

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ТОМСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ (НИ ТГУ)
САЕ Институт «Умные материалы и технологии»
Химический факультет

ДОПУСТИТЬ К ЗАЩИТЕ В ГЭК
Руководитель ООП
д-р. физ.-мат. наук, доцент
И.А. Курзина
подпись
« 16 » июня 2023 г.

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА МАГИСТРА

ПОИСК КЛИНИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫХ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ВАРИАНТОВ В ОБРАЗЦАХ
ГЕНОМНОЙ ДНК И ТОТАЛЬНОЙ РНК ПАЦИЕНТОВ НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНОГО РАКА
ЛЁГКОГО (АДЕНОКАРЦИНОМА ЛЁГКОГО) МЕТОДОМ
ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ

04.04.01. (профиль) «Трансляционные химические и биомедицинские технологии»

Савельев Сергей Николаевич

Руководитель ВКР
д.б.н., профессор каф. ПСФиМХ
Н.В. Чердынцева
подпись
« 16 » июня 2023 г.

Консультант ВКР
к.м.н., доцент каф. ПСФиМХ
П.А. Гervas
подпись
« 16 » июня 2023 г.

Автор работы
студент группы № 282109
С.Н. Савельев
подпись
« 16 » июня 2023 г.

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации.
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ТОМСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ (НИ ТГУ)
САЕ Институт «Умные материалы и технологии»
Химический факультет



ЗАДАНИЕ

по выполнению выпускной квалификационной работы магистра обучающегося
Савельева Сергея Николаевича
(Ф.И.О. обучающегося)

по направлению 04.04.01 Химия, направленность (профиль) «Трансляционные химические и биомедицинские технологии»

1 Тема выпускной квалификационной работы магистра

Поиск клинически значимых генетических вариантов в образцах геномной ДНК и тотальной РНК пациентов немелкоклеточного рака лёгкого (аденокарцинома лёгкого) методом высокопроизводительного секвенирования

2 Срок сдачи обучающимся выполненной выпускной квалификационной работы:

а) на рецензирование – 09.06.2023

б) в деканат – 20.06.2023

в) в ГЭК – 20.06.2023

3 Исходные данные к работе:

Объекты исследования Опухоль заключённую в парафин (биопсия, операционный материал). Материалом для проведения NGS послужила геномная ДНК и тотальная РНК, выделенная из парафиновых блоков у пациентов с НМРЛ

Научная или прикладная проблема Изучение молекулярного генетического портрета аденокарциномы лёгкого (НМРЛ) для поисков новых значимых генетических вариантов геномной ДНК и тотальной РНК, у пациентов с НМРЛ

Цель исследования – Провести поиск клинически-значимых или новых генетических вариантов в образцах геномной ДНК и тотальной РНК пациентов с немелкоклеточным раком лёгкого методом высокопроизводительного секвенирования.

Задачи:

1. Провести поиск значимых генетических вариантов геномной ДНК у пациентов с немелкоклеточным раком лёгкого;
2. Провести поиск значимых генетических вариантов тотальной РНК у пациентов с немелкоклеточным раком лёгкого;
3. Провести поиск новых генетических вариантов (тотальная РНК и геномная ДНК) у пациентов с немелкоклеточным раком лёгкого;
4. Проанализировать возможность новых терапевтических подходов при лечении немелкоклеточного рака легкого с учетом выявленных генетических вариантов;

Методы исследования

Выделение геномной ДНК и тотальной РНК из парафиновых блоков с использованием набора «PureCode», при помощи магнитных частиц

Подготовка NGS библиотек при помощи набора «OncoScope NSCLC Solution» для проведения высокопроизводительного секвенирования на платформе MiSeq (Illumina)

Методы проверки достоверности результатов

Биоформатический анализ данных высокопроизводительного секвенирования и классификация найденных мутаций согласно протоколу ACMG и CAP

4. Этапы работы

Сроки

4.1 Отбор, анализ литературы, патентный поиск

01.10.2022 – 01.02.2023

4.2 Эксперимент и обсуждение результатов

01.02.2023 – 01.04.2023

4.3 Написание и оформление работы

01.04.2023 – 15.06.2023

4.4 Допуск к защите

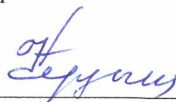
16.06.2023

4.5 Защита

22.06.2023

Руководитель выпускной квалификационной работы

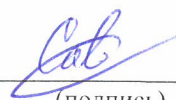
д-р биол. профессор каф. ПСФиМХ ХФ ТГУ
(должность, место работы)


(подпись)

/ Н.В.Чердынцева
(И.О. Фамилия)

Задание принял к исполнению

20 января 2023


(подпись)

/ С.Н. Савельев
(И.О. Фамилия)

АННОТАЦИЯ

Рак легкого является самой частой причиной смерти (по данным ВОЗ) среди всех онкологических заболеваний. Так, в 2022 году от рака лёгкого зарегистрировано около двух миллионов смертей. Пятилетняя выживаемость после установления диагноза варьирует от 4% до 17%. Рак лёгкого является мультифакториальным заболеванием, возникающим при сочетании ряда факторов. На данный момент считается, что курение – основной фактор возникновения рака лёгкого. Сигаретный дым содержит около 60 различных классифицированных канцерогенов, таких как производные никотина, нитрозамины, и полициклические ароматические углеводороды.

Данная работа направлена на поиск клинически-значимых генетических вариантов при помощи метода высокопроизводительного секвенирования (NGS). Включение данного метода в стандарты тестирования позволит обнаружить причины возникновения опухоли. Правильно подобранное лечение способно повысить качество жизни, наряду с показателями выживаемости при НМРЛ, что несомненно является ключевой задачей в онкологии. Методы высокопроизводительного секвенирования ДНК позволяют быстро и точно определять нуклеотидную последовательность интересующих генов за счет прочтения множества коротких многократно клонированных фрагментов ДНК.

В исследовании с включены пациенты (n=12) с морфологически-верифицированным диагнозом – немелкоклеточный рак лёгкого (аденокарцинома), получавшие лечение на базе НИИ Онкологии ТНИМЦ, 7 женщин (58 %) и 5 мужчин (42 %), средний возраст пациентов составляет 60 лет. На момент постановки диагноза 50 % пациентов имели распространённый процесс (T1-3N0-1M0-1) III и IV стадии заболевания.

В данной работе нами проведён поиск клинически значимых генетических вариантов у пациентов с НМРЛ с помощью метода высокопроизводительного секвенирования на платформе MiSeq (Illumina).

Биоинформатический анализ данных NGS проводился согласно протоколу ACMG. Все генетические варианты были классифицированы на четыре группы клинической значимости: высокая, потенциальная, неизвестная и доброкачественная. По данным биоинформатического анализа у 92 % пациентов (11 из 12) обнаружены варианты высокой клинической значимости в генах *EGFR* (8 из 12, 66 %), *KRAS* (1 из 12, 8 %), fusion gene *ALK-EML4* (2 из 12, 16 %). У 8 % (1 из 12) пациентов варианты высокой клинической значимости не обнаружены. Варианты потенциальной клинической значимости обнаружены в гене *EGFR* у одного пациента (2 из 12, 16 %). Мутации неизвестной клинической значимости обнаружены в генах *EGFR*, *KRAS*, *TP53* и *PIK3CA* у четырёх пациентов (4 из 12, 33 %).

Частота встречаемости генетически значимых вариантов у пациентов с НМРЛ составила: *EGFR* (58 %), *KRAS* (25 %), *TP53* (15 %). Частота встречаемости значимых генетических вариантов тотальной РНК у пациентов с немелкоклеточным раком лёгкого составила 17% (*ALK/EML4*). Впервые выявлена новая мутация гена *EGFR* (g.55181323_55181328) потенциальной клинической значимости у пациента с НМРЛ. Впервые обнаружены новые варианты высокой клинической значимости генов *PIK3CA* (chr3: 179198939) и *KRAS* (g. 25245309) у пациентов с НМРЛ.

Таким образом, в данной работе у пациентов с НМРЛ методом высокопроизводительного секвенирования изучен молекулярно-генетический портрет опухоли. Нами впервые выявлены новые вероятно патогенные мутации генов: *EGFR* (g.55181323_55181328 dup), *KRAS* (g.25245309) и *PIK3CA* (g.179198939), требующие дальнейшего изучения их распространённости в патогенезе и их участия в таргетной терапии НМРЛ.

Поскольку НМРЛ является одним из самых распространённых злокачественных новообразований и занимает лидирующие позиции по показателям смертности, изучение механизмов развития данного заболевания – одно из приоритетных направлений в онкологии.

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
1 ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР	6
1.1 Мировая и отечественная статистика по раку лёгкого	6
1.2 Причины возникновения рака лёгкого	10
1.3 Гистологические типы рака лёгкого	12
1.4 Лечение пациентов с немелкоклеточным раком лёгкого.....	14
1.5 Основные таргетные мишени рака лёгкого (аденокарцинома)	17
1.5.1 Рецептор эпидермального фактора роста (<i>EGFR</i>)	17
1.5.2 Рецепторная тирозинкиназа анапластической лимфомы (<i>ALK</i>)	18
1.5.3 Тирозинкиназный рецептор инсулина (<i>ROS-1</i>).....	19
1.5.4 Мутационная активность семейства <i>RAS</i>	20
1.5.5 Мутационная активность гена <i>B-raf</i>	20
1.5.6 Протоонкогенный ген <i>C-MYC</i>	23
1.5.7 Трансмембранный тирозинкиназный рецептор (<i>ERBB2/HER2</i>)	23
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	26
2.1 Материалы исследования	26
2.2 Методы исследования.....	28
2.2.1 Выделение геномной ДНК и тотальной РНК из парафиновых блоков...	28
2.2.2 Флуориметрический метод определения концентрации ДНК и РНК	32
2.2.3 Подготовка NGS-библиотек.....	33
2.2.3 Электрофоретический анализ ДНК и РНК	39
2.2.4 Секвенирование	41
2.2.5 Биоформатический анализ данных высокопроизводительного секвенирования.....	42
3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	49
3.1 Генетические варианты, обнаруженные у пациентов с НМРЛ	49

4 ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	55
4.1 Мутации гена рецептора эпидермального фактора роста.....	55
4.1.1 Сочетанные мутации гена <i>EGFR</i> при НМРЛ	56
4.1.2 Новый вариант гена рецептора эпидермального фактора роста	58
4.1.3 Сочетание патогенных мутаций в гене <i>EGFR</i> с патогенными мутациями в других генах (<i>KRAS</i> и <i>TP53</i>).....	61
4.2 Идентификация фьюжен-онкогенов при НМРЛ.....	66
4.3 Варианты генов <i>KRAS</i> и <i>PIK3CA</i> у пациентов с НМРЛ	67
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	72
ВЫВОДЫ	73
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	74

ВВЕДЕНИЕ

По данным Всемирной Организации Здравоохранения рак легкого является самой частой причиной смерти среди всех онкологических заболеваний. Так, в 2022 году от рака лёгкого зарегистрировано около двух миллионов смертей. Пятилетняя выживаемость после установления диагноза варьирует от 4% до 17%. Ранняя диагностика затруднена из-за низкой чувствительности неинвазивных методов. У 75% пациентов заболевание диагностируется на поздних, неоперабельных стадиях (IIIb-IV).

Немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ, NSCLC) – самый распространенный тип рака легкого, протекает в агрессивной форме бессимптомно, быстро и с распространением метастазов. На его долю приходится до 90% всех случаев этого заболевания. НМРЛ представлен различными гистотипами (аденокарцинома, плоскоклеточный рак, крупноклеточный рак и недифференцированный). Среди которых самый распространенный – аденокарцинома, рак железистого эпителия бронхиальной стенки, составляет около 40% всех случаев.

Согласно Российским и зарубежным рекомендациям по диагностике и лечению НМРЛ, пациентам следует проводить генетическое тестирование на наличие мутаций в генах *EGFR*, *BRAF*, *c-MET*, *RET*, *HER2*, *ALK*, *ROS* согласно разработанным алгоритмам диагностики при помощи ПЦР-тестов и других методов. Мутации генов *EGFR*, *ROS*, *BRAF* наиболее часто мутируют в опухоли НМРЛ и являются мишенями для назначения таргетной терапии пациентам на IV стадии НМРЛ. Однако, при ПЦР-диагностики, у большинства пациентов не удаётся найти мишени для назначения таргетной терапии.

Ввиду выше сказанного, данная работа направлена на поиск клинически-значимых генетических вариантов при помощи метода высокопроизводительного секвенирования (NGS). Включение данного метода в стандарты тестирования позволит обнаружить причины возникновения опухоли. Правильно подобранное лечение способно повысить

качество жизни, наряду с показателями выживаемости при НМРЛ, что несомненно является ключевой задачей в онкологии.

Методы высокопроизводительного секвенирования ДНК позволяют быстро и точно определять нуклеотидную последовательность интересующих генов за счет прочтения множества коротких многократно клонированных фрагментов ДНК. Для диагностики и скрининга генетических вариантов, ассоциированных с развитием рака, рекомендуется применять технологию высокопроизводительного секвенирования, поскольку данный метод позволяет исследовать широкий спектр клинически значимых генетических вариантов и достичь максимальной диагностической чувствительности. Нами сформулированы цели и задачи:

Цель: провести поиск клинически-значимых или новых генетических вариантов в образцах геномной ДНК и тотальной РНК пациентов с немелкоклеточным раком лёгкого методом высокопроизводительного секвенирования.

Задачи:

1. Провести поиск значимых генетических вариантов геномной ДНК у пациентов с немелкоклеточным раком лёгкого;
2. Провести поиск значимых генетических вариантов тотальной РНК у пациентов с немелкоклеточным раком лёгкого;
3. Провести поиск новых генетических вариантов (тотальная РНК и геномная ДНК) у пациентов с немелкоклеточным раком лёгкого;
4. Проанализировать возможность новых терапевтических подходов при лечении немелкоклеточного рака легкого с учетом выявленных генетических вариантов;

Научная новизна: В данной работе будет изучен молекулярной генетический портрет аденокарциномы лёгкого (НМРЛ), будут выявлены новые мутации генов, требующие дальнейшего изучения в патогенезе и таргетной терапии НМРЛ.

1 ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1 Мировая и отечественная статистика по раку лёгкого

Одной из характерных особенностей рака является быстрое размножение аномальных клеток, разрастающихся за пределы своих обычных границ и способных проникать в окружающие ткани, а также мигрировать в другие органы, то есть метастазировать. Согласно данным Всемирной организации здравоохранения (World Health Organization) за 2020 зафиксировано 2,22 миллиона случаев заболеваемости рака лёгких (РЛ), из них около 1,80 миллиона человек умерили [1, 2].

В Российской Федерации согласно данным Ассоциации Онкологов России за 2020-2021 года зафиксировано около 43 000 новых случаев больных с НМРЛ впервые в жизни с установленным диагнозом рак лёгких. На 100 000 населения это примерно 98,8 человек, смертность в первый год после постановки диагноза составляет 48,4 %. Важно отметить, что большинство пациентов, а именно около 48 % при постановке диагноза злокачественного новообразования (ЗНО) рака лёгкого уже находятся на 4 стадии, и только около 20 % находятся на первой стадии [3, 4].

Удельный вес умерших от рака лёгкого в России (2016 г.) среди всех злокачественных новообразований для мужчин составляет 26,5 %, для женщин – 6,8 % (2016 г.). За последние 10 лет смертность мужчин от рака лёгкого уменьшилась с 66,0 до 62,0 стандартных единиц, или на 8,1 %, для женщин возросла с 10,88 до 11,86 стандартных единиц, или на 9,0 %. Ранговое распределение заболеваемости РЛ в регионах Российской Федерации представлено в таблице 1.1 [5].

Таблица 1.1 – Ранговое распределение стандартизованных показателей заболеваемости больных раком легких РФ

(DOI: 10.21294/1814-4861-2018-17-6-15-26)

Территория	Стандартный показатель	Территория	Стандартный показатель
Томская область	32,15	Архангельская область	28,15
Республика Тыва	41,64	Республика Коми	27,69
Магаданская область	39,05	Республика Карелия	26,82
Сахалинская область	35,56	Челябинская область	25,99
Иркутская область	34,76	Псковская область	24,80
Республика Чечня	34,71	Владимирская область	23,85
Алтайский край	33,47	Республика Татарстан	23,57
Чукотский авт.округ	33,47	Мурманская область	30,21
Забайкальский край	32,8	Ленинградская область	19,75
Республика Хакасия	32,75	Калининградская область	21,08
Республика Саха	32,70	Республика Северная Осетия	12,98
Омская область	32,13	г. Москва	12,86
Оренбургская область	31,78	г. Севастополь	14,96
Новгородская область	30,8	г. Санкт-Петербург	21,93

На рисунке 1.1 представлено ранговое распределение умерших от РЛ по административным территориям России (мужчины и женщины). Регионами, с наиболее высоким показателем заболеваемости РЛ считаются: Амурская область, Чукотский край, Ленинградская область, Ямало-Ненецкий автономный округ, Красноярский край [6].

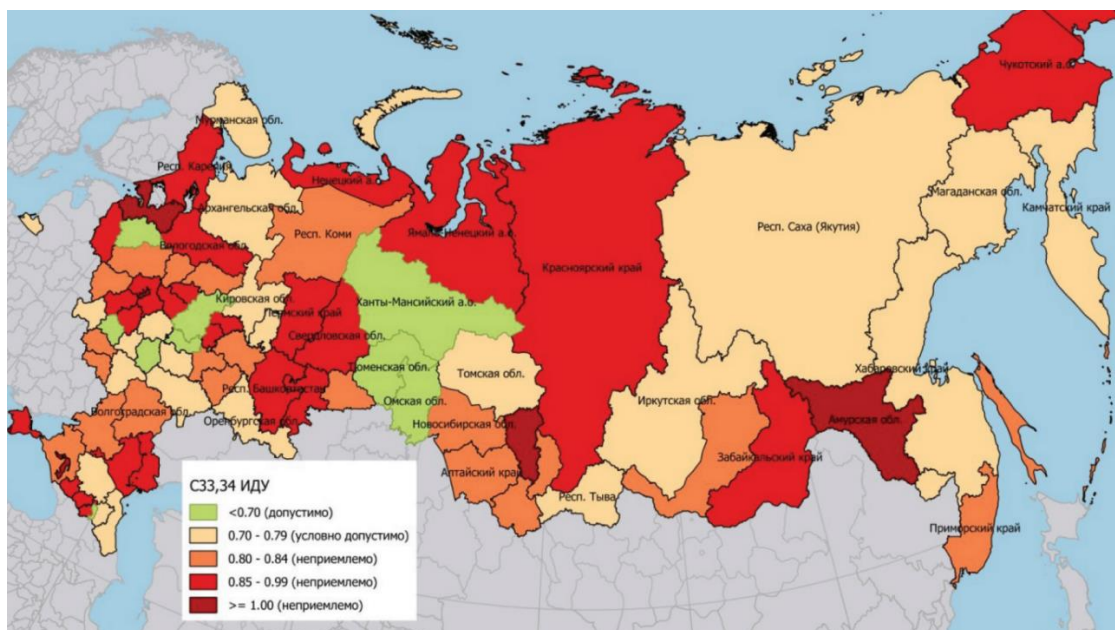


Рисунок 1.1 – Индекс достоверности учета по раку легких (DOI:
10.21294/1814-4861-2018-17-6-15-26)

Статистика по заболеваемости в Сибирском федеральном округе (СФО) представлена в таблице 1.2 [7].

