

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

*На правах рукописи*

**Данишевич Анастасия Михайловна**

**ИЗУЧЕНИЕ ФЕНО-ГЕНОТИПИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК  
СПОРАДИЧЕСКОГО И НАСЛЕДСТВЕННОГО РАКА ЖЕЛУДКА  
У ПАЦИЕНТОВ РОССИЙСКОЙ ПОПУЛЯЦИИ**

3.1.6. Онкология, лучевая терапия

1.5.7. Генетика

**ДИССЕРТАЦИЯ**

на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

**Научные руководители:**

доктор медицинских наук, профессор,  
академик Российской академии наук

**Стилиди Иван Сократович**

доктор медицинских наук

**Любченко Людмила Николаевна**

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ. ....	5
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ. ....	13
1.1 Факторы риска развития рака желудка. ....	13
1.2 Гистологическая классификация рака желудка. ....	15
1.3 Молекулярные фенотипы спорадического рака желудка. ....	16
1.4 Молекулярная классификация рака желудка TCGA. ....	18
1.4.1 Эпштейн – Барр - позитивный подтип. ....	18
1.4.2 Микросателлитно нестабильный подтип. ....	20
1.4.3 Хромосомно нестабильный подтип. ....	22
1.4.4 Геномно стабильный подтип. ....	23
1.4.5 Молекулярные маркеры рака желудка, применяемые в современной клинической практике. ....	24
1.5 Наследственный рак желудка. ....	27
1.5.1 Наследственный диффузный рак желудка. ....	28
1.5.2 Аденокарцинома желудка с проксимальным полипозом. ....	31
1.5.3 Семейный рак желудка кишечного типа. ....	34
1.5.4 Другие наследственные опухолевые синдромы, ассоциированные с повышенным риском развития рака желудка. ....	35
1.5.5 Медико-генетическое консультирование и практическое применение результатов ДНК-диагностики у пациентов с наследственным раком желудка. ....	39
Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ. ....	44
2.1 Материалы исследования и их характеристика. ....	44
2.2 Молекулярные методы исследования. ....	50
2.2.1 Выделение и оценка качества ДНК. ....	50
2.2.2 ДНК-диагностика вируса Эпштейн – Барр методом полимеразной цепной реакции в реальном времени. ....	51
2.2.3 Определение статуса микросателлитной нестабильности методом фрагментного анализа. ....	51
2.2.4 Определение статуса генов <i>KRAS</i> , <i>BRAF</i> , <i>PIK3CA</i> методом анализа кривых плавления с высоким разрешением. ....	52

	2.2.5 Исследование геминальных мутаций в генах, ассоциированных с наследственными опухолевыми синдромами, с применением NGS. . . . .	53
	2.2.6 Подтверждение наличия выявленных клинически значимых вариантов с применением секвенирования по Сэнгеру. . . . .	54
	2.3 Методы статистического анализа. . . . .	55
Глава 3.	<b>ИЗУЧЕНИЕ ФЕНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК СПОРАДИЧЕСКОГО РАКА ЖЕЛУДКА. . . . .</b>	<b>56</b>
	3.1 Определение молекулярных подтипов рака желудка и их характеристика. . . . .	56
	3.1.1 ДНК-диагностика вируса Эпштейн – Барр в образцах опухолевой ткани. . . . .	56
	3.1.2 Оценка статуса микросателлитной нестабильности в образцах опухолевой ткани. . . . .	56
	3.1.3 Изучение клинико-молекулярных характеристик спорадического рака желудка в зависимости от молекулярного подтипа . . . . .	57
	3.1.4 Обсуждение полученных результатов . . . . .	59
	3.2 Определение прогностического значения статуса микросателлитной нестабильности и вируса Эпштейн - Барр при раке желудка. . . . .	60
	3.2.1 Оценка общей выживаемости. . . . .	60
	3.2.2 Обсуждение полученных результатов. . . . .	63
	3.3 Оценка частоты соматических мутаций генов <i>KRAS</i> , <i>BRAF</i> и <i>PIK3CA</i> при раке желудка. . . . .	64
	3.3.1 Исследование полиморфизма «горячих» точек генов <i>KRAS</i> , <i>BRAF</i> и <i>PIK3CA</i> . . . . .	64
	3.3.2 Обсуждение полученных результатов. . . . .	65
Глава 4.	<b>ИЗУЧЕНИЕ ФЕНО-ГЕНОТИПИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК НАСЛЕДСТВЕННОГО РАКА ЖЕЛУДКА. . . . .</b>	<b>66</b>
	4.1 Результаты генотипирования геномной ДНК пациентов с подозрением на наследственную форму рака желудка. . . . .	66
	4.2 Обсуждение полученных результатов. . . . .	68
	4.3 Изучение клинико-anamnestических характеристик носителей мутаций в генах, ассоциированных с наследственными опухолевыми синдромами. . . . .	71

4.4 Обсуждение полученных результатов. ....	77
4.4.1 Клинически значимые варианты нуклеотидной последовательности в генах системы репарации путем гомологичной рекомбинации. ....	77
4.4.2 Клинически значимые варианты нуклеотидной последовательности в генах системы репарации неспаренных оснований. ....	81
4.4.3 Клинически значимые варианты нуклеотидной последовательности в гене <i>TP53</i> . ....	82
4.4.4 Клинически значимый вариант нуклеотидной последовательности в гене <i>CDH1</i> . ....	86
4.4.5 Клинически значимый вариант нуклеотидной последовательности в гене <i>PTCH2</i>	88
ЗАКЛЮЧЕНИЕ. ....	90
ВЫВОДЫ. ....	93
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ. ....	94
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ. ....	95
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ. ....	97

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность проблемы и степень ее разработанности

Рак желудка (РЖ) представляет собой злокачественную опухоль, исходящую из слизистой оболочки желудка. Ежегодно РЖ занимает лидирующую позицию в структуре онкологической заболеваемости, оставаясь высоко актуальной проблемой здравоохранения. По данным Globocan IARC, в 2020 г. в мире зарегистрировано 1 089 103 новых случаев РЖ, и это пятое место (6 %) среди всех впервые выявленных злокачественных новообразований (ЗНО) [1]. Самый высокий уровень заболеваемости отмечен в Восточной Азии, самый низкий – в Северной Америке [2]. В структуре мужской и женской заболеваемости РЖ занял четвертое (719 523) и седьмое (369 580) места соответственно. Абсолютное число летальных исходов составило 768 793 (7,8 %), что также соответствует пятому месту в структуре смертности от ЗНО. Пятилетняя выживаемость при локализованных стадиях РЖ достигает 70–90 % [3]. Общая пятилетняя выживаемость пациентов с I–IV стадией заболевания колеблется в пределах 10–30%, медиана общей выживаемости – менее одного года [4, 5].

В Российской Федерации в 2019 г. на долю опухолей желудка пришлось 5,7 % (6-е место) от всех впервые зарегистрированных ЗНО, абсолютное число заболевших составило 36 171. Таким образом, в структуре заболеваемости РЖ занял 5-е (20 793 случаев; 7,1 %) и 8-е (15 378 случаев; 4,4 %) места у мужчин и женщин соответственно. Лидирующими регионами по показателям заболеваемости оказались Центральный (9920 случаев), Приволжский (7651 случаев), Сибирский (4652 случаев) и Северо-Западный (4091 случаев) федеральные округа. Кумулятивный риск развития РЖ составил 1,63 %. Рост заболеваемости РЖ отмечен в возрастной группе 30–59 лет (4,4 % случаев), несколько чаще диагноз установлен у лиц пожилого возраста (6,3 %). Средний возраст диагностики РЖ составил 67,6 года: 66,3 и 69,3 года у мужчин и женщин соответственно. В большинстве случаев РЖ выявляли на III–IV (60,9 %) стадиях заболевания. Высокая частота диагностики РЖ на распространенных стадиях объясняется значительной гетерогенностью клинических проявлений РЖ и отсутствием скрининговых программ [6].

Несмотря на снижение среднегодового темпа прироста заболеваемости за последнее десятилетие (-11,8 %), летальность от РЖ остается неизменно высокой. Показатель активного выявления РЖ в 2019 г. не превысил 14,6 %, среднероссийский уровень морфологической верификации диагноза – 95,8 %. В общей сложности в 2 871 случае диагноз установлен посмертно. Абсолютное число зарегистрированных смертей достигло 15 922, средний возраст умерших – 69,0 лет. В структуре смертности РЖ занял второе ранговое место (9,3 %), уступая лишь ЗНО трахеи,

бронхов, легкого. Наибольший показатель смертности определен в Центральном (8 142 случаев), Приволжском (5 471 случаев), Сибирском (3 447 случаев) и Северо-Западном (3 110 случаев) федеральных округах. Общая пятилетняя выживаемость больных с I–IV стадией РЖ с момента постановки диагноза составила 59,5 %, годовичная летальность – 45,8 % [6].

РЖ является клинически и генетически гетерогенным заболеванием и обусловлен широким спектром молекулярно-генетических нарушений. Гистопатологические системы классификации, такие как классификация Лаурен и классификация Всемирной организации здравоохранения, влияют на выбор тактики лечения при РЖ, в частности, при эндоскопических или хирургических вмешательствах. Однако определение гистологического типа опухоли не является достаточным ориентиром для индивидуализации лечения.

Совершенствование методов молекулярной диагностики в течение последних десятилетий привело к разработке нескольких систем молекулярной классификации РЖ, основанных на особенностях соматического профиля опухолей. Наиболее масштабными и полными по объему использованных методик стали классификация Европейской группы по созданию атласа генома рака (The Cancer Genome Atlas, TCGA) [7] и классификация Азиатской группы по исследованию рака (Asian Cancer Research Group, ACRG) [8]. Обе классификации включили в себя по 4 молекулярных подтипа РЖ с уникальными клинико-генотипическими характеристиками. Однако, в связи со сложностью диагностических методик и отсутствием достоверной данных о клинической значимости выявленных подтипов, подобное молекулярное профилирование ограничено применяется в клинической практике, а молекулярные нарушения при РЖ остаются предметом интенсивного изучения.

По совокупности результатов исследований TCGA и ACRG наибольший клинический интерес вызывают подтипы РЖ с микросателлитной нестабильностью и Эпштейн – Барр – ассоциированные опухоли. При этих подтипах РЖ отмечено наиболее благоприятное течение заболевания и выявлены молекулярные альтерации с потенциальной возможностью применения таргетной и иммунотерапии [7, 8]. На сегодняшний день клинически значимыми из них являются соматические мутации в генах *KRAS*, *BRAF*, *PIK3CA*. Исследование полиморфизма «горячих» точек этих генов рекомендовано при раке толстой кишки, меланоме, раке молочной железы и других ЗНО в качестве прогностических и предиктивных маркеров [8–11]. Клиническое значение этих нарушений при РЖ предстоит изучить.

Наследственные формы РЖ детерминированы герминальными мутациями в онкогенах и генах-онкосупрессорах, в результате которых РЖ возникает в составе наследственных опухолевых синдромов (НОС). Как известно, около 5–10 % больных РЖ сообщают о нагруженности семейного анамнеза случаями РЖ, однако каузативные герминальные мутации удается выявить лишь в 1–3 % случаев [12]. Среди наследственных форм РЖ выделяют

наследственный диффузный РЖ (hereditary diffuse gastric cancer; HDGC), аденокарциному желудка с проксимальным полипозом (gastric adenocarcinoma and proximal polyposis of the stomach, GAPPs) и семейный РЖ кишечного типа (familial intestinal gastric cancer, FIGC) [13]. Кроме того, прослежена ассоциация РЖ с другими НОС, среди которых аденоматозный полипозный синдром, синдром Линча, синдром Коудена, ювенильный полипоз, *TP53*-ассоциированный опухолевый синдром, *MUTYH*-ассоциированный аденоматозный полипоз и синдром Пейтца – Егерса [14]. В большинстве случаев такие НОС характеризуются аутосомно-доминантным типом наследования, высокой пенетрантностью, ранней манифестацией ЗНО (преимущественно на 3–4-м десятилетии жизни) и склонностью к развитию первично-множественных злокачественных новообразований (ПМЗН). Установленный НОС позволяет индивидуализировать объем лечебных мероприятий у больных РЖ, своевременно предпринимать меры профилактически с целью раннего выявления рака других локализаций, а также выявить родственников больного из группы высокого онкологического риска [15].

На сегодняшний день в России не существует унифицированной системы предиктивных и прогностических маркеров при РЖ, используемой в рутинной клинической практике. Также отсутствуют единые методические рекомендации по медико-генетическому консультированию и алгоритму ДНК-диагностики для больных РЖ. Не найдено публикаций, содержащих оценку частоты мутаций в генах *KRAS*, *BRAF*, *PIK3CA* в российской выборке пациентов. Единичные работы, посвященные молекулярному профилированию и поиску наследственных форм РЖ в российской популяции, ограничены малыми выборками или спектром изучаемых маркеров [16, 17].

### **Цель исследования**

Провести анализ фено-генотипических характеристик спорадического и наследственного рака желудка у пациентов российской популяции.

### **Задачи исследования**

1. Определить частоту и клинические характеристики Эпштейн - Барр - ассоциированных и микросателлитно нестабильных форм рака желудка.
2. Оценить прогностическую значимость статуса микросателлитной нестабильности и вируса Эпштейн - Барр в опухоли при раке желудка.
3. Оценить частоту соматических мутаций в генах *KRAS*, *BRAF*, *PIK3CA* в опухолевой ткани желудка.

4. Оценить долю наследственных форм рака желудка у пациентов с клиническими признаками наследственного заболевания.

5. Изучить спектр и частоту клинически значимых герминальных вариантов у пациентов с подозрением на наследственно-ассоциированный рак желудка.

### **Научная новизна**

В данном исследовании впервые в России выполнено молекулярно-генетическое тестирование большого объема биологических образцов и изучены клинические данные больных РЖ, собранных на базе ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Установлена частота и прослежены клинические особенности Эпштейн - Барр - ассоциированных и микросателлитно нестабильных опухолей желудка, а также оценено прогностическое значение этих маркеров. Выполнен анализ и оценена частота полиморфизма генов *KRAS* (кодоны 12-13 экзона 2; кодон 61 экзона 3 и кодон 146 экзона 4), *BRAF* (кодонов 597-601 экзона 15; кодонов 542-546 экзона 10), *PIK3CA* (кодонов 1047-1049 экзон 21) с учетом статуса вируса Эпштейн – Барр и микросателлитной нестабильности. С применением кастомной панели из 44 онкоассоциированных генов оценены частота и спектр наследственно-обусловленных форм рака желудка, а также вовлеченность молекулярных нарушений в системе репарации неспаренных оснований и гомологичной рекомбинации ДНК при раке желудка в российской популяции.

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

Проведенное молекулярно-генетическое тестирование с анализом статуса микросателлитной нестабильности и вируса Эпштейн – Барр позволило оценить прогностическое значение этих маркеров. Полученные результаты обозначили необходимость дальнейшего изучения клинического значения данных маркеров с помощью альтернативных методов молекулярно-генетической диагностики, что откроет перспективу оптимизации подходов к лечению больных раком желудка. Также результаты проведенного массового параллельного секвенирования (next generation sequencing, NGS) в группе пациентов с подозрением на наследственную форму заболевания позволят улучшить эффективность медико-генетического консультирования, увеличить частоту выявления наследственных форм рака желудка и, как следствие, снизить риск заболеваемости вторыми первичными злокачественными новообразованиями при диагностике наследственного опухолевого синдрома. Результаты исследования могут быть использованы в профессиональной

деятельности врачей-онкологов, врачей лабораторной диагностики, генетиков, лабораторных генетиков, гастроэнтерологов в учреждениях онкологического и общего профилей.

### Методология и методы исследования

В исследование включены 310 биологических образцов больных РЖ с морфологически установленным диагнозом, которые проходили обследование или лечение на базе ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России в период с 1992 по 2020 гг. В зависимости от клинических проявлений заболевания пациенты были стратифицированы на когорту I со спорадическим раком и когорту II с подозрением на наследственную форму РЖ. Когорта I включала 159 больных РЖ I–IV стадии, для которых в молекулярно-биологической лаборатории отдела морфологической и молекулярно-генетической диагностики опухолей ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России проведена ДНК - диагностика вируса Эпштейн - Барр, оценка статуса микросателлитной нестабильности и мутационного статуса «горячих» точек генов *KRAS*, *BRAF*, *PIK3CA* в опухолевой ткани. Для качественной оценки наличия ДНК вируса Эпштейн - Барр методом ПЦР в реальном времени использовался набор реагентов «РеалБест ДНК ВЭБ (комплект 1)» («Вектор Бест», Россия), полученные результаты оценивали в соответствии с инструкцией производителя. Оценку статуса микросателлитной нестабильности выполняли посредством фрагментного анализа методом разделения длин таргетных участков с использованием пяти квазимономорфных мононуклеотидных маркеров. Поиск соматических мутаций во 2, 3, 4 экзонах гена *KRAS*, 597-600 кодонах гена *BRAF* и 10, 21 экзонах гена *PIK3CA* детектировали при помощи метода плавления высокого разрешения с использованием специфических последовательностей праймеров и флуоресцентно меченых зондов с последующей валидацией выявленных нарушений при помощи секвенирования по Сэнгеру.

Когорта II включала 151 пациента с подозрением на наследственную форму РЖ, которым на базе Центра постгеномных исследований ФГБУ «Центр стратегического планирования» ФМБА России проведено массовое параллельное секвенирование кодирующей части генов *APC*, *ATM*, *AXIN2*, *BARD1*, *BLM*, *BMP1A*, *BRCA1*, *BRCA2*, *BRIP1*, *CDH1*, *CDKN2A*, *CHEK2*, *DICER1*, *EPCAM*, *GALNT12*, *GREM1*, *MEN1*, *MLH1*, *MLH3*, *MSH2*, *MSH3*, *MSH6*, *MUTYH*, *NBN*, *NF1*, *NTHL1*, *PALB2*, *PMS2*, *POLD1*, *POLE*, *PTCH1*, *PTCH2*, *PTEN*, *RAD51C*, *RAD51D*, *RET*, *SMAD4*, *STK11*, *SUFU*, *TP53*, *TSC1*, *TSC2*, *VHL*, *WT1* методом парно-концевого чтения с использованием кастомной панели зондов KAPA HYPER (Roche) с последующей биоинформатической обработкой, клинической интерпретацией данных и валидацией выявленных клинически значимых вариантов секвенированием по Сэнгеру.

### Положения, выносимые на защиту

Частота Эпштейн – Барр - ассоциированного рака желудка составила 8,2 % ( $n = 13/159$ ), средний возраст манифестации заболевания - 54,8 года, отмечено достоверное превалирование мужского пола (92,3 %;  $p < 0,01$ ). Этот подтип характеризуется лучшим прогнозом ( $p < 0,01$ ) в отличие от микросателлитно стабильного Эпштейн – Барр – негативного рака желудка, что отражено в 91,7 % общей выживаемости больных в течение 8 лет.

Микросателлитно нестабильный статус опухоли обнаружен в 13,2 % ( $n = 21/159$ ) случаев рака желудка. В группе преобладали пациенты в возрасте старше 50 лет ( $p < 0,01$ ), средний возраст манифестации рака - 62,1 года. Общая 8-летняя выживаемость пациентов с I-IV стадией заболевания составила 67,3%.

При исследовании клинически значимых вариантов в «горячих» точках генов *KRAS* и *PIK3CA* частота таковых составила 7,5 % и 2,5 % соответственно. Не выявлено мутаций в кодонах 597–601 гена *BRAF*. Совокупно доля клинически значимых вариантов в генах *KRAS* и *PIK3CA* при микросателлитно нестабильном раке желудка составила 19,0 % ( $n = 4$ ) и 33,3 % ( $n = 7$ ); при Эпштейн – Барр – ассоциированном подтипе выявлено 0% и 7,7 % ( $n = 1$ ) вариантов соответственно. В 19,0 % (4/21) образцов рака желудка с микросателлитной нестабильностью выявлено сочетание вариантов генов *KRAS* и *PIK3CA*.

При исследовании пациентов с подозрением на генетическую патологию наследственный рак желудка выявлен у 8,6 % (13/151) пациентов в составе синдрома наследственного рака молочной железы и яичников (гены *BRCA1/2*), синдрома Линча (гены *MLH1* и *MSH2*), *TP53*-ассоциированного опухолевого синдрома (ген *TP53*), синдрома наследственного диффузного рака желудка (ген *CDH1*) и Ли – Фраумени – подобного синдрома (ген *CHEK2*).

У 15,2 % (23/151) пациентов с подозрением на наследственную форму заболевания выявлен 21 клинически значимый вариант нуклеотидной последовательности в генах, ассоциированных с наследственными опухолевыми синдромами, в гетерозиготной форме. Наибольшее число мутаций (66,7 %; 14/21) диагностировано в генах системы репарации путем гомологичной рекомбинации и в генах системы репарации неспаренных оснований.

### Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Диссертация соответствует паспорту научной специальности 3.1.6. Онкология, лучевая терапия, направлению исследований п.4 «Разработка и совершенствование программ скрининга и ранней диагностики», и паспорту научной специальности 1.5.7. Генетика, направлению

исследований п19. «Генетика человека. Медицинская генетика. Наследственные болезни. Медико-генетическое консультирование. Болезни с наследственной предрасположенностью. Генетика старения. Иммуногенетика. Онкогенетика. Генетика поведения. Молекулярно-генетическая/биохимическая диагностика заболеваний человека. Фармакогенетика. Генотоксикология. Генетическая терапия».

### **Степень достоверности и апробация результатов**

В исследование включена коллекция большого объема биологических образцов и проведен анализ клинических данных больных раком желудка за длительный период наблюдения, оценены генотипические характеристики образцов опухолевой ткани и крови с применением современных методик. Результаты исследования не противоречат ранее опубликованным данным российских и зарубежных авторов.

Определение статуса микросателлитной нестабильности внедрено и используются в повседневной клинической практике ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России для персонализации и определения тактики лечения и его объемов у больных раком желудка. Данные о значении статуса вируса Эпштейн - Барр, соматических мутаций в генах *KRAS*, *BRAF*, *PIK3CA*, а также спектре герминальных мутаций в группе пациентов с клиническими признаками наследственного заболевания внедрены в обучающий процесс врачей ординаторов, врачей-генетиков, врачей-лабораторных генетиков, а также применяются в ходе медико-генетического консультирования в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, что подтверждено актом о внедрении результатов от 06.06.2024 г.

Апробация диссертации состоялась на совместной научной конференции с участием лаборатории молекулярно-генетической диагностики отдела морфологической и молекулярно-генетической диагностики опухолей, поликлинического отделения, лаборатории клинической иммунологии и инновационных технологий консультативно-диагностического центра, отделения противоопухолевой лекарственной терапии №2, отделения абдоминальной онкологии №1 НИИ клинической онкологии им. академика РАН и РАМН Н.Н. Трапезникова, лаборатории онкопротеомики отдела экспериментальной биологии опухолей НИИ канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России 19 сентября 2023 г.

Материалы диссертации представлены на 53-й международной конференции European Human Genetics Virtual Conference ESHG2020.2 (онлайн формат трансляции, 2020), III Всероссийской конференции с международным участием «Опухолевые маркеры: фундаментальные и клинические аспекты» (Республика Алтай, г. Горно-Алтайск, 2021), Пятой

международной научно-практической конференции «NGS в медицинской генетике» (г. Суздаль, 2021) и 56-й Международной конференции European Human Genetics Conference (гибридный формат, г. Глазго, Шотландия, 2023) в форме устных и постерных докладов.

### **Публикации**

Материалы диссертационного исследования изложены в полном объеме в 8 публикациях, из них 3 в научных журналах, которые внесены в перечень рецензируемых изданий, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России для опубликования основных результатов исследований.

### **Структура и объем диссертации**

Диссертация изложена на 117 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов исследования и их обсуждения, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка сокращений и списка литературы. Работа иллюстрирована 19 рисунками и 15 таблицами. Библиографический указатель содержит 217 источников (12 отечественных и 205 зарубежных).

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1 Факторы риска развития рака желудка

Механизм злокачественной трансформации при РЖ обусловлен воздействием экзо- и эндогенных факторов и представляет сложный многоступенчатый процесс, сопровождающийся множеством молекулярных нарушений, известный как каскад Корреа: атрофия желез желудка, метаплазия, дисплазия и рак [18]. Метапластические изменения в верхних отделах желудочно-кишечного тракта хорошо изучены как ранние предшественники рака, но их точные молекулярные механизмы остаются предметом интенсивных исследований. Считается, что для индукции канцерогенеза требуется 20–30 лет воздействия канцерогенного агента на слизистую оболочку желудка.

Известно, что до 50 % случаев РЖ спровоцировано факторами окружающей среды, преимущественно диетическими привычками и социальным поведением. Как сообщают S. Ge et al., чрезмерное потребление соли увеличивает риск развития РЖ до 22 % [19]. Ряд авторов отметили ассоциацию риска РЖ с преобладанием в рационе красного мяса [20, 21], копченых продуктов, обработанного и соленого мяса [20, 22]. V. Bagnardi et al. описали 24 % риск развития РЖ при употреблении более 50 г алкоголя в день [23]. Курение также отнесено к канцерогенным факторам и обуславливает 60% риск формирования ЗНО желудка [24]. Кроме того, по данным китайских исследователей, потенциальный риск развития РЖ у курильщиков, употребляющих алкоголь в течение жизни, достигает 80 % [25].

Описаны и других факторы риска формирования РЖ, такие как инфекционные агенты, генетическая предрасположенность и отягощенный семейный анамнез, демографические характеристики, ионизирующее излучение и пр. [26].

Среди инфекционных агентов значительный вклад в развитие РЖ вносит инфекция *H. pylori*, которая признана канцерогеном I класса и одним из широко распространенных заболеваний желудка. *H. Pylori* обуславливает до 6,2 % случаев РЖ во всем мире [27].

Высокий уровень патогенности *H. pylori* детерминирован уникальными структурными особенностями и множеством факторов вирулентности (*CagA*, *VacA*, *DupA*, *OipA* и др.) бактерии. Кроме того, интенсивность негативного влияния *H. pylori* зависит от полиморфизма генов провоспалительных цитокинов хозяина. Канцерогенное действие *H. pylori* объясняется двумя основными механизмами: непрямой воспалительной реакцией на слизистую оболочку и прямым эпигенетическим воздействием на эпителиальные клетки желудка [28]. Хроническое воспаление, спровоцированное инфекцией *H. pylori*, вызывает aberrантное метилирование промоторов генов-супрессоров опухолей *RUNX3*, *LOX* и *CDH1*, подавляя их экспрессию [29].

Около 65–80 % *H. pylori*-зависимых ЗНО возникает в дистальном отделе желудка и обычно демонстрирует принадлежность к кишечному гистологическому типу [30]. Благодаря высокой эффективности современных методов эрадикации *H. pylori*, РЖ отнесен к потенциально предотвратимым ЗНО [31]. Кроме того, большой интерес в канцерогенезе РЖ представляет значение других бактерий. Замечено, что состав микробиоты желудка при РЖ отличается сниженным микробным разнообразием с преобладанием оральных и кишечных комменсалов [32], однако непосредственная роль микробиоты требует дальнейшего изучения.

Вирус Эпштейн - Барр (ВЭБ) стал первым описанным канцерогенным вирусом, который обуславливает 1,8 % всех случаев злокачественных новообразований человека, включая лимфому Ходжкина, лимфому Беркитта, НК/Т-клеточную лимфому и рак носоглотки [33]. Впервые в 1990 г. А. Р. Burke et al. обнаружили ДНК ВЭБ в лимфоэпителиальной карциноме желудка [34]. В дальнейшем прослежена тропность ВЭБ к раковым клеткам желудка и отсутствие его генома в нормальных тканях слизистой оболочки, отмечены клинико-патологические особенности и описаны механизмы канцерогенеза ВЭБ-ассоциированного РЖ [35].

Частота ВЭБ-положительных форм РЖ варьирует в зависимости от региональных особенностей. В целом около 10 % опухолей желудка во всем мире ассоциировано с ВЭБ [36]. На сегодняшний день рассматриваются два пути поражения слизистой оболочки желудка ВЭБ. Первый путь предполагает внедрение ВЭБ в В-лимфоциты и эпителиальные клетки ротовой полости, инфицирующие желудочный эпителий со слюной. Во втором случае рассматривается реактивация ВЭБ непосредственно в В-лимфоцитах желудка, которые, высвобождаясь, инфицируют эпителиальные клетки [37]. В организме человека ВЭБ способен существовать в латентной (преимущественно) и литической формах. При литической форме инкубационный период сопровождается эпигенетическим метилированием генома клеток хозяина, вызывая дисбаланс клеточных сигнальных путей, аномальную экспрессию, инициацию и развитие РЖ. Продукты генов EBERs (*BARF-0*, *EBNA-1* и *LMP2A*) ВЭБ при латентном течении участвуют в подавлении семейства miR-200, приводя к снижению экспрессии E-кадгерина и мезенхимально-подобному фенотипу [38]. Кроме того, анализ *in vitro* показал, что активация и репрессия энхансерных областей в ВЭБ-инфицированных клетках становятся причиной aberrантной активации онкогенов и репрессии генов – супрессоров опухоли [39]. Таким образом, энхансеры, молчащие в гетерохроматине, aberrантно активируются в участках генома человека EBVIR (EBV-interacting regions), взаимодействующих с геномом ВЭБ, перестраивая структуру хроматина хозяина и вызывая онкогенез [40]. Показано, что инфицирование ВЭБ приводит к десятикратному увеличению риска развития РЖ в течение жизни [41].

В качестве немодифицируемого фактора риска развития РЖ рассматривается наследственная предрасположенность к раку в составе наследственных онкологических синдромов (НОС), которые обуславливают до 10 % случаев РЖ. Герминальные мутации, являющиеся причиной НОС, удается выявить лишь в 1–3 % случаев семейных форм РЖ. На сегодняшний день выделяют три формы наследственного РЖ: наследственный диффузный РЖ (hereditary diffuse gastric cancer; HDGC), аденокарциному желудка и проксимальный полипоз (gastric adenocarcinoma and proximal polyposis of the stomach, GAPPs), семейный РЖ кишечного типа (familial intestinal gastric cancer, FIGC) [13]. Кроме того, описаны другие НОС, ассоциированные с высоким риском РЖ: синдром Линча, синдром наследственного рака молочной железы и яичников, аденоматозный полипозный синдром, *MUtyH*-ассоциированный полипоз, ювенильный аденоматозный полипоз, синдром Пейтца – Егерса, *TP53*-ассоциированный опухолевый синдром и некоторые другие.

## 1.2 Гистологическая классификация рака желудка

Учитывая высокую морфологическую гетерогенность, разработано большое количество гистопатологических классификаций РЖ. Наиболее востребованными на сегодняшний день являются гистологическая классификация по Лаурен (Lauren, 1965) и классификация Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ). В общей сложности до 90 % опухолей желудка гистологически представлены аденокарциномой желудка, в 10 % случаев диагностируют лимфому и гастроинтестинальные стромальные опухоли.

Согласно классификации Лаурен, существуют два типа аденокарциномы желудка: кишечный (или интестинальный) тип (50 %) и диффузный тип (33 %) [42]. Остальные 17 % классифицируют как смешанные или неклассифицируемые опухоли. Интестинальный рак возникает из метапластически измененных клеток кишечного типа, имеет дифференцировку и в большинстве случаев представлен экзофитными новообразованиями. Чаще интестинальный рак поражает проксимальный отдел желудка (дно). Опухоли диффузного типа отличаются низкой клеточной дифференцировкой с отсутствием межклеточных связей, имеют инфильтрирующий характер и ассоциированы с худшим прогнозом, в отличие от кишечного типа. Развитие интестинального и диффузного рака наблюдается у обоих полов с равной частотой, однако опухоли диффузного типа чаще возникают в более молодом возрасте [43].

По классификации ВОЗ от 2019 г., РЖ подразделяют на папиллярный, муцинозный, перстневидно-клеточный и когезивный, смешанный, аденосквамозный, сквамозноклеточный рак и др.

Гистопатологические системы классификаций влияют на выбор объема и метода лечебных мероприятий при РЖ, в частности при эндоскопических или хирургических вмешательствах. Однако гистологический тип рака не является достаточным критерием для индивидуализации лечения.

### 1.3 Молекулярные фенотипы спорадического рака желудка

Как известно, многочисленные генетические и эпигенетические нарушения, возникающие в слизистой оболочке желудка, приводят к малигнизации, прогрессированию рака, а также оказывают влияние на эффективность проводимой терапии [44].

Неконтролируемый иерархический кластерный анализ данных, полученный Y. Y. Tan et al. в 2011 г. при изучении клеточных линий РЖ, позволил определить два подтипа РЖ с различными геномными характеристиками. Первый подтип был ассоциирован с опухолями кишечного типа, обладал метаболизмом углеводов, белков, клеточной адгезией, и обозначен как G-INT-тип. Вторым, G-DIF-тип, наблюдался при диффузных опухолях и имел способность к пролиферации клеток и метаболизму жирных кислот. Конкордантность G-INT- и G-DIF-типов с классификацией Лаурен не превышала 64 %, однако данные маркеры проявили отличия в прогностической и предиктивной значимости при лечении 5-фторурацилом, оксалиплатином и цисплатином [69].

Также в 2011 г. K. Matsusaka et al. с помощью анализа метилирования 27 578 CpG-сайтов, охватывающих 14 495 генов, а также пиросеквенирования, экспрессии мРНК, иммуноблот-анализа и других методов, выявили различные модели метилирования ДНК при РЖ и классифицировали опухоли желудка на три эпигенотипа: с чрезвычайно высоким метилированием (extremely high-methylation epigenotype, E-HME), с высоким метилированием (high-methylation epigenotype, HME) и с низким метилированием (low-methylation epigenotype, LME). Дополнительно было отмечено, что ВЭБ может играть роль в канцерогенезе желудка, вызывая чрезмерное метилирование ДНК [47].

В 2013 г. Z. Lei et al. провели экспрессионный анализ 248 опухолей желудка, в результате которого идентифицированы пролиферативный, метаболический и мезенхимальный типы РЖ. Опухоли пролиферативного подтипа характеризовались интестинальным гистотипом, высоким уровнем геномной нестабильности, амплификацией генов *ERBB2*, *KRAS*, *CCNE1* и *MYC*, гиперметиллированием ДНК и высокой частотой мутаций в гене *TP53*. Мезенхимальный подтип был представлен диффузным гистотипом, содержал клетки с признаками раковых стволовых клеток и проявлял высокую чувствительность к ингибиторам PI3K-AKT-mTOR. Метаболический подтип включил диффузный и кишечный рак и демонстрировал повышенную

экспрессию генов, связанных с метаболическими путями, а также отличался экспрессией спазмолитического полипептида (SPEM) в метастатически измененных тканях желудка. *In vitro* опухолевые клетки метаболического подтипа РЖ отличались чувствительностью к 5-фторурацилу, что также отражалось лучшим ответом при лечении 5-фторурацилом и более высокими показателями безрецидивной выживаемости пациентов. Однако значимых различий в общей выживаемости больных в зависимости от подтипа не было отмечено [48].

