

РЕЗУЛЬТАТЫ ТАРГЕТНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНОГО РАКА ЛЕГКОГО I–IIIА СТАДИЙ И ИХ СВЯЗЬ С КЛИНИКО-МОРФОЛОГИЧЕСКИМИ ПАРАМЕТРАМИ ОПУХОЛИ

¹ Федеральное
государственное
бюджетное учреждение
«Научный медицинский
исследовательский центр
онкологии им. Н.Н. Блохина»
Минздрава России
(Москва, Россия)

² Федеральное
государственное
автономное
образовательное
учреждение высшего
образования «Российского
национального
исследовательского
медицинского университета
им. Н.И. Пирогова»
Минздрава России
(Москва, Россия)

³ Медицинский институт
им. Березина Сергея
(Москва, Россия)

А.М. Казаков¹, К.К. Лактионов^{1,2}, К.А. Саранцева¹, М.Г. Гордиев³

RELATIONSHIP BETWEEN MOLECULAR GENETIC AND CLINICAL AND MORPHOLOGICAL PARAMETERS IN PATIENTS WITH STAGE I–IIIА NON-SMALL CELL LUNG CANCER

А.М. Казаков¹

Врач-онколог отделения
лекарственных методов лечения
(химиотерапевтическое № 17)
отдела лекарственных методов
лечения ФГБУ «НМИЦ онкологии
им. Н.Н. Блохина» Минздрава РФ.
115478, г. Москва,
Каширское шоссе, д. 24.
SPIN-code: 3774-8783.
ORCID: 0000-0002-9534-2729.

К.К. Лактионов^{1,2}

Доктор медицинских наук, замести-
тель директора по лечебной работе
(НИИ КО), заведующий отделением
лекарственных методов лечения
(химиотерапевтическое № 17)
отдела лекарственных методов
лечения ФГБУ «НМИЦ онкологии
им. Н.Н. Блохина» Минздрава РФ,
профессор кафедры онкологии и
лучевой терапии лечебного факуль-
тета ФGAOU BO «РНИМУ
им. Н.И. Пирогова» Минздрава РФ.
117997, г. Москва,
ул. Островитянова, д. 1.
SPIN-code: 7404-5133.
ORCID: 0000-0003-4469-502X.

К.А. Саранцева¹

Кандидат медицинских наук, врач-
онколог отделения лекарственных
методов лечения (химиотерапевти-
ческое № 17) отдела лекарственных
методов лечения ФГБУ «НМИЦ
онкологии им. Н.Н. Блохина»
Минздрава РФ.
SPIN-code: 5275-1127.
ORCID: 0000-0002-7817-8429.

М.Г. Гордиев³

Заведующий молекулярно-
генетической лабораторией
ООО Национальный биосервис.
107150, Москва,
ул. Лосиноостровская, д. 39.
SPIN-code: 4292-7072.

A.M. Kazakov¹

Oncologist, of the Department of
medicinal methods of treatment of the
Federal State Budgetary Institution
«N.N. Blokhin National Medical Research
Center of Oncology» of the Ministry of
Health of the Russian Federation.
115478, Moscow,
Kashirskoe highway 24.
SPIN-code: 3774-8783.
ORCID: 0000-0002-9534-2729.

K.K. Laktionov^{1,2}

Doctor of Medical Sciences, Deputy
Director for Medical Work (NI KO),
Head of the Department of Medicinal
Methods of Treatment (chemotherapeutic
No 17). N.N. Blokhin of the Ministry
of Health of the Russian Federation,
Professor of the Department of Oncology
and Radiation Therapy, Faculty of
Medicine, Federal State Autonomous
Educational Institution of Higher
Education «N.I. Pirogov Russian National
Research Medical University»
of the Ministry of Health
of the Russian Federation.
117997, Moscow, st. Ostrovityanova, 1.
SPIN-code: 7404-5133.
ORCID: 0000-0003-4469-502X.

K.A. Sarantseva¹

Oncologist, of the Department of
medicinal methods of treatment of the
Federal State Budgetary Institution
«N.N. Blokhin National Medical Research
Center of Oncology» of the Ministry
of Health of the Russian Federation,
candidate of medical sciences.
SPIN-code: 5275-1127.
ORCID: 0000-0002-7817-8429.

M.G. Gordiev³

Head of the Molecular Genetic
Laboratory of National Bioservice.
107150, Moscow,
st. Losinoostrovskaya, 39.
SPIN-code: 4292-7072.

Цель: изучить молекулярно-генетический ландшафт пациентов с немелкоклеточным раком легкого (НМРЛ) I–IIIА стадий, выявить корреляции между молекулярно-генетическими и клинико-морфологическими параметрами опухоли.