Таблица 1.2 – Статистика по заболеваемости в СФО в 2021 г

Республика, край, область	Число ЗНО, выявленных в отчетном году, радикальное лечение которых			
	закончено в отчетном году	% от впервые выявлен- ных	будет продолжено (не закон- чено)	% от впервые выявленных
Томская область	87	18,3	132	27,7
Алтайский край	242	19,7	219	17,8
Красноярский край	399	36,9	148	13,7
Иркутская обл.	316	28,3	116	10,4
Кемеровская обл.	231	24,2	134	14,0
Новосибирская обл.	163	17,7	92	10,0
Омская область	159	17,1	35	3,8
Республика Алтай	13	18,8	20	29,0

Окончание таблицы 1.2

Республика, край, область	Число ЗНО, выявленных в отчетном году, радикальное лечение которых				
	закончено в отчет-ном году	% от впервые выявлен- ных	будет продолжено (не закон- чено)	% от впервые выявлен-ных	
Республика Хакасия	39	18,8	43	20,7	
В том числе с использованием методов					
Республика, край, область	только хирурги- ческого, %	только лучевого, %	только лекарст- венного, %	комбинир. или компл. (кроме химио- лучевого), %	химиолучевого, %
Томская область	50,6	4,6	0,0	39,1	5,7
Алтайский край	65,7	0,0	0,0	31,8	2,5
Красноярский край	55,1	1,8	0,0	42,4	0,8
Иркутская обл.	63,3	0,0	0,0	30,1	6,6
Кемеровская обл.	63,6	2,6	0,0	30,7	3,0
Новосибирская обл.	74,8	0,6	0,0	23,9	0,6
Омская область	82,4	0,0	0,0	17,6	0,0
Республика Алтай	23,1	0,0	0,0	76,9	0,0
Республика Хакасия	74,4	0,0	0,0	25,6	0,0

Таким образом, рак легкого по-прежнему является лидером и по заболеваемости, и по смертности как в общемировой популяции, так и на территории Российской Федерации, в том числе Томской области. Это может быть связано с тем, что РЛ протекает бессимптомно и агрессивно, и проявляется на поздних стадиях заболевания, вследствие чего более чем у половины пациентов диагностируют РЛ на последней стадии с метастазами.

1.2 Причины возникновения рака лёгкого

Рак лёгкого является мультифакториальным заболеванием, возникающим при сочетании ряда факторов, как правило – это внешние факторы, например, образ жизни, вредные привычки или риски профессиональной/производственной деятельности.

Из профессиональных канцерогенных факторов рак легкого чаще всего обусловлен воздействием никеля, хрома, мышьяка, каменноугольной смолы, вдыханием радона, пыли асбеста [6].

На данный момент считается, что курение – основной фактор возникновения рака лёгкого. Сигаретный дым содержит около 60 различных классифицированных канцерогенов, таких как производные никотина, нитрозамины, и полициклические ароматические углеводороды, например, бензпирен, хроническое воздействие которых увеличивает риск развития рака в эпителии легких из-за образования аддуктов ДНК, вызывающих предрасполагающие к раку мутации в генах-супрессорах опухоли *TP53*, *RB1*, *PTEN*, отвечающих за синтез онкобелков *p53*, *pRb*, *PTEN*, обеспечивающих профилактику онкогенеза. Кроме того, генотоксическое действие бензпирена заключается в высокой ДНК-связывающей способности его метаболитов, в то время как эпигенетические эффекты опосредованы изменением экспрессии генов, кодирующих белки или регуляторные РНК. Воздействие бензпирена нарушает сигнальные пути, вследствие повреждения микроРНК. Нарушение экспрессии микроРНК сопровождается изменением

экспрессии их генов-мишеней, таких как *PTEN*, *EMP2*, *IGF1*, *ITGA6*, *SLC34A2* [8,9].

По данным Федеральной службы государственной статистики табачные изделия употребляют около 23 % или 27,4 миллиона россиян, при этом электронные сигареты (далее по тексту ЭС) употребляют 12-14 % россиян. Несмотря на то, что количество потенциальных курильщиков табака снижается и на момент 2022 года упало на планку 2009 года, в России и мире набирает популярность курения электронных сигарет. Основные причины, по мнению людей: ЭС помогают бросить курить, ЭС не такие вредные как сигареты, от ЭС нет вреда окружающей среде и обществу, нет ограничений на курение. При этом больше половины людей, употребляющих ЭС считают, что таким образом не наносят вред своему здоровью.

Согласно литературным данным за 2019-2023 годы тема курения электронных сигарет изучена недостаточно и активно обсуждается в научном сообществе, в том числе проводятся исследования влияния ЭС на риски развития рака лёгких. В ряде научных работ установлено, что устройства для электронных сигарет и жидкости для парения содержат как патогенные, так и вероятно патогенные онкогены, включая производные никотина (нитроснорникотин, нитрозаминокетон), полициклические ароматические углеводороды, тяжелые металлы (включая металлоорганические соединения), а также канцерогенные сложные органические вещества I и II классов опасности [10, 11].

Различные исследования *in vitro* показали, что вещества, содержащиеся в устройствах для электронных сигарет и жидкостях для парения, обладают трансформирующей и цитотоксической активностью, приводят к пролиферации и онкогенезу, курение является основополагающим фактором в развитии РЛ. [12, 13, 14, 15].

1.3 Гистологические типы рака лёгкого

Существует два типа рака лёгкого: мелкоклеточный и немелкоклеточный. Немелкоклеточный рак лёгкого подразделяется на четыре типа: 1. Плоскоклеточная карцинома; 2. Крупноклеточная карцинома; 3. Аденокарцинома; 4. Смешанный тип [16].

Плоскоклеточная карцинома – самый распространённый тип рака лёгкого, составляет около 60 %. Рак, который формируется в плоских клетках, выстилающих внутреннюю часть легких. Это также называется эпидермоидной карциномой. В большинстве случаев к плоскоклеточному раку лёгкого приводит курение. Люди, которые курят сигареты, в 15–30 раз чаще болеют раком легких или умирают от рака легких, чем люди, которые не курят. Даже выкуривание нескольких сигарет в день или курение время от времени увеличивает риск развития рака легких. На возникновение плоскоклеточного рака лёгкого также влияет интенсивность курения, доза, продолжительность и возраст начала курения. Обнаружение иммуногистохимического маркера p40 свидетельствует о наличие плоскоклеточной карциномы [17, 18].

Опухоль возникает в результате длительного воздействия канцерогенных внешних факторов на клетки плоского эпителия, таким образом происходит видоизменение ткани (метаплазия). Опухоль развивается в результате метаплазии клеток мезотелия или однослойного плоского эпителия. При анализе предракового и злокачественного эпителия курящих пациентов с плоскоклеточным раком лёгкого обнаружено, что множественные, последовательно возникающие аллель-специфические хромосомные делеции в широко рассредоточенных, клонально-независимых очагах на ранних стадиях многостадийного патогенеза привели к развитию и прогрессированию плоскоклеточного рака легкого [19].

Крупноклеточная карцинома – самый редкий рак лёгкого, составляет около 5 %. Рак, который может начаться в нескольких типах крупных клеток.

Представляет собой лишенные железистой и плоскоклеточной дифференциации, а также цитологических особенностей, присущих мелкоклеточной карциноме. В большинстве случаев характеризуется расположением в периферических отделах легких и агрессивным течением с ранним метастазированием. Диагностируется при отсутствии гистологических признаков других подтипов опухоли. Для установки диагноза крупноклеточной карциномы необходимо подтвердить наличие хотя бы одного иммуногистохимического маркера нейроэндокринного рака (TTF-1, высокая пролиферативная скорость Ki-67, MIB-1) [20, 21].

Аденокарцинома – злокачественная опухоль, развивающаяся из железистого эпителия стенки бронхов. Является наиболее распространенной разновидностью немелкоклеточного рака легких. Среди всех злокачественных опухолей легких аденокарцинома диагностируется примерно в 40 % случаев. Как правило, аденокарцинома в основном встречается у мужчин, крайне редко развивается в молодом возрасте [22, 23].

Аденокарцинома, как правило, растет медленнее, чем другие подтипы рака легких, и может быть стабильной в течение многих лет, имитируя доброкачественную патологию в виде гранулем. Однако важно отметить, что прошлые темпы роста не являются предиктором будущих темпов роста, поскольку аденокарцинома, в частности, способна к внезапному или непредсказуемо быстрому росту, даже когда начальные темпы роста были медленными.

Аденокарцинома легкого имеет широкий спектр проявлений, некоторые из которых идентичны или близко имитируют незлокачественные процессы. Это особенно важно, поскольку среди пациентов становятся все больше некурящих и никогда не куривших [24, 25].

Риск аденокарциномы, в отличие от плоскоклеточного рака лёгкого, вовсе не зависит от стажа активного курения. Обычно развитие опухоли у некурящих людей происходит на фоне ограниченного пневмосклероза. В числе других характерных факторов риска отмечается пассивное вдыхание

сигаретного дыма, радона, пыли, разных летучих канцерогенных веществ. Пневмокониозы, в том числе асбестоз, способствуют росту угрозы аденокарциномы легкого в десятки раз, за счёт возникновения соматических мутаций, поражая ген-супрессор опухолей [26].

Решающий фактор возникновения аденокарциномы у некурящих людей – соматические мутации. Рак возникает, когда генетические мутации накапливаются в критических генах, особенно в тех, которые контролируют пролиферацию клеток и репарацию поврежденной ДНК, благодаря чему клетки начинают бесконечно расти и делиться, образуя опухоль. Соматические мутации в генах TP53, EGFR и KRAS часто встречаются при аденокарциноме лёгкого. Мутация EGFR L858R является наиболее распространенной при аденокарциноме, вследствие чего наблюдается переход от тимина (T) к гуанину (G) в экзоне 21 EGFR. При аденокарциноме мутации в гене EGFR это наиболее часто встречаемые мутации и составляют более 50 % [27].

1.4 Лечение пациентов с немелкоклеточным раком лёгкого

До 90% людей с раком легкого страдают немелкоклеточным раком легкого, среди немелкоклеточного рака аденокарцинома легкого является наиболее распространенным гистологическим типом, на долю которого приходится почти половина первичного рака легкого.

Как правило, пациентов с немелкоклеточным раком лёгкого на I стадии очень мало, поскольку на ранних стадиях рак лёгкого протекает бессимптомно и диагностика затруднительна, поэтому большая часть пациентов обращается за помощью с прогрессирующим заболеванием на стадиях: IIIA (T1/2-N2-M0 или T3-N1-M0 или T4-N0/1-M0), IIIB (T1/2-N3-M0 или T3-N2-M0 или T4-N2-M0), IV (любая T любая N-M1), что значительно ухудшает прогноз и общую выживаемость данной категории пациентов, так

как после резекции опухоли, вероятность возникновения рецидива на первой стадии составляет 40%, на второй стадии 66 % и на третьей стадии 75 % [28].

Основными типами лечения пациентов с немелкоклеточным раком лёгкого считаются: хирургическое лечение, химиотерапия, таргетная терапия, лучевая терапия и иммунотерапия [29].

При ранних стадиях НМРЛ, когда рак ограничен легким и поэтому считается излечимым, основным методом лечения является хирургическое удаление опухоли. У пациентов с немелкоклеточным раком лёгкого на стадиях IA (T1-N0-M0), IB (T2a-N0-M0), IIA (T2b-N0-M0), где опухоль находится внутри лёгкого без распространения на регионарные лимфатические узлы, стандартным вариантом является лобэктомия. Лобэктомия – хирургическая операция по удалению доли легкого. Легкие человека анатомически делятся на доли – три с правой стороны и две с левой. Эти естественные разграничения позволяют удалять только одну пораженную часть, сохраняя функционирование остального органа. Также, пациентам I стадии назначают химиотерапию для достижения наилучшего результата в лечении, так как пациенты с ранней стадией НМРЛ подвержены значительному риску рецидива даже после потенциально излечивающей хирургической резекции, а 5-летняя выживаемость колеблется от 30 до 60%.

Пациентам, у которых на момент постановки диагноза выявлен РЛ на стадиях IIIA, IIIB и IV показана мультимодальная терапия. При использовании мультимодального лечения применяют неадьювантную химиотерапию в сочетании с лучевой терапией с целью уменьшения объёма первичной опухоли, с последующим хирургическим лечением, и в случае возникновения рецидива применяют адьювантную химиотерапию в сочетании с таргетной терапией [30].

Адьювантная химиотерапия на основе препаратов платины является стандартом лечения пациентов с НМРЛ II и III стадий, чаще всего используются препараты на основе платины (цисплатин и карбоплатин) в сочетании с другими химиопрепаратами [31].

Адьювантная химиотерапия позволяет уничтожить циркулирующие опухолевые клетки в кровотоке, тем самым достигается эрадикация микрометастазов. Адьювантная химиотерапия улучшает общую пятилетнюю выживаемость у пациентов с НМРЛ на 8-15 % [32, 33].

Таким образом, эффективность адьювантной и неадьювантной химиотерапии не высока, вследствие чего РЛ продолжает прогрессировать, и требуется применение новых терапевтических подходов, например, таких как таргетная терапия и иммунно-терапия. Неэффективность химиотерапии с применением препаратов платины можно объяснить самим действием этих препаратов [34].

Препараты платины характеризуются цитотоксическим воздействием не только на опухолевые клетки, но и на здоровые клетки. Цисплатин способен замещать молекулы воды хлорными лигандами, благодаря низкой концентрации ионов хлора препарата (3-20 мМ), вследствие чего лабильные платиновые центры сшивают соседние гуаниновые основания одной цепи ДНК (в меньшей степени – соседние цепи ДНК) с образованием межцепочечных поперечных связей. Данный механизм воздействия классических препаратов платины чаще всего приводит к ингибированию транскрипции уже в здоровых клетках. Когда РНК-полимеразы транскрибируют ДНК, они останавливаются на перекрестной связи платины и задействуют механизм репарации, связанный с транскрипцией. Если этот механизм не может восстановить повреждение, тогда клетка запускает запрограммированный путь клеточной гибели или апоптоз [35].

С продолжением терапии препаратами платины опухолевые клетки приобретают резистентность, в результате снижения клеточного накопления лекарств, усиления системы детоксикации, усиления процесса репарации ДНК, снижения апоптоза и аутофагии.

Резистентность, возникшая к препаратам платины, это процесс требующий применения новых терапевтических подходов с целью улучшения показателей общей выживаемости пациентов.

1.5 Основные таргетные мишени рака лёгкого (аденокарцинома)

Молекулярно-направленная или таргетная терапия стала открытием 20-го века в лечении пациентов с аденокарциномой лёгкого. Целенаправленная терапия заключается в блокировании передачи сигнала пролиферации внутрь клетки, уменьшая размер опухоли.

На данный момент для рака лёгкого открыт ряд мишеней или клональных драйверных мутаций, определяющих появление и развитие опухолевого процесса. Подавляющее большинство НМРЛ с генетическими изменениями онкогенных драйверов составляют аденокарциномы.

Наиболее часто в рутинной практике с целью назначения таргетной терапии определяют статус мутации генов: *EGFR*; *ALK*; *ROS*; *BRAF*. Разработаны алгоритмы тестирования данных мутаций, так в первую очередь определяют мутации гена *EGFR*, а затем *ALK*, *ROS*, *BRAF*. Мутации генов *EGFR* и *BRAF* определяются методом полимеразно-цепной реакции (ПЦР), а нарушения в генах *ALK* и *ROS* определяются при помощи методов иммуногистохимии.

1.5.1 Рецептор эпидермального фактора роста (*EGFR*)

EGFR экспрессируется в 50% НМРЛ, и его экспрессия коррелирует с неблагоприятным прогнозом. *EGFR* вовлечен в сигнальный каскад, контролирующий процессы клеточной пролиферации, апоптоза, ангиогенеза, инвазии и метастазирования.

Известны активирующие мутации гена *EGFR*, связанные с чувствительностью либо устойчивостью к ингибиторам тирозинкиназы. Подавляющее большинство мутаций, связанных с чувствительностью (~90%), – это делеции в 19 экзоне (Del19) или замена L858R в 21 экзоне. Опухоли с мутациями Del19 или L858R наиболее чувствительны к терапии ингибиторами тирозинкиназы *EGFR*. Прочие мутации, связанные с

чувствительностью (G719X, L861Q, S768I и некоторые другие), составляют в сумме ~5% мутантных случаев.

Молекулярный анализ показал, что в большинстве случаев пациенты имели специфические мутации в гене-рецепторе эпидермального фактора роста (*EGFR*). Мутации гена *EGFR* в экзоне 19, характеризуются внутрирамочными делециями аминокислот 747–750, составляют 45% мутаций, мутации экзона 21, приводят к заменам L858R, составляют 40–45% мутаций, а остальные 10% мутаций затрагивают экзон 18 и 20.

Мутация T790M в гене *EGFR* является наиболее частой причиной возникновения резистентности к проводимой таргетной терапии. Своевременное выявление этой мутации позволяет выяснить причину резистентности и принять решение о смене терапии у пациента. Поэтому для назначения эффективной таргетной терапии всем больным немелкоклеточным раком легкого необходим анализ как на наличие мутаций чувствительности, так и на наличие/отсутствие мутаций устойчивости к ингибиторам тирозинкиназы.

Основные таргетные препараты против мутаций рецептора эпидермального фактора роста: цетуксимаб, панитумумаб, гефитиниб, эрлотиниб, лапатиниб, афатиниб [36, 37].

1.5.2 Рецепторная тирозинкиназа анапластической лимфомы (*ALK*)

ALK расположен во второй хромосоме, ген кодирует рецепторную тирозинкиназу, принадлежащую к надсемейству инсулиновых рецепторов. Этот ген кодирует белок, который включает внеклеточный домен, гидрофобный участок, соответствующий трансмембранной области с однократным прохождением, и внутриклеточный киназный домен [38].

ALK-реаранжированный НМРЛ составляет от 2% до 5% всех случаев НМРЛ. Пациенты с активируемым *ALK* НМРЛ, как правило, мало курят или никогда не курили. Гистологически *ALK* случаи пациентов с НМРЛ с

большей вероятностью представляют собой гистологию аденокарциномы, в частности перстневидноклеточного типа с обильным внутриклеточным муцином. На молекулярном уровне изменения *ALK*, по-видимому, исключают мутации *EGFR* и *KRAS* [39].

Основные таргетные препараты ALK-ингибиторы: Кризотиниб, Церитиниб, Алектиниб, Бригатиниб, Лорлатиниб [40].

1.5.3 Тирозинкиназный рецептор инсулина (*ROS-1*)

ROS-1 мутации обнаружены у 0,9–2,6% пациентов при немелкоклеточном раке легкого, в основном аденокарциномы легкого, со значительно большей частотой у некурящих женщин и тенденцией к более молодому возрасту. *ROS-1* является истинным онкогенным фактором, а ингибиторы тирозинкиназы, нацеленные на *ROS-1*, могут блокировать рост опухоли и обеспечивать клиническую пользу для пациента.

Основная причина возникновения драйверных мутации заключается в транслокации претоонкогенов между геном *ROS-1* и *CD-74*, *SLC-24/A-2* или *FIG*. Подобные драйверные мутации встречаются у 1-2 % пациентов с немелкоклеточным раком лёгкого [41]. Микроделеция в хромосоме 6q21 отвечает за слияние *ROS-1* с новым геном слитого в глиобластоме (*FIG*), который отвечает за сверхэкспрессию *ROS-1* и выработку сигналов, аномально активирующих тирозинкиназный путь, придавая ему роль протоонкогена [42].

Основные таргетные препараты, направленные против *ROS-1*: кризотиниб, энтеректениб, церитиниб, лорратиниб, репотректиниб, бригатиниб.

1.5.4 Мутационная активность семейства *RAS*

В семейство *RAS* входят гены *KRAS* (хромосома 12p12.1), *HRAS* (хромосома 11p15.5) и *NRAS* (хромосома 1p13.1). Соматически активирующие мутации в клеточных гомологах всех трех членах семьи *RAS* встречаются в широком спектре раковых заболеваний человека. Эти мутации преимущественно происходят в кодонах 12, 13 и 61 и приводят к конститутивной активации *RAS*. В целом, мутации *RAS* были обнаружены примерно в 30% всех случаев ЗНО у человека, при этом *KRAS* является наиболее часто мутировавшим членом семейства [43].

Мутации *KRAS* преимущественно встречаются в аденокарциномах легких, наиболее распространенном гистологическом подтипе немелкоклеточного рака легкого, с частотой от 16% до 40% проанализированных образцов. Мутации преимущественно происходят в кодоне 12, иногда в кодоне 13 и редко в кодоне 61 *KRAS*.

