенному с чувствительностью до 1 молекулы. Метод прост в использовании и обладает большой специфичностью и чувствительностью при обнаружении редких мутаций (чувствительность детектирования — 0,001 % мутантов). В отличие от ddPCR с помощью NGS можно «прочитать» одновременно сразу несколько участков генома, что значительно ускоряет и удешевляет исследование. NGS позволяет выявлять новые генетические или эпигенетические изменения, которые недоступны ddPCR. Последними разработками NGS являются улучшенные технологии, такие как Safe-Sequencing system (Safe-seq), Cancer personalized profiling by deep sequencing (CAPP-seq), Integrated digital error suppression-enhanced CAPP-seq (iDES-enhanced CAPP-seq), Base-Position error rate (BPER), которые применяют для исследования ctDNA и которые также обладают высокой чувствительностью (0,001 %) и специфичностью (90 %). Часто методы NGS и ddPCR используют в сочетании [22]. Например, Pécuchet et al. применяли BPER NGS и ddPCR для обнаружения ctDNA у больных раком поджелудочной железы и наблюдали высокую чувствительность и специфичность обоих методов. Кроме того, эти методы прекрасно дополняют друг друга, тем самым повышается точность исследования при выявлении мутаций [23].

Применение ctDNA

Исходя из клональной эволюции АКПЖ и математического моделирования скорости приобретения мутаций можно предположить, что проходит около 11,7 года от приобретения иницирующей мутации в здоровой клетке поджелудочной железы до полной трансформации ее в раковую клетку [24]. Таким образом, существует достаточно большой промежуток времени для раннего выявления АКПЖ. В настоящее время наиболее подробно изучены мутации, которые происходят в онкогенах и генах — супрессорах опухолей. По мере накопления эти генетические изменения приводят к нарушению основных сигнальных путей клеточной регуляции, в результате клетка приобретает злокачественные свойства. В АКПЖ наиболее часто мутируют онкоген *KRAS* (91 %) и три гена — супрессора опухолей: *TP53* (61 %), *CDKN2A* (44 %), *SMAD4* (40 %), которых считают основными драйверами онкогенеза. Однако благодаря недавнему широкому геномному анализу, включая исследования секвенирования всего генома, можно составить более детальное представление о сложных геномных изменениях. Помимо четырех часто мутирующих генов установлен спектр генов, мутирующих только в небольшой части АКПЖ, которые также могут служить драйверами онкогенеза (*GATA6*, *ARID1A*, *RNF43*, *ATM*, *TGFBR2*, *MAP2K4*, *MLL3*, *PIK3CA*, *RBM10*, *ROBO2*, *SMARCA4*, *PBRM1*, *SLIT2*, *KDM6A*, *BRAF*, *BRCA2*) [10].

Начиная с 2000 г. большое внимание уделялось наиболее часто мутировавшему гену *KRAS*, как потенциальному биомаркеру АКПЖ. Как правило, в 90 % случаях мутации *KRAS* происходят в кодонах 12 и 13 и приводят ген в активное состояние. Многие исследования подтвердили, что мутантный *KRAS* можно обнаружить в плазме или сыворотке у пациентов с АКПЖ [25–28]. Maire et al. сообщили, что чувствительность и специфичность мутации *KRAS* в сыворотке для диагностики рака поджелудочной железы составили 47 и 87 % соответственно, а Dabritz et al. удалось путем сочетания мутации *KRAS* ctDNA в плазме с онкомаркером CA19-9 добиться 98 и 77 % чувствительности и специфичности соответственно [28]. Такие же результаты получили Sefrioui et al. Они также использовали онкомаркер CA19-9 и мутации *KRAS* [29]. Bettgowda et al. провели исследование на основе жидкой биопсии у 846 пациентов с 15 типами рака, включая АКПЖ, с помощью цифровых технологий и показали зависимость уровня циркулирующей опухоле-

