

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Национальный медицинский исследовательский центр онкологии
имени Н.Н. Блохина»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

На правах рукописи

Казаков Алексей Михайлович

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПРОФИЛЬ ОПУХОЛИ ПРИ
НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНОМ РАКЕ ЛЕГКОГО I-IIIА СТАДИИ И ЕГО
СВЯЗЬ С КЛИНИКО-МОРФОЛОГИЧЕСКИМИ ПАРАМЕТРАМИ**

3.1.6. Онкология, лучевая терапия

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:

Доктор медицинских наук

Лактионов Константин Константинович

Москва – 2024 г.

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	3
ГЛАВА 1.....	12
ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	12
1.1 Общая характеристика соматических и пассажирских мутаций	12
1.2 Соматические мутации, характерные для немелкоклеточного рака лёгкого.....	17
1.3 Влияние мутационного статуса на прогноз заболевания.....	27
1.4 Методы определения соматических мутаций	32
ГЛАВА 2.....	36
МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	36
2.1 Общая характеристика больных	36
2.2 Методы исследования	39
2.3 Статистическая обработка результатов	41
ГЛАВА 3.....	43
РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ	43
3.1 Зависимость между молекулярно-генетическими и клинико-морфологическими параметрами опухоли.....	47
3.2 Зависимость между молекулярно-генетическим статусом опухоли и вероятностью рецидива заболевания.....	64
3.3 Зависимость между молекулярно-генетическим статусом опухоли и общей и безрецидивной выживаемостью.....	81
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	87
ВЫВОДЫ	95
ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ	97
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	98
СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	99
ПРИЛОЖЕНИЯ.....	113

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Рак легкого является одним из наиболее распространенных злокачественных заболеваний не только в России, но и во всем мире. В США рак легкого занимает по распространенности среди женщин и мужчин второе место, уступая только раку молочной железы и раку простаты соответственно - такие данные предоставляет American Cancer Society. Практически аналогичные показатели зафиксированы Всемирной организацией здравоохранения и в Европе, где рак легкого по частоте выявления у мужчин также занимает второе место, а среди женщин – третье, уступая раку молочной железы и колоректальному раку [1]. В России по частоте встречаемости рак легкого также занимает первые позиции, как у мужчин, так и у женщин, по данным за 2018 г - 48 058 случаев впервые выявленного рака легкого у мужчин и 12409 – у женщин [2]. Наиболее часто встречающимся гистологическим подтипом рака легкого является немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ), на который приходится около 80% всех выявляемых случаев [3]. В свою очередь НМРЛ классически делится на две большие группы – аденокарциному и плоскоклеточный рак легкого. Аденокарцинома легкого по данным подавляющего большинства исследований встречается чаще плоскоклеточного рака легкого как в европейской, так и в азиатской популяции – 40-50% против 25-40% случаев [4,5].

Каждая из данных групп также является очень гетерогенной в зависимости от наличия или отсутствия тех или иных соматических мутаций, которые в значительной степени будут определять многие особенности заболевания, а также прогноз и необходимые подходы к лечению. Наиболее частыми, а также клинически значимыми соматическими мутациями при аденокарциноме являются мутации в генах *EGFR*, *ALK*, *ROS1*, *BRAF*, *KRAS*. Менее частыми, но также клинически значимыми являются мутации в генах *RET*, *NTRK*, *MET* и некоторые другие. Каждая из вышеописанных мутаций является мишенью для

определенного таргетного препарата, что делает их выявление важным этапом в лечении и диагностики НМРЛ. В качестве примера можно привести данные эффективности применения ингибитора EGFR III поколения осимертиниба у пациентов с диссеминированным НМРЛ с наличием мутации T790M гена *EGFR*. Исследование показало, что медиана общей выживаемости при использовании осимертиниба составила 18,6 месяцев, тогда как медиана выживаемости при использовании химиотерапии у данной группы пациентов в среднем составляет не более 7-8 месяцев [6,7,8].

Другой пример – использование ингибиторов ALK у пациентов с выявленной транслокацией в гене *ALK*. Применение ингибитора ALK III поколения – алектиниба в первую линию у пациентов с транслокацией ALK позволило достигнуть медианы безрецидивной выживаемости в 25,7 месяцев, что более чем в 3 раза больше чем у пациентов, получающих химиотерапевтическое лечение [9]. Такая же тенденция прослеживается и при применении ингибиторов более редких мутаций, таких как транслокация в гене *RET*, которая встречается в 1-2% случаев НМРЛ [10]. Было показано, что даже в группе предлеченных пациентов (до трех линий предыдущего лекарственного лечения) у которых была выявлена транслокация в гене *RET*, применение таргетного препарата селперкатиноба позволило добиться медианы безрецидивной выживаемости в 17 месяцев [11].

Все описанные выше результаты применения таргетной терапии показывают её высокую эффективность и, как следствие, важность тестирования пациентов аденокарциномой НМРЛ на основные клинически значимые мутации. Однако, мутации, являющиеся в настоящее время прикладными точками для применения таргетной терапии составляют лишь малую часть от всех соматических мутаций, встречающихся при НМРЛ, как при аденокарциноме, так и при плоскоклеточном раке. Многие из соматических мутаций, для которых не существует таргетной терапии, тем не менее имеют свою клиническую роль, поскольку могут быть факторами прогноза заболевания или указывать на некоторые особенности течения заболевания. Ярким примером является мутация

TP53, которая имеет различное прогностическое значение для пациентов с аденокарциномой и плоскоклеточным раком легкого [12]. Кроме того, сочетание мутации *TP53* с другими соматическими мутациями, например, с *KRAS* мутацией ассоциируется с лучшим ответом на иммунотерапию ингибиторами контрольных точек иммунитета у пациентов с диссеминированным НМРЛ [13]. Таких примеров достаточно много среди других соматических мутаций, встречающихся при НМРЛ и которые будут подробно описаны далее. Всё этого говорит о том, что изучение прогностической роли соматических мутаций, а также связи между молекулярно-генетическими и клинико-морфологическими параметрами опухоли является важным направлением в изучении НМРЛ, улучшая диагностику, прогнозирование, что делает лечение НМРЛ более прецизионным и персонализированным. Особенно перспективным направлением видится изучение связи между молекулярно-генетическими и клинико-морфологическими параметрами у пациентов с локализованным НМРЛ, поскольку информация об особенностях течения заболевания будет получена сразу после радикального оперативного лечения и позволит более эффективно и обоснованно проводить динамическое послеоперационное обследование и, если понадобится, лекарственное лечение в случае рецидива заболевания, кроме того, полученные данные в перспективе могут стать одним из обоснований назначения периоперационной терапии.

Степень разработанности темы исследования

В настоящее время у научного сообщества есть данные о частоте встречаемости очень небольшого количества соматических мутаций при немелкоклеточном раке легкого (НМРЛ). К ним относятся мутации в генах *EGFR*, *ALK*, *ROS1*, *BRAF*, *KRAS*, *RET*, *NTKR 1,2,3*, *cMET*, *ERBB2*. Кроме того, по объективным причинам, выше перечисленные мутации определяются в основном у пациентов с диссеминированным НМРЛ. Это связано с тем, что данные мутации могут быть мишенями для определенных таргетных препаратов.

Подавляющее большинство соматических мутаций при НМРЛ на данный момент не являются мишенями таргетной терапии, поэтому их выявление рутинно не используется.

Однако эти соматические мутации могут быть полезны для улучшения диагностики заболевания, определения особенностей его течения, а также прогноза. На текущее время нет ни одной отечественной работы, которая своей целью ставила бы изучение частоты встречаемости соматических мутаций при локализованном НМРЛ, в том числе плоскоклеточного рака легкого, на достаточном большом количестве пациентов, и в которой бы использовалась широкая кастомная панель, включающая в себя более 70 различных соматических мутаций, встречающихся при НМРЛ. Среди зарубежных работ встречаются исследования, посвященные влиянию соматических мутаций на прогноз при локализованном НМРЛ, однако работы носят разрозненный характер, и как правило, посвящены очень небольшому количеству соматических мутаций. Также стоит отметить, что ни отечественные, ни зарубежные работы не ставят акцент на локализации соматической мутации в том или ином экзоне поврежденного гена, хотя данная информация может быть крайне важна для определения прогностического влияния генетической альтерации.

Цель исследования

Целью исследования являются выявление связи молекулярно-генетического профиля опухоли пациентов с I-IIIА стадией немелкоклеточного рака легкого с клинико-морфологическими параметрами

Задачи исследования

1. Составить профиль молекулярно-генетических нарушений у пациентов российской популяции с НМРЛ I-IIIА.

2. Выявить корреляцию между клинико-морфологическими и молекулярно-генетическими характеристиками пациентов с НМРЛ I-IIIА стадии.
3. Определить влияние мутаций, встречающихся у пациентов российской популяции с НМРЛ I-IIIА стадий, на вероятность рецидива заболевания.
4. Определить влияние выявленных мутаций на общую и безрецидивную выживаемость у пациентов I-IIIА стадии после радикального оперативного лечения.

Научная новизна

Впервые на российской популяции пациентов с локализованным раком легкого (N=90), проходивших лечение в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава РФ, будет проведено NGS (next generation sequencing или тестирование методом высокопроизводительного секвенирования) тестирование с использованием панели из 80 генов, мутации в которых встречаются при НМРЛ. Впервые будет определена связь между клинико-морфологическими параметрами опухоли и молекулярно-генетическим статусом у пациентов с локализованным НМРЛ I-IIIА стадий. Впервые будет изучено влияние редких соматических мутаций на прогноз пациентов с локализованным НМРЛ I-IIIА стадии после радикального оперативного лечения.

Теоретическая и практическая значимость

Определение молекулярно-генетического профиля Российских пациентов с локализованным НМРЛ, а также корреляция между молекулярно-генетическим статусом и клинико-морфологическими параметрами при немелкоклеточном раке легкого, позволит улучшить диагностику немелкоклеточного рака легкого. Изучение прогностической значимости соматических мутаций при локализованном НМРЛ может улучшить прогнозирование течения заболевания, оптимизировать послеоперационную тактику ведения пациентов.

Методология и методы исследования

Работа основана на проспективном анализе 90 пациентов с немелкоклеточным раком легкого I-IIIА стадии, прошедших оперативное лечение в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава РФ в период с 2020 по 2022 года. Опухолевый материал, полученный в ходе оперативного лечения, был подвергнут рутинному гистологическому исследованию, а также тестированию с использованием широкой панели генов, соматические мутации в которых характерны для немелкоклеточного рака лёгкого (панель включает 80 генов - *KMT2C, STK11, KRAS, TP53, ALK, EML4, ITGA9, FGFR1,2,3, SYNE1, MLLT10, WT1, ATM, ERBB2,3, LTK, NF1, BRCA1,2, AKT1,2,3, CHEK2, KDM5C, TAF1, TRIM33, IKBKE, TCF7L1, LRP1B, PMS1, PIK3CB, PIK3C2B, PIK3CA, KIT, ADAMTS2, NOTCH1,4, ROS1, ETV1, ADGRA2, KAT6A, NBN, TSC1, RB1, CDH5, CDK12, CIC, DDR2, BRAF, PTEN, NTRK1,2,3, COL1A1, COL22A1, MPL, PTGS2, MSH2,6, PDGFRA, EGFR, GPC3, XPC, SLC34A2, NCOA4, HIP1, KIF5B, CDKN2A, NRAS, MET, FYCO1, NBPF20, PBX1, ABL2, RNF2, PARP1, GOPC, SLC39A8, RET*).

Генетическое тестирование осуществлялось методом NGS. Подготовка библиотеки осуществлялась с использованием гибридных зондов (Roche KAPA HyperCap). Перед выделением ДНК проводилась оценка содержания опухолевой ткани (в работу брались образцы с содержанием опухолевой ткани не менее 30%). Наличие или отсутствие соматических вариантов оценивали в сравнении с не опухолевой тканью, детектировалось содержание мутантной аллели от 1% и более. Среднее покрытие зоны интереса составляло от 150x для гибридной панели. В качестве функциональной единицы был выбран экзон, соответствующий белковому домену, так как основной задачей исследования являлась оценка общего соматического мутационного процесса, без разделения на терапевтически значимые и не значимые мутации. Осуществлен проспективный анализ общей и безрецидивной 2-х летней выживаемости пациентов. Методика послеоперационного обследования включала в себя выполнение компьютерной томографии органов грудной и брюшной полости с

внутривенным контрастированием каждые три месяца в течение 2-х лет после операции. Каждые 6 месяцев пациенты проходили МРТ (магнитно-резонансная томография) головного мозга с в/в контрастированием. Другие методы обследования, такие как сцинтиграфия костей скелета, однофотонная эмиссионная компьютерная томография, ультразвуковое исследование различных локализаций, позитронно-эмиссионная компьютерная томография всего тела проводились в случае необходимости по клиническим показаниям. После получения данных планового гистологического исследования, генетического тестирования и данных об общей и безрецидивной двухлетней выживаемости был произведен анализ их взаимосвязи. Статистическая обработка результатов исследования проводилась с использованием программы SPSS Statistics 23.0, на основе собранной базы данных. Анализ выживаемости проведен с помощью метода Каплана–Мейера. Для анализа социодемографических и клинических характеристик больных использованы методы описательной статистики.

Положения, выносимые на защиту

1. Определение мутационного профиля в крупной когорте пациентов с использованием широкой панели (80 генов) соматических мутаций, встречающихся при НМРЛ, методом таргетного NGS позволит получить представление о мутационном ландшафте опухоли у российских пациентов с локализованным НМРЛ I-IIIА стадии.
2. Мутационный статус пациента может быть ассоциирован с клинико-морфологическими особенностями заболевания.
3. Ряд соматических мутаций могут оказывать влияние на прогноз заболевания, а именно на величину общей и безрецидивной выживаемости у пациентов с локализованным немелкоклеточным раком легкого I-IIIА стадии после проведенного радикального хирургического лечения.
4. Изучение связи мутационного статуса пациента и вероятности рецидива заболевания может позволить выявить мутации, достоверно ассоциирующиеся с

повышением вероятности рецидива заболевания у пациентов с локализованным немелкоклеточным раком легкого I-IIIА стадии после проведенного радикального хирургического лечения.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения диссертационной работы соответствуют паспорту научной специальности: 3.1.6. Онкология, лучевая терапия. Область науки: 3. Медицинские науки, группа клинических специальностей: 3.1. Клиническая медицина. Направления исследований: п 2. Исследования на молекулярном, клеточном и органном уровнях этиологии и патогенеза злокачественных опухолей, основанные на современных достижениях ряда естественных наук (генетики, молекулярной биологии, морфологии, иммунологии, биохимии, биофизики и др.), п 10. Оценка эффективности противоопухолевого лечения на основе анализа отдаленных результатов.

Степень достоверности и апробация результатов

Работа выполнена на достаточном объеме клинического материала для того, чтобы считать полученные результаты достоверными. Достоверность представленных данных подтверждается актом проверки первичной документации от «27» сентября 2023 года. Апробация диссертационной работы состоялась на совместной научной конференции с участием отделения противоопухолевой лекарственной терапии №3 отдела лекарственного лечения, отделения торакальной онкологии НИИ клинической онкологии им. академика РАН и РАМН Н.Н. Трапезникова, лаборатории молекулярно-генетической диагностики и патологоанатомического отделения отдела морфологической и молекулярно-генетической диагностики опухолей консультативно-диагностического центра ФГБУ «НМИЦ онкологии имени Н.Н. Блохина» Минздрава России, состоявшейся 03.11.2023 года.

Публикации

Результаты исследования представлены в 2 научных статьях, которые опубликованы в журналах, рекомендуемых ВАК при Минобрнауки России для публикаций материалов кандидатских и докторских диссертаций.

Объём и структура работы

Диссертация изложена на 115 страницах и состоит из введения, 3 глав, заключения, выводов и списка литературы. Библиографический указатель состоит из 98 источников литературы. Диссертационная работа содержит 15 рисунков и 53 таблицы.

ГЛАВА 1

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Общая характеристика соматических и пассажирских мутаций

Соматические мутации – это мутации, которые могут возникать в любых клетках организма, кроме половых клеток (сперматозоидов и яйцеклеток) и поэтому, в отличие от герминальных мутаций, не передаются по наследству. Заболевания, ассоциированные возникновением соматических мутаций называются спорадическими (не наследственными).

В онкологии очень важным как с теоретической, так и с практической точки зрения является деление мутаций на драйверные и пассажирские. Драйверные мутации обычно определяются как мутации, вызывающие пролиферацию клеток и рост опухоли, в то время как мутации-пассажиры, составляющие примерно 97% всех мутаций опухолевой клетки, не вызывают этого [14]. Появление мутаций пассажиров в клетке не приводит к приобретению ею опухолевого фенотипа, тогда как мутация в драйверном гене может стать причиной злокачественной трансформации. Стоит отметить, что не любая мутация в гене является драйверной. Например только некоторые мутации в 18,19,20,21 экзонах гена EGFR при аденокарциноме легкого являются драйверными, в то время как подавляющее количество мутаций в других участках гена EGFR не приводит к необходимым для опухолевой трансформации изменениям [15].

Роль драйверных мутаций относительно понятна – они являются основой для злокачественной трансформации клеток, благодаря им клетка приобретает такие свойства, как инвазия и метастазирование, выживание в микроокружении. Драйверные мутации представляют опухолевым клеткам преимущество в клональном росте, то есть выживают преимущественно клетки, несущие драйверные мутации. В то же время «мутации-пассажиры» вносят куда меньший вклад в выживание опухолевых клеток и не дают преимущество в клональном

росте [16]. Все гены, имеющие значение для возникновения онкологического заболевания, делятся на две больших группы – протоонкогены и супрессоры. Такие гены, как *BRAF* и *KRAS*, являются протоонкогенами, поскольку при возникновении в них мутации происходит активация бесконтрольного роста и деления клетки, так как оба гена ответственны за синтез белков, участвующих в передаче сигнала в системе MAPK (mitogen-activated protein kinase). Гены-супрессоры, такие как *TP53*, *PTEN*, *CDKN2A*, *BRCA1/2* и др., являются антипролиферативными, для их полного выключения и, как следствие, опухолевой трансформации клетки, необходимы мутации обоих аллелей гена [17].

Как уже говорилось выше, пассажирские мутации не столь сильно влияют на клональную эволюцию как драйверные мутации, однако, современные исследования показывают, что «мутации-пассажиры» не являются однородной группой и могут отличаться между собой по своему влиянию на выживаемость опухолевой клетки. В исследовании Sushant Kumar et al., основанном на анализе крупных баз данных, включающих более 2500 полногеномных секвенирований различных опухолей, было показано, что мутации-пассажиры по своему воздействию на селекцию клеток опухоли делятся на две большие группы – не влияющие на селекцию (low-impact) и влияющие на клеточную селекцию (high-impact). Более того, последняя группа также дихотомически разделяется на позитивные и негативные мутации с точки зрения селекции опухолевых клеток [18] (Рисунок 1).

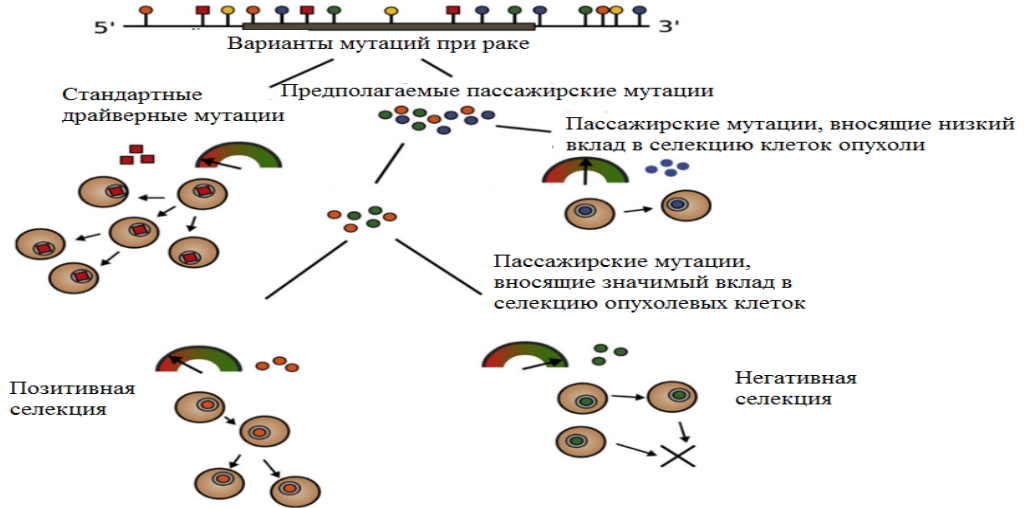


Рисунок 1 - Влияние соматических мутаций на селекцию клеток опухоли

Среди группы «мутаций-пассажиров», обладающих влиянием на опухолевую селекцию, статистически значимым более ранним событием в жизни опухолевой клетки было появление «мутаций-пассажиров» в генах-супрессорах опухоли и в генах, отвечающих за реализацию иммунного ответа. Это говорит о том, что мутации, хоть и пассажирские, в данных генах влияют на клональную эволюцию опухолевых клеток. [19] (Рисунок 2).



Рисунок 2 - Распределение «мутаций-пассажиров» по времени возникновения

В отличие от пассажирских мутаций, драйверные мутации являются причиной опухолевой трансформации и всегда присутствуют в родительском клоне опухолевых клеток, оказывая положительное влияние на селекцию опухолевых клеток, то есть клональную эволюцию. Драйверные мутации можно охарактеризовать как клональные, то есть они присутствуют во всех клетках потомках первичного опухолевого клона, в отличие от вторичных мутаций и «мутаций-пассажиров», которые, являясь субклональными, вносят свой вклад в проявление опухолевой гетерогенности [20].

В контексте всех соматических мутаций, встречающихся при НМРЛ, доля мутаций, являющихся точкой приложения для какого-либо специфического лечения остаётся очень небольшой. Всё же большинство соматических мутаций на данный момент несут только предиктивное клиническое значение, а для некоторых клиническое значение пока вообще не ясно. Яркий тому пример мутация *TP53*, которая является одной из наиболее частых при НМРЛ, как при аденокарциноме, так и при плоскоклеточном раке. На данный момент нет никаких таргетных препаратов, нацеленных на *TP53*, однако информация о наличии последней может дать полезную информацию относительно прогноза заболевания и эффективности некоторых видов лекарственного лечения. Интересным кажется изучение влияния мутационного профиля у пациентов, подвергшимся радикальному оперативному лечению, особенно с учетом бурно развивающихся исследований различных адъювантных режимов и вопросов их использования. Например, результаты известного клинического исследования ADAURA показали значительное преимущество в безрецидивной выживаемости в группе пациентов с *EGFR* мутированным радикально прооперированным НМРЛ, получавшим в адъюванте ингибитор *EGFR* III поколения осимертиниб. Интересно, что решение о проведении или не проведении стандартных 4-х курсов аПХТ перед началом приёма осимертиниба было отдано на усмотрение лечащего врача [21].

Таким образом, ни в результатах исследования, ни в клинических рекомендациях, основанных на его результатах, нет указаний, когда и кому нужно

проводить стандартную аПХТ перед приёмом осимертиниба, а кому нет. В данном контексте выявление у радикально прооперированных пациентов мутаций, влияющих на прогноз заболевания, таких как *TP53*, которая часто встречается вместе с мутацией *EGFR*, и многих других, может позволить определить группу повышенного риска прогрессирования и уже в этой группе пациентов применять усиленную четырьмя курсами аПХТ адъювантную таргетную терапию. То же самое может касаться применения атезолизумаба в адъювантном режиме после проведения 4-х курсов стандартной аПХТ. Исследование IMpower010 показало, что применение атезолизумаба в качестве дополнительной адъювантной терапии у радикально прооперированных пациентов с НМРЛ с экспрессией PD-L1 1% и более снизило риск рецидива на 34% [22] (Рисунок 3).

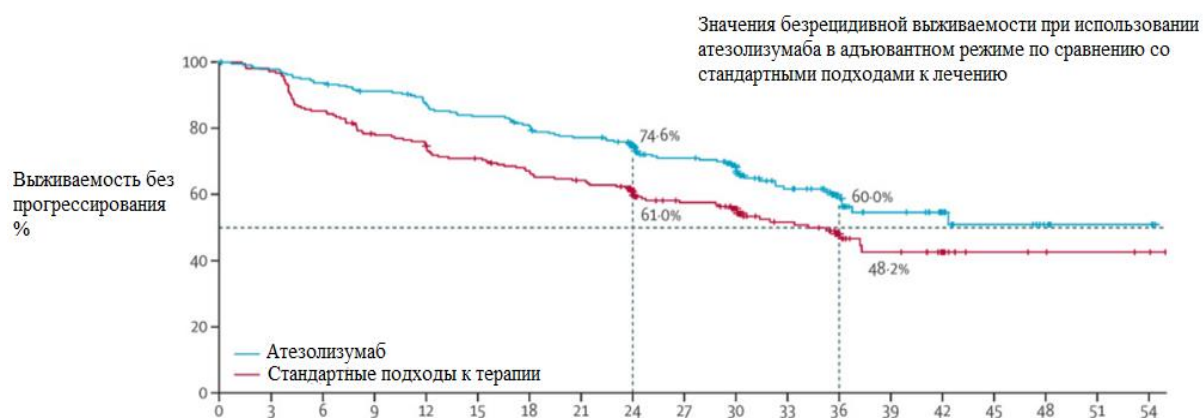


Рисунок 3 - Влияние атезолизумаба в адъювантном режиме на частоту прогрессирования заболевания после радикальной операции

На данный момент нет точного ответа на вопрос кто из пациентов получит преимущество от назначения 4 курсов аПХТ перед проведением иммунотерапии, а кто не получит. Возможно, определение мутационного профиля, включающего не только таргетные мутации, такие как ALK, EGFR и прочие, но и мутации прогноза, позволит более прецизионно назначать схемы адъювантного лечения.

1.2 Соматические мутации, характерные для немелкоклеточного рака лёгкого

При немелкоклеточном раке лёгкого, помимо основных, клинически значимых драйверных мутаций, таких как мутации в генах *EGFR*, *ALK*, *ROS1*, *BRAF*, *MET*, *RET*, *HER2*, *KRAS* и др., встречается и достаточно большое количество других мутаций, для которых на данный момент нет зарегистрированных лекарственных препаратов. К таким мутациям относятся мутации в генах: *KMT2C*, *STK11*, *TP53*, *EML4*, *ITGA9*, *FGFR1,2,3*, *SYNE1*, *MLLT10*, *WT1*, *ATM*, *ERBB3*, *LTK*, *NF1*, *BRCA1,2*, *AKT1,2,3*, *CHEK2*, *KDM5C*, *TAF1*, *TRIM33*, *IKBKE*, *TCF7L1*, *LRP1B*, *PMS1*, *PIK3CB*, *PIK3CA*, *KIT*, *ADAMTS2*, *NOTCH1,4*, *ETV1*, *ADGRA2*, *KAT6A*, *NBN*, *TSC1*, *RB1*, *CDH5*, *CDK12*, *CIC*, *DDR2*, *PTEN*, *COL1A1*, *COL22A1*, *MPL*, *PTGS2*, *MSH2,6*, *PDGFRA*, *GPC3*, *XPC*, *SLC34A2*, *NCOA4*, *HIP1*, *KIF5B*, *CDKN2A*, *NRAS*, *FYCO1*, *NBPF20*, *PBX1*, *ABL2*, *RNF2*, *PARP1*, *GOPC*, *SLC39A8* и некоторые другие.

Белок АКТ является одной из ключевых тирозинкиназ, играющих важную роль в функционировании сигнального пути PI3K-AKT-mTOR. Существует три изоформы данного фермента – АКТ1, АКТ2 и АКТ3 [23]. При НМРЛ могут наблюдаться активирующие мутации в гене *AKT* или гиперэкспрессия *AKT*. Гиперактивация АКТ встречается достаточно часто, по данным Binaifer R Balsara et al., из 110 пациентов с НМРЛ активация АКТ была выявлена у 56 человек (51%). Примечательно, что гиперактивация АКТ не зависела от морфологического типа опухоли и встречалась одинаково часто при аденокарциноме и плоскоклеточном раке. Активирующие мутации в гене *AKT* при НМРЛ встречаются достаточно редко – 0,41-1,9% случаев, по данным ряда исследований, в то время как гиперэкспрессия встречается значительно чаще – около 3-4% случаев [24].