Материалы и методы: рутинное патоморфологическое исследование и таргетное секвенирование опухолевого материала (и парного материала нормальной легочной ткани) 90 пациентов с установленным диагнозом немелкоклеточный рак легкого. Сбор клинической информации. Статистическая обработка полученного материала с использованием программы SPSS Statistics 23.0 на основе собранной базы данных. Для анализа социодемографических и клинических характеристик больных использованы методы описательной статистики.

Результаты: получены данные о частоте встречаемости соматических мутаций, включенных в исследуемую панель, среди пациентов с I–IIIА стадиями немелкоклеточного рака легкого; изучена корреляция между клинико-морфологическими (стадия, пол, возраст, гистологический подтип) и генетическими параметрами опухоли.

Заключение: углубленное изучение генетического профиля у пациентов с локализованным НМРЛ с помощью метода Next generation sequencing (NGS) позволяет более детально определить мутационный ландшафт данной группы пациентов. Более детальное (поэкзонное) секвенирование позволяет точнее определить клиническое значение выявленных мутаций, что может улучшить диагностику и сделать последующую тактику лечения более прецизионной.

Ключевые слова: таргетное секвенирование, соматические мутации, немелкоклеточный рак легкого.

Purpose: to study the molecular genetic landscape of the Russian cohort of patients with stage I–IIIА non-small cell lung cancer, to identify correlations between molecular genetic and clinical and morphological parameters of the tumor.

Materials and methods: routine pathological examination and targeted sequencing of tumor material (and paired material of normal lung tissue) in 90 patients diagnosed with non-small cell lung cancer. Collection of clinical information. Statistical processing of the obtained material using the SPSS Statistics 23.0 program, based on the collected database. Descriptive statistics methods were used to analyze the socio-demographic and clinical characteristics of patients.

Results: data were obtained on the frequency of occurrence of somatic mutations included in the study panel among patients of the Russian population, the correlation between clinical and morphological (stage, gender, age, histological subtype) and genetic parameters of the tumor was studied.

Conclusion: An in-depth study of the genetic profile in patients with localized NSCLC using the Next generation sequencing (NGS) method allows us to determine the mutational landscape of this group of patients in more detail. More detailed, per-exon sequencing makes it possible to more accurately determine the clinical significance of the identified mutations, which improves diagnosis and makes subsequent treatment tactics more precise.

Key words: targeted sequencing, somatic mutations, non-small cell lung cancer.

Введение

Немелкоклеточный рак легкого является очень гетерогенным заболеванием, при котором встречается множество различных соматических мутаций. Некоторые из них, такие как клинически значимые мутации в генах EGFR, ALK, ROS1, BRAF, KRAS, NTRK1,2,3, MET, RET, ERBB2, встречаются только при аденокарциноме легкого, а случаи их выявления при плоскоклеточном раке являются казуистически редкими. Однако подчеркнем, что перечисленные мутации – далеко не единственные и далеко не самые частые при аденокарциноме легкого. При плоскоклеточном раке легкого традиционно не определяется мутационный статус, поскольку на данный момент не существует ни одного лекарственного препарата, нацеленного на какую-либо из мутаций, встречающихся при данной нозологии.

Тем не менее при плоскоклеточном раке легкого, как и при аденокарциноме, также встречается большое количество различных соматических мутаций. В настоящее время активно развивается и внедряется в практику метод Next generation sequencing, позволяющий проводить генетическое тестирование на большие панели соматических мутаций одновременно, выявляя при этом не только генные, но и

хромосомные альтерации (при помощи hybridization capture NGS). В связи с этим становится все более доступным изучение большого объема соматических мутаций, характерных для НМРЛ.

Их изучение уже сейчас доказывает свою клиническую значимость: к примеру, было показано, что присутствие мутации в гене TP53 у пациентов с локализованным раком легкого, подвергшихся радикальному хирургическому лечению, отрицательно влияло на общую выживаемость при аденокарциноме – 49 vs 54 месяцев, тогда как при плоскоклеточном раке легкого эффект был обратным – 62 vs 29 месяцев [2]. Мутация в гене PTEN, приводящая к снижению экспрессии PTEN при НМРЛ, также статистически значимо снижает общую выживаемость, что было показано в исследовании, включавшем в себя 2500 пациентов [3]. Это лишь два примера из очень большого числа мутаций, информация о присутствии которых может облегчить прогнозирование заболевания и индивидуализировать тактику ведения пациента. Также очень важно и то, в каком именно экзоне гена произошла мутация – к примеру, мутация в четвертом экзоне гена EGFR никак не влияет на тактику ведения больных, а вот мутация в восемнадцатом – двадцать первом

экзонах, напротив, будет иметь на нее значительное влияние. Именно поэтому метод NGS так интересен и перспективен, ведь он способен с высокой точностью дать информацию о дефекте конкретного экзона конкретного гена, а также осуществлять тестирование на широкие панели мутаций.