Более подробно особенности молекулярных нарушений при РЖ были описаны исследователями TCGA в 2014 году, которые провели анализ копийности, полноэкзомное секвенирование, секвенирование матричной и микро-РНК, оценку статуса метилирования, анализ транскриптома 295 образцов послеоперационной опухолевой ткани больных РЖ, ранее не получавших лекарственное лечение. В результате исследования опухоли желудка были кластеризованы на четыре молекулярных подтипа: Эпштейн - Барр – позитивный (ВЭБ) (8,8 %), микросателлитно нестабильный (21,7 %), хромосомно нестабильный (49,8 %) и геномно стабильный (19,7 %). Описанные подтипы имели индивидуальные клинико-морфологические особенности, уникальный молекулярно-генетический профиль, прогноз и ответ на терапию. Наиболее благоприятный прогноз отмечался при ВЭБ-позитивном и микросателлитно нестабильном РЖ [7].

В 2015 году ACRG, на основании результатов экспрессионного анализа мРНК и полногеномного исследования 300 образцов РЖ, также разделила опухоли желудка на четыре молекулярных подтипа: микросателлитно нестабильные опухоли (22,7 %), микросателлитно стабильные с эпителиально-мезенхимальным переходом (15,3 %), микросателлитно стабильные с «диким типом» гена *TP53* (26,3 %) и микросателлитно стабильные опухоли с мутацией в гене *TP53* (35,7 %). В данной классификации также прослежен различный прогноз течения РЖ. Как и в классификации TCGA, особое внимание было уделено значению статуса микросателлитной нестабильности, при котором наблюдался лучший прогноз и самая низкая частота рецидивов (22 %) [8]. Частичное совпадение классификаций TCGA и ACRG можно объяснить популяционными особенностями исследованных групп и схожими диагностическими платформами.

С учетом предыдущих исследований в 2016 г. N. Setia et al. опубликовали результаты оценки экспрессии 14 биомаркеров в 146 образцах РЖ, полученных с помощью иммуногистохимической гибридизации *in situ*. Авторы выделили ВЭБ-позитивный РЖ (7,4 %), микросателлитно нестабильный РЖ (6,9 %), РЖ с aberrантной экспрессией E-кадгерина (15,2 %), РЖ с aberrантной экспрессией p53 (49,0 %) и РЖ с нормальной экспрессией p53 (21,5 %). Опухоли ВЭБ-позитивного и микросателлитно нестабильного типов так же, как и в

предыдущих исследованиях, демонстрировали тенденцию к лучшей общей выживаемости в сравнении с другими подтипами [49].

Классификация X. Li et al., опубликованная в 2016 г., была основана на агрегировании молекулярных профилей РЖ 544 пациентов из предыдущих геномных исследований. На основе оценки мутационной нагрузки опухоли желудка были разделены на обычный (86,8 %; 2,4 мутации/Мб, диапазон 0–8,3 мутации/Мб,) и гипермутированный (13,2 %; 20,5 мутаций/Мб, диапазон 9,6–200,2 мутации/Мб) подтипы, последний из которых характеризовался высокой численностью образцов с микросателлитной нестабильностью. Обычный тип был подразделен на два подгруппы, С1 и С2, которые имели различные клинические исходы, независимо от стадии заболевания. С1 был ассоциирован с мутациями в генах *TP53*, *XIRP2* и *APC* и коррелировал со значительно лучшим прогнозом; С2 характеризовался мутациями в генах *ARID1A*, *CDH1*, *PIK3CA*, *ERBB2* и *RHOA* [50].

По результатам описанных исследований пациенты с микросателлитно нестабильным (МСН) РЖ имели, как правило, более благоприятный прогноз, однако на сегодняшний день все больше исследований отмечают преимущества при лечении ингибиторами иммунных контрольных точек менее чем у половины пациентов данной группы. Y. Yang et al. провели неотрицательную матричную факторизацию данных когорты пациентов, исследованных TCGA, что позволило выявить две подгруппы микросателлитно нестабильных опухолей: МСН-Н1 и МСН-Н2. Подгруппа МСН-Н1 отличалась более высоким уровнем экспрессии негативных иммунных регуляторов, таких как С-С-мотив хемокинового лиганда-2 (CCL2)/CCL3/CCL4/CCL28), лиганда запрограммированной смерти-2 (PD-L2) и индоламин-2,3-диоксигеназы-1 (IDO1). Несмотря на то, что значимых различий в клинических характеристиках между МСН-Н1 и МСН-Н2 не было выявлено, выживаемость пациентов в подгруппе МСН-Н1 была значительно ниже, чем в подгруппе МСН-Н2. Авторы предположили, что подобные отличия в выживаемости пациентов могут быть связаны с преобладанием ингибирующих иммунных рецепторов и хемокинов в опухолях МСН-Н1 [51].

## **1.4 Молекулярная классификация рака желудка TCGA**

### **1.4.1 Эпштейн – Барр - позитивный подтип**

Эпштейн - Барр - позитивный (ВЭБ<sup>+</sup>) подтип РЖ отличается значительным разнообразием генетических и эпигенетических нарушений, которые затрагивают до пяти сигнальных путей, ответственных за регуляцию энергетического обмена и метаболизма клетки [7]. ВЭБ индуцирует aberrантное гиперметилирование CpG-островков промоторов 886 генов,

таким образом, ВЭБ<sup>+</sup> РЖ отнесен к эпигенотипу с чрезвычайно высоким метилированием [47]. Гиперметилование CpG-островков вызывает сайленсинг транскрипции, что приводит к экспрессии нижестоящих генов, задействованных в канцерогенезе, и обуславливает один из механизмов развития рака [52]. Так, гиперметилование промотора гена *CDKN2A* (p16INK4A), одного из наиболее значимых генов-онкосупрессоров, было обнаружено во всех ВЭБ<sup>+</sup> образцах РЖ [53].

Кроме того, ВЭБ<sup>+</sup> подтип ассоциирован с высокой частотой соматических мутаций, в частности, в гене *PIK3CA* (фосфатидил-инозитол-3-киназа, Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha) – регуляторе PI3K-опосредованного сигнального каскада [54]. Ген *PIK3CA* является вторым наиболее часто мутирующим геном при многих типах рака. Как сообщалось ранее, более 10 % карцином желудка несут мутации в гене *PIK3CA*, в то время как их частота при ВЭБ-ассоциированной форме варьирует от 40 до 80 % [55]. Как показали С. Вögerdo et al., до 14 % образцов первичной опухоли ВЭБ<sup>+</sup> РЖ ассоциированы с высокой внутриопухолевой гетерогенностью и могут содержать от трех до пяти вариантов онкогена *PIK3CA*, включая «дикий тип» [56]. Данный факт предполагает высокую эффективность лечения ВЭБ<sup>+</sup> РЖ ингибиторами PI3K. М. Dong et al. отметили ассоциацию высокого уровня экспрессии *PIK3CA* при ВЭБ<sup>+</sup> РЖ с лучшей пятилетней выживаемостью в отличие от ВЭБ-негативных опухолей (57,8 против 33,4 %;  $p < 0,001$ ) [57].

Мутации в гене *ARID1A* (AT-rich interacting domain-containing protein 1A) наблюдались в 55 % образцах ВЭБ<sup>+</sup> РЖ. Ген *ARID1A* представляет собой ключевой компонент комплекса ремоделирования хроматина SWI/SNF и второй по частоте нарушений драйверный ген-супрессор опухоли [7]. Структурные варианты в гене *ARID1A* преимущественно представлены мутациями со сдвигом рамки считывания, которые приводят к снижению экспрессии ARID1A в тканях РЖ и направлены на подавление транскрипции E-кадгерина [58]. L. Yamada et al. описали избирательную чувствительность ингибиторов энхансера гомолога *zeste-2* (*EZH2*) к клеткам РЖ с дефицитом ARID1A, что позволило выдвинуть предположение о потенциальной эффективности таргетной терапии на основе синтетического летального исхода [59].

Мутации в гене *BCL-6*, корепрессоре опосредованной транскрипции, *BCOR* (*BCL6 COREPRESSOR*), встречались в 23 % опухолей [60]. Дополнительно обнаружены крупные делеции (*PTEN*, *SMAD4*, *CDKN2A* и *ARID1A*) и вариация числа копий ряда генов. Так, фокальная амплификация хромосомы 9p24.1, включающая гены *JAK2*, *CD274* и *PDCD1LG2*, приводит к конститутивной экспрессии белков JAK2, PD-L1 и PD-L2 соответственно [7, 61]. Гиперэкспрессия PD-L1 (лиганда запрограммированной смерти-1, Programmed cell death 1) отмечалась в 15 % ВЭБ<sup>+</sup> РЖ и была ассоциирована с худшим прогнозом [61]. Данное наблюдение, вероятно, объясняется нарушением передачи сигналов пути JAK/STAT, который

играет важную роль в пролиферации, дифференцировке и апоптозе клетки [62]. Открытое многоцентровое исследование KEYNOTE-059 показало значительную эффективность моноклонального антитела PD-1 пембролизумаб у пациентов с распространенным РЖ и экспрессией CPS $\geq$ 1 (от англ. – *combined positive score*, комбинированный показатель позитивности), благодаря чему препарат был одобрен FDA в качестве терапии третьей или последующих линий лечения РЖ.

Клинически ВЭБ-положительные опухоли в большинстве случаев характеризуются диффузным гистологическим типом по Лаурен, в 2–4 раза чаще встречаются у мужчин (79–81 %) и в два раза чаще поражают кардиальный отдел и тело желудка (62 %) [63]. Средний возраст манифестации ВЭБ<sup>+</sup> РЖ – 53 года, что значительно ниже возрастных показателей при других подтипах РЖ [64, 65]. Кроме того, ВЭБ<sup>+</sup> РЖ отличается наиболее благоприятным прогнозом, меньшим количеством пораженных лимфоузлов и лучшими показателями пятилетней выживаемости [65, 66].

#### 1.4.2 Микросателлитно нестабильный подтип

По различным данным, МСН диагностируется в 10–37 % случаев опухолей желудка [67–69]. ЗНО этого подтипа характеризуются многочисленными геномными нарушениями, которые возникают в результате дефекта системы репарации неспаренных оснований ДНК (Mismatch Repair system, MMR). Система MMR состоит из ряда ферментов восстановления несоответствия нуклеотидной последовательности ДНК, кодируемых генами *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2*, *PMS1* и др. В процессе репарации гетеродимерные комплексы MSH2/MSH6 и MSH2/MSH3 обнаруживают и связывают ошибки несоответствия последовательности ДНК, после чего гетеродимеры MLH1/PMS2 удаляют и повторно синтезируют скорректированные основания в сайтах несоответствия. Потеря экспрессии или дефект одного или нескольких элементов MMR приводят к дефициту комплекса (dMMR) и неудачной репарации ДНК [70].

Большинство опухолей желудка с МСН имеют спорадический характер [71, 72], около 15 % случаев развиваются в составе синдрома Линча в результате герминальных мутаций в генах MMR (чаще – в генах *MLH1* и *MSH2*) [73, 74]. В случае спорадического рака в качестве основного механизма возникновения МСН рассматривается сайленсинг гена *MLH1* в результате гиперметилирования его промотора [75]. Опухоли с МСН имеют гипермутированный фенотип с предполагаемой частотой мутаций 31,6 на Мб (в микросателлитно стабильных опухолях – 3,3 мутаций/Мб) с высокими частотой несинонимичных замен, инсерций и делеций со сдвигом рамки считывания и мутациями, приводящими к нарушению сайта сплайсинга [76]. В ходе исследования TCGA выявлено 37 наиболее часто мутирующих генов, участвующих в

регуляции клеточного цикла (*TP53*, *IGF1R*, *TCF4*), поддержании целостности ДНК (*MSH6*, *MSH3*, *MED1*, *RAD50*, *BLM*, *ATR* и *MRE11*), ремоделировании хроматина, апоптозе (*RIZ*, *BAX*, *CASPASE5*, *FAS*, *BCL10* и *APAF1*), регуляции транскрипции и сигнальных систем клетки [7].

G. Corso et al. описали мутации в генах *EGFR* в 47,6 % случаев (48 % – делеции в полиА-повторе 3'-UTR и отсутствие мутаций в «горячих» точках), *KRAS* – в 14,9 %, *PIK3CA* – в 14,3 % и *MLK3* – в 3,2 % [77]. Так же, как и при ВЭБ<sup>+</sup> РЖ, была отмечена высокая частота нарушений в гене *ARID1A* (83 %), 55 % опухолей с МСН содержали мутации в гене *RNF43*, негативном регуляторе Wnt-пути [78]. Также описаны наличие соматических мутаций (22 %) или потеря экспрессии (35–54 %) генов *AGO2* и *TNRC6A*, ответственных за процессинг микроРНК [78, 79], и повышенная экспрессия генов митотической сети, среди которых мишени активации *AURKA* *A/B*, *E2F*, *FOXM1*, *PLK1* и *MYC* [7]. Кроме того, детектированы частые нарушения генов главного комплекса гистосовместимости, включая *B2M* и *HLA-B*, приводящие к потере экспрессии комплекса HLA класса I и «ускользанию» от иммунного ответа [80]. МСН фенотип ассоциирован с лучшим прогнозом при различных типах опухолей и описан в предраковых поражениях желудка, идентифицируя МСН как раннее событие в канцерогенезе РЖ [81, 82].

Несмотря на то, что в одном опухолевом конгломерате могут сосуществовать МСН и микросателлитно стабильные клеточные популяции, dMMR может сопровождать весь процесс прогрессирования как первичной опухоли, так и метастатических очагов [83, 84]. Накопление соматических мутаций способствует образованию неоантигенов, способных вызывать иммунный ответ, что делает опухоли с МСН чувствительными к терапии ингибиторами иммунных контрольных точек. Так, в исследовании CLASSIC у пациентов с МСН II–III стадии РЖ, при применении в адьювантном режиме комбинации капецитабина с химиотерапией на основе оксалиплатина, отличий в показателях выживаемости без прогрессирования не наблюдалось [85]. Напротив, результаты рандомизированных исследований KEYNOTE-059, KEYNOTE-061, KEYNOTE-062 показали улучшение выживаемости при применении пембролизумаба в монорежиме и в комбинации с химиотерапией. Таким образом, МСН может служить биомаркером ответа на лечение пембролизумабом у пациентов с распространенным РЖ независимо от линии терапии [45].

Клинически МСН РЖ связан с женским полом, пожилым возрастом (средний возраст манифестации рака – 60 лет) и дистальным расположением рака. Кроме того, отмечены преобладание кишечного гистотипа (кишечный тип – 10,7 %, диффузный тип – 2,9 %, смешанный тип – 0,9 %) и более ранняя стадия диагностики рака вследствие низкой локальной инвазии и меньшего поражения лимфатических узлов [86, 87]. В большинстве случаев МСН РЖ ассоциирован с лучшим прогнозом и наиболее низкой частотой рецидивирования РЖ (22 %) в сравнении с другими подтипами РЖ [7, 88].

### 1.4.3 Хромосомно нестабильный подтип

Частота хромосомно нестабильного (ХН) подтипа составляет примерно 50 % всех случаев РЖ и отличает этот подтип выраженной анеуплоидией, потерей гетерозиготности, делецией и амплификацией ряда генов [89].

Нарушение в гене фактора роста эндотелия сосудов *VEGFA* (Vascular endothelial growth factor A), медиатора опухолевого ангиогенеза [90], коррелирует с лучшим прогнозом РЖ и используется в качестве маркера для лечения антителом к *VEGFR2* рамуцирумабом [91].

Амплификация *FGFR2* (Fibroblast growth factor receptor 2) диагностирована в 4–10 % случаев и связана с повышенной пролиферацией, выживаемостью опухоли, а также плохим прогнозом у пациентов с операбельными опухолями и чувствительностью к ингибиторам FGFR [91, 92].

По данным различных исследований, амплификация гена *ERBB2* и иммуногистохимическая гиперэкспрессия белка HER2neu была выявлена в 4–24 % опухолей желудка. В ходе мета-анализа данных 41 исследования гиперэкспрессия HER2neu являлась фактором плохого прогноза при РЖ. На сегодняшний день описанные абберации используются в качестве маркеров стратификации пациентов для терапии РЖ анти-HER2 препаратом трастузумаб [93]. Кроме того, отмечено улучшение показателей выживаемости больных распространенным РЖ при применении перорального ингибитора HER2 тукатиниба, который сенсibiliзирует клетки РЖ, устойчивые к трастузумабу [94].

Также в ХН подтипе было выявлено значительное повышение уровня фосфорилирования *EGFR* (pY1068), что соответствовало амплификации EGFR [7]. Амплификация гена *KRAS* обнаружена примерно в 10 % ХН опухолей желудка и, по-видимому, является взаимоисключающей с амплификацией других рецепторных тирозинкиназ [95]. Мутации в генах *VEGFA*, *EGFR*, *ERBB2*, *ERBB3*, *c-Met*, *FGFR2* были выявлены в 37 % опухолей [89, 96]. В целом, амплификация рецепторных тирозинкиназ показала себя как предиктор плохого прогноза [97]. На сегодняшний день несколько ингибиторов, нацеленных на компоненты RTK/RAS сигнального пути, проходят клинические испытания, что может улучшить эффективность проводимого лечения в этой группе пациентов.

Кроме того, ХН РЖ отличается высокой частотой соматических мутаций антионкогена *TP53* как при кишечном, так и при диффузном типе – до 71 % [7]. Дополнительно отмечено увеличение числа копий генов-медиаторов клеточного цикла *CCNE1*, *CCND1* и *CDK6* [38, 87]. Амплификация генов *CCNE1* (циклин E1) и *CCND1* (циклин D1) наблюдалась в 15 и 10 % ХН опухолей соответственно и была ассоциирована с метастатическим поражением лимфоузлов [89]. Ген *CDK6*, кодирующий циклинзависимую киназу 6, также был амплифицирован

примерно в 15 % опухолей [98]. Паттерн совместного возникновения амплификации *CCNE1* и *ERBB2* был связан с резистентностью к анти-HER2-терапии при некоторых видах рака, что может частично объяснить умеренную эффективность HER2-направленной терапии при РЖ [99, 100].

В ХН опухолях диагностированы редкие слияния генов, такие как *AGTRAP-BRAF*, *ERBB2-CDK12*, *ERBB2-NEUROD2*, *SLC34A2-ROSI*, *SNX2-PRDM6* и *MLL3-PRKAG2* [100]. Клиническое значение данных нарушений в контексте таргетной терапии предстоит выяснить.

Клинически около 50 % случаев ХН РЖ характеризуются интестинальным гистотипом с кардиальной/кардиоэзофагальной локализацией и относительно благоприятным прогнозом [7]. В отличие от других подтипов РЖ, применение адъювантной химиотерапии при ХН РЖ показало увеличение трехлетней безрецидивной выживаемости пациентов, прошедших лекарственное лечение, в сравнении с его отсутствием – 58,7 к 33,5 % [65].

#### 1.4.4 Геномно стабильный подтип

Геномно стабильный подтип (ГС) отличается от ХН РЖ низкой степенью анеуплоидии и частотой мутаций в гене *TP53* – до 15–20 % аденокарцином желудка. В 37 % ГС РЖ были выявлены инактивирующие мутации гена-супрессора опухоли *CDH1*, который кодирует молекулу межклеточной адгезии Е-кадгерин. Нарушение молекулы Е-кадгерина приводит к высокому инвазивному и метастатическому потенциалу раковых клеток, объясняя худший прогноз и низкую общую выживаемость [7]. Ген *RHOA* (Ras homolog family member A), участвующей в контроле актин-миозинзависимой клеточной сократимости, клеточной подвижности, активации STAT3 и стимуляции онкогенеза, был мутирован в 15 % опухолей [7, 101]. Нарушения в гене *RHOA*, так же, как и в гене *CDH1*, были ассоциированы с разрозненной моделью роста клеток и отсутствием межклеточной адгезии. Эти нарушения являются отличительной особенностью диффузного рака, наиболее часто наблюдаемого при ГС РЖ. Таким образом, до 73 % РЖ диффузного типа можно отнести к ГС подтипу [55]. Кроме точечных мутаций, в ГС РЖ выявлено 170 различных структурных перестроек. Так, слияние генов *CLDN18-ARHGAP* выявлено в 62 % ГС РЖ. Межхромосомное слияние генов *CLDN18*, компонента адгезионных структур плотного соединения, и *ARHGAP26*, звена Rho-эффекторного пути [102], является взаимоисключающим с мутацией гена *RHOA* и играет роль негативного регулятора, вызывая нарушение клеточной адгезии [43]. Также в образцах ГС РЖ отмечена активация *miR-21*, приводящая к подавлению экспрессии генов-мишеней, быстрой пролиферации, инвазии и метастатизированию рака [103, 104].

Средний возраст манифестации ГС РЖ составляет 52 года. Чаще этот подтип ассоциирован с диффузной моделью роста, поражением всех отделов желудка в равном соотношении и наихудшим прогнозом [7]. Применение адъювантной химиотерапии при ГС подтипе РЖ не влияло на прогноз [65].

На основе молекулярных характеристик РЖ разрабатываются различные прогностические модели течения заболевания и риска возникновения рецидива. Кроме того, эта классификация может служить основой для стратификации пациентов с целью индивидуализации лечения в будущем [65]. На данный момент не существует унифицированной методики идентификации ХН и ГС подтипов РЖ, в то время как исследование МСН и определение ВЭБ повсеместно применяются в рутинной практике и имеют большее клиническое значение.

#### **1.4.5 Молекулярные маркеры рака желудка, применяемые в современной клинической практике**

Согласно 5-му изданию Классификации опухолей пищеварительной системы Всемирной организации здравоохранения (2019), основные категории молекулярных биомаркеров ЗНО включают: диагностические, прогностические и предиктивные биомаркеры. Диагностические биомаркеры несут вспомогательную функцию при установлении конкретного диагноза; предиктивные маркеры указывают на вероятность эффективности применения специфической терапии; прогностические маркеры определяют исход при отсутствии специфического лечения. Предиктивные биомаркеры кластеризованы на две категории: при наличии рандомизированных клинических испытаний или когортных исследований, подтверждающих их эффективность, считаются маркерами с установленным прогностическим значением; при отсутствии подобных исследований эти маркеры относят к потенциально прогностическим. В случае, если маркер еще не изучен при каком-либо клиническом испытании, предложено обозначать его как «доклинический прогностический биомаркер». Прогностические биомаркеры характеризуются как специфические прогностические маркеры для определенного объекта и маркеры, используемые для создания групп стратификации риска. Биомаркеры, не попадающие ни в одну из этих категорий, рекомендовано относить к «другим». Некоторые биомаркеры могут соответствовать критериям более чем одной категории [105].

Для оценки риска прогрессирования при эпителиальной дисплазии слизистой желудка ВОЗ рассматривает биомаркеры, которые сегодня редко используются в повседневной практике: структурные аномалии ДНК (анеуплоидия или повышенная фракция 4N);

аберрантный p53/ мутации гена *TP53*; мутации в генах *RNF43*, *APC*, *ARID1A*, *ARID2* и инактивация гена *MLH1* промоторным метилированием p16 (с последующей MCH).

Согласно ВОЗ, основными маркерами, применяемыми при опухолях желудка, стали гиперэкспрессия *ERBB2* и/или амплификация *ERBB2* для определения чувствительности к таргетной терапии трастузумабом, мутации в генах *TP53* и *RBI* для проведения дифференциальной диагностики. Также в качестве прогностических маркеров ограниченно применяются гиперэкспрессия *EGFR* и с-MET, статус MCH, исследование ВЭБ, гиперэкспрессия *VEGFR/ TGFa*, *VEGFA* и *CD44*, снижение экспрессии Е-кадгерина, экспрессия *MMP-1*, *MMP7* и *MMP10* и гиперэкспрессия *PCDH9* и др. [105] Категоризация молекулярных биомаркеров при эпителиальной дисплазии и РЖ на основе классификации эпителиальных опухолей пищеварительного тракта (ВОЗ, 2019) представлена в таблице 1.

**Таблица 1** – Категоризация молекулярных биомаркеров при эпителиальной дисплазии и раке желудка на основе классификации эпителиальных опухолей пищеварительного тракта Всемирной организации здравоохранения (2019)

Тип маркера	Категория маркера	Субкатегория маркера	Биомаркер
Преинвазивные маркеры дисплазии желудка	Предиктивные	Рекомендованные	–
		Потенциальные	–
		Доклинические	–
	Прогностические	Специфические	–
		Стратифицирующие риск	DNA CAb p53/ <i>TP53</i> <i>RNF43</i> p16 <i>APC</i> <i>ARID1A</i> <i>ARID2</i> MCH
Инвазивные молекулярные биомаркеры при аденокарциноме желудка	Предиктивные	Рекомендованные	<i>ERBB2</i>
		Потенциальные	MCH PD-L1
		Преคลินิกические	–

Тип маркера	Категория маркера	Субкатегория маркера	Биомаркер
	Прогностические	Специфические	EGFR с-MET ERBB2 MCH EBV EGF/TGF-а VEGF-A CD44 Е-кадгерин MMP1 MMP7 MMP10 SPC18 PCDH B9
		Стратифицирующие риск	–

На сегодняшний день, согласно рекомендациям Национальной комплексной онкологической сети (National Comprehensive Cancer Network, NCCN) и Американского общества клинической онкологии (American Society of Clinical Oncology, ASCO), при аденокарциноме желудка и недифференцированной карциноме желудка гиперэкспрессия ERBB2 и/ или амплификация *ERBB2* используется в качестве прогностического и предиктивного молекулярного биомаркера с установленной прогностической ценностью ответа на терапию трастузумабом [106, 107]. Пембролизумаб/ниволумаб назначаются при MCH (методы ПЦР, NGS) и дефиците MMR (метод ИГХ), экспрессии PD-L1 (метод ИГХ) и высокой мутационной нагрузке (метод NGS) [108]. Эксперты NCCN также предлагают рассматривать транслокацию генов *NTRK1/2/3* в качестве предиктивного маркера для применения некоторых ингибиторов тирозинкиназ, при выявлении химерного гена *RET* рекомендовано применение селперкатиниба. Дабрафениб/траметиниб одобрены для лечения опухолей с мутацией V600E в гене *BRAF* [46, 109].

В ситуации, когда для молекулярного исследования доступно ограниченное количество биоматериала опухоли, с целью поиска молекулярной мишени в опухолевой ткани NCCN рекомендует применение комплексного геномного профилирования с помощью NGS-панелей [109]. Также, при отсутствии возможности биопсии у пациентов с продвинутыми стадиями РЖ, для мониторинга прогрессирования заболевания и коррекции лечения NCCN предлагается применение комплексного геномного профилирования на основе NGS для оценки соматических aberrаций путем исследования структуры циркулирующей в крови опухолевой ДНК (цодНК).

Проведение комплексного геномного профилирования рекомендовано в лабораториях, аккредитованных согласно поправкам к закону по совершенствованию клинических лабораторий (Clinical Laboratory Improvement Amendments, CLIA) [109, 110]. За рубежом подобное тестирование имеет широкий спрос, в то время как в России применение таких панелей в большинстве случаев ограничено поисковыми научными исследованиями и проводится в узкоспециализированных генетических лабораториях.

В России молекулярно-генетическая диагностика при РЖ рассматривается как дополнительный метод обследования с уровнем убедительности «С» (уровень достоверности доказательств – 5) и исключительно на распространенных стадиях. Так, согласно клиническим рекомендациям по раку желудка от 2022 г., при местно распространенном неоперабельном или диссеминированном РЖ рекомендовано выполнение молекулярно-генетической диагностики операционного или биопсийного материала на наличие следующих маркеров [111]:

– исследование статуса HER2/neu методом ИГХ или FISH с целью определения показаний к лечению трастузумабом;

– выявление MSH с применением полимеразной цепной реакции (ПЦР) или dMMR методом иммуногистохимического исследования (ИГХ) с целью установления показаний к лечению с применением иммунотерапии;

– определение экспрессии белка PD-L1 методом ИГХ с целью определения показаний к назначению ингибиторов рецепторов PD-1.

Ограниченное применение методов молекулярно-генетического тестирования определяет необходимость поиска и внедрения новых молекулярных маркеров с целью индивидуализации лечения, увеличения выживаемости и качества жизни больных РЖ.

### 1.5 Наследственный рак желудка

Как известно, до 10 % больных РЖ сообщают об отягощенном семейном анамнезе. Истинно наследственную форму заболевания удастся установить в 1–3 % случаев [12]. На сегодняшний день выделяют три формы наследственного РЖ, среди которых [13]:

– наследственный диффузный РЖ (hereditary diffuse gastric cancer; HDGC), ассоциированный с герминальными мутациями в генах *CDH1* и *CTNNA1*;

– аденокарцинома желудка с проксимальным полипозом (gastric adenocarcinoma and proximal polyposis of the stomach, GAPPs), связанный с герминальными мутациями в гене *APC*;

– семейный РЖ кишечного типа (familial intestinal gastric cancer, FIGC).

Также описаны другие НОС, ассоциированные с высоким риском развития РЖ: синдром наследственного рака молочной железы и яичников (гены *BRCA1/2*), семейный аденоматозный

полипоз (ген *APC*), *MUH*-ассоциированный полипоз (ген *MUTYH*), ювенильный аденоматозный полипоз (гены *SMAD4* и *BMPRIA*), синдром Пейца – Егерса (ген *STK11*), *TP53*-ассоциированный опухолевый синдром (ген *TP53*) и некоторые другие.

### 1.5.1 Наследственный диффузный рак желудка

Синдром наследственного диффузного РЖ (НДРЖ; OMIM#137215, GASTRIC CANCER, HEREDITARY DIFFUSE; HDGC) на сегодняшний день является наиболее изученным НОС, который обуславливает высокий риск развития диффузного рака желудка (ДРЖ) у обоих полов и долькового рака молочной железы (РМЖ) у женщин. НДРЖ характеризуется аутосомно-доминантным типом наследования и высокой пенетрантностью. Впервые НДРЖ был описан в семье народности маори из Новой Зеландии в 1998 г., в настоящее время частота заболеваемости во всем мире оценивается как 5–10 на 100 000 новорожденных. В большинстве случаев причиной НДРЖ является носительство герминальной мутации в гене-онкосупрессоре *CDH1*, который кодирует трансмембранный белок Е-кадгерин, относящийся к кальций-зависимым кадгеринам [112]. Реже встречаются мутации во втором белке межклеточной адгезии,  $\alpha$ -катенине (ген *CTNNA1*) [113].

Ген *CDH1* включает 16 экзонов. Кодированные области *CDH1* состоят из сигнальных пептидов кадгерин-*PRE* и кадгерин-*PRO*, пяти кальцийсвязывающих внеклеточных повторяющихся доменов кадгерина (домены 1–5*EC*) и внутриклеточной цитоплазматической области *CDH1* (включая области связывания с p120- и  $\beta$ -катенином). Цитоплазматический домен Е-кадгерина образует белковый комплекс с  $\beta$ -, p120- и  $\alpha$ -катенинами, который связывает эту молекулу адгезии с актин-миозиновой сетью, координируя форму, полярность клеток в эпителии. Кроме того, посредством активации сигнальных путей и экспрессии генов, Е-кадгерин участвует в поддержании стабильности клеточной структуры, межклеточной адгезии, тканевой дифференцировки, пролиферации, выживаемости и миграция клеток [114]. Изменения экспрессии Е-кадгерина или структурные модификации гена *CDH1* являются пусковым механизмом эпителиально-мезенхимального перехода и прогрессирования рака [115].

Описанные на сегодняшний день клинически значимые мутации в гене *CDH1* затрагивают все функциональные домены гена, однако в некоторых публикациях описаны так называемые «горячие точки» – единичные повторяющиеся в четырех и более семьях патогенные варианты с.1003C>T, с.1212delC, с.1792C>T, с.2398delC с.1008G>T, с.1137G>A и с.1679C>G [116]. Всего в гене *CDH1* зарегистрирован 321 клинически значимый вариант: 249 патогенных, 72 – вероятно патогенных. Наибольшее количество из них представлено мутациями со сдвигом рамки считывания (128), нонсенс-мутациями (73), реже вариантами в

сайте сплайсинга (19), миссенс-мутациями (14), синонимичными заменами (7), вариантами с потерей старта (5), инсерционно-делеционными нарушениями (1). Кроме того, описаны мутации вне кодирующих экзонов (2), большие делеции от 357 пар оснований до 175 килобаз (включая экзоны) встречались редко и составляют 4 % [117]. Интересно, что наиболее частым событием биаллельной инактивации в опухолях НДРЖ является гиперметилирование второго аллеля гена *CDH1*, тогда как вторая мутация или делеция, по-видимому, встречаются реже [118].

Клинический фенотип НДРЖ демонстрирует значительную гетерогенность. По различным данным, нарушение экспрессии белка E-кадгерина в результате мутации гена *CDH1* приводит к 40–70 и 56–83 % риску развития НДЖР для мужчин и женщин в возрасте до 80 лет [112]. Средний возраст манифестации заболевания составляет около 38 лет, однако в пределах одной семьи может варьировать [119]. При гистологическом исследовании у бессимптомных носителей мутации в гене *CDH1* в большинстве случаев выявляются множественные микроскопические очаги внутрислизистой (pT1a) перстневидноклеточной карциномы *in situ* с педжетоидным распространением. Ранний рак демонстрирует отсутствие иммуноэкспрессии Ki-67 и p53. Распространенный НДРЖ имеет плохой прогноз и представлен инвазивной карциномой низкокогезивного/диффузного типа, обычно с малым количеством типичных перстневидных клеток. Распространенные карциномы (pT > 1) проявляют «агрессивный» фенотип по типу «linitis plastica» с плеоморфными клетками, которые иммунореактивны к Ki-67 и p53 [120]. Кроме риска развития РЖ, у женщин также значительно повышен риск формирования долькового РМЖ, который достигает 42 % в течение жизни. Совокупный риск ДРЖ и РМЖ для женщин составляет до 90 % к 80-ти годам [121] Также описаны случаи *CDH1*-ассоциированного рака толстой кишки, однако величина риска ЗНО данной локализации на сегодняшний день не определена.

