



Короткевич П.Е., Смирнов С.Ю., Медведь А.В., Пивоварчик С.Н.✉, Субоч Е.И., Малькевич В.Т., Портянко А.С.

Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии имени Н.Н. Александрова, Минск, Беларусь

## Жидкостная биопсия с использованием циркулирующей опухолевой ДНК у пациентов с немелкоклеточным раком легкого

**Конфликт интересов:** не заявлен.

**Вклад авторов:** концепция и дизайн исследования, редактирование, сбор материала, обработка, написание текста – Короткевич П.Е., Смирнов С.Ю., Медведь А.В., Пивоварчик С.Н., Субоч Е.И., Малькевич В.Т., Портянко А.С.

Подана: 09.08.2023

Принята: 15.09.2023

Контакты: [serginio0290@rambler.ru](mailto:serginio0290@rambler.ru)

### Резюме

---

Рак легкого занимает лидирующие позиции в структуре онкологической заболеваемости и смертности от злокачественных новообразований в мире. Историческим «стандартом» биологического материала для проведения молекулярно-генетического тестирования является опухолевая ткань. Альтернативным минимально инвазивным методом изучения молекулярных характеристик опухоли является жидкостная биопсия. Наиболее перспективным и изученным субстратом для анализа является циркулирующая опухолевая ДНК (цоДНК) плазмы крови. Данный подход характеризуется малой инвазивностью, простотой многократного получения биоматериала и достаточно высокой концентрацией цоДНК у пациентов с распространенными формами опухолей.

В статье отражены методология анализа цоДНК, возможности использования цоДНК для диагностики молекулярно-генетических нарушений, мониторинга эффективности проводимого лечения и выявления механизмов резистентности у пациентов с метастатическим немелкоклеточным раком легкого, а также оценки минимальной остаточной болезни после радикального лечения.

**Ключевые слова:** немелкоклеточный рак легкого, жидкостная биопсия, циркулирующая опухолевая ДНК, минимальная остаточная болезнь

---



Korotkevich P., Smirnov Yu., Medved A., Pivovarchik S., Suboch E., Malkevich V., Portyanko A.

N.N. Alexandrov National Cancer Center of Belarus, Minsk, Belarus

## Circulating Tumor DNA Liquid Biopsy in Patients with Non-Small Cell Lung Cancer

**Conflict of interest:** nothing to declare.

**Authors' contribution:** concept and design of research, editing, material collection, processing, text writing – Korotkevich P., Smirnov Yu., Medved A., Pivovarchik S., Suboch E., Malkevich V., Portyanko A.

Submitted: 09.08.2023

Accepted: 15.09.2023

Contacts: serginio0290@rambler.ru

### Abstract

Lung cancer is the leading cause of cancer and cancer-related mortality worldwide. Tissue biopsy is the gold-standard diagnostic method used to confirm the diagnosis of cancer and to identify actionable targets. Liquid biopsy is a minimally invasive alternative to tissue biopsy. The most promising and studied tumor-derived material is circulating tumor DNA (ctDNA) detectable in the blood. This approach is characterized by low invasiveness, ease of repeated examination and a sufficiently high concentration of cDNA in patients with advanced disease.

The methodology of ctDNA analysis, the possibility of using ctDNA for the assessment of oncogenic driver alterations, treatment response monitoring and identifying resistance mechanisms in patients with metastatic non-small cell lung cancer, as well as assessing the minimal residual disease after radical treatment, are described in the article.

**Keywords:** non-small cell lung cancer, liquid biopsy, circulating tumor DNA, minimal residual disease

### ■ ВВЕДЕНИЕ

Рак легкого занимает лидирующие позиции в структуре онкологической заболеваемости и смертности от злокачественных новообразований в мире. В 2018 г. в Европе диагностировано 470 000 новых случаев немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ), и практически половине из них установлена IV стадия опухолевого процесса [11].

Основополагающим принципом современной лекарственной противоопухолевой терапии является индивидуализация лечения на основании предиктивных молекулярных маркеров. Историческим «стандартом» биологического материала для проведения молекулярно-генетического тестирования является опухолевая ткань. Тем не менее нередко возникают серьезные ограничения ее использования, связанные со сложностью выполнения тканевой биопсии, недостаточным количеством образца для исследования и гетерогенностью опухоли, особенно у пациентов с прогрессированием заболевания на фоне проводимого лечения [29, 43].

Альтернативным минимально инвазивным методом изучения молекулярных характеристик опухоли является жидкостная биопсия. Данная опция как новая диагностическая концепция появилась в 2010 г. и была использована для анализа циркулирующих опухолевых клеток (ЦОК) в крови онкологических пациентов. В настоящее время материалом для проведения исследования являются не только ЦОК, но и циркулирующие нуклеиновые кислоты (циркулирующая опухолевая ДНК (цоДНК), внеклеточные РНК, микроРНК, опухоль-специфическая метилированная ДНК), внеклеточные везикулы (эксосомы), а также измененные опухолью тромбциты [3, 4, 37, 48].

### **Источники цоДНК**

Наиболее часто используемым источником для выделения цоДНК является плазма крови. Данный подход характеризуется малой инвазивностью, простотой многократного получения биоматериала и достаточно высокой концентрацией цоДНК у пациентов с распространенными формами опухолей. С клинической точки зрения цоДНК плазмы является наиболее изученной и подходящей альтернативой тканевому генотипированию при солидных опухолях, включая НМРЛ, при котором определение EGFR-мутаций в плазме крови впервые вошло в клиническую практику [6, 41]. Следует отметить, что в некоторых ранних работах по изучению прогностической и диагностической значимости цоДНК у онкологических пациентов наряду с плазмой использовалась сыворотка крови [36]. Однако в работе Lee и соавт. было показано, что сыворотка содержит большее количество неопухолевой свободно циркулирующей ДНК (сцДНК), тем самым затрудняя диагностику опухоль-специфичных ДНК-маркеров [23, 24].

В качестве высоко репрезентативных источников цоДНК также можно отметить плевральный/перикардиальный выпот и цереброспинальную жидкость [35, 63]. Несмотря на определенные преимущества данных подходов (высокая концентрация цоДНК и практически полное отсутствие примесей неопухолевой цоДНК соответственно), они являются узкоспециализированными и данные виды биоматериала используются значительно реже плазмы крови в связи с высокой инвазивностью получения биологического образца. Стоит отметить, что исследование цоДНК, полученной из цереброспинальной жидкости, более информативно в сравнении с плазмой крови при анализе молекулярного профиля опухоли у пациентов с НМРЛ при наличии интракраниальных метастазов [60].