Ген *PIK3A* кодирует строение каталитической субъединицы (белка p110 alpha (p110α)) фермента фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3K). Мутация в данном гене может встречаться как при плоскоклеточном НМРЛ, так и при

аденокарциноме. Частоты встречаемости мутации не велики – 3,7% по данным Matthias Scheffler et al., и мутации в этом гене наблюдаются чаще при плоскоклеточном раке чем при аденокарциноме – 8,9% и 2,9%, соответственно. Мутация в гене *PIK3A* приводит к повышенной активации фермента PI3K и следовательно к активации сигнального пути PI3K/AKT/mTOR в опухолевых клетках. Как и при гиперактивации AKT, описанной выше, по данным ряда работ было показано, что мутация в гене *PIK3A* была ассоциирована с повышенной частотой отдаленного метастазирования, что объясняется активацией одного и того же сигнального пути, ответственного в том числе за регуляцию инвазивного потенциала опухолевых клеток. Ещё одним сходством с альтерациями в гене *AKT* является то, что мутация в гене *PIK3A* может сочетаться с активирующими мутациями в генах *EGFR* и *KRAS*, что может говорить о некоторых взаимодействиях между этими двумя сигнальными путями (PIK3/AKT/mTOR и MAPK). Кроме того, присутствие мутации *PIK3A* у *EGFR*-мутированных пациентов может быть одним из механизмов резистентности к таргетной терапии. Помимо мутации в генах *EGFR* и *KRAS*, *PIK3A* также может сочетаться с другими мутациями, такими как *BRAF*, *DDR2*, *KRAS*, *MET*, *CTNNB1*, *NFE2L2*, *STK11*, *HER2*, амплификация *FGFR1*. Также было выявлено значительное количество случаев первично множественных метакронных злокачественных заболеваний у пациентов, носителей мутации *PIK3A* - у 42,9% исследованной группы (чаще всего встречался рак молочной железы, колоректальный рак, лимфомы) [25].

DDR2 – это ген, кодирующий рецепторную тирозинкиназу на поверхности клетки. Этот рецептор связывает с коллагеном клеточного микроокружения, после чего запускаются процессы миграции (активация эпителиально-мезенхимального перехода) и пролиферации клетки [26]. Всего в гене было обнаружено 11 мутаций, локализованных в различных доменах, включая L63V, I120M и D125Y в домене дискоидина 1, связывающего коллаген, L239R и G253C в домене дискоидина 2, G505S в цитозольном домене и C580Y, I638F, T765P, G774E и G774V в пределах киназного домена [27]. Мутация в данном гене встречается примерно в 4% случаев плоскоклеточного рака легкого, а также

достаточно редко при крупноклеточном раке легкого, может сочетаться с другими драйверными мутациями [28,29].

Ген *PTEN* кодирует фосфатазу с двойной субстратной специфичностью, то есть способной взаимодействовать с белками и липидами. Данный ген локализуется в 10 хромосоме и состоит из 9 экзонов. *PTEN* является опухолевым супрессором, участвующем в двух важных процессах – отрицательной регуляции PI3K/АКТ/mTOR сигнального пути посредством дефосфорилирования PIP3 до PIP2 и положительной регуляции активности протеина RAD51, участвующего в исправлении дефектов ДНК. Поскольку *PTEN* является опухолевым супрессором, дефекты в данном гене наблюдаются при различных злокачественных новообразованиях, таких как рак молочной железы, колоректальный рак, рак простаты, рак легкого и др [30]. Дефекты в гене *PTEN* (5-8 экзоны) встречаются примерно в 15% случаев плоскоклеточного рака и 3% аденокарциномы легкого. Примечательно, что потеря или снижение экспрессии белка, кодируемого геном *PTEN* встречается намного чаще, чем альтерации в гене *PTEN*. Результат нескольких исследований показал, что потеря или снижение экспрессии белка (продукта *PTEN*), по данным иммуногистохимического анализа встречались значительно чаще чем альтерация в самом гене – 59,8% (N 289), 42,4% (N 288), 21% (N 43), потеря или снижение экспрессии белка также чаще встречались при плоскоклеточном раке легкого с соотношением, близким к таковым при альтерациях в гене [31,32,33]. Такое различие в частотах мутаций в гене и снижением или потерей экспрессии белка может быть объяснено сложным и многоступенчатым механизмом эпигенетической регуляции экспрессии данного гена [34].

Ген *TP53* (состоит из 11 экзонов), являясь опухолевым супрессором, кодирует белок p53, который выполняет достаточно широкий спектр функций - регуляция клеточного роста и деления, апоптоза, устранение ошибок ДНК и др. Мутация в гене *TP53* обнаруживается в более чем 50% всех известных злокачественных новообразований, в том числе при немелкоклеточном раке легкого. Мутация в гене *TP53* является одной из наиболее часто встречающихся

при НМРЛ, по данным Ann R. Halvorsen et al., мутация в данном гене была выявлена в 46% случаев аденокарциномы рака легкого и 81% случаев плоскоклеточного рака легкого (мутация чаще наблюдалась у пациентов с длительным анамнезом курения) [35].

CDKN2A является геном супрессором опухоли, кодирующим структуру нескольких белков, наиболее изученные из которых p16(INK4A) и p14(ARF). Белок p16 взаимодействует с двумя другими протеинами - CDK4 и CDK6, которые активируют рост и пролиферацию клеток. При взаимодействии с CDK4/6 белками, p16 блокирует их активирующее воздействие и, тем самым предотвращает чрезмерный рост и деление клеток. Протеин p14 активирует факторы транскрипции белка p53 (продукта гена *TP53*), также демонстрируя антионкогенные свойства [33,34]. Наиболее часто при немелкоклеточном раке легкого встречается делеция в коротком плече 9 хромосомы. При аденокарциноме легкого данная мутация была выявлена в 42,9% случаев (N=371) [36].

FGFR – рецептор фактора роста фибробластов, вернее это группа рецепторов (FGFR1-4), которые являясь рецепторными тирозинкиназами, активируют некоторые сигнальные пути, такие как MAPK, PI3K/AKT/mTOR, о которых уже было сказано выше, и PLC γ – сигнальный каскад, активация которого также способствует клеточному росту и дифференцировке [37]. При раке легкого могут встречаться несколько видов альтераций в генах рецепторов FGFR – амплификация, точечные мутации и транслокации. Среди амплификаций чаще всего встречается амплификация *FGFR1* – от 7% до 22% случаев плоскоклеточного рака легкого и около 4% случаев аденокарциномы. Мутации в генах *FGFR 2/3* встречались примерно в 3% случаев плоскоклеточного рака легкого и ещё реже в случае аденокарциномы. Наиболее частыми мутациями, являются мутации внеклеточного домена W290C и S320C и мутации киназного домена K660E и K660N в *FGFR2*. Наиболее распространенные мутации *FGFR3* обнаруживаются в киназном домене (R248C и S249C). Транслокации (fusion) при НМРЛ встречаются редко, около 0,2% плоскоклеточного рака и 0,12%

аденокарциномы. Чаще всего встречается FGFR3-fusion (с участком гена ТААС) [38].

RICTOR (rapamycin-insensitive companion of mTOR) - белок, который является активной частью функционирования комплекса mTOR2, необходимым для его полноценной работы. Также, RICTOR является компонентом обратных связей в сигнальном пути PI3K/АКТ/mTOR. Усиление активности RICTOR приводит, опосредованной через повышение активность mTOR2, к чрезмерному росту и пролиферации клеток [39] (Рисунок 4).

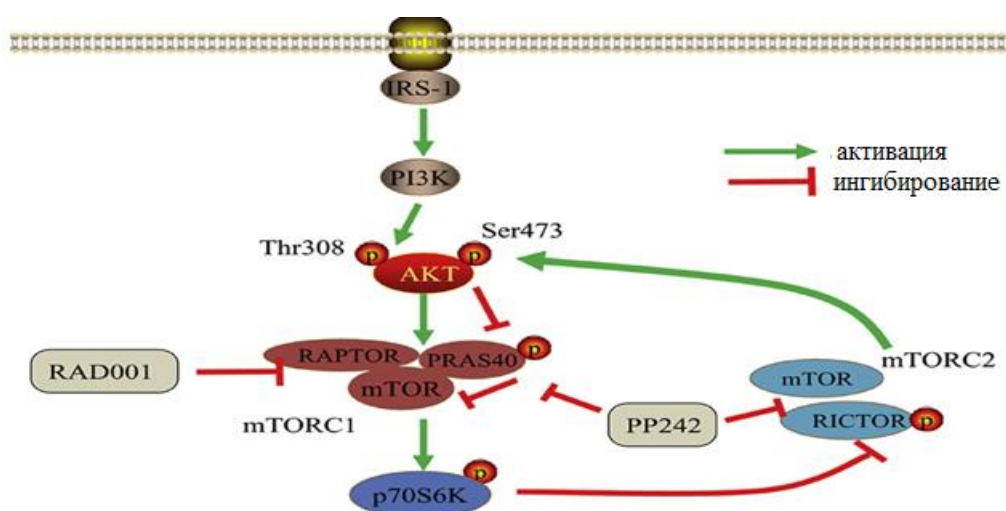


Рисунок 4 - Функции белка RICTOR в клетке

Ген, кодирующий белок RICTOR, находится в коротком плече 5-ой хромосомы. При НМРЛ достаточно часто может встречаться амплификация гена *RICTOR*. По данным Cancer Genome Atlas, около 13% немелкоклеточного рака легкого содержит данную амплификацию. На аденокарциному приходится около 14,3%, на плоскоклеточный рак легкого – 15,8%. Амплификация *RICTOR* может сочетаться с другими альтерациями в генах, участвующих в кодировании компонентов сигнального пути PI3K/АКТ/mTOR, кроме того амплификация *RICTOR* наблюдалась у пациентов с мутациями в генах *EGFR* и *KRAS* (26% и 14% соответственно) [40]. Интересный вывод предоставил Haiying Cheng с коллегами в своей работе, в которой было показано, что амплификация *RICTOR* чаще наблюдается в метастатических очагах в головном мозге. По данным этой работы

частота амплификации *RICTOR* в метастазах в головном мозге составила 9,73% против 7,3% в первичной опухоли и 3,5% в других очагах отдаленного метастазирования. [41]. Поскольку гиперфункция *RICTOR* связана с повышением активности mTOR, были попытки применения ингибиторов mTOR при лечении пациентов с амплификацией *RICTOR*. В 2015 году был опубликован клинический случай, в котором 18-летний пациент с аденокарциномой легкого (не курильщик) с амплификацией *RICTOR* в качестве единственной геномной альтерации получал лечение ингибиторами mTOR1/2 (I фаза клинического исследования). Лечение привело к стабилизации заболевания на 12 месяцев [42]. На данный момент никаких активных клинических исследований ингибиторов *RICTOR* не идет (по данным ClinicalTrials.gov), однако активно изучаются молекулярные механизмы *RICTOR* – индуцированного опухолевого генеза и способы воздействия на них.

SOX2 является геном, кодирующим фактор транскрипции, который в свою очередь регулирует транскрипцию большого количества генов, обуславливающих самообновление и плюрипотентность стволовых клеток. При немелкоклеточном раке легкого амплификация *SOX 2* чаще встречается при плоскоклеточном раке чем при аденокарциноме. По данным Theresia Wilbertz et al., при аденокарциноме амплификация *SOX2* выявляется в 6% случаев (причем только низкий уровень амплификации), тогда как при плоскоклеточном раке в 73-76%% случаев (8% выраженной амплификации и 65-68% низкий уровень амплификации) [43].

Ген *WT1* содержит инструкции для сборки белка, необходимого для развития почек и половых желез у эмбриона. После рождения активность белка *WT1* ограничена клубочками почек. Белок *WT1* играет роль в росте и процессе созревания клеток, а также в регуляции апоптоза. Для выполнения этих функций белок *WT1* регулирует активность других генов, присоединяясь (связываясь) к определенным областям ДНК. На основании этого действия белок *WT1* называют фактором транскрипции [44]. Экспрессия *WT1* при раке лёгкого встречается достаточно часто. Исследование показало, что гиперэкспрессия *WT1* была выявлена в 54/56 (96%) образцах немелкоклеточного рака лёгкого и 5/6 (83%) образцов мелкоклеточного рака лёгкого. Данная работа также показала, что

гиперэкспрессия данного гена встречалась независимо от гистологического типа опухоли [45].

NF1 – это онкосупрессор, который кодирует белок нейрофибромина, отвечающего за отрицательную регуляцию RAS-МАРК сигнального пути [46] (Рисунок 5).

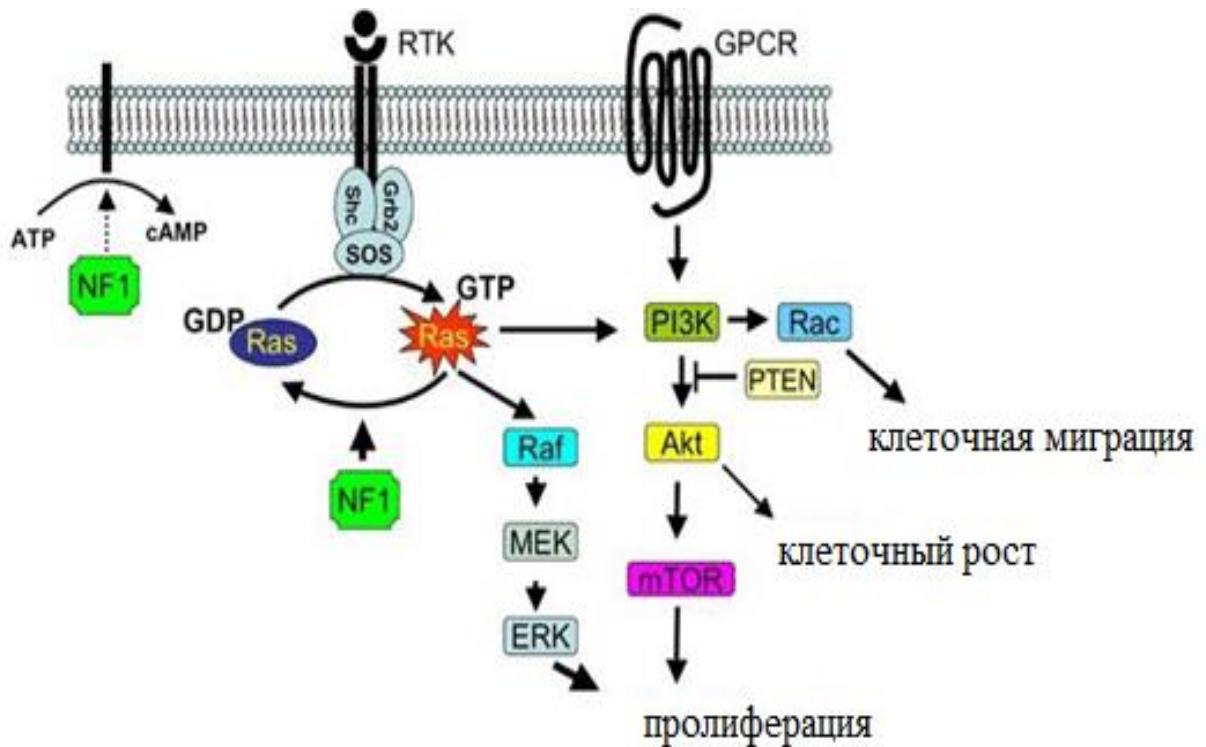


Рисунок 5 - Функции NF1 в регуляции сигнальных путей

Альтерации в гене *NF1* встречаются при многих злокачественных опухолях – меланома, рак лёгкого, рак молочной железы, опухоли центральной и периферической нервной системы. При немелкоклеточном раке лёгкого в гене *NF1* могут встречаться точечные мутации и делеции, точечные мутации встречаются чаще. Дефекты в данном гене встречаются примерно в 10% случаев НМРЛ и могут быть обнаружены как при аденокарциноме так и при плоскоклеточном раке легкого (при аденокарциноме встречаются чаще) [47]. По данным исследования Camille Tlemsani et al., точечные мутации в гене *NF1* могут сочетаться с дефектами таких генов как *EGFR*, *KRAS*, *TP53*, *PIK3CA*, *HER2*.

KIT – протоонкоген, кодирующий строение рецепторной тирозинкиназы CD117. Данная киназа активно экспрессируется на поверхности стволовых клеток гемопоэза, а также на клетках некоторых других тканей. Дефекты в данном гене приводят к повышенной активности и самоактивации данного рецептора, что приводит к неконтролируемому росту и пролиферации клеток. Альтерации в данном гене часто встречаются при гастроинтестинальных стромальных опухолях, семиномах, остром миелоидном лейкозе, меланоме, немелкоклеточном раке легкого и др. Согласно данным My Cancer Genome, при НМРЛ мутации в гене *KIT* в подавляющем большинстве случаев встречаются при аденокарциноме. Частота встречаемости мутаций *KIT* составляет около 3,5% случаев, по данным достаточно крупного исследования (N=402) [48]. В том же исследовании было выявлено, все мутации в гене *KIT* сочетались с мутациями в других генах, такими как *EGFR*, *TP53*, *HER2*.

TSC1, являясь онкосупрессором, кодирует белок гамартин, который, взаимодействуя с белком – продуктом гена *TSC2*, регулирует активность сигнального пути PI3C/АКТ/mTOR. По данным исследования, включившего в себя 1144 пациентов с НМРЛ, частота встречаемости мутации *TSC1* составила 2,36%, а *TSC2* – 3,50%. Данные мутации чаще встречались при аденокарциноме, чем при плоскоклеточном раке легкого - 53.7% против 46.3%. Чаще всего мутации в данных генах сочетались с мутациями в генах *TP53*, семейством *ERBB* и *KRAS* [49].

Ген *GPC3* локализуется на коротком плече 26 хромосомы и кодирует протеин, который регулирует рост и пролиферацию тканей посредством влияния на активность Wnt, YAP, Hedgehog, HGF и других сигнальных путей. Встречается данная мутация при таких злокачественных опухолях как гепатоцеллюлярный рак, рак легкого, меланома, рак щитовидной железы, яичников и др [50]. При НМРЛ мутация в гене *GPC3* может встречаться как при аденокарциноме, так и при плоскоклеточном раке легкого, однако, по данным My Cancer Genome, при аденокарциноме данная мутация встречается значительно чаще.

Гены *BRCA1/2* являются генами онкосупрессорами, которые вовлечены в процесс гомологичной репарации двунитевых разрывов ДНК. Мутации в данных генах достаточно распространены в онкологии и могут встречаться при раке яичников, молочной железы, поджелудочной железы, желчных путей, рака лёгкого и др. Мутации в данных генах могут быть как герминальными, так и соматическими. Соматические мутации встречаются при тех же опухолях, что и герминальные, но реже. Потенциально наличие клинически значимых мутаций (как герминальных, так и соматических) определяет высокую чувствительность опухоли к платиносодержащей терапии и к PARP ингибиторам, поскольку оба эти метода лечения нарушают и так дефектный аппарат репарации ДНК в *BRCA1/2* – мутированных опухолях [51]. Как уже было сказано выше, при немелкоклеточном раке лёгкого также могут выявляться герминальные и соматические мутации в генах *BRCA1/2*. К примеру, в исследовании Jordi Remon et al., из когорты пациентов с НМРЛ (N=379) у 8 пациентов была выявлена мутация в генах *BRCA* – 2 герминальные и 6 соматических. У двух пациентов герминальная мутация была выявлена в гене *BRCA2*, соматические мутации наблюдались в *BRCA1* – 2 и *BRCA2* – 4 случаев соответственно. В 7/8 случаев мутированная опухоль была аденокарциномой и в 1 случае это был плоскоклеточный рак лёгкого. У всех носителей мутаций в генах *BRCA1/2* также определялись ко-мутации, чаще всего это были *TP53* и *KRAS* [39]. В другой работе также была показана распространённость герминальных и соматических мутаций *BRCA1/2* в китайской популяции пациентов с немелкоклеточным раком лёгкого (N=9324). Среди данной группы 459 (4,9%) пациентов являлись *BRCA1/2* положительными (герминальные и соматические мутации). У большинства пациентов диагностирована аденокарцинома (372,81,1%). Распространённость соматических мутаций *BRCA1* и *BRCA2* была практически одинаковой (145, 1,56% и 169, 1,81% соответственно). Герминальные мутации *BRCA2* встречались чаще, чем герминальные мутации *BRCA1* (148, 1,59% против 20, 0,21%) [52]. Несмотря на активное использование PARP ингибиторов при *BRCA*-мутированном раке

яичников, пока нет убедительных данных о эффективности данного подхода при НМРЛ.

Ген *ERBB2* - это протоонкоген, кодирующий рецептор HER2, участвующий в передаче сигналов роста и деления клетки, посредством активации таких сигнальных путей как MAPK, PI3K/AKT/mTOR, STAT и др. Альтерации в гене *ERBB2* встречаются при раке молочной железы, аденокарциноме легкого, колоректальном раке и др. Наиболее распространенными изменениями в *ERBB2* являются мутации *ERBB2* (2,63%), амплификация *ERBB2* (3,30%). Альтерации гена *ERBB2* при аденокарциноме легкого встречаются примерно в 3,9% случаев [53]. По данным крупного исследования, включившего в себя 12946 пациентов с НМРЛ, которым был проведен анализ методов NGS, альтерации в гене *ERBB2* были выявлены у 2,5% случаев. Мутации *ERBB2* были выявлены в 1,5%, а амплификация в 1,1% случаев. Наиболее часто встречаемой мутацией была инсерция в 20 экзоне гена *ERBB2*. В 10 случаях было выявлено одновременное наличие и мутации и амплификации *ERBB2*. Восемь опухолей с *ERBB2* мутацией также имели мутацию в гене *EGFR* (L858R или exon19del) [54]. Другое крупное исследование (N=1934) показало частоту встречаемости мутаций и амплификации *ERBB2* 4,5%. Чаще альтерация *ERBB2* встречалась при аденокарциноме, чем при плоскоклеточном раке (65 против 17 соответственно). Мутации *ERBB2* практически поровну делились на мутации тирозинкиназного домена и остальных доменов – 42,5% и 57,5% соответственно. Стоит отметить, что клиническое значение мутаций в не тирозинкинажном домене пока точно не ясно.

MAP2K1(MEK1) - кодирует белок митоген-активируемую протеинкиназу 1 с двойной специфичностью. Как часть пути киназы MAP, MAP2K1 участвует во многих клеточных процессах, включая клеточную пролиферацию, дифференцировку и регуляцию транскрипции. Чаще всего мутации в гене *MAP2K1* встречаются при меланоме, НМРЛ, колоректальном раке, раке молочной железы [55]. При раке легкого данная мутация встречается достаточно редко (около 0,5% случаев) намного чаще встречается при аденокарциноме, чем при плоскоклеточном раке легкого [56]. На данный момент мутация в гене *MAP2K1*

рассматривается как один из потенциальных механизмов резистентности к таргетной терапии.

1.3 Влияние мутационного статуса на прогноз заболевания

В настоящее время не существует никаких предикторов вероятности рецидивирования или прогрессирования немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ) после радикального хирургического лечения. На длительность общей и безрецидивной выживаемости может указывать только стадия заболевания, установленная на основании гистологического исследования операционного материала. В этом контексте, а также учитывая все более возрастающую роль генетического тестирования у пациентов с локализованным НМРЛ (назначение адъювантной таргетной терапии), изучение корреляций генетического профиля и клинико-морфологических параметров опухоли, а также влияния соматических мутаций на прогноз заболевания становится все более актуальным направлением.

Исследования в этом направлении помогут улучшить диагностику и прогнозирование для больных с локализованным НМРЛ, что в свою очередь отразится на оптимизации тактики послеоперационного ведения таких пациентов.

Большинство соматических мутаций, встречающиеся при НМРЛ, не являются мишенями для таргетной терапии, однако могут быть полезными с клинической точки зрения если располагать данными об их влиянии на прогноз заболевания, о связи с клинико-морфологическими параметрами опухоли.

Ярким примером является соматическая мутация *TP53*. Было показано, что присутствие мутации в гене *TP53* у пациентов с локализованным раком легкого, подвергшихся радикальному хирургическому лечению, отрицательно влияло на продолжительность общей выживаемости при аденокарциноме - 49 против 54 месяцев, тогда как при плоскоклеточном раке легкого эффект обратный - 62 против 29 месяцев [57]. Прогноз также зависит от того, в каком экзоне локализуется мутация – мутации в 4 и 6 экзоне показали худший прогноз, чем мутации в 5,7,8,9 экзонах [58].

Наличие мутации *TP53* также коррелирует с ответом на моноиммунотерапию и комбинацию иммунотерапии с химиотерапией. По данным Shuhang Wang et al., пациенты с распространённым НМРЛ у которых выявлялась мутация *TP53* демонстрировали более длительную безрецидивную выживаемость по сравнению с группой *TP53* дикий тип - при моноиммунотерапии пациенты с мутацией *TP53* имели безрецидивную выживаемость (БРВ) 4,3 против 2,5 месяцев, при комбинированной схеме – БРВ составила 6,3 против 5,4 мес. соответственно [59].

Очень интересными являются свежие данные, касающиеся более детального изучения влияния мутаций в гене *TP53*, а именно экзонов, в которых происходит дефект. Так, было показано, что наибольшим прогностическим значением обладают мутации в 5 и 8 экзоне данного гена. Yutao Liu et al., в своей работе, посвященной изучению прогностической ценности мутации в разных экзонах гена *TP53* у пациентов с НМРЛ продемонстрировали, что пациенты с мутацией в 8 экзоне имели худшую общую выживаемость по сравнению с пациентами, имевшими мутации в других экзонах *TP53* [60]. Другая работа, также посвященная изучению прогностического значения мутаций в различных экзонах *TP53*, показала, что помимо мутаций в 8 экзоне, отрицательным прогностическим значением для пациентов с НМРЛ также обладает и мутация в 5 экзоне *TP53*. На группе из 214 пациентов с НМРЛ было показано, что пациенты с мутацией в экзоне 5 имели более короткую общую выживаемость (ОВ) ($p = 0,029$), а с мутацией в экзоне 8 - более короткую БРВ ($P = 0,003$) [61].

Ещё одной прогностически значимой мутацией при НМРЛ является мутация в гене *PTEN*. Сам ген является геном супрессором опухоли, регулирующим активность сигнального пути PI3K/АКТ/mTOR, поэтому дефект в нем ассоциируется с негативным прогнозом заболевания [62]. В подтверждение этому можно привести результаты крупного метаанализа, включившего в себя 2500 пациентов с НМРЛ (в том числе и с локализованным НМРЛ), в котором было показано, что пациенты с дефектом в гене *PTEN*, приведшим к снижению

экспрессии *PTEN* имели статистически значимый худший прогноз заболевания, в частности меньшую общую выживаемость [63] (Рисунок 6).

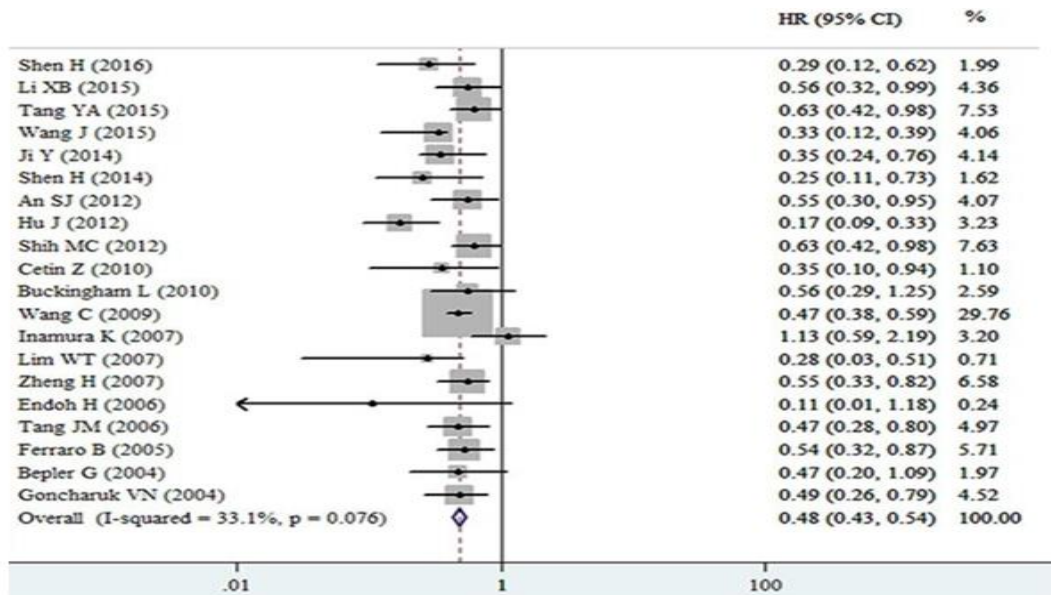


Рисунок 6 - Зависимость общей выживаемости от экспрессии гена *PTEN*

Альтерации в гене *EGFR* также вносят свой вклад в прогноз заболевания. В работе Angela Boros et al., было показано, что наличие мутаций в гене *EGFR* негативно влияло на безрецидивную выживаемость – медиана безрецидивной выживаемость составила 12 месяцев для пациентов с отсутствием мутаций и 9,6 месяцев - для пациентов с наличием одной из мутаций гена *EGFR* [64].