Согласно рекомендациям Международного консорциума по раку желудка (International Gastric Cancer Linkage Consortium, IGCLC), проведение профилактической гастрэктомии в возрасте 20–30 лет остается основным методом первичной профилактики НДРЖ у носителей патогенных герминальных мутаций в гене *CDH1* [122]. Учитывая неполную пенетрантность и значительную клиническую гетерогенность заболевания, гастрэктомия носит рекомендательный характер и остается предметом дискуссий. В связи с широким диапазоном возраста манифестации НДРЖ (описаны случаи НДРЖ в 14 и 85 лет) было предположено, что на развитие определенного фенотипа кроме типа мутации может влиять локализация нарушения [123]. Для определения фено-генотипических ассоциаций Lo W. et al. использовали программный инструмент I-TASSER, который позволяет визуализировать модель структуры белка при возникновении «усекающих» мутаций, приводящих к укорочению синтезируемого белка (truncating mutations) в известных функциональных доменах гена *CDH1*. Так, некоторые

варианты в кадгерине-PRO приводят к укороченному белку с потерей всех ключевых доменов за пределами положения мутации, тогда как при мутации в домене IC белок способен интегрироваться в клеточную мембрану и связываться с p120, но будет лишен возможности связывания с  $\beta$ -катенином. Это объясняет влияние транкирующих вариантов в гене *CDHI* на возникновение разных клинических фенотипов. Также Lo W. et al. провели систематический анализ и проследили фено-генотипические корреляции у 152 пациентов с мутацией в гене *CDHI*. Авторы отметили, что в семьях с «укорачивающими» вариантами в C-концевых доменах EC3/4/5 ДРЖ и РМЖ манифестировали после 40 и 50 лет соответственно. РМЖ чаще регистрировали при вариантах, оказывающих влияние на домены EC3/4/5 и регионы PRE- и PRO-. Колоректальный рак чаще был ассоциирован с вариантами в PRE- и PRO-доменах [116].

Накопление клинической информации привело к пересмотру критериев Международного консорциума по раку ICCLC от 2015 г. по отбору лиц, нуждающихся в исследовании мутаций гена *CDHI*. Например, в работе Jacobs M. F. et al. у 7 из 20 носителей мутации в гене *CDHI* семейный анамнез не был отягощен и они не соответствовали существующим критериям [124]. Также Lowstuter K. et al. выполнили исследование 26 936 образцов крови пациентов, из которых у 16 (0,06%) выявили наличие патогенных мутаций в гене *CDHI*. Среди носителей мутации в гене *CDHI* у 21 % (n = 4) наблюдался инвазивно-протоковый РМЖ, у 5 % (n = 1) – сочетание инвазивного протокового рака и дольковой карциномы и у 5 % (n = 1) – рак толстой кишки. В целом, 65 % обследованных также не соответствовали критериям тестирования ICCLC [125]. Основным отличием критериев ICCLC, опубликованных в 2020 г., стало повышение возраста пациентов с ДРЖ, подлежащих тестированию на наличие мутаций в гене *CDHI*, с 40 до 50 лет. Также возраст тестирования женщин при дольковом РМЖ был увеличен до 70 лет. Таким образом, на сегодняшний день исследование кодирующей части гена *CDHI* рекомендовано в случае гистологически подтвержденного ДРЖ и соблюдении одного из следующих критериев [126]:

#### **Семейные анамнез:**

- два и более случаев РЖ у родственников I–II степени родства независимо от возраста возникновения рака, по крайней мере с одним гистологически подтвержденным ДРЖ;
- один и более случаев ДРЖ в любом возрасте и один и более случаев долькового РМЖ в возрасте моложе 70 лет у разных членов семьи;
- два и более случаев долькового РМЖ у членов семьи моложе 50 лет;

#### **Индивидуальные критерии:**

- ДРЖ в возрасте моложе 50 лет;
- ДРЖ в любом возрасте у лиц этнической принадлежности к маори;

- ДРЖ в любом возрасте у лиц с личным или семейным случаем расщелины губы или неба;
- сочетание ДРЖ и долькового РМЖ в возрасте моложе 70 лет;
- двусторонний дольковый РМЖ, диагностированный в возрасте моложе 70 лет;
- выявление перстневидных клеток *in situ* или педжетоидное распространение перстневидных клеток в слизистой оболочке желудка у лиц моложе 50 лет.

Лицам, отвечающим критериям генетического тестирования, поиск мутации в гене *CDH1* следует проводить начиная с 18 лет. Тестирование лиц, не достигших 18 лет, может быть рассмотрено на консультации клинического генетика с учетом семейного анамнеза. В случае отсутствия мутаций в гене *CDH1* у лиц, соответствующих критериям генетического тестирования, рекомендован анализ гена *CTNNA1* [126].

Как было упомянуто ранее, выявление носительства патогенного варианта в гене *CDH1* в некоторых странах является показанием для выполнения профилактической гастрэктомии. Отказ или невозможность проведения гастрэктомии предполагает эндоскопическое обследование желудка с периодичностью один раз в 12 месяцев с множественной (28–30) биопсией: 5 – кардии, 5 – дна, 10 – тела, 5 – переходных зон и 5 – антральных отделов. Начало скрининга рекомендовано с 18 лет или за 10 лет до возраста манифестации ДРЖ у самого молодого заболевшего члена семьи [126]. Успех обнаружения очагов ДРЖ напрямую зависит от эндоскопического оборудования, опыта врача эндоскописта и патологоморфолога. Ранее сообщалось, что частота диагностики РЖ при эндоскопии у носителей мутации в гене *CDH1* составляет около 9–16 %, в то время как более новые исследования демонстрируют 40–61 % - ную эффективность [124, 127].

Клиническое обследование молочных желез у женщин рекомендовано с 30 лет и должно включать осмотр онколога-маммолога, МРТ молочных желез с контрастированием. Маммографию необходимо проводить с 40 лет, однако при наличии клинических показаний маммографическое исследование допустимо с 35 лет. Ультразвуковое исследование является дополнительным методом диагностики и может быть использовано изолированно в случае недоступности других методов инструментальной диагностики [126].

### 1.5.2 Аденокарцинома желудка с проксимальным полипозом

Полипы фундальных желез чаще всего возникают спорадически, встречаются в небольшом количестве, обычно имеют небольшой размер (менее 5 мм), связаны с хронической терапией ингибиторами протонной помпы и часто несут соматические мутации в гене *CTNNB1* (β-катенин) [128, 129]. Спорадические полипы редко имеют дисплазию и не связаны с

повышенным риском развития рака. Такие полипы чаще встречаются у женщин и у пробандов в возрасте от 40 до 50 лет [130–132].

Аденокарцинома желудка с проксимальным полипозом (Gastric adenocarcinoma and proximal polyposis of the stomach, GAPPS) – недавно описанный редкий синдром полипоза желудка, характеризующийся аутосомно-доминантным типом наследования с неполной пенетрантностью и значительной предрасположенностью к развитию аденокарциномы желудка. Он отличается обширным поражением дна и тела желудка полипами, исходящими из фундальных желез, которые не затрагивают антральный отдел и малую кривизну. В связи с недавним открытием мутаций IV промотора гена *APC*, GAPPS был добавлен к молекулярному классу *APC*-ассоциированных заболеваний.

Впервые в 2012 году Worthley D. L. et al. сообщили о трех семьях из США и Канады с клинико-патологическими особенностями нового синдрома полипоза желудка, названного GAPPS [133]. Члены описанных семей имели менее 100 полипов, покрывающих дно и тело желудка (без поражения антрального отдела и малой кривизны), и множественные случаи аденокарциномы желудка кишечного типа, возникающие в областях полипоза с высокой степенью дисплазии. Позднее исследователи из Японии описали еще две семьи со схожим фенотипом [134]. В результате генетического тестирования известных генов, ассоциированных с полипозом желудочно-кишечного тракта и предрасположенности к РЖ, нарушений выявлено не было.

Молекулярная причина GAPPS была впервые обнаружена исследователями из Квинслендского института медицинских исследований (Аделаида, Австралия). Потеря гетерозиготности исследовалась с помощью анализа групп сцепления между генными локусами (linkage analysis) последовательности из 46 Мб хромосомы 5, а затем прямого секвенирования интересующего участка из 12 Кб. В промоторе IV гена *APC* были обнаружены варианты с.-195A>C и с.-125delA, которые ко-сегрегировали с фенотипом множества пораженных индивидов из большой австралийской семьи [135]. Далее были описаны варианты с.-191T>C, с.-192A>C в трех семьях с GAPPS-фенотипом. Данные варианты IV промотора гена *APC* впоследствии идентифицированы как «горячие» точки, т. к. были обнаружены в других семьях с GAPPS [136–138]. Как выяснено, идентифицированные точечные мутации в промоторе IV гена *APC* значительно снижают связывание фактора транскрипции Yin Yang 1 (YY1) в клетке РЖ и толстой кишки [135]. Транскрипция гена *APC*, управляемая промотором IV, примерно в 15 раз выше, чем промотора IA, который почти повсеместно метилирован при РЖ и в невовлеченной слизистой оболочке желудка [139, 140]. Таким образом, снижение активности промотора IV из-за потери энхансерной функции YY1 приводит к избирательному опухолевому супрессивному фенотипу в желудке, который не встречается в толстой кишке. Транскрипция

гена *APC* в толстой кишке, управляемая интактным IA, сохраняется и способна компенсировать потерю функции промотора IB. Это объясняет, почему точечные мутации IB промотора *APC* не связаны с фенотипом семейного аденоматозного полипоза или аттенуированного семейного аденоматозного полипоза толстой кишки. Структурные варианты, по-разному влияющие на функцию IA и IB промотора гена *APC*, следовательно, могут формировать основу для уникальных фенотипических признаков при *APC*-ассоциированных нарушениях, дополняя описанные для семейного аденоматозного полипоза генотип-фенотипические ассоциации [135].

Полипы фундальных желез являются одним из сигнальных признаков фенотипа GAPPS. Существует несколько фенотипических вариаций GAPPS, в первую очередь в зависимости от возраста возникновения полипов, пенетрантности или степени дисплазии. Наиболее частой и самой ранней гистопатологической аномалией при GAPPS обычно является наличие гиперпролиферативных аберрантных ямок (HPAs) размерами от 3 до 12 мм [141]. Полиповидные поражения обусловлены неорганизованной гиперпролиферацией желез слизистой оболочки желудка вокруг аберрантных ямок. Сопутствующие неопластические элементы в виде полипов фундальных желез с мультифокальной «плоской» дисплазией, аденоматозом желудка могут быть использованы для отбора пациентов для выполнения гастрэктомии. Возраст манифестации заболевания, по данным различных источников, колеблется от 23 до 75 лет, различия по половому признаку не прослежены. Риск развития РЖ у носителей мутации IB промотора гена *APC* в течение жизни характеризуется как высокий, у 13 % пациентов со специфической клинической картиной удается выявить мутации промотора *APC*. На сегодняшний день предложен ряд эндоскопических и патологических критериев для диагностики GAPPS, которые включили [133]:

- 1) полипы тела и дна желудка без признаков полипоза толстой и/или двенадцатиперстной кишки;
- 2) более 100 полипов проксимального отдела желудка у пробанда или более 30 полипов у родственника пробанда I степени родства;
- 3) преимущественное поражение полипами фундальных желез, некоторые из которых с участками дисплазии (либо член семьи с диспластическими полипами фундальных желез или аденокарциномой желудка)
- 4) исключение других наследственных синдромов полипоза желудка (*MUtH*-ассоциированный полипоз, ювенильный полипоз, синдром Пейтца – Егерса, синдром Коудена) и лечение ингибиторами протоновой помпы;
- 5) аутосомно-доминантный тип наследования.

В настоящее время существует большой пробел в точном понимании клинических особенностей течения GAPPS. Длительное эндоскопическое наблюдение за членами семьи не

поддерживается в связи с риском пропустить скрытые участки злокачественной трансформации, быстрой малигнизации и скрытого метастазирования. Гастрэктомия следует рассматривать у всех пациентов с GAPPs. Первостепенное значение для точной гистопатологической диагностики имеет множественная биопсия. Отсутствие полипоза верхних отделов ЖКТ при ЭГДС может облегчить дифференциальную диагностику с другими полипозными синдромами.

### 1.5.3 Семейный рак желудка кишечного типа

Семейный РЖ кишечного типа (familial intestinal gastric cancer, FIGC) – синдром с аутосомно-доминантным типом наследования и высоким риском развития РЖ интестинального типа. Макроскопические и гистопатологические характеристики при FIGC не отличимы от признаков спорадического РЖ кишечного типа. В недавнем исследовании Carvalho J. et al. был проведен анализ клинического фенотипа больных РЖ, соответствующих клиническим критериям для FIGC. Средний возраст постановки диагноза РЖ в исследованной группе составлял 72 года, что примерно на 10 лет раньше, чем у пациентов со спорадическим РЖ кишечного типа [142].

Генетическая причина, лежащая в основе заболевания, еще не выяснена. В голландской семье с накоплением случаев РЖ кишечного типа были обнаружены гетерозиготные мутации в гене *IL12RB1*, связанном с иммунным ответом [143]. Полноэкзомное секвенирование в китайской семье обнаружило мутации зародышевой линии в трех генах, участвующих во внеклеточном сигнальном пути митоген активируемой протеинкиназы, а именно генах *ESR1*, *EZR* и *IGFR2* [144]. В недавнем исследовании у 50 пробандов с семейной агрегацией РЖ кишечного типа и отсутствием клинических критериев принадлежности к другим синдромам, связанным с ЗНО желудочно-кишечного тракта, было выполнено NGS несколько генов, вовлеченных в канцерогенез верхних отделов желудочно-кишечного тракта и синдромов предрасположенности к раку. Ландшафт герминальных и соматических альтераций отличался от спорадического РЖ кишечного типа и РЖ, возникающего в составе наследственного диффузного РЖ. Таким образом, были предложены гены-кандидаты предрасположенности к FIGC, среди которых *SMAD4*, *PMS1*, *PRSS1* и *TP53*. Несмотря на то, что в ходе исследования не выявлена моногенная причина FIGC, полученные данные повысили вероятность развития FIGC по механизму полигенного заболевания. Диагностические критерии для FIGC, предложенные авторами, включают [142]:

- два родственника с РЖ, диагностированным в любом возрасте; или

– подтвержденный гистологически РЖ кишечного типа как минимум у одного родственника.

Рекомендации по ведению пациентов с риском развития FIGC включают регулярное эндоскопическое наблюдение, эрадикацию *H. pylori* и изменение пищевых привычек [145].

#### **1.5.4 Другие наследственные опухолевые синдромы, ассоциированные с повышенным риском развития рака желудка**

Как указано ранее, РЖ может развиваться в составе других наследственных онкологических синдромов, таких как аденоматозный полипозный синдром (ген *APC*), синдром Линча (гены *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2*, *EPCAM*), синдром Пейтца – Егерса (ген *STK11*), синдром ювенильного полипоза (гены *SMAD4*, *BMPRIA*), синдром наследственного рака молочной железы и яичников (гены *BRCA1/2*), *TP53*-ассоциированный синдром (ген *TP53*). Описанные синдромы представляют собой фенотипически разнообразную группу заболеваний преимущественно с аутосомно-доминантным типом наследования и различной степенью пенетрантности. Риск развития РЖ при данных синдромах колеблется от умеренного до высокого. Также случаи РЖ были описаны при НОС с аутосомно-доминантным (синдром Коудена – ген *PTEN*, синдром Блума – гены *BLM*, *RECQL3*) и аутосомно-рецессивным типом наследования (пигментной ксеродерме – гены *DDB2*, *ERCC1*, *ERCC2*, *ERCC3*, *ERCC4*, *ERCC5*, *POLH*, *XPA*, *XPC*, атаксии-телеангиоэктазии – ген *ATM*), однако уровень риска РЖ у носителей данных мутаций не установлен. Оценка семейного и личного анамнеза является ключевым фактором, который позволяет врачу-генетику провести дифференциальную диагностику и подобрать необходимый объем ДНК-тестирования. Основные критерии отбора пациентов для проведения ДНК-диагностики и клинико-генетические характеристики наиболее значимых НОС, ассоциированных с РЖ, суммированы в таблице 2 [146].

**Таблица 2** – Основные критерии отбора пациентов для проведения ДНК-диагностики и клинико-генетические характеристики наиболее значимых наследственных опухолевых синдромов, ассоциированных с раком желудка

НОС	Критерии ДНК-диагностики	Тип наследования	Ген	Кумулятивный риск РЖ, %	Гистологический тип РЖ
АПС	Рекомендации ACG: – не менее 10 колоректальных аденом; – аденомы и другие проявления АПС в анамнезе	АД	<i>APC</i>	4-7 – для азиатов, не повышен в западных странах	Интестинальный тип
СЛ	Амстердамские критерии II: – СЛ-ассоциированный рак у трех или более родственников; и один из двух других является родственником первой степени родства; и – затронуты два или более последовательных поколения; и – СЛ-ассоциированный рак в возрасте моложе 50 лет у одного или нескольких родственников; и – исключение пересмотренных критериев Bethesda: – КРР в возрасте моложе 50 лет – синхронный/метахронный КРР или другой СЛ-ассоциированный рак независимо от возраста; – КРР с МСН в возрасте моложе 60 лет; – КРР у одного или нескольких родственников первой степени родства с СЛ-ассоциированным раком в возрасте моложе 50 лет; – КРР у двух или более родственников I или II степени родства с СЛ-ассоциированным раком независимо от возраста. Универсальный скрининг на все КРР и рак эндометрия	АД	<i>MLH1</i> <i>MSH2</i> <i>MSH6</i> <i>PMS2</i> <i>EPCAM</i>	9 10 7 0 0	В большинстве случаев кишечные (тубулярный/ папиллярный) РЖ. Также были описаны когезивный и муцинозный РЖ.

Продолжение таблицы 2

НОС	Критерии ДНК-диагностики	Тип наследования	Ген	Кумулятивный риск РЖ, %	Гистологический тип РЖ
СПЕ	Критерии ВОЗ: – не менее трех полипов Пейтца – Егерса; – любое количество полипов Пейтца – Егерса с семейным анамнезом СПЕ; – меланоцитарная пигментация слизистых оболочек и семейный анамнез СПЕ; – любое количество полипов Пейтца – Егерса и характерная выраженная пигментация слизистых оболочек/кожи	АД	<i>STK11</i>	29	Интестинальный тип
СЮП	Критерии ВОЗ: – более трех-пяти ювенильных полипов толстой кишки; – ювенильные полипы желудочно-кишечного тракта; – любое количество ювенильных полипов с семейным анамнезом ювенильного полипоза	АД	<i>SMAD4</i> <i>BMPRIA</i>	10–30	Кишечный или диффузный РЖ из ювенильных полипов с дисплазией
СЛФ	Пересмотренные критерии критериев Шомпре: – опухоль из спектра СЛФ в возрасте моложе 46 лет и, по крайней мере, один родственник первой или второй степени с опухолью из СЛФ (за исключением РМЖ, если у пробанда есть РМЖ) в возрасте моложе 56 лет или первично-множественные опухоли; – множественные опухоли (кроме РМЖ), две из которых относились к спектру опухолей СЛФ и первая возникла в возрасте моложе 46 лет; – карцинома надпочечников или опухоль сосудистого сплетения	АД	<i>TP53</i>	2–5	Интестинальный или диффузный типы

Продолжение таблицы 2

НОС	Критерии ДНК-диагностики	Тип наследования	Ген	Кумулятивный риск РЖ, %	Гистологический тип РЖ
СНРМЖ	Необходимость диагностики определяется с помощью инструмента BRCAPRO и подобных, анализа заболеваемости РМЖ и РЯ в личной и семейной истории.	АД	<i>BRCA1</i> <i>BRCA2</i>	2	Интестинальный тип
<i>MUtyH</i> -ассоциированный полипоз	Индивид с аденоматозным полипозом, у которого были исключены АПС и СЛ путем поиска герминальных мутаций в генах <i>APC</i> , <i>MLH1</i> , <i>MSH2</i> , <i>MSH6</i> и <i>PMS2</i> .	АР	<i>MUtyH</i>	2 – женщины, 5 – мужчины	Интестинальный тип

*Примечания:* НОС – наследственный опухолевый синдром, АПС – аденоматозный полипозный синдром, АСГ (American College of Gastroenterology) – Американский колледж гастроэнтерологии, СЛ – синдром Линча, КРР – колоректальный рак, СПЕ – синдром Пейтца – Егерса, СЮП – синдром ювенильного полипоза, СЛФ – синдром Ли – Фраумени (*TP53*-ассоциированный синдром), СНРМЖ – синдром наследственного РМЖ, РЯ – рак яичников.

### **1.5.5 Медико-генетическое консультирование и практическое применение результатов ДНК-диагностики у пациентов с наследственным раком желудка**

Медико-генетическое консультирование (МГК) все больше внедряется в клиническую онкологию и становится необходимым этапом на пути выбора тактики лечения и профилактики ЗНО. Целью МГК является анализ родословной и личного анамнеза пациента для предварительного определения риска наследственной предрасположенности к раку и необходимости проведения ДНК-диагностики. Для формирования верной траектории МГК и последующей дифференциальной диагностики НОС, минимальным является информированность пациента о заболеваниях родственников I–II степени родства. Для эмпирической оценки риска развития вторых первичных опухолей представленная информация должна быть достаточной, без избыточной детализации. Проведение анализа родословной пациента целесообразно на момент постановки диагноза, перед началом лечения. Кроме того, в связи с активным развитием технологий ДНК-тестирования и изменением клинических данных пациента и его родственников, рекомендовано периодическое обновление информации [148].

Разработаны различные вспомогательные интернет-ресурсы для оценки семейной истории [149–151], отбора претендентов для проведения ДНК-диагностики и рекомендации по ведению пациентов с НОС [15, 152–154]. В целом, критерии подозрения на наследственную предрасположенность к злокачественным новообразованиям, также подходящие для первичного отбора больных РЖ, включают [148]:

- ранний возраст манифестации ЗНО;
- множественные случаи ЗНО у родственников по одной линии;
- первично-множественные ЗНО (в особенности поражение одного органа/ парных органов) у одного индивидуума;
- индивидуумы с определенными гистологическими типами рака (диффузный РЖ, тройной негативный РМЖ, медуллярный рак щитовидной железы и др.),
- а также наличие выявленной патогенной мутации у близкого родственника.

На сегодняшний день многочисленные методы ДНК-диагностики доступны для применения в онкологической практике, среди них ПЦР, секвенирование по Сэнгеру, сравнительная геномная гибридизация на чипах (CGH) и др. Однако каждый из таких методов имеет ограниченную разрешающую способность. Перекрываемость фенотипов различных НОС зачастую приводит к длительному последовательного поиску мутаций в единичных генах, ассоциированных с РЖ, что значительно отражается на времени постановки генетического диагноза.

Массовое параллельное секвенирование, или NGS, представляет собой современный метод ДНК-диагностики, который позволяет оценить широкий спектр генетических aberrаций в одном эксперименте. NGS широко применяется с целью поиска герминальных мутаций при различных заболеваниях и способно заменить многочисленные методы ДНК-тестирования, что значительно ускоряет поиск причины заболевания. Кроме того, выявление одного патогенного варианта не исключает носительства мутации в другом НОС-ассоциированном гене, т.е. сочетанное носительство, что необходимо принимать во внимание в случаях расхождения фенотипических проявлений относительно обнаруженного варианта. Исследование с помощью таргентных мультигенных панелей в таких ситуациях является методом выбора, в связи с возможностью одномоментной оценки статуса набора интересующих генов, нарушения в которых специфичны для определенной патологии. Также необходимо иметь в виду, что вариация типов и положения клинически значимых вариантов может варьировать степень пенетрантности того или иного признака. Это может в значительной степени отражаться на разработке тактики скрининга и профилактики для пациента – носителя мутации в гене, связанном с НОС [109, 147]. Таким образом, исследование панели генов в большинстве случаев является наиболее подходящим методом ДНК-диагностики и назначается с учетом клинических данных, семейной и личной истории больного РЖ.

В некоторых случаях для исключения наследственной формы рака исследование с применением таргентной панели генов недостаточно. Так, наличие протяженных делеций и инсерций, затрагивающих большую часть гена/нескольких генов и др., или расположение альтерации в глубоко интронных областях, требует расширения объема ДНК-диагностики до мультиплексной амплификации лигированных зондов (MLPA), полноэкзомного и полногеномного секвенирования и т. д. Эти методы редко применяются в диагностике наследственных форм РЖ, их назначение целесообразно после получения отрицательного результата рекомендованных молекулярных исследований, комплексной оценки фенотипических характеристик и анамнеза больного.

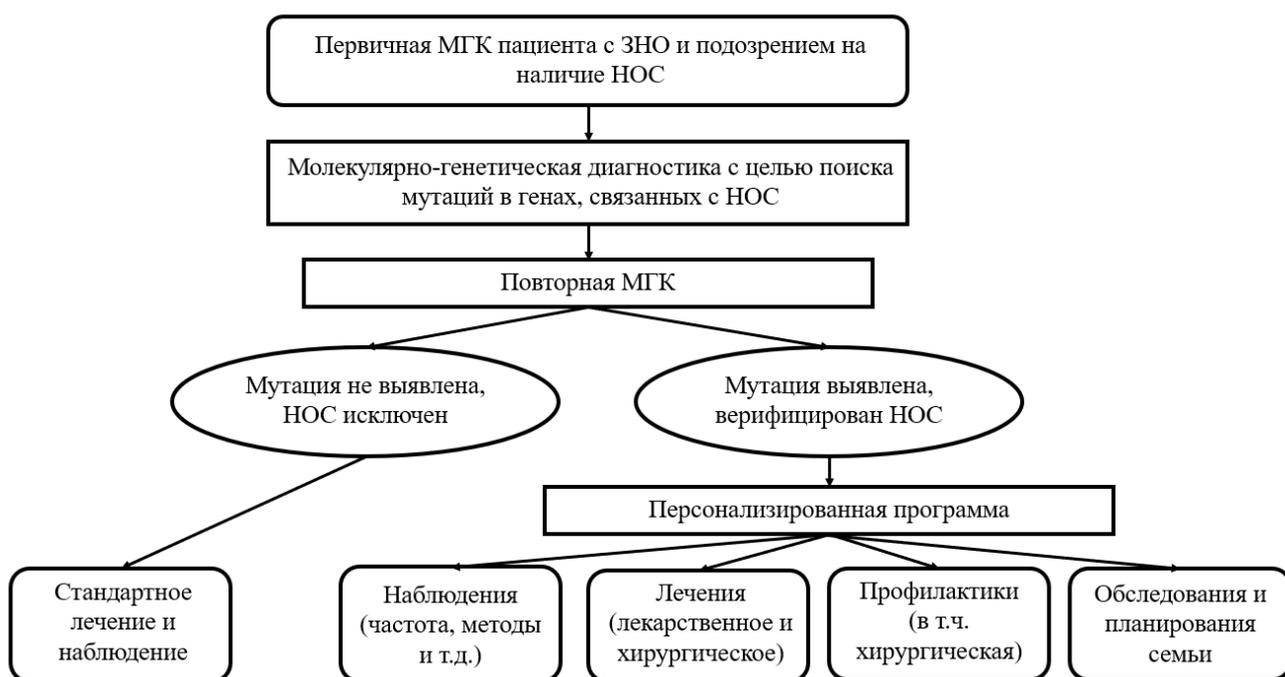
Данные о носительстве герминальной мутации в гене, ассоциированном с развитием НОС, позволяет индивидуализировать тактику лечения РЖ, составить персонализированный план профилактических мероприятий с учетом индивидуального риска развития ЗНО с целью раннего выявления вторых первичных опухолей (Таблица 3).

**Таблица 3** – Профилактические и скрининговые мероприятия, применяемые в России при наиболее распространенных наследственных опухолевых синдромах, ассоциированных с раком желудка

Синдром (гены)	Профилактические и скрининговые мероприятия
Наследственный ДРЖ (ген <i>CDH1</i> )	<ul style="list-style-type: none"> <li>– &gt;18 лет ежегодно гастроскопия с рандомной биопсией (не менее 15 биопсий) дна, кардии, тела, переходной зоны, антрума, препилорической зоны;</li> <li>– &gt;30–35 лет (или за 5–10 лет до возраста развития самого раннего известного РМЖ в семье) ежегодно: МРТ молочных желез с контрастированием и маммография с томосинтезом;</li> <li>– &gt;75 лет: дополнительные методы обследований назначаются в индивидуальном порядке [15].</li> </ul>
Синдром Линча (гены <i>MLH1, MSH2, MSH6, PMS2</i> )	<ul style="list-style-type: none"> <li>– &gt;27 лет (или за 2–5 лет до возраста развития самого раннего РЖ в семье): ежегодная ЭГДС;</li> <li>– &gt;18 лет: при возникновении РТК – рассмотрение вопроса о проведении профилактической колэктомии, колпроктэктомии – при локализации рака в прямой кишке;</li> <li>– &gt;50 лет (или за 10 лет до возраста развития самого раннего экзокринного рака поджелудочной железы в семье): ежегодно МРТ с контрастированием/МРТ-холангиопанкреатография и/или эндоскопическое УЗИ исследование;</li> <li>– &gt;32 лет при мутации гена <i>MSH2</i>: обследование органов мочевыделительной системы и выполнение цитологического анализа мочи;</li> <li>– &gt;27 лет: для женщин ежегодное трансвагинальное УЗИ матки с придатками и исследованием уровня СА-125;</li> <li>– &gt;30–35 лет у женщин: 1 раз в 1–2 года возможно проведение биопсии эндометрия, (назначается индивидуально в зависимости от клинической ситуации) и рассмотрение вопроса о проведении профилактической пангистерэктомии [15]</li> </ul>
Аденокарцинома и проксимальный полипоз желудка (ген <i>APC</i> )	<ul style="list-style-type: none"> <li>– &gt;18 лет: ежегодно колоноскопия мес. и консультация хирурга-онколога для рассмотрения возможности и целесообразности профилактической колпроктэктомии [154];</li> <li>– &gt;18 лет: ежегодно УЗИ щитовидной железы;</li> <li>– &gt;20 лет: ЭГДС 1 раз в 2–3 года [15]</li> </ul>
Синдром Пейтца – Егерса (ген <i>STK11</i> )	<ul style="list-style-type: none"> <li>– &gt;18 лет: 1 раз в 2–3 года колоноскопия с полипэктомией полипов &gt;3 мм;</li> <li>– &gt;18 лет: 1 раз в 2–3 года ЭГДС с удалением полипов размером более 3 мм; при выявлении полипов толстой кишки рекомендована полипэктомия для всех полипов, вызывающих симптомы, и полипов размером &gt;10 мм;</li> <li>– &gt;25 лет для женщин: ежегодный осмотр онколога-маммолога, УЗИ молочных желез, маммография с томосинтезом и/или МРТ молочных желез;</li> <li>– &gt;25 лет для женщин: ежегодный осмотр гинеколога и трансвагинальное УЗИ органов малого таза;</li> </ul>

Синдром (гены)	Профилактические и скрининговые мероприятия
	– >50 лет: ежегодно (или за 10 лет до возраста развития самого раннего экзокринного рака поджелудочной железы в семье) МРТ с контрастированием/магнитно-резонансная холангиопанкреатография и/или эндоскопическое УЗИ исследование [15]
<p><i>TP53</i>-ассоциированный опухолевый синдром (ген <i>TP53</i>)</p>	<p>– &gt;18 лет: ежегодно осмотр онколога дерматолога для исключения меланомы;</p> <p>– &gt;18 лет: МРТ всего тела ежегодно (назначается индивидуально в зависимости от клинической ситуации);</p> <p>– &gt;25 лет (или за 5 лет до возраста развития самого раннего известного РТК в семье): 1 раз в 2–5 лет колоноскопия, ЭГДС;</p> <p>– 20–29 лет для женщин: ежегодно МРТ молочных желез с контрастированием (или маммография с томосинтезом, если проведение МРТ недоступно);</p> <p>– 30–75 лет для женщин: ежегодно маммография с томосинтезом и МРТ молочных желез с контрастированием;</p> <p>– &gt;50 лет (или за 10 лет до возраста развития самого раннего экзокринного рака поджелудочной железы в семье) ежегодно МРТ с контрастированием/ МРТ-холангиопанкреатография и/или эндоскопическое УЗИ исследование,</p> <p>– &gt;75 лет для женщин и мужчин: дополнительные методы обследования назначаются в индивидуальном порядке [15].</p>
<p>Синдром наследственного РМЖ и рака яичников (гены <i>BRCA1/2</i>)</p>	<p>20 лет для женщин 1 раз 6 мес. консультация онколога–маммолога, ультразвуковое исследование молочных желез;</p> <p>– 25–29 лет для женщин: ежегодно МРТ молочных желез с контрастированием (или маммография с томосинтезом, если проведение МРТ недоступно);</p> <p>– 30–75 лет для женщин: ежегодно маммография с томосинтезом и МРТ молочных желез с контрастированием;</p> <p>– &gt;75: лет для женщин дополнительные методы обследований в индивидуальном порядке;</p> <p>– &gt;30–35 лет для женщин: ежегодно трансвагинальное УЗИ и определением СА-125;</p> <p>– &gt;50 лет: ежегодно (или за 10 лет до возраста развития самого раннего экзокринного рака поджелудочной железы в семье) МРТ с контрастированием/ИРТ-холангиопанкреатография и/или эндоскопическое УЗИ исследование;</p> <p>– &gt;40 лет для мужчин: ежегодно пальцевое ректальное исследование, исследование уровня ПСА (при носительстве вариантов в гене <i>BRCA1</i> – опционально) [15]</p>

Кроме того, МГК дает возможность оказать психологическую и образовательную помощь больному, а также определить необходимость ДНК-диагностики родственников пациента – носителя мутации, позволяя формировать группу высокого онкологического риска [109]. Принимая во внимание 50 %-ную вероятность наследования мутации, немаловажным аспектом МГК больных наследственным РЖ молодого возраста является обсуждение репродуктивных возможностей после окончания лечения, в том числе целесообразность применения пренатальной и преимплантационной ДНК-диагностики. Алгоритм МГК и последующего ведения пациентов с подозрением на наличие НОС представлен на рисунке 1.



**Рисунок 1** – Алгоритм медико-генетического консультирования (МГК) и последующего ведения больных злокачественными новообразованиями (ЗНО) с подозрением на наличие наследственного опухолевого синдрома (НОС)

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1 Материалы исследования и их характеристика

В исследование включены 310 пациентов с верифицированным диагнозом РЖ, которые проходили лечение или обследование в НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина Минздрава России по поводу I–IV стадии РЖ в период с 1992 по 2020 гг. включительно. Все обследованные рандомизированы на 2 когорты.

В I когорту вошли 159 больных I–IV стадии всех гистологических подтипов со спорадическим РЖ. Клинико-морфологические данные группы представлены в таблице 4.