Мутации *KRAS* встречаются с большей частотой в опухолях у курильщиков по сравнению с мутациями у некурящих. Кроме того, мутации, связанные с трансверсиями нуклеотидов (например, G/C или G/T), которые, как известно, связаны с воздействием табачного дыма, чаще встречаются у курильщиков, чем у некурящих. Действительно, две наиболее распространенные мутации *KRAS* при НМПЛ, G12C (~40%) и G12V (~22%), возникают в результате трансверсий G/T [44, 45].

1.5.5 Мутационная активность гена *B-raf*

В геноме человека ген протоонкогена *B-raf* (*BRAF*) расположен на хромосоме 7 (7q34) и кодирует белок *BRAF*, состоящий из 766 аминокислот. *BRAF* является основным онкогенным фактором и, следовательно, терапевтической мишенью для разработки лекарств. Почти 7% случаев ЗНО у человека связаны с мутациями *BRAF*, и более 90% наблюдаемых мутаций

BRAF являются мутациями V600E или I класс мутации гена. Замена валина на глутаминовую кислоту в положении 600 вызывает 500-кратное увеличение активности киназы и приводит к усилению клеточной пролиферации [46].

Наиболее важный и изученный сигнальный путь, в котором участвует *BRAF* – сигнальный путь *EPK (Ras-Raf-MEK-ERK)* мультифункциональный внутриклеточный сигнальный путь *MAPK (mitogen-activated protein kinase)*, где *BRAF* обладает наибольшей фосфолирующей активностью *MEK* из всего семейства *RAF*. Основная функция *BRAF* в вышеупомянутом сигнальном пути – регуляция пролиферации, дифференцировки и апоптоза клеток в ответ на внеклеточное воздействие. Прогрессирование опухоли связано с абберациями генов, которые модулируют пролиферацию, дифференцировку, выживаемость и апоптоз клеток. В частности, накопление патологических изменений в протоонкогенах приводит к значительным клеточным дефектам [47].

Существует три класса мутаций гена *BRAF*. Класс I включает мутации *BRAF V600E* и позволяет *BRAF* действовать как конститутивно активный мономер. Мутации класса II позволяют конститутивно активные димеры. Класс III либо имеет нарушенную киназную активность, либо неактивен вовсе.

Поскольку все патогенные мутации *BRAF*, независимо от их классов, активируют фосфорилирование *ERK*, предполагается, что факторы транскрипции (TF), модулируемые сигнальным путем *ERK*, являются потенциальными мишенями нижестоящих мутаций *BRAF*. Одним из наиболее известных транскрипционных факторов, которые регулируются фосфорилированием *ERK* в раковых клетках, является *C-MYC*. то фосфорилирование предотвращает деградацию белка. Кроме того, мутация *C-MYC* в *Thr58*, которая блокирует деградацию *C-MYC*, показала устойчивость к ингибированию сигнального пути *FGFR* (Рецептор фактора роста фибробластов) в нескольких линиях раковых клеток, зависимых от *FGFR*. фосфорилирование *ERK*, опосредованное мутацией *BRAF*,

индуцирует стабильность *C-MYC* и может передавать онкогенный сигнал от мутаций *BRAF* [48].

Однако, согласно литературным данным, спектр генетических нарушений при аденокарциноме лёгкого значительно шире, активируются различные сигнальные пути с привлечением генов-супрессоров опухоли. Наиболее распространённые и изученные клеточные сигнальные пути, характерных для аденокарциномы лёгкого, активируемые в результате соматических изменений. Чаще всего встречаются мутации в сигнальном пути рецепторных тирозинкиназ (RTK) около 50 % (рецепторы с тирозинкиназной активностью), *TP53* около 50 % (ген-супрессор опухолей), *MYC* около 30 % (ген-супрессор опухолей, фактор транскрипции) и *LKB1/AMPK* около 15-30 % (ген-супрессор опухолей/центральный метаболический сенсор), основные мутации, нарушающие сигнальный путь представленный в Таблице 1.

Таблица 1.3 – Клеточные сигнальные пути РЛ, активируемые в результате соматических изменений приводящие к аденокарциноме лёгкого

Сигнальный путь	Аденокарцинома лёгкого	
	Вовлечённые гены	%
RTK	EGFR, ALK, MET, ERBB2, ROS1, RET	~50
TP53	TP53, MDM	~50
C-MYC	Мyc	~30
LKB1/AMPK	LKB1	~15-30
RAS/RAF	KRAS, NF1, BRAF, NRAS	~25
Epigenetic regulation	SMARCA4, ARID1A, SETD2	~22
TTF1	NKX2.1/TTF1	~20
RB1/CDKNA2	CDKNA2	~15-20
PI3K/AKT	PIK3CA, PTEN, AKT1	~10-12

1.5.6 Протоонкогенный ген *C-MYC*

C-MYC находится на 8q24, или 24 сегменте длинного плеча 8 хромосомы. Ген *C-MYC* кодирует белок Мус, который играет важную роль в пролиферации клетки, он контролирует экспрессию генов, кодирующих факторы клеточного цикла [49].

В норме белок Мус присутствует в клетках всех типов тканей, где осуществляет регуляторные функции. Основная функция Мус – модуляция экспрессии генов. Считается, что под непосредственным контролем гена *C-MYC* находится экспрессия около 15 % всего человеческого генома [50].

При мутации (структурной перестройке) в протоонкогене *C-MYC* запускается процесс амплификации, из-за чего число копий *C-MYC* кратно увеличивается, что приводит к избыточному образованию белка Мус. Клетка, где произошла такая мутация, начинает бесконтрольно размножаться и впоследствии превращается в опухоль [51].

C-MYC играет роль в регуляции поведения клеток рака легкого, включая рост, резистентность, гибель и распространение посредством активации белков, управляющих клеточным циклом. *C-MYC* функционирует как нисходящий сигнал нескольких рецепторов роста, таких как рецептор эпидермального фактора роста (*EGFR*), трансформирующий фактор роста альфа (*TGF-α*), рецептор трансформирующего фактора роста бета (*TGF-β*), интерлейкин-6 (*IL-6*) рецептор [52, 53].

1.5.7 Трансмембранный тирозинкиназный рецептор (*ERBB2/HER2*)

ERBB2/HER2 принадлежит к семейству рецепторов *EGF* (*EGFR*). Это семейство включает в себя четыре вида рецепторов: *EGFR/HER1*, *HER2*, *HER3* и *HER4*. Рецепторы семейства *EGF* функционируют за счет стимуляции сигнальных путей фактора роста, таких как путь *PI3K – АКТ – mTOR*. Как правило, мутация в *ERBB2* представляет собой инсерцию

непосредственно в экзоне, и очень редко можно наблюдать точечные замены нуклеотидов. Пациенты с мутацией в гене *ERBB2* НМРЛ, как правило, мало курят или никогда не курили.

В опухолевых клетках активация *ERBB2* происходит независимо от лиганда за счет мутаций либо амплификации гена *ERBB2*. Гиперэкспрессия рецептора *ERBB2* приводит к конститутивной активации сигнальных путей фактора роста и тем самым служит онкогенным фактором при различных типах злокачественных опухолей. Генетическое разнообразие мутаций *ERBB2* меньше по сравнению с мутациями *EGFR*, так как 96% составляют вставки экзона 20, а 83% из них представляют собой рекуррентные вставки из 12 пар оснований, вызывающие дублирование аминокислот YVMA в кодоне 775 [54].

Мутация в гене *ERBB2* как правило обнаруживается у людей с аденокарциномой лёгкого 1-2 %. Пациенты, у которых обнаружен немелкоклеточный рак лёгкого с мутацией *ERBB2* говорит о том, что *ERBB2* является целевой драйверной мутацией [55].

Наиболее частое назначаемое лечение это таргетная терапия совместно с химиотерапией. Основные таргетные препараты при лечении: трастузумаб, афатиниб. Таргетная терапия *ERBB2* может обеспечить контроль над заболеванием у пациентов с метастатическим НМРЛ с мутацией *ERBB2*, прогрессирующим на фоне предыдущей терапии. При назначении таргетной терапии *ERBB2* переносимость трастузумаба и афатиниба довольно токсична, особенно при сочетании с химиотерапией [56].

Однако, определение всех этих мишеней на практике невозможно по нескольким причинам: 1. Нехватка биологического материала (операционный или биопсийный материал); 2. Трудозатраты по времени и отсутствие наборов на вышеупомянутые мишени. В данной ситуации предпочтительно использовать метод высокопроизводительного секвенирования (NGS), позволяющий в относительно короткое время отслеживать статус нескольких генов мишеней, что позволяет в короткие

сроки подобрать наиболее эффективный препарат и назначить пациенту необходимое лечение. Внедрение метода NGS позволяет не только повысить качество лечения, но и показатели общей и безрецидивной выживаемости.

2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Материалы исследования

В исследовании включены пациенты (n=12) с морфологически-верифицированным диагнозом – немелкоклеточный рак лёгкого (аденокарцинома), получавшие лечение на базе НИИ Онкологии ТНИМЦ. 7 женщин (58 %) и 5 мужчин (42 %), средний возраст пациентов составляет 60 лет. На момент постановки диагноза 50 % пациентов имели распространённый процесс (T1-3N0-1M0-1) и находились на III и IV стадии заболевания.

В качестве основного материала исследования для проведения NGS использовали опухоль заключённую в парафин (биопсия, операционный материал). Материалом для проведения NGS послужила геномная ДНК и тотальная РНК, выделенная из парафиновых блоков. Информация о пациентах, принимавших участие в исследовании представлена в таблице 2.1.

Таблица 2.1 – Информация о пациентах

№	Код пациента, дата рождения	Пол, возраст	Статус курения	Гистологический диагноз	Стадия на момент постановки диагноза	TNM
1	ШВТ-12 19.10.1940	Ж, 80	Не курит	Неплоскоклеточный, аденокарцинома	IV	T4N1M1a
2	СИИ-14 06.05.1955	М, 66	Не курит	Неплоскоклеточный, аденокарцинома	II	T1cN0M0
3	АЛВ-13 31.03.1976	Ж, 47	Не курит	Аденокарцинома	II	T1aN1M0

Окончание таблицы 2.1

4	БТС-4 11.03.1952	Ж, 69	Не курит	Неплоскоклеточный, аденокарцинома	II	T2N0M0
5	ПЛВ-6 27.09.1969	Ж, 53	Курит	Неплоскоклеточный, аденокарцинома	I	T1bN0M0
6	ЧНН-10 24.08.1955	Ж, 66	Не курит	Неплоскоклеточный, аденокарцинома	III	T3N2M0
7	АТА-11 08.01.1951	Ж, 71	Не курит	Неплоскоклеточный, аденокарцинома	IV	T2bN2M1a
8	ВВП-5 10.04.1954	М, 77	Не курит	Неплоскоклеточный, аденокарцинома	IV	TXN2M1c
9	СВА-3 23.02.1956	М, 67	Нет данных	Инвазивная муцинозная аденокарцинома	Ia	T1N0M0
10	МВН-7 24.07.1955	М, 65	Не курит	Неплоскоклеточный, аденокарцинома	III	T1bN2M0
11	ТАК-9 14.06.1957	Ж, 65	Нет данных	Папиллярная аденокарцинома	I	Данные отсутствуют
12	ПОМ-2 04.09.1976	Ж, 46	Не курит	Неплоскоклеточный, аденокарцинома	IIIA	T1cN2M0

Критерием включения пациентов в исследование являлось наличие морфологически-верифицированного диагноза НМРЛ (аденокарцинома). Критерием исключения являлись тяжёлые сопутствующие заболевания и наличие других злокачественных новообразований.

Проведение данного исследования одобрено этическим комитетом ТНИМЦ и выполнено с соблюдением Хельсинкской декларации от 1964 г.

2.2 Методы исследования

2.2.1 Выделение геномной ДНК и тотальной РНК из парафиновых блоков

Используется набор PureCode предназначенный для последовательного выделения ДНК и РНК при помощи магнитных частиц. из одного образца ткани FFPE (фиксированной формалином и заключенной в парафин) в отдельных элюатах. Выделение ДНК и РНК из одного образца дает возможность проводить комплексный анализ нуклеиновых кислот.

Образцы сначала лизируют в АМ буфере в присутствии протеиназы К. Затем лизат нагревают для денатурации протеиназы и обращения химических сшивок нуклеиновых кислот. После нагревания лизат смешивают с ВМ буфером и Магнитными частицами Mag. ДНК связывается с магнитными частицами, а РНК-содержащий супернатант отбирается в отдельную пробирку для связывания с магнитными частицами в присутствии изопропилового спирта. В начале осуществляется подготовка первичных образцов опухолевых тканей, заключённых в парафиновые блоки:

1. В 1,5 или 2 мл пробирку вносят 2–3 среза ткани фиксированной формалином и заключенной в парафин блока толщиной 5–10 мкм;
2. Добавляют к образцу 300 мкл минерального масла. Центрифугируют образец для сброса капель;
3. Инкубируют образец в термоблоке при температуре 56 °С в течение 3 минут, после инкубации центрифугируют для сброса капель;
4. Затем вносят 300 мкл АМ буфера и 20 мкл протеиназы К в пробирку с образцом, вортиксируют и центрифугируют;
5. Далее образец центрифугируют с ускорением 2000 g в течение 1 минуты для создания в растворе двух фаз: маслянистой (верхней) и водной (нижней);

6. Инкубируют образец в твердотельном термостате при температуре 56 °C в течение 4 часа;

7. По истечению 4 часов образец инкубируют в твердотельном термостате при температуре 90 °C в течение 1 часа, после чего центрифугируют с ускорением 2000 g в течение 1 минуты;

8. Далее переносят 200 мкл нижней водной фазы, не забирая клеточный дебрис, в новую 2 мл пробирку;

9. Добавляют к образцу 500 мкл ВМ буфера и 10 мкл Магнитных частиц Mag, вортексируют в течение 10 минут.

10. Помещают пробирку на магнитный штатив и выдерживают при комнатной температуре до восстановления полной прозрачности раствора;

11. Отбирают супернатант около 700 мкл и перенести в новую 2 мл пробирку;

На данном этапе подготовка первичных образцов опухолевых тканей, заключённых в парафиновые блоки завершена. Отобранный супернатант в дальнейшем используется для выделения РНК.

Магнитные частицы, оставшиеся на дне пробирки на стадии подготовки образца используется для выделения тотальной ДНК:

1. К осадку с магнитными частицами добавляют 400 мкл СМ буфера, образец снимают с магнитного штатива и вортексируют в течение 2 минут;

2. Далее образец помещают на магнитный штатив и выдерживают при комнатной температуре до восстановления полной прозрачности раствора, отбирают и сбрасывают супернатант не задевая осадок магнитных частиц;

3. Добавляют к осадку магнитных частиц 400 мкл 80% этанола, снимают пробирку с магнитного штатива и вортексируют в течение 2 минут, помещают пробирку на магнитный штатив и выдерживают при комнатной температуре до восстановления полной прозрачности раствора, затем отбирают и сбрасывают супернатант;

4. Осуществляют повторную промывку этанолом;
5. Центрифугируют в импульсном режиме для сбора капель на дне пробирки, затем помещают пробирку на магнитный штатив и удаляют остаточные капли этанола.
6. Подсушивают осадок магнитных частиц в течение 10 минут при комнатной температуре, не снимая пробирку с магнитного штатива;
7. Добавляют к осадку магнитных частиц 50 мкл Элюирующего буфера;
8. Снимают пробирку с магнитного штатива и вортиксовать в течение 5 минут для тщательного перемешивания;
9. Помещают пробирку на магнитный штатив, выдержать при комнатной температуре до восстановления полной прозрачности раствора, переносят очищенный супернатант, содержащий ДНК, в чистую 1,5 мл пробирку.

На данном этапе заканчивается выделение ДНК из первичных образцов опухолевых тканей. Полученный препарат ДНК хранится при -20 °С.

Дальнейшей стадией является выделение геномной РНК из отобранного супернатанта, полученного на стадии подготовки образца:

1. Добавляют к супернатанту 600 мкл 100% изопропанола и 10 мкл Магнитных частиц Mag и вортиксовать в течение 10 минут;
2. Помещают пробирку на магнитный штатив, выдерживают при комнатной температуре до восстановления полной прозрачности раствора, отбирают и сбрасывают супернатант не задевая осадок магнитных частиц;
3. Добавляют к осадку магнитных частиц 400 мкл 80% этанола, снимают пробирку с магнитного штатива и вортиксовать в течение 2 минут, помещают пробирку на магнитный штатив и выдерживают при комнатной температуре до восстановления полной прозрачности раствора, затем отбирают и сбрасывают супернатант;

4. Центрифугируют в импульсном режиме для сбора капель на дне пробирки, затем помещают пробирку на магнитный штатив и удаляют остаточные капли этанола.
5. Подсушивают осадок магнитных частиц в течение 3 минут при комнатной температуре, не снимая пробирку с магнитного штатива;
6. Добавляют к осадку магнитных частиц 73,5 мкл буфера для ДНКазы и 1,5 мкл ДНКазы, снимают пробирку с магнитного штатива и пипетируют;
7. Выдерживают при комнатной температуре в течение 15 минут и добавляют 225 мкл DM буфера;
8. Помещают пробирку на магнитный штатив, выдержать при комнатной температуре до восстановления полной прозрачности раствора, затем отбирают и сбрасывают супернатант;
9. Добавляют к осадку магнитных частиц 400 мкл 80% этанола, снимают пробирку с магнитного штатива и вортексируют в течение 2 минут, помещают пробирку на магнитный штатив и выдерживают при комнатной температуре до восстановления полной прозрачности раствора, затем отбирают и сбрасывают супернатант;
10. Осуществляют повторную промывку;
11. Центрифугируют в импульсном режиме для сбора капель на дне пробирки, затем помещают пробирку на магнитный штатив и удаляют остаточные капли этанола;
12. Подсушивают осадок магнитных частиц в течение 10 минут при комнатной температуре, не снимая пробирку с магнитного штатива;
13. Добавляют 50 мкл воды без нуклеаз, снимают пробирку с магнитного штатива и вортексируют в течение 5 минут;
14. Помещают пробирку на магнитный штатив, выдержать при комнатной температуре до восстановления полной прозрачности раствора, переносят очищенный супернатант, содержащий РНК, в чистую 1,5 мл пробирку.

На данном этапе заканчивается выделение ДНК из первичных образцов опухолевых тканей. Полученный препарат ДНК хранится при -80 °С.

2.2.2 Флуориметрический метод определения концентрации ДНК и РНК

Для определения концентрации нуклеиновых кислот используется прибор Qubit 4.0. Сущность метода основана на введении флуоресцентных зондов, которые специфически связывают целевую нуклеиновую кислоту (ДНК, РНК), образуя флуоресцентный комплекс. Источник света возбуждает флуоресценцию, которая пропорциональна концентрации определяемого вещества. Флуоресцентный краситель испускает сигнал только при связывании с мишенью, что сводит к минимуму влияние загрязняющих веществ на результат. Прибор измеряет интенсивность свечения и рассчитывает концентрацию.

Методика проведения анализа состоит из следующих этапов:

1. Выполняется калибровка прибора, для этого берутся два стандартных образца известной концентрации нуклеиновых кислот – минимальной и максимальной;
2. Осуществляется построение калибровочного графика;
3. В пустую пробирку на 0,5 мл добавляют 199 мкл ТЕ буфера и 1 мкл флуоресцентного красителя. Инкубируют в течении 1 минуты и вортексируют при малых оборотах;
4. Затем в тонкостенные пробирки для флуориметра вносят 195 мкл подготовленного буфера и 5 мкл образца (ДНК или РНК);
5. Инкубируют в течении 5 минут и вортексируют в течение 30 сек и центрифугируют для сброса капель и эффективного связывания флуоресцентных зондов с целевой нуклеиновой кислотой, данный процесс осуществляют крайне осторожно при малых оборотах, во избежание разрушения полученного комплекса;

6. Помещают пробирку в прибор, измеряют концентрацию нуклеиновых кислот.

7. Проводят анализ полученных данных, от концентрации проб зависит дальнейшая судьба проведения NGS. При низких концентрациях образца NGS не пройдет и все дальнейшие действия не целесообразны.

На данном этапе заканчивается определение концентрации нуклеиновых кислот в полученных образцах, данные записываются и анализируются.