Бронхоальвеолярный лаваж является малоинвазивной диагностической процедурой и не уступает плазме крови в качестве биоматериала для детекции цоДНК при использовании метода ультраглубокого секвенирования нового поколения (Next Generation Sequencing, NGS). Однако технологическая сложность процедуры затрудняет серийный забор материала для количественного мониторинга цоДНК [47].

С научной точки зрения определенный интерес представляют такие источники цоДНК, как моча и слюна. В первом случае правильнее будет говорить о трансреальной опухолевой ДНК, т. е. цоДНК плазмы, прошедшей через почечную фильтрацию. Эта особенность влечет ряд специфичных ограничений: размер фрагментов цоДНК (менее 250 нуклеотидов) и различная скорость накопления цоДНК в моче, которая определяется индивидуальными особенностями клубочковой фильтрации



пациентов [53]. Малая концентрация цодНК в обоих типах вышеуказанного биоматериала требует специальных подходов к ее обнаружению. Так, при работе с мочой используются большие объемы биоматериала (до 100 мл) [44]. Это приводит к значительному разбавлению цодНК и, как следствие, необходимости использования методов детекции с высокой аналитической чувствительностью. Слюна, в свою очередь, содержит ультракороткие фрагменты цодНК (40–60 нуклеотидов), которые нельзя амплифицировать с использованием классической технологии полимеразной цепной реакции (ПЦР). Для их обнаружения был разработан высокочувствительный метод электростимулированного высвобождения и измерения (electric field-induced release and measurement; EFIRM), позволяющий выявлять отдельные мутации в генах (EGFR и др.) [27]. Данная особенность, несмотря на высокую чувствительность метода, сильно ограничивает круг пациентов с НМРЛ, у которых он может быть использован.

### **Методология анализа цодНК**

Современные методы экстракции сцДНК позволяют получить ее общий пул, состоящий как из цодНК, так и циркулирующих нуклеиновых кислот неопухолевого происхождения, например, ДНК лейкоцитов периферической крови при работе с плазмой. В связи с этим актуальным является использование подходов к снижению концентрации последней при выделении: обработка плазмы в течение не более 1 часа с момента забора образца или использование специальных пробирок со стабилизатором; дополнительное ультрацентрифугирование образцов [22]. Стоит отметить, что вне зависимости от дальнейшего метода детекции цодНК, важное значение имеет объем биоматериала: в текущих рекомендациях Европейской ассоциации медицинских онкологов по использованию цодНК в клинической практике достаточным считается объем от 8 до 10 мл плазмы крови [50].

Исследование цодНК в общем пуле сцДНК основано на детекции опухоль-специфичных молекулярно-генетических нарушений, таких как мутации, метилирование или копийность генов, фьюжен-гены, оценка транскриптомного профиля или профиля экспрессии некодирующих РНК. Стоит отметить, что определение экспрессии протеина PD-L1 возможно только в опухолевой ткани иммуногистохимическим методом. Наибольшее распространение в научной и клинической практике получили методы исследования цодНК, основанные на выявлении мутаций в одиночных генах (EGFR, PIK3CA и др.) или использовании генных панелей (FoundationOne\_Liquid) [FoundationOne\_Liquid\_CDx\_Label\_Technical\_Info].

Ключевые отличия этих двух подходов состоят в численности пациентов, охваченных тестированием, и используемых методах детекции цодНК. Так, например, использование в качестве маркерных генов EGFR позволяет провести исследование цодНК не более чем у 15% пациентов с НМРЛ в европейской популяции, KRAS – 35%, BRAF – 2%. В научном сообществе продолжается поиск универсальных опухолевых маркеров НМРЛ, позволяющих детектировать цодНК у большей части пациентов. Наиболее перспективными являются нарушения метилирования промоторной области ключевых генов канцерогенеза при данном заболевании, такие как RASSF1, SOX9 и др. [65]. В то же время все большую популярность набирает использование широких генных панелей, включающих сотни и больше генов, так как это позволяет охватить тестированием практически всех пациентов.

Анализ цДНК, основанный на детекции единичных нарушений, как правило, проводится с помощью метода ПЦР в его различных модификациях, отличающихся аналитической чувствительностью. Так, например, аналитическая чувствительность одобренного Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (Food and Drug Administration; FDA) диагностического набора Cobas EGFR Mutation Test (Roche Molecular Systems, Inc.) составляет около 5%. Для сравнения, аналогичный показатель при определении EGFR-мутантной цДНК методом цифровой капельной ПЦР (цкПЦР) варьирует от 1% до 0,01% в зависимости от исходного количества ДНК в реакции и типа мутации. Таким образом, во втором случае можно ожидать большего процента совпадения результатов тестирования цДНК из плазмы и ДНК, выделенной из опухолевой ткани. Также цкПЦР позволяет проводить количественный анализ цДНК, что может быть использовано для оценки ее динамики во время проведения специального противоопухолевого лечения. Концентрация цДНК может измеряться как в копиях/мкл, так и в таких значениях, как MAF/VAF (Minor Allele Frequency / Variant Allele Frequency), что соответствует показателям, используемым в методе NGS.

Для проведения исследования на основе генных панелей используется метод NGS, характеризующийся рядом параметров, влияющих на достоверность результатов: спектром исследуемых генов и глубиной их прочтения (числом покрытий). Чем большее количество генов включено в используемую панель, тем выше вероятность детекции цДНК в исследуемом биоматериале. Глубина прочтения – это показатель среднего количества прочтений каждого нуклеотида [41]. В настоящее время рекомендуемым подходом к анализу цДНК является использование панелей, включающих от 50 до 300 генов, и 5000-кратного покрытия, позволяющих получить аналитическую чувствительность в 0,4% [18]. Обычно оба параметра находятся в обратной зависимости друг от друга: чем меньше генов включает панель, тем выше глубина их прочтения и, как следствие, аналитическая чувствительность метода. Например, ультраглубокое секвенирование 37 опухоль-ассоциированных генов с использованием 50 000-кратного позволило Li и соавт. детектировать патогенные варианты с VAF=0,14% [26]. Вариация этих двух параметров в значительной степени определяет сопоставимость полученных результатов при тестировании цДНК и опухолевой ткани (до 73%) [28]. Также стоит отметить, что, согласно данным последних исследований, процентное соотношение adenокарцином и плоскоклеточного рака в изученных выборках пациентов с НМРЛ также может влиять на диагностическую чувствительность метода NGS [26, 28].