Цель

Определение молекулярно-генетического ландшафта пациентов с немелкоклеточным раком легкого I–III стадий, выявление корреляций между молекулярно-генетическими и клинико-морфологическими параметрами опухоли.

Материалы и методы

Работа основана на проспективном анализе группы из 90 пациентов с диагностированным локализованным немелкоклеточным раком легкого I–III стадий, прошедших радикальное оперативное лечение в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава РФ с 2020 по 2021 гг. Из 90 пациентов было 62 мужчины (69%) и 28 женщин (31%). Медиана возраста пациентов составила 59 лет. Диапазон возраста пациентов мужского пола варьировался от 28 до 77 лет (медиана 52,5 года), а женского – от 36 до 72 лет (медиана 54 года). Опухолевый материал, полученный в ходе оперативного лечения, был подвергнут рутинному патоморфологическому исследованию с целью подтверждения диагноза «немелкоклеточный рак легкого» (в работу включались только аденокарцинома и плоскоклеточный рак легкого).

Парафиновые блоки, полученные после оперативного вмешательства, отправлялись на генетическое тестирование. Оно осуществлялось путем таргетного секвенирования нового поколения (NGS *hybridization capture*). Использовалась кастомная панель из 78 соматических мутаций, встречающихся при немелкоклеточном раке легкого – *KMT2C*, *STK11*, *KRAS*, *TP53*, *ALK*, *EML4*, *ITGA9*, *FGFR1,2,3*, *SYNE1*, *MLL10*, *WT1*, *ATM*, *ERBB2,3*, *LTK*, *NF1*, *BRCA1,2*, *AKT1,2,3*, *CHEK2*, *DM5C*, *TAF1*, *TRIM33*, *IKBKE*, *TCF7L1*, *LRP1B*, *PMS1*, *PIK3CB*, *PIK3CA*, *KIT*, *ADAMTS2*, *NOTCH4*, *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*, *PAP1*, *GOPC*, *SLC39A8*, *RET*. ДНК из образцов ткани вы-

делялось с помощью набора QIAamp DNA FFPE Tissue Kit. Также было проведено генетическое тестирование на ту же панель соматических мутаций нормальной ткани легкого для каждого пациента – для исключения выявления редких форм полиморфизма генов.

Все пациенты подписывали информированное согласие на передачу их опухолевого материала в центральную лабораторию и проведение генетического тестирования в объеме вышеописанной панели генов.

Статистическая обработка результатов исследования проводилась на основе собранной базы данных с использованием программы SPSS Statistics 23.0. Для анализа социодемографических и клинических характеристик больных была использована компьютерная программа электронных таблиц «Microsoft Excel».

Результаты

По данным морфологического исследования, из 90 включенных пациентов у 63 (70%) была диагностирована аденокарцинома легкого и у 27 (30%) пациентов – плоскоклеточный рак легкого.

Распределение пациентов по стадиям (TNM⁸) представлено в таблице №1.

Среди мужчин подавляющее большинство пациентов имело стадию заболевания IB – 30,6%, второй по частоте была стадия IIIA – 21%; среди женщин наиболее часто встречалась стадия IB – 35,7%, далее IB – 25% и IIIA – 17,9%.

После получения данных генетического тестирования результаты для пациентов с плоскоклеточным раком легкого и аденокарциномой были ранжированы по частоте встречаемости. Они приведены в таблицах № 2 и № 3.

Полученные нами 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 среди пациентов с аденокарциномой по частоте встречаемости преобладали мутации в генах KRAS (30%) и EGFR (23,8%), что также соотносится с общемировыми данными. Следующей по частоте у пациентов с аденокарциномой была мутация в гене STK11, которая в нашем исследовании была выявлена немного чаще, чем она выявляется в среднем по общемировым данным (17,5% против ~10%). Возможно, это

Таблица № 1.

Распределение пациентов по стадиям

Стадия (TNM8)	IA1	IA2	IA3	IB	IIA	IIB	IIIA
Мужчины	0 (0%)	6 (9,7%)	5 (8,1%)	9 (14,5%)	10 (16,1%)	19 (30,6%)	13 (21%)
Женщины	1 (3,6%)	3 (10,7%)	0 (0%)	10 (35,7%)	2 (7,1%)	7 (25%)	5 (17,9%)

Таблица № 2.