2.2.3 Подготовка NGS-библиотек

Исследуемую ДНК перед анализом на NGS необходимо модифицировать путём создания коллекции случайных фрагментов нужной структуры. Для этого образец ДНК фрагментируют, присоединение синтетических олигонуклеотидных адаптеров по краям, отбирают фрагменты определённой длины и амплифицируют. В результате получают библиотеку случайных фрагментов ДНК для NGS. Правильно приготовленная библиотека случайных фрагментов определяет на 90 % успех проведения NGS.

Подготовка NGS библиотек осуществлялась при помощи набора «OncoScope NSCLC Solution» компании «Parseq». Набор реагентов «OncoScope NSCLC Solution» предназначен для обогащения целевых регионов генов, ассоциированных с развитием немелкоклеточного рака легкого, методом мультиплексной ПЦР и ОТ-ПЦР с использованием специфических праймеров с последующим созданием библиотек ампликонов, анализируемых методом высокопроизводительного секвенирования и последующим биоинформатическим анализом и визуализацией полученных результатов.

На первом этапе проводятся реакция таргетного обогащения для образцов геномной ДНК и объединенная реакция обратной транскрипции и

таргетного обогащения для образцов тотальной РНК. Таргетное обогащения для обоих аналитов проводится методом мультиплексной ПЦР с использованием специфических праймеров, содержащих последовательность универсального адаптера для платформы Illumina. Ампликоны, полученные в ходе таргетного обогащения ДНК и РНК, объединяются в одну реакцию и подвергаются очистке на магнитных частицах, после чего осуществляется амплификация библиотеки и молекулярное индексирование образцов. Финальная библиотека проходит очистку на магнитных частицах. Анализируемые маркеры набора реагентов «OncoScope NSCLC Solution» представлены в таблице 2.2.

Подготовка NGS библиотек осуществляется в несколько этапов: 1. Разрешение ДНК с получением фрагментов определённой длины; 2. Присоединение адаптеров; 3. Предварительная амплификация библиотек; 4. Отбор фракции фрагментов нужной длины; 5. Штрих кодирование ДНК.

Таблица 2.2 – Анализируемые маркеры NMPЛ, затрагиваемые набором

№	Ген	Транскрипт	Анализируемые маркеры
NSCLC ДНК			
1	<i>ALK</i>	NM_004304.5	экзоны 20-25
2	<i>BRAF</i>	NM_004333.6	экзоны 11, 15
3	<i>EGFR</i>	NM_005228.5	все экзоны
4	<i>ERBB2</i>	NM_004448.4	экзоны 16-21
5	<i>KRAS</i>	NM_004985.5	все экзоны
6	<i>MET</i>	NM_001127500.3	варианты: Y1003X, D1010X, D1246N
7	<i>NRAS</i>	NM_002524.5	все экзоны
8	<i>PIK3CA</i>	NM_006218.4	экзоны 2, 8, 10, 21
9	<i>ROS1</i>	NM_002944.3	варианты: R2072W, R2039C, D2033N, G2032R, L2026M, S1986F, S1986Y
10	<i>TP53</i>	NM_000546.6	все экзоны

Окончание таблицы 2.2

NSCLC РНК (Онкогены)			
11	<i>NTRK1</i>	NM_002529.4	Фьюжн-гены
12	<i>NTRK2</i>	NM_001018064.3	Фьюжн-гены
13	<i>NTRK3</i>	NM_001012338.3	Фьюжн-гены
14	<i>ALK</i>	NM_004304.5	Фьюжн-гены
15	<i>ROS1</i>	NM_002944.3	Фьюжн-гены
16	<i>RET</i>	NM_020975.6	вариант: METloss14ex
17	<i>MET</i>	NM_001127500.3	вариант: ERBB2loss16ex
18	<i>ERBB2</i>	NM_004448.4	
NSCLC РНК (Гены-партнеры)			
19	<i>IRF2BP2</i>	NM_182972.3	Фьюжн-гены
20	<i>SQSTM1</i>	NM_003900.5	Фьюжн-гены
21	<i>TPM3</i>	NM_152263.4	Фьюжн-гены
22	<i>TRIM24</i>	NM_015905.3	Фьюжн-гены
23	<i>AKAP13</i>	NM_007200.5	Фьюжн-гены
24	<i>ETV6</i>	NM_001987.5	Фьюжн-гены
25	<i>EML4</i>	NM_019063.5	Фьюжн-гены
26	<i>CD74</i>	NM_001025159.3	Фьюжн-гены

Приготовление библиотек состоит из следующих этапов: 1. Таргетное обогащение образца геномной ДНК; 2. Объединенная реакция обратной транскрипции и таргетного обогащения образца тотальной РНК; 3. Амплификация продуктов таргетного обогащения с индексированием.

Таргетное обогащение ДНК: 1. Установить программу таргетного обогащения ДНК на амплификаторе (объем реакции 25 мкл), программа амплификатора представлена в таблице 2.3;

Таблица 2.3 – Программа амплификатора таргетного обогащения ДНК

Количество циклов	Температура	Время
1	95 °C	15 мин
5	95 °C	15 сек
	60 °C	4 мин
17	95 °C	15 сек
	63 °C	1 мин
1	4 °C	Хранение

2. Приготовить реакционную смесь для таргетного обогащения смещивают следующие компоненты: 5 мкл ПЦР смесь, 5 мкл NSCLC ДНК Пул праймеров, 12 мкл воды без нуклеаз и 3 мкл образца геномной ДНК;

3. Перемешать реакцию на вортексе, центрифугировать в импульсном режиме и поместить в амплификатор для таргетного обогащения ДНК.

Обратная транскрипция и таргетное обогащение РНК: 1. Установить программу обратной транскрипции и таргетного обогащения РНК на амплификаторе (объем реакции 25 мкл), программа амплификатора представлена в таблице 2.4;

Таблица 2.4 – Программа амплификатора таргетного обогащения РНК

Количество циклов	Температура	Время
1	50 °C	60 мин
1	95 °C	15 мин
5	95 °C	15 сек
	60 °C	4 мин
20	95 °C	15 сек
	63 °C	1 мин
1	4 °C	Хранение

2. Приготовить реакционную смесь для таргетного обогащения смещивают следующие компоненты: 5 мкл ПЦР смесь, 1 мкл обратной

транскриптазы, 5 мкл NSCLC РНК Пул праймеров, 11 мкл воды без нуклеаз и 3 мкл образца тотальной РНК;

3. Перемешать реакцию на вортексе, центрифугировать в импульсном режиме и поместить в амплификатор для таргетного обогащения РНК.

Объединение продуктов таргетного обогащения и очистка:

1. Продукты таргетного обогащения образцов геномной ДНК (12,5 мкл) и продукты обратной транскрипции и таргетного обогащения соответствующего образца РНК (12,5 мкл) объединяют в новом планшете или пробирках с получением 25 мкл объединенных продуктов таргетного обогащения. Остатки каждой реакции замораживают;

2. Добавить 28,8 мкл тщательно перемешанных магнитных частиц к 25 мкл объединенного ПЦР продукта. Тщательно вортифицируют до гомогенного состояния и центрифугируют в импульсном режиме;

3. Инкубируют образцы 5 минут при комнатной температуре;

4. По истечении времени инкубации образцы помещают на магнитный штатив, до полного восстановления прозрачности раствора;

5. Не снимая образцы с магнитного штатива, удалить супернатант (~55 мкл), не задевая осадок магнитных частиц;

6. Добавляют 150 мкл свежеприготовленного 70% спирта к осадку магнитных частиц. Удаляют весь спирт, не задевая осадок магнитных частиц. Процедуру очистки спиртом повторяют два раза;

8. После удаления спирта образцы снимают с магнитного штатива и центрифугируют в импульсном режиме. После чего пробирки возвращают на магнитный штатив и удаляют остаточные капли спирта. Осадок сушат в течении 5 минут на магнитном штативе, смотрят за тем, чтобы не пересушить осадок.

На данном этапе подготовки библиотек случайных фрагментов ДНК для NGS закончено объединение продуктов таргетного обогащения образцов геномной ДНК и продукты обратной транскрипции и таргетного обогащения соответствующего образца РНК, а также осуществлена очистка проб от

остаточного количества реактивов: компонентов ПЦР реакции, неприсоединившихся адаптеров и полимеразы.

Амплификация библиотек с индексированием:

Рекомендовано проводить амплификацию библиотек с использованием прибора, позволяющего детектировать наличие продуктов амплификации в режиме реального времени. Этот метод позволяет определить сильные количественные отклонения отдельных библиотек, а также определить наличие проблем или отсутствие амплификации.

1. В каждую пробирку с сухим осадком частиц перенести из планшета или стрипованных пробирок 50 мкл ПЦР смеси 2 с индексированными праймерами;

2. Тщательно вортиксировать пробы и компоненты реакции, центрифугировать в импульсном режиме для сброса капель и поместить в амплификатор с заданной программой (объем реакции 50 мкл), представленной в таблице 2.5.

Таблица 2.5 – Амплификация библиотек с индексированием

Количество циклов	Температура	Время
1	98 °C	2 мин
9	98 °C	30 сек
	55 °C	30 сек
	72 °C	1 мин
1	72 °C	5 мин
1	4 °C	Хранение

Очистка библиотек после амплификации:

1. Добавить 50 мкл Реагента В к амплифицированной библиотеке, тщательно перемешать содержимое на вортексе до гомогенного состояния и центрифугировать в импульсном режиме;

2. Инкубировать образцы 5 минут при комнатной температуре;

3. По истечении времени инкубации поместить образцы на магнитный штатив, оставить на 5, до прозрачности раствора;
4. Не снимая образцы с магнитного штатива, удалить супернатант, не задевая осадок магнитных частиц;
5. Добавить 150 мкл свежеприготовленного 70% спирта к осадку магнитных частиц, удалить весь спирт, не задевая осадок магнитных частиц;
6. Повторить пункт 5 для повторной промывки осадка;
7. После удаления спирта необходимо снять образцы с магнитного штатива и центрифугировать в импульсном режиме. После чего пробирки ставят на магнитный штатив и удаляют остаточные капли спирта, подсушивают осадок 5 минут на магнитном штативе;
8. Добавляют к каждому образцу 25 мкл воды I типа и тщательно перемешивают содержимое на вортексе до гомогенного состояния и центрифугируют в импульсном режиме;
9. Помещают образцы на магнитный штатив и инкубируют 5 минут до полного восстановления прозрачности раствора;
10. Переносят супернатант, содержащий очищенные библиотеки, в чистые пробирки.

На данном этапе заканчивается процесс подготовки амплифицированных библиотек с индексированием, для дальнейшего проведения высоковоспроизводительного секвенирования.

2.2.3 Электрофоретический анализ ДНК и РНК

Главная суть анализа – оценка качества и целостности подготовленных библиотек перед запуском секвенирования следующего поколения (NGS) для получения надежных и высококачественных данных для последующего анализа. Для проведения электрофоретического анализа нуклеиновых кислот используется прибор TapeStation 4150 на чипах ScreenTape. Одноразовые чипы ScreenTape содержат по 16 отдельных каналов, и заменяют целый

комплекс оборудования, необходимого для проведения стандартного электрофореза на агарозном геле.

Протокол работы состоит из следующих этапов:

1. Измерить исходные концентрации образцов, используя, например, флуориметр Cubit, при необходимости разбавить образцы водой или TE;
2. За 30 минут до выделения довести реагенты до комнатной температуры;
3. Включите компьютер и прибор и запустите программное обеспечение Agilent TapeStation Controller.
4. При первом открытии пакета из фольги для устройства ScreenTape написать на пакете дату вскрытия. Встряхнуть устройство для снятия пленки один раз, чтобы уменьшить количество пузырьков воздуха, и вставить его в гнездо для снятия пленки прибора для создания гобеленов;
5. Выберите требуемые позиции образцов и назовите ваши образцы в программном обеспечении TapeStation Controller;
6. Указать необходимые настройки для образцов в программном обеспечении для начала анализа;
7. Провортексировать реагенты и образцы непосредственно перед анализом, 2000 об/мин в течение 1 минуты;
8. Загрузить полоску с образцом в прибор. Установить лестницу в положение A1 на держателе трубчатой ленты;
9. Запустить прибор;
10. По окончании работы прибора программное обеспечение для анализа гобеленов автоматически открывается после запуска и отображает результаты.
11. Проанализировать полученные данные для дальнейшей работы с построением библиотек для проведения высокопроизводительного секвенирования, образцы должны иметь 200-300 пар нуклеотидов, также быть целостными, не иметь признаков разрушения и наличия других праймеров.

2.2.4 Секвенирование

Второе поколение секвенирования (также называемое NGS Next-Generation Sequencing) основывается на методах массового параллельного секвенирования, которые позволяют параллельно анализировать миллионы фрагментов ДНК. Основные отличия между первым и вторым поколением секвенирования связаны с объемом и скоростью секвенирования, а также возможностью анализировать не только ДНК, но и РНК и метилированные последовательности.

Секвенирование инициируется отжигом праймера, который комплементарен адаптеру на одной из концов ДНК библиотеки. Затем трифосфаты добавляются в микрореакторы по очереди, и если добавленный нуклеотид комплементарен матрице, то ДНК-полимераза интегрирует его в синтезируемую цепь. Реакция образования фосфодиэфирной связи вызывает локальное изменение pH среды в микрореакторе. Это изменение детектируется сенсором, подключенным к каждому микрореактору. Если нуклеотид не подходит, то соответственно сигнал отсутствует. После каждого добавленного нуклеотида система промывается буфером для удаления остатков невключенных ДНТФ данного вида. Как и в случае пиросеквенирования, существуют проблемы с детекцией гомополимерных последовательностей – длинных моонуклеотидов, что приводит к потере дискретности сигнала и затрудняет точное определение количества присутствующих нуклеотидов в последовательности.

В данной работе проведение NGS осуществлялось на платформе MiSeq (Illumina, США), с целью обогащения 22 генов (*ALK*, *BRAF*, *EGFR*, *ERBB2*, *KRAS*, *MET*, *NRAS*, *PIK3CA*, *ROS1*, *TP53*, *NTRK1*, *NTRK2*, *NTRK3*, *IRF2BP2*, *SQSTM1*, *TPM3*, *TRIM24*, *AKAP13*, *ETV6*, *EML4*, *CD74*, *KIF5B*).

2.2.5 Биоформатический анализ данных высокопроизводительного секвенирования

В качестве основы для интерпретации данных, полученных методом Next Generation Sequencing (NGS) были взяты существующие протоколы по интерпретации результатов секвенирования нового поколения ACMG и CAP, которые были переработаны и расширены группой ведущих специалистов в области генетики и биоинформатики РФ.

Таблица 2.6 – Базы данных, используемые для интерпретации данных

Популяционные генетические базы данных	Описание
Exome Aggregation Consortium http://exac.broadinstitute.org/	База данных вариантов, найденных при проведении экзомного секвенирования у 61,486 неродственных индивидуумов, являющихся участниками различных болезнь-специфичных и популяционных генетических исследований. Детские заболевания и связанные с ними лица были исключены из выборки.
Exome Variant Server http://evs.gs.washington.edu/EVS/	База данных вариантов, найденных во время экзомного секвенирования нескольких крупных когорт лиц европейского и афро-американского происхождения.
1000 Genomes Project http://browser.1000genomes.org/index.html	База данных вариантов, найденных во время геномного и таргетного секвенирования с низким и высоким покрытием среди 26-и популяций. Обеспечивает большее разнообразия по сравнению Exome Variant Server, но

Окончание таблицы 2.6

1000 Genomes Project http://browser.1000genomes.org/index.html	содержит данные более низкого качества, а некоторые когорты содержат данные о родственных индивидуумах.
Фенотипические базы данных	Описание
OMIM http://www.omim.org/	База данных генов человека и генетических состояний, которая содержит репрезентативную выборку вариантов, ассоциированных с заболеваниями.
Human Gene Mutation Database http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php	База данных аннотированных вариантов, опубликованных в литературе. Доступ к основной части контента требует оплаты.
ClinVar http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/	База данных утверждений о клинической значимости и фенотипической взаимосвязи вариантов. Содержит данные низкого качества, к использованию не рекомендуется.
Специфичные базы данных (локус/ болезнь/ этно/ другие)	Описание
Human Genome Variation Society http://www.hgvs.org/dblist/dblist.html	Сайт общества по изучению вариаций генома человека создало список из тысяч баз данных, которые предоставляют варианты аннотации на конкретные разновидности человеческой вариации.
Leiden Open Variation Database http://www.lovd.nl	Большая доля баз данных представлена системе Leiden Open Variation Database system.
Кодирующая последовательность	Описание
NCBI Genome http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome	Ресурс полногеномных референсных последовательностей

Все обнаруженные варианты необходимо классифицировать по патогенности. Оценка патогенности выявленных вариантов включает изучение медицинской и научной литературы и баз данных. В качестве основных баз данных использовались варианты, представленные в таблице 2.6.

Варианты, являющиеся причиной развития интересующего фенотипа и подходящие под тип наследования, классифицируются как патогенные. Для интерпретации остальных вариантов предлагается использовать два набора критериев: первый для классификации вероятно патогенных вариантов, второй для классификации вероятно доброкачественных вариантов. Каждый патогенный критерий может оцениваться несколькими категориями: очень сильный (PVS1), сильный (PS1-4), средней тяжести (PM1-6) или вспомогательный (PP1-5).

Каждый доброкачественный критерий классифицируется как: очень сильный (независимый) (BA1), сильный (BS1-4) или вспомогательный (BP1-6). Нумерация признаков внутри категории не дает никаких усилений варианта, важность представляет только наименование, нумерация нужна для упрощения их использования. Классификация патогенности тех или иных критериев при анализе NGS представлены в таблице 2.7.

Таблица 2.7 – Критерии патогенности

Патогенный (P)		
Категория	Обозначение	Описание Критерия
«Очень сильный» (very strong-PVS)	PVS1	PVS1 LOF-варианты - варианты, приводящие к прекращению синтеза белка (нонсенс-мутации; мутации со сдвигом рамки считывания; изменения канонических ± 1 или ± 2 нуклеотидов сайта сплайсинга; варианты, приводящие к исчезновению стоп-кодона; делеции/дупликации одного или нескольких экзонов) в генах, где данный тип варианта является известной причиной развития заболевания.

Продолжение таблицы 2.7

«Сильный» (strong-PS):	PS1	PS1 вариант, приводящий к замене на ту же аминокислоту в том же положении, которая была описана ранее как патогенная для этого заболевания. Например: если описана замена G>C, приводящая к замене Val>Leu, то замена G>T, приводящая к той же аминокислотной замене, описывается признаком PS1.
	PS2	De novo вариант: у обоих родителей пациента вариант отсутствует. Только подтверждения отцовства недостаточно. Донорство яйцеклеток, суррогатное материнство, ошибки при подсадке эмбриона и так далее, могут привести к неверному определению материнства.
«Сильный» (strong-PS):	PS3	Функциональные исследования (in vitro или in vivo), подтверждают патогенный эффект варианта на ген или генный продукт. Функциональные исследования должны быть валидируемыми, воспроизводимыми и проведенными лабораториями, имеющими хорошую репутацию.
	PS4	Распространенность варианта у больных индивидуумов значительно выше чем у контрольной группы. Отношение шансов (OR), полученное из исследований случай-контроль > 5.0.
«Средней тяжести» (moderate-PM)	PM1	Вариант расположен в «горячей» точке и/или важных и хорошо исследованных функциональных доменах (например, активный сайт фермента), в которых нет доброкачественных изменений.
Средней тяжести» (moderate-PM)	PM2	Вариант отсутствует в контрольной выборке (или встречается с крайне низкой частотой: для АД заболеваний частота не должна превышать

Продолжение таблицы 2.7

	PM2	0,01%, для AP заболеваний - 0,5%), а также отсутствует в открытых базах данных (ESP, 1KG или EXAC).
	PM3	Вариант, находящийся в транс-положении с описанным патогенным вариантом при рецессивных заболеваниях.
	PM4	Варианты, приведшие к синтезу белка с измененной длиной (инсерции/делеции в рамках считывания в неповторяющихся регионах или потеря стоп-кодона (замена на аминокислоту)).
	PM5	Новые миссенс варианты в аминокислотном остатке, установлены как патогенные.
«Вспомогательная» (supporting-PP)	PP1	Вариант в гене, для которого точно установлена связь с болезнью, с сегрегацией с болезнью у нескольких пораженных членов семьи.
	PP2	Миссенс вариант в гене, который имеет низкий уровень доброкачественных миссенс изменений и в котором миссенс варианты являются обычным механизмом возникновения заболевания.
	PP3	Результаты не менее трех программ предсказания подтверждают патогенное воздействие на ген или генный продукт.
	PP4	Фенотип пациента или/и семейная история высоко специфичны для заболевания с данной генетической этиологией.
	PP5	Источники с хорошей репутацией показали патогенность варианта, но независимая оценка не проводилась.