При сравнении результатов тестирования цДНК с образцами опухолевой ткани в качестве референсных у пациентов с распространенными формами НМРЛ (IIIB–IV стадии) процент конкордантности для методов ПЦР составил 55–100%, а для метода NGS – 73–97% [54, 62]. Однако, как было отмечено ранее, детекция отдельных генетических нарушений методом ПЦР может быть использована лишь у небольшого числа пациентов с данным заболеванием.

В настоящее время FDA одобрены 2 платформы для исследования цДНК плазмы методом NGS при солидных опухолях, включая НМРЛ: Guardant360 и FoundationOne Liquid CDx [55, 56].

Применение технологий на основе NGS имеет ряд преимуществ по сравнению с методами на основе ПЦР, так как делает возможным выявление не только определенных мутаций, но и редких, а также неизвестных вариантов. Несмотря на лучшие



показатели чувствительности NGS для детекции цоДНК данный метод также обладает рядом недостатков, т. к. является значительно более трудоемким, затратным по времени и дорогостоящим в сравнении с ПЦР (особенно при высокой глубине прочтения) [25, 31, 40].

### **Клинические аспекты использования цоДНК**

#### **1. Генотипирование опухолей и выявление механизмов приобретенной резистентности**

В обновленном консенсусе Международной ассоциации по изучению рака легкого (International Society for the Study of Lung Cancer; IASLC), опубликованном в 2021 г., пересмотрены рекомендации касательно использования жидкостной биопсии при распространенном НМРЛ. Исследование цоДНК плазмы в настоящее время считается альтернативным вариантом молекулярного профилирования у пациентов с впервые установленным распространенным НМРЛ. Выбор между генотипированием опухолевой ткани или жидкостной биопсией, проводимыми как последовательно, так и одновременно, должен быть индивидуализирован на основе характеристик пациента и заболевания, доступных методологий тестирования и ожидаемых результатов [46]. В проведенных к настоящему времени исследованиях показано увеличение частоты выявления детектируемых биомаркеров на 48–65% при добавлении анализа цоДНК плазмы по сравнению с использованием только тканевых образцов [25, 30]. Следует отметить, что среднее время обработки опухолевого материала значительно превышает таковое при проведении жидкостной биопсии (9 дней против 15 дней;  $P<0,0001$ ) [25].

Согласно рекомендациям Национальной всеобщей онкологической сети (National Comprehensive Cancer Network, NCCN, США) по диагностике и лечению НМРЛ (version 3.2023), тестирование цоДНК может быть использовано в случаях недостаточности или невозможности получения опухолевой ткани для молекулярно-генетических исследований.

Результаты различных клинических испытаний доказали возможность эффективного использования цоДНК в качестве первичного материала для молекулярно-генетического тестирования. Так, например, предварительные результаты зонтичного исследования Blood-First Assay Screening Trial (NCT03178552) указывают на возможность использования цоДНК для обнаружения слияний гена ALK с сопоставимой частотой и показателями объективного ответа у пациентов, получающих алектиниб, с ожидаемыми при тестировании тканевых образцов [12]. Аналогичным образом в клиническом испытании тепотиниба (NCT02864992) жидкостная биопсия для детекции утраты 14-го экзона гена MET показала свою эффективность в сравнении с генотипированием опухоли [39].

При прогрессировании опухолевого процесса на фоне таргетной терапии ингибиторами тирозинкиназ у пациентов с активирующими мутациями первостепенное использование цоДНК предпочтительно для изучения механизмов резистентности по сравнению с проведением повторной тканевой биопсии у пациентов с неинформативным результатом. В данном контексте в первую очередь речь идет о детекции мутации T790M у пациентов с прогрессированием опухолевого процесса на фоне терапии EGFR-ингибиторами 1–2-го поколений [19, 46].

Согласно финальным результатам клинического испытания JP-CLEAR, чувствительность метода детекции патогенного варианта EGFR T790M у пациентов с T790M-резистентным НМРЛ составила 21,1%. Таким образом, ребиопсия опухоли является предпочтительным подходом для оценки изменений в молекулярно-генетическом профиле злокачественного новообразования на фоне терапии EGFR-ингибиторами 1–2-го поколений. Однако частота ответа опухоли на терапию осимертинибом между T790M-цДНК и T790M-ткань подгруппами не отличалась и составила 25% и 28,6% соответственно.

Вторичные мутации в гене ALK также являются частым механизмом резистентности к ALK-ингибиторам 1–2-го поколений и предикторами чувствительности опухолей к препарату третьего поколения лорлатинибу [13]. Данные об эффективности использования цДНК для выявления мутаций устойчивости, а также ALK-независимых генетических механизмов приобретенной резистентности будут получены по результатам II фазы исследования NCI-NRG ALK (NCT03737994), оценивающего соответствие результатов генотипирования тканей и плазмы с помощью NGS после прогрессирования заболевания на фоне терапии ALK-ингибиторами второго поколения (церитиниб, алектиниб, энсартиниб и бригатиниб) [52]. Согласно имеющимся в настоящее время данным G. Hua, частота обнаружения ALK-мутаций в цДНК пациентов с наличием прогрессирования на фоне применения ALK-ингибитора 1-го поколения кризотиниба составляет 36%, в то время как при прогрессировании заболевания на фоне терапии ALK-ингибиторами 2-го поколения – 56% [12].

У пациентов без активирующих мутаций роль цДНК недостаточно определена к настоящему времени, однако имеются многообещающие направления, в частности определение мутационной нагрузки (TMB) для назначения ингибиторов контрольных точек. Ожидается результаты продолжающихся проспективных рандомизированных исследований для решения вопроса о возможности использования данного биомаркера в клинической практике при анализе цДНК [46, 50].

## **2. Мониторинг эффективности лечения**

Большинство исследований по изучению цДНК для мониторинга эффективности лечения при НМРЛ проводились у пациентов с наличием активирующих EGFR-мутаций. Частота их выявления в плазме варьировала от 23 до 100% [5].

В подавляющем большинстве исследований отмечена корреляция между ответом на лечение и снижением мутантной фракции в плазме. Увеличение выживаемости без прогрессирования наблюдалось при неопределенном уровне цДНК в сравнении с пациентами с сохраняющимся биомаркером на фоне таргетной терапии ингибиторами тирозинкиназ [24, 34, 42]. Аналогичные данные также получены в отношении общей выживаемости [17, 20, 59, 64, 66]. Напротив, количественный рост цДНК свидетельствовал о развитии резистентности и ассоциировался с прогрессированием заболевания [2, 21, 33].