**Таблица 4** – Клиническо-морфологические данные больных когорты I

Характеристики обследуемой группы		Количество пациентов	Доля пациентов, %
Общее количество случаев		159	100,0
Пол	Мужчины	77	48,4
	Женщины	82	51,6
Возраст манифестации, лет	Средний $\pm$ SD	55,9 $\pm$ 14,6 лет	
	16–49	47	29,6
	50–83	112	70,6
Группировка по стадиям	I	21	13,2
	II	32	20,1
	III	56	35,2
	IV	50	31,4
Гистологический тип по Лаурен	Кишечный	73	45,9
	Диффузный	70	44,0
	Смешанный	16	10,1
Локализация опухоли	Кардия	35	22,0
	Дно	11	6,9
	Тело	47	29,6
	Преддверие привратника	18	11,3
	Привратник	7	4,4
	Малая кривизна	7	4,4
	Большая кривизна	6	3,8
	Выходит за пределы указанных областей	28	17,6

Предметом изучения в I когорте стали образцы периферической крови, нормальной и опухолевой ткани 159 пациентов. Коллекция нормальной и опухолевой ткани включила 54 парных образца свежей послеоперационной ткани и 105 срезов FFPE. Образцы свежей нормальной и опухолевой ткани отбирали во время оперативного вмешательства, быстро замораживали и хранили в морозильной камере при температуре  $-80^{\circ}\text{C}$ . Отобранные препараты FFPE содержали не менее 20 % опухолевых клеток по площади среза, периферическую кровь отбирали в пробирки с EDTA. Во всех образцах ткани РЖ определяли ДНК ВЭБ, статус MSH и полиморфизм генов *KRAS* (кодоны 12-13 экзона 2; кодон 61 экзона 3 и кодон 146 экзона 4), *BRAF* (кодонов 597-601 экзона 15; кодонов 542-546 экзона 10), *PIK3CA* (кодонов 1047-1049 экзона 21) в молекулярно-биологической лаборатории отдела морфологической и молекулярно-генетической диагностики опухолей НИИ клинической онкологии Н.Н. Трапезникова НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина.

Когорта II включала 151 пациента с установленным РЖ и подозрением на наследственную форму заболевания. Анализ семейного и личного анамнеза пациентов проводили согласно консенсусу экспертов ASCO [148]. В когорту II включены больные РЖ с ПМЗН других локализаций и больные, отвечающие критериям NCCN для направления на консультацию врача-генетика и оценки генетического риска у больных РЖ [109]:

- РЖ в возрасте до 40 лет;
- РЖ в возрасте до 50 лет при наличии одного родственника I или II степени родства с РЖ;
- РЖ в любом возрасте при наличии двух и более родственников I или II степени родства, больных РЖ;
- РЖ и РМЖ с манифестацией первого ЗНО в возрасте до 50 лет;
- РЖ в любом возрасте при наличии в семейном анамнезе случая РМЖ у родственника I или II степени родства, диагностированного в возрасте до 50 лет;
- РЖ в любом возрасте при наличии в семейном анамнезе ювенильных полипов или полипоза желудочно-кишечного тракта;
- РЖ в любом возрасте при наличии в семейном анамнезе случаев рака, ассоциированных с синдромом Линча (колоректальный рак, рак эндометрия, тонкой кишки или мочевыводящих путей).

Все пациенты когорты II разделены на две подгруппы: подгруппа IIА с органспецифическим РЖ и подгруппа IIВ с РЖ в составе ПМЗН.

В подгруппу IIА вошел 131 (86,8 %) пациент в возрасте от 15 до 76 лет, средний возраст манифестации рака -  $41,5 \pm 12,8$  года. Среди них 76 пациентов женского ( $42,5 \pm 12,99$  года) и

55 мужского ( $42,1 \pm 12,6$  года) пола. Подробные клиническо-морфологические данные больных представлены в таблице 5.

**Таблица 5** – Клиническо-морфологические данные больных подгруппы ПА

Клинические характеристики		Количество пациентов	Доля пациентов, %
Общее количество случаев		131	100,0
Пол	Мужчины	55	42,0
	Женщины	76	58,0
Возраст манифестации, лет	15–49	103	78,6
	50–83	28	21,4
	Среднее $\pm$ SD	41,5 $\pm$ 12,8 лет	
Стадия	I	13	9,9
	II	22	16,8
	III	28	21,4
	IV	58	44,3
	Не установлена	10	7,6
Гистологический тип по Лаурен	Кишечный	24	18,3
	Диффузный	92	70,2
	Смешанный	5	3,8
	Не установлен	10	7,6
Локализация опухоли	Кардия	20	15,3
	Дно	14	10,7
	Тело	43	32,8
	Преддверие привратника	11	8,4
	Привратник	5	3,8
	Малая кривизна	2	1,5
	Большая кривизна	0	0
	Выходит за пределы указанных областей	20	15,3
	Локализация неизвестна	16	12,2

При IV стадии заболевания у больных подгруппы ПА метастатическое поражение брюшины отмечено в 13 (22,4 %) случаев, костей – в 8 (13,8 %), яичников – в 5 (8,6 %) и лёгких – в 1 (1,7 %). В остальных случаях зарегистрировано полиорганное поражение ( $n = 22$ ; 37,9 %) или отсутствуют данные о локализации метастатических очагов ( $n = 9$ ; 15,5 %). В 1 (0,8 %) случае РЖ манифестировал на фоне беременности.

Накопление случаев ЗНО в семейном анамнезе наблюдали у 79 (59,9 %) пациентов подгруппы ПА:

- наличие ЗНО у родственников I степени родства – 56 (42,8 %);
- наличие ЗНО у родственников II степени родства – 49 (37,4 %);
- наличие ЗНО у родственников III степени родства – 11 (8,4 %);
- число вовлеченных поколений (I–III) в среднем – 1,6;
- количество родственников I степени родства с ЗНО – 1,2 (1–3 родственника);
- количество родственников II степени родства – 1,4 (1–4 родственника);
- количество родственников III степени родства с ЗНО – 1,5 (1–4 родственника).

Накопление случаев РЖ в семейном анамнезе наблюдали у 30 (22,9 %) пациентов подгруппы ПА:

- РЖ у родственников в I степени родства – 30 (22,9 %);
- наличие РЖ у родственников II степени родства – 22 (16,9 %);
- наличие РЖ у родственников III степени родства – 3 (2,3 %);
- число вовлеченных поколений (I–III) в среднем – 2;
- среднее количество родственников с РЖ I степени родства – 1,1 (1–3 родственника)
- среднее количество родственников II степени родства с РЖ – 1,4 (1–3 родственника);
- среднее количество родственников III степени родства с РЖ – 1 (1–1 родственник).

В подгруппу ПВ включили 20 (13,2 %) пациентов с РЖ и ПМЗН. В 15 (75,0 %) случаях диагностировано два ЗНО, в 4 (20,0 %) случаях – три ЗНО, в 1 (5,0 %) случае – четыре ЗНО. У большинства пробандов ( $n = 8$ ; 40,0%) выявлено сочетание РМЖ и РЖ, у 5 (62,5 %) из них идентифицирован тройной негативный молекулярный подтип РМЖ. Сочетание РЖ и РТК выявлено в 2 (10 %) случаях, у остальных больных ( $n = 10$ ; 50,0 %) дополнительно диагностирован рак легких, шейки матки, предстательной железы, яичников, эндометрия, меланома кожи. В 95,0 % случаев установлены метакронные ПМЗН, синхронные РЖ и рак шейки матки были выявлены у одной (5,0 %) пациентки в возрасте 31 года. Подробные клиничко-морфологические данные группы ПВ рассмотрены в таблице 6.

Таблица 6 – Клиническо-морфологические данные больных подгруппы ПВ

Клинические характеристики		Количество пациентов	Доля пациентов, %
Общее количество случаев		20	100,0
Пол	Мужчины	7	33,4
	Женщины	14	66,7
Возраст манифестации I ЗНО, лет	15–49	9	45,0
	50–83	11	55,0
	Среднее $\pm$ SD	47,6 $\pm$ 12,5	
Возраст манифестации РЖ, лет	Среднее $\pm$ SD	50,4 $\pm$ 12,8	
Стадия РЖ	I	2	9,5
	II	2	9,5
	III	5	23,8
	IV	8	38,1
	Не установлена	2	9,5
Гистологический тип РЖ по Лаурен	Кишечный	5	25,0
	Диффузный	9	45,0
	Смешанный	0	0
	Не установлен	6	30,0
Локализация опухоли	Кардия	5	25,0
	Дно	0	0
	Тело	4	20,0
	Преддверие привратника	1	5,0
	Привратник	0	0
	Малая кривизна	0	0
	Большая кривизна	0	0
	Выходит за пределы указанных областей	1	5,0
	Локализация неизвестна	9	45,0

Отягощенный семейный анамнез случаями ЗНО наблюдали у 13 (65,0%) больных подгруппы ПВ:

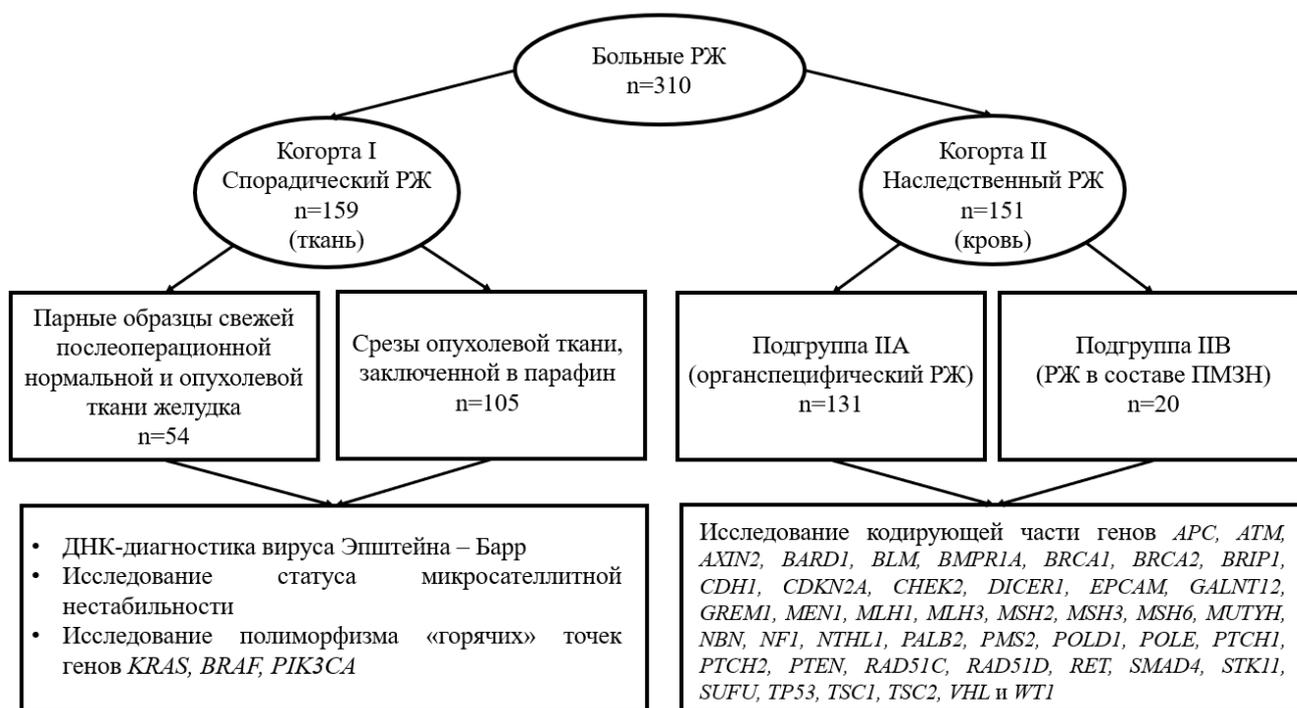
- наличие ЗНО у родственников I степени родства – 7 (35,0 %);
- наличие ЗНО у родственников II степени родства – 6 (30,0 %);
- наличие ЗНО у родственников III степени родства – 2 (10,0 %);
- число вовлеченных поколений (I–III) в среднем – 1,4;
- количество родственников I степени родства с ЗНО – 1,5 (1–4 родственника);
- количество родственников II степени родства – 1,5 (1–3 родственника);
- количество родственников III степени родства с ЗНО – 1 (1 родственник).

Накопление случаев РЖ в семейном анамнезе наблюдали у 4 (20,0 %) пациентов подгруппы ПВ:

- наличие РЖ у родственников I степени родства – 2 (10,0 %);
- наличие РЖ у родственников II степени родства – 1 (5,0 %);
- наличие РЖ у родственников III степени родства – 1 (5,0 %);
- число вовлеченных поколений (I–III) в среднем – 1;
- среднее количество родственников с РЖ I степени родства – 1 (1 родственник);
- среднее количество родственников II степени родства с РЖ – 1 (1 родственник);
- среднее количество родственников III степени родства с РЖ – 1 (1 родственник).

Для больных когорты II в рамках научно-исследовательской работы по созданию национальной базы данных для диагностики наследственных форм онкологических заболеваний методом NGS в лаборатории разработки новых методов молекулярной диагностики заболеваний человека Центра постгеномных исследований ФГБУ «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» Федерального медико-биологического агентства России выполнено тестирование кодирующих экзонов и прилегающих интронных областей 44 генов, ассоциированных с развитием наследственных опухолевых синдромов, с использованием метода NGS, последующей биоинформатической обработкой и клинической интерпретацией полученных данных.

Дизайн исследования представлен на рисунке 2.



**Рисунок 2** – Дизайн исследования

## 2.2 Молекулярные методы исследования

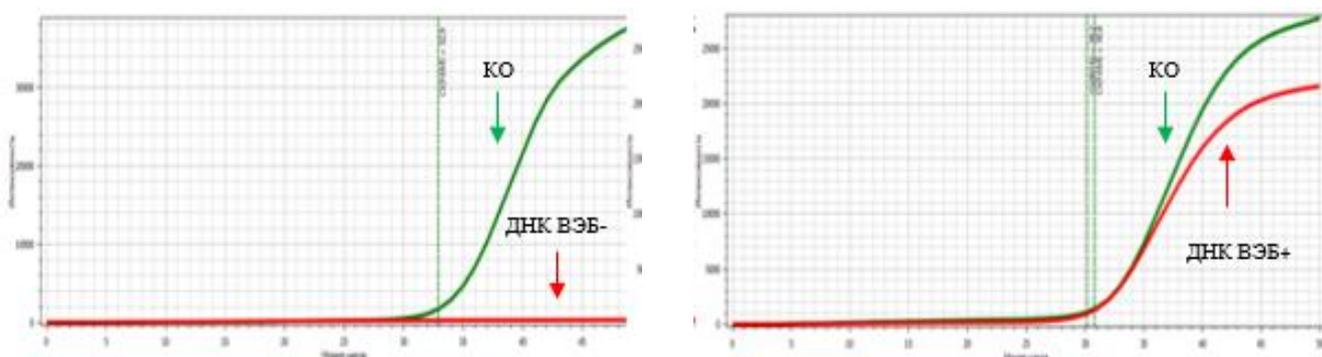
### 2.2.1 Выделение и оценка качества ДНК

Выделение ДНК из образцов послеоперационной нормальной и опухолевой ткани, а также срезов ткани, заключенной в парафин, проводили с использованием коммерческого набора Cobas® DNA Sample Preparation Kit (Roche, Германия) согласно инструкции производителя. Геномную ДНК, использованную в качестве контрольного образца при оценке статуса МСН, выделяли из лимфоцитов периферической крови с использованием набора Проба-ГС-Генетика («ДНК-технология», Россия); выделение геномной ДНК для проведения NGS выполняли из лимфоцитов периферической крови с помощью набора QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Германия) в соответствии с протоколом производителя.

Количество выделенной ДНК оценивалось с использованием набора Qubit dsDNA HS Assay Kit (Thermo Scientific, США) на флюориметре Qubit™ 4 (Thermo Scientific, США) согласно инструкции производителя. Качество ДНК оценивали, измеряя концентрацию и соотношение  $A_{260}/A_{280}$  на спектрофотометре NanoDrop Lite (Thermo Fisher Scientific, США).

### 2.2.2 ДНК-диагностика вируса Эпштейн – Барр методом полимеразной цепной реакции в реальном времени

ДНК ВЭБ в образцах РЖ выявляли с использованием коммерческого набора реагентов для определения ДНК ВЭБ методом ПЦР в режиме реального времени «РеалБест ДНК ВЭБ» (комплект 1) («Вектор Бест», Россия) на приборе ДТ-96 («НПФ ДНК-Технология», Россия). На первом этапе исследования в когорту I проспективно собрана коллекция парных образцов свежей послеоперационной опухолевой и нормальной ткани 54 пациентов. Ложноположительные/ложноотрицательные результаты исключали, анализируя все образцы в двух повторах. В результате ПЦР-диагностики ДНК ВЭБ выявлена в 3/54 образцах опухоли. На втором этапе, с целью валидации результатов, полученных для трех ВЭБ<sup>+</sup> и семи случайно отобранных ВЭБ-негативных (ВЭБ<sup>-</sup>) образцов, определяли наличие ДНК ВЭБ на срезах FFPE. Было получено совпадение показателей во всех случаях. В дальнейшем ДНК-диагностику ВЭБ проводили ретроспективно на 107 срезах FFPE. Результаты оценивали в соответствии с инструкцией производителя (Рисунок 3).



1. Отсутствие ДНК ВЭБ. Зеленая кривая – график амплификации ДНК внутреннего контрольного образца (КО), красная кривая – отсутствие амплификации ДНК ВЭБ

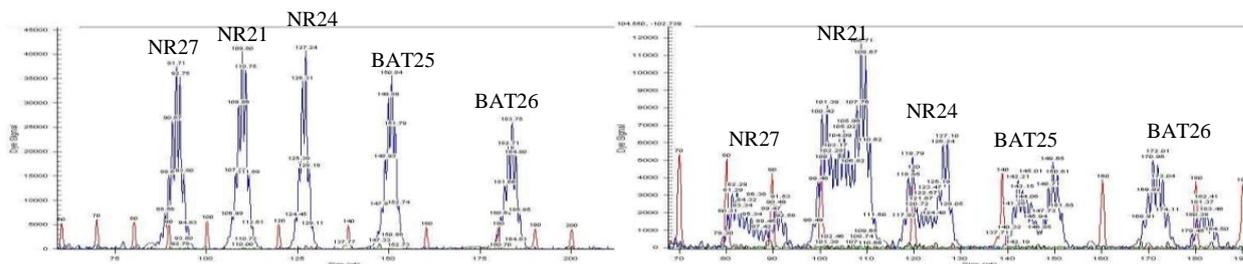
2. Наличие ДНК ВЭБ. Зеленая кривая – график амплификации ДНК внутреннего контрольного образца (КО), красная кривая – график амплификация ДНК ВЭБ

**Рисунок 3** – Качественная оценка наличия ДНК вируса Эпштейн – Барр (ВЭБ)

### 2.2.3 Определение статуса микросателлитной нестабильности методом фрагментного анализа

Статус МСН определяли методом фрагментного анализа с использованием пяти квазимономорфных мононуклеотидных маркеров NR21, NR24, NR27, BAT25, BAT26 на платформе Beckman Coulter Genome Lab GeXP (Beckman Coulter, США). При отсутствии нарушений или нестабильности одного маркера статус опухоли определяли как

микросателлитно стабильный (МСС), при нестабильности двух или более маркеров – как опухоль с МСН (Рисунок 4).



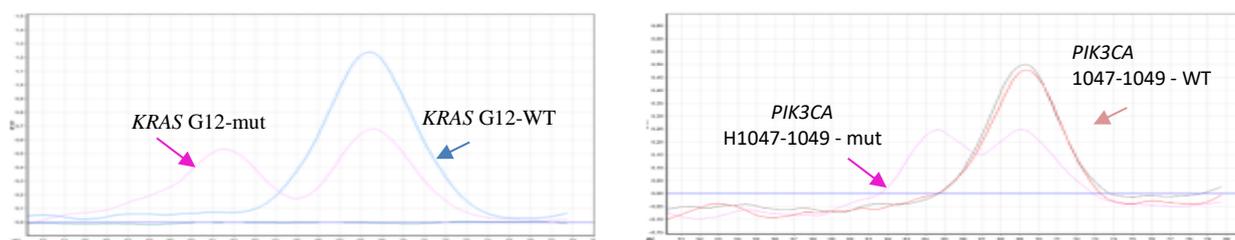
1. Микросателлитно стабильный статус опухоли (маркеры имеют по одному фрагменту разной длины)
2. Микросателлитно нестабильный статус опухоли (маркеры имеют по два фрагмента разной длины)

**Рисунок 4** – Оценка статуса микросателлитной нестабильности

### 2.2.4 Определение статуса генов *KRAS*, *BRAF*, *PIK3CA*

#### методом анализа кривых плавления с высоким разрешением

Поиск соматических мутаций в кодонах 12–13 (экзон 2), 61 (экзон 3) и 146 (экзон 4) гена *KRAS*, в кодонах 597–601 (экзон 15) гена *BRAF* и кодонах 542–546 (экзон 10), 1047–1049 (экзон 21) гена *PIK3CA* выполнен путем анализа кривых плавления с высоким разрешением (High Resolution Melting curve analysis, HRM) после проведения ПЦР в режиме реального времени с применением праймеров и зондов на амплификаторе Rotor-Gene (QIAGEN, Германия) (Рисунок 5). Последовательности праймеров, зондов и условия ПЦР описаны ранее [65].



1. Кривая плавления при анализе кодонов 12–13 гена *KRAS* (синий график – «дикий» тип, розовый график – мутантный тип)
2. Кривая плавления при анализе кодонов 1047–1049 гена *PIK3CA* (красный и зеленый графики – «дикий» тип, розовый график – мутантный тип)

**Рисунок 5** – HRM-анализ соматических мутаций в генах *KRAS*, *PIK3CA* и *BRAF* на примере кривых плавления гетерозиготных вариантов в кодонах 12–13 гена *KRAS* и кодонах 1047–1049 гена *PIK3CA*

### 2.2.5 Исследование геминальных мутаций в генах, ассоциированных с наследственными опухолевыми синдромами, с применением NGS

Кастомная панель включала гены *APC*, *ATM*, *AXIN2*, *BARD1*, *BLM*, *BMPRIA*, *BRCA1*, *BRCA2*, *BRIP1*, *CDH1*, *CDKN2A*, *CHEK2*, *DICER1*, *EPCAM*, *GALNT12*, *GREM1*, *MEN1*, *MLH1*, *MLH3*, *MSH2*, *MSH3*, *MSH6*, *MUTYH*, *NBN*, *NF1*, *NTHL1*, *PALB2*, *PMS2*, *POLD1*, *POLE*, *PTCH1*, *PTCH2*, *PTEN*, *RAD51C*, *RAD51D*, *RET*, *SMAD4*, *STK11*, *SUFU*, *TP53*, *TSC1*, *TSC2*, *VHL* и *WT1*. Для пробоподготовки была использована методика гибридационного селективного обогащения фрагментами ДНК, относящимися к кодирующим областям генов с известным клиническим значением, с использованием панели зондов KAPA HYPER (Roche) по стандартному протоколу. Гибридизацию с таргетной панелью проводили также по стандартному протоколу Hyper (Roche). В качестве секвенирующей платформы использовали систему MiSeq (Illumina, США), версия реагентов MiSeq Reagent Kit v2 500-cycles. Анализ проведен методом парно-концевого чтения согласно протоколу производителя.

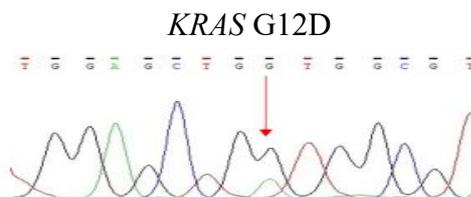
Генерация FastQ-файлов выполнялась с использованием программного обеспечения Illumina bcl2fastq v2.4. Выравнивание прочтений на референсную последовательность генома человека GRCh38 производили с помощью программного обеспечения BWA-MEM2 [155]. Дедупликацию выполняли с помощью Picard MarkDuplicates [156]. Рекалибрацию качества пар оснований и выявление вариантов нуклеотидной последовательности выполняли с использованием GATK BQSR v4.2.6.0 и GATK HaplotypeCaller 4.2.6.0 соответственно [157]. Аннотацию выявленных вариантов проводили по всем известным транскриптам каждого гена из базы RefSeq с применением ряда *in silico* методов предсказания патогенности замен (SIFT, PolyPhen2-HDIV, PolyPhen2-HVAR, MutationTaster, MetaSVM), а также методов расчета эволюционной консервативности позиций (PhyloP, PhastCons). Далее проводили оценку популяционных частот с использованием данных Genome aggregation database (gnomAD), Exome Aggregation Consortium (ExAC). Визуализация данных секвенирования проводили с применением программы Integrative Genomics Viewer (IGV) (Рисунок 6). В работу включали образцы с минимальным покрытием 70x, среднее покрытие по всем образцам составило 215,7x.



**Рисунок 6** – Визуализация альтернативного варианта нуклеотидной последовательности (указан стрелкой) в гене *TP53* с помощью программы IGV

### 2.2.6 Подтверждение наличия выявленных клинически значимых вариантов с применением секвенирования по Сэнгеру

Присутствие соматических и герминальных мутаций подтверждали путем очистки полученного ПЦР-продукта и прямого секвенирования по Сэнгеру на платформе Beckman Coulter Genome Lab GeXP (Beckman Coulter) согласно инструкции производителя. Чтение нуклеотидной последовательности проводили с помощью программы Chromas (Рисунок 7).



**Рисунок 7** – Фрагмент секвенограммы гена *KRAS* и гетерозиготный вариант G12D (указан стрелкой) в образце опухоли

Классификацию выявленных вариантов нуклеотидной последовательности проводили согласно рекомендациям по интерпретации данных секвенирования Американской коллегии медицинской генетики и геномики (American College of Medical Genetics and Genomics, ACMG) и Ассоциации молекулярных патологов (Association for Molecular Pathology, AMP) [158].

### 2.3 Методы статистического анализа

Статистический анализ проводили с помощью программного обеспечения GraphPad Prism 8.0.0 (GraphPad Software, США). Общую выживаемость определяли как время от момента постановки диагноза до смерти от любой причины или даты последнего наблюдения пациента и рассчитывали по методу Каплана – Мейера. Различия между общей выживаемостью пациентов трех групп оценивали при помощи теста лог-ранга критерия Мантеля – Кокса. Для попарных сравнений выживаемости группы пациентов сравнивали с помощью теста лог-ранга Мантеля – Кокса и критерия Бреслоу – Гехана – Вилкоксона. Выживаемость на определенных этапах исследования сравнивали с использованием точного теста Фишера, отличия общей выживаемости между подгруппами выявляли с применением U-критерия Манна – Уитни и критерия Краскела – Уоллиса. Различие считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ . Для сравнений после теста Краскела-Уоллиса применяли критерий Данна.

## ГЛАВА 3. ИЗУЧЕНИЕ ФЕНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК СПОРАДИЧЕСКОГО РАКА ЖЕЛУДКА

### 3.1 Определение молекулярных подтипов рака желудка и их характеристика

#### 3.1.1 ДНК-диагностика вируса Эпштейн – Барр в образцах опухолевой ткани

В результате проведенного исследования ДНК ВЭБ выявлена в 13/159 (8,2 %) образцах. В большинстве случаев ВЭБ<sup>+</sup> РЖ диагностирован у мужчин ( $n = 12$ ; 92,3 %). У 10/13 (76,9 %) пациентов диагноз установлен после 50 лет, средний возраст манифестации РЖ – 54,8 года. Чаще ВЭБ<sup>+</sup> опухоли располагались в теле желудка ( $n = 4$ ; 30,7 %), кардиально или поражали дно ( $n = 6$ ; 46,0 %). Диффузный рак и аденокарцинома кишечного типа встречались практически в равном соотношении – 6 (46,2 %) и 5 (38,5 %) случаев, в то время как смешанный тип наблюдали только у 2 (15,4 %) обследованных. Распространенный рак (III–IV стадии) выявлен у 7 (53,9 %) больных, в остальных 6 (46,2 %) случаях диагноз установлен на I–II стадии. При III стадии отмечено поражение 3–6 регионарных лимфатических узлов ( $n = 1$ ), 7 и более ( $n = 1$ ), вовлечение висцеральной брюшины ( $n = 1$ ), в двух случаях лимфатические узлы не оценены. РЖ IV стадии ( $n = 2$ ) характеризовался метастатическим поражением в кости.

#### 3.1.2 Оценка статуса микросателлитной нестабильности в образцах опухолевой ткани

При исследовании опухолевой ткани 159 больных РЖ когорты I МСН статус опухоли обнаружен в 21 (13,2 %) образце. У мужчин и женщин МСН РЖ диагностирован в 10 (47,6%) и 11 (52,4 %) образцах соответственно. В 16 (76,2 %) случаях заболевание манифестировало в возрасте старше 50 лет, средний возраст диагностики –  $62,1 \pm 14,5$  года. У 6 (28,6 %) обследованных установлено поражение малой кривизны, в 5 (23,8 %) – больше одной топографической области, тела желудка – у 4 (19,0 %) и преддверия привратника – у 4 (19,0%) больных. Кишечный и диффузный гистотипы были представлены в соотношении 15 (71,4 %) к 4 (19,0 %). В большинстве случаев ( $n = 14$ ; 66,7 %) диагноз установлен на поздних стадиях. На III стадии при МСН РЖ ( $n = 8$ ; 38,1 %) чаще наблюдали поражение 1–2 регионарных лимфатических узлов ( $n = 3$ ; 37,5%), реже 3–6 лимфоузлов ( $n = 2$ ; 25,0 %), 7 и более лимфоузлов ( $n = 1$ ; 12,5 %). Для IV стадии ( $n = 6$ ; 28,6 %) было характерно метастатическое поражение легких ( $n = 1$ ), костей ( $n = 2$ ), печени ( $n = 3$ ), яичников ( $n = 1$ ) и лимфоузлов средостения ( $n = 1$ ). При сравнительном анализе частот выявления МСН в зависимости от стадий РЖ выявлено

превалирование в группе операбельных (I, II, III стадии) форм над диссеминированными (IV) – 6 vs 3,5 % ( $p = 0,35$ ) (Таблица 7), однако данные результаты не являлись статистически значимыми.

**Таблица 7** – Частота выявления микросателлитной нестабильности (МСН) при различных стадиях рака желудка (РЖ)

Стадия заболевания	Всего пациентов	Количество пациентов с МСН РЖ, абс./%
I	13	1 (0,1)
II	22	6 (1,3)
III	58	8 (4,6)
IV	58	6 (3,5)

В проведенном исследовании ВЭБ<sup>+</sup>-подтип и МСН-подтип РЖ были взаимоисключающими.

### 3.1.3 Изучение клинико-молекулярных характеристик спорадического рака желудка в зависимости от молекулярного подтипа

Средний возраст манифестации РЖ в группе МСН составил 62,1 года, у пациентов с ВЭБ<sup>+</sup> и ВЭБ<sup>-</sup> + МСС - в более молодом возрасте – 54,8 и 55,0 года соответственно. Сравнительный анализ подгруппы ВЭБ<sup>+</sup> и МСН не выявил значимых различий ( $p = 0,0691$ ) по возрасту манифестации РЖ. В сравнении с группой ВЭБ<sup>-</sup>+МСС при МСН преобладали пациенты в возрасте старше 50 лет ( $p < 0,01$ ). Эпштейн – Барр - ассоциированный РЖ достоверно чаще (92,3 %;  $p < 0,01$ ) выявлен у пациентов мужского пола, в МСН - группе соотношение мужчин и женщин составило 47,6 и 52,4 % соответственно.

В отличие от I, II и IV стадий, в группах ВЭБ<sup>+</sup> и МСН чаще диагностировали III стадия заболевания – 38,5 и 38,1 % соответственно. Диффузный гистотип при ВЭБ<sup>+</sup> РЖ выявлен в 46,2 % случаев, кишечный – в 38,5 %. МСН РЖ чаще ассоциирован с кишечным гистотипом (71,4 %). МСН рак наблюдали во всех отделах и, как и ВЭБ<sup>+</sup> (30,7 %), чаще поражал тело желудка (23,8 %) или выходил за пределы одной области (23,8 %), но не развивался на большой кривизне. Клинические характеристики обследованных групп в зависимости от статуса ВЭБ и МСН представлены в таблице 8.

**Таблица 8** – Клинические характеристики пациентов когорты I с Эпштейн - Барр - позитивным (ВЭБ<sup>+</sup> РЖ), микросателлитно нестабильным (МСН РЖ) и ВЭБ – негативным микросателлитно стабильным раком желудка (ВЭБ<sup>-</sup>+МСС РЖ)

Клинические характеристики 159 (100 %)		ВЭБ <sup>+</sup> -группа 13 (8,2 %)	МСН-группа 21 (13,2 %)	ВЭБ <sup>-</sup> +МСС- группа 125 (78,6 %)
		абс./%		
Пол	Мужчины	12 (92,3)	10 (47,6)	54 (43,2)
	Женщины	1 (7,7)	11 (52,4)	71 (56,8)
Возраст манифестации, лет	16–49	10 (76,9)	5 (23,8)	86 (71,2)
	50–83	3 (23,1)	16 (76,2)	39 (28,8)
	Среднее ± SD	54,8 ± 11,9	62,1 ± 14,5	55,0 ± 14,7
Стадия	I	2 (15,4)	1 (4,8)	17 (13,6)
	II	4 (30,8)	6 (28,6)	22 (17,6)
	III	5 (38,5)	8 (38,1)	43 (34,4)
	IV	2 (15,4)	6 (28,6)	43 (34,4)
Гистологический тип по Лаурен	Кишечный	5 (38,5)	15 (71,4)	73 (58,4)
	Диффузный	6 (46,2)	4 (19,0)	60 (48,0)
	Смешанный	2 (15,4)	2 (9,5)	12 (9,6)
Локализация опухоли	Кардия	3 (23,1)	2 (9,5)	30 (24,0)
	Дно	3 (23,1)	1 (4,8)	7 (5,6)
	Тело	4 (30,7)	5 (23,8)	38 (30,4)
	Преддверие привратника	1 (7,7)	4 (19,0)	13 (10,4)
	Привратник	0 (0)	1 (4,8)	5 (4,0)
	Малая кривизна	1 (7,7)	3 (14,3)	3 (2,4)
	Большая кривизна	1 (7,7)	0 (0)	5 (4,0)
	Выходит за пределы указанных областей	0 (0)	5 (23,8)	24 (19,2)

### 3.1.4 Обсуждение полученных результатов

По данным различных источников, МСН при РЖ диагностируется в 10–37 % опухолей желудка [28–30], что согласуется с частотой МСН опухолей в представленном исследовании (13,2 %). Поскольку для оценки статуса МСН использовалась эталонная панель Bethesda [58], разработанная преимущественно для диагностики статуса МСН при колоректальном раке, можно предположить, что частота МСН РЖ может быть несколько выше. Так, Hause R. J. et al. оценили МСН аденокарциномы желудка методом NGS. Частота МСН РЖ составила 19,0 %, уступая раку эндометрия (30,0 %) и колоректальному раку (19,0 %). Отмечена высокая частота МСН в широком спектре локусов, часто совпадающих с МСН локусами при раке толстой кишки [88]. Несмотря на то, что Su-Jin Shin et al. сообщили о большей частоте МСН у женщин, в изучаемой группе 92,3 % приходилось на пациентов мужского пола. Как и в других исследованиях, МСН фенотип был представлен кишечным гистотипом [31, 32]. В литературе имеются указания на то, что МСН в опухоли чаще встречается при ранних стадиях РЖ (I–II), чем при диссеминированном процессе [86]. В представленном исследовании наиболее часто МСН диагностирована при III стадии опухолевого процесса и в совокупности операбельные опухоли (I–III стадии) с МСН преобладали [159]. Однако, учитывая малочисленность групп, результаты такого анализа трудно считать окончательными.