вой ДНК от стадии заболевания. У пациентов на поздних стадиях мутировавший ген обнаруживали в 80 % случаев, а на ранних стадиях (без инвазии и метастазирования) лишь в 47 % случаев [30]. Были проведены сравнительные исследования по обнаружению мутаций ctDNA в плазме и опухолевых тканях, полученных путем биопсии. Marchese et al. обнаружили мутации в гене *KRAS* в образцах опухолевой ткани в 70 % случаев, тогда как в образцах плазмы тех же пациентов мутация *KRAS* найдена не была [31]. Чуть позже Zill et al., пользуясь методами NGS, выявили мутации *KRAS*, *TP53* и *SMAD4* в 90 % случаев и в плазме, и в опухолевой ткани у 26 пациентов [32].

Рак поджелудочной железы характеризуется не только генетическими мутациями, но и эпигенетическими изменениями. Jones et al. считают, что aberrантное метилирование CpG-островков ДНК может играть ключевую роль в канцерогенезе и опухолевой прогрессии [33]. При aberrантном метилировании инактивируются гены — супрессоры опухолей или, наоборот, усиливаются функции онкогенных сигнальных путей [34]. Обнаружение специфичных эпигенетических изменений в свободно циркулирующей ДНК может стать важным диагностическим инструментом для раннего выявления рака поджелудочной железы. Yi et al. обнаружили гиперметилированные промоторы генов *BNC1* и *ADAMTS1* в сыворотке крови [35]. Стоит изучить возможность использования комбинаторных подходов с несколькими биомаркерами на основе крови, включая геномные и эпигенетические изменения в ctDNA, в качестве стратегии повышения чувствительности и специфичности диагностики рака поджелудочной железы на ранней стадии.

Наибольшую эффективность ctDNA показала в исследованиях, связанных с прогнозированием и ответной реакцией на химиотерапию у пациентов с АКПЖ. Хотя оперативное лечение до сих пор остается основным методом лечения рака поджелудочной железы, но так или иначе всем пациентам независимо от стадии рака при отсутствии противопоказаний рекомендована адъювантная химиотерапия. Многие исследования были посвящены поиску зависимости выживаемости от проведенного лечения. Оказалось, что пациенты с мутацией *KRAS*, обнаруженной ctDNA в плазме, имеют плохой прогноз даже на фоне химиотерапии FOLFIRINOX. Sausen et al. показали, что пациенты с мутацией *KRAS* в ctDNA после операции были более подвержены рецидиву, чем

пациенты без мутации *KRAS*. Следует отметить, что рецидив был выявлен на 6,5 мес. раньше по ctDNA, чем при использовании стандартных методов визуализации [25]. В другом исследовании Nadano et al. оценили появление рецидива и общую выживаемость пациентов, перенесших операцию, при помощи технологии ddPCR. Оказалось, что у пациентов, у которых была обнаружена ctDNA, рецидив возникал в течение 6 мес., а медиана выживаемости составляла около 16 мес., тогда как у пациентов без ctDNA показатели рецидива и медианы выживаемости составили 13 и 27 мес. соответственно [36]. Perets et al. наблюдали за пациентами с IV стадией на фоне химиотерапии и выяснили, что у пациентов с диким типом *KRAS* (немутированным) медиана выживаемости составила около 37,5 мес., а с мутантным *KRAS* около 8 мес. [37]. Интересный анализ провели Nakano et al., которые сравнивали ctDNA, полученную перед операцией, с ctDNA в послеоперационном периоде. Они обнаружили, что у некоторых пациентов без мутации *KRAS* перед операцией могли появиться мутации в этом гене в послеоперационном периоде, и рецидив в таких случаях возникал в течение 6 мес. [38]. В свою очередь Kinugasa et al. более подробно изучили мутации *KRAS* в кодоне 12 у 75 пациентов с помощью ddPCR. Большинство мутаций *KRAS* располагались в кодонах G12V и G12D. Медиана выживаемости у пациентов с такими мутациями также была значительно короче и составляла 276 дней по сравнению с пациентами с диким типом *KRAS* (413 дней). Примечательным оказалось то, что выживаемость у пациентов с мутацией G12V была самой короткой (219 дней) в сравнении с другими мутациями [39]. Интересный анализ провели Wei et al., которые выполняли секвенирование ctDNA и наблюдали не только за мутацией *KRAS*, но и за другими мутациями, выявленными в процессе исследования. В этом исследовании участвовали 38 пациентов с III и IV стадиями на фоне режима первой линии FOLFIRINOX [40]. Результат оказался довольно впечатляющий, так как доказывает пользу применения ctDNA при мониторинге рака. У пациентов с мутациями *KRAS* и *TP53* резистентность к химиотерапии появилась в конце 2-го цикла, после чего опухоль начала снова прогрессировать. Один пациент с мутацией *SF3B1* положительно отреагировал на все четыре цикла химиотерапии, в результате чего размер опухоли уменьшился и появилась возможность выполнить резекцию опухоли. У пациентов с мутацией *GNAS*^{R201S} на фоне ле-