**Частота встречаемости мутаций при аденокарциноме
(сгруппированы по частоте встречаемости)**

Частота встречаемости мутаций при аденокарциноме	Название мутации
9,5–41,3% (частые)	TP53, KRAS, EGFR, STK11, FGFR3, EML4, NF1, RB1, KMT2C, COL22A1, CDKN2A, ERBB2
4,8–7,9%	TSC1, PIK3CA, DDR2, BRAF, GPC3, BRCA1, NTRK1,3, AKT1, WT1, HIP1, FGFR1, KIF5B, CHEK2, COL1A1, COL1A1, PDGFRA, SLC34A2
1,6–3,2% (редкие)	PTEN, BRCA2, KIT, XPC, ALK, FGFR2, ROS1, CDK12, ALK fus, KDM5C, TAF1, ROS1 fus, MSH2,6, SLC39A8, TRIM33, PIK3CB, KAT6A, NBN, FYCO1, ETV1, NCOA4, MET, ITGA9, SYNE1, MLLT10, ERBB3, LTK, AKT2,3, PIK3C2B, NOTCH1, NTRK2, MPL, PTGS2, NRAS, NBPF20, PBX1, ABL2, RNF, PARP1, GOPC, RET fus

Таблица № 3.

**Частота встречаемости мутаций при плоскоклеточном раке
(сгруппированы по частоте встречаемости)**

Частота встречаемости мутаций при плоскоклеточном раке легкого	Название мутации
11,1–55,6% (частые)	TP53, KMT2C, TSC1, EML4, PTEN, NF1, COL22A1, CDKN2A, RB1, BRCA1,2, STK11, FGFR3, NTRK3, KIT, XPC
7,4%	DDR2, BRAF, NTRK1, HIP1, ALK, FGFR2, ROS1, CDK12, TRIM33, PIK3CB, KAT6A, NBN, FYCO1, IKVKE, TCF7L1, LRP1B, PMS1, ADAMTS2, NOTCH4, ADGRA2, CDH5
3,7% (редкие)	GPC3, FGFR1, KIF5B, ETV1, NCOA4, MET, SDC4

свидетельствует о некоторой насыщенности российской популяции пациентов с аденокарциномой легкого данной мутацией по сравнению с американской и европейской популяциями.

Частота встречаемости более редких, но клинически значимых мутаций, таких как транслокация ALK, ROS1, RET, или 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 пятнадцатый экзон 1,6% vs ~2%), RET (1,6% vs ~1%). Среди пациентов с плоскоклеточным раком легкого второе место занимала мутация KMT2C – 33%, что коррелирует с мировой статистикой (~40% случаев). Третье место по частоте встречаемости в нашей группе пациентов заняла мутация в гене TSC1 – 25,9% случаев, что сильно отличается в большую сторону от мировой статистики (~2–4%). Это также может объясняться особенностями российской популяции пациентов, либо сравнительно небольшим объемом исследуемой группы пациентов с плоскоклеточным НМРЛ. KMT2C является геном, кодирующим строение гистон-метилтрансферазы, которая отвечает за эпигенетическую модификацию гистонов, тем самым регулируя экспрессию некоторых генов, таких как DNMT3A и др [4, 5].

В контексте изучения немелкоклеточного рака легкого KMT2C интересен тем, что мутация в данном гене, по данным некоторых исследований, ассоциируется с усилением ответа на иммунотерапию ингибиторами контрольных точек иммунитета.

Dingxie Liu et al. показали, что присутствие мутации KMT2C, вне зависимости от уровня PD-L1 и Tumor mutation burden (TMB), ассоциировалось с лучшим ответом на иммунотерапию. Также авторами был сделан вывод о возможном использовании KMT2C в качестве предиктора ответа на иммунотерапию [6].

Ген TSC1 кодирует строение белка под названием гамаргин, отвечающего за контроль роста и деление клетки. Мутация в гене TSC1 при НМРЛ обладает провоспалительным действием относительно опухолевого микроокружения и потенцирует ответ на иммунотерапию, что было показано Qingyuan Huang и соавторами [7].

Далее была определена частота мутации в каждом отдельном экзоне исследуемых генов при аденокарциноме и плоскоклеточном раке легкого. Таблица № 4 и 5.

Все выявленные дефектные экзоны были разделены на три группы, в зависимости от частоты их встречаемости при различных гистологических подтипах в Российской популяции пациентов.

На примере частоты встречаемости различных экзонов мутированных генов как при аденокарциноме, так и при плоскоклеточном раке видно, что не всегда ранжированная частота встречаемости экзонов в точности повторяет частоту встречаемости содержащих их генов. Так, при аденокарциноме четверть наиболее часто встречающимися генами были TP53, KRAS, EGFR, STK11, тогда как среди экзонов первое место занял пятый экзон гена TP53

Таблица № 4.