Продолжение таблицы 2.7

Доброкачественный (В)		
Категория	Обозначение	Описание Критерия
«Сильный» (strong – BS)	BS1	Частота аллеля больше, чем ожидаемая для заболевания (для АД заболеваний частота аллеля не должна превышать 0,01%, для АР заболеваний - 0,5%).
	BS2	Если вариант встретился у здорового взрослого человека при заболеваниях с полной пенетрантностью, манифестирующих в детском возрасте: 1) в гомозиготном состоянии с рецессивным типом наследования; 2) в гетерозиготном состоянии с доминантным типом наследования или 3) в гемизиготном состоянии при Х-сцепленном типе наследования.
«Сильный» (strong – BS)	BS3	Функциональные исследования (<i>in vitro</i> или <i>in vivo</i>), подтверждают отсутствие патогенного эффекта на ген или генный продукт.
	BS4	Вариант в гене, для которого точно установлено отсутствие сегрегации с болезнью у пораженных членов семьи.
«Вспомогательная» (support – BP)	BP1	Миссенс вариант в гене, где известной причиной заболевания являются мутации, приводящие к изменению длинны белка.
	BP2	При заболеваниях с полной пенетрантностью, если выявлена одна патогенная мутация, соответствующая фенотипу, а неописанный вариант находится с ней в транс- положении при доминантном типе наследования или в цис-положении при любом типе наследования.
	BP3	Делеции/инсерции с сохранением рамки считывания, если не проводилось функциональное исследование.

Окончание таблицы 2.7

«Вспомогательная» (support – BP)	BP4	Результаты не менее трех программ предсказания подтверждают отсутствие воздействия варианта на ген или генный продукт.
	BP5	Источники с хорошей репутацией показали отсутствие патогенности варианта, но независимая оценка не проводилась.
	BP6	Синонимичный (silent) вариант, для которого алгоритмы предсказания сплайсинга показывают отсутствие влияния на консенсусную последовательность сплайс-сайтов (отсутствует создание нового сайта-сплайсинга) и нуклеотид не является высококонсервативным в эволюции.

3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1 Генетические варианты, обнаруженные у пациентов с НМРЛ

Результаты таргетного секвенирования материала пациентов с НМРЛ и биоинформатического анализа представлены в таблице 3.1.

Таблица 3.1 – Результаты таргетного секвенирования

№	Пациент	Клиническая значимость:		
		Высокая I-A/I-B	Потенциальная II-C/II-D	Неизвестная
1	ШВТ-12	<i>EGFR</i> rs121913440	Не обнаружено	<i>EGFR</i> rs559717059
		<i>TP 53</i> rs28934573		
2	СИИ-14	<i>EGFR</i> rs121434568	Не обнаружено	Не обнаружено
3	АЛВ-13	<i>EGFR</i> rs121434568	Не обнаружено	<i>KRAS</i> g.25245309 T>C, exon-2
4	БТС-4	<i>EGFR</i> rs121913436	<i>EGFR</i> rs121913229	Не обнаружено
5	ПЛВ-6	<i>EGFR</i> , g.55181323_55181328 dup, exon-20	Не обнаружено	Не обнаружено
6	ЧНН-10	<i>EGFR</i> rs121913436 (Согласно онкоскопу)	<i>EGFR</i> rs121913229	Не обнаружено
		<i>EGFR</i> rs121434568		
		<i>TP53</i> rs55863639		
7	АТА-11	<i>EGFR</i> rs121434568	Не обнаружено	<i>TP53</i> rs587781642
8	ВВП-5	<i>KRAS</i> rs121913530	Не обнаружено	<i>PIK3CA</i> , g.179198939 dup, exon-2
9	СВА-3	<i>KRAS</i> rs121913530	Не обнаружено	Не обнаружено
10	МВН-7	<i>ALK(20)-EML4(13)</i>	Не обнаружено	Не обнаружено
11	ПОМ-2	<i>ALK(20)-EML4(13)</i>	Не обнаружено	Не обнаружено
12	ТАК-9	Не обнаружено	Не обнаружено	Не обнаружено

Биоинформатический анализ данных NGS проводился согласно протоколу ACMG (см. «Глава II. Материалы и методы»). Все генетические

варианты были классифицированы на четыре группы клинической значимости: высокая, потенциальная, неизвестная и доброкачественная.

По данным биоинформатического анализа, представленного в таблице 3.1 у 92 % пациентов (11 из 12) обнаружены варианты высокой клинической значимости. Мутации высокой клинической значимости обнаружены в генах *EGFR* (8 из 12, 66 %), *KRAS* (1 из 12, 8 %), fusion gene *ALK-EML4* (2 из 12, 16 %). У 8 % (1 из 12) пациентов варианты высокой клинической значимости не обнаружены.

Таблица 3.2 – Характеристика мутаций высокой клинической значимости

№	Ген	db SNP ID	Хромосома, позиция	Положение в кодирующей части генома	Аминокислотное положение
1	<i>EGFR</i>	rs121913440	7: 55174776_55174793	c.2239_2256del	p.Leu747_Ser752del
2	<i>EGFR</i>	rs121434568	7: 55191822	c.2573T>G	p.Leu858Arg
3	<i>EGFR</i>	rs121913436	7: 55174776_55174784	c.2239_2247del	P.Leu747_Glu749del
4	<i>EGFR</i>	-	7: 55181323_55181328	c.2314_2319dup	p.Pro772_His773dup
5	<i>EGFR</i>	rs121913436	g.55191822	c.2573T>G	p.Leu858Arg
6	<i>KRAS</i>	rs121913530	12: 25245351	c.34G>T	p.Gly12Cys
7	<i>TP53</i>	rs28934573	17: 7674241	c.722C>T	p.Ser241Phe
8	<i>TP53</i>	rs55863639	17: 7675994	c.375G>C	p.Thr125
9	<i>ALK(20)-EML4(13)</i>	-	<i>ALK</i> 20-ый экзон / <i>EML4</i> 13-ый экзон	-	-

Варианты потенциальной клинической значимости обнаружены в гене *EGFR* у одного пациента (2 из 12, 16 %). Мутации неизвестной клинической

значимости обнаружены в генах *EGFR*, *KRAS*, *TP53* и *PIK3CA* у четырёх пациентов (4 из 12, 33 %).

Генные варианты высокой клинической значимости наиболее часто встречались в гене *EGFR*. В таблице 3.2 представлена характеристика мутаций высокой клинической значимости.

Обнаружено пять вариантов мутаций высокой клинической значимости у пациентов с НМРЛ в гене *EGFR*. Мутации в гене *EGFR* представлены делециями со сдвигом рамки считывания (rs121913440 и rs121913436), миссенс вариантами (rs121434568 и rs121913436) и новым вариантом гена *EGFR* (chr7: 55181323_ 55181328), отсутствующим в db Pubmed SNP. Данный вариант приводит к дупликации с.2314_2319dup и замене аминокислоты пролина на гистидин p.Pro772_His773dup и согласно базе данных OncoScore является вариантом высокой клинической значимости.

Также обнаружена патогенная мутация в гене *KRAS* (rs121913530) в положении с.34G>T, которая приводит к замене аминокислоты глицин на цистеин p.Gly12Cys. А также, обнаружена миссенс мутация высокой клинической значимости в гене *TP53* (rs28934573) в положении с.722C>T и приводящая к замене аминокислоты серин на фенилаланин p.Ser241Phe [57, 58].

Найдена патогенная синонимичная мутация в гене *TP53* (rs55863639) с заменой в положении с.375G>C, не приводящая к замене аминокислоты [59].

Обнаружена патогенная фьюжен мутация в результате слияния двух генов *ALK/EML4* в положении *ALK* 20-ый экзон и *EML4* 13-ый экзон.

В таблице 3.3 представлена характеристика мутации потенциальной клинической значимости, обнаруженной у пациента с НМРЛ.

Таблица 3.3 – Характеристика варианта потенц. клинической значимости

№	Ген	db SNP ID	Хромосома, позиция	Положение в кодирующей части генома	Аминокислотное положение	Частота
1	<i>EGFR</i>	rs121913229	7: 55174785	с.2248G>C	p.Ala750Pro	-

Обнаружен один миссенс вариант потенциальной клинической значимости в гене *EGFR* (rs121913229) по положению с.2248G>C, где аминокислота аланин заменяется на пролин p.Ala750Pro. В таблице 3.4 представлена характеристика мутаций неизвестной клинической значимости.

Таблица 3.4 – Характеристика мутаций неизвестной клинической значимости

№	Ген	db SNP ID	Хромосома, позиция	Положение в кодирующей части генома	Аминокислотное положение	Частота
1	<i>EGFR</i>	rs559717059	7: 55174795	с.2258C>A	p.Pro753Gln	T = 0.000008 (TOPMED)
2	<i>KRAS</i>	-	12: 25245309	с.76A>G	p.Asn26Asp	-
3	<i>TP53</i>	rs587781642	17: 7676032	с.337T>G	p.Phe113Val	-
4	<i>PIK3CA</i>	-	3: 179198939	с.114Tdup	p.Glu39Ter	-

Обнаружена миссенс мутация в гене *EGFR* (rs559717059) в положении с.2258C>A, где аминокислота пролин заменяется на глутамин. Обнаружен миссенс вариант в гене *KRAS* (chr12: 25245309) по положению с.76A>G, где аминокислота аспарагин заменяется на аспарагиновую кислоту.

Обнаружен миссенс вариант в гене *TP53* (rs587781642) по положению с.337T>G, где аминокислота фенилаланин заменяется на валин. Впервые обнаруженный нами вариант в гене *PIK3CA* (3: 179198939), отсутствующий в базах данных, по положению с.114Tdup с дупликацией тимина. Приводит к сдвигу рамки считывания и образованию терминирующего кодона UGA на матричной РНК. В таблице 3.5 представлена характеристика доброкачественных/вероятно доброкачественных мутаций.

Таблица 3.5 – Характеристика доброкачественных/вероятно доброкачественных мутаций

№	Ген	db SNP ID	Хромосома, позиция	Положение в кодирующей части генома	Аминокислотное положение	Частота
1	<i>EGFR</i>	rs2072454	7: 55146655	c.474C>T	p.Asn158=	T = 0.29418 TOPMED
2	<i>EGFR</i>	rs1050171	7:55181370	c.2361G>A	p.Gln787=	A=0.4327 1000G
3	<i>EGFR</i>	rs1140475	7:55198724	c.2709T>C	p.Thr903=	T=0.100937 TOPMED
4	<i>EGFR</i>	rs2227983	7:55161562	c.1562G>A	p.Arg521Lys	A=0.223291 TOPMED
5	<i>EGFR</i>	rs2227984	7:55171181	c.1887T>A	p.Thr629=	A=0.344781, TOPMED
6	<i>EGFR</i>	rs17336800	7:55161509	c.1509C>T	p.Gly503=	T=0.007488 TOPMED
7	<i>EGFR</i>	rs2293347	7:55201223	c.2982C>T	p.Asp994=	T=0.091031 TOPMED
8	<i>ERBB2</i>	rs1136201	17:39723335	c.1963A>G	p.Ile655Val	G=0.155710 TOPMED
9	<i>KRAS</i>	rs1137282	12:25209843	c.519T>C	p.Asp173=	G=0.195550 TOPMED
10	<i>TP53</i>	rs1042522	17:7676154	c.215C>G	p.Pro72Arg	G=0.382621 TOPMED
11	<i>ALK</i>	rs3795850	2:29222592	c.3375C>A	p.Gly1125=	-

Большая часть доброкачественных мутаций обнаружена в гене *EGFR* (7 из 11), из которых большинство синонимичные и не представляют интереса для дальнейшего исследования. Миссенс мутации в генах *EGFR*, *ERBB2* и *TP53* согласно базам данных не изменяют структуру транслируемого пептида и не меняют его функций. Также обнаружены доброкачественные мутации в генах *ERBB2*, *KRAS*, *TP53* и *ALK*.

В работе использован набор фирмы OncoScore для определения наличия или отсутствия повреждений в геномной ДНК или тотальной РНК у пациентов с НМРЛ в генах: *ALK*, *BRAF*, *EGFR*, *ERBB2*, *KRAS*, *MET*, *NRAS*, *PIK3CA*, *ROS1*, *NTRK1*, *NTRK2*, *NTRK3*, *IRF2BP2*, *SQSTM1*, *TPM3*, *TRIM24*, *AKAP13*, *ETV6*, *EML4*, *CD74*, *KIF5B* и *TP53*. Нами не обнаружено генетических вариантов в генах: *BRAF*, *MET*, *NRAS*, *ROS1*, *NTRK1*, *NTRK2*,

NTRK3, IRF2BP2, SQSTM1, TPM3 , TRIM24 , AKAP13, ETV6, EML4 , CD74, KIF5B.

Таким образом, при проведении NGS нами обнаружены мутации высокой клинической значимости генов *EGFR* (chr7: 55181323_ 55181328), *KRAS* (rs121913530), *TP53*(rs55863639), которые широко не тестируются на практике с применением ПЦР-тест систем и не включены в алгоритмы тестирования пациентов НМРЛ с целью определения дальнейшего лечения. Также нами обнаружен новый вариант гена *PIK3CA* (chr3: 179198939) и редкие мутации генов *EGFR* (rs559717059), *KRAS* (chr12: 25245309) и *TP53* (chr17: 7676032), клиническая значимость которых не установлена, что требует их дальнейшего изучения в патогенезе НМРЛ.

4 ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

4.1 Мутации гена рецептора эпидермального фактора роста

В результате биоинформатического анализа полученных данных высокопроизводительного секвенирования нами обнаружены мутации гена *EGFR* у 58 % (7 из 12) пациентов с НМРЛ.

Рецептор эпидермального фактора роста (*EGFR*), член семейства HER, который представляет собой трансмембранный белок. Внеклеточный домен *EGFR* связывается со своими лигандами, такими как эпидермальный фактор роста (EGF) и трансформирующий фактор роста-альфа (TGF- α) и подвергается аутофосфорилированию по ключевым остаткам тирозина, таким образом, активируя сигнальный каскад внутри клетки, регулирующий деление клеток, их рост и развитие (пролиферация) [60, 61].

Сверхэкспрессия гена *EGFR*, вызванная различными драйверными мутациями, запускает сигнальный каскад через *RAS-RAF-MEK-MAPK*- и *P13K-AKT*-путь, приводя к стимуляции ангиогенеза и метастазирования, повышению в опухолевых клетках пролиферации [62].

Активные исследования сигнального пути *EGFR* в онкогенезе НМРЛ послужило стимулом к созданию препаратов, способных воздействовать на механизм сверхэкспрессии гена в результате различных драйверных мутаций, данные препараты получили название «Ингибиторы *EGFR* (тирозинкиназ)»: гефитиниб (иресса), эрлотиниб, афатиниб, осимертиниб, рамуцирумаб и бевацизумаб [63].

На данный момент выявлены основные (часто встречающиеся) мутации гена *EGFR*, определяющие чувствительность опухолевых клеток к ингибиторам тирозинкиназ, например: p.L858R (rs121434568), p.G719X (NP_005219.2), p.L861Q (COSV51766344), p.S768I (COSV51768106). Другой пул драйверных мутаций определяет устойчивость к ингибиторам тирозинкиназ, например: p.Ins20 (COSV51810066), p.T790M (rs121434569).

Мутация p.T790M (rs121434569) в гене *EGFR* является наиболее частой причиной возникновения резистентности на фоне проведения терапии ингибиторами тирозинкиназ (гитфетиниб, эралтиниб). В случае обнаружении мутации p.T790M (rs121434569) показаны ингибиторы тирозинкиназ следующего поколения, препарат осимертиниб [64, 65].

Таким образом в нашем исследовании у 58 % пациентов обнаружены патогенные варианты высокой клинической значимости гена *EGFR*, согласно клиническим рекомендациям данным пациентам показано лечение ингибиторами тирозинкиназ, такими как: гекфитиниб (иресса), эрлотиниб и другие. Однако, при проведении NGS нами установлено, что три пациента из двенадцати имели две патогенные мутации гена *EGFR*, которые также сочетались с другими вариантами клинической значимости гена *EGFR*, влияние которых не учитывается при назначении ингибиторов тирозинкиназ.

4.1.1 Сочетанные мутации гена *EGFR* при НМРЛ

Так, например, у одного из пациентов (ШБТ-12) женского пола в возрасте 80 лет с диагнозом аденокарцинома IV стадия (T4N1M1a) обнаружены две мутации: высокой (rs121913440) и потенциальной (rs559717059) клинической значимости гена *EGFR*. Также у пациента (БТС-4) женского пола в возрасте 69 лет с диагнозом аденокарцинома II стадии (T2N0M0) обнаружены две мутации высокой (rs121913440) и потенциальной (rs559717059) клинической значимости гена *EGFR*.

Потенциальный вариант (вероятно-патогенный вариант согласно базе данных OncoScore) гена *EGFR* rs559717059 встречается во всех популяциях, частота встречаемости согласно gnomAD составляет 0,007 %. Мутации rs559717059 присвоен идентификатор (SNP ID), но данный вариант крайне редко упоминается в базах данных ClinVar, COSMIC и db Pubmed SNP и имеет статус неопределённой значимости. Миссенс мутация rs559717059 затрагивает домен TyrKc (Tyrosine kinase, catalytic domain), мутации в домене

TyrKc EGFR коррелируют с ответом на лечение и выживаемостью у пациентов с НМРЛ, получавших гефитиниб, и могут быть использованы в качестве прогностического фактора [66].

Таблица 4.1 – Описание варианта в гене *EGFR* (rs559717059)

Признак	Критерий	Комментарий
PVS1	-	Мутация не затрагивает сплайс-донор сайт
PS1	Strong	Аминокислота пролин заменяется на глутамин
PS2	-	Данные на родителей пациента отсутствуют
PS3	-	Исследования, говорящие о патогенности мутации отсутствуют во всех базах данных
PS4	-	Не обнаружено
PM1	Moderate	Вариант расположен в функциональных доменах согласно базе данных Pscan St. Jude
PM2	Moderate	Данный вариант не встречается в базах данных ESP, 1KG, EXAC
PM3	-	Не обнаружено
PM4	-	Не влияет на длину синтезируемого белка
PM5	-	Не обнаружено
PP1	-	Не обнаружено
PP2	-	Не обнаружено
PP3	Support	CADD 25,1 (>23) вероятно патогенный вариант согласно программе https://cadd.gs.washington.edu
PP4	-	Не обнаружено
PP5	-	Данный вариант не встречается в базах данных ESP, 1KG, EXAC, информация отсутствует

Данная мутация нами дополнительно классифицирована согласно критериям ACMG и может быть рассмотрена как патогенная (вероятно-патогенная), представлено в таблице 4.1.

Также у пациента (ЧНН-10) женского пола 66 лет с диагнозом аденокарциномы лёгкого III стадии (T3N2M0) нами обнаружено две мутации высокой клинической значимости (rs121913436 и rs121434568) и одна мутация потенциальной клинической значимости (rs121913229) гена EGFR. Обнаружение сразу трёх мутаций вызывает интерес, поскольку встречается крайне редко и в большинстве своём наблюдается в виде часто встречаемой двойной мутации T790M и L858R. Мутация rs121913229 согласно базам данных ClinVar, COSMIC и db Pubmed SNP имеет статус вероятно-

патогенной [67]. Данный вариант находится в домене Furin-like (фуриноподобный домен), который отвечает за механизм передачи сигнала рецепторными тирозинкиназами и агрегацию рецепторов. Мутации в фуриноподобных доменах являются причиной большинства однонуклеотидных мутаций и усиления экспрессии гена *EGFR*. Данные об эффективности назначения ингибиторов тирозинкиназ при наличии мутации противоречивы [68].