чения уровень ctDNA не изменился. А у пациентов с мутациями *KEAP1* и *BCL11A* ответ на химиотерапию был таким же, как и у пациентов с мутацией *KRAS*. В исследовании также было показано, что ctDNA больше подходит для отслеживания опухолевой прогрессии, чем онкомаркеры CA19-9, CA125 и РЭА.

Заключение

Неудивительно, что ctDNA представляет большой интерес для многих исследователей, так как уже сейчас очевидна значительная польза ее применения для пациентов, страдающих раковыми заболеваниями. Как уже доказано, ctDNA имеет ряд преимуществ: во-первых, это неинвазивный метод диагностики; во-вторых, с помощью технологий ddPCR и NGS можно выявить генетические и эпигенетические изменения, происходящие в опухолевой ткани; в-третьих, уровень ctDNA коррелирует с опухолевой прогрессией. Все эти качества позволяют использовать ctDNA для раннего выявления, прогнозирования и мониторинга заболевания во время лечения.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература

1. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018. *CA Cancer J Clin.* 2018;68(1):7-30. <https://doi.org/10.3322/caac.21442>.
2. Malvezzi M, Carioli G, Bertuccio P, et al. European cancer mortality predictions for the year 2018 with focus on colorectal cancer. *Ann Oncol.* 2018;29(4):1016-1022. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdy033>.
3. Zińczuk J, Zaręba K, Romaniuk W, et al. Expression of chosen carcinoembryonic-related cell adhesion molecules in pancreatic intraepithelial neoplasia (panin) associated with chronic pancreatitis and pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC). *Int J Med Sci.* 2019;16(4):583-592. <https://doi.org/10.7150/ijms.32751>.
4. Состояние онкологической помощи населению России в 2018 году / под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, Г.В. Петровой. – М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2019. – 236 с. [Sostoyaniye onkologicheskoy pomoshchi naseleniyu Rossii v 2018 godu. Ed. by A.D. Kaprin, V.V. Starinskiy, G.V. Petrova. Moscow: Moskovskiy nauchno-issledovatel'skiy onkologicheskii institut im. P.A. Gertsena — filial FGBU "Natsional'nyy meditsinskiy issledovatel'skiy tsentr radiologii" Minzdrava Rossii; 2019. 236 p. (In Russ.)]