Частота встречаемости мутаций в различных экзонах при аденокарциноме

Частота встречаемости при аденокарциноме	Название экзона
6,3–15,9% (частые)	TP53 4,5,6,7 экз, KMT2C 16 экз, KRAS G12C, EGFR 19 экз, CDKN2A 1 экз, TP53 8 экз, KRAS G12D, EGFR 21 экз, STK11 6 экз, FGFR3 7 экз, KRAS G12V
3,2–4,8%	EGFR 20 экз, FGFR3 17, TSC1 20, GPC3 1, KIF5B 15, CHEK2 2, PDGFRA 17, SLC34A2 4, EML4 4,13,19, STK11 5,7, NF1 7,17,26, TSC1 13, RB1 11,19, COL22A1 23, ERBB2 20,23, BRCA1 10, PIK3CA 10, PTEN 8, DDR2 16, NTRK3 17, HIP1 28, FGFR1 1, AKT1 4, ROS1 31, CDK12 2, KRAS 4, KDM5C 6, TAF1 25, MSH6 10, SLC39A8 8
1,6% (редкие)	TP53 10, EGFR 4,22, EML4 2,10, STK11 1,2,9, NF1 14.48. FGFR3 2,3,4,10, RB1 6,10,17, COL22A1 3,7,8,32,41, ERBB2 14,17,19,28, BRCA1 1,15, 21, PIK3CA 1,4,5,9, DDR2 6,14,18, BRAF 7,10,11,13,15, NTRK3 6,20, GPC3 3,4,5, WT1 1,4,5, BRCA2 14,20, KIT 6,8, NTRK1 8,9,13, XPC 8,10,13, HIP1 29, ALR 4,5, FGFR1 7,10, FGFR2 7,17, AKT1 8, 14, KIF5B 19, TRIM33 4, PIK3CB 2, KAT6A, NBN 16, COL1A1 2,16,24,29,45, MET 5, FYCO1 8, ETV1 8, NCOA4 9, KRAS G13D, ITGA9, SYNE 1 40, MLLT10 13, ATM 51, ERBB3 18, LTK 16, AKT2 4, AKT3 7, PIK3CB 29,m NOTCH1 2, NTKR2 17, MPL 6, PTGS2 4, MSH2 13, NRAS 4, NBPF20 53, PBX1 9, ABL2 12, RNF2 4, PARP1 22, GOPC 7

Таблица № 5.

Частота встречаемости мутаций в различных экзонах при плоскоклеточном раке

Частота встречаемости при плоскоклеточном раке легкого	Название экзона
11,1–33,3%	KMT2C 16, PTEN 8, TP53 5,6,8,10, CDKN2A 1, TP53 5, EML4 2
7,4–11,0%	ADAMTS2 10, ADGRA2 8, ALK 12, BRCA1 10,21, BRCA2 23, CDH5 6, CDK12 2, CIC 2, EML4 4,19, COL22A1 58, FGFR2 16, FGFR3 9, FYCO1 8, HIP1 28, IKBKE 19, KAT6A 8, KIT 6, LRP1B 88, NBN 16, NF1 48, NOTCH4 14, PIK3CB 2, PMS1 9, RB1 19, ROS1 30, STK11 10, TCF7L1 12, TRIM33 4, TSC1 8,16, WT1 1
3,7–7,3%	BRAF 12,17, BRCA2 11, CDKN2A 20, COL22A1 28,38, 39, 53, DDR2 10,11, EML4 20, ERBB2 4,23, ETV1 8, FGFR1 7, FGFR3 7, GPC3 1, HIP1 29, KIT 12, MET 6, KIF5B 15, NCOA4 9, NF1 7,21,24,30,35, NTRK1 1,4,10, NTRK3 4,5,9, PIK3CA 4,10, 11, PTEN 3, RB1 23,26, SDC4 3, STK11 4, TP53 7, TSC1 9,12,20, XPC 1,2,9

(аналогично с геном TP53); второе место занял шестнадцатый экзон гена KMT2C, ген которого был лишь на девятом месте по частоте встречаемости; третье и четвертое места заняли экзоны генов KRAS (G12C) и EGFR (девятнадцатый экзон). Шестой экзон гена STK11 оказался на двенадцатом месте по частоте встречаемости экзонов, тогда как ген STK11 был четвертым среди генов.

Аналогичная картина была получена и при плоскоклеточном раке – четыремя наиболее часто встречающимися генами были TP53, KMT2C, TSC1, EML4, тогда как среди экзонов наиболее часто встречающимся был шестнадцатый экзон гена KMT2C, далее восьмой экзон гена PTEN, восьмой экзон гена TP53 и первый экзон гена CDKN2A.