В качестве маркера цДНК изучалось также использование KRAS-мутаций. Так, в исследовании Guibet et al. проведен мониторинг уровня цДНК и циркулирующих опухолевых клеток у 32 пациентов с KRAS-позитивным метастатическим НМРЛ. Показано, что использование цДНК характеризуется большей чувствительностью (выявлена у 82%) в сравнении с циркулирующими опухолевыми клетками (выявлена у 34%). Авторами отмечена корреляция между уровнем цДНК и ответом на лечение в 87,5% случаев [16]. В другом исследовании показано, что детекция патогенных



вариантов KRAS G12/G13 в плазме методом цПЦР является независимым неблагоприятным прогностическим фактором по результатам мультивариантного анализа у пациентов с метастатическим НМРЛ в отношении как выживаемости без прогрессирования ( $HR=3,12$ ;  $p<0,001$ ), так и общей выживаемости ( $HR=2,53$ ,  $p=0,002$ ). Увеличение частоты мутантных аллелей KRAS при первой оценке эффекта лечения (через 6–9 недель) ассоциировалось с худшей выживаемостью без прогрессирования ( $p=0,005$ ) [32].

Ответ на лечение в процессе противоопухолевой терапии и наблюдение пациентов с солидными злокачественными опухолями основывается на радиологической оценке согласно критериям RECIST [10]. Однако в ряде случаев рентгенологическая оценка является проблематичной. На фоне иммунотерапии часто наблюдается медленное уменьшение размеров опухолевых очагов либо отмечается их увеличение за счет инфильтрации иммунными клетками – псевдопрогрессирование, что не отражает истинный эффект от лечения [9]. Это может приводить к отмене потенциально эффективной иммунотерапии, и, наоборот, неэффективное лечение может быть продолжено в надежде на реализацию эффекта. Возможность использования цДНК для оценки эффективности иммунотерапии показана в ряде исследований [15, 45].

Sarah B. Goldberg et al. изучали возможность оценки эффективности иммунотерапии на основе жидкостной биопсии. Авторы сравнили изменения уровней цДНК и рентгенологическую динамику у 28 пациентов с метастатическим НМРЛ, получающих ингибиторы контрольных точек, и сопоставили эти данные с показателями выживаемости. За критерий молекулярного ответа принято 50%-ное снижение уровня фракции мутантных аллелей от начального. Если при NGS были идентифицированы несколько мутаций, для анализа выбиралась мутация с наибольшей аллельной фракцией. Согласно полученным результатам, наблюдалась корреляция между молекулярным и рентгенологическим ответом на лечение (Cohen's карра 0,753). Медиана времени до наступления молекулярного ответа составила 24,5 дня, рентгенологического – 72,5 дня. Несмотря на 50%-ный порог молекулярного ответа, авторы наблюдали значительно большее уменьшение цДНК: среди 10 пациентов с частичным ответом по RECIST 1.1 у 8 наблюдалась полная элиминация цДНК из крови, в двух случаях – редукция на 89% и 91%. У пациентов с диагностированным молекулярным ответом продолжительность терапии была достоверно выше, чем при его отсутствии, и составила 205,5 дня и 69 дней соответственно ( $p<0,0001$ ). Молекулярный ответ ассоциировался с увеличением выживаемости без прогрессирования ( $HR=0,29$ ; 95% ДИ 0,09–0,89;  $p=0,03$ ) и общей выживаемости ( $HR=0,17$ ; 95% ДИ 0,05–0,62;  $p=0,007$ ). Интересным фактом явилась элиминация цДНК и достижение высоких показателей выживаемости в двух случаях отсутствия рентгенологического ответа. Авторами сделан вывод о прогностической роли цДНК в качестве раннего маркера терапевтической эффективности иммунотерапии и предикции выживаемости [15].

В исследовании Ricciuti et al. показано, что снижение уровня цДНК после начала иммунотерапии пембролизумабом коррелирует с его клинической эффективностью. Среди пациентов с частичным и полным рентгенологическим ответом ( $n=18$ ) уровень цДНК снизился на 90,1% (от -100% до +65%), при стабилизации процесса ( $n=15$ ) на 19,9% (от -100% до +410%), а в случае прогрессирования заболевания ( $n=12$ ) увеличился на 28,8% (от -100% до +410%) ( $p=0,003$ ). Наличие молекулярного

ответа ассоциировалось с большей частотой объективных ответов (60,7% против 5,8%,  $p=0,0003$ ), более высокими показателями выживаемости без прогрессирования (8,3 мес. против 3,4 мес., HR=0,29;  $p=0,0007$ ) и общей выживаемости (26,2 мес. против 13,2 мес., HR=0,34;  $p=0,008$ ). Ограничениями исследования явились малый объем выборки ( $n=45$ ), разнородность группы по уровню PD-L1 экспрессии (23,2% – <1%, 17,8% – 1%–49%, 59,9% – ≥50%), а соответственно, и по схеме лекарственной терапии: химиоиммунотерапия в группе низкой и промежуточной экспрессии PD-L1 и монотерапия пембролизумабом при наличии гиперэкспрессии. Авторами также не обоснована временная точка (21 день) для оценки уровня цоДНК [45, 49].

По данным метаанализа, включающего 10 исследований и 1017 пациентов, показано, что редукция уровня цоДНК после начала иммунотерапии ассоциируется с увеличением общей выживаемости, выживаемости без прогрессирования и частоты объективных ответов. Не выявлено достоверных различий в частоте объективных эффектов и показателях выживаемости в зависимости от того, выделялась цоДНК до начала лечения или нет [58].

### **3. Оценка минимальной остаточной болезни после радикального лечения**

Важным направлением применения жидкостной биопсии является детекция цоДНК в плазме крови после полной циторедукции или при достижении полного регресса заболевания – диагностика минимальной резидуальной болезни (Minimal Residual disease; MRD). Возможности использования цоДНК для определения MRD при раке легкого продемонстрированы в ряде исследований [1, 7, 8, 14, 38, 51, 57, 61].

Согласно полученным данным, частота выявления цоДНК в дооперационном периоде составила 19,2–20,9% [8, 61]. Относительно низкая чувствительность метода может быть обусловлена рядом факторов. Так, в исследовании TRACERx показано, что гистологический вариант опухоли является предиктором вероятности выявления цоДНК на ранних стадиях рака легкого и при adenокарциноме частота детекции цоДНК составила 19,0% [1]. Имеются данные о независимом прогностическом значении размера опухоли ≥3 см и наличия лимфососудистой инвазии для детекции цоДНК ( $p<0,001$ ) [8]. Согласно данным D. Gale et al., показано увеличение частоты выявления цоДНК до лечения при различной распространенности опухолевого процесса – у 24%, 77% и 87% при I, II и III стадиях соответственно [14].