Очень интересна мутация *STK11* в контексте определения прогноза радикально прооперированных пациентов с НМРЛ. Изучение данной мутации показало, что очень большое значение имеет экзон, в котором произошла поломка. Так было показано, что мутации в 1 и 2 экзонах гена *STK11*, ассоциировались со значительным ухудшением общей выживаемости пациентов по сравнению с мутациями в других экзонах или с отсутствием мутаций *STK11*. При мутациях в 1-2 экзонах медиана общей выживаемости составила 24 месяца по сравнению с 69 месяцами для *STK11* дикий тип и 91 месяцем для пациентов с мутацией в в экзонах 3-9 *STK11* [65] (Рисунок 7).

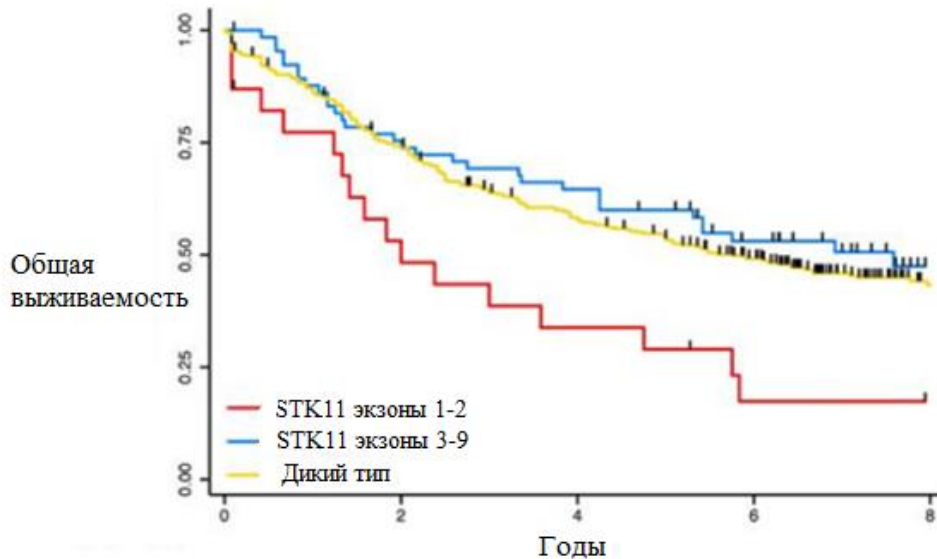


Рисунок 7 - Зависимость общей выживаемости от наличия мутации в разных экзонах *STK11*

Ещё одной интересной с точки зрения влияния на прогноз заболевания после радикального хирургического лечения локализованного НМРЛ является мутация в гене *KMT2D*, кодирующем строение лизин-специфической метилтрансферазы 2D. В работе, посвященной изучению его прогностической значимости, было показано, что у пациентов с мутацией в данном гене медианы общей и безрецидивной выживаемости были значительно ниже, чем у пациентов без данной мутации - пациенты с мутацией имели медиану ОВ 9,97 месяцев против 30.2 месяца, соответственно, а медиану БРВ – 8,46 против 24.1 месяца, соответственно. При проведении многофакторного анализа было показано, что данная мутация была одним из наиболее значимых прогностических факторов рецидива заболевания после радикального лечения. Также, авторами было отмечено, что мутация встречалась значительно чаще у женщин [66].

Мутация в гене *KRAS* также оказывает влияние на прогноз заболевания как при распространенном, так и при локализованном НМРЛ, являясь негативным фактором прогноза, связанным с уменьшением общей и безрецидивной выживаемости [67]. Исследование, в котором изучалась предиктивная роль соматических мутаций после радикального оперативного лечения НМРЛ также показало, что пациенты с мутацией в гене *KRAS* имели худшую безрецидивную

выживаемость чем пациенты без мутаций в гене *KRAS* и пациенты с мутациями в генах *EGFR* и *ALK*. В группе с наличием мутации в гене *KRAS* БРВ составила 6.0 месяцев, тогда как в группах с мутациями *EGFR/ALK* и у пациентов с отсутствием мутаций в данных генах БРВ составила 9,6 и 12.0 месяцев, соответственно [68].

Изучение прогностической ценности транслокаций в гене *ALK* у радикально прооперированных пациентов с локализованным НМРЛ показало, что наличие/отсутствие дефектов данного гена статистически значимо не влияло ни на безрецидивную выживаемость, ни на общую выживаемость. Liu и др., показали на когорте из 2103 пациентов, перенёсших радикальную резекцию, из которых 81 пациент был *ALK*-положительным, что транслокация *ALK* не была независимым прогностическим фактором при аденокарциноме легкого I–IIIА стадии [69]. В другом исследовании также была проанализирована прогностическая ценность транслокации *ALK* у пациентов с локализованным НМРЛ - пятилетняя выживаемость составила 81% и 77% для *ALK*-положительных и *ALK*-отрицательных пациентов, соответственно [70]. Что касается безрецидивной выживаемости, то, Paik et al. сообщили о медиане БРВ 76,4 месяца у *ALK*-положительных и 71,3 месяца у *ALK*-отрицательных пациентов, которые были радикально прооперированы по поводу НМРЛ I-IIIА стадии [71].

Помимо наличия той или иной соматической мутации, очень важным является и общее количество мутаций у пациента. Количество мутаций может рассматриваться как самостоятельный фактор прогноза заболевания. В исследовании Akihiro Tamiya et al., на когорте из 876 пациентов с НМРЛ, которые были разделены на две группы с 0 или 1 соматической мутацией и с 2 и более мутациями (всего панель содержала 72 соматических мутации), было показано, что группа с 2 и более мутациями имела статистически значимое уменьшение БРВ и ОВ по сравнению с пациентами, у которых не было выявлено соматических мутаций или была выявлена только одна [72].

Схожие данные были получены и при изучении частоты рецидива у радикально прооперированных пациентов с локализованным НМРЛ – увеличение частоты рецидива было ассоциировано с большим количеством субклональных

мутаций [73]. Объясняется данный феномен тем, что большее количество соматических мутаций связано с изменением копийности генов, которое является критическим событием, способствующим развитию и прогрессии злокачественного новообразования. Это находит подтверждение в результатах исследования TRACERx, в котором было показано, что увеличение альтераций копийности генов было статистически значимым отрицательным прогностическим фактором у прооперированных пациентов с НМРЛ - медиана безрецидивной выживаемости в группе с высокой долей субклональных альтераций копийности генов составила 24,4 месяца, тогда как в группе с низкой долей подобных субклональных изменений БРВ достигнута не была [74] (Рисунок 8).

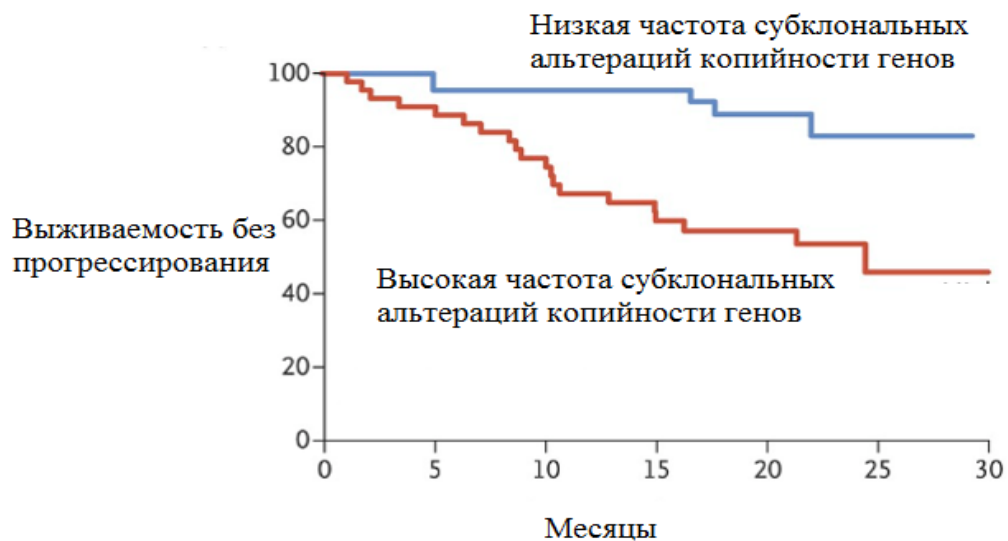


Рисунок 8 - Зависимость безрецидивной выживаемости от количества субклональных альтераций копийности генов

1.4 Методы определения соматических мутаций

Существует множество методов детекции мутаций в злокачественных опухолях. Методы определения могут значительно отличаться друг от друга по механизму своего действия, точности, количеству мутаций, которое можно

исследовать одновременно, а также по типу альтераций, которые можно посмотреть тем или иным методом.

Одним из самых частых и уже достаточно старых методов определения мутаций является полимеразная цепная реакция (ПЦР). Существует несколько типов ПЦР- тестирования, о которых мы поговорим чуть ниже.

Аллель-специфичная ПЦР – самая простейшая ПЦР (ПЦР в реальном времени) анализ, который позволяет с достаточной точностью может определить наличие того или иного мутантного аллеля, даже если его концентрация составляет 1-5%. Метод относительно дешёв и не требует наличия сложного оборудования. Из недостатков метода – невозможность детекции других мутаций в опухолевом материале даже при их наличии, поскольку необходимые для реакции праймеры строго комплементарны определенным (искомым) участкам ДНК. Это делает невозможным тестирование опухолевого материала на большое количество мутаций с помощью ПЦР методики. Также при помощи ПЦР теста невозможно определить изменения копийности гена (амплификация и др).

ПЦР также можно проводить, используя в качестве опухолевого материала циркулирующую опухолевую ДНК (цоДНК) в плазме. В таком случае будет использоваться цифровая капельная ПЦР (цкПЦР). В отличие от ПЦР в реальном времени, цкPCR способна выявлять дупликации, инсерции и вставки с большей чувствительностью.

Иммуногистохимический метод определения мутаций – основан на детекции экспрессии продуктов мутантного гена путём связывания с ними меченных антител (прямой метод) или путем связывания с ними антител с последующим связыванием с ними вторых меченных антител (непрямой метод).

Таким методом возможно определение транслокации *ALK*, гиперэкспрессии *HER2* и др.

Метод FISH (fluorescence in situ hybridization) – исследование, позволяющее определить качественные и количественные изменения хромосом. Данным методом можно определить транслокацию *ALK*, *ROS1*, амплификацию *HER2* -

уточняющий метод при неоднозначном результате ИГХ или самостоятельная методика.

Самым современным, точным и высокопроизводительным является метод секвенирования опухолевого материала [75]. Кроме того, секвенирование может отличаться по количеству искомым мутаций: секвенирование определенной панели генов (от десятков до сотен) или полногеномное/полноэкзомное секвенирование. Возможность одновременного тестирования большого количества различных генетических альтераций, что выгодно отличает секвенирование от других методов определения мутаций. Как и цкПЦР, можно проводить секвенирование цоДНК. Ну и конечно, одним из главных достоинств секвенирования является возможность детекции любых генетических альтераций – от небольших дупликаций или инсерций до транслокаций и инверсий. Ширина возможностей секвенирования зависит и от подтипа применяемого метода секвенирования, а именно: полногеномное секвенирование позволяет выявить любые типы мутаций, полноэкзомное – всё, кроме таких хромосомных мутаций, как транслокации, инверсии и крупные делеции, которые в принципе возможно уловить при помощи полногеномного секвенирования, однако это сопряжено со многими трудностями и может приводить к ошибкам. Индивидуальные (кастомные) панели для таргетного NGS в основном рассчитаны на детекцию точечных мутаций, небольших дупликаций, инсерций, делеций, однако при применении метода гибридизационного захвата, таргетное секвенирование способно выявлять изменения копияности генов и даже наиболее известные и часто встречающиеся хромосомные перестройки [76]. Таргетное секвенирование очень интересно в контексте составления панелей под определенные задачи тестирования, например, для оценки статуса минимальной резидуальной болезни после проведенного оперативного лечения. NGS цоДНК послеоперационной плазмы на основе панели, построенной после проведения NGS опухолевого материала позволяет определить наличие или отсутствие в плазме крови после операции тех или иных мутаций, присутствовавших в первичной опухоли и тем самым высказаться о радикальности проведенного лечения [77].

Таким образом, подводя итог вышеизложенному, можно сделать вывод о том, что информация не только о наличии в опухоли мутаций, для которых существует высокоэффективная таргетная терапия, но и о наличии мутаций, влияющих на прогноз заболевания, может иметь свои точки приложения. Дальнейшее изучение редких соматических мутаций при НМРЛ, а также соматических мутаций, для которых в настоящее время не существует лекарственной терапии, может в перспективе улучшить диагностику и прогнозирование течения заболевания у пациентов с НМРЛ.

ГЛАВА 2

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Общая характеристика больных

Работа основана на проспективном анализе группы из 90 пациентов с диагностированным локализованным немелкоклеточным раком лёгкого I-III стадий, прошедших радикальное оперативное лечение (с добавлением по показаниям неадьювантной или адьювантной полихимиотерапии) в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России в период с 2020 по 2021 гг. В исследование включены 62(68,9%) пациент мужского пола и 28(31,1%) - женского. Отношение мужчин/женщин 2,2: 1. Возраст пациентов варьировал от 28 до 77 лет (средний возраст $59,4 \pm 10,5$ лет, медиана 61 год) (Рисунок 9).

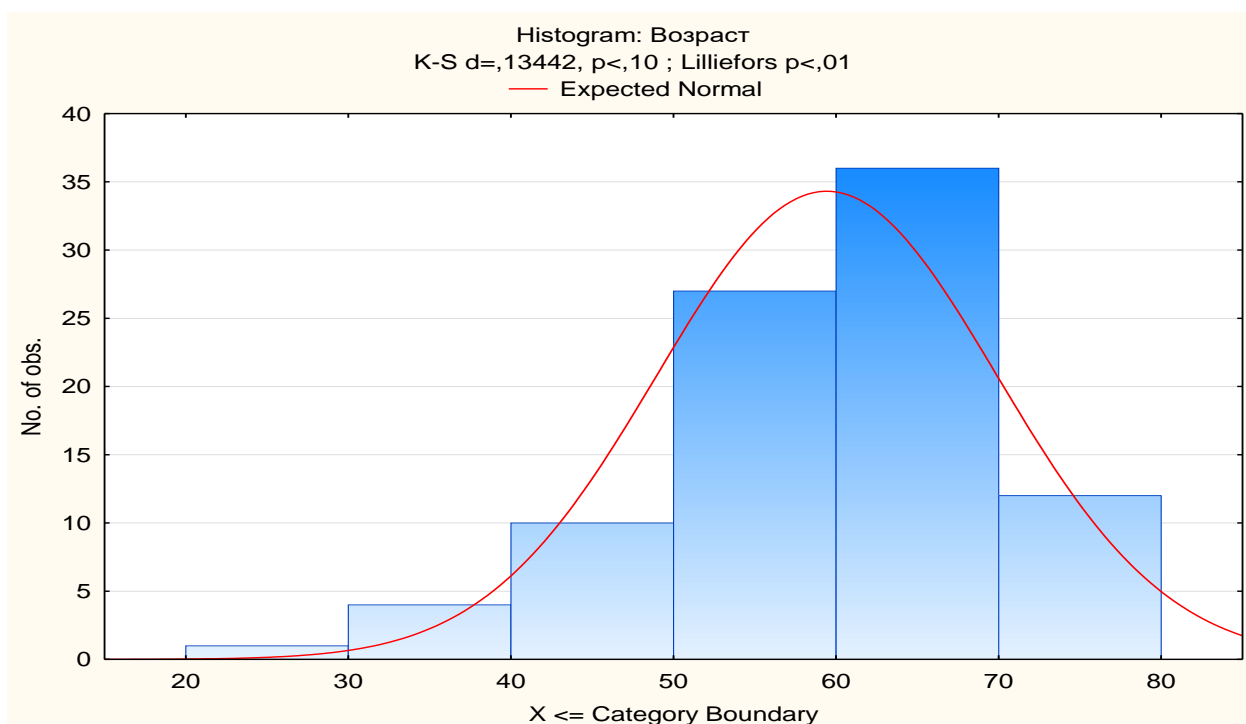


Рисунок 9 - Распределение пациентов в исследуемой группе по возрасту

Как видно из графика, представленного на рисунке 9, большинство пациентов были в возрасте от 50 до 70 лет.

Распределение пациентов в зависимости от пола и возраста представлено в таблице 1.

Таблица 1 - Распределение пациентов в зависимости от пола и возраста

Возраст	Мужчины		Женщины		Всего	
	абс.	%	абс.	%	Абс.	%
Число пациентов	62	68,9	28	31,1	90	100
До 40	3	4,8	2	7,2	5	5,6
41-50	6	9,7	4	14,3	10	11,1
51-60	18	29,0	9	32,1	27	30,0
61-70	27	43,6	9	32,1	36	40,0
Старше 70	8	12,9	4	14,3	12	13,3
Средний возраст	60,1±10,2		58,3±11,2		59,4±10,5	

Из таблицы видно, что средний возраст мужчин и женщин достоверно не отличался. Гистологически у 63 (70,0%) пациентов верифицирована аденокарцинома, у 27 (30,0%) - плоскоклеточный рак. Среднее время наблюдения за больными составило $27,8 \pm 6,6$ мес. (от 6,5 до 36,1 мес., медиана 29,1 мес.). Только оперативное лечение получил 51 (56,7%) пациент, 39(43,3%) – комбинированное лечение (Рисунок 10).



Рисунок 10 - Распределение пациентов в зависимости от вида проведенного лечения

Как видно представленных на рисунке 10 данных, примерно одинаковое количество пациентов получили только оперативное или комбинированное лечение. Общая характеристика пациентов в зависимости от вида лечения представлена в таблице 2.

Таблица 2 - Характеристика проведённого оперативного лечения в группах хирургического и комбинированного видов лечения

		Вид лечения				Всего	
		Хирургический		Комбинированный			
Число пациентов		51		39		90	
Пол	мужской	35	68,6%	27	69,2%	62	68,9%
	женский	16	31,4%	12	30,8%	28	31,1%
Вид операции	Сегментэктомия	2	3,9%	2	5,1%	4	4,4%
	Лоб/билобэктомия	45	88,2%	28	71,8%	73	81,1%
	Пульмонэктомия	4	7,9%	9	23,1%	13	14,5%

В группе комбинированного лечения 17/39 (43,6%) получили неоадьювантную ХТ, 22(56,4%) – адьювантную химиотерапию.

Распределение по стадиям, гистологическому типу, возрасту и статусу курения в зависимости от проведенного типа лечения представлено в таблице 3.

Таблица 3 - Распределение по стадиям, гистологическому типу, возрасту и статусу курения в зависимости от проведённого вида лечения

		Вид лечения				Всего	
		Хирургический		Комбинированный			
Число пациентов		51		39		90	
Морфология	аденокарцинома	38	74,5%	25	64,1%	63	70,0%
	плоскоклеточный	13	25,5%	14	35,9%	27	30,0%
Стадия	I	29	56,9%	5	12,8 %	34	37,8%
	IIa	10	19,6%	2	5,1 %	12	13,3%
	IIb	9	17,6%	17	43,6 %	26	28,9%
	III	3	5,9%	15	38,5 %	18	20,0%
Курение		32	62,8%	22	56,4%	54	60,0%
Средний возраст		62,5±8,2		55,4±11,8		59,4±10,5	

И в группе только хирургического лечения, и в группе комбинированного лечения преобладали пациенты с аденокарциномой, в группе только хирургического лечения ожидаемо преобладали пациенты с I-IIa стадиями заболевания, тогда как в группе комбинированного лечения ожидаемо преобладали пациенты с IIb-IIIa стадиями.

В таблице 4 представлена количественная характеристика основных клинически значимых соматических мутаций (*EGFR*, *ALK*, *ROS1*, *BRAF*), выявленных в исследуемой популяции пациентов.

Таблица 4 - Количество клинически значимых мутаций в генах *EGFR*, *ALK*, *ROS1*, *BRAF*

Наименование мутации	<i>EGFR</i> (19-21 экзоны)	<i>ALK</i> транслокация	<i>ROS1</i> транслокация	<i>BRAF</i> 15 экзон
Количество пациентов с выявленной мутацией	15 (16,7%)	3 (3,3%)	2 (2,2%)	1 (1,6%)

Частоты мутаций в представленных генах в нашем исследовании были близки к общемировым данным.

2.2 Методы исследования

Парафиновые блоки, полученные после оперативного вмешательства, с подтвержденным диагнозом НМРЛ подвергались на генетическому тестированию. Генетическое тестирование проводилось методом секвенирования нового поколения (NGS Hybridization capture). Использовалась кастомная панель из 80 генов, мутации в которых встречались при немелкоклеточном раке лёгкого - *KMT2C*, *STK11*, *KRAS*, *TP53*, *ALK*, *EML4*, *ITGA9*, *FGFR1,2,3*, *SYNE1*, *MLLT10*, *WT1*, *ATM*, *ERBB2,3*, *LTK*, *NF1*, *BRCA1,2*, *AKT1,2,3*, *CHEK2*, *KDM5C*, *TAF1*, *TRIM33*, *IKBKE*, *TCF7L1*, *LRP1B*, *PMS1*, *PIK3CB*, *PIK3C2B*, *PIK3CA*, *KIT*, *ADAMTS2*, *NOTCH1,4*, *ROS1*, *ETV1*, *ADGRA2*, *KAT6A*, *NBN*, *TSC1*, *RB1*, *CDH5*,

CDK12, CIC, DDR2, BRAF, PTEN, NTRK1,2,3, COL1A1, COL22A1, MPL, PTGS2, MSH2,6, PDGFRA, EGFR, GPC3, XPC, SLC34A2, NCOA4, HIP1, KIF5B, CDKN2A, NRAS, MET, FYCO1, NBP20, PBX1, ABL2, RNF2, PARP1, GOPC, SLC39A8, RET). ДНК из образцов ткани выделяли с помощью набора QIAamp DNA FFPE Tissue Kit согласно протоколу фирмы производителя. Далее производился биоинформатический анализ полученных данных - файлы FASTQ обрабатывались для удаления адаптеров, с 3'-конца удалялись все N и буквы с качеством менее 15 методом "скользящего окна" (размер окна 6 нуклеотидов). Полностью удалялись все прочтения, содержащие более 40% нуклеотидов с качеством менее 15, и прочтения длиной менее 36. Затем выполнялось картирование на геном с помощью алгоритма BWA-MEM и последующее удаление дубликатов. Проводилась рекалибровка значений качества с помощью инструмента BaseRecalibrator, затем поиск вариантов с помощью алгоритмов DRAGEN, Strelka2 и HaplotypeCaller/Mutect2 из GATK4. Получившиеся VCF-файлы объединяли с удалением дублирующихся строк. Постобработка вариантов проводилась с помощью предобученной нейронной сети (CNNScoreVariants, модель 2D) и с помощью индивидуальных фильтров по качеству. Варианты аннотировались по следующим источникам данных: RefSeq, LRG/MANE, dbSNP, gnomAD, OMIM, ClinVar, HGMD (публичная), алгоритмы предсказания патогенности SIFT, PolyPhen HDIV/HVAR, Mutation Taster, FATHMM, CADD, DANN, M-CAP, REVEL, BayesDel, ClinPred, LIST-S2.

После получения результатов генетического тестирования каждого пациента материалы были занесены в сводную таблицу для оценки комутационного статуса и последующей статистической обработки.

Следующим этапом данной работы было динамическое наблюдение за пациентами в течение 2-х лет от начала противоопухолевого лечения. В течение двух лет каждые три месяца пациенты проходили контрольное обследование в виде компьютерной томографии органов грудной и брюшной полости с внутривенным контрастированием. Каждые 6 месяцев пациенты выполняли МРТ головного мозга с в/в контрастированием. Другие методы обследования, такие как

сцинтиграфия костей скелета, однофотонная эмиссионная компьютерная томография, ультразвуковое исследование различных локализаций, позитронно-эмиссионная компьютерная томография всего тела проводились по клиническим показаниям в случае необходимости.

По результатам наблюдения за пациентами оценивались общая и безрецидивная выживаемость, локализация местного или отдалённого рецидива заболевания.

2.3 Статистическая обработка результатов

Статистическая обработка материала и расчеты показателей проведены с использованием компьютерной программы электронных таблиц “Microsoft Excel, Statistica for Windows v.10 Ru, SPSS 21 for Windows.

Достоверность различий между количественными показателями вычисляли по критерию t Стьюдента для нормально распределенных величин или по непараметрическому критерию Манна-Уитни.

Для сравнения качественных параметров применяли точный критерий Фишера и χ^2 . Различия считали значимыми при $p < 0,05$ (95% точности), для обозначения тенденции к статистической значимости также использовали значимость $0,05 < p < 0,1$.

Степень взаимосвязи параметров оценивали с помощью корреляционного анализа Спирмена. Использовали результаты одно- и многофакторного регрессионного анализа.

Определение критических точек с оптимальным соотношением чувствительности и специфичности выполняли методом построения ROC-кривой.

Показатели выживаемости рассчитывали из реальных данных о длительности жизни каждого больного на момент завершения исследования с использованием метода Каплана-Мейера.

Оценивали общую выживаемость и безрецидивную выживаемость.

Достоверность различий выживаемостей в группах рассчитывали по log-rank test. Проводили регрессионный анализ по Коксу.

ГЛАВА 3

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Всего в исследовании было проанализировано 218 экзонов 80 генов. Ниже представлена таблица, в которой указаны частоты мутаций в генах по убыванию, не зависимо от гистологического типа опухоли (отдельно были выделены транслокации в генах *ALK* и *RET* для того, чтобы они не были спутаны с соматическими мутациями в аналогичных генах). Все мутации были распределены на три группы в зависимости от частоты встречаемости не зависимо от гистологического типа опухоли. Границы, на основании которых происходило разделение на группы по частоте встречаемости были выбраны для более наглядного представления полученных данных и получения более однородных групп. В таблице 5 представлены наиболее часто встречающиеся соматические мутации независимо от гистологического типа опухоли.

Таблица 5 - Соматические мутации, встречающиеся с частотой от 6,6 % до 47,7%, независимо от гистологического типа опухоли

Ген	Частоты встречаемости мутаций	
	Абс.	%
<i>TP53</i>	43	47,7
<i>KRAS</i>	18	20,0
<i>EGFR</i>	13	14,4
<i>FGFR3</i>	13	14,4
<i>CDKN2A</i>	11	12,2
<i>STK11</i>	10	11,1
<i>TSC1</i>	9	10,0
<i>RBI</i>	8	8,9
<i>PTEN</i>	7	7,8
<i>NF1</i>	7	7,8
<i>BRCA1</i>	7	7,8
<i>ERBB2</i>	7	7,8
<i>COL22A1</i>	6	6,6

Наиболее частыми мутациями вне зависимости от гистологического подтипа опухоли оказались мутации в генах *TP53*, *KRAS*, *EGFR*. Выявленные мутации в гене *ERBB2* не являлись клинически значимыми (не чувствительны к таргетной терапии).

В таблице 6 представлены соматические мутации, встретившиеся с частотой от 3,3% до 5,6% в исследованной группе пациентов.