5. Neoptolemos JP, Palmer DH, Ghaneh P, et al. Comparison of adjuvant gemcitabine and capecitabine with gemcitabine monotherapy in patients with resected pancreatic cancer (ESPAC-4): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 trial. *Lancet*. 2017;389(10073):1011-1024. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)32409-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)32409-6).
6. Wolfgang CL, Herman JM, Laheru DA, et al. Recent progress in pancreatic cancer. *CA Cancer J Clin*. 2013;63(5):318-348. <https://doi.org/10.3322/caac.21190>.
7. Chin V, Nagrial A, Sjoquist K, et al. Chemotherapy and radiotherapy for advanced pancreatic cancer. *Cochrane Database Syst Rev*. 2018;3:CD011044. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD011044.pub2>.
8. Groot VP, Gemenetzis G, Blair AB, et al. Defining and predicting early recurrence in 957 patients with resected pancreatic ductal adenocarcinoma. *Ann Surg*. 2019;269(6):1154-1162. <https://doi.org/10.1097/SLA.0000000000002734>.
9. Felsenstein M, Hruban RH, Wood LD. New developments in the molecular mechanisms of pancreatic tumorigenesis. *Adv Anat Pathol*. 2018;25(2):131-142. <https://doi.org/10.1097/PAP.0000000000000172>.
10. Groot VP, Rezaee N, Wu W, et al. Patterns, timing, and predictors of recurrence following pancreatectomy for pancreatic ductal adenocarcinoma. *Ann Surg*. 2018;267(5):936-945. <https://doi.org/10.1097/SLA.0000000000002234>.
11. Murtaza M, Dawson SJ, Tsui DW, et al. Non-invasive analysis of acquired resistance to cancer therapy by sequencing of plasma DNA. *Nature*. 2013;497(7447):108-112. <https://doi.org/10.1038/nature12065>.
12. Groot VP, Mosier S, Javed AA, et al. Circulating tumor dna as a clinical test in resected pancreatic cancer. *Clin Cancer Res*. 2019;25(16):4973-4984. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-19-0197>.
13. Jahr S, Hentze H, Englisch S, et al. DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer Res*. 2001;61(4):1659-1665.
14. Jung K, Fleischhacker 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. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2010.07.032>.
15. Fleischhacker M, Schmidt B. Circulating nucleic acids (CNAs) and cancer: a survey. *Biochim Biophys Acta*. 2007;1775(1):181-232. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2006.10.001>.
16. Diehl F, Li M, Dressman D, He Y, et al. Detection and quantification of mutations in the plasma of patients with colorectal tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(45):16368-16373. <https://doi.org/10.1073/pnas.0507904102>.
17. Stroun M, Maurice P, Vasioukhin V, et al. The origin and mechanism of circulating DNA. *Ann NY Acad Sci*. 2000;906:161-168. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2000.tb06608.x>.
18. Laktionov PP, Tamkovich SN, Rykova EY, et al. Cell-surface-bound nucleic acids: free and cell-surface-bound nucleic acids in blood of healthy donors and breast cancer patients. *Ann N Y Acad Sci*. 2004;1022:221-227. <https://doi.org/10.1196/annals.1318.034>.
19. Diehl F, Schmidt K, Choti MA, et al. Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. *Nat Med*. 2008;14(9):985-990. <https://doi.org/10.1038/nm.1789>.
20. Perkins G, Lu H, Garlan F, Taly V. Droplet-based digital PCR: application in cancer research. *Adv Clin Chem*. 2017;79:43-91. <https://doi.org/10.1016/bs.acc.2016.10.001>.
21. Pecuchet N, Zonta E, Didelot A, et al. Base-position error rate analysis of next-generation sequencing applied to circulating tumor dna in non-small cell lung cancer. *PLoS Med*. 2016;13(12):e1002199. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1002199>.
22. Pietrasz D, Pécuchet N, Garlan F, et al. Plasma circulating tumor DNA in pancreatic cancer patients is a prognostic marker. *Clin Cancer Res*. 2017;23(1):116-123. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-0806>.
23. Pecuchet N, Rozenholc Y, Zonta E, et al. Analysis of base-position error rate of next-generation sequencing to detect tumor mutations in circulating DNA. *Clin Chem*. 2016;62(11):1492-1503. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2016.258236>.
24. Yachida S, Jones S, Bozic I, et al. Distant metastasis occurs late during the genetic evolution of pancreatic cancer. *Nature*. 2010;467(7319):1114-1117. <https://doi.org/10.1038/nature09515>.
25. Sausen M, Phallen J, Adleff V, et al. Clinical implications of genomic alterations in the tumour and circulation of pancreatic cancer patients. *Nat Commun*. 2015;6:7686. <https://doi.org/10.1038/ncomms8686>.
26. Tjensvoll K, Lapin M, Buhl T, et al. Clinical relevance of circulating KRAS mutated DNA in plasma from patients with advanced pancreatic cancer. *Mol Oncol*. 2016;10(4):635-643. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2015.11.012>.
27. Maire F, Micard S, Hammel P, et al. Differential diagnosis between chronic pancreatitis and pancreatic cancer: value of the detection of KRAS2 mutations in circulating DNA. *Br J Cancer*. 2002;87(5):551-554. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6600475>.
28. Däbritz J, Preston R, Hänfler J, Oettle H. KRAS mutations in the plasma correspond to computed tomographic findings in patients with pancreatic cancer. *Pancreas*. 2012;41(2):323-325. <https://doi.org/10.1097/MPA.0b013e3182289118>.
29. Sefrioui D, Blanchard F, Toure E, et al. Diagnostic value of CA19.9, circulating tumour DNA and circulating tumour cells in patients with solid pancreatic tumours. *Br J Cancer*. 2017;117(7):1017-1025. <https://doi.org/10.1038/bjc.2017.250>.
30. Bettgowda C, Sausen M, Leary RJ, et al. Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human