В работе Aadel F. Chaudhuri et al. проанализирована роль цоДНК для определения MRD после радикального лечения у пациентов с I–III стадиями рака легкого ( $n=40$ ). В 94% случаев детекции цоДНК в первом образце крови после окончания лечения отмечено развитие рецидива. Определение цоДНК у 72% пациентов предшествовало рентгенологическому прогрессированию на 5,2 мес. [7].

В исследовании DYNAMIC определен период «полужизни» цоДНК (медиана = 35 мин. (8–147 мин.) у пациентов с I–IIIA стадиями рака легкого, получивших радикальное хирургическое лечение ( $n=205$ ). Периоперационное изучение уровней цоДНК проводилось непосредственно перед операцией (A), через 5 мин. (B), 30 мин. (C) и 2 часа (D) после атипичной резекции легкого с опухолью либо пересечения легочной вены, а также на 1-е, 3-и сутки и через 1 месяц после операции. До операции цоДНК определялась лишь у 19,2% (26/205) пациентов. Концентрация цоДНК быстро снижалась после удаления опухоли. Средняя частота мутантных аллелей в точках A, B, C и D составила 2,72%, 2,11%, 1,14%, 0,17% соответственно [8]. У 6 пациентов отмечено увеличение по сравнению с исходной концентрации цоДНК в точке B



(через 5 мин. после удаления опухоли), что подтверждает гипотезу о выбросе цДНК в кровь в связи с манипуляциями во время хирургического вмешательства [57]. Безрецидивная выживаемость у пациентов с определяемой и неопределенной цДНК в 1-е сутки после операции составила 528 дней и 543 дня соответственно ( $p=0,657$ ), в то время как на 3-и сутки – 278 дней и 637 дней соответственно ( $p=0,002$ ). Таким образом, авторы статьи считают, что забор крови на 3-и сутки после операции является оптимальным для определения минимальной остаточной болезни [8].

Изучение динамики уровня цДНК до начала лечения, во время и после операции и ее влияние на показатели выживаемости радикально пролеченных пациентов с НМРЛ IA-IIIB стадиями ( $n=21$ ) проведено Silvia Waldeck et al. Частота выявления цДНК и ее концентрация в плазме были достоверно выше во время операции (57%; 12,47 нг/мл), чем до начала лечения (19%; 6,64 нг/мл). После операции цДНК определялась у 4 пациентов и в всех из них развилось прогрессирование. Для сравнения, рецидив произошел лишь у 4 из 12 пациентов с неопределенной цДНК. Выявление цДНК в плазме после хирургического лечения ассоциировалось с худшими показателями выживаемости без прогрессирования ( $p=0,013$ ) и общей выживаемости ( $p=0,004$ ) [57]. В исследовании Shuta Ohara et al. также получены худшие показатели безрецидивной выживаемости в группе пациентов с определяемым уровнем цДНК после операции ( $p=0,032$ ), в то время как ее выявление до начала лечения достоверно не влияло на развитие рецидива ( $p=0,132$ ) [38].

Согласно данным D. Gale et al., наличие цДНК в плазме крови до начала лечения ассоциировалось с ухудшением показателей общей и безрецидивной выживаемости у пациентов с ранними стадиями заболевания (I-IIa) ( $HR=2,97$  и  $3,14$ ,  $p=0,01$  и  $0,003$  соответственно). В сроки от 2 недель до 4 месяцев после завершения лечения цДНК выявлена у 17% пациентов, что также было связано с худшими показателями безрецидивной ( $HR=14,8$ ,  $p<0,00001$ ) и общей ( $HR=5,48$ ,  $p<0,0003$ ) выживаемости. Детекция цДНК предшествовала клиническому рецидиву на 212,5 дня. После завершения лечения у 18 из 28 пациентов (64,3%) с определяемой цДНК в последующем был диагностирован возврат болезни. На основании проведенного исследования авторы сделали вывод, что определение цДНК после завершения лечения у пациентов с локализованным и местнораспространенным НМРЛ может идентифицировать пациентов, нуждающихся в дополнительной противоопухолевой терапии [14].

Наиболее крупное исследование по изучению роли MRD (LUNGCA-1) было организовано Xia et al. ( $n=330$ ). Взятие образцов крови производилось до начала лечения, на 3-и сутки и через 1 месяц после операции. Лишь у 20,9% пациентов определялась цДНК до начала лечения, что ассоциировалось с худшими показателями выживаемости среди пациентов с adenокарциномой легкого ( $HR=4,2$ ;  $p<0,001$ ). Выявление цДНК на 3-и сутки и через 1 месяц после операции ухудшало показатели безрецидивной выживаемости ( $HR=11,1$ ;  $p<0,001$ ). Интересно, что у пациентов с определяемой цДНК после операции проведение адьювантной терапии улучшало показатели безрецидивной выживаемости, в то время как проведение адьювантной терапии у пациентов с неопределенной цДНК ухудшало отдаленные результаты лечения ( $HR=3,1$ ;  $p<0,001$ ) [61].

Обобщая результаты проведенных исследований, можно констатировать, что цДНК является эффективным и крайне перспективным маркером MRD после радикального лечения рака легкого. Задачами последующих исследований является

изучение роли адьювантной терапии в зависимости от наличия MRD у радикально оперированных пациентов с НМРЛ.

## ■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ мировой литературы показал, что цоДНК является крайне перспективным биологическим маркером при НМРЛ. Совершенствование методологии выделения цоДНК сделает жидкостную биопсию реальной альтернативой тканевой биопсии. Это позволит персонализировать противоопухолевое лечение, своевременно выявляя мутации резистентности, даст возможность проводить мониторинг эффективности терапии, анализируя концентрацию цоДНК в плазме крови, и обеспечит раннюю диагностику рецидива заболевания у радикально пролеченных пациентов.

В настоящее время на базе РНПЦ ОМР им. Н.Н. Александрова при поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований проводится научная работа по разработке новых подходов к увеличению эффективности жидкостной биопсии у пациентов с раком легкого (М23РНФ-131). Ожидаемые результаты позволят повысить диагностическую чувствительность метода анализа цоДНК с использованием технологии цифровой капельной ПЦР.