Таблица 6 - Соматические мутации встречающиеся с частотой от 3,3% до 5,6% независимо от гистологического типа опухоли

Ген	Частоты встречаемости мутаций	
	Абс.	%
<i>GPC3</i>	5	5,6
<i>PIK3CA</i>	5	5,6
<i>HIP1</i>	4	4,4
<i>KIT</i>	4	4,4
<i>FGFR1</i>	4	4,4
<i>CDK12</i>	4	4,4
<i>NTRK3</i>	4	4,4
<i>BRAF</i>	4	4,4
<i>ALK</i> транслокация	3	3,3
<i>TRIM33</i>	3	3,3
<i>PIK3CB</i>	3	3,3
<i>COL1A1</i>	3	3,3
<i>PDGFRA</i>	3	3,3
<i>FYCO1</i>	3	3,3
<i>DDR2</i>	3	3,3

В приведенной выше таблице практически не оказалось клинически значимых мутаций, за исключением мутаций в гене *BRAF* (из 4 мутаций в 15 экзоне была только одна клинически значимая, что будет отражено в последующих материалах), а также *ALK*-транслокации.

В таблице 7 представлены мутации, частота выявления которых стала самой низкой – менее 3,3% случаев.

Таблица 7 - Соматические мутации встречающиеся с частотой менее 3,3% независимо от гистологического типа опухоли

Ген	Частоты встречаемости мутаций	
	Абс.	%
<i>BRCA2</i>	2	2,2
<i>KDM5C</i>	2	2,2
<i>TAF1</i>	2	2,2
<i>XPC</i>	2	2,2
<i>IKBKE</i>	2	2,2
<i>TCF7L1</i>	2	2,2
<i>LRP1B</i>	2	2,2
<i>PMS1</i>	2	2,2
<i>ADAMTS2</i>	2	2,2
<i>NOTCH4</i>	2	2,2
<i>ROS1</i> транслокация	2	2,2
<i>ETV1</i>	2	2,2
<i>ADGRA2</i>	2	2,2
<i>CDH5</i>	2	2,2
<i>CIC</i>	2	2,2
<i>MSH6</i>	2	2,2
<i>NCOA4</i>	2	2,2
<i>MET</i>	2	2,2
<i>NTRK1</i>	2	2,2
<i>ITGA9</i>	1	1,1
<i>SYNE1</i>	1	1,1
<i>MLLT10</i>	1	1,1
<i>ATM</i>	1	1,1
<i>ERBB3</i>	1	1,1
<i>LTK</i>	1	1,1
<i>AKT3</i>	1	1,1
<i>MPL</i>	1	1,1
<i>PTGS2</i>	1	1,1
<i>MSH2</i>	1	1,1
<i>ABL2</i>	1	1,1
<i>GOPC</i>	1	1,1
<i>RET</i> транслокация	1	1,1

Продолжение таблицы 7

<i>SDC4</i>	1	1,1
<i>AKT1</i>	1	1,1

В данную группу соматических мутаций входили такие клинически значимые мутации, как транслокация в гене *RET* и *ROS1*. Также все выявленные мутации были разделены по пяти уровням в зависимости от доказательной базы их терапевтического значения (Руководство по интерпретации клинически значимых нуклеотидных вариантов при солидных опухолях с целью выбора тактики терапии и представлению результатов, полученных методов секвенирования следующего поколения (NGS) 2022г.) (Таблица 8).

Таблица 8 - Классификация соматических мутаций в зависимости от их терапевтического значения

Уровень А	Уровень В	Уровень С	Уровень D	Уровень Е
<i>KRAS, EGFR, ERBB2, BRAF, MET, ALK</i> транслокация, <i>ROS1</i> транслокация	<i>RET</i> транслокация	-	<i>PIK3CA, KIT, PDGFRA, ABL2</i>	<i>TP53, STK11, NF1, TSC1, RB1, COL22A1, CDKN2A, PTEN, DDR2, GPC3, XPC, NTRK1,2,3, HIP1, FGFR1,2,3, AKT1, CDK12, BRCA1,2, TRIM33, PIK3CB, COL1A1, FYCO1, KDM5C, TAF1, IKBKE, TCF7L1, LRP1B, PMS1, ADAMTS2, NOTCH4, ETV1, ADGRA2, CDH5, CIC, MSH6, NCOA4, ITGA9, SYNE1, MLLT10, ATM, ERBB3, LTK, AKT1,3, MPL, PTGS2, MSH2, GPC3, SDC4</i>

Как видно из выше представленной таблицы, большинство выявленных соматических мутаций не являлись мишенями для какой-либо таргетной терапии, и, следовательно, были отнесены к категории Е.

3.1 Зависимость между молекулярно-генетическими и клинико-морфологическими параметрами опухоли

При разделении пациентов в зависимости от гистологического подтипа и также ранжировании мутаций по частоте встречаемости, были созданы три группы с максимально схожими границами разделения по отношению к аналогичным группам при разделении мутаций по частоте встречаемости независимо от гистологического подтипа опухоли. Для аденокарциномы данные представлены в таблицах 9, 10, 11. Границы, на основании которых происходило разделение на группы по частоте встречаемости, также были выбраны для более наглядного представления полученных данных и получения более однородных групп.

Таблица 9 - Соматические мутации, встречающиеся при аденокарциноме с частотой 9,5%-41,3%

Ген	Частоты встречаемости мутаций	
	Абс.	%
<i>TP53</i>	27	42,8
<i>KRAS</i>	18	28,1
<i>EGFR</i>	13	20,1
<i>FGFR3</i>	10	15,9
<i>STK11</i>	7	11,1
<i>CDKN2A</i>	6	9,5

Наиболее часто встречающимися при аденокарциноме мутациями были мутации в генах *TP53*, *KRAS*, *EGFR*, *FGFR3* что повторяло наиболее часто встречающиеся мутации независимо от гистологического подтипа опухоли.

В группу, представленную в таблице 10, включены в основном клинически не значимые соматические мутации, за исключением одной мутации в 15 экзоне гена *BRAF*.

Таблица 10 - Соматические мутации, встречающиеся при аденокарциноме с частотой 4,8% – 7,9%

Ген	Частоты встречаемости мутаций	
	Абс.	%
<i>TSC1</i>	5	7,9
<i>ERBB2</i>	5	7,9
<i>RBI</i>	5	7,9
<i>BRAF</i>	4	6,3
<i>NF1</i>	4	6,3
<i>GPC3</i>	4	6,3
<i>NTRK3</i>	3	4,8
<i>FGFR1</i>	3	4,8
<i>COL1A1</i>	3	4,8
<i>PDGFRA</i>	3	4,8
<i>PIK3CA</i>	3	4,8
<i>COL22A1</i>	3	4,8
<i>BRCA1</i>	3	4,8

В группу, представленную в таблице 11, вошли такие клинически значимые мутации как транслокация в генах *RET*, *ALK*, *ROS1*.

Таблица 11 - Соматические мутации, встречающиеся при аденокарциноме с частотой 1,6% – 3,2%

Ген	Частоты встречаемости мутаций	
	Абс.	%
<i>PTEN</i>	2	3,2
<i>HIP1</i>	2	3,2
<i>NTRK1</i>	2	3,2
<i>CDK12</i>	2	3,2
<i>ALK</i> транслокация	2	3,2
<i>KDM5C</i>	2	3,2
<i>TAF1</i>	2	3,2
<i>ROS1</i> транслокация	2	3,2
<i>MSH6</i>	2	3,2
<i>XPC</i>	1	1,6

<i>BRCA2</i>	1	1,6
<i>DDR2</i>	1	1,6
<i>TRIM33</i>	1	1,6
<i>PIK3CB</i>	1	1,6
<i>FYCO1</i>	1	1,6
<i>ETV1</i>	1	1,6
<i>NCOA4</i>	1	1,6
<i>MET</i>	1	1,6
<i>KIT</i>	1	1,6
<i>ITGA9</i>	1	1,6
<i>SYNE1</i>	1	1,6
<i>MLLT10</i>	1	1,6
<i>ERBB3</i>	1	1,6
<i>LTK</i>	1	1,6
<i>AKT3</i>	1	1,6
<i>MPL</i>	1	1,6
<i>PTGS2</i>	1	1,6
<i>MSH2</i>	1	1,6
<i>ABL2</i>	1	1,6
<i>RNF</i>	1	1,6
<i>GOPC</i>	1	1,6
<i>RET</i> транслокация	1	1,6
<i>AKT1</i>	1	1,6

В таблице 12 представлены наиболее часто встречающиеся Соматические мутации при плоскоклеточном раке легкого. Как видно из полученных данных, чаще всего при плоскоклеточном раке лёгкого встречалась мутация *TP53*, как и при аденокарциноме, далее располагались мутации в генах *PTEN*, *CDKN2A*, *TSC1* и другие. Как и в случае аденокарциномы, сравнительно чаще других при плоскоклеточном раке встречались мутации в генах *CDKN2A*, *STK11*, *FGFR3*.

Таблица 12 - Соматические мутации, встречающиеся при плоскоклеточном раке лёгкого с частотой 11,1% – 55,6%

Ген	Частоты встречаемости мутаций	
	Абс.	%
<i>TP53</i>	16	59,2
<i>PTEN</i>	5	18,5

Продолжение таблицы 12

<i>CDKN2A</i>	5	18,5
<i>TSC1</i>	4	14,8
<i>BRCA1</i>	4	14,8
<i>RBI</i>	3	11,1
<i>COL22A1</i>	3	11,1
<i>NF1</i>	3	11,1
<i>STK11</i>	3	11,1
<i>FGFR3</i>	3	11,1
<i>KIT</i>	3	11,1

В таблице 13 приведены мутации, выявленные в 7,4% случаев у пациентов с плоскоклеточным раком легкого.

Таблица 13 - Соматические мутации, встречающиеся при плоскоклеточном раке лёгкого с частотой 7,4%

Ген	Частоты встречаемости мутаций	
	Абс.	%
DDR2	2	7,4
PIK3CA	2	7,4
HP1	2	7,4
ERBB2	2	7,4
CDK12	2	7,4
TRIM33	2	7,4
PIK3CB	2	7,4
FYCO1	2	7,4
IKBKE	2	7,4
TCF7L1	2	7,4
LRP1B	2	7,4
PMS1	2	7,4
ADAMTS2	2	7,4
NOTCH4	2	7,4
ADGRA2	2	7,4
CDH5	2	7,4
CIC	2	7,4

В таблице 14 представлены все мутации, которые встречались при плоскоклеточном раке легкого по 1 разу.

Таблица 14 - Соматические мутации, встречающиеся при плоскоклеточном раке лёгкого с частотой 3,7%

Ген	Частоты встречаемости мутаций	
	Абс.	%
FGFR1	1	3,7
ETV1	1	3,7
NCOA4	1	3,7
SDC4	1	3,7
GPC3	1	3,7
NTRK3	1	3,7
BRCA2	1	3,7
XPC	1	3,7

Полученные данные о частоте встречаемости соматических мутаций среди пациентов с аденокарциномой и плоскоклеточным раком легкого в целом соответствовали общемировым. Наиболее часто встречающейся мутацией среди обоих гистологических подтипов ожидаемо стала мутация в гене *TP53*, далее по частоте встречаемости среди пациентов с аденокарциномой шли мутации в гене *KRAS* и *EGFR* и *FGFR3*, что также было весьма характерно. Частота встречаемости более редких, но клинически значимых мутаций, таких как транслокация *ALK*, *ROS1*, *RET*, мутаций в генах *BRAF* в нашем исследовании была близка к общемировым – *ALK* (3,2% vs 5-6%), *ROS1* (3,2% vs ~2%), *BRAF* (клинически значимый 15 экзон 1,6% vs ~2%), *RET* (1,6% vs ~1%).

Среди пациентов с плоскоклеточным раком лёгкого второе и третье места занимали мутации в гене *PTEN* и *CDKN2A* – по 18,5%, что несколько чаще по сравнению с мировой статистикой: ~10% и ~8% соответственно. Четвёртое место по частоте встречаемости в нашей группе пациентов заняла мутация в гене *TSC1* – 14,8% случаев, что сильно отличается в большую сторону от мировой статистики (~2-4%), что может объясняться особенностями Российской популяции пациентов, а также сравнительно небольшим объёмом исследуемой группы пациентов с плоскоклеточным НМРЛ.

Более редкие по частоте мутации как при аденокарциноме, так и при плоскоклеточном раке лёгкого будут более подробно обсуждены в главе «Обсуждение».

После получения информации о мутационном ландшафте опухоли в группах пациентов с аденокарциномой и плоскоклеточным раком лёгкого был проведён анализ частоты встречаемости дефектов различных экзонов мутированных генов (Таблицы 15, 16).

Таблица 15 - Частоты встречаемости мутаций в различных экзонах исследуемых генов при аденокарциноме

Ген	Экзон	Аденокарцинома	
		Абс.	%
<i>TP53</i>	5	10	15,9
<i>KRAS G12C</i>	2	7	11,1
<i>EGFR</i>	19	6	9,5
<i>CDKN2A</i>	1	6	9,5
<i>TP53</i>	8	5	7,9
<i>KRAS G12D</i>	2	5	7,9
<i>TP53</i>	4	3	7,7
	6	4	6,4
	7	4	6,4
<i>EGFR</i>	21	4	6,4
<i>STK11</i>	6	4	6,4
<i>FGFR3</i>	7	4	6,4
<i>FGFR3</i>	2	4	6,4
<i>KRAS G12V</i>	2	4	6,4
<i>EGFR</i>	20	3	4,8
<i>TSC1</i>	20	3	4,8
<i>GPC3</i>	1	3	4,8
<i>PDGFRA</i>	17	3	4,8
<i>STK11</i> 7 экз, <i>NF1</i> 17,26 экз, <i>TSC1</i> 13 экз, <i>RB1</i> 19 экз, <i>ERBB2</i> 20, 23 экз, <i>BRCA1</i> 10 экз, <i>PIK3CA</i> 10 экз, <i>PTEN</i> 8 экз, <i>NTRK3</i> 17 экз, <i>FGFR1</i> 1 экз, <i>CDK12</i> 2 экз, <i>ALK</i> транслокация, <i>KRAS</i> 4 экз, <i>KDM5C</i> 23 экз, <i>TAF1</i> 25 экз, <i>ROS1</i> транслокация, <i>MSH6</i> 10 экз, <i>HIP1</i> 28 экз	-	по 2 случая в каждом представленном экзоне	3,2%

<i>TP53 10 экз, STK11 9 экз, FGFR3 6,10 экз, RB1 6,17,18 экз, COL22A1 3,7,8 экз, ERBB2 14,19 экз, BRCA1 15,21 экз, PIK3CA 4,5 экз, DDR2 18 экз, BRAF 10.11,13,15 экз, NTRK3 20 экз, GPC3 4 экз, BRCA2 14 экз, KIT 6 экз, NTRK1 8,9 экз, XPC 8 экз, FGFR1 7, 10 экз, AKT1 8 экз, TRIM33 4 экз, PIK3CB 2 экз, COL1A1 2,16,24 экз, MET 6 экз, FYCO1 8 экз, ETV1 8 экз, NCOA4 9 экз, ITGA9 12 экз, SYNE1 40 экз, MLLT10 13 экз, ATM 51 экз, ERBB3 18 экз, LTK 16 экз, AKT3 7 экз, MPL 6 экз, PTGS2 4 экз, MSH2 13 экз, экз, ABL2 12 экз, GOPC 7 экз, RET <i>тр</i></i>	-	по 1 случаю в каждом представленном экзоне	1,6%
--	---	--	------

На примере частоты встречаемости мутаций в различных экзонах мутированных генов при аденокарциноме, представленной в таблице 15 видно, что не всегда ранжированная частота встречаемости экзонов с мутацией в точности повторяет частоту встречаемости содержащих их мутированных генов.

Так, при аденокарциноме четырьмя наиболее часто встречающимися генами с мутациями были *TP53*, *KRAS*, *EGFR*, *FGFR*, среди экзонов, содержащих мутацию, первое место занял 5 экзон гена *TP53* (аналогично с геном *TP53*), второе место занял 2 экзон гена *KRAS*, третье место - мутации в 19 экзоне гена *EGFR*. Четвёртое место по частоте встречаемости среди мутаций в экзонах при аденокарциноме заняла мутация в 1 экзоне гена *CDKN2A*, что отличалось от четвёртого по частоте встречаемости мутаций гена при аденокарциноме - *FGFR3*. Данная информация важна с клинической точки зрения, поскольку для клинической практики намного важнее информация о частоте встречаемости мутации в том или ином экзоне гена, а не мутации в гене в целом.

Аналогичная картина была получена и при плоскоклеточном раке (Таблица 16) – четырьмя наиболее часто встречающимися мутированными генами были *TP53*, *PTEN*, *CDKN2A*, *TSC1*.

Таблица 16 - Частоты встречаемости мутаций в различных экзонах исследуемых генов при плоскоклеточном раке лёгкого

Ген	Экзон	Плоскоклеточный	
		Абс.	%
<i>PTEN</i>	8	5	18,5
<i>TP53</i>	8	5	18,5
<i>CDKN2A</i>	1	4	14,8
<i>TP53</i>	5	4	14,8
<i>TP53</i>	6	3	11,1
	10	3	11,1
<i>ADAMTS2</i> 10 экз, <i>ADGRA2</i> 8 экз, <i>BRCA1</i> 10,21 экз, <i>BRCA2</i> 11 экз, <i>CDH5</i> 6 экз, <i>CDK12</i> 2 экз, <i>CIC</i> 2 экз, <i>COL22A1</i> 58 экз, <i>FGFR3</i> 10 экз, <i>FYCO1</i> 8 экз, <i>HIP1</i> 28 экз, <i>IKBKE</i> 19 экз, <i>KIT</i> 6,12 экз, <i>LRP1B</i> 88 экз, <i>NOTCH4</i> 14 экз, <i>PIK3CB</i> 2 экз, <i>PMS1</i> 9 экз, <i>RBI</i> 19 экз, <i>STK11</i> 10 экз, <i>TCF7L1</i> 12 экз, <i>TRIM33</i> 4 экз, <i>TSC1</i> 16 экз	-	по 2 случая в каждом представленном экзоне	7,4
<i>CDKN2A</i> 2 экз, <i>COL22A1</i> 39 экз, <i>DDR2</i> 10,11 экз, <i>ERBB2</i> 23 экз, <i>ETV1</i> 8 экз, <i>FGFR1</i> 7 экз, <i>FGFR3</i> 7 экз, <i>GPC3</i> 1 экз, <i>MET</i> 6 экз, <i>NCOA4</i> 9 экз, <i>NF1</i> 21,24,30 экз, <i>NTRK3</i> 9 экз, <i>PIK3CA</i> 4 экз, <i>RBI</i> 23 экз, <i>SDC4</i> 3 экз, <i>STK11</i> 4 экз, <i>TP53</i> 7 экз, <i>TSC1</i> 12,20 экз, <i>XPC</i> 9 экз	-	по 1 случаю в каждом представленном экзоне	3,7

По частоте встречаемости мутаций в экзонах при плоскоклеточном раке первое место делили 8 экзон в генах *TP53* и *PTEN*, второе место занимали 1 экзон гена *CDKN2A* и 5 экзон гена *TP53*, третье - мутации в 6 и 10 экзонах *TP53*. Содержащие мутации экзоны гена *TSC1* не вошли в четвёрку наиболее часто встречающихся при плоскоклеточном раке, что также, как и в случае аденокарциномы говорит об отличии между частотой встречаемости мутаций в гене в целом и в его отдельных экзонах.

Все выявленные мутации в экзонах были разделены на три группы, в зависимости от частоты их встречаемости при различных гистологических подтипах. (Таблицы 17, 18).

Таблица 17 - Частота встречаемости мутаций в различных экзонах при аденокарциноме

Частота встречаемости при аденокарциноме	Название экзона
6,3%-15,9%	<i>TP53 4,5,6,7,8 экз, KRAS G12C, EGFR 19 экз, CDKN2A 1, KRAS G12D, EGFR 21 экз, STK11 6 экз, FGFR3 2,7 экз, KRAS G12V</i>
3,2%-6,2%	<i>EGFR 20 экз, TSC1 20, GPC3 1, PDGFRA 17, STK11 5,7, NF1 17,26, TSC1 13, RB1 19, ERBB2 20,23, BRCA1 10, PIK3CA 10, PTEN 8, NTRK3 17, HIP1 28, FGFR1 1, CDK12 2, KRAS 4, KDM5C 23, TAF1 25, MSH6 10</i>
Менее 3,2%	<i>TP53 10, STK11 2,9, FGFR3 6,10, RB1 6,17, COL22A1 3,7,8, ERBB2 14,19, BRCA1 15, 21, PIK3CA 4,5, DDR2 18, BRAF 10,11,13,15, NTRK3 20, GPC3 4, BRCA2 14, KIT 6, NTRK1 8,9, XPC 8, ALR 4,5, FGFR1 7,10, AKT1 14, TRIM33 4, PIK3CB 2, COL1A1 2,16,24, MET 6, FYCO1 8, ETV1 8, NCOA4 9, ITGA9 12, SYNE 1 40, MLLT10 13, ATM 51, ERBB3 18, LTK 16, AKT3 7, PIK3CB 29, NTKR2 17, MPL 6, PTGS2 4, MSH2 13, ABL2 12, GOPC 7, SYNE1 40</i>

Из приведенной таблицы видно, что имеется четкая тенденция к увеличению количества разновидностей более редких мутаций.

Таблица 18 - Частота встречаемости мутаций в различных экзонах при плоскоклеточном раке

Частота встречаемости при плоскоклеточном раке легкого	Название экзона
11,1%-33,3%	<i>PTEN 8, TP53 5,6,8,10, CDKN2A 1, TP53 5</i>
7,4%-11,0%	<i>ADAMTS2 10, ADGRA2 8, BRCA1 10,21, CDH5 6, CDK12 2, CIC 2, COL22A1 58, FGFR3 10, FYCO1 8, HIP1 28, IKBKE 19, KIT 6, LRP1B 88, NOTCH4 14, PIK3CB 2, PMS1 9, RB1 19, STK11 10, TCF7L1 12, TRIM33 4, TSC1 16</i>

Менее 7,4%	<i>BRCA2</i> 11, <i>CDKN2A</i> 2, <i>COL22A1</i> 39, <i>DDR2</i> 10,11, <i>EML4</i> 20, <i>ERBB2</i> 23, <i>ETV1</i> 8, <i>FGFR1</i> 7, <i>FGFR3</i> 7, <i>GPC3</i> 1, <i>KIT</i> 12, <i>MET</i> 6, <i>NCOA4</i> 9, <i>NF1</i> 21,24,30, <i>NTRK3</i> 9, <i>PIK3CA</i> 4,10, <i>RB1</i> 23, <i>SDC4</i> 3, <i>STK11</i> 4, <i>TP53</i> 7, <i>TSC1</i> 12,20, <i>XPC</i> 9
------------	---

Из представленных в таблице 18 данных видно, что также, как и в случае с аденокарциномой, при плоскоклеточном раке выявлено увеличение разнообразия соматических мутаций по мере уменьшения частоты их встречаемости.

Для большей наглядности был проведен отбор генов и экзонов, встречающихся только при аденокарциноме и только при плоскоклеточном раке легкого.

Наиболее частым геном, мутация при котором встречалась только при аденокарциноме, являлся ген *KRAS* – 28,1%, далее шли мутации в гене *EGFR* – 20,1%, остальные мутации встречались значительно реже (Таблица 19).

Таблица 19 - Гены, мутации в которых встречались только при аденокарциноме

Ген	Аденокарцинома (n=63)	
	Абс.	%
<i>KRAS</i>	18	28,1%
<i>EGFR</i>	13	20,1
<i>AKT1</i>	4	6,3
<i>COL1A1</i>	3	4,8
<i>PDGFRA</i>	3	4,8
<i>KDM5C</i>	2	3,2
<i>TAF1</i>	2	3,2
<i>MSH6</i>	2	3,2

<i>ITGA9, SYNE1, MLLT10, ATM, ERBB3, LTK, AKT3, MPL, PTGS2, MSH2, ABL2, GPC, RET</i>	по 1 случаю в каждом представленном экзоне	1,6
--	--	-----

Показано, что уникальными для аденокарциномы стали мутации в 58 экзонах (Таблица 20).

Таблица 20 - Экзоны, мутации в которых встречались только при аденокарциномы

Экзоны		Аденокарцинома (n=63)	
		Абс.	%
<i>TP53</i>	4	3	7,7
	19 экз	6	9,5
	20 экз	3	4,8
	21 экз	4	6,4
<i>NF1</i>	17	2	3,2
	26	2	3,2
<i>DDR2</i>	18	1	1,6
<i>NTRK3</i>	17	2	3,2
	18	1	1,6
<i>KRAS G12D</i>	2	5	7,9
<i>FGFR1</i>	1	2	3,2
	10	1	1,6
<i>AKT1</i>	8	1	1,6
<i>PDGFRA</i>	17	3	4,8
<i>FGFR3</i>	2	4	6,4
	6	1	1,6
<i>TSC1</i>	13	2	3,2

Продолжение таблицы 20

<i>RBI</i>	6	1	1,6
	17	1	1,6
	18	1	1,6
<i>COL22A1</i>	3	1	1,6
	7	1	1,6
	8	1	1,6
<i>KRAS G12C 2 экз</i>	2	7	11,1
<i>KRAS</i>	4	2	3,2
<i>KDM5C</i>	23	2	3,2
<i>TAF1</i>	25	2	3,2
<i>MSH6</i>	10	2	3,2
<i>ITGA9 12 экз, SYNE1 40 экз, MLLT10 13 экз, ATM 51 экз, ERBB3 18 экз, LTK 16 экз, AKT3 7 экз, MPL 6 экз, PTGS2 4 экз, MSH2 13 экз, ABL2 12 экз, GOPC 7 экз, BRCA1 15 экз, PIK3CA 1,5 экз, BRAF 10,11,13,15, GPC3 4 экз, BRCA2 14 экз, KIT 6 экз, NTRK1 8,9 экз, XPC 8 экз, COL1A1 2,16,24, ERBB2 32,41</i>	по 1 случаю в каждом представленном экзоне	1,6	

Как видно из таблицы 20, уникальными для аденокарциномы стали мутации в 58 экзонах.

При плоскоклеточном раке лёгкого встречалось меньше уникальных генов, не встречающихся при аденокарциноме (Таблица 21).

Таблица 21 - Гены, мутации в которых встречались только при плоскоклеточном раке лёгкого

Ген	Плоскоклеточный (n=27)	
	Абс.	%
<i>IKBKE</i>	2	7,4
<i>TCF7L1</i>	2	7,4
<i>LRP1B</i>	2	7,4

Продолжение таблицы 21

<i>PMS1</i>	2	7,4
<i>ADAMTS2</i>	2	7,4
<i>NOTCH4</i>	2	7,4
<i>ADGRA2</i>	2	7,4
<i>CDH5</i>	2	7,4
<i>CIC</i>	2	7,4
<i>SDC4</i>	1	3,7

В таблице 22 представлены экзоны, мутации в которых были выявлены только при плоскоклеточном раке легкого.

Таблица 22 - Экзоны, мутации в которых встречались только при плоскоклеточном раке лёгкого

Экзоны		Плоскоклеточный (n=27)	
		Абс.	%
<i>STK11</i>	4	1	3,7
	10	2	7,4
<i>NF1</i>	21	1	3,7
	24	1	3,7
	30	1	3,7
	12	1	3,7
	16	2	7,4
<i>RB1</i>	23	1	3,7
<i>COL22A1</i>	39	1	3,7
	58	2	7,4
<i>CDKN2A</i>	2	1	3,7
<i>DDR2</i>	10	1	3,7
	11	1	3,7
<i>NTRK3</i>	9	1	3,7
<i>BRCA2</i>	11	1	3,7
<i>KIT</i>	6	2	7,4
	12	1	3,7
<i>XPC</i>	9	1	3,7
<i>IKBKE</i>	19	2	7,4
<i>TCF7L1</i>	12	2	7,4
<i>LRP1B</i>	88	2	7,4
<i>PMS1</i>	9	2	7,4

<i>ADAMTS2</i>	10	2	7,4
<i>NOTCH4</i>	14	2	7,4
<i>ADGRA2</i>	8	2	7,4
<i>CDH5</i>	6	2	7,4
<i>CIC</i>	2	2	7,4
<i>SDC4</i>	4	1	3,7

Так же, как в отношении генов, уникальных для плоскоклеточного рака мутантных экзонов оказалось меньше, чем уникальных мутантных экзонов при аденокарциноме. Далее был проведен анализ среднего количества мутированных генов у пациентов с аденокарциномой и плоскоклеточным раком легкого (Таблица 23).

