

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

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н. Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации (директор – академик РАН, доктор медицинских наук, профессор Стилиди Иван Сократович).

Научный руководитель:

доктор медицинских наук

Лактионов Константин Константинович

Официальные оппоненты:

Завалишина Лариса Эдуардовна, доктор биологических наук, профессор кафедры патологической анатомии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения дополнительного профессионального образования «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Козлов Вадим Викторович, доктор медицинских наук, заведующий онкологическим отделением №3 государственного бюджетного учреждения здравоохранения Новосибирской области «Новосибирский областной онкологический клинический диспансер»

Ведущая организация: федеральное государственное бюджетное учреждение «Главный военный клинический госпиталь имени академика Н.Н. Бурденко» Министерства обороны Российской Федерации.

Защита состоится «17» октября 2024 года в 13-00 часов на заседании диссертационного совета 21.1.032.01, созданного на базе ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России по адресу: 115522, г. Москва, Каширское шоссе, д. 23.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России по адресу: 115522, г. Москва, Каширское шоссе, д. 24 и на сайте www.ronc.ru.

Автореферат разослан «_____» _____ 2024 года.

Ученый секретарь

диссертационного совета

доктор медицинских наук, профессор

Кадагидзе Заира Григорьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности

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 (Лактионов К.К.,2022). В России по частоте встречаемости рак легкого 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 (Мерабишвили В.М.,2018). Наиболее часто встречающимся гистологическим подтипом рака легкого является немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ), на который приходится около 80% всех выявляемых случаев (Carpner M.B.,2015). 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 (Cheng T.D.,2016, Lin H.T.,2019).

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 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 по 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 (Ramalingam S.S.,2020, Qi F.,2019, Xiao H.,2016).

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 (Peters S.,2017). Такая же тенденция прослеживается и при применении ингибиторов более редких мутаций, таких как транслокация в гене *RET*, которая встречается в 1-2% случаев НМРЛ (Bronte G.,2019). 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 селперкатиниба позволило добиться медианы безрецидивной выживаемости в 17 месяцев (Takamori S.,2021).

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 (Fan Z.,2022). 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 (Laktionov K.K.,2022). Таких примеров достаточно много среди других соматических мутаций, встречающихся при НМРЛ. 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 и 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.

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* и др. 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 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.

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 гибридационных 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 150х для гибридационной 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.

Научная новизна

Впервые на российской популяции пациентов с локализованным раком легкого (N=90), проходивших лечение в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, 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 клинικο-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 клинικο-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.

Личный вклад

Автор принимал непосредственное участие во всех этапах выполнения научно-исследовательской работы: ведение, лечение и динамическое наблюдение пациентов с

немелкоклеточным раком легкого I-IIIА стадией, проведение аналитического обзора литературных данных, постановка цели и задач исследования, разработка дизайна, сбор данных из первичной медицинской документации, статистический анализ клинических данных пациентов, обобщение и систематизация результатов исследования, формулировка выводов и оформление диссертационной работы, написание публикаций по выполненной работе.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Диссертация соответствует специальностям 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.

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 клинικο-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.

Внедрение результатов исследования

Результаты исследования апробированы и используются в диагностической и лечебной деятельности отделения противоопухолевой лекарственной терапии №3 с дневным стационаром отдела лекарственного лечения ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (акт о внедрении от 27.09.2023 г.).

Апробация результатов исследования

Апробация диссертации состоялась 03 ноября 2023 г. на совместной научной конференции отделений 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.

Публикации

Результаты исследования представлены в 2 научных статьях, которые опубликованы в периодических 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.

СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОЙ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Работа основана на проспективном анализе группы из 90 пациентов с диагностированным локализованным немелкоклеточным раком лёгкого I-IIIА стадий,

прошедших радикальное оперативное лечение (с добавлением по показаниям неoadъювантной или адъювантной полихимиотерапии) в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России в период с 2020 года по 2021 года. В исследование включены 62 (68,9%) пациента 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). Большинство пациентов были в возрасте от 50 до 70 лет (Таблица 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	$60,1 \pm 10,2$		$58,3 \pm 11,2$		$59,4 \pm 10,5$	

Из данных, представленных в таблице, 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 1).



Рисунок 1 - Распределение пациентов в зависимости от вида проведённого лечения

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 неoadъювантную ХТ, 22(56,4%) – адъювантную 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.

Молекулярно-генетическое тестирование

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*, *NBPF20*, *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.

Динамическое наблюдение

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.

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. Оценивалась общая выживаемость и безрецидивная выживаемость.

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

Результаты исследования

Профиль молекулярно-генетических нарушений у пациентов российской популяции с немелкоклеточным раком легкого I-IIIА стадии

Всего в исследовании было проанализировано 218 экзонов 80 генов. Полученные данные молекулярно-генетического тестирования российской когорты из 90 пациентов с немелкоклеточным раком легкого I-IIIА стадии показали, что исследуемая группа пациентов 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*.

Были выделены гены, мутации в которых встречались только при аденокарциноме (Таблица 4).

Таблица 4 - 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, GOPC, RET</i>	по 1 случаю в каждом представленном экзоне	1,6

Также был проведен анализ уникальных для аденокарциномы мутаций в экзонах (Таблица 5).

Как видно из представленных данных 5, уникальными для аденокарциномы стали мутации в 58 экзонах.