Учитывая то, что в подавляющем большинстве случаев наиболее важную с клинической точки зрения информацию дают знания о мутации в конкретном

экзоне гена, данные о частоте встречаемости того или иного экзона представляются более значимыми, чем данные о встречаемости той или иной мутации.

Нами был проведен анализ зависимости стадии и среднего количества мутированных генов и дефектных экзонов. Таблица № 6.

Выяснилось, что с ростом стадии не увеличивалось количество генетических дефектов как при аденокарциноме, так и при плоскоклеточном раке легкого, несмотря на предполагаемую связь между увеличением стадии (длительность заболевания во времени) и накоплением генетических дефектов.

При определении количества мутированных генов и количества мутаций в экзонах у одного пациента в зависимости от гистологического подтипа были получены следующие данные. Таблица № 7 и № 8.

В среднем у пациентов с плоскоклеточным раком легкого на одного пациента было больше мутаций чем

Таблица № 6.

Зависимость количества генетических дефектов от стадии заболевания

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

Таблица № 7.

Количество генов с мутациями у одного пациента в зависимости от гистологического подтипа

Количество генов с мутациями 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	

при аденокарциноме. 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 [8].

При углубленном анализе выяснилось, что в среднем пациенты с плоскоклеточным раком легкого имеют большее количество поврежденных экзонов, чем пациенты с аденокарциномой легкого. Данные результаты, наряду с результатами, полученными в отношении количества соматических мутаций, подтверждают гипотезу о том, что пациенты с плоско-

клеточным раком легкого накапливают больше соматических мутаций, и, как следствие, имеют большее количество поврежденных экзонов.

Помимо этого был проведен анализ зависимости количества мутированных генов, дефектных экзонов и статуса курения.

Анализ показал, что количество генов и экзонов, в которых произошли мутации у курящих пациентов, было выше, чем у некурящих как без учета деления пациентов по гистологическим подтипам, так и внутри групп пациентов с аденокарциномой и плоскоклеточным раком легкого.

Таблица № 8.

**Количество экзонов, в которых произошла мутация у одного пациента
в зависимости от гистологического подтипа**

Количество экзонов в которых произошла мутация 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
26	v	–	1	3,7	1	1,1
27	–	–	1	3,7	1	1,1
В среднем на 1 пациента	4,14		5,66		4,6	

Таблица № 9.

Зависимость между статусом курения и количеством мутаций в генах и экзонах

	Аденокарцинома (n=63)		Плоскоклеточный (n=27)		Всего (n=90)	
	Курит	Не курит	Курит	Не курит	Курит	Не курит
N	33	30	21	6	54	36
Среднее количество генов с мутациями у одного пациента	4,8±4,3	3,0±2,1	6,2±7,2	2,7±1,4	5,4±5,6	2,9±2,0
Среднее количество экзонов в которых произошла мутация у одного пациента	5,2±4,9	3,0±2,2	6,6±7,2	2,8±1,3	5,7±5,9	3,0±2,1

При анализе зависимости возраста пациентов и наличия тех или иных соматических мутаций было выявлено, что пациенты старшей возрастной группы (старше 60 лет) чаще имели мутации в восьмом экзоне гена TP53, и напротив, более молодые пациенты – в пятом экзоне TP53, шестом экзоне гена STK11, первом экзоне гена GPC3, пятнадцатом экзоне гена KIF5B. Таблица № 10 (положительное значение R – положительная связь между увеличением возраста и увеличением частоты встречаемости мутации, отрицательное значение R – обратная связь между

увеличением возраста и частотой встречаемости мутации).

Также были обнаружены некоторые статистически значимые корреляции между полом пациентов и их молекулярно-генетическим статусом. Таблица № 11 (положительный R – прямая связь с женским полом, отрицательный R – с мужским).

Было выявлено, что у мужчин статистически чаще встречаются мутации в генах KMT2C, EML4, STK11, BRCA1, PTEN, а у женщин – мутации в гене EGFR и транслокация в гене ALK.

Таблица № 10.

Зависимость между возрастом пациентов и наличием мутаций в генах

	Spearman - R	p-value
Возраст (60 лет и старше) & TP53 5 экз	-0,213029	0,043808
Возраст (60 лет и старше) & TP53 8 экз	0,259851	0,013385
Возраст (60 лет и старше) & STK11 6 экз	-0,230556	0,028800
Возраст (60 лет и старше) & GPC3 1 экз	-0,230556	0,028800
Возраст (60 лет и старше) & KIF5B 15 экз	-0,230556	0,028800

Таблица № 11.