Таблица 23 - Количество мутированных генов у одного пациента в зависимости от гистологического подтипа

Число мутированных генов у 1 пациента	Аденокарцинома (n=63)		Плоскоклеточный (n=27)		Всего (n=90)	
	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%
1	11	17,4	6	22,3	17	18,9
2	13	20,6	4	14,8	17	18,9
3	15	23,8	3	11,1	18	20,0
4	6	9,5	4	14,8	10	11,1
5	8	12,7	3	11,1	11	12,2
6	3	4,8	1	3,7	4	4,4
7	1	1,6	1	3,7	2	2,2
8	1	1,6	2	7,4	3	3,4
9	1	1,6	1	3,7	2	2,2
10	1	1,6	-	-	1	1,1
15	1	1,6	-	-	1	1,1
17	1	1,6	-	-	1	1,1
19	1	1,6	-	-	1	1,1
26	-	-	1	3,7	1	1,1
27	-	-	1	3,7	1	1,1
В среднем на 1 пациента	3,95		5,3		4,3	

В среднем у пациентов с плоскоклеточным раком легкого на 1 пациента было больше мутаций, чем при аденокарциноме – 5,3 мутированных генов против 3,95. Это объясняется тем, что плоскоклеточный рак чаще связан с длительным стажем курения, которое приводит к большому количеству генетических aberrаций, что подтверждается повышением статуса ТМВ у курящих пациентов.

При углублённом анализе было показано, что в среднем пациенты с плоскоклеточным раком лёгкого имеют больше повреждённых экзонов, чем пациенты с аденокарциномой лёгкого (Таблица 24).

Аналогично количеству мутантных генов, среднее количество экзонов с мутациями при плоскоклеточном раке оказалось выше, чем при аденокарциноме – 5,66 против 4,14.

Таблица 24 - Количество экзонов с мутациями у одного пациента в зависимости от гистологического подтипа

Число экзонов с мутациями у 1 пациента	Аденокарцинома (n=63)		Плоскоклеточный (n=27)		Всего (n=90)	
	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%
1	11	17,5	6	22,2	17	18,9
2	13	20,6	3	11,1	16	17,8
3	14	22,2	3	11,1	17	18,9
4	6	9,5	4	14,8	10	11,1
5	8	12,7	2	7,4	10	11,1
6	3	4,8	3	11,1	6	6,7
7	2	3,2	1	3,7	3	3,3
8	-	-	1	3,7	1	1,1
9	1	1,6	1	3,7	2	2,2
10	2	3,2	-	-	2	2,2
11	-	-	1	3,7	1	1,1
18	2	3,2	-	-	2	2,2
21	1	1,6	-	-	1	1,1

Продолжение таблицы 24

26	-	-	1	3,7	1	1,1
27	-	-	1	3,7	1	1,1
В среднем на 1 пациента	4,14		5,66		4,6	

Анализ взаимосвязи стадии и количества мутантных генов и экзонов с мутациями показал отсутствие связи между данными параметрами (Таблица 25).

Таблица 25 - Взаимосвязь стадии и количества мутированных генов и экзонов с мутациями

	Стадия			
	I (n=34)	IIa (n=12)	IIb (n=26)	III (n=18)
Среднее число мутаций генов у 1 пациента	4,6±5,7	3,1±1,6	4,5±4,9	4,7±3,4
Среднее число мутаций экзонов у 1 пациента	4,9±6,0	3,2±1,6	4,7±4,9	5,0±4,1

Отсутствие увеличения количества мутантных генов по мере роста стадии позволяет сделать предположение о том, что большинство из мутаций, входящих в исследуемую панель, являются клональными, что объясняет отсутствие увеличения их количества по мере прогрессирования заболевания.

Был проведён анализ зависимости количества мутированных генов, экзонов с мутациями от статуса курения при разных гистологических вариантах опухоли (Таблица 26).

Ожидаемо, количество мутаций у курящих пациентов было выше, чем у некурящих. Количество мутаций генов и количество экзонов с мутациями у курящих между пациентами с аденокарциномой и плоскоклеточным раком, как и у некурящих пациентов данных морфологических групп, статистически значимо не отличалось.

Таблица 26 - Зависимость между статусом курения и количеством мутированных генов и экзонов при разных гистологических вариантах опухоли

	Аденокарцинома (n=63)		Плоскоклеточ- ный (n=27)		Всего (n=90)	
	Курит	Не курит	Курит	Не курит	Курит	Не курит
N	33	30	21	6	54	36
Среднее число мутантных генов у 1 пациента	4,8±4,3	3,0±2,1 *0,035	6,2±7,2	2,7±1,4	5,4±5,6	2,9±2,0 *0,013
Среднее число экзонов с мутациями у 1 пациента	5,2±4,9	3,0±2,2 *0,034	6,6±7,2	2,8±1,3	5,7±5,9	3,0±2,1 *0,010

*статистически значимые различия по сравнению с курящими пациентами, $p < 0,05$

При анализе связи возраста с наличием/отсутствием исследуемых мутаций были получены следующие данные. Положительное значение R – положительная связь между увеличением возраста и увеличением частоты встречаемости мутации, отрицательное значение R – отрицательная связь между увеличением возраста и частотой встречаемости мутации (Таблица 27).

Таблица 27 - Зависимость между возрастом пациентов и наличием мутаций в генах

	Spearman - R	p-value
Возраст & <i>TP53</i> 5 экз	-0,213029	0,043808
Возраст & <i>TP53</i> 8 экз	0,259851	0,013385
Возраст & <i>STK11</i> 6 экз	-0,230556	0,028800
Возраст & <i>GPC3</i> 1 экз	-0,230556	0,028800

Пациенты старшей возрастной группы чаще имели мутации в 8 экзоне гена *TP53*, напротив, более молодые пациенты чаще имели мутации в 5 экзоне *TP53*, 6 экзоне гена *STK11*, 1 экзоне гена *GPC3*.

Также, были обнаружены некоторые статистически значимые корреляции между полом пациентов и их молекулярно-генетическим статусом. Положительный R – прямая связь с женским полом, отрицательный R – с мужским (Таблица 28).

Таблица 28 - Зависимость между полом пациентов и наличием мутаций в генах

	Spearman - R	p-value
Пол & <i>EGFR</i>	0,214669	0,042172
Пол & <i>STK11</i>	-0,222209	0,035293
Пол & <i>BRCA1</i>	-0,209904	0,047070
Пол & <i>PTEN</i>	-0,209904	0,047070
Пол & <i>ALK</i> транслокация	0,276324	0,008381

Было выявлено, что у мужчин статистически чаще встречаются мутации в генах *STK11*, *BRCA1*, *PTEN*, а у женщин мутации в гене *EGFR* и транслокация в гене *ALK*.

Кроме того, у мужчин статистически значимо в среднем наблюдалось большее количество генетических альтераций, что было связано с большей частотой и большим стажем курения.

3.2 Зависимость между молекулярно-генетическим статусом опухоли и вероятностью рецидива заболевания

Как уже говорилось выше, данная работа основана на проспективном анализе группы из 90 пациентов с диагностированным локализованным немелкоклеточным раком легкого I-IIIА стадий, прошедших радикальное оперативное лечение. Из 90 пациентов было 62 (69%) мужчины и 28 (31%) женщин. Средний возраст составил 59,4±10,5 лет (от 28 до 77 лет, медиана – 61 год).

За время наблюдения ($27,8 \pm 6,6$ мес. от 6,5 до 36,1 мес., медиана 29,1 мес.) умерло 15 (16,7%) пациентов, прогрессирование выявлено у 38 (42,2%) больных (Таблица 29).

Таблица 29 - Общая выживаемость и безрецидивная выживаемость пациентов с локализованным немелкоклеточным раком лёгкого I-III стадий

	ОВ	ВБП
Число пациентов	90	90
1 год	$96,7 \pm 1,9$	$76,7 \pm 4,5$
3 года	$82,9 \pm 4,0$	$55,4 \pm 5,4$
Медиана	Не достигнута	Не достигнута

Трёхлетняя общая выживаемость пациентов составила 82,9%, ВБП – 55,4%. Медианы выживаемостей не достигнуты.

Распределение по стадиям среди пациентов, у которых выявлено прогрессирование, было следующим – IA2 – 1 (2,6%), IA3 – 1 (2,6%), IB – 7 (18,4%), ПА – 5 (13,1%), ПВ – 13 (34,2%), IIIA – 11 (28,9%). Ожидается частота прогрессирования была наиболее высокой у пациентов с ПВ и IIIA стадиями. С ростом стадии увеличивалась доля пациентов, которым проводилась периперационная терапия.

У 52 (57,8%) пациентов не было выявлено прогрессирование заболевания за время наблюдения. Распределение по стадиям у пациентов без прогрессирования заболевания было следующим – IA1 - 2 (3,8%), IA2 – 8 (15%), IA3 – 4 (7,7%), IB – 12 (23%), ПА – 7 (13,4%), ПВ – 12 (23%), IIIA – 7 (13,4%).

Суммарно 26 пациентов из 52 пациентов без прогрессирования заболевания имели I стадию заболевания (50%), 19 пациентов со II стадией – 36,5%, и 13,5% с III стадией заболевания. Ожидается, в группе пациентов без прогрессирования заболевания доминирующей по количеству стадией была I, затем II и затем уже III в порядке убывания.

Соотношение пациентов без прогрессирования заболевания с пациентами с прогрессированием заболевания по стадиям представлено в таблице 30.

Таблица 30 - Соотношение пациентов без прогрессирования и с прогрессированием заболевания

Стадия заболевания	Пациенты с прогрессированием заболевания	Пациенты без прогрессирования заболевания
I	9 (23,6%)	26 (50%)
II	18 (47,4%)	19 (36,5%)
III	11 (29%)	7 (13,5%)
Всего	38	52

Как видно из таблицы, в группе пациентов с прогрессированием заболевания преобладают II и III стадии заболевания, тогда как в группе пациентов без прогрессии ожидаемо ситуация обратная. Среди пациентов с прогрессированием заболевания 27 человек (71%) имели гистологический подтип аденокарциномы, а 11 (29%) – плоскоклеточного рака лёгкого.

Среди пациентов с аденокарциномой и плоскоклеточным раком лёгкого, у которых было зарегистрировано прогрессирование заболевания, распределение по стадиям отражено на рисунках 11 и 12.

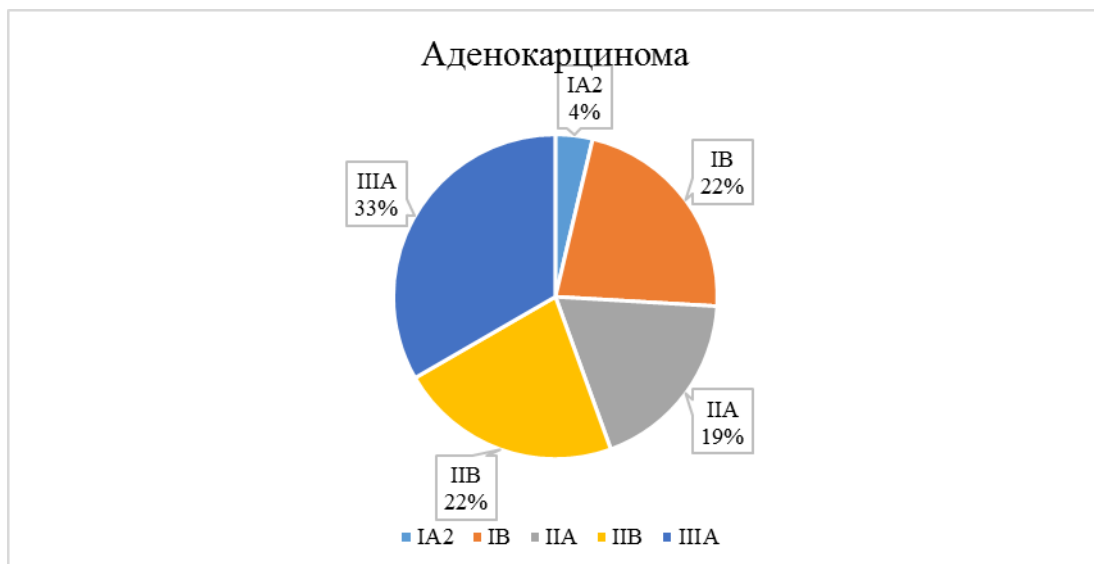


Рисунок 11 - Распределение по стадиям среди пациентов с аденокарциномой с зарегистрированным прогрессированием заболевания

При аденокарциноме большинство прогрессирующих пациентов имели IIIA стадию заболевания.

Большинство пациентов с зарегистрированным прогрессированием заболевания и плоскоклеточным раком имели IIВ стадию – 64%.

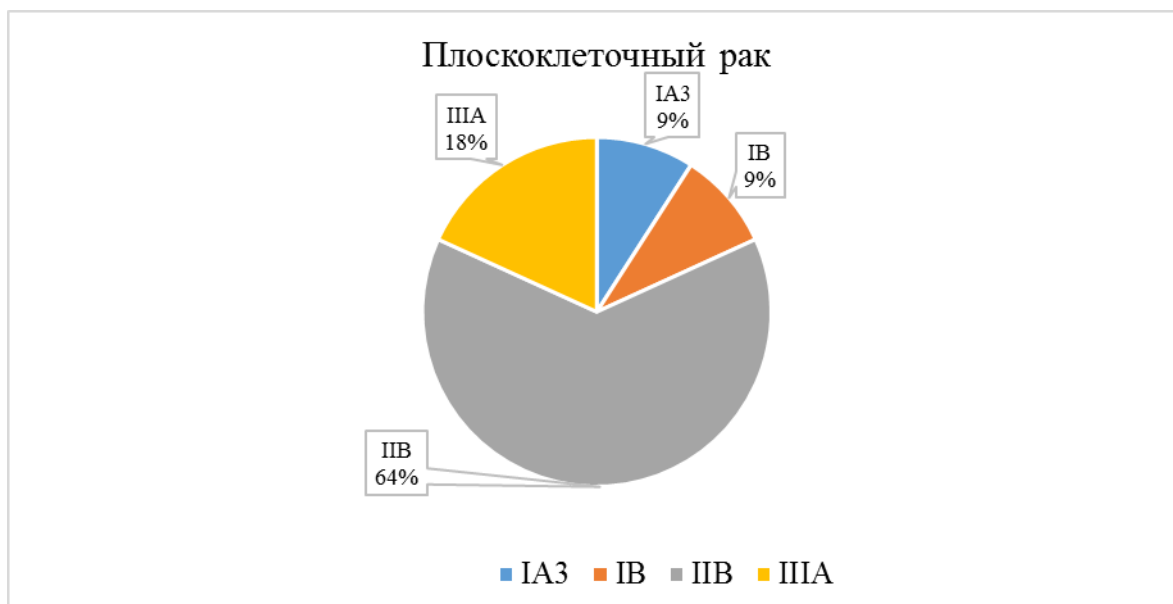


Рисунок 12 - Распределение по стадиям среди пациентов с плоскоклеточным раком с зарегистрированным прогрессированием заболевания

Большинство пациентов с зарегистрированным прогрессированием заболевания и плоскоклеточным раком имели IIВ стадию – 64%.

Сайты и частота прогрессирования указаны на рисунке 13.

Все случаи прогрессирования заболевания были разделены на рецидив в зоне операции и отдалённое метастазирование (Рисунок 14).

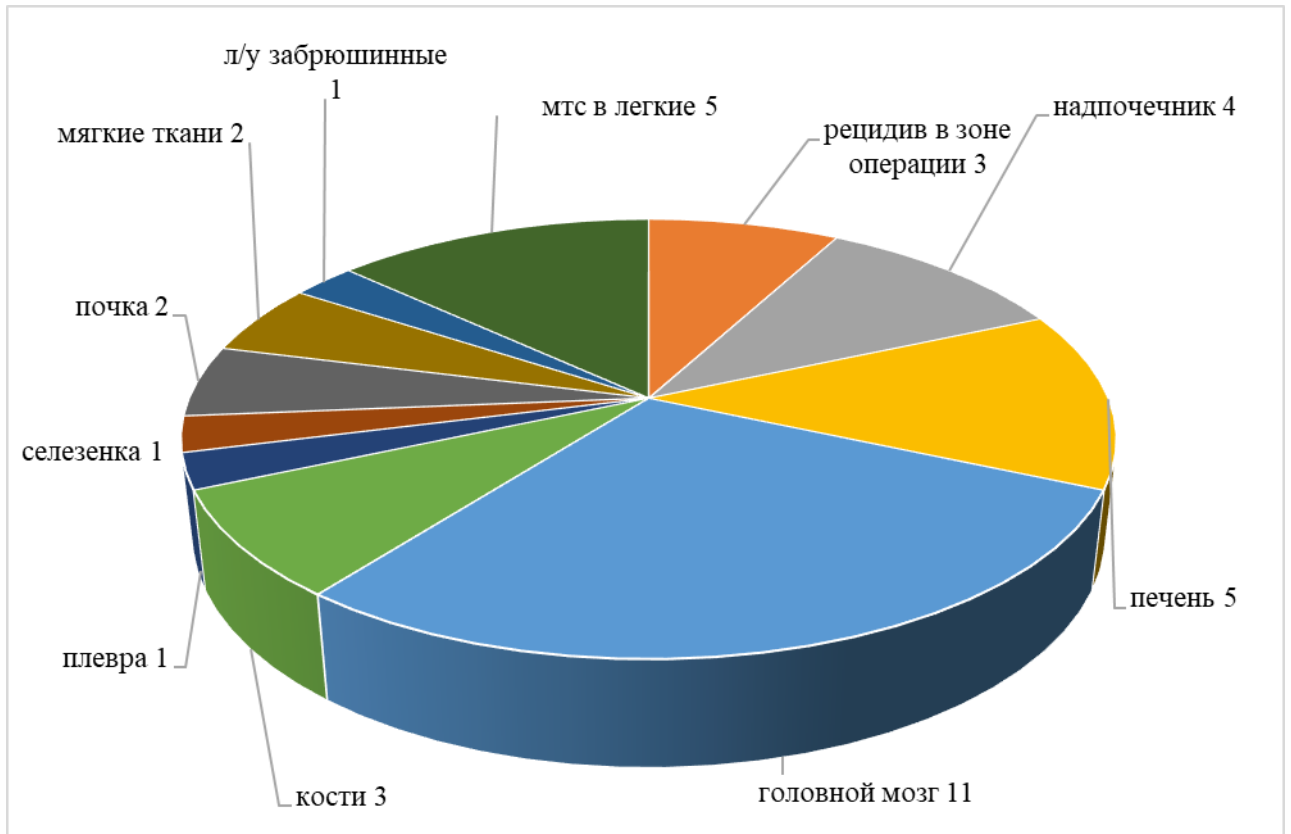


Рисунок 13 - Сайты и частота прогрессирования

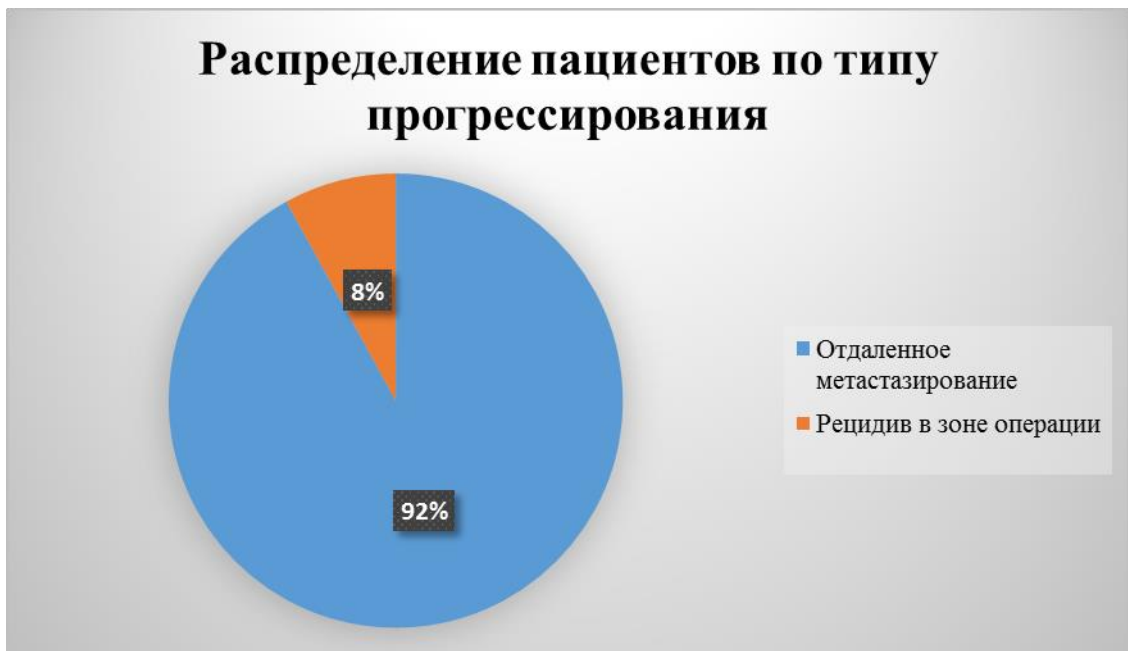


Рисунок 14 - Распределение пациентов по типу прогрессирования

Как видно из диаграммы, чаще всего прогрессирование заболевания отмечалось в виде отдаленного метастазирования - 92% случаев.

Был проведен анализ зависимости сайта прогрессирования от количества мутации в том или ином гене (экзоне гена) и общего количества мутаций у пациента (Таблица 31).

Таблица 31 - Связь между сайтом прогрессирования и исходным генетическим статусом пациентов (N=38)

	Локализация прогрессирования	
	Рецидив в зоне операции	Отдаленное метастазирование
Число больных	3	35
Среднее количество экзонов с мутациями у пациента	3,71	3,93

Как видно из таблицы, достоверной разницы в среднем количестве экзонов с мутациями на одного пациента между группами пациентов с местным рецидивом и отдаленным метастазированием выявлено не было.

Далее был проведен аналогичный анализ в группе пациентов с отдаленным метастазированием (Таблица 32).

Таблица 32 - Связь между сайтом прогрессирования и исходным генетическим статусом пациентов

	Локализация прогрессирования									
	Надпочечник	Печень	Мозг	Кости	Плевра	Селезенка	Почки	Мягкие ткани	Л/у забрюшинные	MTS в легкие
Число больных	4	5	11	3	1	1	2	2	1	5
Итого экзонов с мутациями	11	16	63	11	1	3	6	10	1	4
Среднее количество экзонов с мутациями у пациента	2,75	3,20	5,73	3,67	1	3,0	3,0	5,0	1	2,0

При сравнении внутри группы пациентов с отдаленным метастазированием какой-либо связи между сайтом прогрессирования и средним количеством экзонов с мутациями также выявлено не было, однако определилась тенденция к большему количеству генетических дефектов у пациентов с прогрессированием в головной мозг (среднее количество экзонов с мутациями 5,73) и мягкие ткани (среднее количество экзонов с мутациями 5,0). Обратная ситуация была в отношении прогрессирования в забрюшинные лимфоузлы и плевру (среднее количество экзонов с мутациями – 1,0).

Для выявления влияния генетических особенностей, способных влиять на прогноз, было осуществлено сравнение пациентов с прогрессированием заболевания и без него.

Все пациенты были разделены на две группы – те, кто спрорессировал и те, кто не спрорессировал. Был проведен анализ мутационного статуса в каждой из двух групп с целью выявления мутаций, связанных с худшим прогнозом заболевания (Таблица 33).

Таблица 33 - Мутации, статистически значимо связанные с прогнозом заболевания

Гены/экзоны		Без прогрессирования N=52		С прогрессированием N=38		p
		Абс.	% (от пациентов без прогрессирования заболевания)	Абс.	% (от пациентов с прогрессированием заболевания)	
<i>TP53</i>	7	-	-	5	12,8	0,013
<i>TP53</i>	8	1	2,0	9	23,1	0,002
<i>EGFR</i>	20 экз	-	-	3	7,7	0,08
<i>Ген FGFR3</i>		11	21,6	2	5,1	0,026
<i>Ген NF1</i>		5	9,6	2	5,2	0,063
<i>Ген PTEN</i>		2	3,9	5	13,1	0,065
<i>Ген KIT</i>		4	7,8	-	-	0,053
<i>CDK12 2 экз</i>		4	7,8	-	-	0,098

Значимыми в контексте прогноза заболевания явились мутации в 7 (с.725G>T, p.C242F; с.734G>T, p.G245V; с.731G>T, p.G244V) и 8 (с.832C>T, p.P278S; с.803A>T, p.N268I; с.817C>T, p.R273C) экзонах гена *TP53* и мутации во всех встреченных экзонах гена *FGFR3*: 2 (с.48C>T, P.I16I), 6 (C.622C>T, P.H208Y), 7 (C.786delC, P.N262fs), 10 (C.1386delC, P.D462fs). Мутации в 7 и 8 экзонах *TP53* ассоциировались с ухудшением прогноза, в гене *FGFR3* – с улучшением. У 13 пациентов была выявлена мутация в гене *FGFR3* без наличия мутации в 7 или 8 экзонах *TP53*, у 2 из пациентов было выявлено прогрессирование заболевания – (15%), у 11 – нет (85%). Остальные, перечисленные в таблице мутации, показали тенденцию к связи с прогнозом заболевания.

Было предположено, что у пациентов с наличием мутации в гене *FGFR3* одновременно с отсутствием в 7 и 8 экзонах *TP53* риск прогрессирования ниже (выделенная группа низкого риска прогрессирования).

У пациентов с любым другим сочетанием соматических мутаций предполагался повышенный риск прогрессирования заболевания (выделенная группа высокого риска прогрессирования). Всего пациентов из группы повышенного риска прогрессирования – 77, из группы низкого риска прогрессирования – 13. Распределение по стадиям среди пациентов из группы высокого риска прогрессирования и группы низкого риска прогрессирования представлено в таблице 34.

Таблица 34 - Распределение пациентов из различных групп прогноза заболевания по стадиям

		Группа высокого риска прогрессирования (n=77)	Группа низкого риска прогрессирования (n=13)
Стадия	I	27 (35%)	7 (54%)
	II	34 (44%)	4 (31%)
	III	16 (21%)	2 (15%)

Большинство пациентов из группы высокого риска прогрессирования имели II стадию заболевания, а из группы низкого риска – I стадию.

Далее была проведена оценка частоты прогрессирования в группах различного риска прогрессирования, выделенных на основании генетического статуса (Таблица 35).

Таблица 35 - Частота прогрессирования пациентов с благоприятным и неблагоприятным прогнозом

	Группа высокого риска прогрессирования (n=77)		Группа низкого риска прогрессирования (n=13)	
	Абс.	%	Абс.	%
Частота прогрессирования	37	48,1	2	15,4 *0,014

*статистически значимые различия по сравнению с группой с негативным прогнозом, $p < 0,05$

В группе низкого риска прогрессирования частота прогрессирования была статистически значимо ниже, чем в группе высокого риска прогрессирования.

Среднее время наблюдения пациентов в группах пациентов, выделенных по риску прогрессирования, не отличалось: $27,5 \pm 6,4$ мес. в группе высокого риска прогрессирования и $29,5 \pm 7,6$ мес. – в группе низкого риска ($p = 0,338$).

Также, была проведена оценка частоты использования различных видов лечения у пациентов из различных групп прогноза заболевания (Таблица 36).

Таблица 36 - Различные виды лечения у пациентов с благоприятным и неблагоприятным прогнозом

		Группа высокого риска прогрессирования (n=77)		Группа низкого риска прогрессирования (n=13)	
		Абс.	%	Абс.	%
лечение	Операция	42	54,5	9	69,2
	неоПХТ+операция	14	18,2	3	23,1
	Операция+аПХТ	21	23,3	1	7,7

Частота проведения неоадьювантной и адьювантной химиотерапии в разных прогностических группах статистически значимо не отличалась.

Был проведен дополнительный анализ пациентов из группы высокого и низкого риска прогрессирования. Вначале все пациенты из группы высокого риска прогрессирования были разделены на 2 группы в зависимости от вида лечения (Таблица 37).

Таблица 37 - Распределение пациентов из группы высокого риска прогрессирования в зависимости от проведенного вида лечения и частоты прогрессирования

Вид проведенного лечения	Частоты прогрессирования
Только оперативно лечение N = 42	16 (38%)
Комбинированное лечение N = 35	21 (60%)

Из данных таблицы видно, что прогрессирование регистрировалось чаще в группе пациентов, получивших комбинированное лечение.

Для того, чтобы в полной мере высказаться о влиянии вида проведенного лечения на частоту прогрессирования заболевания, была проведена оценка стадий заболевания в группах пациентов, получавших только хирургическое или комбинированное лечение (Таблица 38).