ПЦР — это экономичный и доступный метод, широко применяемый для выявления ВЭБ-инфекции в сыворотке, плазме и цельной крови. Как сообщалось Deyhimi et al., при ПЦР-диагностике ДНК ВЭБ в солидных опухолях существует возможность получения ложноположительных результатов [160]. Низкую специфичность ПЦР можно объяснить тем, что клетки памяти и/или неопухолевые лимфоциты, инфицированные ВЭБ, также могут попасть в образец для анализа. Таким образом, методы на основе ПЦР более чувствительны, но менее специфичны, чем метод гибридизации РНК, кодируемой ВЭБ (EBER), *in situ* (EBER-ISH) — золотой стандарт диагностики ВЭБ в гистопатологических образцах [56]. С целью исключения из анализа нормальной ткани желудка забор опухолевого материала проводили с использованием метода макродиссекции под контролем патоморфолога, оценку наличия ДНК ВЭБ выполняли в парных образцах нормальной и опухолевой ткани желудка. С той же целью ПЦР проводили в двух повторах, в результате чего частота ВЭБ<sup>+</sup> РЖ в исследованной выборке составила 8,2 %. Tavakoli et al. провели мета-анализ данных 71 статьи и 2 226 пациентов с РЖ из 26 стран и показали, что совокупная распространенность ВЭБ среди больных РЖ составила 8,77 % [161]. По данным мета-анализа, проведенного Camargo et al. (13 исследований с участием 4 599 пациентов), средний возраст постановки диагноза ВЭБ<sup>+</sup> РЖ составлял 58 лет, группа отличалась преобладанием мужчин (71 %) [162]. Tavakoli et al. также отметили высокую

частоту возникновения ВЭБ<sup>+</sup> РЖ у лиц мужского пола [161]. В представленном исследовании 92,3 % ВЭБ<sup>+</sup> РЖ также диагностирован у мужчин. Однако в представленной выборке отмечен более ранний возраст манифестации ВЭБ<sup>+</sup> РЖ – 54,8 года. Кроме того, Tavakoli et al. в 57 % случаев отнесли ВЭБ<sup>+</sup> РЖ к кишечному типу, тогда как в представленной группе отмечено незначительное преобладание диффузного типа над кишечным (6/13, 46,2% vs 5/13, 38,5%) [161].

### 3.2 Определение прогностического значения

#### статуса микросателлитной нестабильности и вируса Эпштейн-Барр при раке желудка

##### 3.2.1 Оценка общей выживаемости

Медиана времени наблюдения за больными в когорте I от момента постановки диагноза составила 31,3 мес. (95 %; ДИ 27,6–35,1 мес.), медиана общей выживаемости (ОВ) – 55,0 мес. 1-, 3- и 5-летняя ОВ составила 84,6; 69,6 и 54,3 мес. соответственно.

Статистически значимые различия в ОВ выявлены при сравнении групп с учетом возраста манифестации: до и после 50 лет – 33,39 vs. 63,81 мес. ( $p < 0,01$ ). Не выявлено значимых различий в ОВ в зависимости от пола пациентов ( $p = 0,98$ ). Значимые различия в ОВ выявлены на III и IV стадиях РЖ ( $p = 0,01$ ), статистических различий между другими стадиями заболевания не прослежено в связи с малочисленностью обследуемых групп. Также не найдено значимых различий в ОВ в зависимости от гистологического типа опухоли ( $p = 0,96$ ) (Рисунок 8).

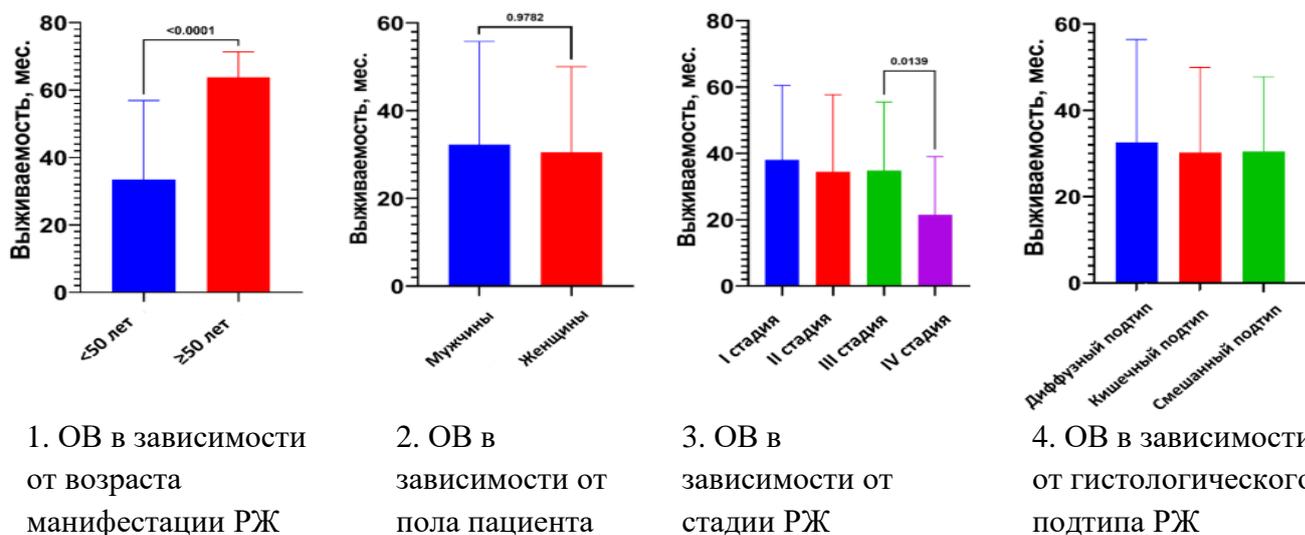
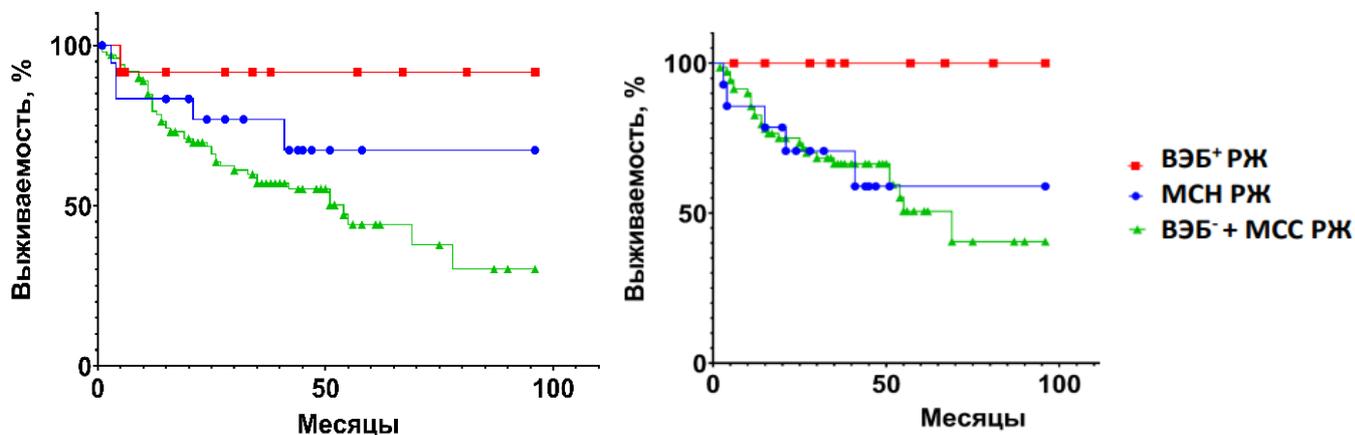


Рисунок 8 – Анализ общей выживаемости (ОВ) больных раком желудка (РЖ) когорты I

Как показано на графиках (Рисунок 9), у пациентов с I–IV стадиями ВЭБ<sup>+</sup> РЖ прогноз лучше, чем в группах МСН ( $p = 0,24$ ) и ВЭБ<sup>-</sup>+ МСС ( $p = 0,04$ ) РЖ. В группе операбельного РЖ (I–III стадии) также отмечен лучший прогноз при ВЭБ<sup>+</sup>-подтипе РЖ, в сравнении с МСН РЖ ( $p = 0,06$ ) и ВЭБ<sup>-</sup>+ МСС РЖ ( $p = 0,04$ ).



1. Общая выживаемость пациентов с I–IV стадиями рака желудка когорты I

2. Общая выживаемость пациентов с I–III стадиями рака желудка когорты I

**Рисунок 9** – Показатели общей выживаемости пациентов когорты I с Эпштейн - Барр - позитивным (ВЭБ<sup>+</sup> РЖ), микросателлитно нестабильным (МСН РЖ) и ВЭБ – негативным микросателлитно стабильным раком желудка (ВЭБ<sup>-</sup>+МСС РЖ)

Статистически значимой разницы в показателях ОВ пациентов с МСН и ВЭБ<sup>-</sup> + МСС не отмечено как в общей группе ( $p = 0,66$ ), так и при операбельных формах ( $p = 0,26$ ) РЖ. 50 %-ная выживаемость достигнута в группе больных с ВЭБ<sup>-</sup>+МСС РЖ.

При парных сравнениях показателей в группе больных I–IV стадиями РЖ выявлены статистически значимые различия 5- и 8-летней ОВ между подгруппами ВЭБ<sup>+</sup> и ВЭБ<sup>-</sup>+МСС РЖ. Результаты анализа ОВ представлены в таблице 9.

**Таблица 9** - Общая выживаемость больных I-IV стадиями рака желудка когорты I: 1-, 3-, 5-, 8-летняя выживаемость (%) и медиана (мес.)

Кол-во пациентов, n = 128	1-год. ОВ, %	3-лет. ОВ, %	5-лет. ОВ, %	8-лет. ОВ, %	Медиана, мес.
ВЭБ <sup>+</sup> , n = 11	91,7	91,7	91,7	91,7	Не достигнута
МСН, n = 18	83,3	76,9	67,3	67,3	Не достигнута
ВЭБ <sup>-</sup> + МСС, n = 99	79,5	56,9	44,1	30,2	54

Молекулярный подтип РЖ	ВЭБ <sup>+</sup>	МСН	ВЭБ <sup>-</sup> + МСС
<b>Парные сравнения, 1-годовая выживаемость</b>			
ВЭБ <sup>+</sup>		>0,99	0,69
МСН	0,99		>0,99
ВЭБ <sup>-</sup> + МСС	0,69	>0,99	
<b>Парные сравнения, 3-летняя выживаемость</b>			
ВЭБ <sup>+</sup>		0,62	<b>0,04</b>
МСН	0,62		0,12
ВЭБ <sup>-</sup> + МСС	<b>0,04</b>	0,12	
<b>Парные сравнения, 5-летняя выживаемость</b>			
ВЭБ <sup>+</sup>		>0,05	<b>&lt;0,01</b>
МСН	>0,05		0,12
ВЭБ <sup>-</sup> + МСС	<b>&lt;0,01</b>	0,12	
<b>Парные сравнения, 8-летняя выживаемость</b>			
ВЭБ <sup>+</sup>		0,24	<b>0,03</b>
МСН	0,24		0,26
ВЭБ <sup>-</sup> + МСС	<b>0,03</b>	0,26	

При парных сравнениях показателей в группе операбельного РЖ также выявлены статистически значимые различия 5- и 8-летней ОВ между подгруппами ВЭБ<sup>+</sup> и ВЭБ<sup>-</sup>+МСС РЖ. Результаты анализа ОВ представлены в таблице 10.

**Таблица 10** – Общая выживаемость больных первично-операбельным (I-III стадии) раком желудка когорты I: 1-, 3-, 5-, 8-летняя выживаемость (%) и медиана (мес.)

Кол-во пациентов, n = 92	1-год. ОВ, %	3-лет. ОВ, %	5-лет. ОВ, %	8-лет. ОВ, %	Медиана, мес.
ВЭБ <sup>+</sup> , n = 8	100	100	100	100	Не достигнута
МСН, n = 13	84,6	68,4	54,7	54,7	Не достигнута
ВЭБ <sup>-</sup> + МСС, n = 71	82,6	66,5	50,6	40,5	69

Молекулярный подтип РЖ	ВЭБ <sup>+</sup>	МСН	ВЭБ <sup>-</sup> + МСС
<b>Парные сравнения, 1-годичная выживаемость</b>			
ВЭБ <sup>+</sup>		0,49	0,34
МСН	0,49		>0,99
ВЭБ <sup>-</sup> + МСС	0,34	>0,99	
<b>Парные сравнения, 3-летняя выживаемость</b>			
ВЭБ <sup>+</sup>		0,12	>0,05
МСН	0,11		>0,99
ВЭБ <sup>-</sup> + МСС	>0,05	>0,99	
<b>Парные сравнения, 5-летняя выживаемость</b>			
ВЭБ <sup>+</sup>		>0,05	<b>0,03</b>
МСН	>0,05		>0,99
ВЭБ <sup>-</sup> + МСС	<b>0,03</b>	>0,99	
<b>Парные сравнения, 8-летняя выживаемость</b>			
ВЭБ <sup>+</sup>		0,06	<b>0,04</b>
МСН	0,06		0,66
ВЭБ <sup>-</sup> + МСС	<b>0,04</b>	0,66	

*Примечание:* парные сравнения представлены значением по log-rank *p*-критерию.

### 3.2.2 Обсуждение полученных результатов

Показатели ОВ в проведенном исследовании подтверждают связь ВЭБ<sup>+</sup> подтипа с наилучшим прогнозом: в течение 8 лет наблюдения ОВ в общей когорте и при операбельном РЖ составила 91,7 и 100 % соответственно. В исследовании прогностической модели с применением данных когорты РЖ из TCGA обращая 3-летняя выживаемость пациентов с ВЭБ-ассоциированным РЖ составила 100 % [65]. В мета-анализе J.-S. Pao et al. ВЭБ-ассоциированный РЖ коррелировал с лучшим прогнозом по сравнению с ВЭБ-негативным РЖ (ОР 0,890, 95 %; ДИ 0,816–0,970). Кроме того, не было выявлено существенных различий в ОВ пациентов с ВЭБ-положительными и МСН опухолями и больными с микросателлитно

стабильным и ВЭБ-отрицательным РЖ (ОР 1,099, 95 % ДИ 0,885–1,364 и 0,954, 95 % ДИ 0,872–1,044 соответственно) [163].

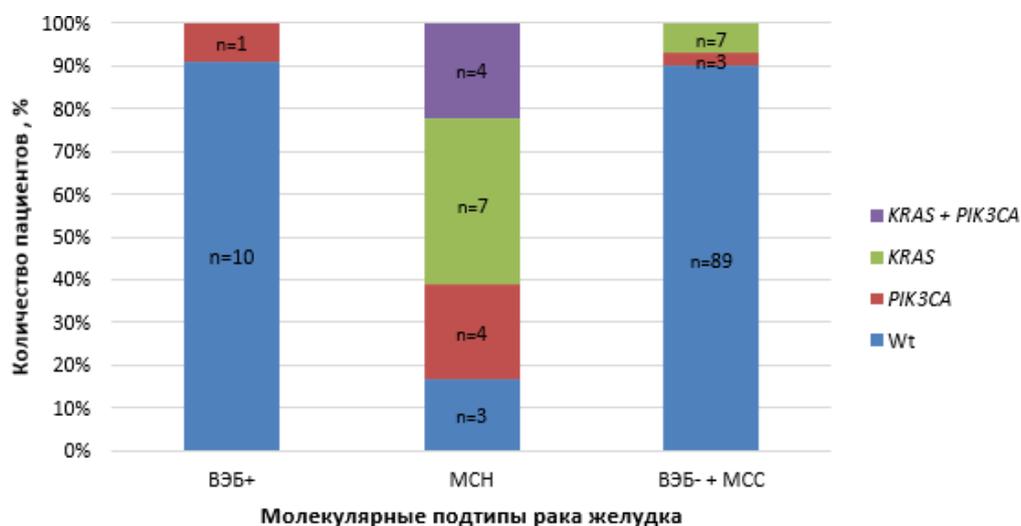
Также J.-S. Ryo et al. провели анализ ОВ в зависимости от популяции. В результате в азиатских и американских подгруппах у пациентов с ВЭБ-ассоциированным раком прогноз был лучше, чем у лиц с ВЭБ-негативным РЖ (ОР 0,880, 95 % ДИ 0,782–0,991 и ОР 0,840, 95 % ДИ 0,750–0,941 соответственно). В то же время в европейской подгруппе не было выявлено значимой корреляции между наличием ВЭБ и ОВ. В представленном исследовании различия в ОВ при МСН и ВЭБ+МСС раке не были статистически значимыми, что может быть связано с малым количеством пациентов в группе МСН. Таким образом, полученные результаты нельзя считать окончательными.

### 3.3 Оценка частоты соматических мутаций генов *KRAS*, *BRAF* и *PIK3CA* при раке желудка

#### 3.3.1 Исследование полиморфизма «горячих» точек генов *KRAS*, *BRAF* и *PIK3CA*

В ходе изучения статуса «горячих» точек генов *KRAS* и *PIK3CA* диагностировано 12 (7,5 %) и 5 (2,5 %) клинически значимых вариантов соответственно. В кодонах 597–601 (экзон 15) гена *BRAF* мутаций не выявлено.

В отличие от ВЭБ<sup>+</sup>-опухолей, где совокупно выявлен 1 (7,7 %) клинически значимый вариант в гене *PIK3CA*, МСН-фенотип характеризовался большим количеством соматических мутаций: 4 (19,0 %) варианта в кодонах 12–13 гена *KRAS* и 7 (33,3 %) – в экзонах 10 и 21 гена *PIK3CA* (Рисунок 10).



**Рисунок 10** – Структура выявленных вариантов в «горячих» точках генов *KRAS* и *PIK3CA* при различных молекулярных подтипах РЖ в образцах опухоли пациентов когорты I

Кроме того, в 19,0 % (4/21) образцов с МСН обнаружено сочетание вариантов в генах *KRAS* и *PIK3CA* (Таблица 11).

**Таблица 11** – Спектр выявленных клинически значимых вариантов в генах *KRAS* и *PIK3CA* при генотипировании образцов ДНК опухолевой ткани когорты I

Ген	Молекулярный подтип РЖ, число случаев (абс.)		
	ВЭБ <sup>+</sup> РЖ	МСН РЖ	ВЭБ <sup>-</sup> + МСС РЖ
<i>KRAS</i>	Wt	Wt	G12A, 1 G12V, 1 G12D, 3 Q61E, 1
<i>PIK3CA</i>	Q546K, 1	Q546K, 1 H1047R, 2	E545K, 1 H1047R, 2
<i>KRAS</i> + <i>PIK3CA</i>	Wt	<i>KRAS</i> G13D + <i>PIK3CA</i> E542K, 2 <i>KRAS</i> G13D + <i>PIK3CA</i> H1047R, 1 <i>KRAS</i> G12V + <i>PIK3CA</i> H1047R, 1	Wt

### 3.3.2 Обсуждение полученных результатов

Согласно TCGA, до 80 % ВЭБ<sup>+</sup> опухолей желудка могут содержать мутации в гене *PIK3CA*, тогда как в представленном исследованной выборке только в одном случае выявлен вариант E545K в экзоне 21 гена *PIK3CA*. Было отмечено, что в отличие от других подтипов РЖ, где наибольшая частота aberrаций зарегистрирована в киназном домене гена *PIK3CA* (экзон 21), в ВЭБ<sup>+</sup> опухолях мутации распределены по всему гену [14]. Таким образом, низкая частота соматических мутаций в гене *PIK3CA* при ВЭБ<sup>+</sup> РЖ в представленном исследовании может быть связана с недостаточным охватом тестируемых экзонов и/или недостаточной чувствительностью метода HRM. Напротив, МСН РЖ отличается высокой частотой соматических мутаций (33,3 %) гена *PIK3CA*, что значительно превышает показатели, полученные К. Polom et al. (8,1 %) [59] и G. Corso et al. (14,3 %) [37]. Расхождение показателей может быть связано с недостаточным объемом использованной выборки.

Кроме того, в 19 % образцов из выборки с МСН выявлено сочетание клинически значимых вариантов в генах *KRAS* и *PIK3CA*, что можно объяснить гипермутированным фенотипом МСН опухолей. Крупное международное многоцентровое исследование, изучающее статус гена *KRAS* и генов MMR у пациентов с местнораспространенным операбельным РЖ, подтвердило корреляцию между мутациями *KRAS* и механизмом dMMR [60]. По результатам

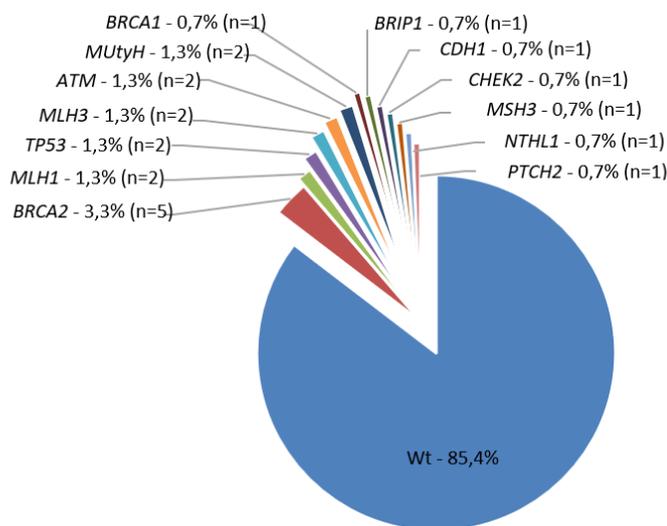
представленного исследования, а также по данным Barbi et al., мутация H1047R в гене *PIK3CA* диагностирована только в образцах МСН РЖ и связана со статусом МСН [61]. К. Polom et al. отметили более низкую пятилетнюю выживаемость пациентов с МСН и мутациями, чем лиц с геном *PIK3CA* «дикого» типа – 40,0 vs 70,4 % соответственно. В том же исследовании оценили различия в выживаемости пациентов с МСН и различными мутациями в гене *PIK3CA*. Оказалось, что пятилетняя выживаемость составила 0 и 80 % при мутации в экзоне 10 (ранее 9) и мутации в экзоне 21 (ранее 20) соответственно [42]. Учитывая малочисленность этой группы в проведенном исследовании, показатели выживаемости рассчитать не представляется возможным.

Отличительной особенностью представленной работы стало отсутствие мутаций в кодонах 597–601 гена *BRAF*, патогномоничных для МСН колоректального рака [53]. Согласно проведенным ранее исследованиям, частота мутаций в гене *BRAF* при РЖ колеблется в диапазоне 0–11 % [62].

## ГЛАВА 4. ИЗУЧЕНИЕ ФЕНО-ГЕНОТИПИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК НАСЛЕДСТВЕННОГО РАКА ЖЕЛУДКА

### 4.1 Результаты генотипирования геномной ДНК пациентов с подозрением на наследственную форму рака желудка

В результате генотипирования 151 образца крови пациентов когорты II с применением таргетной панели генов у 15,2 % ( $n = 23$ ) пробандов выявлен 21 клинически значимый вариант нуклеотидной последовательности (ВНП) в гетерозиготной форме в генах, ассоциированных с НОС (Рисунок 11).

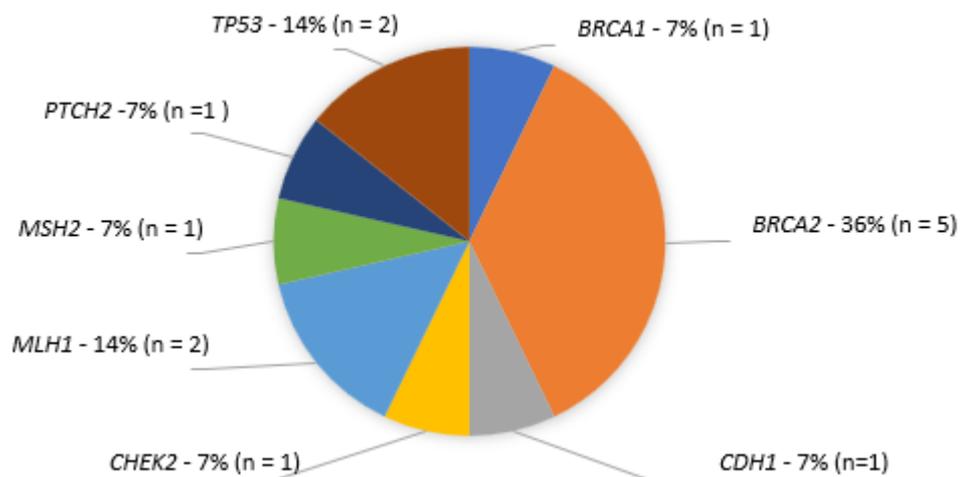


**Рисунок 11** – Распределение больных когорты II в зависимости от генотипа

По функциональному значению выявленные варианты были распределены следующим образом:

- нонсенс-варианты – 9 (42,9 %);
- мутации со сдвигом рамки считывания – 8 (38,1 %);
- миссенс-варианты – 4 (19,0 %);
- мутации сайта сплайсинга – 2 (9,5 %);
- делеция без сдвига рамки считывания – 1 (4,8 %).

У 9,3 % (14/151) обследованных диагностированы патогенные и вероятно патогенные ВНП в генах с аутосомно-доминантным типом наследования. Среди них большую долю составили ВНП в генах *BRCA1/2* – 5 вариантов у 6/14 (42,9 %) пациентов. В генах *MLH1*, *TP53* выявлено по 2 (14,3 %) варианта; в генах *CHEK2*, *CDH1*, *MSH2* и *PTCH2* – по одному (7,2 %) клинически значимому ВНП. Среди всех выявленных ВНП 78,6 % (11/14) зарегистрированы в базах данных dbSNP, ClinVar, BRCAExchange, VarSome как патогенные клинически значимые варианты. Ранее не зарегистрированные патогенные варианты выявлены в генах *BRCA2* (1 вариант) и *CDH1* (1 вариант); вероятно патогенный вариант идентифицирован в гене *PTCH2* (1 вариант). В общей сложности доля незарегистрированных патогенных вариантов и вероятно патогенных вариантов составила 14,3 % (2/14) и 7,1 % (1/14) соответственно. Структура выявленных патогенных и вероятно патогенных ВНП в генах, ассоциированных с НОС, с аутосомно-доминантным типом наследования у пациентов когорты II представлена на рисунке 12.



**Рисунок 12** – Структура выявленных патогенных и вероятно патогенных вариантов нуклеотидной последовательности в генах наследственных опухолевых синдромов с аутосомно-доминантным типом наследования у пациентов когорты II

К отдельной группе были отнесены пациенты с мутациями в генах *ATM* ( $n = 2$ ; 9,1 %), *BRIP1* ( $n = 1$ ; 4,6 %), *MLH3* ( $n = 2$ ; 9,1 %) с неопределенным типом наследования и пенетрантностью в отношении РЖ. Наличие гетерозиготных мутаций в генах *MSH3* ( $n = 1$ ; 4,6 %), *MUTYH* ( $n = 2$ ; 9,1 %), *NTHL1* ( $n = 1$ ; 4,6 %) у обследованных расценено как носительство в связи с отсутствием в личном и семейном анамнезе полипоза желудочно-кишечного тракта и далее в работе не рассматривается. Подробное описание выявленных клинически значимых вариантов отображено в таблице 12.

Таким образом наибольшее число мутаций (14/21; 66,7 %) было выявлено в генах систем репарации ДНК:

– в генах системы репарации путем гомологичной рекомбинации (homologous recombination repair, HRR) *BRCA1/2*, *CHEK2*, *ATM*, *BRIP1* – 9/21 (42,9 %) ВНП;

– в генах системы репарации неспаренных оснований (mismatch repair, MMR) *MLH1*, *MSH2*, *MLH3* – 5/21 (23,8 %) ВНП.

#### 4.2 Обсуждение полученных результатов

На сегодняшний день многочисленные исследования направлены на изучение аббераций в системах HRR и MMR в связи с возможностью применения нарушений этих генов в качестве мишеней для таргетной и иммунотерапии. В многоцентровом исследовании INTERCEPT для неотобранной группы 34 пациентов было выполнено таргетное NGS-тестирование 84 онкоассоциированных генов. По результатам тестирования у 17,6 % больных были выявлены патогенные/вероятно патогенные ВНП в генах *BRCA1* ( $n = 2$ ), *BRCA2* ( $n = 1$ ), *CDH1* ( $n = 1$ ), *FH* ( $n = 1$ ), *SDHA* ( $n = 1$ ) [164]. В исследовании G. Tedaldi et al. было проведено NGS панели из 94 генов для 96 больных РЖ. Пациенты прошли консультацию врача-генетика и были отобраны, согласно критериям, специфичным для синдрома наследственного диффузного РЖ, синдрома Линча, синдромов желудочно-кишечных полипозов. В результате в 10,4 % ( $n = 10$ ) случаев были выявлены мутации в гене *CDH1*; в 11,5 % – варианты в генах *ATM*, *PALB2*, *BRCA1*, *BRCA2*, *MSH2*, *PMS2*, *BMPR1A*, *PRF1*, *BLM* [165]. Как и в представленном исследовании, больший процент находок в рассмотренных публикациях приходился на мутации в генах HRR и MMR. Низкую долю мутаций в гене *CDH1* в представленной работе, вероятно, можно объяснить более слабыми критериями отбора пациентов и низкой частотой встречаемости данного синдрома в российской популяции.

Таблица 12 – Спектр и характеристики выявленных клинически значимых герминальных вариантов у больных когорты II

Номер варианта	Номер образца	Ген	Тип наследования	Транскрипт	Тип варианта	Положение варианта в кДНК	Аминокислотная замена	rs (dbSNP)	Клиническое значение варианта	
									Критерии ACMG	Clinvar
1	HC432	<i>BRCA1</i>	АД	NM_007294	frameshift_elongation	c.5266dup	p.Gln1756ProfsTer74	rs80357906	P	P
2	HC0059	<i>BRCA2</i>	АД	NM_000059	frameshift_truncation	c.3167_3170del	p.Gln1056ArgfsTer3	rs80359372	P	P
3	HC0526	<i>BRCA2</i>	АД	NM_000059	frameshift_elongation	c.5238dup	p.Asn1747Ter	rs80359499	P	P
4	HC0247	<i>BRCA2</i>	АД	NM_000059	frameshift_truncation	c.6595del	p.Thr2199LeufsTer7	-	P	-
5	HC0010 HC0014	<i>BRCA2</i>	АД	NM_000059	frameshift_truncation	c.9253del	p.Thr3085GlnfsTer19	rs80359752	P	P
6	HC0339	<i>CDH1</i>	АД	NM_004360	stop_gained	c.1596G>A	p.Trp532Ter	-	P	-
7	HC0029	<i>CHEK2</i>	АД	NM_007194	frameshift_truncation	c.1100del	p.Thr367MetfsTer15	rs555607708	P	P
8	HC0597	<i>MLH1</i>	АД	NM_000249	inframe_deletion	c.1852_1854del	p.Lys618del	rs63751247	P	P
9	HC0064	<i>MLH1</i>	АД	NM_000249	splice_site_variant	c.1990-2A>G	-	rs267607883	P	P
10	HC0065	<i>MSH2</i>	АД	NM_000251.3	stop_gained	c.577C>T	p.Gln193Ter	rs63751326	P	P
11	HC0049	<i>PTCH2</i>	АД	NM_003738	frameshift_truncation	c.2019del	p.Tyr674IlefsTer26	rs769826884	LP	VUS
12	HC0575	<i>TP53</i>	АД	NM_000546	missense_variant	c.488A>G	p.Tyr163Cys	rs148924904	P	P
13	HC0217	<i>TP53</i>	АД	NM_000546	missense_variant	c.799C>T	p.Arg267Trp	rs55832599	P	P/ LP

14	HC0370	<i>ATM</i>	АД/ АР	ENST00000278 616.8	stop_gained	c.5932G>T	p.Glu1978Ter	rs587779852	P	P
15	HC0053	<i>ATM</i>	АД/ АР	ENST00000278 616	stop_gained	c.7240C>T	p.Gln2414Ter	rs863224462	P	P
16	HC0027	<i>BRIP1</i>	АД/ АР	NM_032043	frameshift_truncation	c.128_131del	p.Leu43TrpfsTer11	rs1064794202	P	P
17	HC0589	<i>MLH3</i>	АД/ ?	NM_001040108	stop_gained	c.628C>T	p.Arg210Ter	rs770668994	VUS	VUS
18	HC0261	<i>MLH3</i>	АД/ ?	NM_001040108	frameshift_truncation	c.979_980del	p.Leu327AspfsTer2	rs1483852500	LP	-
19	HC0042	<i>MSH3</i>	АР	NM_002439	splice_site_variant	c.2813+1G>C	-	-	LP	-
20	HC0005 HC0246	<i>MUtyH</i>	АР	NM_001048174	missense_variant	c.1103G>A	p.Gly368Asp	rs36053993	P	P
21	HC0531	<i>NTHL1</i>	АР	NM_002528	stop_gained	c.244C>T	p.Gln82Ter	rs150766139	P/LP	Conf

Сокращения: АД – аутомно-доминантный тип наследования, АР – аутомно-рецессивный тип наследования, P (Pathogenic) – патогенный вариант, LP (Likely pathogenic) – вероятно патогенный вариант, VUS (Variant with uncertain significance) – вариант с неопределенным клиническим значением, Conf (Conflicting interpretations of pathogenicity) – вариант с конфликтом интерпретации патогенности.