- malignancies. *Sci Transl Med*. 2014;6(224):224ra24. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3007094>.
31. Marchese R, Muleti A, Pasqualetti P, et al. Low correspondence between *K-ras* mutations in pancreatic cancer tissue and detection of *K-ras* mutations in circulating DNA. *Pancreas*. 2006;32(2):171-177. <https://doi.org/10.1097/01.mpa.0000202938.63084.e3>.
 32. Zill OA, Greene C, Sebisano D, et al. Cell-free DNA next-generation sequencing in pancreatobiliary carcinomas. *Cancer Discov*. 2015;5(10):1040-1048. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-15-0274>.
 33. Jones PA, Baylin SB. The epigenomics of cancer. *Cell*. 2007;128(4):683-692. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.01.029>.
 34. Fukushige S, Horii A. Road to early detection of pancreatic cancer: attempts to utilize epigenetic biomarkers. *Cancer Lett*. 2014;342(2):231-237. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2012.03.022>.
 35. Yi JM, Guzzetta AA, Bailey VJ, et al. Novel methylation biomarker panel for the early detection of pancreatic cancer. *Clin Cancer Res*. 2013;19(23):6544-6555. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-3224>.
 36. Hadano N, Murakami Y, Uemura K, et al. Prognostic value of circulating tumour DNA in patients undergoing curative resection for pancreatic cancer. *Br J Cancer*. 2016;115(1):59-65. <https://doi.org/10.1038/bjc.2016.175>.
 37. Perets R, Greenberg O, Shentzer T, et al. Mutant *KRAS* circulating tumor DNA is an accurate tool for pancreatic cancer monitoring. *Oncologist*. 2018;23(5):566-572. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2017-0467>.
 38. Nakano Y, Kitago M, Matsuda S, et al. *KRAS* mutations in cell-free DNA from preoperative and postoperative sera as a pancreatic cancer marker: a retrospective study. *Br J Cancer*. 2018;118(5):662-669. <https://doi.org/10.1038/bjc.2017.479>.
 39. Kinugasa H, Nouse K, Miyahara K, et al. Detection of *K-ras* gene mutation by liquid biopsy in patients with pancreatic. *Cancer*. 2015;121(13):2271-2280. <https://doi.org/10.1002/cncr.29364>.
 40. Wei T, Zhang Q, Li X, et al. Monitoring tumor burden in response to FOLFIRINOX chemotherapy via profiling circulating cell-free DNA in pancreatic cancer. *Mol Cancer Ther*. 2019;18(1):196-203. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-17-1298>.

◆ Адрес автора для переписки (*Information about the author*)

Озал Арзуман оглы Бейлерли / Ozal A. Beylerli

Тел. / Tel.: +7(987)5980003

E-mail: obeylerli@mail.ru

<https://orcid.org/0000-0002-6149-5460>