Таблица 5 - Экзоны, мутации в которых встречались только при аденокарциноме

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

Продолжение таблицы 5

<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
<i>RB1</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	

При плоскоклеточном раке лёгкого встречалось меньше уникальных генов, не встречающихся при аденокарциноме (Таблица 6).

Таблица 6 - 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
<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 7 представлены экзоны, мутации в которых были выявлены только при плоскоклеточном раке легкого.

Таблица 7 - 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

Продолжение таблицы 7

<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.

Связь молекулярно-генетического статуса с полом и возрастом у пациентов с немелкоклеточным раком легкого I-IIIА стадий

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 8).

Таблица 8 - 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 9).

Таблица 9 - 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.

Влияние мутаций, встречающихся у пациентов российской популяции с немелкоклеточным раком легкого I-IIIА стадий, на вероятность рецидива заболевания

С целью выявления влияния особенностей молекулярно-генетического статуса на вероятность прогрессирования заболевания был проведен многофакторный анализ, который

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:

$$\text{ИП} = 0,112448 * \text{Стадия} + 0,214734 * \text{Прогноз прогрессирования на основании генетического статуса опухоли}$$

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%, $p=0,0005$). Полученная 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 2).

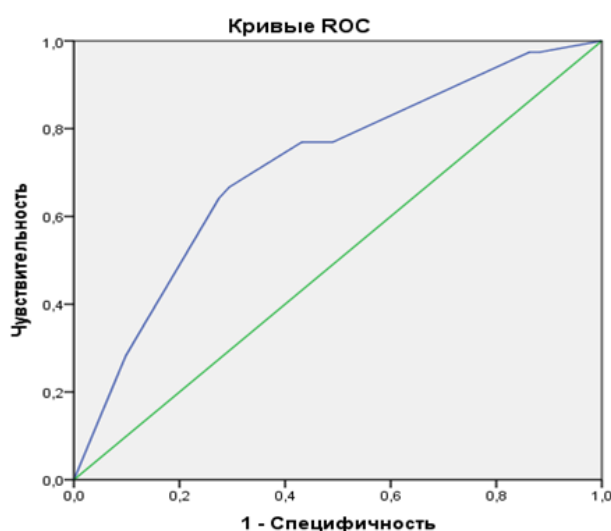


Рисунок 2 - Кривые ROC

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, р.С242F; с.734G>T, р.Г245V; с.731G>T, р.Г244V) и 8 (с.832C>T, р.Р278S; с.803A>T, р.N268I; с.817C>T, р.Р273C) экзонах гена *TP53* является независимым положительным прогностическим фактором, снижающим риск прогрессирования заболевания.

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

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 связано с ухудшением общей выживаемости.

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>T, р.С242F; с.734G>T, р.Г245V; с.731G>T, р.Г244V) и 20 экзоне гена *EGFR* (с.2300_2301insCAGCGTGGA, р.А767delinsASVD) являются независимыми предикторами снижения безрецидивной выживаемости (Таблица 10).

Таблица 10 - Многофакторный анализ влияния клинико-морфологических и молекулярно-генетических параметров на безрецидивную выживаемость при аденокарциноме

		ВБП			
Экзоны		р	HR	95%CI	
				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 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, р.Р335X; с.805_806del, р.К269fs) являются независимыми предикторами снижения общей выживаемости (Таблица 11).

Таблица 11 - Многофакторный анализ влияния клинико-морфологических и молекулярно-генетических параметров на общую выживаемость при плоскоклеточном раке лёгкого

		ОВ			
Экзоны		p	HR	95%CI	
				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 безрецидивной выживаемости (Таблица 12).

Таблица 12 - Многофакторный анализ влияния клинико-морфологических и молекулярно-генетических параметров на безрецидивную выживаемость при плоскоклеточном раке лёгкого

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

Таким образом, независимыми предикторами снижения общей выживаемости для аденокарциномы стала стадия заболевания, для плоскоклеточного рака лёгкого – стадия заболевания и мутация в 8 экзоне гена *PTEN* (с.1003C>T, p.R335X; с.805_806del, p.K269fs). Независимыми предикторами снижения безрецидивной выживаемости при аденокарциноме стали мутации в 7 экзоне гена *TP53* (с.725G>T, p.C242F; с.734G>T, p.G245V; с.731G>T, p.G244V) и 20 экзоне гена *EGFR* (с.2300_2301insCAGCGTGGA, p.A767delinsASVD), а для плоскоклеточного рака лёгкого – мутация в 8 экзоне гена *PTEN* (с.1003C>T, p.R335X; с.805_806del, p.K269fs).

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: продолжение исследования 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 РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Казаков, А. М. Генетический профиль пациентов с немелкоклеточным раком легкого I–IIIА стадий / А.М. Казаков, К.К. Лактионов, К.А. Саранцева //Российский биотерапевтический журнал. – 2023. – Т.22. - №1. – С.42-48.
2. Казаков, А. М. Результаты таргетного секвенирования немелкоклеточного рака легкого I–IIIА стадий и их связь с клинико-морфологическими параметрами опухоли / А.М. Казаков, К.К. Лактионов, К.А. Саранцева, М.Г. Гордиев //Практическая онкология. – 2023. – Т.24. - №3. – С.291-299.