Таблица 38 - Распределение пациентов из группы только оперативного лечения по стадиям

Вид проведенного лечения	Распределение по стадиям
Только оперативное лечение	I - 22 (52%)
	II - 18 (42,8%)
	III - 2 (4,8%)

Видно, что оперативное лечение в подавляющем количестве случаев назначалось пациентам с I-II стадиями заболевания (чаще при I стадии).

Аналогичный анализ был проведен у пациентов, получавших комбинированное лечение (Таблица 39).

Таблица 39 - Распределение пациентов из группы комбинированного лечения по стадиям

Вид проведённого лечения	Распределение по стадиям
Комбинированное лечение	I - 5 (14%)
	II - 16 (45,5%)
	III - 14 (40,5%)

Суммируя вышеописанные данные, можно сделать вывод о том, что более высокая частота прогрессирования в группе комбинированного лечения скорее всего была связана с тем, что в данной группе пациентов преобладали пациенты II-III стадий, в отличие от группы только оперативного лечения, где преобладали пациенты с I стадией заболевания.

Далее был проведен аналогичный анализ пациентов из группы низкого риска прогрессирования заболевания (Таблица 40).

Таблица 40 - Распределение пациентов из группы низкого риска прогрессирования в зависимости от проведённого вида лечения и частоты прогрессирования

Вид проведенного лечения	Частоты прогрессирования
Только оперативно лечение N = 9	2 (22,1%)
Комбинированное лечение N = 4	0 (0%)

Прогрессирование было отмечено только в группе оперативного лечения. Была проведена оценка стадий заболевания в группах пациентов, получавших только хирургическое или комбинированное лечение (Таблица 41).

Таблица 41 - Распределение пациентов из группы только оперативного лечения по стадиям

Вид проведённого лечения	Распределение по стадиям
Только оперативное лечение	I - 7 (77,8%)
	II - 1 (11,1%)
	III - 1 (11,1%)

Большинство пациентов имели I стадию заболевания, всего у двух пациентов были II и III стадии заболевания.

Аналогичный анализ был проведен у пациентов, получавших комбинированное лечение (Таблица 42).

Таблица 42 - Распределение пациентов из группы комбинированного лечения по стадиям

Вид проведённого лечения	Распределение по стадиям
Комбинированное лечение	I - 0 (0%)
	II - 3 (75%)
	III - 1 (25%)

Также, как и в группе плохого прогноза заболевания, в группе комбинированного лечения преобладали пациенты с II-III стадиями заболевания.

Суммируя представленные выше данные о пациентах из группы хорошего прогноза, можно увидеть, что прогрессирование было выявлено только в группе оперативного лечения без добавления нео-, или адъювантной терапии, несмотря на то, что в данной группе доминировали пациенты с I стадией заболевания. Учитывая маленькое количество пациентов в группе хорошего прогноза, сложно сделать какой-либо в полной мере обоснованный вывод на основании полученной информации, касающейся полученной более высокой частотой прогрессирования у пациентов с более ранними стадиями, получившими только оперативное лечение. Вероятнее всего, это объясняется недостаточно большой группой пациентов.

Также, был проведен анализ внутри групп хорошего и плохого прогноза для оценки частоты прогрессирования в зависимости от стадии заболевания (Таблица 43).

Ожидаемо, с ростом стадии частота прогрессирования увеличивалась как в группе высокого, так и в группе низкого риска прогрессирования.

Таблица 43 - Частота прогрессирования в зависимости от стадии заболевания в группах высокого и низкого риска прогрессирования

Стадия	Высокий риск прогрессирования N=77		Низкий риск прогрессирования N=13	
	Количество пациентов	Количество спрорессировавших пациентов и частота прогрессирования	Количество пациентов	Количество спрорессировавших пациентов и частота прогрессирования
I	27	10 (37%)	7	0 (0%)
II	33	15 (45,4%)	4	1 (25%)
III	17	12 (70,5%)	2	1 (50%)

После этого было проведено непосредственно сравнение между собой пациентов из разных групп прогноза заболевания (Таблица 44).

Таблица 44 - Частота прогрессирования, вид лечения пациентов и стадии пациентов с высоким и низким риском прогрессирования заболевания

		Группа высокого риска прогрессирования (n=77)		Группа низкого риска прогрессирования (n=13)	
		Операция	Операция + периоперационная ПХТ	Операция	Операция + периоперационная ПХТ
		42	35	9	4
Частота прогрессирования		16(38,1%)	21 (60%)	2 (22,2%)	-
Стадия	I	22(52,4%)	5(14,2%)	7(77,8%)	-
	II	18(42,8%)	16(45,7%)	1(11,1%)	3(75%)
	III	2(4,8%)	14(40%)	1(11,1%)	1(25%)
Время наблюдения, мес.		28,5±5,1	26,4±7,6	29,5±8,9	29,4±4,2

При сравнении подгрупп пациентов, которым было проведено только оперативное лечение из групп низкого и высокого риска прогрессирования видно, что и в одной и в другой группах преобладают пациенты с I стадией (52% в

группе высокого риска прогрессирования и 77,8% в группе низкого риска прогрессирования), тогда как II и III стадии встречаются реже – 42,8% vs 11,1% для второй стадии и 4,8% и 11,1% для третьей стадии. Таким образом группы относительно однородны и по проведенному лечению и по распределению по стадиям, тем не менее, частота прогрессирования в группе неблагоприятного прогноза выше по сравнению с группой благоприятного прогноза. Это показывает эффективность разделения пациентов по прогностическим группам на основании предложенных молекулярно-генетических особенностей для пациентов, которым не была проведена периоперационная полихимиотерапия.

Что касается сравнения подгрупп пациентов с периоперационной ПХТ из групп с низкого и высокого риска прогрессирования, то пациенты из группы неблагоприятного прогноза, получившие периоперационную ПХТ в 14% имели I стадию, в 45,5% - II, в 40,5% - III, тогда как аналогичная подгруппа из группы благоприятного прогноза не включила пациентов с I стадией, пациентов со второй стадией было 75%, с III – 25%. Прогрессирование не было зарегистрировано в подгруппе пациентов из группы низкого риска прогрессирования, тогда как в группе высокого риска прогрессирования оно было зарегистрировано у 60% пациентов. Также, как и при сравнении подгрупп пациентов с только оперативным лечением, можно сделать вывод о том, что при относительно похожем распределении по стадиям в подгруппах пациентов, получивших периоперационное лечение, между группами низкого и высокого риска прогрессирования, деление пациентов на прогностические группы на основании предложенных молекулярно-генетических особенностей показывает свою эффективность, хотя стоит отметить, что такое сравнение менее показательно ввиду малого количества пациентов из группы благоприятного прогноза, получивших периоперационную полихимиотерапию.

Далее был проведён однофакторный регрессионный анализ параметров опухоли, способных влиять на риск прогрессирования (Таблица 45).

Таблица 45 - Данные однофакторного регрессионного анализа для риска прогрессирования

	Оценка параметра	Стандартная ошибка	Стандартизованный коэффициент Бета	Достигнутый уровень значимости (p)	95% ДИ для отношения шансов	
					Нижняя	Верхняя
Стадия(1/2a/2b/3)	0,177	0,019	0,697	0,0001	0,139 -	0,216
T (1/2/3/4)	0,196	0,024	0,649	0,0001	0,148 -	0,244
N (0/1)	0,667	0,106	0,555	0,0001	0,456 -	0,877
Гистология (аденокарц/ плоскокл)	0,292	0,040	0,612	0,0001	0,213 -	0,372
Лечение (хир/комб)	0,290	0,034	0,668	0,0001	0,222 -	0,358
Вид операции(сегмент /лоб/пульмонэктомия)	0,203	0,024	0,662	0,0001	0,155 -	0,252
Курение (нет/да)	0,352	0,082	0,414	0,0001	0,189 -	0,515
Возраст 60 (до/больше)	0,252	0,034	0,618	0,0001	0,185 -	0,320
Возраст (лет)	0,007	0,001	0,640	0,0001	0,005 -	0,009
Пол	0,299	0,039	0,631	0,0001	0,222 -	0,376
Прогноз прогрессирования по предложенным генетическим особенностям	0,481	0,056	0,675	0,0001	0,370 -	0,591

Все из вышеописанных параметров статистически значимо влияли на риск прогрессирования. Вероятность прогрессирования нарастала с увеличением стадии, возраста, размера первичной опухоли, также было выявлено, что

вероятность прогрессирования была выше у пациентов с плоскоклеточным раком лёгкого, наличием метастазов в регионарных лимфатических узлах, при проведении комбинированного лечения, мужском поле, увеличении объёма оперативного вмешательства, а также у пациентов с набором соматических мутаций, отличным от того, при котором нами была сформирована группа с пониженным риском прогрессирования заболевания. На основании полученных данных был проведён многофакторный регрессионный анализ, который выявил два независимых фактора, влияющих на риск прогрессирования (Таблица 46).

Таблица 46 - Данные многофакторного регрессионного анализа для прогрессирования

	Оценка параметра	Стандартная ошибка	Стандартизованный коэффициент Бета	Достигнутый уровень значимости (p)	95% ДИ для отношения шансов	
					Нижняя	Верхняя
Стадия(1/2a/2b/3)	0,112448	0,035	0,443	0,002	0,042 - 0,183	
Прогноз прогрессирования на основании генетического статуса	0,214734	0,099	0,302	0,032	0,018 - 0,411	

Многофакторный анализ показал, что независимыми факторами повышения риска прогрессирования заболевания являются нарастание стадии заболевания, а также любое другое сочетание соматических мутаций кроме наличия мутации в гене *FGFR3* одновременно с отсутствием в 7 и 8 экзонах *TP53*. Напротив, наличие мутации в гене *FGFR3* одновременно с отсутствием в 7 и 8 экзонах *TP53* является достоверным независимым фактором, снижающим риск прогрессирования заболевания.

По данным многофакторного регрессионного анализа построена значимая ($p=0,0001$) регрессионная модель, включающая 2 независимых фактора – предиктора прогрессирования.

Риск прогрессирования вычислялся по формуле:

ИП=0,112448*Стадия+0,214734*Прогноз прогрессирования на основании генетического статуса опухоли

С помощью ROC-кривой (Площадь под кривой составила 0,712 (95% ДИ 0,604-0,820), $p=0,001$) определили критическую точку по Юдену– значение ИП **0,5**, чувствительность в которой составила 66,7% при специфичности 70,6%. При ИП менее этого значения вероятность прогрессирования низкая ($14/51=27,5\%$), а выше- высокая ($25/39=64,1\%$, $p=0,0005$). Полученные в данной работе площадь под кривой 0,712 является удовлетворительным результатом, поскольку пригодной к использованию считается модель, площадь под кривой при которой является более 0,6 (Рисунок 15).

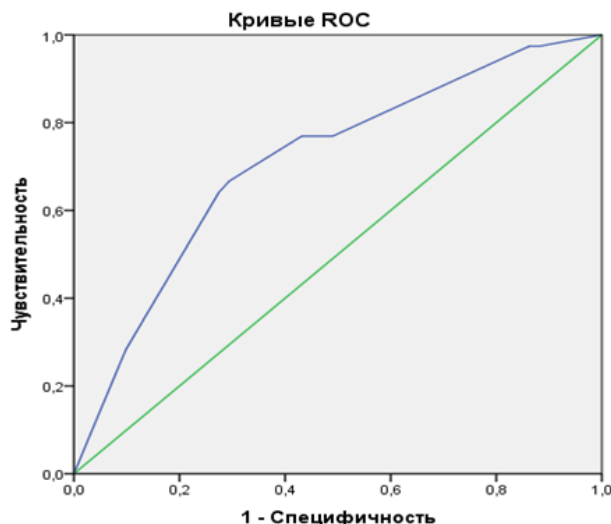


Рисунок 15 - Кривые ROC

Таким образом, предложенная модель определения риска прогрессирования на основании молекулярно-генетических особенностей показала свою

достоверность в определении вероятности прогрессирования заболевания. Наличие мутаций в 2 (с.48C>T, P.I16I), 6 (C.622C>T, P.H208Y), 7 (C.786delC, P.N262fs), 10 (C.1386delC, P.D462fs) экзонах гена *FGFR3* одновременно с отсутствием мутаций в 7 (с.725G>T, p.C242F; с.734G>T, p.G245V; с.731G>T, p.G244V) и 8 (с.832C>T, p.P278S; с.803A>T, p.N268I; с.817C>T, p.R273C) экзонах гена *TP53* является независимым положительным прогностическим фактором, снижающим риск прогрессирования заболевания.

3.3 Зависимость между молекулярно-генетическим статусом опухоли и общей и безрецидивной выживаемостью

Вначале был проведён однофакторный регрессионный анализ клинико-морфологических факторов, способных влиять на общую выживаемость отдельно для пациентов с плоскоклеточным раком лёгкого и аденокарциномы (Таблица 47).

Таблица 47 - Однофакторный анализ влияния клинико-морфологических параметров на общую выживаемость

Фактор	Морфология					
	Аденокарцинома (n=63)			Плоскоклеточный (n=27)		
	HR	95%CI	p	HR	95%CI	p
Стадия(1/2a/2b/3)	5,94	1,54-22,85	0,010	2,481	1,13-5,48	0,022
N (0/1)	3,75	1,62-8,70	0,002			-
G	-	-	-			-
ПМЗО(0/1)	-	-	-			-
Курение(0/1)	-		-			-
Пол (муж/жен)	-		-			-
Возраст	-		-			-

Как видно из таблицы, по данным однофакторного анализа повышение стадии ассоциировалось с ухудшением общей выживаемости как при аденокарциноме, так и при плоскоклеточном раке лёгкого. Дополнительно негативным прогностическим признаком выступило наличие метастазов в лимфоузлах уровня N1 для аденокарциномы.

Аналогичный анализ был проведён в отношении выживаемости без прогрессирования (Таблица 48).

Таблица 48 - Однофакторный анализ влияния клинико-морфологических параметров на выживаемость без прогрессирования

Фактор	Морфология					
	Аденокарцинома (n=63)			Плоскоклеточный (n=27)		
	HR	95%CI	p	HR	95%CI	p
Стадия (1/2a/2b/3)	1,54	1,15-2,05	0,004			-
N (0/1)	2,07	1,26-3,41	0,004			-
G	-	-	-			-
ПМЗО (0/1)	-	-	-			-
Курение (0/1)	-		-			-
Пол (муж/жен)	-		-			-

При аденокарциноме негативно влияли на выживаемость без прогрессирования повышение стадии и наличие метастазов в лимфоузлах уровня N1. Для плоскоклеточного рака лёгкого факторов, статистически значимо влияющих на выживаемость без прогрессирования выявлено не было.

После этого был проведён однофакторный анализ Кокса для определения влияния мутаций в различных генах и экзонах на общую выживаемость и выживаемость без прогрессирования отдельно для плоскоклеточного рака лёгкого и аденокарциномы (Таблица 49).

По данным однофакторного анализа при аденокарциноме на общую выживаемость статистически значимо отрицательно влияет наличие мутации в 6 экзоне гена *TP53* (с.637C>G, p.R213G), а на выживаемость без прогрессирования отрицательно влияет наличие мутации в 20 экзоне гена *EGFR* (с.2300_2301insCAGCGTGGA, p.A767delinsASVD) и 7 экзоне гена *TP53* (с.725G>T, p.C242F; с.734G>T, p.G245V; с.731G>T, p.G244V).

Таблица 49 - Однофакторный анализ влияния соматических мутаций на общую выживаемость и выживаемость без прогрессирования при аденокарциноме

Ген	Экзон	Аденокарцинома		Общая				ВБП			
				p	HR	95% CI		p	HR	95% CI	
		Абс	%			Ниж	Верх			Ниж	Верх
<i>TP53</i>	5	10	15,9	-				-			
<i>KRAS G12C</i>	2	7	11,1	-				-			
<i>EGFR</i>	19	6	9,5	-				-			
<i>CDKN2A</i>	1	6	9,5	-				-			
<i>TP53</i>	8	5	7,9	-				-			
<i>KRAS G12D</i>	2	5	7,9	-				-			
<i>TP53</i>	4	3	7,7	-				-			
	6	4	6,4	0,04	5,38	1,08	26,7	-			
	7	4	6,4	-				0,006	4,68	1,56	14,09
<i>EGFR</i>	21	4	6,4	-				-			
<i>STK11</i>	6	4	6,4	-				-			
<i>FGFR3</i>	7	4	6,4	-				-			
<i>KRAS G12V</i>	2	4	6,3	-				-			
<i>EGFR</i>	20	3	4,8	-				0,020	4,29	1,26	14,66
<i>TSC1</i>	20	3	4,8	-				-			
<i>GPC3</i>	1	3	4,8	-				-			

При проведении многофакторного анализа для определения независимых параметров, влияющих на общую выживаемость при аденокарциноме, единственным независимым фактором, влияющим на общую выживаемость, стала стадия заболевания – повышение стадии статистически значимо было связана с ухудшением ОВ.

При проведении многофакторного анализа для определения независимых параметров, влияющих на безрецидивную выживаемость при аденокарциноме, было выявлено, что мутации в 7 экзоне гена *TP53* (с.725G>Т, р.С242F; с.734G>Т,

p.G245V; c.731G>T, p.G244V) и 20 экзоне гена *EGFR* (c.2300_2301insCAGCGTGGA, p.A767delinsASVD) являются независимыми предикторами снижения БРВ (Таблица 50).

Таблица 50 - Многофакторный анализ влияния клинико-морфологических и молекулярно-генетических параметров на безрецидивную выживаемость при аденокарциноме

		БВП			
		p	HR	95% CI	
Экзоны				Ниж	Верх
<i>TP53</i>	7	0,012	4,206	1,365	12,958
<i>EGFR</i>	20	0,043	3,679	1,044	12,958

Аналогичный анализ был проведён для пациентов с плоскоклеточным раком лёгкого.

При однофакторном анализе влияния соматических мутаций при плоскоклеточном раке лёгкого на общую выживаемость и безрецидивную выживаемость были получены следующие данные (Таблица 51).

Таблица 51 - Однофакторный анализ влияния соматических мутаций на общую выживаемость и выживаемость без прогрессирования при плоскоклеточном раке лёгкого

Ген	Экзон	Плоскоклеточный		Общая				БВП			
				p	HR	95% CI		p	HR	95% CI	
						Ниж	Верх			Ниж	Верх
		Частоты встречаемости мутаций									
		Абс	%								
<i>PTEN</i>	8	5	18,5	0,002	10,65	2,34	48,52	0,001	17,18	3,14	93,93
<i>TP53</i>	8	5	18,5	-				-			
<i>CDKN2A</i>	1	4	14,8	0,029	5,31	1,18	23,84	-			
<i>TP53</i>	5	4	14,8	-				-			

TP53	6	3	11,1	-				-			
	10	3	11,1	-				-			

По данным однофакторного анализа при плоскоклеточном раке на общую выживаемость статистически значимо отрицательно влияет наличие мутации в 8 экзоне гена *PTEN* (с.1003C>T, p.R335X; с.805_806del, p.K269fs) и 1 экзоне гена *CDKN2A* (с.84G>A, p.P28P), на безрецидивную выживаемость отрицательно влияет только наличие мутации в 8 экзоне гена *PTEN* (с.1003C>T, p.R335X; с.805_806del, p.K269fs).

При проведении многофакторного анализа для определения независимых параметров, влияющих на общую выживаемость при плоскоклеточном раке лёгкого, было выявлено, что стадия заболевания и мутации в 8 экзоне гена *PTEN* (с.1003C>T, p.R335X; с.805_806del, p.K269fs) являются независимыми предикторами снижения ОБ (Таблица 52).

Таблица 52 - Многофакторный анализ влияния клинико-морфологических и молекулярно-генетических параметров на общую выживаемость при плоскоклеточном раке лёгкого

		ОБ			
		p	HR	95% CI	
Эзоны				Ниж	Верх
PTEN	8	0,002	10,656	2,340	48,523
Стадия(1/2a/2b/3)		0,022	2,481	1,138	5,481

При проведении многофакторного анализа для определения независимых параметров, влияющих на безрецидивную выживаемость при плоскоклеточном раке лёгкого, было выявлено, что только мутации в 8 экзоне гена *PTEN* (с.1003C>T, p.R335X; с.805_806del, p.K269fs) являются независимыми предикторами снижения БРВ (Таблица 53).

Таблица 53 - Многофакторный анализ влияния клинико-морфологических и молекулярно-генетических параметров на выживаемость без прогрессирования при плоскоклеточном раке лёгкого

		ВБП			
		p	HR	95% CI	
Экзоны				Ниж	Верх
PTEN	8	0,001	17,18	3,14	93,93

Таким образом, независимыми предикторами снижение ОВ для аденокарциномы стала стадия заболевания, для плоскоклеточного рака лёгкого – стадия заболевания и мутация в 8 экзоне гена *PTEN* (с.1003С>Т, р.Р335Х; с.805_806del, р.К269fs).

Независимыми предикторами снижения БРВ при аденокарциноме стали мутации в 7 экзоне гена *TP53* (с.725G>Т, р.С242F; с.734G>Т, р.Г245V; с.731G>Т, р.Г244V) и 20 экзоне гена *EGFR* (с.2300_2301insCAGCGTGGA, р.А767delinsASVD), а для плоскоклеточного рака лёгкого – мутация в 8 экзоне гена *PTEN* (с.1003С>Т, р.Р335Х; с.805_806del, р.К269fs).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные данные молекулярно-генетического тестирования российской когорты из 90 пациентов с немелкоклеточным раком легкого I-IIIА стадии показали, что исследуемая группа пациентов российской популяции, является достаточно гетерогенной с точки зрения присутствия различных соматических мутаций. Все выявленные мутации были разделены на три группы в зависимости от их частоты встречаемости:

1 Частота встречаемости 6,6-45,6% - *TP53, KRAS, EGFR, STK11, FGFR3, TSC1, RB1, CDKN2A, PTEN, NF1, ERBB2, BRCA1, COL22A1*.

2 Частота встречаемости 3,3-5,6% - *BRAF, GPC3, KIT, HIP1, FGFR1,2, CDK12, PIK3CA, NTRK3, ALK-транслокация, TRIM33, PIK3CB, COL1A1, PDGFRA, FYCO1, DDR2*.

3 Частота встречаемости менее 3,3% - *KDM5C, TAF1, IKBKE, TCF7L1, LRP1B, PMS1, ADAMTS2, ROS1-транслокация, ETV1, ADGRA2, CDH5, CIC, MSH6, NCOA4, MET, ITGA9, SYNE1, MLLT10, ATM, ERBB3, LTK, AKT 3, MPL, PTGS2, MSH2, ABL2, GOPC, RET-транслокация, SDC4, AKT1, BRCA2, NTRK1, XPC*.

Наиболее часто встречающиеся в данной работе соматические мутации, такие как *TP53, KRAS, EGFR* имели сопоставимые с мировыми данными частоты обнаружения. Частота обнаружения мутаций в гене *FGFR3* в данной работе была выше, по сравнению с данными мировой литературы - 14,4% против 2-3% [78]. Мутация в гене *STK11* встречалась практически с такой же частотой, что и в Европейской и Американской популяциях пациентов с НМРЛ – 11,1% против ~ 11% (США и Европа) [79]. Мутация в гене *TSC1* также встречалась чаще, чем в Европейской популяции пациентов – 10,0% против 2-7% [80]. Соматическая мутация в гене *RB1* по данным нашего исследования встречалась в 8,9% - практически также часто, как и по общемировым данным - 8,2% [81]. Соматическая мутация в гене *CDKN2A* встречалась практически с той же частотой, что и в Европейской и Американской – 12,2% по сравнению с 13,2%

случаев. Частота встречаемости мутаций в гене *PTEN* в данной работе составила 7,8% vs 3,33% по мировым данным. Мутации в гене *BRCA1* встречались с частотой 8,9%, тогда как по данным мировой литературы, такая мутация встречается примерно у 2,6% пациентов с НМРЛ [82]. Частота встречаемости мутаций в гене *NF1* в настоящей работе составила 7,8%, что несколько меньше частоты встречаемости по мировым данным - около 10% [83]. Мутации в гене *ERBB2* в настоящей работе встречались с частотой 7,8%, что несколько чаще по сравнению с мировыми данными - порядка 4,5% [84]. Сравнить частоту встречаемости соматических мутаций в гене *COL22A1* между российской популяцией и общемировыми данным не приходится возможным в связи отсутствием данных о частоте встречаемости в мировой литературе.

Во второй группе по частоте встречаемости мутаций (3,3-5,6%), практически все соматические мутации встречались примерно с такой же частотой, как описывается в мировой литературе. Дефекты в гене *PIK3CA* в настоящей работе встречались у 5,6% пациентов против 6,36% по общемировым данным. Мутации в генах *NTKR3* (4,4% в РП vs 5,73% по мировым данным), *KIT* (4,4% в РП vs 2,09% по мировым данным), *FGFR1* (4,4% в РП vs 3,54% по мировым данным), *CDK12* (4,44% vs 2,45% по мировым данным) [85]. Мутации в гене *DDR2* в настоящей работе встречались с частотой 3,3% против 4,0% по мировым данным [86]. Частота мутаций в гене *PDGFRA* в данной работе была чуть выше частоты встречаемости по общемировым данным ~ 3,3% vs 2,14% [87].

Сравнить частоту встречаемости соматических мутаций в генах *GPC3*, *TRIM33*, *COL1A1* и *HIP1* между российской популяцией и общемировыми данным не приходится возможным в связи отсутствием данных о частоте встречаемости в мировой литературе.

Третья по частоте встречаемости мутаций в российской популяции пациентов группа (менее 3,3%) оказалась наиболее обширной. При сравнении частоты встречаемости наиболее редких соматических мутаций, с мировыми данными, в качестве последних в подавляющем большинстве случаев использовались данные, представленные на платформе My cancer genome (AACR

Project GENIE database). Данная платформа в основном представляет данные полученные в центрах в США и Европе, поэтому сравнение ниже будет представлено между российской с одной стороны и Американской и Европейской популяциями с другой.

К этой подгруппе относились мутации в гене *NCOA4* (2,2% в РП vs 0,09% по мировым данным), *TAF1* (2,2% в РП vs 4,48% по мировым данным), *LRP1B* (2,2% в РП vs 12% по мировым данным), *ETV1* (2,2% в РП vs 3,5% по мировым данным), *ATM* (1,1% в РП vs 7,14% по мировым данным), *BRCA2* (2,2% vs 5,6% по мировым данным), *KDM5C* (2,2% vs 2,35% по мировым данным), *PDGFRA* (1,1% vs 3,5% по мировым данным), *PMS1* (1,1% vs 2,0% по мировым данным), *MSH6* (1,1% vs 2,1% по мировым данным), *NTKRI* (2,2% vs 3,88% по мировым данным), *AKT1* (1,1% vs 0,91% по мировым данным), *AKT3* (1,1% vs 1,51% по мировым данным) *ABL* (1,1% vs 0,47% по мировым данным), *MPL* (1,1% vs 1,24% по мировым данным), *MET* (2,2% vs 2,7% по мировым данным), *SDC4* (1,1% vs 0,12% по мировым данным), *IKBKE* (2,2% vs 0,86% по мировым данным).

Как видно из представленной информации, в большинстве своем данные о частоте встречаемости мутаций, полученные в данной работе были близки к общемировым, исключение составили только частоты мутаций в генах *LRP1B*, *ATM*, частота встречаемости которых в настоящей работе была значительно ниже в сравнении с общемировыми данными.

Частоту нескольких мутаций не удалось сравнить с общемировыми данными в связи с отсутствием информации о частоте их встречаемости при НМРЛ в мировой литературе и базах данных – *TCF7L1*, *ADGRA2*, *ADAMTS2*, *CDH5*, *CIC*, *XPC*, *LTK*.

Частота встречаемости клинически значимых мутаций, таких как мутация в гене *EGFR*, транслокация *ALK*, *ROS1*, *RET*, мутаций в генах *BRAF* в нашем исследовании была близка к общемировым – *EGFR* (20,1% vs ~ 25%), *ALK* (3,2% vs 5-6%), *ROS1* (3,2% vs ~2%), *BRAF* (клинически значимый 15 экзон 1,6% vs ~2%), *RET* (1,6% vs ~1%).