Таким образом, методом NGS у пациентов нами обнаружено несколько патогенных вариантов гена *EGFR*. Согласно литературным данным наличие двух мутаций и более гена *EGFR* встречается редко [69]. Данная находка подтверждает теорию внутриопухолевой гетерогенности НМРЛ [70]. Феномен внутри опухолевой гетерогенности достаточно широко изучен и описан, вероятно, можно предположить о наличии в опухоли нескольких пулов клеток с различными генетическими повреждениями, и как следствие противоречивых результатов лечения при назначении ингибиторов тирозинкиназ.

4.1.2 Новый вариант гена рецептора эпидермального фактора роста

У пациента (ПЛВ-6) женского пола 53 лет с диагнозом аденокарцинома лёгкого I стадии (T1bN0M0) обнаружена новая (g.55181323_55181328 dup) in-frame мутация гена *EGFR* высокой клинической значимости по данным OncoScore.

Данная мутация приводит к дупликации двух кодонов (-CCCCAC-) затрагивая домены ТyгКс и РТКс_ЕGFR гена *EGFR*. В данном положении также описана патогенная мутация гена *EGFR* в кодонах N771_H773dup (NM_005228), где происходит дупликация трёх кодонов и вовлеченная в патогенез НМРЛ (аденокарцинома лёгкого).

Согласно данным литературы, мутации, нарушающие киназные домены ТyгКс и РТКс_ЕGFR приводят к сверхэкспрессии рецептора гена

EGFR и связаны с прогрессированием аденокарциномы лёгкого (Рисунок 4.1 и Таблица 4.2).

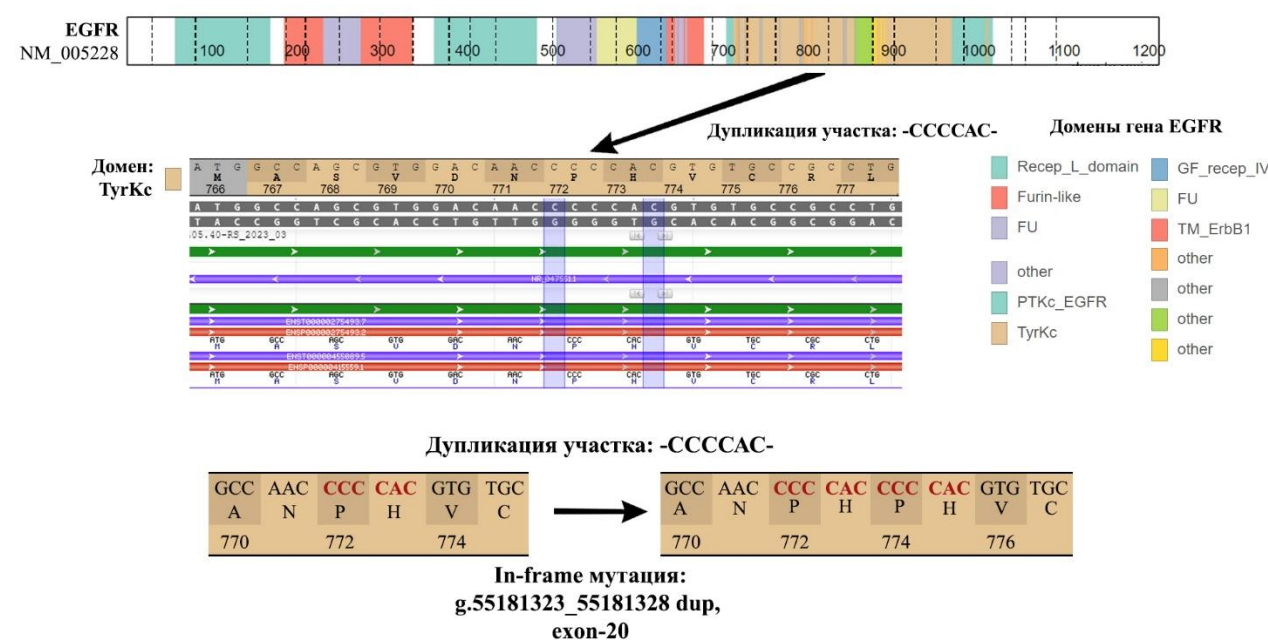


Рисунок 4.1 – Новый вариант в гене EGFR (дупликация)

В гене EGFR по положению 55181323_55181328 происходит дупликация участка -CCCCAC-, в результате происходит нарушение в домене ТyeKc, связанный с доменом PTKc_EGFR приводят к сверхэкспрессии в гене EGFR и связана с прогрессированием аденокарциномы лёгкого

Таким образом нами впервые обнаружена новая вероятно-патогенная in-frame мутация гена *EGFR* (g.55181323_55181328). Пациенту следует пройти курс таргетной терапии, состоящей из низкомолекулярных ингибиторов тирозинкиназы, нацеленных на блокировку *EGFR* рецепторов, такие как гефитиниб (Iressa) и эрлотиниб (Tarceva), которые уже используются для лечения НМРЛ [71].

Таблица 4.2 – Новый вариант в гене *EGFR* (дупликация) согласно критериям ACMG

Признак	Критерий	Комментарий
PVS1	Very Strong	Мутация не затрагивает два важных домена: TyeKc и PTKc_EGFR
PS1	Strong	Приводит к сдвигу рамки считывания
PS2	-	Данные на родителей пациента отсутствуют
PS3	-	Исследования, говорящие о патогенности мутации отсутствуют во всех базах данных
PS4	-	Не обнаружено
PM1	Moderate	Вариант расположен в функциональных доменах согласно базе данных Pscan St. Jude
PM2	Moderate	Данный вариант не встречается в базах данных ESP, 1KG, EXAC
PM3	Moderate	Не обнаружено
PM4	Moderate	Влияет на длину синтезируемого белка
PM5	-	Не обнаружено
PP1	-	Не обнаружено
PP2	-	Не обнаружено
PP3	Support	CADD 28,1 (>23) вероятно патогенный вариант согласно программе https://cadd.gs.washington.edu
PP4	-	Не обнаружено
PP5	-	Данный вариант не встречается в базах данных ESP, 1KG, EXAC, информация отсутствует

Таким образом нами впервые обнаружена новая вероятно-патогенная in-frame мутация гена *EGFR* (g.55181323_55181328).

Однако, так как данная мутация расположена в 20-ом экзоне, где описаны мутации, приводящие к резистентности ингибиторов тирозинкиназ (T790M и другие), требуется дальнейшие исследования для изучения эффективности назначения ингибиторов тирозинкиназ при наличии данной мутации в опухоли. Мутация обнаружена впервые при использовании метода высокопроизводительного секвенирования и включение её в стандарты тестирования позволит пациенту получить правильное лечение.

4.1.3 Сочетание патогенных мутаций в гене *EGFR* с патогенными мутациями в других генах (*KRAS* и *TP53*)

В исследуемой выборке (N12) у двух пациентов патогенные мутации гена *EGFR* сочетались с патогенными мутациями гена *TP53* (17 %, 2 из 12) и патогенные мутации гена *EGFR* сочетались с мутациями неизвестной клинической значимости генов *TP53* и *KRAS* (17 %, 2 из 12).

У пациента (АЛВ-13) женского пола 47 лет с диагнозом аденокарцинома лёгкого II стадии (T1aN1M0) обнаружена патогенная мутация в гене *EGFR* (rs121434568) и новая мутация гена *KRAS* неизвестного значения (g.25245309). В данном положении гена *KRAS* описана rs с неизвестным клиническим значением.

В работе Ito, M., 2023 г описана низкая общая безрецидивная выживаемость в группе пациентов, опухоль которых несёт патогенные мутации генов *EGFR* и *KRAS*, по сравнению с группой пациент только с мутацией гена *EGFR* [72, 73].

Новая миссенс мутация в гене *KRAS* (chr12: 25245309) по положению c.76A>G, где аминокислота аспарагин заменяется на аспарагиновую кислоту находится в домене HNK_Ras_like (N-Ras and K-Ras4A/4B). Мутация в данном домене приводит к нарушению работы киназ N-Ras и K-Ras4A/4B, в результате чего происходит активация передачи сигналов внутрь клетки, инициации пролиферации и инициации роста опухоли. [74]. Миссенс вариант представлен на рисунке 2.

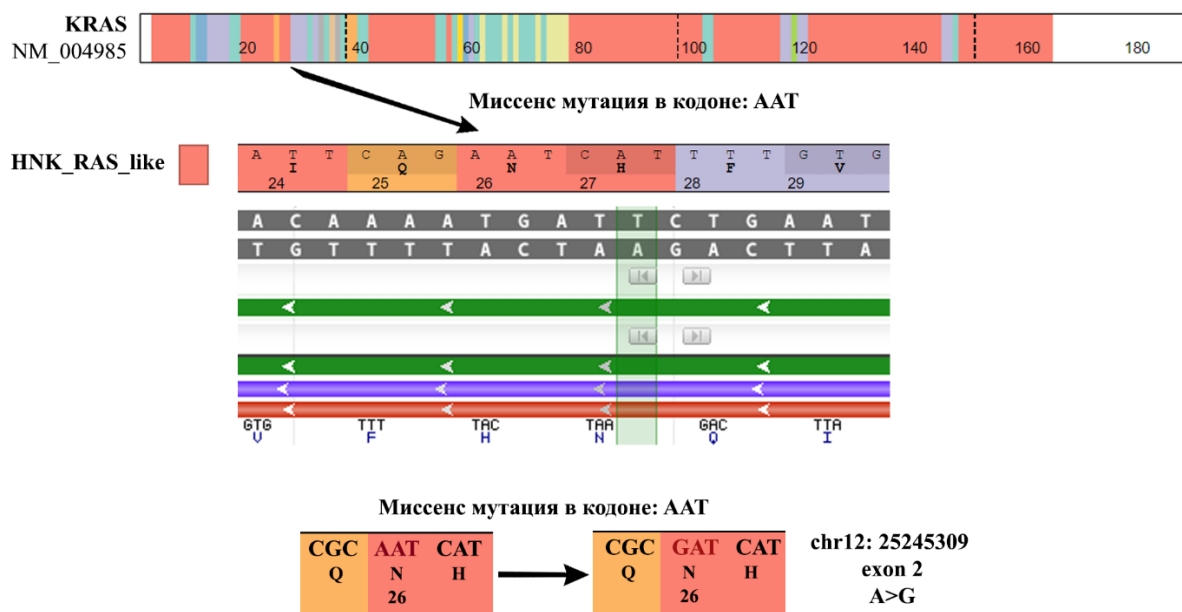


Рисунок 4.2 – Мутация в гене *KRAS* g. 25245309

В гене *KRAS* по положению chr12: 25245309 происходит миссенс замена A>G, в результате происходит нарушение в ключевом домене HNK_Ras_like (N-Ras and K-Ras4A/4B), что приводит к сверхэкспрессии в гене *KRAS*

У пациента (АТА-10) женского пола 66 лет с диагнозом аденокарциномы лёгкого III стадии (T3N2M0) с наличием патогенных мутаций в гене *EGFR* (rs121913436, rs121434568 и rs121913229) обнаружена также патогенная (синонимичная) мутация в гене *TP53* (rs55863639). Синонимичная мутация в гене *TP53* (rs55863639) с заменой в положении с.375G>C, аминокислота триптофан. Патогенная мутация в гене *TP53* rs55863639 затрагивает сплайс-донор сайт (Рисунок 4.3 и Таблица 4.3).

Таблица 4.3 – Описание мутации у пациента ЧНН-10 в гене *TP53* согласно ACMG

Признак	Критерий	Комментарий
PVS1	Very Strong	Мутация затрагивает сплайс-донор сайт
PS1	-	Замена нуклеотида, не приводит к изменению синтеза белка
PS2	-	Данные на родителей пациента отсутствуют
PS3	Strong	Исследования, говорящие о патогенности мутации в данном положении, * ¹
PS4	-	Не обнаружено
PM1	Moderate	Вариант расположен в функциональных доменах согласно базе данных Pectan St. Jude
PM2	-	Данный вариант встречается в базах данных ESP, 1KG, EXAC
PM3	-	Не обнаружено
PM4	-	Не влияет на длину синтезируемого белка
PM5	Moderate	C>A / C>G / C>T
PP1	-	Не обнаружено
PP2	-	Не обнаружено
PP3	Support	CADD 24,9 (>23) вероятно патогенный вариант согласно программе https://cadd.gs.washington.edu
		CAPICE 1.78 (>1) вероятно патогенный вариант согласно программе https://capice.molgeniscloud.org/
PP4	-	Не обнаружено
PP5	Support	Высокая вероятность патогенности при замене на другой нуклеотид, поскольку затрагивает сплайс-донор сайт* ¹

*¹ PubMed: 10864200 , 20501846 , 21059199 , 33011440 , 34961499

TP53 представляет собой продукт гена-супрессора опухоли. Мутации в *TP53* или отсутствие его экспрессии связаны с развитием различных злокачественных заболеваний. *TP53* активируется повреждением ДНК и действует как регулятор экспрессии генов, который в конечном итоге блокирует продвижение по клеточному циклу [75].

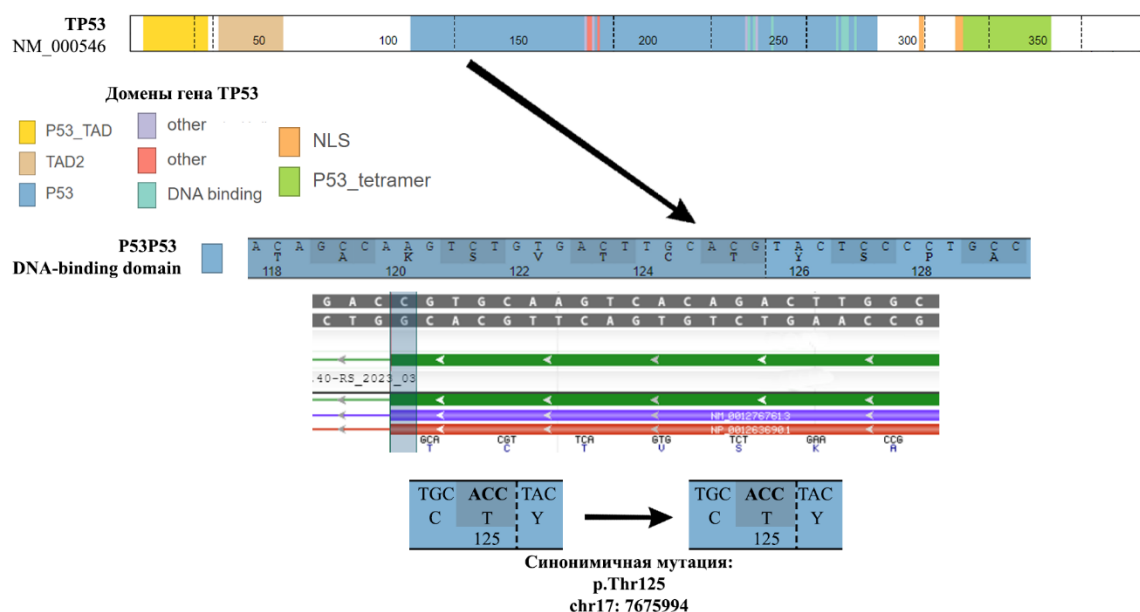


Рисунок 4.3 – Мутация в гене *TP53* с нарушением сплайс-донор сайта

Замена гуанина на цитозин с.375G>C в гене *TP53* происходит в последних двух нуклеотидах сплайс-донор сайта в домене P53 (DNA-binding domain). Мутация синонимична и не приводит к замене аминокислоты триптофан.

Также, у пациента (ШВТ-12) женского пола 80 лет с диагнозом аденокарцинома лёгкого IV стадии (T4N1M1a) помимо двух мутаций в гене *EGFR* (rs121913440 и rs559717059), описанных ранее, обнаружен вариант высокой клинической значимости в гене *TP53* (rs28934573). Обнаруженный патогенный вариант гена *TP53* (rs28934573) по положению chr17:7674241 располагается в ДНК-связывающем домене 7-го экзона, происходит замена с.722C>T нарушая функции четырёх белков: S241F, S109F, S202F и S82F. Анализ *in silico* предсказывает данное изменение как патогенное и приводящее к развитию опухоли [76].

У пациента (АТА-11) женского пола 80 лет с диагнозом аденокарцинома IV стадии (T2bN2M1a) помимо патогенной мутации в гене *EGFR* (rs121434568) обнаружен неизвестный вариант в гене *TP53* (rs587781642), локализованный в экзоне 3 гена *TP53*, возникает в результате

замены Т на G в положении 337 нуклеотида. rs587781642 крайне редко упоминается в базах данных ClinVar, COSMIC и db Pubmed SNP [77]. Данная мутация классифицирована нами согласно протоколу ACMG, таблица 4.4.

Таблица 4.4 – Описание мутации у пациента АТА-11 в гене *TP53* согласно ACMG

Признак	Критерий	Комментарий
PVS1	Very Strong	Не затрагивает сайты сплайсинга, не приводит к сдвигу рамки считывания и образования стоп-кодона
PS1	Strong	Замена нуклеотида, приводит к изменению синтеза белка
PS2	-	Данные на родителей пациента отсутствуют
PS3	Strong	Исследования, говорящие о патогенности мутации в данном положении
PS4	-	Не обнаружено
PM1	Moderate	Вариант расположен в функциональных доменах согласно базе данных Pectan St. Jude
PM2	Moderate	Данный вариант встречается в базах данных ESP, 1KG, EXAC
PM3	-	Не обнаружено
PM4	-	Не влияет на длину синтезируемого белка
PM5	Moderate	A>C / A>T
PP1	-	Не обнаружено
PP2	-	Не обнаружено
PP3	Support	CADD 28.1 (>23) вероятно патогенный вариант согласно программе https://cadd.gs.washington.edu
PP4	-	Не обнаружено
PP5	Support	Высокая вероятность патогенности при замене на другой нуклеотид, поскольку затрагивает

Основываясь на подтверждающих доказательствах, патогенный вариант в гене *TP53* (rs587781642) интерпретируется как вариант, сопутствующий развитию опухоли.

Онкосупрессор p53 играет решающую роль в поддержании стабильности генома и предотвращении опухолей, но также является наиболее часто мутировавшим геном при НМРЛ. Согласно данным литературы, патогенная мутация гена *TP53* могут приводить к

резистентность опухоли к ингибиторам тирозинкиназы при наличии мутации в гене *EGFR* [78, 79].

4.2 Идентификация фьюжен-онкогенов при НМРЛ

У 17 % пациентов (2 из 12) MBH-7 мужского пола 67 лет с диагнозом аденокарцинома лёгкого III стадии (T1bN2M0) и ТАК-9 женского пола 65 лет с диагнозом аденокарцинома лёгкого I стадии (без классификации стадии злокачественного новообразования) обнаружен фьюжен вариант *ALK-EML4*.

Транслокация гена *ALK* – это внутривхромосомная перестройка (парацентрическая инверсия) короткого плеча 2-й хромосомы, ведущая к образованию химерного онкогена *EML4/ALK* примерно в 95% случаев. Еще в 5% случаев транслокация возникает с участием других генов, представляя, как правило, истинную реципрокную транслокацию. Иногда образование типичного химерного онкогена сопровождается частичной делецией 3' части гена *ALK*, биологическое значение пока до конца не изучено [80].

ALK является рецепторной тирозинкиназой из семейства инсулинзависимых рецепторов. В норме протеин *ALK* активно экспрессируется в нервной ткани только во время эмбриогенеза, регулируя пролиферацию нейронов. Основной функцией этого рецептора является передача сигнала. Основными сигнальными путями, задействованными в передаче, являются пути *PI3K/ERK* и *RAS/MAPK*, то есть те же, что участвуют в передаче сигнала *EGFR*.

Впервые о наличии данной мутации обнаруженной у пациента с аденокарциномой легкого сообщается автором Soda M, 2007 [81]. Мутантный *EML4-ALK* кодирует гибридный белок, состоящий из 1059 аминокислот. В последующих экспериментах показано, что введение гена *EML4-ALK* в нормальные клетки легких индуцирует канцерогенез, что позволяет предположить, что *EML4-ALK* обладает онкогенным эффектом [82].