---

## ■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Abbosh C., Birkbak N.J., Wilson G.A. et al. (2017) Phylogenetic ctDNA analysis depicts early-stage lung cancer evolution. *Nature*, vol. vol. 545, no 7655, pp. 446–451. doi.org/10.1038/nature22364
2. Alegre E., Fusco J.P., Restituto P. et al. (2016) Total and mutated EGFR quantification in cell-free DNA from non-small cell lung cancer patients detects tumor heterogeneity and presents prognostic value. *Tumour biology: the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, vol. 37, no 10, pp. 13687–13694. doi.org/10.1007/s13277-016-5282-9
3. Alix-Panabières C., Pantel K. (2021) Liquid Biopsy: From Discovery to Clinical Application. *Cancer discovery*, vol. 11, no 4, pp. 858–873. doi. org/10.1158/2159-8290.CD-20-1311
4. Best M.G., Wesseling P., Wurdinger T. (2018) Tumor-Educated Platelets as a Noninvasive Biomarker Source for Cancer Detection and Progression Monitoring. *Cancer research*, vol. 78, no 13, pp. 3407–3412. doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-0887
5. Boonstra P.A., Wind T.T., van Kruchten M. et al. (2020) Clinical utility of circulating tumor DNA as a response and follow-up marker in cancer therapy. *Cancer metastasis reviews*, vol. 39, no 3, pp. 999–1013. doi.org/10.1007/s10555-020-09876-9
6. Cescos D.W., Bratman S.V., Chan S.M., Siu L.L. (2020) Circulating tumor DNA and liquid biopsy in oncology. *Nature cancer*, vol. 1, no 3, pp. 276–290. doi.org/10.1038/s43018-020-0043-5
7. Chaudhuri A.A., Chabon J.J., Lovejoy A.F. et al. (2017) Early Detection of Molecular Residual Disease in Localized Lung Cancer by Circulating Tumor DNA Profiling. *Cancer discovery*, vol. 7, no 12, pp. 1394–1403. doi.org/10.1158/2159-8290.CD-17-0716
8. Chen K., Zhao H., Shi Y. et al. (2019) Perioperative Dynamic Changes in Circulating Tumor DNA in Patients with Lung Cancer (DYNAMIC). *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, vol. 25, no 23, pp. 7058–7067. doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-19-1213
9. Chiou V.L., Buroto M. (2015) Pseudoprogression and Immune-Related Response in Solid Tumors. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, vol. 33, no 31, pp. 3541–3543. doi.org/10.1200/JCO.2015.61.6870
10. Eisenhauer E.A., Therasse P., Bogaerts J. et al. (2009) New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). *European journal of cancer (Oxford, England: 1990)*, vol. 45, no 2, pp. 228–247. doi.org/10.1016/j.ejca.2008.10.026
11. Ferlay J., Colombet M., Soerjomataram I. et al. (2018) Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries and 25 major cancers in 2018. *European journal of cancer (Oxford, England: 1990)*, vol. 103, pp. 356–387. doi.org/10.1016/j.ejca.2018.07.005
12. Gadgeel S.M., Mok T.S.K., Peters S. et al. (2019) 5026 – Phase II/III Blood First Assay Screening Trial (BFAST) in patients (pts) with treatment-naïve NSCLC: initial results from the ALK+ cohort. *Annals of Oncology*, vol. 30, pp. 851–934.
13. Gainor J.F., Dardaei L., Yoda S. et al. (2016) Molecular Mechanisms of Resistance to First- and Second-Generation ALK Inhibitors in ALK-Rearranged Lung Cancer. *Cancer discovery*, vol. 6, no 10, pp. 1118–1133. doi.org/10.1158/2159-8290.CD-16-0596
14. Gale D., Heider K., Ruiz-Valdepenas A. et al. (2022) Residual ctDNA after treatment predicts early relapse in patients with early-stage non-small cell lung cancer. *Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology*, vol. 33, no 5, pp. 500–510. doi.org/10.1016/j.annonc.2022.02.007
15. Goldberg S.B., Narayan A., Kole A.J. et al. (2018) Early Assessment of Lung Cancer Immunotherapy Response via Circulating Tumor DNA. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, vol. 24, no 8, pp. 1872–1880. doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-17-1341
16. Guibert N., Pradines A., Farella M. et al. (2016) Monitoring KRAS mutations in circulating DNA and tumor cells using digital droplet PCR during treatment of KRAS-mutated lung adenocarcinoma. *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)*, vol. 100, pp. 1–4. doi.org/10.1016/j.lungcan.2016.07.021