Генетическое тестирование показало, что в большинстве случаев у одного пациента, вне зависимости от гистологического подтипа опухоли, выявлялись мутации более чем в одном гене. Только у 18,9% пациентов были выявлены единичные мутации. Среднее количество мутаций у одного пациента зависело от двух параметров – от пола и от статуса курения.

При плоскоклеточном раке, без учета статуса курения, в среднем у одного пациента выявлялось больше соматических мутаций, чем при аденокарциноме. Также, у курящих пациентов ожидаемо количество соматических мутаций оказалось выше по сравнению с некурящими. При сравнении количества соматических мутаций у курящих пациентов было показано, что их количество статистически значимо не отличалось между курящими пациентами с аденокарциномой и курящими пациентами с плоскоклеточным раком легкого.

При более подробном анализе результатов генетического тестирования – анализе частоты встречаемости мутаций различных экзонов генов, входящих в тестируемую панель, было выявлено, что ранжированная частота встречаемости того или иного экзона не всегда повторяет ранжированную общую частоту встречаемости мутаций содержащего его гена. Учитывая главенствующую роль информации о мутации в конкретном экзоне а не гене в целом, можно сделать вывод о том, что информация о частотах встречаемости мутаций в различных экзонах может быть полезной для клиницистов и исследователей, особенно когда она значительно отличается от частоты встречаемости мутаций самого гена.

Количество экзонов с мутациями у одного человека показало такую же зависимость от пола и курения, как и количество мутаций в генах. У мужчин среднее количество экзонов с мутацией было больше, чем у женщин, у курящих пациентов больше, чем у не курящих.

При анализе зависимости стадии заболевания и количества генетических дефектов были получены данные, говорящие об отсутствии повышения количества мутаций в генах и экзонах при повышении стадии заболевания. Это может свидетельствовать о том, что исследуемые мутации могут быть

клональными, то есть появляющимися в самом начале заболевания, а не субклональными, накапливающимися по мере роста и прогрессирования опухоли.

Предложенный в данной работе метод определения вероятности прогрессирования заболевания на основании молекулярно-генетического статуса пациентов (наличие мутаций во всех выявленных экзонах гена *FGFR3* одновременно с отсутствием мутаций в 7 (с.725G>T, p.C242F; с.734G>T, p.G245V; с.731G>T, p.G244V) и 8 (с.832C>T, p.P278S; с.803A>T, p.N268I; с.817C>T, p.R273C) экзонах *TP53*) подтвердил свою эффективность по данным многофакторного регрессионного анализа. Многофакторный регрессионный анализ показал, что пациенты с наличием мутации в гене *FGFR3* одновременной с отсутствием мутаций в 7 и 8 экзонах *TP53* имеют меньшую вероятность прогрессирования заболевания после оперативного лечения по сравнению с любыми другими, встретившимися в данной работе вариантами мутационного статуса. Чувствительность метода составила - 66,7% при специфичности -70,6%.

Существует ряд зарубежных работ, показывающих, что мутации в гене *TP53* негативно влияют на прогноз при НМРЛ. К примеру, работа Cheng-long Huang et al., в которой авторы пришли к выводу, что у пациентов с локализованным НМРЛ I-III стадии наличие мутаций в 7 и 8 экзонах гена *TP53* негативно влияет на общую выживаемость, что перекликается с полученными в настоящей работе данными, касающимися повышения риска прогрессирования заболевания у пациентов с локализованным НМРЛ I-IIIА, у которых была выявлена мутация в 7 или 8 экзоне гена *TP53* [88, 89]. Другая работа 2020 года показала уже зависимость между уменьшением безрецидивной выживаемости у пациентов с локализованным НМРЛ после радикального оперативного лечения и наличием мутаций в гене *TP53* вне зависимости от экзона и конкретной мутации. Медиана безрецидивной выживаемости составила 38,4 месяца для пациентов с наличием мутации в гене *TP53* против недостигнутой медианы безрецидивной выживаемости на период наблюдения 5,5 лет [90]. Однако, есть и работы, не показавшие влияние наличия мутаций в гене *TP53*, в том числе в 7 и 8 экзонах на выживаемость без прогрессирования у пациентов с локализованным НМРЛ после

радикального оперативного лечения (N=566). В работе Zhisong Fan et al., было показано, что наличие мутаций в 5-8 экзонах TP53 статистически значимо не влияли на выживаемость без прогрессирования [91]. Данный факт демонстрирует необходимость дальнейшего изучения влияния мутаций в гене *TP53* и других генах на прогноз у пациентов с немелкоклеточным раком легкого после проведенного радикального оперативного лечения, в российской популяции пациентов.

Мутации в гене *FGFR3* по результатам данной работы статистически значимо ассоциировались с уменьшением вероятности рецидива заболевания после проведенного радикального лечения в случае отсутствия одновременной мутации в 7 или 8 экзоне гена *TP53*. Ген *FGFR3* кодирует строение рецептора фактора роста фибробластов 3. Воздействие на данный рецептор запускает каскад реакций по активации таких внутриклеточных сигнальных путей как MAPK, PI3K-AKT-mTOR, JACK-STAT, которые ответственны за активацию роста и пролиферации клетки [92]. Ряд зарубежных работ показали, что альтерации в гене *FGFR3* ассоциируются с улучшением прогноза пациентов с немелкоклеточным раком легкого и другими злокачественными опухолями. Китайское исследование 2023 года продемонстрировало, что гиперэкспрессия и мутации в 10 экзоне гена *FGFR3* позитивно коррелировали с увеличением общей и безрецидивной выживаемости у пациентов с НМРЛ I-IIIА стадией, перенесших радикальное оперативное лечение (N=116). Более того, многофакторный анализ показал, что альтерации в гене *FGFR3* являются независимым положительным прогностическим фактором увеличения общей выживаемости [93]. Другое исследование, касающееся рака мочевого пузыря, также показало, что наличие мутации в гене *FGFR3* (9 экзон) статистически значимо ассоциировалось с уменьшением вероятности рецидива заболевания после проведенного оперативного лечения [94]. Однако, для некоторых злокачественных опухолей, например для меланомы кожи, наличие альтераций в гене *FGFR3* наоборот связано с ухудшением прогноза заболевания. При меланоме кожи альтерации в гене *FGFR3* достоверно связаны с увеличением толщины по Бреслоу и с более

высокой частотой поражения регионарных лимфоузлов. Причиной является усиленная активация эпителиально-мезенхимального перехода в опухолях с альтерациями в *FGFR3* [95]. Причины по которым наличие альтераций в гене *FGFR3* являются положительным предиктором прогноза заболевания для одних злокачественных опухолей и отрицательным предиктором для других пока не выяснены и требуют дальнейшего изучения.

Проведённый анализ зависимости молекулярно-генетического статуса и прогноза заболевания (общей и выживаемости без прогрессирования) показал, что особенности молекулярно-генетического статуса исследованной группы пациентов влияют не только на риск рецидива, но и на вышеописанные показатели. По данным многофакторного регрессионного анализа было показано, что независимыми предикторами снижения ОВ для аденокарциномы стала стадия заболевания, для плоскоклеточного рака лёгкого – стадия заболевания и мутация в 8 экзоне гена *PTEN*. Ген *PTEN* кодирует антионкоген, активация которого тормозит рост, пролиферацию и деление клетки через ингибирование активности основных внутриклеточных сигнальных путей (в основном PI3K/АКТ/mTOR и MAPK), а также регулирует апоптоз [96]. Хотя основной механизм его супрессорной активности в отношении опухолей опосредован его способностью дефосфорилировать PIP3 в PIP2, что приводит к антагонизму передачи сигналов PI3K/АКТ и индуцированию гибели опухолевых клеток, полностью механизм *PTEN*-опосредованной опухолевой супрессии ещё до конца не изучен. Снижение или потеря экспрессии опухолью *PTEN* связана со снижением общей выживаемости пациентов с НМРЛ, что было подтверждено несколькими исследованиями и перекликается с результатами данной работы [97].

Независимыми предикторами снижения ВБП при аденокарциноме стали мутации в 7 экзоне гена *TP53* и 20 экзоне гена *EGFR*. Влияние мутации в 7 экзоне гена *TP53* уже было обсуждено выше, а наличие мутации в 20 экзоне гена *EGFR* является хорошо изученным и общепризнанным негативным фактором прогноза для немелкоклеточного рака лёгкого [98]. Независимыми предикторами снижения ВБП для плоскоклеточного рака лёгкого – мутация в 8 экзоне гена *PTEN*.

Учитывая высокую распространённость использования метода NGS в диагностике немелкоклеточного рака лёгкого, широкие панели мутаций, которые данный метод может эффективно и точно обрабатывать, а также возможность создавать или модифицировать панели соматических мутаций, данные, полученные в настоящей работе можно использовать для создания диагностических панелей, способных эффективно и точно определять прогноз пациентов с локализованным немелкоклеточным раком лёгкого, получивших радикальное оперативное лечение с или без добавления того или иного варианта периперационной терапии.

ВЫВОДЫ

1. Определён профиль генетических нарушений у пациентов Российской популяции с НМРЛ I-IIIА стадий (проанализировано 218 экзонов 80 генов). По частоте встречаемости мутации разделены на 3 группы: первая - 6,6-47,7% (13 генов), вторая – 3,3-5,6% (15 генов) и третья – менее 3,3% (34 гена).

2. Выделены группы мутаций в генах и их экзонах, характерные только для аденокарциномы - 21 ген и 58 экзонов, или только для плоскоклеточного рака - 10 генов и 28 экзонов. Они ранжированы по частоте встречаемости.

3. Выявлена прямая связь между рядом генетических альтераций и полом (у мужчин статистически чаще встречаются мутации в генах *STK11*, *BRCA1*, *PTEN*, а у женщин мутации в гене *EGFR* и транслокация в гене *ALK*) и возрастом пациентов (у пациентов старшей возрастной группы (60 лет и более) чаще встречаются мутации в 8 экзоне гена *TP53*, у более молодых пациентов чаще встречаются мутации в 5 экзоне *TP53*, 6 экзоне гена *STK11*, 1 экзоне гена *GPC3*).

4. Наличие мутаций во всех выявленных экзонах гена *FGFR3* одновременно с отсутствием мутаций в 7 (с.725G>T, p.C242F; с.734G>T, p.G245V; с.731G>T, p.G244V) и 8 (с.832C>T, p.P278S; с.803A>T, p.N268I; с.817C>T, p.R273C) экзонах *TP53* достоверно ассоциируется с уменьшением вероятности прогрессирования заболевания (чувствительность - 66,7% при специфичности -70,6%).

5. Независимым предиктором снижения общей выживаемости при аденокарциноме легкого стала стадия заболевания. Независимыми предикторами снижения выживаемости без прогрессирования при аденокарциноме легкого стали мутации в 7 экзоне гена *TP53* (C.786delC, P.N262fs) и 20 экзоне гена *EGFR* (с.2300_2301insCAGCGTGGA, p.A767delinsASVD).

6. Независимыми предикторами снижения общей выживаемости при плоскоклеточном раке лёгкого стали стадия заболевания и мутации в 8 экзоне гена *PTEN* (с.1003C>T, p.R335X; с.805_806del, p.K269fs). Независимым предиктором снижения выживаемости без прогрессирования при плоскоклеточном раке

лёгкого стали мутации в 8 экзоне гена *PTEN* (с.1003C>T, p.R335X; с.805_806del, p.K269fs)

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Выявление значимых с клинической точки зрения соматических мутаций при немелкоклеточном раке легкого требует дальнейшего изучения на большем количестве пациентов, что позволит более точно определить их влияние на прогноз заболевания (связь с вероятностью рецидива заболевания после радикального оперативного лечения, влияние на общую и безрецидивную выживаемость). Полученные результаты исследования позволяют определить перспективы дальнейшей разработки темы, а именно: продолжить исследование прогностического значения соматических мутаций при локализованной немелкоклеточном раке легкого на более крупных когортах пациентов, а также создание кастомных панелей для NGS тестирования из прогностически значимых соматических мутаций для улучшения диагностики и прогнозирования течения заболевания у пациентов с локализованным немелкоклеточным раком легкого.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ВБП – выживаемость без прогрессирования

НМРЛ – немелкоклеточный рак легкого

ОВ – общая выживаемость

ПЦР - полимеразная цепная реакция

ПХТ – полихимиотерапия

цодНК – циркулирующая опухолевая дезоксирибонуклеиновая кислота

цкПЦР – цифровая капельная полимеразная цепная реакция

NGS – next generation sequences

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Лактионов, К. К. Роль жидкостной биопсии в выборе тактики лечения немелкоклеточного рака лёгкого / К.К. Лактионов, А.М. Казаков, К.А. Саранцева, Е.В. Реутова, А.Л. Арзуманян, Н.М. Москалюк // Практическая онкология. – 2022. – Т.1. – №1. – С.46-55.
2. Мерабишвили, В.М. Заболеваемость и смертность населения от рака легкого, достоверность учета / В.М. Мерабишвили, А.И. Арсеньев, С.А. Тарков, А.А. Барчук, А.М. Щербаков, Е.В. Демин // Сибирский онкологический журнал. – 2018. - Т.17. – №6. – С.15-26.
3. Carper, M. B. Clinical potential of gene mutations in lung cancer / M.B. Carper, P.P. Claudio // Clin Transl Med. – 2015. – Vol.4. – №33. – P.2-12.
4. Cheng, T.D. The International Epidemiology of Lung Cancer: Latest Trends, Disparities, and Tumor Characteristics / T.D. Cheng, S.M. Cramb, P.D. Baade, D.R. Youlden, C. Nwogu, M.E. Reid // J Thorac Oncol. – 2016. – Vol.11. – №10. – P.1653-71.
5. Lin, H.T. Epidemiology and Survival Outcomes of Lung Cancer: A Population-Based Study / H.T. Lin, F. Liu, C. Wu, C. Kuo, W. Lan, H. Yu // Biomed Res Int. - 2019. – Vol.4. – №1. – P.1-19.
6. Ramalingam, S.S. Overall Survival with Osimertinib in Untreated, EGFR-Mutated Advanced NSCLC / S. S. Ramalingam, J. Vansteenkiste, D. Planchard, B. C. Cho, J. E. Gray, Y.Ohe, C. Zhou, T. Reungwetwattana, Y. Cheng, B. Chewaskulyong, R. Shah, M. Cobo, K.H. Lee, P. Cheema, M. Tiseo, T. John, M. Lin, F. Imamura, T. Kurata, A. Todd, R. Hodge, M. Saggese, Y. Rukazenzov, J. Soria // N Engl J Med. – 2020. – Vol.382. – N1. – P.41-50.
7. Qi, Fei. First-line pemetrexed-platinum doublet chemotherapy with or without bevacizumab in non-squamous non-small cell lung cancer: A real-world propensity score-matched study in China / F. Qi, X. Hu, Y. Liu, Z. Wang, J. Duan, Jie Wang, M.D. Chin // J Cancer Res. – 2019. – Vol.31. – №5. – P.749–758.

8. Xiao, H. Efficacy of pemetrexed plus platinum doublet chemotherapy as first-line treatment for advanced nonsquamous non-small-cell-lung cancer: a systematic review and meta-analysis / H. Xiao, R. Tian, Z. Zhang, K. Du, Y. Ni // *Onco Targets Ther.* – 2016. – Vol.9. – №1. – P.1471–1476.

9. Peters, S. Alectinib versus Crizotinib in Untreated ALK-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer / S. Peters, D.R. Camidge, A. T. Shaw, S. Gadgeel, J. S. Ahn, D. Kim, S. Ou, M. Pérol, R. Dziadziuszko, Ra. Rosell, A. Zeaiter, E. Mitry, S. Golding, B. Balas, J. Noe, P. N. Morcos, T. Mok // *N Engl J Med.* – 2017. – Vol.377. – №9. – P.829-838.

10. Bronte, G. Targeting RET-rearranged non-small-cell lung cancer: future prospects / G. Bronte, P. Ulivi, A. Verlicchi, P. Cravero, A. Delmonte, L. Crinò // *Lung Cancer (Auckl).* – 2019. – Vol.1. – №10. – P.27–36.

11. Takamori, S. Targeted Therapy for RET Fusion Lung Cancer: Breakthrough and Unresolved Issue / S. Takamori, T. Matsubara, N. Haratake, G. Toyokawa, T. Fujishita, R. Toyozawa, K. Ito, M. Yamaguchi, K. Taguchi, T. Okamoto, T. Seto // *Front Oncol.* – 2021. – Vol.11. – №1. – P.1-6.

12. Fan, Z. Genomic landscape and prognosis of patients with *TP53*-mutated non-small cell lung cancer / Z. Fan, Q. Zhang, L. Feng, L. Wang, X. Zhou, J. Han, D. Li, J. Liu, X. Zhang, J. Zuo, X. Zou, Y. Cai, Y. Sun, Y. Wang // *Ann Transl Med.* – 2022. – Vol.10. – №4. – P.1-12.

13. Laktionov, K.K. Mutation in the *kras* gene as a predictor of the effectiveness of immunotherapy for non-small cell lung cancer / K.K. Laktionov, A.M. Kazakov, K.A. Sarantseva, D.S. Scherbo, A.P. Koval // *Siberian journal of oncology.* – 2022. – Vol.21. – №1. – P.115-121.

14. Vogelstein, B. Cancer genome landscapes / B. Vogelstein, Ni. Papadopoulos, V.E. V, S. Zhou, L. A. Diaz Jr, K.W. Kinzler // *Science.* – 2013. – Vol.339. – №6127. – P.1546-1558.

15. Harrison, P.T. Rare epidermal growth factor receptor (EGFR) mutations in non-small cell lung cancer / P. T. Harrison, S. Vyse, P. H. Huang // *Seminars in Cancer Biology.* – 2020. – Vol.61. – №1. – P.167-179.

16. Aparisi, F. Passenger mutations in cancer evolution / F. Aparisi, H. Amado-Labrador, S. Calabuig-Fariñas, S. Torres, A. Herreros-Pomares, E. Jantus-Lewintre, A. Blasco, V. Iranzo, C. Camps // *Cancer Reports and Reviews*. – 2019. – Vol.3. – №2. – P.1-8.
17. Morjaria, S. Driver mutations in oncogenesis / S. Morjaria // *International Journal of Molecular and Immuno Oncology*. – 2020. – Vol.6. – №2. – P.100-102.
18. Fu, Y. FunSeq2: a framework for prioritizing noncoding regulatory variants in cancer / Y. Fu, Z. Liu, S. Lou, J. Bedford, X. J. Mu, K.Y. Yip, E. Khurana, M. Gerstein // *Genome Biology*. – 2014. – Vol.15. – №480. – P.1-15.
19. Kumar, S. Passenger Mutations in More Than 2,500 Cancer Genomes: Overall Molecular Functional Impact and Consequences / S. Kumar, J. Warrell, S. Li, P. D. McGillivray, W. Meyerson, L. Salichos, A. Harmanci, A. Martinez-Fundichely, C.Chan, M. M. Nielsen, L. Lochovsky, Y. Zhang, X. Li, S. Lou, J. S. Pedersen, C. Herrmann, G. Getz, E. Khurana, M. B. Gerstein // *Cell*. – 2020. – Vol.180. – №5. – P.915-927.
20. Лактионов, К.К. Роль использования циркулирующей опухолевой ДНК в лечении диссеминированных пациентов с немелкоклеточным раком лёгкого / К.К. Лактионов, А.М. Казаков, М.Г. Гордиев // *Практическая онкология*. – 2021. – Т.22. – №2. – С.165-171.
21. Ortega-Franco, A. ADAURA: The Splash of Osimertinib in Adjuvant EGFR-Mutant Non-small Cell Lung Cancer / A. Ortega-Franco, S. Rafee // *Oncol Ther*. – 2022. – Vol.10. – №1. – P.13-22.
22. Enriqueta, F. Adjuvant atezolizumab after adjuvant chemotherapy in resected stage IB–IIIA non-small-cell lung cancer (IMpower010): a randomised, multicentre, open-label, phase 3 trial / F. Enriqueta, A. Nasser, C. Zhou, T. Csőszi, I. Vynnychenko, O. Goloborodko, A. Luft, A. Akopov, A. Martinez-Marti, H. Kenmotsu, Y.Chen, A.Chella, S. Sugawara, D. Voong, F. Wu, J. Yi, Y. Deng, M. McClelland, E. Bennett, B. Gitlitz, H. Wakelee // *Lancet*. – 2021. – Vol.398. – №10308. – P.1344-1357.

23. Wang, J. AKT isoform-specific expression and activation across cancer lineages / J. Wang, W. Zhao, H. Guo, Y. Fang, S. E. Stockman, S. Bai, P. K. Ng, Y. Li, Q. Yu, Y. Lu, K. J. Jeong, X. Chen, M. Gao, J. Liang, W. Li, X. Tian, E. Jonasch, G.B. Mills, Z. Ding // *BMC Cancer*. – 2018. – Vol.18. – №742. – P.1-10.

24. Sanaeia, M.G. The PI3K/Akt/mTOR pathway in lung cancer; oncogenic alterations, therapeutic opportunities, challenges, and a glance at the application of nanoparticles / M. Sanaei, S. Razi, A. Pourbagheri-Sigaroodi, D. Bashash // *Transl Oncol*. – 2022. – Vol.18. – №14. – P.1-17.

25. Scheffler, M. PIK3CA mutations in non-small cell lung cancer (NSCLC): Genetic heterogeneity, prognostic impact and incidence of prior malignancies / M. Scheffler, M. Bos, M. Gardizi, K. König, S. Michels, J. Fassunke, C. Heydt, H. Künstlinger, M. Ihle, F. Ueckerth, K. Albus, M. Serke, U. Gerigk, W. Schulte, K. Töpelt, L. Nogova, T. Zander, W. Engel-Riedel, E. Stoelben, Y. Ko, W. Randerath, B. Kaminsky, J. Panse, C. Becker, M. Hellmich, S. Merkelbach-Bruse, L. C. Heukamp, R. Büttner, J. Wolf // *Oncotarget*. – 2015. – Vol.6. – №2. – P.1315-1326.

26. Daoud, A. Targeting Novel but Less Common Driver Mutations and Chromosomal Translocations in Advanced Non-Small Cell Lung Cancer. *Front. Oncol* / A. Daoud, Q. S Chu // *Front Oncol*. – 2017. – Vol.7. – №222. – P.1-10.

27. Xu, C. NSCLC Driven by DDR2 Mutation is Sensitive to Dasatinib and JQ1 Combination Therapy / C. Xu, K.A Buczkowski, Y. Zhang, H. Asahina, E.M. Beauchamp, H. Terai, Y.Y. Li, M. Meyerson, K. Wong, P.S. Hammerman // *Mol Cancer Ther*. – 2015. – Vol.14. – №10. – P.2382–2389.

28. Fathi, Z. Distribution of KRAS, DDR2, and TP53 gene mutations in lung cancer: An analysis of Iranian patients / Z. Fathi, S. A. Mousavi, R. Roudi, F. Ghazi // *PLoS One*. – 2018. – Vol.13. – №7. – P.1–9.

29. Ricordel, C. Mutational Landscape of DDR2 Gene in Lung Squamous Cell Carcinoma Using Next-generation Sequencing / C. Ricordel, A. Lespagnol, F. Llamas-Gutierrez, M. Tayrac, M. Kerjouan, A. Fievet, H. Hamdi-Rozé, A. Aliouat, B. Desrues, J. Mosser, H. Léna // *Clin Lung Cancer*. – 2018. – Vol.19. – №2. – P.163–169.

30. Liu, L. PTEN inhibits non-small cell lung cancer cell growth by promoting G0/G1 arrest and cell apoptosis / L. Liu, L. Huang, J. He, S. Cai 1, Yimin Weng, S. Huang, S. Ma // *Oncol Lett.* – 2019. – Vol.17. – №1. – P.1333–1340.
31. Chang, X. The clinical significance of loss of FHIT and PTEN expression in 289 patients with non-small-cell lung cancer / X. Chang, X. Zuo, Z. Wang, F. Li, Y. Duan, M. Han // *Transl. Cancer Res.* – 2016. – Vol.5. – №3. – P.294–301.
32. Yoo, S.B. Loss of PTEN Expression is an Independent Poor Prognostic Factor in Non-small Cell Lung Cancer / S. B. Yoo, X. Xu, H. J. Lee, S. Jheon, C. Lee, G. Choe, J. Chung // *J. Pathol.* – 2011. – Vol.45. – №1. – P.329–335.
33. Spoerke, J.M. Phosphoinositide 3-kinase (PI3K) pathway alterations are associated with histologic subtypes and are predictive of sensitivity to PI3K inhibitors in lung cancer preclinical models / J. M Spoerke, C. O'Brien, L. Huw, H. Koeppen, J. Fridlyand, R. K. Brachmann, P. M. Haverty, A. Pandita, S. Mohan, D. Sampath, L. S. Friedman, L. Ross, G. M. Hampton, L. C. Amler, D. S. Shames, M. R. Lackner // *Clin. Cancer Res.* – 2012. – Vol.18. – №24. – P.6771–6783.
34. Gkoutakos, A. PTEN in Lung Cancer: Dealing with the Problem, Building on New Knowledge and Turning the Game Around / A. Gkoutakos, G. Sartori, I. Falcone, G. Piro, L. Ciuffreda, C. Carbone, G. Tortora, A. Scarpa, E. Bria, M. Milella, R. Rosell, V. Corbo, S. Pilotto // *Cancers (Basel).* – 2019. – Vol.11. – №8. – P.1141–1149.
35. Halvorsen, A.R. TP53 Mutation Spectrum in Smokers and Never Smoking Lung Cancer Patients / A. R. Halvorsen, L. Silwal-Pandit, L. A. Meza-Zepeda, D. Vodak, P. Vu, C. Sagerup, E. Hovig, O. Myklebost, A. Børresen-Dale, O. T. Brustugun, Å. Helland // *Front.* – 2016. – Vol.7. – №85. – P.1–10.
36. Ahn, E.R. Palbociclib in Patients With Non-Small-Cell Lung Cancer With CDKN2A Alterations: Results From the Targeted Agent and Profiling Utilization Registry Study / E. R. Ahn, P. K. Mangat, E. Garrett-Mayer, S. Halabi, E. G. Dib, D. E. Haggstrom, K. B. Alguire, C. J. Calfa, T. L. Cannon, P. A. Crilley, A. G. Gaba, A. S. Marr, A. Sangal, R. Thota, K. R. Antonelli, S. Islam, A. L. Rygiel, S. S. Bruinooge, R. L. Schilsky // *JCO Precis Oncol.* – 2020. – Vol.1. – №4. – P.757–766.

37. Федянин, М.Ю. Рецепторы фактора роста фибробластов при злокачественных опухолях / М.Ю. Федянин, Д.Н. Хмелькова, Т.С. Серебрянская, Т.А. Никольская, С.А. Тюляндин // Злокачественные опухоли. – 2014. – Vol.1. – №4. – P.19–34.

38. Pacini, L. Targeting the Fibroblast Growth Factor Receptor (FGFR) Family in Lung Cancer / L. Pacini, A. D. Jenks, N. C. Lima, P. H. Huang // Cancer Treat Rev.– 2021. – Vol.10. – №5. – P.1–22.

39. Kim, S.T. Rapamycin-insensitive companion of mTOR (RICTOR) amplification defines a subset of advanced gastric cancer and is sensitive to AZD2014-mediated mTORC1/2 inhibition / S. T. Kim, S Y Kim, S J. Klempner, J. Yoon, N. Kim, S. Ahn, H. Bang, K.M. Kim, W. Park, S. H. Park, J. O. Park, Y. S. Park, H. Y. Lim, S. H. Lee, K. Park, W. K. Kang, J. Lee // Ann Oncol.– 2017. – Vol.28. – №3. – P.547–554.

40. Cheng, H. RICTOR Amplification Defines a Novel Subset of Patients with Lung Cancer Who May Benefit from Treatment with mTORC1/2 Inhibitors / H. Cheng, Y. Zou, J. S. Ross, K. Wang, X. Liu, B. Halmos, S. M. Ali, H. Liu, A. Verma, C. Montagna, A. Chachoua, S. Goel, E. L. Schwartz, C. Zhu, J. Shan, Y. Yu, K. Gritsman, R. Yelensky, D. Lipson, G. Otto, M. Hawryluk, P. J. Stephens, V. A. Miller, B. Piperdi, R. Perez-Soler // Cancer Discov.– 2015. – Vol.5. – №12. – P.1262–1270.