Гены *EML4* и *ALK* расположены на p21 и p23 хромосомы 2 человека соответственно и находятся на расстоянии ~10 Мб друг от друга, их ориентация последовательностей генов обратная на коротком плече второй хромосомы. В слитом гене *EML4-ALK* все фрагменты гена *EML4* содержат базальный домен, а *ALK* содержит киназную область. Химерный ген *EML4* и *ALK* может кодировать химерный составной белок с онкогенной активностью, а именно слитый белок *EML4-ALK* [83].

Гибридный белок может непосредственно образовывать димер *ALK* без активации экзогенного лиганда, тем самым активируя *ALK* и его нижестоящие сигнальные пути *RAS/ERK/STAT3/mTOR*, в том числе и другие возможные сигнальные пути. А также, слитый белок *EML4-ALK* активирует и усиливает регуляцию экспрессии *STAT3*, а сверхэкспрессия *STAT3* повышает уровень фосфорилирования *mTOR* и повышает противоапоптотическую способность опухоли путем активации передачи сигналов *mTOR* [84, 85]. Пациентам с транслокациями *EML4/ALK* показан препарат кризотиниб.

4.3 Варианты генов *KRAS* и *PIK3CA* у пациентов с НМРЛ

При помощи секвенирования нового поколения у пациента с отсутствием значимых вариантов в гене *EGFR*, найдены варианты в генах *KRAS* и *PIK3CA*.

У пациента (ВВП-5) мужского пола 77 лет с диагнозом аденокарцинома лёгкого IV стадии (TXN2M1c) обнаружен вариант высокой клинической значимости в гене *KRAS* (rs121913530), а также новый, ранее не описанный в базах данных, вариант в гене *PIK3CA* (g.179198939).

Патогенный вариант гена *KRAS* (rs121913530), хорошо изучен и имеет 31 цитирование в базе данных db PubMed SNP. Исследования мутантного белка показали, что он обладает онкогенными свойствами. В исследовании [86] группы пациентов с первичной аденокарциномой легкого С.А. Арендт и

соавторы [87] обнаружили, что 92 пациента с данной мутацией (87%) курильщики. Тридцать девять из сорока опухолей с мутациями второго экзона гена *KRAS* имели 1 из 4 изменений в кодоне 12, наиболее распространенным из которых был G12C, который присутствовал в 25 опухолях и значительно чаще встречались у курильщиков по сравнению с некурящими (43% против 0%; $P = 0,001$).

Пациенты получили лечение в виде направленных ингибиторов (Соторасиб, адаграсиб или AMG-510), нацеленных на участок G12C гена *KRAS*, что привело к регрессии опухоли и улучшило противоопухолевую эффективность комбинированного лечения при помощи химиотерапии и таргетных препаратов. Средняя продолжительность ответа составила 8,5 месяцев, при этом средняя выживаемость без прогрессирования составила 6,5 месяцев, а средняя общая выживаемость при последнем наблюдении составила 12,6 месяцев [88, 89]. Препарат соторасиб одобрен FDA в мае 2021 года, таким образом при прохождении регистрации данного препарата в России, пациент может быть рассмотрен для назначения данного вида терапии. Также, у этого пациента обнаружена мутация в гене *PIK3CA*.

В данной работе впервые обнаружена мутация в гене *PIK3CA* по положению chr3: 179198939 c.114Tdup, с образованием терминирующего кодона UAA в матричной РНК во втором экзоне. Визуализированный процесс дупликации тимина в гене *PIK3CA* chr3: 179198939 представлен на рисунке 4.4.

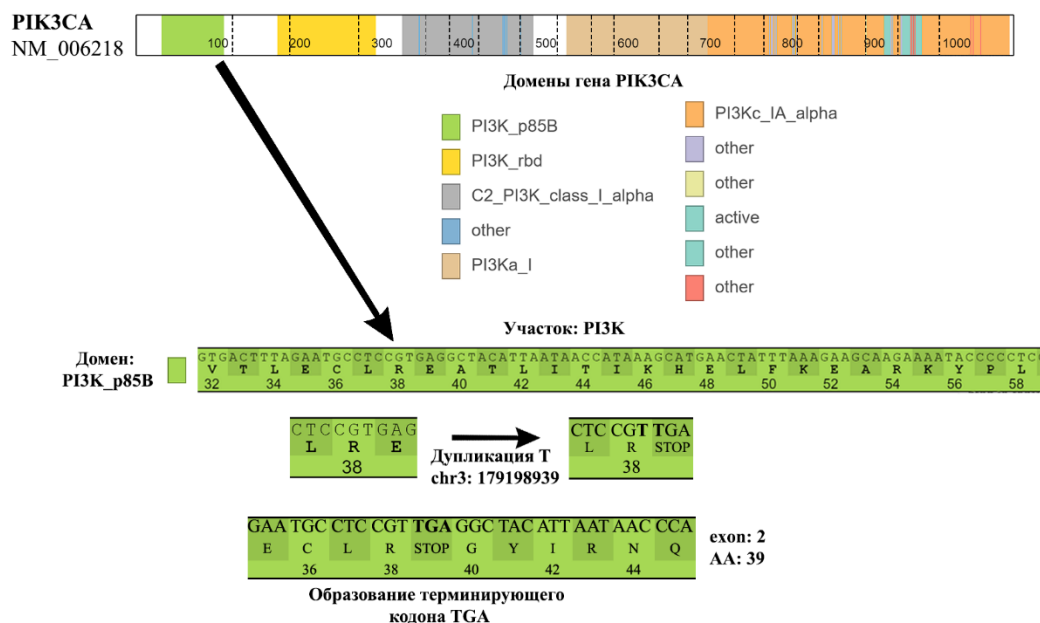


Рисунок 4.4 – Дупликации тимина в гене *PIK3CA* chr3: 179198939

Дупликация тимина в гене *PIK3CA* (3: 179198939) по положению с.114TduP.Особенность данной мутации заключается в сдвиге рамки считывания и образование терминирующего кодона UGA на матричной РНК. Данный вариант происходит в домене *PI3K*, отвечающим за трансляцию фосфатидилинозитол-3-киназы.

Данный вид мутации не встречается в открытых базах данных. Дупликация тимина приводит к сдвигу рамки считывания, в результате образуется терминирующий кодон TGA. Новая мутация гена *PIK3CA* классифицирована согласно протоколу *ACMG*, представлена в таблице 4.5.

Смещение рамки считывания приводит к образованию на смысловой цепи кодона TGA, в результате чего на матричной РНК образуется терминирующий кодон UGA, приводящий к полной остановке синтеза белка, практически в самом начале его структуры во втором экзоне.

Таблица 4.5 – Описание мутации у пациента ВВП-5в гене *PIK3CA*

Признак	Критерий	Комментарий
PVS1	Very Strong	Мутация затрагивает сплайс-донор сайт
PS1	Strong	Дупликация тимина, приводит к изменению синтеза белка
PS2	-	Данные на родителей пациента отсутствуют
PS3	-	Исследования, говорящие о патогенности мутации отсутствуют во всех базах данных
PS4	-	Не обнаружено
PM1	Moderate	Вариант расположен в функциональных доменах согласно базе данных Pscan St. Jude
PM2	Moderate	Данный вариант не встречается в базах данных ESP, 1KG, EXAC
PM3	-	Не обнаружено
PM4	-	Не влияет на длину синтезируемого белка
PM5	-	Не обнаружено
PP1	-	Не обнаружено
PP2	-	Не обнаружено
PP3	Support	CADD 30.0 (>23) вероятно патогенный вариант согласно программе https://cadd.gs.washington.edu
PP4	-	Не обнаружено
PP5	Support	Высокая вероятность патогенности при замене на другой нуклеотид, поскольку сдвиг рамки считывания приводит к образованию стоп кодона TGA

Согласно результатам биоинформатического анализа данный вариант может быть рассмотрен как патогенный, поскольку образование терминирующего кодона нарушает трансляцию белка PI3K.

Pik3CA (Phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit alpha) – ген, кодирующий фосфатидилинозитол-3-киназу (PI3K p110α класса I).

Фосфатидилинозитол-3-киназа являются частью важного сигнального пути *PI3K/AKT/mTOR*, которая отвечает за остановку апоптоза, рост, пролиферацию клеток и метаболизм. Путь *PI3K-AKT-mTOR* имеет решающее значение для доминирования множества связанных с опухолью регуляторных процессов, таких как рост клеток, выживание и развитие цикла, пролиферация и другие [90]. PI3K состоит из регуляторной (p85) субъединицы и каталитической (p110) субъединицы; последний кодируется тремя генами, включая *PIK3CA*, *PIK3CB* и *PIK3CD*. Активация PI3-киназного

пути может усиливать инвазивную способность опухолевых клеток в лимфатические узлы, а мутация *PIK3CA* связана с потерей PTEN, который ингибирует миграцию клеток [91].

При РМЖ и других злокачественных новообразованиях наиболее часто мутации затрагивают спиральный связывающий домен экзон 9 (E545K или E542K) или каталитическую субъединицу экзон 20 (H1047R или H1047L). Например, в доклиническом исследовании введение активированной мутации гена *PIK3CA* с.1633G>A (p.E545K) в клеточную линию с положительной мутацией *EGFR*, придает устойчивость к gefитинибу. Данная мутация гена *PIK3CA* является предиктором устойчивости к ингибиторам тирозинназы гена *EGFR*, примерно у 5% пациентов с НМРЛ [92]. Согласно данным литературы, мутации гена *PIK3CA* при плоскоклеточной карциноме легкого составляют 11,4 %, а при аденокарциноме легкого – 2,8% [92, 93]. Также показано, что наличие мутации в гене *PIK3CA* коррелирует с плохой выживаемостью пациентов с НМРЛ [94]. Таким образом, у пациентов с НМРЛ нами впервые согласно критериям ACMG обнаружена новая вероятно патогенная мутация гена *PIK3CA* (g.179198939). Требуются дальнейшие исследования для назначения таргетных препаратов при наличии данной мутации у пациентов с НМРЛ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе у пациентов с НМРЛ методом высокопроизводительного секвенирования изучен молекулярно-генетический портрет опухоли, а также проведён поиск новых клинически значимых вариантов в образцах геномной ДНК и тотальной РНК пациентов с немелкоклеточным раком лёгкого с помощью метода NGS.

Таким образом, при проведении NGS нами обнаружены мутации высокой клинической значимости генов EGFR (chr7: 55181323_ 55181328), KRAS (rs121913530), TP53(rs55863639), которые широко не тестируются на практике с применением ПЦР-тест систем и не включены в алгоритмы тестирования пациентов НМРЛ с целью определения дальнейшего лечения. Также нами впервые выявлен вариант гена PIK3CA (chr3: 179198939) и редкие мутации генов EGFR (rs559717059), KRAS (chr12: 25245309) и TP53 (chr17: 7676032), классифицированные нами согласно протоколу ACMG как вероятно-патогенные и требующие дальнейшего изучения в патогенезе и таргетной терапии НМРЛ.

Поскольку НМРЛ является одним из самых распространённых злокачественных заболеваний и занимает лидирующие позиции по показателям смертности, изучение механизмов развития данного заболевания, одно из приоритетных направлений в данной области.

ВЫВОДЫ

Частота встречаемости генетически значимых вариантов у пациентов с НМРЛ составила: EGFR (58 %), KRAS (25 %), TP53 (15 %). Частота встречаемости значимых генетических вариантов тотальной РНК у пациентов с немелкоклеточным раком лёгкого составила 17% (ALK/EML4). Впервые выявлена новая мутация гена EGFR (g.55181323_55181328) потенциальной клинической значимости у пациента с НМРЛ. Впервые обнаружены новые варианты высокой клинической значимости генов PIK3CA (chr3: 179198939) и KRAS (g. 25245309) у пациентов с НМРЛ. Методом высокопроизводительного секвенирования обнаружена мутация гена KRAS (rs121913530) высокой клинической значимости, не входящая в стандарты тестирования при НМРЛ. При наличии данной мутации при НМРЛ показано назначение таргетного препарата соторасиб, данный препарат не зарегистрирован в России.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Cancer [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>.
2. Lung cancer statistics [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.wcrf.org/cancer-trends/lung-cancer-statistics/>.
3. Итоги круглого стола в области лечения рака легкого [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://oncology-association.ru/itogi-kruglogo-stola-v-oblasti-lecheniya-raka-legkogo>.
4. Каприн, А.Д. Состояние онкологической помощи населению России в 2020 году / А.Д. Каприн, В.В. Старинский, А.О. Шахзадова. – Москва: Московский научно-исследовательский онкологический институт имени П.А. Герцена, 2021. – 239 с. – УДК 616 - 006.04 - 082 (470). – ББК 55.6.
5. Мерабишвили, В.М. Заболеваемость и смертность населения от рака лёгкого, достоверность учёта / В.М. Мерабишвили, А.И. Арсеньев и др. // Epidemiological studi. – 2017. – №17(6). – С. 17-29. – DOI: 10.21294/1814-4861-2018-17-6-15-26.
6. Каприн, А.Д. Состояние онкологической помощи населению России в 2021 году / А.Д. Каприн, В.В. Старинский, А.О. Шахзадова. – Москва: Московский научно-исследовательский онкологический институт имени П.А. Герцена, 2022. – 239 с. – УДК 616 - 006.04 - 082 (470). – ББК 55.6.
8. Бабанов, С.А. Профессиональные злокачественные новообразования легких и других локализаций и потенциально опасные производственные канцерогены / С.А. Бабанов, Д.С. Будащ, А.Г. Байкова, Н.С. Рыжова // Consilium Medicum. – 2017. – №19(11). – С. 39-46. – DOI: 10.26442/2075-1753_19.11.39-46.
9. Smoking and P53 polymorphism association with chromosomal aberration in lung cancer / F.M. Aldakheel, A.A. Abuderman et al. – Saudi Arabia: Journal of King Saud University – Science, 2021. – V.33(6). – p.101533. – ISSN 1018-3647. – DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2021.101533>.

10. Association of DNA repair gene polymorphism with chromosomal aberrations in the blood lymphocytes of patients with lung cancer / V.I. Minina, M.L. Bakanova et al. – Russia: Ecological Genetics, 2011. – V.9(2). – P.74-79. – DOI: 10.17816/ecogen9274-79.
11. Identifying factors that conjointly influence nicotine vaping product relative harm perception among smokers and recent ex-smokers: Findings from the 2016 ITC Four Country Smoking and Vaping Survey / Hua-Hie Yong, Chandan Karmakar, et al. – Netherlands: Drug and Alcohol Dependence, 2021. – V.218. – p.108370. –DOI: <https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2020.108370>.
12. The chemistry and toxicology of vaping / Emily Bonner, Yvonne Chang et al. – United Kingdom: Pharmacology & Therapeutics, 2021. – V.225. – P.107837. – DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2021.107837>.
13. The impact of tobacco smoking and electronic cigarette vaping on salivary biomarkers. A comparative study / Naglaa M. Kamal, Noha S. Shams. – Saudi Arabia: The Saudi Dental Journal, 2022. – V.34(5). – P.404-409. – DOI: <https://doi.org/10.1016/j.sdentj.2022.05.003>.
14. Comparative study of lung toxicity of E-cigarette ingredients to investigate E-cigarette or vaping product associated lung injury / Sung-Hoon Yoon, Mi-Kyung Song et al. – Netherlands: Journal of Hazardous Materials, 2023. – V.445. – P.404-409. – DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2022.130454>.
15. Tobacco Smoking and Risk of Second Primary Lung Cancer / Jacqueline V.Aredo BS, Sophia J. Luo et al. – USA: Journal of Thoracic Oncology, 2021. – V.16(6). – P.968-979. – DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2021.02.024>.
16. Over-Time Risk of Lung Cancer Is Largely Owing to Continuing Smoking Exposition: A Good Reason to Quit / Giuseppe Pelosi, Felice Pasini et al. – USA: Journal of Thoracic Oncology, 2021. – V.16(8). – P.e57-e59. – DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2021.04.013>.
17. Lung Adenocarcinoma / David J. Myers, Jason M. Wallen. – StatPearls, 2023. – Bookshelf ID: NBK519578. – PMID: 30137862.

18. Adenocarcinoma spectrum lesions of the lung: Detection, pathology and treatment strategies / L. Sucony, A.P.Barker et al. – United Kingdom: Tumour review, 2021. – V.99. – P.102237. – DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2021.102237>.
19. Clinicopathological, gene expression and genetic features of stage I lung adenocarcinoma with necrosis / Hiroaki Oiwa, Keiju Aokage et al. – Research article, 2021. – V.159. – P.74-83. – DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2021.07.001>.
20. Cigarette smoking and histologic type of lung cancer in men / F. Barbone, M. Bovenzi et al. – United Kingdom: Comparative Study, 1997. – V.112(6). – P.1474-9. – PMID: 9404741. – DOI: 10.1378/chest.112.6.1474.
21. Association between the mutational smoking signature and the immune microenvironment in lung adenocarcinoma / Kei Sato, Sachiyo Mimaki et al. – United Kingdom: Research article, 2020. – V.147. – P.12-20. – DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2020.06.029>.
22. Lung adenocarcinoma: from molecular basis to genome-guided therapy and immunotherapy / Roberto Chalela, Victor Curul et al. – J Thorac Dis, 2017. – V.9(7). – P.2142-2158. – PMID: 28840016. – PMCID: PMC5542927. – DOI: 10.21037/jtd.2017.06.20.
23. Outcomes in Patients With Lung Adenocarcinoma With Transformation to Small Cell Lung Cancer After EGFR Tyrosine Kinase Inhibitors Resistance: A Systematic Review and Pooled Analysis / Jinhe Xu, Lihuan Xu et al. – United Kingdom: Systematic Reviews, 2022. – V.11. – DOI: <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.766148>.
24. Adenocarcinoma spectrum lesions of the lung: Detection, pathology and treatment strategies / L. Sucony, D.M. Rassl et al. – United Kingdom: Cancer Treatment Reviews, 2021. – V.99. – P.102237. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2021.102237/>.
25. Clinicopathological Characteristics and Mutations Driving Development of Early Lung Adenocarcinoma: Tumor Initiation and Progression /

Kentaro Inamura. – Sweden: Int J Mol Sci, 2018. – V.19(4). – P.1259. – PMID: 29690599. – PMCID: PMC5979290. – DOI: 10.3390/ijms19041259.

26. Lung Adenocarcinoma Presenting as Multiple Thromboembolic Events: A Case Report and Review of the Literature / Gliceida M Galarza Fortuna et al. – United Kingdom: J Investig Med High Impact Case Rep, 2020. – V.8. – P.2324709620969482. – PMID: 33138640. – PMCID: PMC7675902. – DOI: 10.1177/2324709620969482.

27. Smoking and Lung Cancer / Tonya Walser et al. – Proc Am Thorac Soc, 2008. – V.5(8). – P.811-815. – DOI: 10.1513/pats.200809-100TH.

28. Impact of Somatic Mutations in Non-Small-Cell Lung Cancer: A Retrospective Study of a Chinese Cohort / Hai-bo Shen, Yuan-shan Yao et al. – Cancer Manag Res, 2020. – V.12. – P.7427–7437. – DOI: 10.2147/CMAR.S254139.

29. Prognostic and Predictive Markers of Benefit from Adjuvant Chemotherapy in Early-Stage Non-small Cell Lung Cancer / Ana Belen Custodio, Jana Bobokova et al. – USA: Journal of Thoracic Oncology, 2009. – V.4. – P.891-910. – DOI: <https://doi.org/10.1097/JTO.0b013e3181a4b8fb>.

30. Impact of surgery and adjuvant chemotherapy on the survival of stage I lung adenocarcinoma patients with tumor spread through air spaces / Yilv Lv, Siwen Li et al. – Netherlands: Lung Cancer, 2023. – V.177. – P.51-58. – DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2023.01.009>.

31. Cancer nanomedicine in preoperative therapeutics: Nanotechnology-enabled neoadjuvant chemotherapy, radiotherapy, immunotherapy, and phototherapy / Xiaogang Qu, Dong Zhou et al. – China: Bioactive Materials, 2018. – V.24. – P.136-152. – DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2022.12.010>.