### 4.3 Изучение клинико-анамнестических характеристик носителей мутаций в генах, ассоциированных с наследственными опухолевыми синдромами

Средний возраст манифестации рака у носителей мутаций в генах, ассоциированных с развитием НОС, из подгруппы ПА составил  $45 \pm 15,2$  года. В 72,7 % (8/11) случаев установлена IV стадия заболевания, с преимущественным поражением более одной топографической области желудка ( $n = 4$ ; 36,4 %). В большей доле случаев РЖ был представлен аденокарциномой диффузного типа – 5/11 (45,5 %), смешанный и кишечный типы диагностированы у четверых (36,4 %) пациентов. При оценке родословных отягощенный семейный анамнез выявлен у 5 (45,5 %) пациентов – носителей мутации из подгруппы ПА (Таблица 13).

В подгруппе ПВ у носителей мутаций средний возраст манифестации первого ЗНО составил  $45,3 \pm 12,8$  года, средний возраст манифестации РЖ –  $48,1 \pm 16,3$  года. У 5/7 (71,4 %) больных наблюдался отягощенный семейный анамнез (Таблица 13).

**Таблица 13** – Данные семейного анамнеза носителей мутации в генах, ассоциированных с наследственными опухолевыми синдромами, из когорты II

Степень родства	Количество родственников пробанда с ЗНО, абс./%		Количество родственников пробанда с РЖ, абс./%	
	Подгруппа ПА	Подгруппа ПВ	Подгруппа ПА	Подгруппа ПВ
<b>I степень родства</b>	5 (100,0 %);	3 (42,9 %)	3 (60,0 %)	-
<b>II степень родства</b>	4 (80,0 %);	2 (28,6 %)	2 (40,0 %)	-
<b>III степень родства</b>	2 (40,0 %);	1 (14,3 %)	-	-
	Среднее количество родственников с ЗНО, абс.		Среднее количество родственников с РЖ, абс.	
<b>I степень родства</b>	1,4	2,0	1	-
<b>II степень родства</b>	2,0	2,0	1	-
<b>III степень родства</b>	2,5	1	-	-
<b>Число вовлеченных поколений</b>	2,6	1,3	2	-

При оценке критериев NCCN для отбора больных РЖ, нуждающихся в проведении ДНК-диагностики, чувствительность и специфичность таковых составила 9,4% и 93,3%, соответственно (Таблица 14). Таким образом, 90,6 % наследственно-ассоциированных случаев РЖ не соответствовали критериям NCCN.

**Таблица 14** – Соответствие клинических характеристик пациентов когорты II рекомендациям Национальной комплексной онкологической сети (NCCN) по отбору больных, нуждающихся в ДНК-диагностике для исключения наследственной формы раком желудка

№	Критерий NCCN	Когорта II, абс.	Наследственный РЖ, абс.
1	Больной с манифестацией РЖ в возрасте до 40 лет	62	2
2	Больной РЖ в возрасте до 50 лет, у которого один родственник I или II степени родства болел РЖ	18	1
3	Больной РЖ в любом возрасте, имеющий $\geq 2$ родственников I или II степени родства, больных РЖ	19	1
4	Больной РЖ и РМЖ с манифестацией первого ЗНО в возрасте до 50 лет	7	1
5	Больной РЖ в любом возрасте, у которого в семейном анамнезе наблюдался случай РМЖ у родственника I или II степени родства, диагностированный в возрасте до 50 лет	2	1
6	Больной РЖ в любом возрасте с наличием в семейном анамнезе ювенильных полипов или полипозов желудочно-кишечного тракта	0	0
7	Больной РЖ в любом возрасте при наличии в семейном анамнезе случаев рака, ассоциированного с синдромом Линча (колоректальный рак, рак эндометрия, тонкой кишки или мочевыводящих путей)	8	4
8	Соответствие рекомендациям NCCN, абс./%	106 (70,2)	10/13 (76,9)

Соотношение выявленных ВНП в подгруппах IIА и IIВ составила 58,8 % ( $n = 10$ ) / 41,2 % ( $n = 7$ ) соответственно. В общей сложности 7,6 % (10/131) больных подгруппы IIА и 35,0 % (7/20) больных подгруппы IIВ являлись носителями мутаций в генах НОС ( $p = 0,0021$ ; ОШ = 6,515; 95 % ДИ 2,233–20,60). В 6/7 (85,7 %) случаев РЖ из подгруппы IIВ были представлены кишечным гистотипом.

В общей сложности наследственно-ассоциированный РЖ выявлен при НОС с высокой и средней пенетрантностью у 13 (8,6 %) пациентов:

– синдром наследственного рака молочной железы и яичников (гены *BRCA1/2*; OMIM #612555, OMIM #604370) – в 4,0 % ( $n = 6$ ) случаев;

– синдром Линча (гены *MLH1* и *MSH2*; OMIM #158320, #158320) – в 2,0 % ( $n = 3$ ) случаев;

– *TP53*-ассоциированный опухолевый синдром (ген *TP53*, OMIM #151623) – в 1,3 % (n = 2) случаев;

– синдром наследственного диффузного РЖ (ген *CDH1*, OMIM #137215) – в 0,7 % (n = 1) случаев;

– Ли – Фраумени-подобный синдром (ген *CHEK2*, OMIM #609265) – в 0,7 % (n = 1) случаев.

Подробные клинико-anamнестические данные пациентов – носителей мутаций в генах, связанных с НОС, отображены в таблице 15.

**Таблица 15** – Основные клинико-анамнестические данные больных когорты II – носителей клинически значимых вариантов нуклеотидной последовательности в генах наследственных опухолевых синдромов с аутосомно-доминантным типом наследования

№ пациента	№ образца	Пол	Ген	Coding	Диагноз	Возраст манифестации	Локализация ЗНО	Стадия	Метастатические очаги	Гистологический тип	Классификация Loupen	Семейный анамнез (степень родства)- кол-во родственников
1	HC0059	М	<i>BRCA2</i>	c.3167_3170del	РЖ	52	Кардия	IV	Печень Легкие Брюшина	АК	Нд	РПеч (I) –1 РТМ (I) –1 РЖ (II) –1 РМЖ (II) –1 РТК (II) –1 РЖ/РТК (II) –1
2	HC0010	Ж	<i>BRCA2</i>	c.9253del	РЖ	50	>1 области	IV	Брюшина	Нд	Нд	РЖ (I) –1 РМЖ (II–IV) – 4 РТК (III) – 2
3	HC0014	Ж	<i>BRCA2</i>	c.9253del	РЖ	35	Тело	IV	Брюшина	АК с ПК компонентом	СМ	РЖ (I) –1 РМЖ (II–III) – 2 РТК (III) – 2 РМЖ (IV) – 2
4	HC0339	М	<i>CDH1</i>	c.1596G>A	РЖ	41	Тело	II	–	ПК	ДИФ	Но
5	HC0575	М	<i>TP53</i>	c.488A>G	РЖ	54	Кардия	IV	Брюшина	ПК	ДИФ	Саркома (I) -1 ОГМ/МТС в ГМ (I) -1
6	HC0029	Ж	<i>CHEK2</i>	c.1100del	РЖ	35	Дно	II	-	ПК	ДИФ	Но

7	HC0049	Ж	<i>PTCH2</i>	c.2019del	РЖ	37	Преддверие привратника	IV	Брюшина Яичники	АК с ПК компонентом	СМ	Но
8	HC0589	Ж	<i>MLH3</i>	c.628C>T	РЖ	76	>1 области	IV	Легкие	АК	КИШ	РЖ (I) – 1 РЖ (II) – 2
9	HC0261	Ж	<i>MLH3</i>	c.979_980 del	РЖ	39	>1 области	IV	Яичники, Забрюш. л/у Канцероматоз Асцит	ПК	ДИФ	Нд
10	HC0027	М	<i>BRIP1</i>	c.128_131 del	РЖ	23	>1 области	IV	Печень Брюшина	ПК	ДИФ	Но
11	HC432	Ж	<i>BRCA1</i>	c.5266dup	РЖ	45	Нд	Нд	Нд	Нд	Нд	РМЖ (?) – 1 РТМ (?) – 1
					РЯ	45	Нд	Нд	Нд	Нд	Нд	
12	HC0526	М	<i>BRCA2</i>	c.5238dup	РЖ	68	>1 области	IV	Печень	АК	КИШ	ЗНО неизвестной локализации
					РПрЖ	68	Нд	II	-	АК	-	
13	HC0247	Ж	<i>BRCA2</i>	c.6595del	РМЖ	37	-	IV	Нд	АК ТНМП	-	Но
					РЖ	40	Кардия	II	-	АК	КИШ	
14	HC0597	Ж	<i>MLH1</i>	c.1852_1854del	РМЖ	43	-	Нд	-	Нд	-	ТРК (I) – 3 РпрЖ (I) – 1 РТК (II) – 2 РМЖ (II) – 1
					РТМ	45	Эндометрий	Нд	-	Нд	-	
					РЖ	54	Тело	I	-	Нд	КИШ	
					РТК	61	Сигмовидная кишка	III	-	АК	-	

15	НС0064	М	MLH1	с.1990– 2A>G	РЖ	27	Кардия	III	–	АК	КИШ	РТК (I) –1 РТМ/РТК (I) –1 РТК (II–III) – 2
					Карци– ноид	30	Тонкая кишка	–	–	–	–	
					РТК	31	Толстая кишки	I	–	Недифферен цированный рак	–	
16	НС0065	М	MSH2	с.577C>T	Рак сальных желез	65	Сальные железы спины и кисти	I	–	Плоскоклеточ ный	–	РТК (I) –1 РМП (I) –1 Рак ОЖРС (I) –1
					РМП	67	–	I	–	Нд	–	
					РЖ	69	Нд	III	–	АК	КИШ	
17	НС0217	М	TP53	с.799C>T	МК	32	Бедро	I	–	–	–	РЛ (I) –1
					РЖ	34	Кардия	I	–	АК	КИШ	

*Сокращения:* РПеч – рак печени, РТМ – рак тела матки, РЖ – рак желудка, РМЖ – рак молочной железы, РТК – рак толстой кишки, РМП –рак мочевого пузыря, РЛ – рак легких, ОГМ – опухоль головного мозга, МТС –метастазы, ГМ – головной мозг, РПрЖ – рак предстательной железы, РЯ – рак яичников, ТнК – тонкая кишка, ОЖРС – органы женской репродуктивной системы, Но – не отягощен, Нд – нет данных, ТНМП – тройной негативный молекулярный подтип, АК – аденокарцинома, ПК – перстневидноклеточный рак, КИШ – кишечный подтип по Лаурен, ДИФ – диффузный подтип по Лаурен, СМ – смешанный подтип по Лаурен.

#### 4.4 Обсуждение полученных результатов

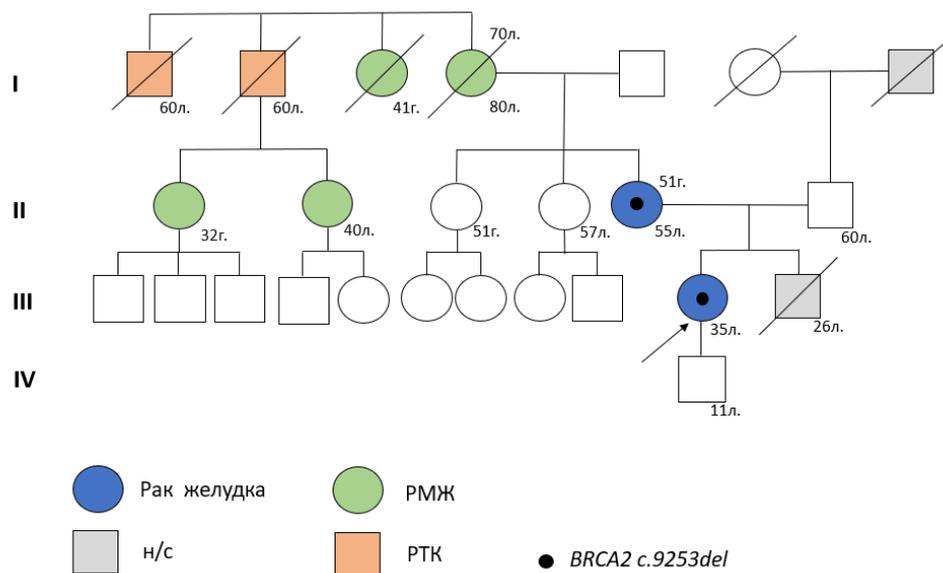
В рамках развития наследственной патологии клинический интерес в первую очередь представляют патогенные и вероятно патогенные ВМП. Каузативность конкретного варианта целесообразно оценивать в каждом случае индивидуально, принимая во внимание данные личного анамнеза и нагруженность родостовной онкологической патологией. Поскольку в представленной работе выявленные клинически значимые варианты представлены нарушениями в генах, связанных с НОС с аутосомно-доминантным типом наследования, ниже рассмотрена их роль в развитии наследственного РЖ у обследованных пробандов.

##### 4.4.1 Клинически значимые варианты нуклеотидной последовательности в генах системы репарации путем гомологичной рекомбинации

Репарация путем гомологичной рекомбинации является высокоточной системой, участвующей в репарации двухцепочечных разрывов ДНК, и имеет решающее значение для разрешения остановившихся репликационных вилок во время клеточного деления. Анализ нарушений в генах HRR становится все более важным для выявления пациентов, отвечающих на лечение ингибиторами поли(аденозиндифосфат [АДФ]-рибоза) полимеразы (PARP). На сегодняшний день эти препараты применяют при раке яичников, молочной железы, поджелудочной железы и предстательной железы. Другие типы рака, вероятно и РЖ, последуют за ними. Клинически дефицит гомологичной рекомбинации (HRD) имеет широкое определение, начиная от повреждающих мутаций в отдельных генах HRR (*BRCA1*, *BRCA2*, *PALB2*, *BARD1*, *ATR*, *ATRXL*, *ATM*, *BAP1*, *RAD51B*, *RAD51C*, *RAD51D*, *BRIP1*, *NBN*, *CHEK1*, *CHEK2*, *FANCA*, *FANCC* и *MRE11*) до сложных геномных нарушений [166]. Одними из наиболее значимых представителей системы гомологичной рекомбинации являются гены *BRCA1/2* – супрессоры опухолевого роста, мутации в которых широко изучены как причина синдрома наследственного рака молочной железы и яичников (OMIM#604370, OMIM#612555), в качестве факторов риска развития рака поджелудочной железы (OMIM#614320), предстательной железы (OMIM# 176807), медуллобластомы (OMIM#155255), РМЖ у мужчин (OMIM#114480), опухоли Вильмса (OMIM#194070). Многочисленные публикации в последние годы также свидетельствуют о повышенном риске развития РЖ у носителей мутаций в этих генах [167-170]. Так, в недавнем исследовании для Японской когорты пациентов – носителей мутации в гене *BRCA1* кумулятивный риск развития РЖ к возрасту 85 лет составил 21,3 %, в гене *BRCA2* – 19,3 % [170]. Однако необходимо учесть повышенный общепопуляционный риск формирования РЖ в этой популяции. Уровень риска РЖ для носителей мутаций в генах

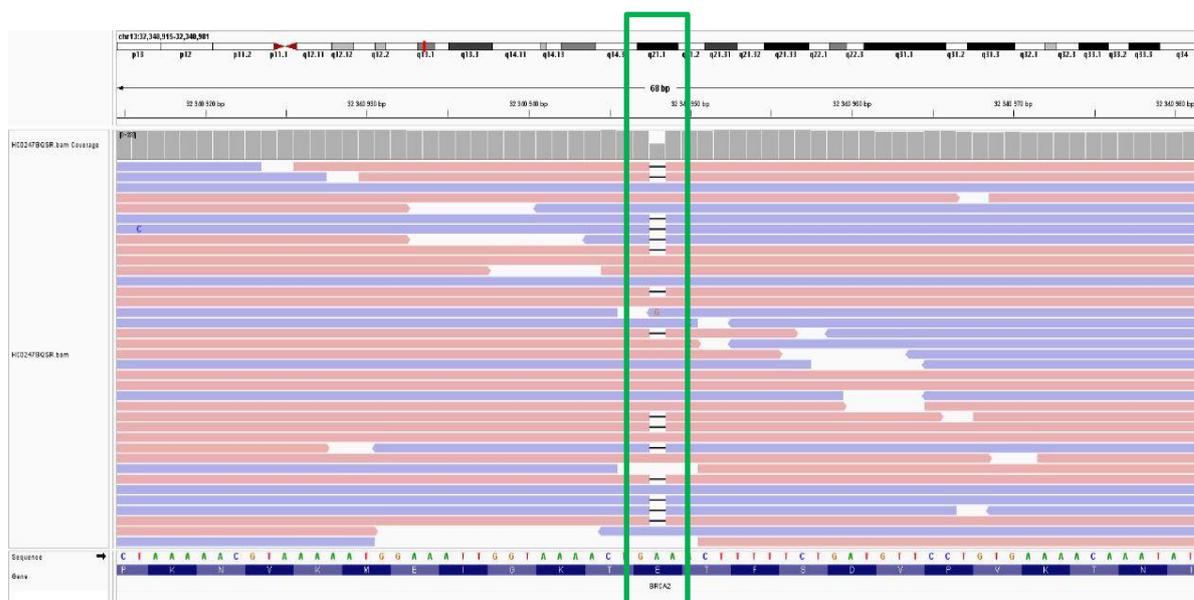
*BRCA1/2* из европейской популяции до сих пор не определен. В представленном исследовании в подавляющем большинстве случаев ( $n = 6/151$ ; 3,9%) у обследованных с РЖ выявлены мутации в генах *BRCA1/2*, в 4 (2,6 %) из которых в составе ПМЗН. Как и в других исследованиях, патогенные варианты в гене *BRCA2* были идентифицированы чаще в сравнении с мутациями в гене *BRCA1* – 5 vs 1 пациентов [171]. В связи с малочисленностью обследованной группы расчет индивидуального риска развития РЖ невозможен.

Показательный случай семейного *BRCA*-ассоциированного РЖ в исследованной когорте продемонстрирован на примере семьи пациента с носительством варианта *c.9253del* (p.Thr3085GlnfsTer19, rs80359752) в гене *BRCA2*. На рисунке 13 представлена родословная пациентки НС0010, 35 лет, с диссеминированным РЖ, гистологически – смешанным подтипом. Пациентка прошла комбинированное лечение, однако, в связи с прогрессированием заболевания, погибла в возрасте 36 лет. Мать пациентки также заболела РЖ в 50 лет, диагноз был установлен на IV стадии. В течение трех лет после постановки диагноза, с учетом распространенности процесса, получала капецитабин, со стабилизацией. Кроме того, в соответствии с классическим проявлением синдрома наследственного РМЖ и РЯ, во II–III поколениях данной семьи наблюдались многочисленные случаи РМЖ, а также случаи колоректального рака (Рисунок 13). Сегрегация данного варианта с клиническими проявлениями в данной семье позволяет сделать вывод о каузативности мутации *c.9253del* в гене *BRCA2* в развитии семейного РЖ.



**Рисунок 13** – Родословная пациентки НС0010 –носительницы мутации *c.9253del* в гене *BRCA2*

Также значимой находкой в представленном исследовании стал ранее не зарегистрированный вариант c.6595del в 11 экзоне гена *BRCA2* у пациентки HC0247 с метахронными РЖ и РМЖ. Вариант c.6595del расположен в высоко консервативной области гена, представлен делецией аденина в 6595 положении. Выявленная делеция приводит к преждевременной терминации синтеза белка через 7 аминокислот в результате сдвига рамки считывания (Рисунок 14). Данные о частоте минорного аллеля отсутствуют в базах данных популяционных частот gnomAD Genomes и gnomAD Exomes. Согласно критериям ACMG (PVS1, PM2), учитывая фенотип заболевания, вариант оценен как патогенный и каузативный.



**Рисунок 14** – Герминальный вариант c.6595del в гене *BRCA2* в гетерозиготной форме, идентифицируемый с использованием IGV-браузера

Вторым наиболее часто мутирующим геном из системы HRR является ген *CHEK2*, гетерозиготные мутации в котором ассоциированы с Ли – Фраумени-подобным синдромом (OMIM#609265), предрасположенностью к РМЖ (OMIM#114480), колоректальному раку (OMIM#114500) и семейному раку предстательной железы (OMIM#176807). В исследовании U. Teodorczyk et al. мутация в гене *CHEK2* наблюдалась у 57 из 658 (8,7 %) неотобранных больных РЖ (ОШ = 1,6;  $p = 0,004$ ) и 19 из 154 (12,3 %) семейных случаев (ОШ = 2,3;  $p = 0,001$ ). ОШ для РЖ у лиц в возрасте младше 50 лет было выше (2,1;  $p = 0,01$ ), чем у пациентов в возрасте 50 лет и старше (ОШ = 1,4;  $p = 0,05$ ). Укорачивающие мутации в гене *CHEK2* были связаны с более высоким риском развития РЖ (ОШ = 2,1;  $p = 0,02$ ). Выявленный вариант c.1100del является одной из наиболее распространенных мутаций в гене *CHEK2*: частота минорного аллеля 1100del в европейской популяции составляет 1,1–1,4 %, в России – 2–5 % [172-174]. Вариант c.1100del был выявлен у пациентки HC0029 без отягощенного семейного анамнеза с диффузным раком дна желудка, установленным в возрасте 35 лет [175]. Было

проведено комбинированное лечение, однако, в связи с быстрым прогрессированием заболевания, пациентка погибла в возрасте 36 лет.

Как известно на сегодняшний день, гомозиготные и компаунд гетерозиготные мутации в гене *ATM* являются причиной атаксии-телеангиэктазии (ОМIM# 208900) – редкого аутосомно-рецессивного заболевания, характеризующегося мозжечковой атаксией, телеангиэктазиями, иммунными дефектами и предрасположенностью к ЗНО. Мутации в гене *ATM* в гетерозиготном положении являются фактором риска развития РМЖ (ОМIM#114480). Было установлено, что у гетерозиготных носителей мутации в гене *ATM* вероятность РМЖ в два раза выше, чем в нормальной популяции. Варианты с потерей функции *ATM* вызывают увеличение риска развития РМЖ в 10 раз больше, чем миссенс-варианты [176]. Однако некоторые миссенс-мутации, например вариант p.Val2424Gly, по-видимому, связаны с более высоким риском РМЖ, сравнимым с таковым при мутациях в гене *BRCA2* [177]. Кроме того, у женщин моложе 50 лет риск РМЖ был повышен в 5 раз [178]. Предполагается, что для других ЗНО у носителей патогенных вариантов в гене *ATM* в возрасте до 50 лет общий риск развития рака с 2,23 (94 % ДИ = 1,26–4,28) увеличивается до 4,94 (95 % ДИ = 1,90–12,9) [179]. Накапливается все больше информации о связи гетерозиготных вариантов в гене *ATM* с предрасположенностью и к колоректальному раку, раку предстательной железы, поджелудочной железы и желудка [180–183].

В исследовании M. J. Hall et al. отмечено значительное увеличение риска РЖ (ОШ = 2,97; 95 % ДИ = 1,66–5,31) у гетерозиготных носителей мутации в гене *ATM* в сравнении с общей популяцией [184]. В исследовании H. Helgason et al. проведен полногеномный поиск ассоциаций (Genome-Wide Association Studies, GWAS) для 2 500 больных РЖ азиатской популяции, при котором у гетерозиготных носителей вариантов в гене *ATM* также выявлен повышенный риск развития РЖ (ОШ = 4,74; 95 % ДИ 3,03–7,40). Средний возраст манифестации *ATM*-ассоциированного РЖ в этом исследовании составил  $69,6 \pm 12,4$  года ( $p = 0,0078$ ), что значительно выше возраста пациентов из представленного исследования. Фенотип пациентов – носителей патогенных ВМП в гене *ATM* в представленном исследовании значительно отличался. Вариант c.5932G>T выявлен у пациента HC0370, 34 лет, без ЗНО в семейном анамнезом. Мутация c.7240C>T обнаружена у больного HC0053, 49 лет, с семейным РЖ: РЖ у матери – в 66 лет, РЖ у дяди по матери – в 50 лет. Оба выявленных варианта являются нонсенс-мутациями, которые приводят к преждевременной терминации синтеза белка (PVS1) и описаны в базах данных ClinVar, Varsome как патогенные клинически значимые варианты.

Ген *BRIP1* также является составным звеном системы HRR. Гетерозиготные патогенные герминальные ВМП в этом гене описаны как фактор предрасположенности к РМЖ

(OMIM#114480) [185]. Согласно данным литературы, до 0,6–0,9 % случаев РЯ могут быть ассоциированы с патогенными вариантами в гене *BRIP1*, однако процентное соотношение может варьировать в разных популяциях [186, 187]. Сообщалось о редких случаях рака предстательной железы, связанного с мутациями в гене *BRIP1*, фенотипически схожим с *BRCA2*-ассоциированным раком предстательной железы [188]. В исследовании Ji. Ke et al. частота носительства мутаций в гене *BRIP1* у пациентов с РЖ составила 0,7 % (2/282) [189]. Выявленный вариант с.128\_131del в гене *BRIP1*, представленный делецией 4 нуклеотидов, приводит к преждевременной терминации синтеза белка. Критерии ACMG (PVS1, PP5, PM2) позволяют отнести данный вариант к патогенным. Ранее вариант описан как патогенный у женщины с ПМЗН (ЗНО молочной железы в 47 лет и щитовидной железы – в 62 года) и у пробанда с семейным РЯ [187, 190]. У пациента HC0027, носителя мутации с.128\_131del, диффузный РЖ диагностирован на распространенной стадии в возрасте 23 лет, семейный анамнез пациента не был отягощен.

#### 4.4.2 Клинически значимые варианты нуклеотидной последовательности в генах системы репарации неспаренных оснований

Как было описано ранее, опухоли с дефицитом системы MMR, одного из видов эксцизионной репарации, имеют значительный клинический интерес [191]. Генетические или эпигенетические события, приводящие к молчанию одного из генов *MLH1*, *PMS2*, *MSH2*, *MSH6*, *MLH3*, *MSH3* и *PMS1*, проявляются в появлении мутантного фенотипа, образованию неоантигенов с последующей МСН и чувствительностью к иммунотерапии [192]. В представленном исследовании в общей сложности выявлено 5/151 (3,3 %) пациентов с патогенными ВМП в генах MMR. Из них у лиц с ПМЗН, характерными для синдрома Линча, были выявлены 2 (1,3 %) ранее зарегистрированных варианта с.1852\_1854del и с.1990-2A>G в гене *MLH1*, один (0,7 %) вариант с.577C>T в гене *MSH2*. Фено-генотипические характеристики данных пациентов представлены в таблице 15.

Кроме того, у пациентов из подгруппы I с органспецифическим РЖ выявлены 2 (1,3 %) гетерозиготных клинически значимых варианта в гене *MLH3*. Вариант с.628C>T расположен во 2-м экзоне гена *MLH3* и представлен нонсенс-мутацией в 210 положении. Частота этого варианта, по данным gnomAD Exomes, составляет 0,0000279, gnomAD Genomes – 0,0000197. Три программы предсказания патогенности *in silico* идентифицируют данный вариант как патогенный (EIGEN PC, EIGEN, LRT), одна – как повреждающий (FATHMM-MKL) и одна – как вариант с неопределенным клиническим значением (MutationTaster). В базе данных ClinVar вариант дважды описан как ВМП с неопределенным клиническим значением. Согласно

критериям ACMG (PM2, PVS1, PP3) охарактеризован как вероятно патогенный. Данный вариант диагностирован у пациента HC0589 с манифестацией кишечной аденокарциномы желудка в 76 лет. В семейном анамнезе больной наблюдали 2 случая РЖ в I и II поколениях. Второй выявленный вариант, с.979\_980del во 2-м экзоне гена *MLH3*, является делецией 2 нуклеотидов, приводящий к терминации синтеза белка через 2 аминокислоты. Популяционная частота данного варианта равна 0,00000378 (gnomAD Genomes). Согласно критериям ACMG (PVS1, PM2) данный вариант охарактеризован как патогенный. Манифестация РЖ у пробанда HC0261 – носителя мутации с.979\_980del наблюдалась в 39 лет, семейный анамнез не был отягощен.

На сегодняшний день опубликовано малое количество сообщений о вкладе изолированных мутаций в гене *MLH3* в предрасположенность к раку [193, 194]. Ген *MLH3* напрямую взаимодействует с геном *MLH1* и является звеном системы MMR [192]. Тип наследования и степень пенетрантности мутаций в гене *MLH3* остаются предметом изучения. Согласно источникам литературы, патогенные герминальные мутации в гене *MLH3* приводят к развитию наследственного неполипозного рака толстой кишки 7 типа (OMIM #614385), а в гетерозиготном состоянии являются причиной предрасположенности к раку эндометрия (OMIM #608089). Кроме того, описаны случаи аденоматозного полипоза у пациентов с биаллельными нонсенс-вариантами в гене *MLH3* [195]. В работе М. К. Korhonen et al. миссенс-варианты в гене *MLH3* функционально охарактеризованы как мутации с низким риском развития синдрома Линча [196]. Qiao-qi Sui et al. предположили, что гетерозиготные варианты в гене *MLH3* могут потенцировать патогенное влияние мутаций в гене *MLH1*, приводя к фенотипу синдрома Линча [197]. Отсутствие возможности проведения сегрегационного анализа в семьях обследованных пробандов из представленного исследования также не дает оснований охарактеризовать варианты с.628C>T и с.979\_980del в гене *MLH3* как каузативные.

Другие 2,7 % ( $n = 4/151$ ) клинически значимых ВМП были выявлены в генах с аутосомно-доминантным типом наследования вне систем репарации ДНК.

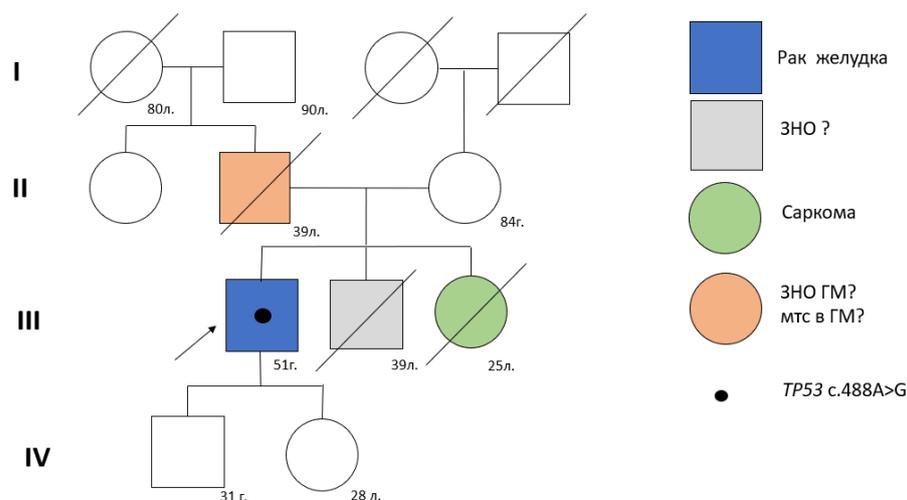
#### **4.4.3 Клинически значимые варианты нуклеотидной последовательности в гене *TP53***

Ген *TP53* представляет собой наиболее изученный опухолевый супрессор, мутации в котором являются причиной *TP53*-ассоциированного опухолевого синдрома, ранее известного как синдром Ли – Фраумени (СЛФ). СЛФ характеризуется аутосомно-доминантным типом наследования, ранней манифестацией и широким спектром опухолей: РМЖ (26,4 %), опухоли центральной нервной системы (13,1 %), саркомы мягких тканей (11,6 %), остеосаркомы (9,1 %),

адренокортикальный рак (5,2 %), гемобластозы (4,7 %), колоректальный рак (3,6 %), рак легких (3,6 %), рак желудка (3,1 %), на другие локализации приходится 19,4 % опухолей [198]. СЛФ ассоциирован с практически абсолютным риском развития ЗНО. Кумулятивный риск возникновения хотя бы одной опухоли достигает 40–50 % к 30 годам, а к 70 годам приближается к 80–100 % [199]. Всего в представленном исследовании в 1,3 % ( $n = 2/151$ ) случаев выявлен *TP53*-ассоциированный РЖ. Проявления заболевания и семейный анамнез у носителей мутации в гене *TP53* значительно отличались.

Так, у пациента НС0575, 51 года, при обследовании в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России в 2011 г. выявлен РЖ с переходом на пищевод, с метастазами (мтс) в печень. В связи с полной дисфагией выполнено стентирование пищевода на 2 см выше образования. На 8-е сутки после второго курса полифимioterпии (ПХТ) на фоне рвоты произошла эвакуация стента, после чего состояние пациента значительно улучшилось, появился аппетит, в полном объеме восстановилось прохождение пищи по пищеводу. Проведено 4 курса химиотерапии по схеме иринотекан в комбинации с оксалиплатином и 5-фторурацилом. При контрольном обследовании выявлено прогрессирование заболевания в виде увеличения числа мтс в легких, по плевре, площади поражения желудка. Начата вторая схема ПХТ по схеме таксотер + кселода до 12 курсов. При контрольных обследованиях после 3, 6, 9, 12 циклов ПХТ зарегистрирован частичный эффект с полной резорбцией первичной опухоли желудка, подтвержденный морфологически. Отмечена прибавка в весе на 7 кг. Далее с декабря 2012 г. проведено 11 циклов поддерживающей терапии кселодой, на протяжении которых сохранялся достигнутый частичный эффект. При обследовании в июле 2013 г. зарегистрировано увеличение количества мтс по плевре. Проведено три цикла химиотерапии по схеме таксотер + кселода + авастин, при контрольном обследовании зафиксирована стабилизация процесса. После четвертого цикла ПХТ отмечено прогрессирование в виде появления мтс в нижней трети пищевода. В качестве 3-й линии ПХТ больному проведено два цикла по схеме митомицин Ц + иринотекан. При обследовании отмечена регрессия мтс в нижней трети пищевода, но увеличение количества мтс по плевре. С января 2014 г. при эзофагогастродуоденоскопии отмечено сохранение полной регрессии первичной опухоли желудка, стабилизация парагастрального лимфоузла по данным ультразвукового исследования. Мтс в печени не определялись, при рентгенографии органов грудной полости размеры мтс в легких без динамики, отмечено увеличение мтс по плевре до 0,3 см. Констатирована стабилизация процесса. При последней госпитализации для проведения ПХТ по схеме иринотекан + оксалиплатин выполнена эзофагогастродуоденоскопия, где в среднегрудном отделе пищевода на уровне 29–30 см ранее выявленные подслизистые образования 0,3 и 0,5 см по передней и задней стенкам желудка не определяли. Кардиоэзофагальный переход на уровне

41 см от резцов, по передней и задней стенкам на месте язвенных дефектов диагностированы два белесоватых рубца, формирование кольца Шацкого. Розетка кардии была сужена за счет рубцовых изменений, свободно проходима эндоскопом, зияла. В субкардиальном отделе желудка с переходом на кардию на месте опухолевой инфильтрации определяли разрыхление слизистой. Все стенки желудка описаны как эластичные, слизистая атрофична. Более поздней информации об истории болезни пациента нет. При медико-генетическом консультировании в 2014 г. выяснено, что семейный анамнез пациента был значительно отягощен (Рисунок 15).