41. Cheng, H. RICTOR amplification as a novel therapeutic target for lung cancer brain metastases / H. Cheng, N. Fan, E. Sokol, F. Wang, Y. Zou, M. Feng, G. M. Frampton, T. Bhagat, A. Verma, B. Halmos, R. Perez-Soler // Journal of Clinical Oncology.– 2020. – Vol.38. – №15. – P.3597–3598.

42. Zhao, D. The role of RICTOR amplification in targeted therapy and drug resistance / D. Zhao, M. Jiang, X. Zhang, H. Hou // Mol Med.– 2020. – Vol.26. – №20. – P.1–11.

43. Wilbertz, T. SOX2 gene amplification and protein overexpression are associated with better outcome in squamous cell lung cancer / T. Wilbertz, P. Wagner, K. Petersen, A. Stiedl, V. J. Scheble, S. Maier, M. Reischl, R. Mikut, N. K.

Altorki, H. Moch, F. Fend, A. Staebler, A. J. Bass, M. Meyerson, M. A. Rubin, A. Soltermann, C. Lengerke, S. Perner // *Mod Pathol.* – 2011. – Vol.24. – №7. – P.944–953.

44. Al-Hussain, T. Wilms tumor: an update / T. Al-Hussain, A. Ali, M. Akhtar // *Adv Anat Pathol.* – 2014. – Vol.21. – №3. – P.166–173.

45. Oji, Y. Overexpression of the Wilms' tumor gene WT1 in de novo lung cancers / Y. Oji, S. Miyoshi, H. Maeda, S. Hayashi, H. Tamaki, S. Nakatsuka, M. Yao, E. Takahashi, Y. Nakano, H. Hirabayashi, Y. Shintani, Y. Oka, A. Tsuboi, N. Hosen, M. Asada, T. Fujioka, M. Murakami, K. Kanato, M. Motomura, E.H. Kim, M. Kawakami, . Ikegame, H. Ogawa, K. Aozasa, I. Kawase, H. Sugiyama // *Int J Cancer.* – 2002. – Vol.100. – №3. – P.297–303.

46. Leslie, L. L. NF1 in Solid Tumors: The Unknown Soldier of Tumor Suppressor Genes? / L.L.Leslie, K. Choucair, R. Patel, R. S. Albalawy, S. M. Morand, L. Stanbery, M. Albrethsen, M. Nemunaitis, A. Walter, F. C. Brunicardi, L. Dworkin, J. Nemunaitis // *Genetics & Molecular Medicine.* – 2019. – Vol.1. – №1. – P.1–13.

47. Redig, A.J. Clinical and molecular characteristics of NF1 mutant lung cancer / A. J. Redig, M. Capelletti, S. E. Dahlberg, L. M. Sholl, S. Mach, C. Fontes, Y. Shi, P. Chalasani, P. A. Jänne // *Clin Cancer Res.* – 2016. – Vol.22. – №13. – P.3148–3156.

48. Xu,C. P3.03-09 Molecular Spectrum of KIT Mutations Detection in Chinese Non-Small Cell Lung Cancer Patients / C. Xu, W. Wang, Q. Zhang, W. Zhuang, Y. Zhu, Y. Chen, M. Fang, G. Chen, T. Lv, Y. Song // *Journal of Thoracic Oncology.*– 2018. – Vol.13. – №10. – P.913–914.

49. Wang, Y. Clinical and molecular characteristics of TSC1/2 mutant lung cancer / Y. Wang, S. Xu, S. Zhao, S. Zhu, X. Li, X. Lei, J. Chen, G.Chen // *Journal of Clinical Oncology.* – 2020. – Vol.18. – №15. – P.30–42.

50. Li,N. The Role of Glypicans in Cancer Progression and Therapy / N. Li , M. R. Spetz, M. Ho // *Journal of Histochemistry and Cytochemistry.* – 2020. –Vol.68. – №12. – P.841–862.

51. Remon, J. Somatic and Germline BRCA 1 and 2 Mutations in Advanced NSCLC From the SAFIR02-Lung Trial / J. Remon, B. Besse, A. Leary, I. Bièche, B.

Job, L. Lacroix, A. Auguste, M. Mauduit, C. Audigier-Valette, J. Raimbourg, A. Madroszyk, S. Michels, M. A. Bayar, M. Jimenez, J. Soria, E. Rouleau, F.e Barlesi // JTO Clin Res Rep.– 2020. –Vol.1. – №3. – P.81–87.

52. Fang, W. BRCA1/2 germline mutations and response to PARP inhibitor treatment in lung cancer / W. Fang, X. Cai, H. Zhou, Y. Wang, Y. Zhang, S. Hong, Y. Shao, L. Zhang // Journal of Clinical Oncology . – 2019. – Vol.37. – №15. – P.1–10.

53. The AACR Project GENIE Consortium. AACR Project GENIE: powering precision medicine through an international consortium / AACR Project GENIE Consortium // Cancer Discovery. – 2017. – Vol.7. – №8. – P.818–831.

54. Singh, V. Characterization of ERBB2 alterations in non-small cell lung cancer / V. Singh, R. Feldman, A. Sukari, C. Kim, H. Mamdani, A. I. Spira, G. Bepler, E. S. Kim, L. E. Raez, S. G. Pai, C. Ikpeazu, A. M. Vanderwalde, J. Xiu, A. J. Wozniak, H. Borghaei, S. V. Liu, M. Nagasaka // Journal of Clinical Oncology 38. – 2020. – Vol.38. – №15. – P.800–813.

55. Pugh, T.J. AACR Project GENIE: 100,000 Cases and Beyond / T. J. Pugh, J. L. Bell, J. P. Bruce, G. J. Doherty, M. Galvin, M. F. Green, H. Hunter-Zinck, P. Kumari, M. L. Lenoue-Newton, M. M. Li, J. Lindsay, T. Mazor, A. Ovalle, S. Sammut, N. Schultz, T. V. Yu, S. M. Sweeney, B. Bernard // Cancer Discovery. – 2022. – Vol.12. – №9. – P.2044-2057.

56. Scheffler, M. Co-occurrence of targetable mutations in Non-small cell lung cancer (NSCLC) patients harboring MAP2K1 mutations / M. Scheffler, A. Holzem, A. Kron, L. Nogova, M. A. Ihle, C. von Levetzow, J. Fassunke, C. Wömpner, E. Bitter, S. Koleczko, D. S. Y Abdulla, S. Michels, R. Fischer, R. Riedel, J. Weber, T. Westphal, U. Gerigk, J. Kern, B. Kaminsky, W. Randerath, K. Kambartel, S. Merkelbach-Bruse, R. Büttner, J. Wolf // Lung Cancer. – 2020. – Vol.144. – №10. – P.40-48.

57. Fan, Z. Genomic landscape and prognosis of patients with TP53-mutated non-small cell lung cancer / Z. Fan, Q. Zhang, L. Feng, L. Wang, X. Zhou, J. Han, D. Li, J. Liu, X. Zhang, J. Zuo, X. Zou, Y. Cai, Y. Sun, Y. Wang // Ann Transl Med. – 2022. – Vol.10. – №4. – P.188.

58. Jiao, X.D. The prognostic value of TP53 and its correlation with EGFR mutation in advanced non-small cell lung cancer, an analysis based on cBioPortal data base / X.D. Jiao, B. Qin, P. You, J. Cai, Y. Zang // Lung. – 2018. – Vol.123. – №4. – P.70-75.

59. Wang, S. The role of distinct co-mutation patterns with *TP53* mutation in immunotherapy for NSCLC / S. Wang, M. Jiang, Z. Yang, X. Huang, N. Li // Genes Dis. – 2022. – Vol.9. – №1. – P.245-251.

60. Liu, Y. Mutations in exon 8 of *TP53* are associated with shorter survival in patients with advanced lung cancer / Y. Liu, F. Xu, Y. Wang, Q. Wu, B. Wang, Y. Yao, Y. Zhang, H. Han-Zhang, J. Ye, L. Zhang, X. Mao, Z. Zhang, J. Liu, L. Zhu, R. Guo // Oncol Lett. – 2019. – Vol.18. – №3. – P. 3159–3169.

61. He, Y. Prognostic Value of TP53 Hot Exon Mutation in Patients with Advanced Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC) / Y. He, R. Guo, Y. Liu, F. Xu // Journal of Thoracic Oncology. – 2018. – Vol.13. – №10. – P. 681–682.

62. Fischer, T. PTEN mutant non-small cell lung cancer require ATM to suppress pro-apoptotic signalling and evade radiotherapy / T. Fischer, O. Hartmann, M. Reissland, C. Garcia, K. Klann, N. Pahor, C. Schülein-Völk, A. Baluapuri, B. Polat, A. Abazari, E. Gerhard-Hartmann, H. Kopp, F. Essmann, M. Rosenfeldt, C. Münch, M. Flentje, M. E. Diefenbacher // Cell Biosci. – 2022. – Vol.12. – №1. – P. 50-51.

63. Xiao, J. PTEN expression is a prognostic marker for patients with non-small cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis of the literature / J. Xiao, C. Hu, B. Xiu He, X. Chen, X. Lu, M. Xie, W. Li, S. He, S. You, Q. Chen // Oncotarget. – 2016. – Vol.7. – №36. – P. 57832–57840.

64. Boros, A. Prognostic value of tumor mutations in radically treated locally advanced non-small cell lung cancer patients / A. Boros, L. Lacroix, B. Lacas, J. Adam, J. Pignon, C. Caramella, D. Planchard, V. Montpreville, E. Deutsch, A. Levy, B. Besse, C. Pechoux // Oncotarget. – 2017. – Vol.8. – №15. – P. 25189-25199.

65. Pécuchet, N. Different prognostic impact of STK11 mutations in non-squamous non-small-cell lung cancer / N. Pécuchet, P. Laurent-Puig, A. Mansuet-Lupo, A. Legras, M. Alifano, K. Pallier, A. Didelot, L. Gibault, C. Danel, P. Just, M.

Riquet, F. Pimpec-Barthes, D. Damotte, E. Fabre, H. Blons // *Oncotarget.* – 2017. – Vol.8. – №14. – P.23831-23840.

66. Ardeshir-Larijani, F. KMT2D Mutation Is Associated With Poor Prognosis in Non-Small-Cell Lung Cancer / F. Ardeshir-Larijani, P. Bhateja, M. B. Lipka, N. Sharma, P. Fu, A. Dowlati // *Clin Lung.* – 2018. – Vol.19. – №4. – P. 489-501.

67. Xie, M. KRAS-Mutant Non-Small Cell Lung Cancer: An Emerging Promisingly Treatable Subgroup / M. Xie, X. Xu, Y. Fan // *Front. Oncol.* – 2021. – Vol.3. – №11. – P.672612.

68. Boros, A. Prognostic value of tumor mutations in radically treated locally advanced non-small cell lung cancer patients / A. Boros, L. Lacroix, B. Lacas, J. Adam, J. Pignon, C. Caramella, D. Planchard, V. Montpreville, E. Deutsch, A. Levy, B. Besse, C. Pechoux // *Oncotarget.*– 2017. – Vol.8. – №15. – P. 25189-25199.

69. Liu, Y. Prognostic Significance of Anaplastic Lymphoma Kinase Rearrangement in Patients with Completely Resected Lung Adenocarcinoma / Y. Liu, X. Ye, Y. Yu, S. Lu // *J. Thorac Oncotarget.*– 2019. – Vol.11. – №10. – P. 4258–4270.

70. Fukui, T. Clinicoradiologic Characteristics of Patients with Lung Adenocarcinoma Harboring EML4-ALK Fusion Oncogene / T. Fukui, Y. Yatabe, Y. Kobayashi, K. Tomizawa, S. Ito, S. Hatooka, K. Matsuo, T. Mitsudomi // *Lung Cancer.*– 2012. – Vol.77. – №2. – P. 319-325.

71. Garinet, S. Updated Prognostic Factors in Localized NSCLC / S. Garinet, P. Wang, A. Mansuet-Lupo, L. Fournel, M. Wislez, H. Blons // *Cancers (Basel).*– 2022. – Vol.14. – №6. – P. 1400.

72. Tamiya, A. Impact of somatic mutations on prognosis in resected non-small-cell lung cancer: The Japan Molecular Epidemiology for lung cancer study / A. Tamiya, Y. Koh, S. Isa, A. Kubo, M. Ando, H. Saka, N. Yoshimoto, S. Takeo, H. Adachi, T. Tagawa, O. Kawashima, M. Yamashita, K. Kataoka, M. Takenoyama, Y. Takeuchi, K. Watanabe, A. Matsumura, T. Kawaguchi // *Cancer Med.*– 2020. – Vol.9. – №7. – P. 2343-2351.

73. Zhang, J. Intratumor heterogeneity in localized lung adenocarcinomas delineated by multiregion sequencing / J. Zhang, J. Fujimoto, J. Zhang, D. C. Wedge, X. Song, J. Zhang, S. Seth, C. Chow, Y. Cao, C. Gumbs, K. A. Gold, N. Kalhor, L. Little, H. Mahadeshwar, C. Moran, A. Protopopov, H. Sun, J. Tang, X. Wu, Y. Ye, W. N. William, J. J. Lee, J. V. Heymach, W. K. Hong, S. Swisher, I. I. Wistuba, A. Futreal // *Science*.– 2014. – Vol.346. – №6206. – P. 256-259.

74. Jamal-Hanjani, M. Tracking the Evolution of Non–SmallCell Lung Cancer / M. Jamal-Hanjani, G. A. Wilson, N. McGranahan, N. J Birkbak // *Engl J Med*.– 2017. – Vol.376. – №22. – P. 2109-2121.

75. Sokolenko, A. Molecular Diagnostics in Clinical Oncology / A. P. Sokolenko, E. N. Imyanitov // *Front. Mol. Biosci*.– 2018. – Vol.5. – №76. – P. 21-32.

76. Qin, D. Next-generation sequencing and its clinical application / D. Qin // *Cancer Biol Med*.– 2019. – Vol.16. – №1. – P. 4–10.

77. Kazakov, A.M. Circulating tumor DNA as a marker of minimal residual disease in non-small cell lung cancer / A. M. Kazakov, K. K. Laktionov, M. G. Gordiev, B. B. Akhmedov, V. A. Kuzmina // *Malignant tumours*.– 2019. – Vol.12. – №2. – P. 14–20.

78. Pacini, L. Targeting the Fibroblast Growth Factor Receptor (FGFR) Family in Lung Cancer / L. Pacini, A. D. Jenks, N. C. Lima, P. H. Huang // *Cells*.– 2021. – Vol.10. – №5. – P. 1154–1157.

79. Shire, N.J. *STK11 (LKB1)* mutations in metastatic NSCLC: Prognostic value in the real world / N. J. Shire, A. B. Klein, A. Golozar, J. M. Collins, K. H. Fraeman, B. L. Nordstrom, R. McEwen, T. Hembrough, N. A Rizvi // *PLoS One*.– 2020. – Vol.15. – №9. – P. 19–25.

80. Huang, Q. Loss of TSC1/TSC2 sensitizes immune checkpoint blockade in non-small cell lung cancer / Q. Huang, F. Li, H. Hu, Z. Fang, Z. Gao, G. Xia, W. Ng, A. Khodadadi-Jamayran, T. Chen, J. Deng, H. Zhang, C. Almonte, K. Labbe, H. Han, K. Geng, S. Tang, G. J. Freeman, Y. Li, H. Chen, K. Wong // *Sci Adv*. - 2022 – Vol.8. – №5. – P. 356–362.

81. Bhateja, P. Retinoblastoma mutation predicts poor outcomes in advanced non small cell lung cancer / P. Bhateja, M. Chiu, G. Wildey, M. B. Lipka, P. Fu, M. C. Yang, F. Ardeshir-Larijani, N. Sharma, A. Dowlati // *Cancer Med.* – 2022 – Vol.8. – №4. – P. 1459-1466.

82. Huang, Y. Frequency and Molecular Characteristics of BRCA1 Mutations in Non-Small Cell Lung Cancer from East Asian Patients / Y. Huang, C. Xu, W. Wang, Q. Zhang, W. Zhuang, Y. Zhu, Y. Huang, G. Chen, M. Fang, T. Lv, Y. Song // *Journal of thoracic oncology.*– 2020. – Vol.14. – №10. – P.963–964.

83. Pan, Y. Frequency and clinical significance of *NFI* mutation in lung adenocarcinomas from East Asian patients / Y. Pan, C. Yuan, C. Cheng, Y. Zhang, Y. Ma, D. Zheng, S. Zheng, Y. Li, Y. Jin, Y. Sun, H. Chen // *Cancer Genetics and Epigenetics.* – 2019. – Vol.144. – №2. – P. 290-296.

84. Wei, X. Mutational landscape and characteristics of ERBB2 in non-small cell lung cancer / X. Wei, X. Gao, X. Zhang, J. Yang, Z. Chen, Y. Wu, Q. Zhou // *Thorac Cancer.* – 2020. – Vol.11. – №6. – P. 1512–1521.

85. Diossy, M. A subset of lung cancer cases shows robust signs of homologous recombination deficiency associated genomic mutational signatures / Miklos Diossy, Zsofia Sztupinszki, Judit Borcsok, Marcin Krzystanek, Viktoria Tisza, Sandor Spisak, Orsolya Rusz, Jozsef Timar, István Csabai, Janos Fillinger, Judit Moldvay, Anders Gorm Pedersen, David Szuts, Zoltan Szallasi // *NPJ Precis Oncol.*– 2021. – Vol.5. – №1. – P.55-56.

86. Ricordel, C. Mutational Landscape of DDR2 Gene in Lung Squamous Cell Carcinoma Using Next-generation Sequencing / C. Ricordel, A. Lespagnol, F. Llamas-Gutierrez, M. Tayrac, M. Kerjouan, A. Fievet, H. Hamdi-Rozé, A. Aliouat, B. Desrues, J. Mosser, H. Léna // *Clin Lung Cancer.*– 2018. – Vol.19. – №2. – P.163-169.

87. Xu, C. P2.03-11 PDGFRA Defines a Unique Molecular Subtypes of Chinese Non-Small Cell Lung Cancer Patients / C. Xu, W. Wang, Q. Zhang, W. Zhuang, Y. Zhu, Y. Chen, M. Fang, G. Chen, T. Lv, Y. Song // *Journal of Thoracic Oncology.*– 2018. – Vol.13. – №10. – P.720.

88. Toufektchan, E. The Guardian of the Genome Revisited: p53 Downregulates Genes Required for Telomere Maintenance, DNA Repair, and Centromere Structure / E. Toufektchan, F. Toledo // *Cancers (Basel)*.– 2018. – Vol.10. – №5. – P.135.

89. Huang, C. Mutations in exon 7 and 8 of p53 as poor prognostic factors in patients with non-small cell lung cancer / Cheng-long Huang, Toshihiko Taki, Masashi Adachi, Takaaki Konishi, Masahiko Higashiyama, Masayuki Miyake // *Oncogene*.– 1998. – Vol.16. – №1. – P.2469–2477.

90. Goto, T. Association of Mutation Profiles with Postoperative Survival in Patients with Non–Small Cell Lung Cancer / T. Goto, K. Kunimasa, Y. Hirotsu, T. Nakagomi, Y. Yokoyama, R.Higuchi, S. Otake, T. Oyama, K. Amemiya, H. Mochizuki, M. Omata // *Cancers (Basel)*. – 2020. – Vol.11. – №11. – P.3472.

91. Fan, Z. Genomic landscape and prognosis of patients with TP53-mutated non-small cell lung cancer / Z. Fan, Q. Zhang, L. Feng, L. Wang, X. Zhou, J. Han, D. Li, J. Liu, X. Zhang, J. Zuo, X. Zou, Y. Cai, Y. Sun, Y. Wang // *Ann Transl Med*. – 2022. – Vol.10. – №14. – P.188.

92. Ornitz,D. The Fibroblast Growth Factor signaling pathway / D. M. Ornitz, N. Itoh // *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*.– 2015. – Vol.4. – №3. – P.215–266.

93. Lin, Y. High expression of FGFR3 predicts a better prognosis for patients with non-small cell lung cancer in a Chinese population / Y. Lin, H. Long, C. Chen, G. Liu, F. Li, Y. Tian, L. Da // *J Thorac Dis*. – 2023. – Vol.15. – №1. – P.101–111.

94. Kang, H. Expression levels of FGFR3 as a prognostic marker for the progression of primary pT1 bladder cancer and its association with mutation status / H. W. Kang, Y. Kim, P. Jeong, C. Park, W. T. Kim, D. H. Ryu, E. Cha, Y. Ha, T. Kim, T. G. Kwon, S. Moon, Y. H. Choi, S. Yun, W. Kim // *Oncology Letters*.– 2017. – Vol.14. – №3. – P.3817-3824.

95. Li, L. FGFR3 promotes the growth and malignancy of melanoma by influencing EMT and the phosphorylation of ERK, AKT, and EGFR / L. Li, S. Zhang, H. Li, H. Chou // *BMC Cancer*.– 2019. – Vol.19. – №1. – P.963.

96. Georgescu, M. PTEN Tumor Suppressor Network in PI3K-Akt Pathway Control / M. Georgescu // *Genes Cancer*.– 2010. – Vol.1. – №12. – P.1170–1177.

97. Sirhan, Z. Therapeutic Implications of PTEN in Non-Small Cell Lung Cancer / Z. Sirhan, R. Alojair, A. Thyagarajan, R. P. Sahu // *Pharmaceutics*.– 2023. – Vol.15. – №8. – P.2090.

98. Li, K. Real-World Clinical Outcomes for Patients with EGFR and HER2 Exon 20 Insertion-Mutated Non-Small-Cell Lung Cancer / Kelly Li, Ian Bosdet, Stephen Yip, Cheryl Ho, Janessa Laskin, Barbara Melosky, Ying Wang, Sophie Sun // *Curr. Oncol.*– 2023. – Vol.30. – №8. – P.7099-7111.

ПРИЛОЖЕНИЯ

ПРИЛОЖЕНИЕ А

Таблица А – Перечень всех выявленных соматических мутаций

Ген	Экзон	кДНК	Белок	Кол-во
<i>Trp53</i>	4	c.376-86T>C		3
	5	c.473G>T	p.R158L	14
	6	c.637C>G	p.R213G	7
	7	c.725G>T	p.C242F	2
	7	c.734G>T	p.G245V	2
	7	c.731G>T	p.G244V	1
	8	c.832C>T	p.P278S	4
	8	c.803A>T	p.N268I	3
	8	c.817C>T	p.R273C	3
	10	c.1041C>T	p.A347A	4
<i>KRAS</i>	2	c.34G>T	p.G12C	7
	2	c.35G>A	p.G12D	5
	2	c.35G>T	p.G12V	4
	4	c.437C>T	p.A146V	2
<i>EGFR</i>	19	c.2240_2248del	p.747_750del	2
	19	c.2252C>T	p.T751I	2
	19	c.2260A>G	p.K754E	2
	20	c.2300_2301insC AGCGTGGA	p.A767delinsAS VD	3
	21	c.2573T>G	p.L858R	4
<i>CDKN2A</i>	1	c.84G>A	p.P28P	10
	2	c.250G>T	p.D84Y	1
<i>STK11</i>	4	c.535C>T	p.P179S	1
	6	c.816C>G	p.Y272X	4
	7	c.465-2A>C		2
	9	c.1148G>A	p.R383H	1
	10	c.*230C>G		2
<i>FGFR3</i>	2	c.48C>T	P.I16I	3
	6	C.622C>T	P.H208Y	3
	7	C.786delC	P.N262fs	4
	10	C.1386delC	P.D462fs	1
<i>TSC1</i>	12	c.1166delG	p.G389fs	
	13	c.1313T>G	p.L438R	2
	16	c.2014A>T	p.K672X	2
	20	c.2626-3->TTTT		4
<i>GPC3</i>	1	c.107A>C	p.H36P	4
	4	c.1166+8G>A		1
<i>PDGFRA</i>	17	c.2397C>G	p.T799T	3
<i>NF1</i>	17	c.1983delA	p.G661fs	2

	21	c.2848C>T	p.Q950X	1
	24	c.3188G>A	p.C1063Y	1
	26	c.3479_3485del	p.G1160fs	2
	30	c.4064C>G	p.S1355X	1
<i>RB1</i>	6	c.584G>A	p.W195X	1
	17	c.1627_1634del	p.T543fs	1
	18	c.1736G>A	p.R579Q	1
	19	c.1908_1909insT GGGT	p.F636fs	2
	23	c.2475G>A	p.M825I	1
<i>COL22A1</i>	3	c.168G>C	p.K56N	1
	7	c.1150C>A	p.L384M	1
	39	c.2977G>C	p.G993R	1
	58	c.4059T>A	p.N1353K	2
<i>ERBB2</i>	14	c.1166T>A	p.L389Q	1
	19	c.1829A>T	p.K610M	1
	20	c.1943G>T	p.R648L	2
	23	c.2220_2221insG CATACGTGAT G	p.E740delinsEAY VM	3
<i>BRCA1</i>	10	c.874_875insGTT GCTCCTAAGTT CCCAGGGCGG GAGGATGACC ATTG	p.L292_T293deli nsRCSX	2
	10	c.4066C>T	p.Q1356X	1
	10	c.1734T>A	p.S578S	1
	15	c.4831delG	p.A1611fs	1
	21	c.5350delG	p.V1784fs	2
<i>PIK3CA</i>	4	c.688C>A	p.R230R	2
	5	c.1035T>A	p.N345K	1
	10	c.1544A>G	p.N515S	2
<i>PTEN</i>	8	c.1003C>T	p.R335X	3
	8	c.805_806del	p.K269fs	4
<i>DDR2</i>	10	c.960C>T	p.F320F	1
	11	c.932C>T	p.F462D	1
	18	c.2296_2297del	p.T766fs	1
<i>NTRK3</i>	9	c.903C>G	p.V301V	1
	17	c.2062G>C	p.G688R	2
	20	c.2473delC	p.H825fs	1
<i>FGFR1</i>	7	c.930_933del	p.I310fs	2
	1	c.1365C>T	p.P455P	1
<i>AKT1</i>	8	c.577delG	p.A193fs	1
<i>CDK12</i>	2	c.1212delG	p.K404fs	4
<i>KDM5C</i>	23	c.3642_3643del	p.V1214fs	2
<i>TAF1 25</i>	25	c.3856delG	p.G1286fs	2
<i>MSH6</i>	10	c.*19_*20insAA CACCAAAAAG GCAACAAGGA AGCTGGTCAA		2

		ATCCAAAG		
BRAF	10	c.1205C>A	p.P402H	1
	11	c.1396_1397TT	p.Gly466Leu	1
	13	c.1593G>T	p.W531C	1
	15	c.1799T>A	p.Val600Glu	1
BRCA2	11	c.3180C>T	p.S1060S	1
	14	c.7254dupA	p.R2418fs	1
KIT	6	c.1020delC	p.F340fs	2
	12	c.1790C>A	p.A597D	2
NTRK1	8	c.681C>T	p.D227D	1
	9	c.769delA	p.S257fs	1
XPC	8	c.906C>G	p.F302L	1
	9	c.1712delG	p.G571fs	1
HIP1	28	c.2844C>T	p.G948G	4
TRIM33	4	c.811delC	p.Q271fs	3
PIK3CB	2	c.240delT	p.F80fs	3
COL1A1	2	c.293G>T	p.G98V	1
	16	c.1055delA	p.K352fs	1
	24	c.1626_1634del	p.542_545del	1
MET	6	c.1836G>C	p.L612F	2
FYCO1	8	c.1420C>T	p.Q474X	3
ETV1	8	c.419delC	p.P140fs	2
NCOA4	9	c.1308G>A	p.E436E	2
ITGA9	12	c.1269delC	p.L423fs	1
SYNE1	40	c.5292delT	p.V1764fs	1
MLLT10	13	c.637_638insGCT GGAAGGTCCT GGGCAGGATC TTTGGGTGTG AAAACCAGTC ACAGGGGAAG GGTGC	p.I213fs	1
ATM	51	c.7615delG	p.E2539fs	1
ERBB3	18	c.2102delC	p.A701fs	1
LTK	16	c.1971_1975del	p.S657fs	1
AKT3	7	c.689G>A	p.G230E	1
MPL	6	c.932delC	p.S311fs	1
PTGS2	4	c.394_395insGTT TGCATCATT AGTGTTAGGT TGGTTTGTACA TATTGGTTAC	p.S132_Y133deli nsCLHHX	1
MSH2	13	c.2142T>A	p.A714A	1
ABL2	12	c.2738G>A	p.W913X	1
GOPC	7	p.E317Q	p.E317Q	1