Зависимость между полом пациентов и наличием мутаций в генах

	Spearman - R	p-value
Пол & KMT2C	-0,249708	0,017618
Пол & EGFR	0,214669	0,042172
Пол & EML4	-0,300537	0,004000
Пол & STK11	-0,222209	0,035293
Пол & BRCA1	-0,209904	0,047070
Пол & PTEN	-0,209904	0,047070
Пол & ALK-транслокация	0,276324	0,008381

Обсуждение

Полученные данные представляют реальный мутационный ландшафт пациентов с НМРЛ I–IIIА стадий. Как и ожидалось, мутации в генах EGFR, ALK, ROS1, KRAS, RET, NTRK2 были зафиксированы только при аденокарциноме. В отношении генов ERBB2, BRAF, NTRK (1, 3), MET картина совершенно иная. Выше уже было отмечено, что мутации в гене ERBB2 встречались как при аденокарциноме (9,5%), так и при плоскоклеточном раке легкого (7,4%). Если говорить о классической клинически значимой мутации – инсерции в двадцатом экзоне, то она встречалась при аденокарциноме – в 3,2% случаев, – и не наблюдалась при плоскоклеточном раке. Мутация в двадцать третьем экзоне ERBB2 встречалась как при аденокарциноме (3,7%), так и при плоскоклеточном раке; мутации в четырнадцатом (1,6%), семнадцатом (1,6%), девятнадцатом (1,6%) и двадцать восьмом (1,6%) экзонах встречались только при аденокарциноме; в четвертом экзоне – только при плоскоклеточном раке (3,7%). Согласно базе данных Polyphen-2, соматическая мутация в четвертом экзоне гена ERBB2 является онкогенной, что говорит о теоретической возможности применения специфической таргетной терапии в случае ее выявления.

Данные, касающиеся мутаций в гене BRAF, столь же интересны. Так, мутации в данном гене были выявлены как при аденокарциноме (7,9%), так и при плоскоклеточном раке (7,4%), однако только при аденокарциноме была выявлена клинически

значимая мутация – в пятнадцатом экзоне (1,6%). При плоскоклеточном раке были выявлены мутации BRAF в двенадцатом и семнадцатом экзонах, которые, по имеющейся на данный момент информации, не являются клинически значимыми.

Мутации в гене MET были выявлены по одному случаю при аденокарциноме (пятый экзон) и плоскоклеточном раке (шестой экзон) – обе не были клинически значимыми. Мутации в генах NTRK1 и 3 были выявлены при аденокарциноме и плоскоклеточном раке легкого, однако все это были генные мутации, а не хромосомные транслокации, которые могли бы иметь клиническое значение. При аденокарциноме были выявлены мутации гена NTRK1 в восьмом, девятом, тринадцатом экзонах – по 1,6% случаев; при плоскоклеточном раке мутации NTRK1 в первом, четвертом, десятом экзонах – по 3,7%. Мутации в гене NTRK3 при аденокарциноме были выявлены в шестом и двадцатом экзонах – по 1,6%, при плоскоклеточном раке в четвертом, пятом и девятом экзонах с частотой по 3,7%.

Распределение по частоте встречаемости других мутаций и их экзонов указано в соответствующих таблицах.

При плоскоклеточном раке у одного пациента в среднем было больше соматических мутаций, чем у пациентов с аденокарциномой. Это соответствует данным мировой литературы, поскольку возникновение плоскоклеточного рака в основном ассоциировано с

курением, которое приводит к большому количеству генетических альтераций, что также находит подтверждение в более высоком уровне ТМВ у курящих пациентов. В нашем исследовании у пациентов с аденокарциномой в среднем было 3,95 мутаций, тогда как при плоскоклеточном раке – 5,3 мутации на человека. Такая же тенденция была отслежена и в отношении количества дефектных экзонов у пациентов с аденокарциномой и плоскоклеточным раком – 4,14 и 5,66 экзона у одного пациента соответственно.

По мере роста стадии заболевания не было отмечено увеличения количества генетических альтераций, что может свидетельствовать о том, что выявленные мутации являются клональными и присутствуют в опухоли с момента ее появления.

Заключение

Углубленное изучение генетического профиля у пациентов с локализованным НМРЛ позволяет детально определить мутационный ландшафт данной группы пациентов. Развернутое поэкзонное секвенирование помогает точнее определить клиническое значение выявленных мутаций, что улучшает диагностику и делает последующую тактику лечения более прецизионной. Выявление частоты различных соматических мутаций с последующей оценкой их прогностического и терапевтического значения позволит со временем значительно улучшить как диагностику, так и лечение пациентов с немелкоклеточным раком легкого.