**Рисунок 15** – Родословная пациента HC0575 – носителя варианта с.488A>G в гене *TP53*

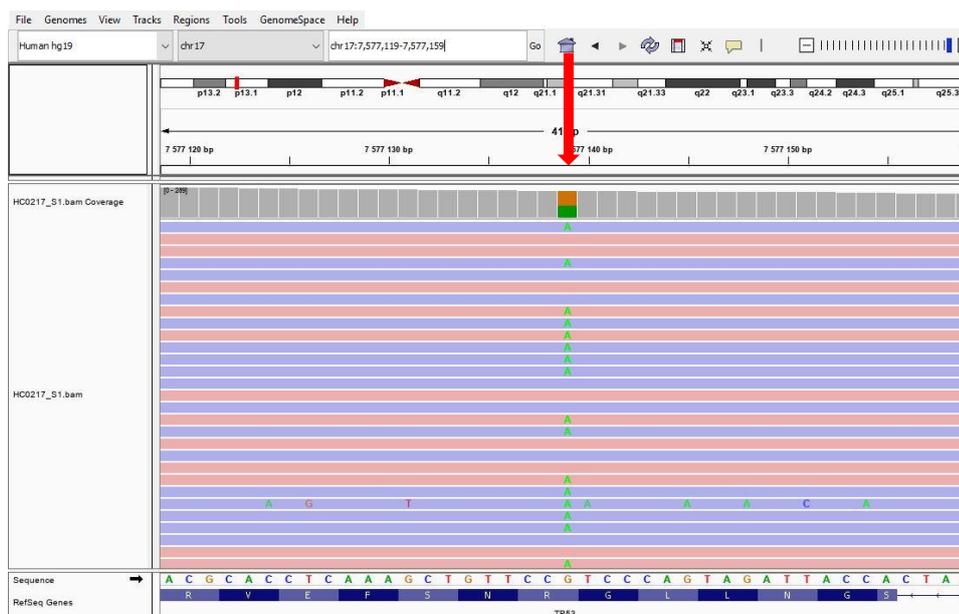
В ходе NGS у пациента HC0575 выявлен ВНП с.488A>G в экзоне 5 гена *TP53* (NM\_000546.6), приводящий к замене тирозина на цистеин в 163 положении. Частота мутантного аллеля G составляет 0,00000657 (gnomAD Genomes). Данный вариант ранее зарегистрирован в базе данных Clinvar как патогенный клинически значимый вариант, описан в более 10 наблюдениях как соматический вариант в «горячей» точке. А. Giacomelli et al. описали доминирующий отрицательный эффект и потерю функции белка p53 в присутствии данного варианта [200, 201]. Об этой мутации сообщали у двух пробандов, соответствующих критериям Шомпре [202, 203], и в одном наблюдении *de novo* варианта у пробанда в возрасте до 5 лет с клиническими проявлениями СЛФ [204]. В базе данных The *TP53* Database вариант с.488A>G также зарегистрирован как патогенный, согласно критериям ACMG (PP5, PS3, PM1, PP3, PM2) охарактеризован как патогенный.

Несмотря на классически агрессивное течение ЗНО, возраст манифестации ЗНО у пробанда-носителя мутации с.488A>G из представленного исследования был значительно старше, чем у большинства пациентов с СЛФ. Кроме того, общая выживаемость у больного с

момента постановки диагноза РЖ составила более трех лет, на фоне проводимой ПХТ отмечен значительный регресс заболевания с полной деструкцией первичных очагов РЖ.

Второй клинически значимый вариант с.799С>Т в гене *TP53* выявлен у пациента №НС0217 с манифестацией меланомы кожи бедра T1aN0M0 в возрасте 32 лет, выполнено иссечение. В последующем в 34 года в ходе профилактической фиброгастроуденоскопии случайно выявлен полип в области кардии желудка, выполнена биопсия. При гистологическом исследовании биоптата определены фокусы аденокарциномы умеренной степени дифференцировки, установлен диагноз рак субкардиального отдела желудка T1aN0M0, I стадия. Выполнена эндоскопическая резекция слизистой желудка. В семейном анамнезе пробанда выявлен случай рака легких у отца в 56 лет.

Вариант с.799С>Т (Рисунок 16) в гене *TP53* представлен миссенс-мутацией с заменой аргинина на триптофан в 267 положении в ДНК-связывающем домене. Данный вариант зарегистрирован в базе данных Clinvar, отсутствует в контрольных выборках gnomAD Exomes и gnomAD Genomes. В многочисленных публикациях сообщалось о носительстве варианта с.799С>Т у лиц, страдающих СЛФ с различными видами ЗНО. Однако этот вариант также был зарегистрирован у здоровых людей, включая одного индивида с гомозиготным носительством, что отражает возможную более низкую пенетрантность варианта [208,209]. В. Wang et al. и L. R Dearth et al. сообщали, что этот вариант нарушает нормальную активность белка [207,208]. Восемь лабораторий классифицировали вариант с.799С>Т как патогенный ( $n = 3$ ) и вероятно патогенный ( $n = 5$ ).

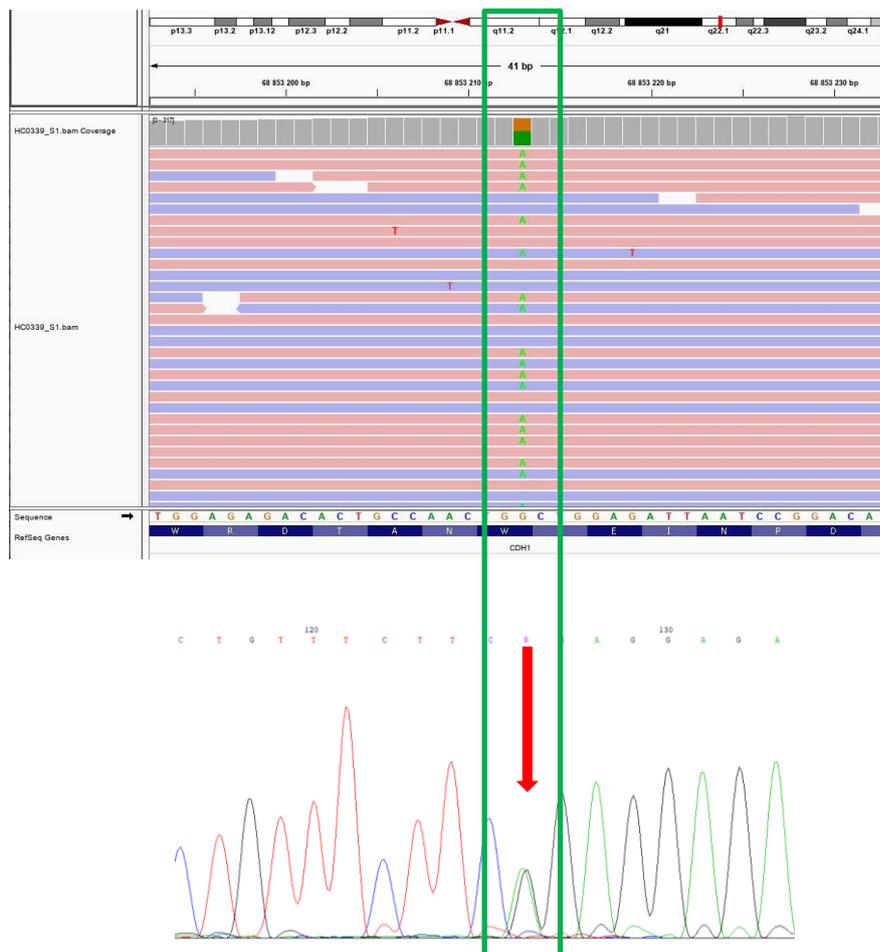


**Рисунок 16** – Герминальный вариант с.799С>Т (p.Arg267Trp) в гене *TP53* в гетерозиготной форме (указан стрелкой), идентифицируемый с использованием IGV-браузера

Учитывая клинические данные пробанда HC0217, а также критерии ACMG (PP5, PM1, PM5, PP3, PM2), вариант с.799C>T в гене *TP53* расценен как вероятно патогенный.

#### 4.4.4 Клинически значимый вариант нуклеотидной последовательности в гене *CDH1*

Наиболее интересной находкой в представленном исследовании стала идентификация нового патогенного варианта с.1596G>A в 11 экзоне гена *CDH1* (Рисунок 17) [209]. Замена гуанина на аденин в 1596 позиции является причиной возникновения стоп-кодона и преждевременной остановки синтеза белка. Выявленный вариант ранее не зарегистрирован в базах данных популяционных частот gnomAD Exomes и gnomAD Genomes, согласно критериям ACMG, классифицирован как патогенный (PVS1).



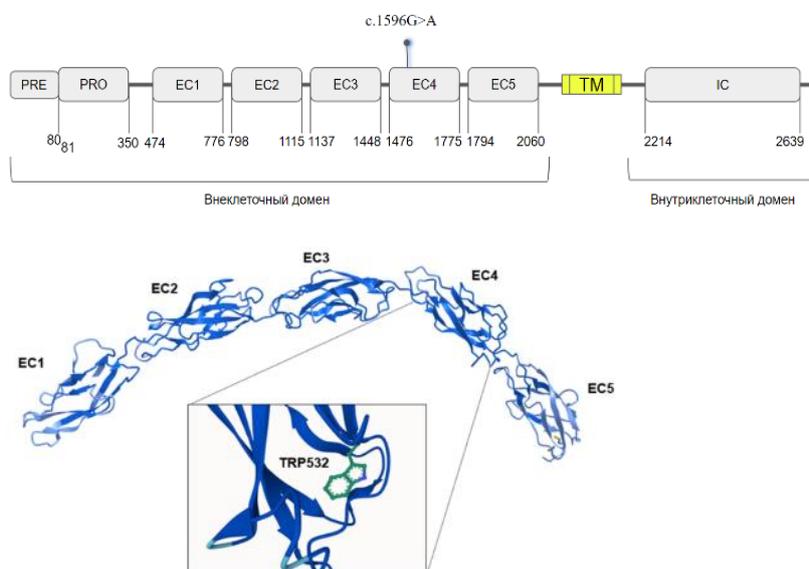
1. Визуализация варианта с.1596G>A в гене *CDH1* в гетерозиготной форме с использованием IGV-браузера

2. Фрагмент последовательности гена *CDH1* и вариант с.1596G>A в гетерозиготной форме (указан стрелкой) на секвенограмме

**Рисунок 17** – Герминальный вариант с.1596G>A в гене *CDH1* в гетерозиготной форме, идентифицируемый с использованием IGV-браузера и подтвержденный секвенированием по Сэнгеру

Как известно на сегодняшний день, дополнительные функциональные исследования для определения клинического значения ВНП в гене *CDH1*, как правило, требуются при выявлении миссенс-вариантов (20 % случаев). Миссенс-мутации приводят к образованию полноразмерных молекул Е-кадгерина, поэтому их влияние на функцию белка непредсказуемо [210]. Терминирующие варианты в гене *CDH1*, такие как вариант с.1596G>A (p.Trp532Ter), приводят к полной потере экспрессии Е-кадгерина из-за возникновения преждевременного стоп-кодона, укорочения белка, оказывая патогенное влияние.

Клинически пробанду HC0339 в возрасте 41 года был установлен диагноз рак тела и проксимального отдела желудка с переходом на проксимальный отдел пищевода T4aN1M0, IIIA ст., диффузного типа, без экспрессии рецептора HER2-neu. Как известно, С-концевые домены кадгерина EC3, EC4 и EC5 отвечают за гетеродимеризацию с другими молекулами адгезии или рецепторными тирозинкиназами. Таким образом, возникновение замены с.1596G>A может привести к нарушению этой функции и потере межклеточной адгезии [116, 211]. В исследовании W. Lo et al. отмечено, что при носительстве укорачивающих вариантов в С-концевых доменах EC3/4/5, таких как вариант с.1596G>A (Рисунок 18), ДРЖ манифестировал после 40 лет, что также наблюдалось у пациента HC0339 [116].



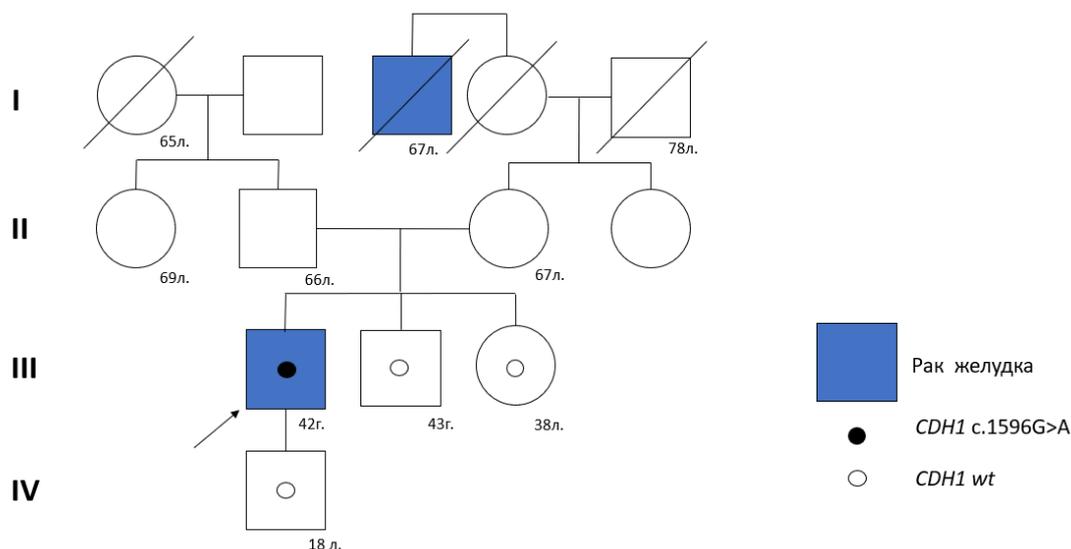
1. Структура гена *CDH1* и вариант с.1596G>A

2. Положение варианта с.1596G>A в структуре белка Е-кадгерин

**Рисунок 18** – Положение варианта с.1596G>A в гене *CDH1* и визуализация 3D-структуры белка Е-кадгерин

В связи с отказом родителей пробанда от ДНК-диагностики, оценить пенетрантность варианта с.1596G>A затруднительно, так как не исключен *de novo* характер мутации (Рисунок 19). Ранее соматическая мутация с.1596G>A в гене *CDH1*, аналогичная выявленной, была зарегистрирована в опухоли пищевода [212]. В исследовании P. R. Venusiglio et al. у больного ДРЖ 44 лет описан патогенный вариант с.1595G>A, находящийся в соседнем

нуклеотиде с выявленным вариантом с.1596G>A. Данный вариант также приводит к формированию преждевременного стоп-кодона в 523-м положении, терминации синтеза белка и охарактеризован как патогенный. Как и в случае пациента HC0339, P. R. Venusiglio et al. отмечают отсутствие злокачественных новообразований в семейном анамнезе пациента [213]. Упоминание о повреждающем характере мутации с.1595G>A отмечено в работе T. L. Mastracci et al. при исследовании опухолевых образцов дольчатого РМЖ [214].



**Рисунок 19** – Родословная пациента HC0339-носителя варианта с.1596G>A в гене *CDH1*

#### 4.4.5 Клинически значимый вариант нуклеотидной последовательности в гене *PTCH2*

Герминальные гетерозиготные патогенные варианты в генах *PTCH2*, *PTCH1* и *SUFU* описаны как причина синдрома базальноклеточного невуса (или синдрома Горлина – Гольца, СГГ, OMIM#109400) – фенотипически гетерогенного заболевания, которое проявляется вариабельной клинической картиной и возрастом манифестации первых симптомов. Среди многочисленных проявлений СГГ, начиная с младенчества, могут возникать нарушения опорно-двигательного аппарата, зачастую в виде одонтогенных кератоцист нижней челюсти, кифосколиоза, расщепления ребер и переднего отдела стоп и кистей, прогнатии. Кроме того, в некоторых случаях возникают офтальмологические и неврологические нарушения, в числе которых глаукома, катаракта, деменция, агенезия мозолистого тела, кальцификация серпа головного мозга. Ведущим симптомом СГГ является образование множественных базалиом и базальноклеточных карцином. Реже наблюдают медуллобластомы, менингиомы, папиллярные фиброластомы сердца, фибросаркомы и нефробластомы [215]. В Европе распространенность СГГ составляет 1/31,000–1/164,000. В России опубликованы единичные клинические случаи

СГГ, поэтому определить его распространенность в нашей стране не представляется возможным.

Выявленный вариант с.2019del в гене *PTCH2* представлен делецией гуанина в 44827882 позиции на хромосоме 1. Вариант расположен в центральной части гена (14 экзон из 22), приводит к преждевременной терминации синтеза белка в результате сдвига рамки считывания. Частота минорного аллеля, по данным популяционной базы данных gnomAD Exomes, составляет 0,0000159. Согласно критериям ACMG (PVS1, PM2), мутация с.2019del имеет прямые признаки патогенности и описана в базе данных Varsome как вероятно патогенный вариант. Ранее этот вариант зарегистрирован в базе данных генетических вариантов Clinvar как вариант с неопределенным клиническим значением, не описан в литературе у лиц с *PTCH2*-ассоциированным фенотипом.

На сегодняшний день в гене *PTCH2* отсутствуют зарегистрированные патогенные варианты, только 4 варианта охарактеризованы как вероятно патогенные. Ранее было указано, что носители мутаций в гене *PTCH2* могут проявлять менее агрессивный фенотип. Однако в 2019 году исследователи обнаружили здорового человека с гомозиготным вариантом в гене *PTCH2* [216]. Согласно данным M. J. Smith et al., значение гена *PTCH2* сомнительно в предрасположенности к СГГ, такие мутации могут действовать как модификатор фенотипа [217]. В работе K. Ji et al. у больного РЖ был выявлен вариант со сдвигом рамки считывания с.1172\_1173delCT в гене *PTCH2*. Однако, несмотря на признаки патогенности, авторы также отнесли данную мутацию к вариантам с неопределенным клиническим значением. Вариант с.2019del был диагностирован у пациентки HC0049, 37 лет, со смешанной аденокарциномой преддверия привратника желудка, метастатическим поражением брюшины и яичников. Со слов пробанда, ранее ЗНО в семейной истории не было выявлено. При осмотре отсутствовали фенотипические проявления и СГГ-сопутствующая патология.

## ГЛАВА 4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В России стандарт молекулярной диагностики при РЖ включает исследование статуса HER2/neu, MCH и экспрессии PD-L1 в случае местно распространенной неоперабельной или диссеминированной аденокарциномы. Оценка статуса MCH возможна также при операбельных формах РЖ для определения показаний к адъювантной химиотерапии [63]. Таким образом, индивидуализированное лечение доступно преимущественно пациентам с распространенными стадиями РЖ. Ограниченный спектр рекомендованных ДНК-тестов определяет актуальность поиска и внедрения в клиническую практику новых молекулярных маркеров при РЖ. Результаты многочисленных исследований показали, что ВЭБ<sup>+</sup> и MCH являются прогностически благоприятными маркерами при РЖ.

NGS все больше входит в лабораторную практику при поиске герминальных мутаций у больных РЖ с клиническими признаками НОС. Несмотря на это, в России на сегодняшний день отсутствуют данные о популяционной частоте наследственно-ассоциированного РЖ, не описан спектр молекулярных нарушений в генах со схожим фенотипом, а также отсутствуют единые критерии направления пациентов на ДНК-диагностику с целью поиска мутаций в генах, ассоциированных с НОС.

В результате проведенного исследования выполнено молекулярно-генетическое исследование биологических образцов от 310 больных с морфологически верифицированным диагнозом РЖ. Обследованная группа была рандомизирована на когорту спорадического рака (159 образцов опухоли) и когорту пациентов с подозрением на наследственную форму РЖ (151 образец).

В результате проведенного исследования удалось установить, что в 8,2 % ( $n = 13/159$ ) случаев спорадический РЖ ассоциирован с ВЭБ. ВЭБ<sup>+</sup> РЖ наиболее часто ( $n = 12$ ; 92,3 %) диагностирован у мужчин и в возрасте старше 50 лет ( $n = 10$ ; 76,9 %,  $p < 0,01$ ). Средний возраст манифестации ВЭБ<sup>+</sup> РЖ составляет 54,8 года. У 53,9 % ( $n = 7$ ) больных выявлен распространенный рак (III–IV стадии). Чаще опухоли поражали тело желудка ( $n = 4$ ; 30,7 %), ДРЖ и аденокарцинома кишечного типа выявлены в практически равном соотношении.

В 13,2 % ( $n = 21/159$ ) образцах спорадического РЖ выявлен MCH статус опухоли. У мужчин и женщин MCH РЖ диагностирован в соотношении 10 (47,6 %) к 11 (52,4 %) случаев соответственно. Чаще ( $n = 16$ ; 76,2 %,  $p < 0,01$ ) ЗНО манифестировало в возрасте старше 50 лет, средний возраст диагностики –  $62,1 \pm 14,5$  года. MCH опухоли затрагивали малую кривизну ( $n = 6$ ; 28,6 %), больше одной топографической области ( $n = 6$ ; 23,8 %), тело желудка ( $n = 4$ ; 19,0 %) и преддверие привратника ( $n = 4$ ; 19,0 %). Чаще ( $n = 15$ ; 71,4 %) гистологически был

диагностирован кишечный тип. В большинстве случаев диагноз установлен на операбельных стадиях ( $n = 15$ ; 71,4 %).

Среднее время наблюдения за больными в группе спорадического РЖ от момента постановки диагноза составило 31,3 мес. (95 %; ДИ: 27,6–35,1 мес.), медиана общей выживаемости (ОВ) – 55,0 мес. ОВ (1-, 3- и 5-летняя) составила 84,6; 69,6 и 54,3 мес. соответственно. Выявлены статистически значимые различия в ОВ в зависимости от возраста манифестации рака: до и после 50 лет – 33,39 vs 63,81 мес. ( $p < 0,01$ ). Отмечено, что у пациентов с ВЭБ<sup>+</sup> подтипом прогноз лучше, чем в группах МСН ( $p = 0,24$ ) и ВЭБ<sup>+</sup> МСС ( $p = 0,03$ ). Наилучший прогноз отмечен при ВЭБ-ассоциированном раке, что отразилось в 91,7 % ОВ в течение 96 мес. наблюдения. Различия в ОВ при МСН и ВЭБ<sup>+</sup> МСС раке не были статистически значимыми, что, вероятно, связано с малым количеством пациентов в группе МСН.

В ходе изучения статуса «горячих» точек генов *KRAS* и *PIK3CA* диагностировано 7,5 % ( $n = 12$ ) и 2,5 % ( $n = 5$ ) клинически значимых вариантов соответственно. Все 13 ( $n = 13$ , 100 %) ВЭБ<sup>+</sup> образцов содержали ген *KRAS* «дикого» типа, только в 1 (7,7 %) случае выявлен вариант E545K в экзоне 21 гена *PIK3CA*. Напротив, при МСН-фенотипе были диагностированы 4 (19,0 %) варианта в кодонах 12–13 гена *KRAS* и 7 (33,3 %) – в экзонах 10 и 21 гена *PIK3CA*, что объясняется гипермутированным фенотипом МСН опухолей. Также в 19,0 % (4/21) образцов РЖ с МСН опухолей ( $n = 4$ ) выявлено сочетание вариантов генов *KRAS* и *PIK3CA*. Отличительной особенностью исследования стало отсутствие мутаций в кодонах 597–601 гена *BRAF*, патогномичных для колоректального рака с МСН.

В ходе анализа герминальных мутаций в генах, ассоциированных с НОС, в группе пациентов с подозрением на наследственную форму РЖ у 15,2 % (23/151) обследованных всего выявлен 21 клинически значимый ВНП в гетерозиготной форме. Соотношение установленных ВНП в подгруппе ПА с органспецифическим РЖ и подгруппе ПВ с РЖ в составе ПМЗН составила 58,8 % ( $n = 10$ )/41,2 % ( $n = 7$ ) соответственно. В общей сложности наследственно-ассоциированный РЖ диагностирован при НОС с высокой и средней пенетрантностью у 8,6 % (13/151) пациентов:

- синдром наследственного РМЖ и РЯ (гены *BRCA1/2*; ОМIM #612555, ОМIM #604370) – в 4,0 % случаев;
- синдром Линча (гены *MLH1* и *MSH2*; ОМIM#158320, ОМIM#158320) – в 2,0 % случаев;
- *TP53*-ассоциированный опухолевый синдром (ген *TP53*, ОМIM#151623) – в 1,3 % случаев;
- синдром наследственного ДРЖ (ген *CDH1*, ОМIM#137215) – в 0,7 % случаев;
- Ли – Фраумени-подобный синдром (ген *CHEK2*, ОМIM#609265) – в 0,7 % случаев.

Наибольшее число герминальных патогенных ВНП (14/21; 66,7 %) было выявлено в генах системы репарации ДНК путем гомологичной рекомбинации *BRCA1/2*, *CHEK2*, *ATM*, *BRIP1* (9/21; 42,9 %) и в генах системы репарации неспаренных оснований *MLH1*, *MSH2*, *MLH3* (5/21; 23,8 %).

При оценке критериев NCCN для отбора больных РЖ с целью проведения ДНК-диагностики для исключения наследственной формы РЖ, чувствительность таковых составила 9,4 %, специфичность - 93,3 %. Таким образом, значительная доля больных (90,6 %) наследственным РЖ в представленном исследовании не соответствовала предлагаемым критериям и была бы пропущена в ходе диагностики и лечения.

Появление технологии NGS позволило подробно изучить строение опухолевого генома, транскриптома, протеома и доказало генетическую и эпигенетическую уникальность, молекулярную сложность злокачественных опухолей желудка, а также привело к формированию нескольких классификаций РЖ с учетом уникального фенотипа опухоли. Однако на сегодняшний день в связи с высокой стоимостью и сложностью методик молекулярной диагностики данные методы остаются ограниченно доступными при поиске молекулярных мишеней. Проведение дополнительных исследований позволит прогнозировать течение заболевания при первично операбельном РЖ, что, в конечном счете, сможет благоприятно отразиться на показателях выживаемости.

Вероятно, системы анализа статуса ВЭБ и МСН в гистопатологических образцах с помощью искусственного интеллекта, разрабатываемые в настоящий момент, сделают оценку данных нарушений менее затратной и более доступной [64]. Таким образом, дальнейшее изучение влияния статуса МСН и ВЭБ на возникновение и течение РЖ является актуальной задачей. Расхождение в данных о роли соматических мутаций в генах *KRAS*, *PIK3CA* и *BRAF* делают необходимым дальнейшее изучение прогностического и предиктивного значения этих маркеров.

Касаемо поиска наследственных форм РЖ, целесообразно проведение дальнейших исследований на больших выборках пациентов российской популяции для установления частоты РЖ в составе синдрома наследственного ДРЖ, синдрома аденокарциномы желудка с проксимальным полипозом и синдрома семейного рака желудка кишечного типа. Кроме того, необходимо дальнейшее изучение вклада герминальных мутаций в генах *BRCA1/2*, *ATM*, *BRIP1*, *MLH3* в этиологию РЖ, а также оценка прогностического и предиктивного значения герминальных вариантов генов *HRR* и *MMR*, что найдет отражение в показателях заболеваемости, позволит персонализировать подход к лечению РЖ, снизит финансовую нагрузку на систему здравоохранения.

## ВЫВОДЫ

1. Частота Эпштейн – Барр - ассоциированного рака желудка составила 8,2 %. Выявлена достоверная ассоциация этого подтипа рака желудка с мужским полом (92,3 %;  $p < 0,01$ ).

2. Доля микросателлитно нестабильного рака желудка составила 13,2 %. Достоверно установлена взаимосвязь микросателлитной нестабильности с возрастом старше 50 лет ( $p < 0,01$ ).

3. Эпштейн – Барр – ассоциированный рак желудка является прогностически благоприятным подтипом в сравнении с микросателлитно стабильным Эпштейн - Барр - негативным РЖ ( $p = 0,03$ ). Общая 8-летняя выживаемость больных Эпштейн – Барр - ассоциированным раком желудка составила 91,7 %, пациентов с микросателлитно нестабильным раком желудка - 67,3%.

4. Частота клинически значимых вариантов в «горячих» точках генов *KRAS* и *PIK3CA* при раке желудка составила 7,5 % и 2,5 % соответственно. Не выявлено мутаций в кодонах 597–601 гена *BRAF*. Совокупно доля клинически значимых вариантов в генах *KRAS* и *PIK3CA* при микросателлитно нестабильном раке желудка составила 19,0 % и 33,3 %; при Эпштейн – Барр – ассоциированном подтипе выявлено 0% и 7,7 % вариантов соответственно. В 19,0 % образцов рака желудка с микросателлитной нестабильностью выявлено сочетание вариантов генов *KRAS* и *PIK3CA*.

5. Доля наследственно - ассоциированных форм рака желудка составила 8,6 % и представлена синдромом наследственного рака молочной железы и яичников в 4,0 % случаев; синдромом Линча – в 2,0 %; *TP53*-ассоциированным опухолевым синдром – в 1,3 %; синдромом наследственного диффузного рака желудка – в 0,7 % и Ли – Фраумени - подобным синдром – в 0,7 % случаев.

6. У 15,2 % пациентов с подозрением на наследственную форму заболевания выявлен 21 клинически значимый вариант нуклеотидной последовательности в генах, ответственных за развитие наследственных опухолевых синдромов, в гетерозиготной форме. Большая доля (66,7 %) мутаций диагностирована в генах систем репарации ДНК: в генах системы репарации путем гомологичной рекомбинации *BRCA1/2*, *CHEK2*, *ATM*, *BRIP1* (42,9 %) и в генах системы репарации неспаренных оснований *MLH1*, *MSH2*, *MLH3* (23,8 %). В 17,4 % случаев выявлено гетерозиготное носительство вариантов в генах *MSH3*, *MUTYH*, *NTHL1* с аутосомно-рецессивным типом наследования, в 23,8 % случаев – носительство вариантов в генах *ATM*, *BRIP1*, *MLH3* с неопределенным типом наследования и пенетрантностью в отношении рака желудка.

## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Исследование вируса Эпштейн – Барр в образцах опухоли при раке желудка рекомендовано для определения прогноза заболевания и оценки потенциальной иммуногенности опухоли. До 90% случаев Эпштейн - Барр – положительного рак желудка ассоциированы с мужским полом. Для качественной оценки наличия ДНК вируса Эпштейн – Барр возможно применение метода ПЦР в режиме реального времени.

2. Исследование статуса микросателлитной нестабильности у больных раком желудка рекомендовано в качестве предиктивного и прогностического маркера. Тестирование микросателлитной нестабильности наиболее эффективно в группе больных старше 50 лет.

3. При отборе пациентов, нуждающихся в ДНК-диагностике для исключения наследственно-ассоциированной формы рака желудка, в российской популяции целесообразно применение следующих критериев:

- ранний возраст манифестации рака желудка;
- множественные случаи злокачественных новообразований в семейном анамнезе;
- первично-множественные злокачественные новообразования в личном и/или семейном анамнезе;
- гистологически верифицированный диффузный рак желудка по классификации Лаурен.

4. В ходе медико-генетического консультирования пациентов российской популяции с подозрением на наследственную форму рака желудка целесообразно проведение дифференциальной диагностики в первую очередь между синдромом наследственного диффузного рака желудка, синдромом Линча, синдромом наследственного *BRCA1/2* – ассоциированного рака молочной железы, *TP53* - ассоциированным наследственным опухолевым синдромом и Ли – Фраумени – подобным синдромом.