32. EP02.01-005 The Efficacy of Platinum-Based Chemotherapy as Adjuvant Therapy in EGFR Mutant Lung Adenocarcinoma / K. Onodera, K. Aokage, M. Wakabayashi et al. – USA: Journal of Thoracic Oncology, 2022. – V.17. – P.S199-S200. – DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2022.07.332>.

33. EP02.01-017 The Role of Adjuvant Chemotherapy for Stage II/III Lung Adenocarcinoma Based on Epidermal Growth Factor Receptor Mutation Status / Y. Tsutani, Y. Shimada et al. – USA: Journal of Thoracic Oncology, 2022. – V.17. – P.S207-S208. – DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2022.07.344>.
34. Prediction of response and adverse drug reaction of pemetrexed plus platinum-based chemotherapy in lung adenocarcinoma by serum metabolomic profiling / Wei-Jing Gong, Peng Cao et al. – Italy: Translational Oncology, 2022. – V.19. – P.101393. – DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2022.101393>.
35. Adjuvant chemotherapy of non-small-cell lung cancer / J.Y. Douillard. – United Kingdom: European Journal of Cancer Supplements, 2013. – V.11. – P.131-136. – DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejcsup.2013.07.024>.
36. The Drug-Resistance Mechanisms of Five Platinum-Based Antitumor Agents / Jiabei Zhou, Yu Kang. – Front Pharmacol, 2020. – V.11. – P.343. – DOI: [10.3389/fphar.2020.00343](https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00343).
37. Ингибиторы EGFR в лечении колоректального рака / М.В. Забелин, А.Д. Каприн, А.А. Костин, Е.В. Гамеева, С.Е. Варламова. – Россия: Исследования и практика в медицине, 2018. – Т.5(3). – DOI: <https://doi.org/10.17709/2409-2231-2018-5-3-7>.
38. EGFR-Targeted Therapies in the Post-Genomic Era / Mary Jue Xu, Daniel E. Johnson et al. – USA and Netherlands: Cancer Metastasis Rev, 2017. – V.36. – P.463–473. – DOI: [10.1007/s10555-017-9687-8](https://doi.org/10.1007/s10555-017-9687-8).
39. ALK receptor tyrosine kinase [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/238>.
40. ALK mutation and inhibition in lung cancer / Tri Le and David E. Gerber. – USA: Semin Cancer Biol, 2017. – V.42. – P.81–88. – DOI: [10.1016/j.semcancer.2016.08.007](https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2016.08.007).
41. ALK-rearrangement in non-small-cell lung cancer (NSCLC) / Xue Du et al. – Australia: Thoracic Cancer, 2018. – V.9(4). – P.5879058. – DOI: [10.1111/1759-7714.12613](https://doi.org/10.1111/1759-7714.12613).

42. ROS-1 Fusions in Non-Small-Cell Lung Cancer: Evidence to Date / Sebastien Gendarme, Olivier Bylicki et al. – Canada: Curr Oncol, 2022. – V.29(2). – P.641–658. – DOI: 10.3390/curroncol29020057.
43. Fusion of FIG to the receptor tyrosine kinase ROS in a glioblastoma with an interstitial del(6)(q21q21) / Alain Charest , Keara Lane et al. – USA: Genes Chromosomes Cancer, 2003. – V.37(1). – P.58-71. – DOI: 10.1002/gcc.10207.
44. The genetics and biology of KRAS in lung cancer / Peter M.K. Westcott and Minh D.To. – Chine: Chin J Cancer, 2013. – V.32(2). – P.63–70. – DOI: 10.5732/cjc.012.10098.
45. COSMIC: mining complete cancer genomes in the Catalogue of Somatic Mutations in Cancer / Simon A. Forbes, Nidhi Bindal, Sally Bamford et al. – United Kingdom: Nucleic Acids Res, 2011. – V.39. – P.D945–D950. – DOI: 10.1093/nar/gkq929.
46. Different types of K-Ras mutations could affect drug sensitivity and tumour behaviour in non-small-cell lung cancer / M.C. Garassino, M. Marabese et al. – United Kingdom: Ann Oncol, 2011. – V.22(1). – P.235-237. – PMID: 21169473. – DOI: 10.1093/annonc/mdq680.
47. Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF / Paul T C Wan, Mathew J. Garnett, S. Mark Roe et al. – USA: Cell, 2004. – V.116(6). – P.855-67. – PMID: 15035987. – DOI: 10.1016/s0092-8674(04)00215-6.
48. Emerging BRAF Mutations in Cancer Progression and Their Possible Effects on Transcriptional Networks / Magdalena Smiech, Paweł Leszczynski et al. – Spain: Genes (Basel), 2020. – V.11(11). – P.1342. – DOI: 10.3390/genes11111342.
49. Nuclear ERK: Mechanism of Translocation, Substrates, and Role in Cancer / Galia Maik-Rachline, Avital Hacoen-Lev-Ran and Rony Seger. – Switzerland: Int J Mol Sci, 2020. – V.20(5). – P.1194. – PMID: 30857244. – PMCID: PMC6429060. – DOI: 10.3390/ijms20051194.

50. Usefulness of serum carcinoembryonic antigen (CEA) in evaluating response to chemotherapy in patients with advanced non small-cell lung cancer: a prospective cohort study / Oscar Arrieta et al. – United Kingdom: BMC Cancer, 2013. – V.13(254). – PMID: 23697613. – PMCID: PMC3665670. – DOI: 10.1186/1471-2407-13-254. – V.1(4). – P.291-301. – PMID: 7889417. – DOI: 10.1016/1074-7613(94)90081-7.

51. Development of hematopoietic stem cell activity in the mouse embryo / A M Müller et al. – USA: Immunity, 1994.

52. Мисюрина А. Е., Мисюрин В. А., Варях Е. А., Ковригина А. М., Кравченко С. К. Роль экспрессии генов c-MYC, bcl2 и BCL6 в патогенезе диффузной В-крупноклеточной лимфомы // Клиническая онкогематология. 2014, 2014. – Т.7(4). – №.4. – С. 512-521.

53. C-myc Contributes to Malignancy of Lung Cancer: A Potential Anticancer Drug Target / Pithi Chanvorachote et al. – Greece: Anticancer Research, 2020. – V.40(2). – P.609-618. – DOI: <https://doi.org/10.21873/anticancer.13990>.

54. Myc Is a Metastasis Gene for Non-Small-Cell Lung Cancer / Ulf R. Rapp, Christian Korn, Fatih Ceteci et al. – USA: Plos one, 2009. – DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006029>.

55. Chuang JC, Stehr H, Liang Y, Das M, Huang J, Diehn M, Wakelee HA, Neal JW. ERBB2-Mutated Metastatic Non-Small Cell Lung Cancer: Response and Resistance to Targeted Therapies. J Thorac Oncol. 2017 May;12(5):833-842. doi: 10.1016/j.jtho.2017.01.023. Epub 2017 Feb 4. PMID: 28167203; PMCID: PMC5402884.

56. Mazieres J, et al. Lung cancer patients with HER2 mutations treated with chemotherapy and HER2-targeted drugs: results from the European EUHER2 cohort. Ann Oncol. 2016;27(2):281–6.

57. Chuang JC, Stehr H, Liang Y, Das M, Huang J, Diehn M, Wakelee HA, Neal JW. ERBB2-Mutated Metastatic Non-Small Cell Lung Cancer: Response and Resistance to Targeted Therapies. J Thorac Oncol. 2017

May;12(5):833-842. doi: 10.1016/j.jtho.2017.01.023. Epub 2017 Feb 4. PMID: 28167203; PMCID: PMC5402884.

58. Genome landscapes of rectal cancer before and after preoperative chemoradiotherapy / Jie Yang , Yuan Lin et al. – USA: Theranostics, 2019. – V.9(23). – P.6856-6866. – DOI: 10.7150/thno.37794.

59. Tumor-derived DNA from pleural effusion supernatant as a promising alternative to tumor tissue in genomic profiling of advanced lung cancer / Lin Tong, Ning Ding et al. – USA: Theranostics, 2019. – V.9(19). – P.5532-5541. – PMCID: PMC6735385. – DOI: 10.7150/thno.34070.

60. NM_000546.6(TP53):c.375G>A (p.Thr125=) AND Li-Fraumeni syndrome [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/RCV000154460.11/>.

61. Targeting the EGF receptor family in non-small cell lung cancer—increased complexity and future perspectives / Tobias Boch et al. – China: Cancer Biol Med, 2022. – V.19(11). – P.1543–1564. – DOI: 10.20892/j.issn.2095-3941.2022.0540.

62. Different Epidermal Growth Factor (EGF) Receptor Ligands Show Distinct Kinetics and Biased or Partial Agonism for Homodimer and Heterodimer Formation / Jennifer L. Macdonald-Obermann, Linda J. Pike. – USA: J Biol Chem, 2014. – V.289(38). – P.26178–26188. – DOI: 10.1074/jbc.M114.586826.

63. Mechanisms of resistance to EGFR-targeted drugs: lung cancer / Floriana Morgillo et al. – United Kingdom: Cancer Biol Med, 2013. – V.1(3). – P.e000060. – DOI: 10.1136/esmoopen-2016-000060.

64. Злокачественное новообразование бронхов и легкого / Общероссийский национальный союз «Ассоциация онкологов России». – Министерства здравоохранения Российской Федерации, 2021. – 104 с.

65. Mechanisms of acquired resistance to first- and second-generation EGFR tyrosine kinase inhibitors / D Westover et al. – United Kingdom: Ann Oncol, 2013. – V.29(1). – P.i10–i19. – DOI: 10.1093/annonc/mdx703.

66. Epidermal Growth Factor Receptor Expression and Resistance Patterns to Targeted Therapy in Non-Small Cell Lung Cancer: A Review / E.A. Karlsen et al. – USA: Cells, 2021. – V.10(5). – P.1206. – DOI: 10.3390/cells10051206.

67. Mutation in the tyrosine kinase domain of epidermal growth factor receptor is a predictive and prognostic factor for gefitinib treatment in patients with non-small cell lung cancer / T.Y. Chou et al. – USA: Clin Cancer Res, 2005. – V.11(10). – P.3750-7. – DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-04-1981.

68. Differential sensitivities to tyrosine kinase inhibitors in NSCLC harboring EGFR mutation and ALK translocation / J. K. Lee et al. – Ireland: Lung Cancer, 2012. – V.77(2). – P.460-3. – DOI: 10.1016/j.lungcan.2012.04.012.

69. Spectrum of EGFR aberrations and potential clinical implications: insights from integrative pan-cancer analysis / H. Liu et al. – United Kingdom: Cancer Communications, 2020. – V.40(1). – P.43-59. – DOI: 10.1002/cac2.12005.

70. Multiple mutations in the EGFR gene in lung cancer: a systematic review / J. P.Castaneda-Gonzalez et al. – Hong Kong: Translational Lung Cancer Research, 2022. – V.11(10). – P.2148–2163. – DOI: 10.21037/tlcr-22-235.

71. Understanding Intratumor Heterogeneity and Evolution in NSCLC and Potential New Therapeutic Approach / T. Goto et al. – Switzerland: Cancers, 2018. – V.10(7). – P.212. – DOI: 10.3390/cancers10070212.

72. Comparison of epidermal growth factor receptor mutations between primary and corresponding metastatic tumors in tyrosine kinase inhibitor-naïve non-small-cell lung cancer / C.H. Gow et al. – United Kingdom: Annals of Oncology, 2008. – V.20(4). – P.696-702. – DOI: 10.1093/annonc/mdn679.

73. The current situation: erlotinib (Tarceva) and gefitinib (Iressa) in non-small cell lung cancer / Robert L Comis. – USA: Oncologist, 2005. – V.10(7). – P.467-70. – DOI: 10.1634/theoncologist.10-7-467.

74. Identifying relationships between imaging phenotypes and lung cancer-related mutation status: EGFR and KRAS / Pinheiro, G., Pereira, T., Dias,

C. et al. – Austria: Open Access, 2019. – 3625. – DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-60202-3>.

75. Ito, M., Miyata, Y., Kushitani, K. et al. Distribution and prognostic impact of EGFR and KRAS mutations according to histological subtype and tumor invasion status in pTis-3N0M0 lung adenocarcinoma. BMC Cancer 23, 248 (2023). <https://doi.org/10.1186/s12885-023-10716-6>.

76. Ras GTPase family containing H-Ras, N-Ras and K-Ras4A/4B [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cddsrv.cgi?uid=133338>.

77. P53 DNA-binding domain [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cddsrv.cgi?uid=176262>.

78. Understanding the function-structure and function-mutation relationships of p53 tumor suppressor protein by high-resolution missense mutation analysis / Shunsuke Kato et al. – USA: Proc Natl Acad Sci USA, 2003. – V.100(14). – P.8424-9. – DOI: 10.1073/pnas.1431692100.

79. Kotler E et al. Mol. Cell. 2018 Jul;71:178-190.e8; Giacomelli AO et al. Nat. Genet. 2018 Oct;50:1381-1387.

80. The Role of TP53 Mutations in EGFR-Mutated Non-Small-Cell Lung Cancer: Clinical Significance and Implications for Therapy / Matteo Canale et al. – Switzerland: Cancers, 2022. – V.14(5). P.1143. – DOI: 10.3390/cancers14051143.

81. Therapeutic targeting of p53: all mutants are equal, but some mutants are more equal than others / Kanaga Sabapathy and David P Lane. – Switzerland: Cancers, 2018. – V.15(1) P.13-30. – DOI: 10.1038/nrclinonc.2017.151.

82. Транслокации с участием гена ALK [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.cancergenome.ru/mutations/ALK/>.

83. Soda M, Choi YL, Enomoto M, Takada S, Yamashita Y, Ishikawa S, Fujiwara S, Watanabe H, Kurashina K, Hatanaka H, et al: Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. Nature. 448:561–566. 2007.

84. Soda M, Takada S, Takeuchi K, Choi YL, Enomoto M, Ueno T, Haruta H, Hamada T, Yamashita Y, Ishikawa Y, et al: A mouse model for EML4-ALK-positive lung cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*. 105:19893–19897. 2008.
85. Bayliss R, Choi J, Fennell DA, Fry AM and Richards MW: Molecular mechanisms that underpin EML4-ALK driven cancers and their response to targeted drugs. *Cell Mol Life Sci*. 73:1209–1224. 2016.
86. Takezawa K, Okamoto I, Nishio K, Jänne PA and Nakagawa K: Role of ERK-BIM and STAT3-survivin signaling pathways in ALK inhibitor-induced apoptosis in EML4-ALK-positive lung cancer. *Clin Cancer Res*. 17:2140–2148. 2011.
87. EML4-ALK fusion gene in non-small cell lung cancer (Review) / Yu Lei et al. – Greece: *Oncology Letters*, 2022. – V.15(1). – P.277. – DOI: <https://doi.org/10.3892/ol.2022.13397>.
88. Isolation of transforming sequences of two human lung carcinomas: structural and functional analysis of the activated c-K-ras oncogenes / H Nakano et al. – USA: *Proc Natl Acad Sci USA*, 1984. – V.81(1). – P.71-5. – DOI: 10.1073/pnas.81.1.71.
89. Cigarette smoking is strongly associated with mutation of the K-ras gene in patients with primary adenocarcinoma of the lung / S. A. Ahrendt et al. – Switzerland: *Cancer*, 2001. – V.92(6). – P.1525-30. – DOI: 10.1002/1097-0142(20010915)92:6<1525::aid-cnrc1478>3.0.co;2-h.
90. The clinical KRAS(G12C) inhibitor AMG 510 drives anti-tumour immunity / Jude Canon, Karen Rex et al. – United Kingdom: *Nature*, 2019. – V.575(7781). – P.217-223. – DOI: 10.1038/s41586-019-1694-1.
91. Adagrasib in Non-Small-Cell Lung Cancer Harboring a KRAS G12C Mutation / Pasi A Janne et al. – USA: *New England Journal of Medicine*, 2022. – V.387(2). – P.120-131. – DOI: 10.1056/NEJMoa2204619.
92. Clinical Significance of PIK3CA Gene in Non-Small-Cell Lung Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis / Yi Wang et al. – USA: *BioMed*

Research International, 2020. – V.2020. – P.3608241. – DOI: <https://doi.org/10.1155/2020/3608241>.

93. P42336 · PK3CA_HUMAN [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P42336/entry>.

94. Phosphoinositide-3-kinase catalytic alpha and KRAS mutations are important predictors of resistance to therapy with epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in patients with advanced non-small cell lung cancer / Vienna Ludovini et al. – USA: Journal of Thoracic Oncology, 2011. – V.6(4). – P.707-15. – DOI: 10.1097/JTO.0b013e31820a3a6b.

95. Mutation and prognostic analyses of PIK3CA in patients with completely resected lung adenocarcinoma / Zhengbo Song et al. – United Kingdom: Cancer Medicine, 2016. – V.5(10). – P.2694-2700. – DOI: <https://doi.org/10.1002/cam4.852>.

96. The Role of PIK3CA Mutations among Lung Adenocarcinoma Patients with Primary and Acquired Resistance to EGFR Tyrosine Kinase Inhibition / S.G. Wu et al. – Austria: Open Access, 2016. – 35249. – DOI: <https://doi.org/10.1038/srep35249>.

СПРАВКА

Томский Государственный Университет

о результатах проверки текстового документа
на наличие заимствований

ПРОВЕРКА ВЫПОЛНЕНА В СИСТЕМЕ АНТИПЛАГИАТ.ВУЗ

Автор работы: Савельев Сергей Николаевич
Самоцитирование
рассчитано для: Савельев Сергей Николаевич
Название работы: Савельев С.Н. ВКР
Тип работы: Выпускная квалификационная работа
Подразделение: АМП "Трансляционные химические и биомедицинские технологии"

РЕЗУЛЬТАТЫ

■ ОТЧЕТ О ПРОВЕРКЕ КОРРЕКТИРОВАЛСЯ: НИЖЕ ПРЕДСТАВЛЕНЫ РЕЗУЛЬТАТЫ ПРОВЕРКИ ДО КОРРЕКТИРОВКИ

СОВПАДЕНИЯ 19.97%
ОРИГИНАЛЬНОСТЬ 77.89%
ЦИТИРОВАНИЯ 2.14%
САМОЦИТИРОВАНИЯ 0%

СОВПАДЕНИЯ 10.3%
ОРИГИНАЛЬНОСТЬ 87.56%
ЦИТИРОВАНИЯ 2.14%
САМОЦИТИРОВАНИЯ 0%

ДАТА ПОСЛЕДНЕЙ ПРОВЕРКИ: 18.06.2023

ДАТА И ВРЕМЯ КОРРЕКТИРОВКИ: 18.06.2023 11:06

Структура документа:

Проверенные разделы: основная часть с.1, 4-86, содержание с.2-3

Модули поиска:

ИПС Адилет; Библиография; Сводная коллекция ЭБС; Интернет Плюс*; Сводная коллекция РГБ; Цитирование; Переводные заимствования (RuEn); Переводные заимствования по eLIBRARY.RU (EnRu); Переводные заимствования по коллекции Гарант: аналитика; Переводные заимствования по коллекции Интернет в английском сегменте; Переводные заимствования по Интернету (EnRu); Переводные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте; Переводные заимствования издательства Wiley; eLIBRARY.RU; СПС ГАРАНТ: аналитика; СПС ГАРАНТ: нормативно-правовая документация; Медицина; Диссертации НББ; Коллекция НБУ; Перефразирования по eLIBRARY.RU; Перефразирования по СПС ГАРАНТ: аналитика; Перефразирования по Интернету; Перефразирования по Интернету (EN); Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в английском сегменте; Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте; Перефразирования по коллекции

Работу проверил: Якутина Марина Александровна

ФИО проверяющего

Н.В. Якутина

Дата подписи:

Подпись проверяющего



Чтобы убедиться
в подлинности справки, используйте QR-код,
который содержит ссылку на отчет.

Ответ на вопрос, является ли обнаруженное заимствование
корректным, система оставляет на усмотрение проверяющего.
Предоставленная информация не подлежит использованию
в коммерческих целях.