17. He J, Tan W, Tang X. et al. (2017) Variations in EGFR ctDNA Correlates to the Clinical Efficacy of Afatinib in Non-Small Cell Lung Cancer with Acquired Resistance. *Pathology oncology research: POR*, vol. 23, no 2, pp. 307–315. doi.org/10.1007/s12253-016-0097-y
18. Heitzer E, Van den Broek D, Denis M.G. et al. (2022) Recommendations for a practical implementation of circulating tumor DNA mutation testing in metastatic non-small-cell lung cancer. *ESMO open*, vol. 7, no 2, pp. 1–12. doi.org/10.1016/j.esmoop.2022.100399
19. Hendriks L.E., Kerr K.M., Menis J. et al. (2023) Non-oncogene-addicted metastatic non-small-cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guideline for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology*, vol. 34, no 4, pp. 358–376. doi.org/10.1016/j.annonc.2022.12.013
20. Imaura F, Uchida J, Kukita Y. et al. (2016) Early responses of EGFR circulating tumor DNA to EGFR tyrosine kinase inhibitors in lung cancer treatment. *Oncotarget*, vol. 7, no 44, pp. 71782–71789. doi.org/10.18632/oncotarget.12373
21. Iwama E, Sakai K, Azuma K. et al. (2017) Monitoring of somatic mutations in circulating cell-free DNA by digital PCR and next-generation sequencing during afatinib treatment in patients with lung adenocarcinoma positive for EGFR activating mutations. *Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology*, vol. 28, no 1, pp. 136–141. doi.org/10.1093/annonc/mdw531
22. Kerachian M.A., Azghandi M., Mozaffari-Jovin S. et al. (2021) Guidelines for pre-analytical conditions for assessing the methylation of circulating cell-free DNA. *Clinical epigenetics*, vol. 13, no 1, pp. 193. doi.org/10.1186/s13148-021-01182-7
23. Lee J.S., Kim M, Seong M.W. et al. (2020) Plasma vs. serum in circulating tumor DNA measurement: characterization by DNA fragment sizing and digital droplet polymerase chain reaction. *Clinical chemistry and laboratory medicine*, vol. 58, no 4, pp. 527–532. doi.org/10.1515/clcm-2019-0896
24. Lee J.Y., Qing X, Xiumin, W. et al. (2016) Longitudinal monitoring of EGFR mutations in plasma predicts outcomes of NSCLC patients treated with EGFR TKIs: Korean Lung Cancer Consortium (KLCC-12-02). *Oncotarget*, vol. 7, no 6, pp. 6984–6993. doi.org/10.18632/oncotarget.6874
25. Leigh N.B., Page, R.D., Raymond V.M. et al. (2019) Clinical Utility of Comprehensive Cell-free DNA Analysis to Identify Genomic Biomarkers in Patients with Newly Diagnosed Metastatic Non-Small Cell Lung Cancer. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, vol. 25, no 15, pp. 4691–4700. doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-19-0624
26. Li B.T., Janku F, Jung B. et al. (2019) Ultra-deep next-generation sequencing of plasma cell-free DNA in patients with advanced lung cancers: results from the Actionable Genome Consortium. *Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology*, vol. 30, no 4, pp. 597–603. doi.org/10.1093/annonc/mdz046
27. Li F, Wei F, Huang W.L. et al. (2020) Ultra-Short Circulating Tumor DNA (usctDNA) in Plasma and Saliva of Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC) Patients. *Cancers*, vol. 12, no 8, pp. 2041. doi.org/10.3390/cancers12082041
28. Li Y, Zhang F, Yuan P. et al. (2020) High MAF of EGFR mutations and high ratio of T790M sensitizing mutations in ctDNA predict better third-generation TKI outcomes. *Thoracic cancer*, vol. 11, no 6, pp. 1503–1511. doi.org/10.1111/1759-7714.13418
29. Liam C.K., Mallawathantri, S., Fong, K.M. (2020) Is tissue still the issue in detecting molecular alterations in lung cancer? *Respirology (Carlton, Vic.)*, vol. 25, no 9, pp. 933–943. doi.org/10.1111/resp.13823
30. Mack P.C., Banks K.C., Espenchedi C.R. et al. (2020) Spectrum of driver mutations and clinical impact of circulating tumor DNA analysis in non-small cell lung cancer: Analysis of over 8000 cases. *Cancer*, vol. 126, no 14, pp. 3219–3228. doi.org/10.1002/cncr.32876
31. Maia M.C., Salgia M., Pal S.K. (2020) Harnessing cell-free DNA: plasma circulating tumour DNA for liquid biopsy in genitourinary cancers. *Nature reviews. Urology*, vol. 17, no 5, pp. 271–291. doi.org/10.1038/s41585-020-0297-9
32. Michaelidou K., Koutoulaki C., Mavridis K. et al. (2020) Detection of KRAS G12/G13 Mutations in Cell Free-DNA by Droplet Digital PCR, Offers Prognostic Information for Patients with Advanced Non-Small Cell Lung Cancer. *Cells*, vol. 9, no 11, pp. 2514. doi.org/10.3390/cells9112514
33. Minari R., Bordi P., Del Re M. et al. (2018) Primary resistance to osimertinib due to SCLC transformation: Issue of T790M determination on liquid re-biopsy. *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)*, vol. 115, pp. 21–27. doi.org/10.1016/j.lungcan.2017.11.011N
34. Mok T., Wu Y.L., Lee J.S. et al. (2015) Detection and Dynamic Changes of EGFR Mutations from Circulating Tumor DNA as a Predictor of Survival Outcomes in NSCLC Patients Treated with First-line Intercalated Erlotinib and Chemotherapy. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, vol. 21, no 14, pp. 3196–3203. doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-2594
35. Mokánszki A., Bánó E.S., Mónus A. et al. (2021) Cell-free DNA From Pleural Effusion Samples: Is It Right for Molecular Testing in Lung Adenocarcinoma? *Pathology oncology research: POR*, vol. 27, pp. 613071. doi.org/10.3389/pore.2021.613071
36. Nie K., Jiā Y., Zhang X. (2015) Cell-free circulating tumor DNA in plasma/serum of non-small cell lung cancer. *Tumour biology: the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, vol. 36, no 1, pp. 7–19. doi.org/10.1007/s13277-014-2758-3
37. Nuzzo P.V., Berchuck J.E., Korthauer K. et al. (2020) Detection of renal cell carcinoma using plasma and urine cell-free DNA methylomes. *Nature medicine*, vol. 26, no 7, pp. 1041–1043. doi.org/10.1038/s41591-020-0933-1
38. Ohara S., Suda K., Sakai K. et al. (2020) Prognostic implications of preoperative versus postoperative circulating tumor DNA in surgically resected lung cancer patients: a pilot study. *Translational lung cancer research*, vol. 9, no 5, pp. 1915–1923. doi.org/10.21037/tlcr-20-505
39. Paik P.K., Veillon R., Cortot A.B. et al. (2019) Phase II study of tepotinib in NSCLC patients with METEx14 mutations. *Journal Clinical Oncology*, vol. 37 pp. 9005
40. Pantel K., Alix-Panabières C. (2019) Liquid biopsy and minimal residual disease – latest advances and implications for cure. *Nature reviews. Clinical oncology*, vol. 16, no 7, pp. 409–424. doi.org/10.1038/s41571-019-0187-3
41. Paweletz C.P., Sacher A.G., Raymond C.K. et al. (2016) Bias-Corrected Targeted Next-Generation Sequencing for Rapid, Multiplexed Detection of Actionable Alterations in Cell-Free DNA from Advanced Lung Cancer Patients. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, vol. 22, no 4, pp. 915–922. doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-1627-T
42. Pécuquet N., Zonta E., Didelot A. et al. (2016) Base-Position Error Rate Analysis of Next-Generation Sequencing Applied to Circulating Tumor DNA in Non-Small Cell Lung Cancer: A Prospective Study. *PLoS medicine*, vol. 13, no 12, pp. 1–19 doi.org/10.1371/journal.pmed.1002199
43. Pisapia P., Malapelle U., Troncone G. (2019) Liquid Biopsy and Lung Cancer. *Acta cytologica*, vol. 63, no 6, pp. 489–496. doi.org/10.1159/000492710
44. Reckamp K.L., Melnikova V.O., Karlovich C. et al. (2016) A Highly Sensitive and Quantitative Test Platform for Detection of NSCLC EGFR Mutations in Urine and Plasma. *Journal of thoracic oncology: official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*, vol. 11, no 10, pp. 1690–1700. doi.org/10.1016/j.jtho.2016.05.035
45. Ricciuti B., Jones G., Severgnini M. et al. (2021) Early plasma circulating tumor DNA (ctDNA) changes predict response to first-line pembrolizumab-based therapy in non-small cell lung cancer (NSCLC). *Journal for immunotherapy of cancer*, vol. 9, no 3, pp. 15–24. doi.org/10.1136/jitc-2020-001504
46. Rolfo C., Mack P., Scagliotti G.V. et al. (2021) Liquid Biopsy for Advanced NSCLC: A Consensus Statement From the International Association for the Study of Lung Cancer. *Journal of thoracic oncology: official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*, vol. 16, no 10, pp. 1647–1662. doi.org/10.1016/j.jtho.2021.06.017