Список литературы

1. Drilon A., Lu Wang, Arcila M.E. et al. Broad, Hybrid Capture-Based Next-Generation Sequencing Identifies Actionable Genomic Alterations in Lung Adenocarcinomas Otherwise Negative for Such Alterations by Other Genomic Testing Approaches // *Clinical Cancer Research*. – 2015. – Vol. 21, № 16. – P. 3631–3639.
2. Zhisong Fan, Qi Zhang, Li Feng et al. Genomic landscape and prognosis of patients with TP53-mutated non-small cell lung cancer // *Annals of Translational Medicine*. – 2022. – Vol. 10, № 4. – P. 188.
3. Jian Xiao, Cheng-Ping Hu, Bi-Xiu He et al. PTEN expression is a prognostic marker for patients with non-small cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis of the literature // *Oncotarget*. – 2016. – Vol. 7, №36. – P. 57832–57840.
4. Mastoraki S., Balgkouranidou I., Tsaroucha E. et al. KMT2C promoter methylation in plasma-circulating tumor DNA is a prognostic biomarker in non-small cell lung cancer // *Molecular Oncology*. – 2021. – Vol. 15, № 9. – P. 2412–2422.
5. Feifei Na, Xiangyu Pan, Jingyao Chen et al. KMT2C deficiency promotes small cell lung cancer metastasis through DNMT3A-mediated epigenetic reprogramming // *Nature Cancer*. – 2022. – Vol. 3, № 6. – P. 753–767.
6. Dingxie Liu, Benzaquen J., L. G. T. Morris et al. Mutations in KMT2C, BCOR and KDM5C Predict Response to Immune Checkpoint Blockade Therapy in Non-Small Cell Lung Cancer // *Cancers (Basel)*. – 2022. – Vol. 14, № 11. – P. 2816.
7. Qingyuan Huang, Fei Li, Hai Hu, et al. Loss of TSC1/TSC2 sensitizes immune checkpoint blockade in non-small cell lung cancer // *Science Advances*. – 2022. – Vol. 8, №5. – eabi9533.
8. Xinan Wang, Ricciuti B., Nguyen T. et al. Association between Smoking History and Tumor Mutation Burden in Advanced Non-Small Cell Lung Cancer // *Cancer Research*. – 2021. – Vol. 81, № 9. – P. 2566–2573.

References

1. Alexander Drilon, Lu Wang, Maria E Arcila, et al. Broad, Hybrid Capture-Based Next-Generation Sequencing Identifies Actionable Genomic Alterations in Lung Adenocarcinomas Otherwise Negative for Such Alterations by Other Genomic Testing Approaches. *Clin Cancer Res* 2015 Aug 15; 21(16): 3631-9. Doi: 10.1158/1078-0432.CCR-14-2683. Epub 2015 Jan 7.
2. Zhisong Fan, Qi Zhang, Li Feng, et al. Genomic landscape and prognosis of patients with TP53-mutated non-small cell lung cancer. *Ann Transl Med*. 2022 Feb; 10(4): 188. Doi: 10.21037/atm-22-412.
3. Jian Xiao, Cheng-Ping Hu, Bi-Xiu He, et al. PTEN expression is a prognostic marker for patients with non-small cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis of the literature. *Oncotarget*. 2016 Sep 6; 7(36): 57832–57840. Doi: 10.18632/oncotarget.1106.
4. Sofia Mastoraki, Ioanna Balgkouranidou, Emily Tsaroucha, et al. KMT2C promoter methylation in plasma-circulating tumor DNA is a prognostic biomarker in non-small cell lung cancer. *Molecular Oncology*. 2021; 15(9): 2412-2422. Doi: 10.1002/1878-0261.12848.
5. Feifei Na, Xiangyu Pan, Jingyao Chen, et al. KMT2C deficiency promotes small cell lung cancer metastasis through DNMT3A-mediated epigenetic reprogramming. *Nat Cancer* 2022 Jun; 3(6): 753-767. Doi: 10.1038/s43018-022-00361-6. Epub 2022 Apr 21.
6. Dingxie Liu, Jonathan Benzaquen, Luc G. T. Morris, et al. Mutations in KMT2C, BCOR and KDM5C Predict Response to Immune Checkpoint Blockade Therapy in Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancers (Basel)* 2022 Jun 6; 14(11): 2816. Doi: 10.3390/cancers14112816.
7. Qingyuan Huang, Fei Li, Hai Hu, et al. Loss of TSC1/TSC2 sensitizes immune checkpoint blockade in non-small cell lung cancer. *Sci Adv* 2022 Feb 4; 8(5): eabi9533. Doi: 10.1126/sciadv.abi9533. Epub 2022 Feb 4.
8. Xinan Wang, Biagio Ricciuti, Tom Nguyen, et al. Association between Smoking History and Tumor Mutation Burden in Advanced Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancer Res* 2021 May 1; 81(9): 2566-2573. Doi: 10.1158/0008-5472.CAN-20-3991. Epub 2021 Mar 2.