47. Ryu J.S. (2019) Feasibility of Bronchial Washing Fluid-Based Approach to Early-Stage Lung Cancer Diagnosis. *The Oncologist*, vol. 24, no 7, pp. 603–606. doi.org/10.1634/theoncologist.2019-0147.
48. Shields M. D., Chen K., Dutcher G. et al. (2022) Making the Rounds: Exploring the Role of Circulating Tumor DNA (ctDNA) in Non-Small Cell Lung Cancer. *International journal of molecular sciences*, vol. 23, no 16, pp. 9006. doi.org/10.3390/ijms23169006
49. Shim J.H., Kim H.S., Cha H. et al. (2020). HLA-corrected tumor mutation burden and homologous recombination deficiency for the prediction of response to PD-(L)1 blockade in advanced non-small-cell lung cancer patients. *Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology*, vol. 31, no 7, pp. 902–911. doi.org/10.1016/j.annonc.2020.04.004
50. Shin S., Woo H.J., Kim J.W. et al. (2022) Clinical Practice Guidelines for Pre-Analytical Procedures of Plasma Epidermal Growth Factor Receptor Variant Testing. *Annals of laboratory medicine*, vol. 42, no 2, pp. 141–149. doi.org/10.3343/alm.2022.42.2.141
51. Tang C., Lee W.C., Reuben A. et al. (2020) Immune and Circulating Tumor DNA Profiling After Radiation Treatment for Oligometastatic Non-Small Cell Lung Cancer: Translational Correlatives from a Mature Randomized Phase II Trial. *International journal of radiation oncology, biology, physics*, vol. 106, no 2, pp. 349–357. doi.org/10.1016/j.ijrobp.2019.10.038
52. Targeted Treatment for ALK Positive Patients Who Have Previously Been Treated for Non-Squamous Non-Small Cell Lung Cancer. *Clinical Trials*, Gov. Identifier: NCT03737994. doi:clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03737994?term=NCT03737994&draw=2&rank=1
53. Tivey A., Church M., Rothwell D. et al. (2022) Circulating tumour DNA – looking beyond the blood. *Nature reviews. Clinical oncology*, vol. 19, no 9, pp. 600–612. doi.org/10.1038/s41571-022-00660-y
54. Tran H.T., Lam V.K., Elamini Y.Y. et al. (2021) Clinical Outcomes in Non-Small-Cell Lung Cancer Patients Treated with EGFR-Tyrosine Kinase Inhibitors and Other Targeted Therapies Based on Tumor Versus Plasma Genomic Profiling. *JCO precision oncology*, vol. 5, pp. 1241–1249. doi.org/10.1200/PO.20.00532
55. U.S. Food and Drug Administration. FDA Approves First Liquid Biopsy Next-Generation Sequencing Companion Diagnostic Test. 2020. Available online: <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-first-liquid-biopsy-next-generation-sequencing-companion-diagnostic-test> (accessed on 23 March 2022).
56. U.S. Food and Drug Administration. FDA Approves Liquid Biopsy NGS Companion Diagnostic Test for Multiple Cancers and Biomarkers. 2020. Available online: <https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/fda-approves-liquid-biopsy-ngs-companion-diagnostic-test-multiple-cancers-and-biomarkers> (accessed on 23 March 2022).
57. Waldeck S., Mitschke J., Wiesemann S. et al. (2022) Early assessment of circulating tumor DNA after curative-intent resection predicts tumor recurrence in early-stage and locally advanced non-small-cell lung cancer. *Molecular oncology*, vol. 16, no 2, pp. 527–537. doi.org/10.1002/1878-0261.13116
58. Wang H., Zhou F., Qiao M. et al. (2021) The Role of Circulating Tumor DNA in Advanced Non-Small Cell Lung Cancer Patients Treated with Immune Checkpoint Inhibitors: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Frontiers in oncology*, vol. 11, pp. 1–12. doi.org/10.3389/fonc.2021.671874
59. Wei Z., Wang W., Shu Z. et al. (2017) Correlation Between Circulating Tumor DNA Levels and Response to Tyrosine Kinase Inhibitors (TKI) Treatment in Non-Small Cell Lung Cancer. *Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research*, vol. 23, pp. 3627–3634. doi.org/10.12659/msm.902265
60. Wu J., Liu Z., Huang T. et al. (2023) Cerebrospinal fluid circulating tumor DNA depicts profiling of brain metastasis in NSCLC. *Molecular oncology*, vol. 17, no 5, pp. 810–824. doi.org/10.1002/1878-0261.13357
61. Xia L., Mei J., Kang R. et al. (2022) Perioperative ctDNA-Based Molecular Residual Disease Detection for Non-Small Cell Lung Cancer: A Prospective Multicenter Cohort Study (LUNGCA-1). *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, vol. 28, no 15, pp. 3308–3317. doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-21-3044
62. Xie X., Wu J., Guo B. et al. (2022) Comprehensive characterization reveals sputum supernatant as a valuable alternative liquid biopsy for genome profiling in advanced non-small cell lung cancer. *Respiratory research*, vol. 23, no 1, pp. 175. doi.org/10.1186/s12931-022-02097-4
63. Yang H., Wen L., Zhao C. et al. (2022) Cerebrospinal fluid-derived circulating tumor DNA is more comprehensive than plasma in NSCLC patients with leptomeningeal metastases regardless of extracranial evolution. *Helix*, vol. 8, no 12, pp. 12374. doi.org/10.1016/j.helix.2022.e12374
64. Yu H.A., Spira A., Horn L. et al. (2017) A Phase I, Dose Escalation Study of Oral ASP8273 in Patients with Non-small Cell Lung Cancers with Epidermal Growth Factor Receptor Mutations. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, vol. 23, no 24, pp. 7467–7473. doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-17-1447
65. Zhang N., Liu Z., Li K. et al. (2023) DNA Methylation Analysis of the SHOX2 and RASSF1A Panel Using Cell-Free DNA in the Diagnosis of Malignant Pleural Effusion. *Journal of oncology*, vol. 10, pp. 1–9. doi.org/10.1155/2023/5888844
66. Zhu Y.J., Zhang H.B., Liu Y.H. et al. (2017) Estimation of cell-free circulating EGFR mutation concentration predicts outcomes in NSCLC patients treated with EGFR-TKIs. *Oncotarget*, vol. 8, no 8, pp. 13195–13205. doi.org/10.18633/oncotarget.14490