5. При проведении ДНК-диагностики у пациентов российской популяции с подозрением на наследственную форму рака желудка методом выбора является исследование таргетной панели генов. Минимальные требования к применяемой таргетной панели включают наличие в её составе генов *BRCA1/2*, *MLH1*, *MSH2*, *CDH1*, *CHEK2*, *TP53*.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АПС	аденоматозный полипозный синдром
ВНП	вариант нуклеотидной последовательности
ВОЗ	Всемирная организация здравоохранения
ВЭБ	вирус Эпштейн – Барр
ВЭБ <sup>+</sup>	наличие ДНК вируса Эпштейн – Барр (Эпштейн – Барр – позитивный РЖ)
ГС подтип	геномно стабильный подтип
ЗНО	злокачественное новообразование
КРР	колоректальный рак
МСН	микросателлитная нестабильность, микросателлитно-нестабильный фенотип опухоли
МСС	микросателлитно стабильный фенотип опухоли
Мтс	метастаз
НДРЖ	наследственный диффузный рак желудка
НОС	наследственный опухолевый синдром
ОВ	общая выживаемость
ПМЗН	первично-множественные злокачественные новообразования
ПХТ	полихимиотерапия
РЖ	рак желудка
РЯ	рак яичников
СЛ	синдром Линча
СЛФ	синдром Ли – Фраумени ( <i>TP53</i> -ассоциированный синдром)
СНРМЖ	синдром наследственного рак молочной железы
СПЕ	синдром Пейтца – Егерса
СЮП	синдром ювенильного полипоза
ХН подтип	хромосомно нестабильный подтип
ACG	Американский колледж гастроэнтерологии (American College of Gastroenterology)
ACRG	Азиатская группа по исследованию рака (Asian Cancer Research Group)
ASCO	Американское общество клинической онкологии (American Society of Clinical Oncology)
CLIA	Поправки по улучшению клинической лаборатории (Clinical Laboratory Improvement Amendments)
dMMR	дефицит системы репарации неспаренных оснований ДНК

FIGC	семейный рак желудка кишечного типа (familial intestinal gastric cancer)
GAPPS	аденокарцинома желудка и проксимальный полипоз желудка (gastric adenocarcinoma and proximal polyposis of the stomach)
HRR	система репарации путем гомологичной рекомбинации (homologous recombination repair)
IGCLC	Международный консорциум по раку желудка (International Gastric Cancer Linkage Consortium)
MMR	система репарации неспаренных оснований ДНК (Mismatch Repair system)
NCCN	Национальная комплексная онкологическая сеть (National Comprehensive Cancer Network)
NGS	массовое параллельное секвенирование (next generation sequencing)
TCGA	Атлас опухолевого генома (The Cancer Genome Atlas)
WT	дикий тип (Wild type, Wt)

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. CANCER TODAY, International Agency for Research on Cancer. – URL: <https://gco.iarc.fr/today/en>.
2. Ferlay, J. Cancer incidence and mortality worldwide : sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012 / J. Ferlay, I. Soerjomataram, R. Dikshit [et al.] // International Journal of Cancer. – 2015. – Vol. 136, № 5. – P. E359–E386.
3. Rivera, F. SEOM clinical guidelines for the diagnosis and treatment of gastric adenocarcinoma / F. Rivera, C. Grávalos, R. García-Carbonero // Clinical & translational oncology. – 2012. – Vol. 14, № 7. – P. 528–535.
4. Oba, K. Role of chemotherapy for advanced/recurrent gastric cancer : an individual-patient-data meta-analysis / K. Oba, S. Yamamoto, K. Nakamura [et al.] // European journal of cancer. – 2013. – Vol. 49, № 7. – P. 1565–1577.
5. Dicken, B. J. Gastric adenocarcinoma : review and considerations for future directions / B. J. Dicken, D. L. Bigam, C. Cass [et al.] // Annals of surgery. – 2005. – Vol. 241, № 1. – P. 27–39.
6. Злокачественные новообразования в России в 2020 году (заболеваемость и смертность) / под ред. А. Д. Каприна, В. В. Старинского, А. О. Шахзадовой. – Москва : МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2021. – 252 с. – URL: [https://glavonco.ru/cancer\\_register/Забол\\_2020\\_Электр.pdf](https://glavonco.ru/cancer_register/Забол_2020_Электр.pdf) (date accessed: 10.11.2022).
7. Bass, A. J. Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma / A. J. Bass, V. Thorsson, I. Shmulevich [et al.] // Nature. – 2014. – Vol. 513, № 7517. – P. 202–209.
8. Cristescu, R. Molecular analysis of gastric cancer identifies subtypes associated with distinct clinical outcomes / R. Cristescu, J. Lee, M. Nebozhyn [et al.] // Nature medicine. – 2015. – Vol. 21, № 5. – P. 449–456.
9. Жукова, Л. Г. Рак молочной железы : клинические рекомендации / Л. Г. Жукова, Ю. Ю. Андреева, Л. Э. Завалишина [и др.]. – Москва, 2021. – 93 с.
10. Ананьев, В. С. Клинические рекомендации по диагностике и лечению больных раком ободочной кишки / В. С. Ананьев, Е. В. Артамонова, С. И. Ачкасов [и др.]. – Москва, 2014. – 13 с.
11. Алиев, М. Д. Клинические рекомендации по диагностике и лечению больных меланомой кожи / М. Д. Алиев, Б. Ю. Бохан, Л. В. Демидов [и др.]. – Москва, 2014. – 11 с.
12. Oliveira, C. Familial gastric cancer : genetic susceptibility, pathology, and implications for management / C. Oliveira, H. Pinheiro, J. Figueiredo [et al.] // The Lancet Oncology. – 2015. – Vol. 16, № 2. – P. 60–70.

13. Assumpção, P. Hereditary gastric cancer : three rules to reduce missed diagnoses / P. Assumpção, T. Araújo, A. Khayat [et al.] // *World J. Gastroenterol.* – 2020. – Vol. 26, № 13. – P. 1382. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32308342/> (date accessed: 31.10.2022).
14. Van der Post, R. S. Hereditary gastric cancer : what's new? Update 2013-2018 / R. S. Van der Post, C. Oliveira, P. Guilford, F. Carneiro // *Familial cancer.* – 2019. – Vol. 18, № 3. – P. 363–367. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30989426/> (date accessed: 29.11.2022).
15. Хатьков, И. Е. Рекомендации по медицинскому сопровождению пациентов с верифицированными (подтвержденными) наследственными опухолевыми синдромами и их родственников с выявленной предрасположенностью к развитию онкологических заболеваний : методические рекомендации / И. Е. Хатьков, Л. Г. Жукова, А. М. Данишевич [и др.]. – Москва : ООО «Эвоген», ГБУЗ «МКНЦ им. А.С. Логинова ДЗМ», 2022. – 27 с.
16. Немцова, М. В. Спектры герминальных и соматических мутаций при диффузном и интестинальном типах рака желудка / М. В. Немцова, А. И. Калинин, А. С. Танас [и др.] // *Медицинская генетика.* – 2018. – Т. 17, № 11. – С. 11–14.
17. Немцова, М. В. Соматические и герминальные мутации при раке желудка / М. В. Немцова, А. С. Танас, Е. А. Алексеева [и др.] // *Молекулярная медицина.* – 2015. – Т. 4. – С. 28–34.
18. Correa, P. Human Gastric Carcinogenesis : A Multistep and Multifactorial Process-First American Cancer Society Award Lecture on Cancer Epidemiology and Prevention1 / P. Correa // *Cancer Research.* – 1992. – Vol. 52, № 24. – P. 6735–6740.
19. Ge, S. Association between Habitual Dietary Salt Intake and Risk of Gastric Cancer: A Systematic Review of Observational Studies / S. Ge, X. Feng, L. Shen [et al.] // *Gastroenterology research and practice.* – 2012. – Vol. 2012. – ID 808120. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23125851/> (date accessed: 30.11.2022).
20. Bonequi, P. Risk factors for gastric cancer in Latin-America : a meta-analysis / P. Bonequi, F. Meneses-González, P. Correa [et al.] // *Cancer causes & control.* – 2013. – Vol. 24, № 2. – P. 217.
21. Rae Kim, S. Effect of Red, Processed, and White Meat Consumption on the Risk of Gastric Cancer : An Overall and Dose-Response Meta-Analysis / S. Rae Kim, K. Kim, S. Ah Lee [et al.] – Text: electronic // *Nutrients.* – 2019. – Т. 11, № 4. – P. 826. – URL: [www.mdpi.com/journal/nutrients](http://www.mdpi.com/journal/nutrients) (date accessed: 30.11.2022).
22. Fang, X. Landscape of dietary factors associated with risk of gastric cancer : a systematic review and dose-response meta-analysis of prospective cohort studies / X. Fang, J. Wei, X. He [et al.] // *European Journal of Cancer.* – 2015. – Vol. 51, № 18. – P. 2820–2832.

23. Bagnardi, V. Alcohol consumption and site-specific cancer risk : a comprehensive dose–response meta-analysis / V. Bagnardi, M. Rota, E. Botteri [et al.] // *British Journal of Cancer*. – 2015. – Vol. 112, № 3. – P. 580.
24. González, C. A. Smoking and the risk of gastric cancer in the European Prospective Investigation Into Cancer and Nutrition (EPIC) / C. A. González, G. Pera, A. Agudo [et al.] // *International Journal of Cancer*. – 2003. – Vol. 107, № 4. – P. 629–634.
25. Moy, K. A. Alcohol and tobacco use in relation to gastric cancer : a prospective study of men in Shanghai, China / K. A. Moy, Y. Fan, R. Wang [et al.] // *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. – 2010. – Vol. 19, № 9. – P. 2287–2297.
26. Yusefi, A. R. Risk factors for gastric cancer : a systematic review / A. R. Yusefi, K. B. Lankarani, P. Bastani [et al.] // *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention: APJCP*. – 2018. – Vol. 19, № 3. – P. 591.
27. Plummer, M. Global burden of gastric cancer attributable to *Helicobacter pylori* / M. Plummer, S. Franceschi, J. Vignat [et al.] // *International Journal of Cancer*. – 2015. – Vol. 136, №2. – P. 487–490.
28. Khatoon, J. Role of *Helicobacter pylori* in gastric cancer : updates / J. Khatoon, R. P. Rai, K. N. Prasad // *World journal of gastrointestinal oncology*. – 2016. – Vol. 8, № 2. – P. 147–158.
29. Niwa, T. Inflammatory processes triggered by *Helicobacter pylori* infection cause aberrant DNA methylation in gastric epithelial cells / T. Niwa, T. Tsukamoto, T. Toyoda [et al.] // *Cancer Research*. – 2010. – Vol. 70, № 4. – P. 1430–1440.
30. Nagtegaal, I. D. The 2019 WHO classification of tumours of the digestive system / I. D. Nagtegaal, R. D. Odze, D. Klimstra [et al.] // *Histopathology*. – 2020. – Vol. 76, № 2. – P. 182–188.
31. Ishaq, S. *Helicobacter pylori* and gastric cancer: a state of the art review / S. Ishaq, L. Nunn // *Gastroenterology and Hepatology From Bed to Bench*. – 2015. – Vol. 8, Suppl. 1. – P. S6.
32. Ge, Z. Coinfection with Enterohepatic *Helicobacter* species can ameliorate or promote *Helicobacter pylori*-induced gastric pathology in C57BL/6 mice / Z. Ge, Y. Feng, S. Muthupalani [et al.] // *Infection and immunity*. – 2011. – Vol. 79, № 10. – P. 3861–3871.
33. Guilford, P. E-cadherin germline mutations in familial gastric cancer / P. Guilford, J. Hopkins, J. Harraway [et al.] // *Nature*. – 1998. – Vol. 392, № 6674. – P. 402–405.
34. Burke, A. P. Lymphoepithelial carcinoma of the stomach with Epstein-Barr virus demonstrated by polymerase chain reaction / A. P. Burke, T. S. Yen, K. M. Shekitka, L. H. Sobin // *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology*. – 1990. – Vol. 3, № 3. – P. 377–380.

35. Zur Hausen, A. Distinct chromosomal aberrations in Epstein-Barr virus-carrying gastric carcinomas tested by comparative genomic hybridization / A. Zur Hausen, N. C. T. Van Grieken, G. A. Meijer [et al.] // *Gastroenterology*. – 2001. – Vol. 121, № 3. – P. 612–618.
36. Uozaki, H. Epstein-Barr Virus and Gastric Carcinoma – Viral Carcinogenesis through Epigenetic Mechanisms / H. Uozaki, M. Fukayama // *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*. – 2008. – Vol. 1, № 3. – P. 198.
37. Hutt-Fletcher, L. M. The Long and Complicated Relationship between Epstein-Barr Virus and Epithelial Cells / L. M. Hutt-Fletcher // *Journal of Virology*. – 2017. – Vol. 91, № 1. – e01677-16.
38. Shinozaki, A. Downregulation of microRNA-200 in EBV-associated gastric carcinoma / A. Shinozaki, T. Sakatani, T. Ushiku [et al.] // *Cancer Research*. – 2010. – Vol. 70, № 11. – P. 4719–4727.
39. Okabe, A. Cross-species chromatin interactions drive transcriptional rewiring in Epstein-Barr virus-positive gastric adenocarcinoma / A. Okabe, K. K. Huang, K. Matsusaka [et al.] // *Nature Genetics*. – 2020. – Vol. 52, № 9. – P. 919–930.
40. Okabe, A. Regulation of tumour related genes by dynamic epigenetic alteration at enhancer regions in gastric epithelial cells infected by Epstein-Barr virus / A. Okabe, S. Funata, K. Matsusaka [et al.] // *Scientific Reports*. – 2017. – Vol. 7, № 1. – P. 1–13.
41. Bae, J. M. Epstein-Barr Virus and Gastric Cancer Risk : a Meta-analysis With Meta-regression of Case-control Studies / J. M. Bae, E. H. Kim // *Journal of Preventive Medicine and Public Health*. – 2016. – Vol. 49, № 2. – P. 97.
42. Lauren, P. The two histological main types of gastric carcinoma : diffuse and so-called intestinal-type carcinoma. An attempt at a histo-clinical classification / P. Lauren // *Acta pathologica et microbiologica Scandinavica*. – 1965. – Vol. 64, № 1. – P. 31–49.
43. Tan, P. Genetics and Molecular Pathogenesis of Gastric Adenocarcinoma / P. Tan, K. G. Yeoh // *Gastroenterology*. – 2015. – Vol. 149, № 5. – P. 1153–1162.e3.
44. Peltomäki, P. Mutations and epimutations in the origin of cancer / P. Peltomäki // *Experimental Cell Research*. – 2012. – Vol. 318, № 4. – P. 299–310. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22182599/> (date accessed: 29.11.2022).
45. Chao, J. Assessment of Pembrolizumab Therapy for the Treatment of Microsatellite Instability-High Gastric or Gastroesophageal Junction Cancer Among Patients in the KEYNOTE-059, KEYNOTE-061, and KEYNOTE-062 Clinical Trials / J. Chao, C. S. Fuchs, K. Shitara [et al.] // *JAMA Oncology*. – 2021. – Vol. 7, № 6. – P. 895–902.
46. Tan, I. B. Intrinsic subtypes of gastric cancer, based on gene expression pattern, predict survival and respond differently to chemotherapy / I. B. Tan, T. Ivanova, K. H. Lim [et al.] //

Gastroenterology. – 2011. – Vol. 141, № 2. – P. 476–485. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21684283/> (date accessed: 29.11.2022).

47. Matsusaka, K. Classification of Epstein-Barr virus-positive gastric cancers by definition of DNA methylation epigenotypes / K. Matsusaka, A. Kaneda, G. Nagae [et al.] // *Cancer Research*. – 2011. – Vol. 71, № 23. – P. 7187–7197.

48. Lei, Z. Identification of molecular subtypes of gastric cancer with different responses to pi3-kinase inhibitors and 5-fluorouracil / Z. Lei, I. B. Tan, K. Das [et al.] // *Gastroenterology*. – 2013. – Vol. 145, № 3. – P. 554–565. – URL: <http://www.gastrojournal.org/article/S0016508513007221/fulltext> (date accessed: 29.11.2022).

49. Setia, N. A protein and mrna expression-based classification of gastric cancer / N. Setia, A. T. Agoston, H. S. Han [et al.] // *Modern Pathology*. – 2016. – Vol. 29, № 7. – P. 772–784. – URL: <https://www.nature.com/articles/modpathol201655> (date accessed: 01.12.2022).

50. Li, X. Distinct Subtypes of Gastric Cancer Defined by Molecular Characterization Include Novel Mutational Signatures with Prognostic Capability / X. Li, W. K. K. Wu, R. Xing [et al.] // *Cancer Research*. – 2016. – Vol. 76, № 7. – P. 1724–1732. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26857262/> (date accessed: 01.12.2022).

51. Yang, Y. Heterogeneity of MSI-H gastric cancer identifies a subtype with worse survival / Y. Yang, Z. Shi, R. Bai, W. Hu // *Journal of medical genetics*. – 2021. – Vol. 58, № 1. – P. 12–19.

52. Zhao, J. Genome-wide identification of Epstein-Barr virus-driven promoter methylation profiles of human genes in gastric cancer cells / J. Zhao, Q. Liang, K. F. Cheung [et al.] // *Cancer*. – 2013. – Vol. 119, № 2. – P. 304–312.

53. Kandoth, C. Mutational landscape and significance across 12 major cancer types / C. Kandoth, M. D. Mclellan, F. Vandin [et al.] // *Nature*. – 2013. – Vol. 502, № 7471. – P. 333–339.

54. Arcaro, A. The phosphoinositide 3-kinase pathway in human cancer : genetic alterations and therapeutic implications / A. Arcaro, A. Guerreiro // *Current genomics*. – 2007. – Vol. 8, № 5. – P. 271–306.

55. Muzny, D. M. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer / D. M. Muzny, M. N. Bainbridge, K. Chang [et al.] // *Nature*. – 2012. – Vol. 487, № 7407. – P. 330–337.

56. Böger, C. Epstein-Barr virus-associated gastric cancer reveals intratumoral heterogeneity of PIK3CA mutations / C. Böger, S. Krüger, H. M. Behrens [et al.] // *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*. – 2017. – Vol. 28, № 5. – P. 1005–1014.

57. Dong, M. Expression and prognostic roles of PIK3CA, JAK2, PD-L1, and PD-L2 in Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma / M. Dong, H. Y. Wang, X. X. Zhao [et al.] // *Human Pathology*. – 2016. – Vol. 53. – P. 25–34.
58. Yan, H. B. Reduced expression of the chromatin remodeling gene ARID1A enhances gastric cancer cell migration and invasion via downregulation of E-cadherin transcription / H. B. Yan, X. F. Wang, Q. Zhang [et al.] // *Carcinogenesis*. – 2014. – Vol. 35, № 4. – P. 867–876.
59. Yamada, L. Selective sensitivity of EZH2 inhibitors based on synthetic lethality in ARID1A-deficient gastric cancer / L. Yamada, M. Saito, A. K. Thar Min [et al.] // *Gastric Cancer*. – 2021. – Vol. 24, № 1. – P. 60–71.
60. Astolfi, A. BCOR involvement in cancer / A. Astolfi, M. Fiore, F. Melchionda [et al.] // *Epigenomics*. – 2019. – Vol. 11, № 7. – P. 835.
61. Derks, S. Abundant PD-L1 expression in Epstein-Barr Virus-infected gastric cancers / S. Derks, X. Liao, A. M. Chiaravalli [et al.] // *Oncotarget*. – 2016. – Vol. 7, № 22. – P. 32925–32932.
62. Pereira, M. A. Clinicopathological and prognostic features of Epstein-Barr virus infection, microsatellite instability, and PD-L1 expression in gastric cancer / M. A. Pereira, M. F. Ramos, S. F. Faraj [et al.] // *Journal of Surgical Oncology*. – 2018. – Vol. 117, № 5. – P. 829–839.
63. Yanagi, A. Clinicopathologic Characteristics of Epstein-Barr Virus-Associated Gastric Cancer Over the Past Decade in Japan / A. Yanagi, J. Nishikawa, K. Shimokuri [et al.] // *Microorganisms*. – 2019. – Vol. 7, № 9. – P. 305.
64. Van Beek, J. EBV-positive gastric adenocarcinomas : a distinct clinicopathologic entity with a low frequency of lymph node involvement / J. Van Beek, A. Zur Hausen, E. K. Kranenbarg [et al.] // *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*. – 2004. – Vol. 22, № 4. – P. 664–670.
65. Sohn, B. H. Clinical Significance of Four Molecular Subtypes of Gastric Cancer Identified by The Cancer Genome Atlas Project / B. H. Sohn, J. E. Hwang, H. J. Jang [et al.] // *Clinical Cancer Research : an Official Journal of the American Association for Cancer Research*. – 2017. – Vol. 23, № 15. – P. 4441–4449.
66. Lee, H. S. Epstein-barr virus-positive gastric carcinoma has a distinct protein expression profile in comparison with epstein-barr virus-negative carcinoma / H. S. Lee, M. S. Chang, H. K. Yang [et al.] // *Clinical Cancer Research : an Official Journal of the American Association for Cancer Research*. – 2004. – Vol. 10, № 5. – P. 1698–1705.
67. Choi, Y. Y. Is microsatellite instability a prognostic marker in gastric cancer? A systematic review with meta-analysis / Y. Y. Choi, J. M. Bae, J. Y. An [et al.] // *Journal of Surgical Oncology*. – 2014. – Vol. 110, № 2. – P. 129–135.

68. Smyth, E. C. Mismatch Repair Deficiency, Microsatellite Instability, and Survival: An Exploratory Analysis of the Medical Research Council Adjuvant Gastric Infusional Chemotherapy (MAGIC) Trial / E. C. Smyth, A. Wotherspoon, C. Peckitt [et al.] // *JAMA Oncology*. – 2017. – Vol. 3, № 9. – P. 1197–1203.
69. Choi, Y. Y. Comment on «To Treat, or Not to Treat, That is the Question: Biomarker-guided Adjuvant Chemotherapy for Stage II and III Gastric Cancer» / Y. Y. Choi, J. H. Cheong // *Annals of Surgery*. – 2019. – Vol. 270, № 2. – P. 40–41.
70. Puliga, E. Microsatellite instability in Gastric Cancer : between lights and shadows / E. Puliga, S. Corso, F. Pietrantonio, S. Giordano // *Cancer Treatment Reviews*. – 2021. – Vol. 95. – P. 102175.
71. Shin, S.-J. Mismatch Repair Status of Gastric Cancer and Its Association with the Local and Systemic Immune Response / S.-J. Shin, S. Y. Kim, Y. Y. Choi [et al.] // *The Oncologist*. – 2019. – Vol. 24, № 9. – P. 835–844.
72. Zhu, L. I. N. Microsatellite instability and survival in gastric cancer : a systematic review and meta-analysis / L. I. N. Zhu, Z. H. I. Li, Y. A. N. Wang [et al.] // *Molecular and Clinical Oncology*. – 2015. – Vol. 3, № 3. – P. 699–705.
73. Latham, A. Microsatellite Instability Is Associated With the Presence of Lynch Syndrome Pan-Cancer / A. Latham, P. Srinivasan, Y. Kemel [et al.] // *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*. – 2019. – Vol. 37, № 4. – P. 286–295.
74. Wu, M. S. Infrequent hms2 mutations in sporadic gastric adenocarcinoma with microsatellite instability / M. S. Wu, J. C. Sheu, C. T. Shun [et al.] // *Cancer Letters*. – 1997. – Vol. 112, № 2. – P. 161–166.
75. Leite, M. MSI phenotype and MMR alterations in familial and sporadic gastric cancer / M. Leite, G. Corso, S. Sousa [et al.] // *International Journal of Cancer*. – 2011. – Vol. 128, № 7. – P. 1606–1613.
76. Wang, K. Exome sequencing identifies frequent mutation of ARID1A in molecular subtypes of gastric cancer / K. Wang, J. Kan, S. T. Yuen [et al.] // *Nature Genetics*. – 2011. – Vol. 43, № 12. – P. 1219–1223.
77. Corso, G. Oncogenic mutations in gastric cancer with microsatellite instability / G. Corso, S. Velho, J. Paredes [et al.] // *European journal of cancer*. – 2011. – Vol. 47, № 3. – P. 443–451.
78. Wang, K. Whole-genome sequencing and comprehensive molecular profiling identify new driver mutations in gastric cancer / K. Wang, S. T. Yuen, J. Xu [et al.] // *Nature Genetics*. – 2014. – Vol. 46, № 6. – P. 573–582.

79. Kim, M. S. Somatic mutations and losses of expression of microRNA regulation-related genes AGO2 and TNRC6A in gastric and colorectal cancers / M. S. Kim, J. E. Oh, Y. R. Kim [et al.] // *The Journal of Pathology*. – 2010. – Vol. 221, № 2. – P. 139–146.
80. Bernal, M. Implication of the  $\beta$ 2-microglobulin gene in the generation of tumor escape phenotypes / M. Bernal, F. Ruiz-Cabello, A. Concha [et al.] // *Cancer Immunology, Immunotherapy*. – 2012. – Vol. 61. – P. 1359–1371. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22833104/> (date accessed: 10.11.2022).
81. Li, B. Microsatellite instability of gastric cancer and precancerous lesions / B. Li, H.-Y. Liu, S.-H. Guo [et al.] // *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*. – 2015. – Vol. 8, № 11. – P. 21138.
82. Sugimoto, R. Clinicopathological and molecular alterations in early gastric cancers with the microsatellite instability-high phenotype / R. Sugimoto, T. Sugai, W. Habano [et al.] // *International Journal of Cancer*. – 2016. – Vol. 138, № 7. – P. 1689–1697.
83. Zubarayev, M. Clinical and molecular prognostic markers of survival after surgery for gastric cancer: tumor-node-metastasis staging system and beyond / M. Zubarayev, E. K. Min, T. Son // *Translational gastroenterology and hepatology*. – 2019. – Vol. 4. – P. 59.
84. Von Loga, K. Extreme intratumour heterogeneity and driver evolution in mismatch repair deficient gastro-oesophageal cancer / K. Von Loga, A. Woolston, M. Punta [et al.] // *Nature Communications*. – 2020. – Vol. 11, № 1. – P. 139.
85. Choi, Y. Y. Microsatellite Instability and Programmed Cell Death-Ligand 1 Expression in Stage II/III Gastric Cancer : Post Hoc Analysis of the CLASSIC Randomized Controlled study / Y. Y. Choi, H. Kim, S. J. Shin [et al.] // *Annals of Surgery*. – 2019. – Vol. 270, № 2. – P. 309–316.
86. Polom, K. Meta-analysis of microsatellite instability in relation to clinicopathological characteristics and overall survival in gastric cancer / K. Polom, L. Marano, D. Marrelli [et al.] // *The British journal of surgery*. – 2018. – Vol. 105, № 3. – P. 159–167.
87. Mathiak, M. Clinicopathologic Characteristics of Microsatellite Instable Gastric Carcinomas Revisited : Urgent Need for Standardization / M. Mathiak, V. S. Warneke, H. M. Behrens [et al.] // *Applied immunohistochemistry & molecular morphology : AIMM*. – 2017. – Vol. 25, № 1. – P. 12–24.
88. Hause, R. J. Classification and characterization of microsatellite instability across 18 cancer types / R. J. Hause, C. C. Pritchard, J. Shendure, S. J. Salipante // *Nature medicine*. – 2016. – Vol. 22, № 11. – P. 1342–1350.

89. Ottini, L. Patterns of genomic instability in gastric cancer : clinical implications and perspectives / L. Ottini, M. Falchetti, R. Lupi [et al.] // *Annals of Oncology*. – 2006. – Vol. 17, Suppl. 7. – P. vii97-vii102.
90. Ellis, L. M. VEGF-targeted therapy : mechanisms of anti-tumour activity / L. M. Ellis, D. J. Hicklin // *Nature reviews. Cancer*. – 2008. – Vol. 8, № 8. – P. 579–591.
91. Xie, L. FGFR2 gene amplification in gastric cancer predicts sensitivity to the selective FGFR inhibitor AZD4547 / L. Xie, X. Su, L. Zhang [et al.] // *Clinical Cancer Research : an Official Journal of the American Association for Cancer Research*. – 2013. – Vol. 19, № 9. – P. 2572–2583.
92. Su, X. FGFR2 amplification has prognostic significance in gastric cancer : results from a large international multicentre study / X. Su, P. Zhan, P. R. Gavine [et al.] // *British Journal of Cancer*. – 2014. – Vol. 110, № 4. – P. 967–975.
93. Satoh, T. Lapatinib plus paclitaxel versus paclitaxel alone in the second-line treatment of HER2-amplified advanced gastric cancer in Asian populations : tytan - A randomized, phase III study / T. Satoh, T. Doi, A. Ohtsu [et al.] // *Journal of Clinical Oncology*. – 2014. – Vol. 32, № 19. – P. 2039–2049.
94. Lucas, F. A. M. HER2 testing in gastric cancer : an update / F. A. M. Lucas, S. N. Cristovam // *World Journal of Gastroenterology*. – 2016. – Vol. 22, № 19. – P. 4619–4625.
95. Dulak, A. M. Gastrointestinal adenocarcinomas of the esophagus, stomach, and colon exhibit distinct patterns of genome instability and oncogenesis / A. M. Dulak, S. E. Schumacher, J. Van Lieshout [et al.] // *Cancer Research*. – 2012. – Vol. 72, № 17. – P. 4383–4393.
96. Jung, E. J. Fibroblast growth factor receptor 2 gene amplification status and its clinicopathologic significance in gastric carcinoma / E. J. Jung, E. J. Jung, S. Y. Min [et al.] // *Human pathology*. – 2012. – Vol. 43, № 10. – P. 1559–1566.
97. Deng, N. A comprehensive survey of genomic alterations in gastric cancer reveals systematic patterns of molecular exclusivity and co-occurrence among distinct therapeutic targets / N. Deng, L. K. Goh, H. Wang [et al.] // *Gut*. – 2012. – Vol. 61, № 5. – P. 673–684.
98. Isinger-Ekstrand, A. Genetic profiles of gastroesophageal cancer : combined analysis using expression array and tiling array-comparative genomic hybridization / A. Isinger-Ekstrand, J. Johansson, M. Ohlsson [et al.] // *Cancer Genetics and Cytogenetics*. – 2010. – Vol. 200, № 2. – P. 120–126.
99. Bizari, L. Alterations of the CCND1 and HER-2/neu (ERBB2) proteins in esophageal and gastric cancers / L. Bizari, A. A. Borim, K. R. Moreira Leite [et al.] // *Cancer genetics and cytogenetics*. – 2006. – Vol. 165, № 1. – P. 41–50. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16490596/> (date accessed: 10.11.2022).

100. Palanisamy, N. Rearrangements of the RAF kinase pathway in prostate cancer, gastric cancer and melanoma / N. Palanisamy, B. Ateeq, S. Kalyana-Sundaram [et al.] // *Nature medicine*. – 2010. – Vol. 16, № 7. – P. 793–798.
101. Yu, H. The stats of cancer--new molecular targets come of age / H. Yu, R. Jove // *Nature reviews. Cancer*. – 2004. – Vol. 4, № 2. – P. 97–105.
102. Türeci, Ö. Claudin-18 gene structure, regulation, and expression is evolutionary conserved in mammals / Ö. Türeci, M. Koslowski, G. Helftenbein [et al.] // *Gene*. – 2011. – Vol. 481, № 2. – P. 83–92.
103. Medina, P. P. Oncomir addiction in an in vivo model of microrna-21-induced pre-B-cell lymphoma / P. P. Medina, M. Nolde, F. J. Slack // *Nature*. – 2010. – Vol. 467, № 7311. – P. 86–90.
104. Pfeffer, S. R. The Role of mir-21 in Cancer / S. R. Pfeffer, C. H. Yang, L. M. Pfeffer // *Drug development research*. – 2015. – Vol. 76, № 6. – P. 270–277.
105. Quezada-Marin, J. I. Gastrointestinal tissue-based molecular biomarkers: a practical categorisation based on the 2019 World Health Organization classification of epithelial digestive tumours / J. I. Quezada-Marin, A. K. Lam, A. Ochiai [et al.] // *Histopathology*. – 2020. – Vol. 77, № 3. – P. 340–350. – URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/his.14120> (date accessed: 06.12.2022).
106. Grillo, F. HER2 heterogeneity in gastric/gastroesophageal cancers : from benchside to practice / F. Grillo, M. Fassan, F. Sarocchi [et al.] // *World Journal of Gastroenterology*. – 2016. – Vol. 22, № 26. – P. 5879–5887. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27468182/> (date accessed: 06.12.2022).
107. Motoshima, S. Prognostic implications of HER2 heterogeneity in gastric cancer / S. Motoshima, K. Yonemoto, H. Kamei [et al.] // *Oncotarget*. – 2018. – Vol. 9, № 10. – P. 9262–9272. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29507688/> (date accessed: 06.12.2022).
108. Shah, M. A. Immunotherapy and Targeted Therapy for Advanced Gastroesophageal Cancer : ASCO Guideline / M. A. Shah, E. B. Kennedy, A. E. Alarcon-Rozas [et al.] // *Journal of Clinical Oncology*. – 2023. – T. 41, № 7. – C. 1470-1491.
109. Ajani, J. A. Gastric cancer / J. A. Ajani, T. A. D’Amico, D. J. Bentrem, [et al.] // *NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines)*. – Internet resource. – 2023. – URL: <https://www.nccn.org/>
110. Zneimer, S. Preparing for Clinical Laboratory Improvement Amendments (CLIA) and College of American Pathologists (CAP) Inspections / Zneimer S., Hongo D. // *Current Protocols*. – 2021. – Vol. 1, № 12. – P. e324.

111. Бесова, Н. С. Рак желудка : клинические рекомендации / Н. С. Бесова, А. Е. Калинин, С. Н. Неред [и др.]. // Современная онкология. – 2021. – Т. 23, № 4. – С. 541-571.
112. Hansford, S. Hereditary diffuse gastric cancer syndrome : CDH1 mutations and beyond / S. Hansford, P. Kaurah, H. Li-Chang [et al.] // JAMA Oncology. – 2015. – Vol. 1, № 1. – P. 23–32.
113. Lobo, S. Cancer predisposition and germline CTNNA1 variants / S. Lobo, P. R. Benusiglio, F. Coulet [et al.] // European journal of medical genetics. – 2021. – Vol. 64, № 10. – P. 104316. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34425242/> (date accessed: 07.11.2022).
114. Godwin, T. D. E-cadherin-deficient cells have synthetic lethal vulnerabilities in plasma membrane organisation, dynamics and function / T. D. Godwin, S. T. Kelly, T. P. Brew [et al.] // Gastric Cancer. – 2019. – Vol. 22, № 2. – P. 273–286.
115. Paredes, J. Epithelial E- and P-cadherins : role and clinical significance in cancer / J. Paredes, J. Figueiredo, A. Albergaria [et al.] // Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer. – 2012. – Vol. 1826, № 2. – P. 297–311.
116. Lo, W. Associations of CDH1 germline variant location and cancer phenotype in families with hereditary diffuse gastric cancer (HDGC) / W. Lo, B. Zhu, A. Sabesan [et al.] // Journal of Medical Genetics. – 2019. – Vol. 56, № 6. – P. 370–379.
117. Oliveira, C. Germline CDH1 deletions in hereditary diffuse gastric cancer families / C. Oliveira, J. Senz, P. Kaurah [et al.] // Human Molecular Genetics. – 2009. – Vol. 18, № 9. – P. 1545–1555.
118. Grady, W. M. Methylation of the CDH1 promoter as the second genetic hit in hereditary diffuse gastric cancer / W. M. Grady, J. Willis, P. J. Guilford [et al.] // Nature Genetics. – 2000. – Vol. 26, № 1. – P. 16–17.
119. Kaurah, P. Founder and recurrent CDH1 mutations in families with hereditary diffuse gastric cancer / P. Kaurah, A. Macmillan, N. Boyd [et al.] // JAMA. – 2007. – Vol. 297, № 21. – P. 2360–2372. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17545690/> (date accessed: 07.11.2022).
120. Van der Post, R. S. Histopathological, molecular, and genetic profile of hereditary diffuse gastric cancer : current knowledge and challenges for the future / R. S. Van der Post, I. Gullo, C. Oliveira [et al.] // Advances in Experimental Medicine and Biology. – 2016. – Vol. 908. – P. 371–391.
121. Pharoah, P. D. P. Incidence of gastric cancer and breast cancer in CDH1 (E-cadherin) mutation carriers from hereditary diffuse gastric cancer families / P. D. P. Pharoah, P. Guilford, C. Caldas // Gastroenterology. – 2001. – Vol. 121, № 6. – P. 1348–1353.

122. Suriano, G. A model to infer the pathogenic significance of CDH1 germline missense variants / G. Suriano, S. Seixas, J. Rocha, R. Seruca // *Journal of Molecular Medicine*. – 2006. – Vol. 84, № 12. – P. 1023–1031.
123. Gullo, I. Phenotypic heterogeneity of hereditary diffuse gastric cancer : report of a family with early-onset disease / I. Gullo, V. Devezas, M. Baptista [et al.] // *Gastrointestinal Endoscopy*. – 2018. – Vol. 87, № 6. – P. 1566–1575.
124. Jacobs, M. F. Outcomes of Endoscopic Surveillance in Individuals With Genetic Predisposition to Hereditary Diffuse Gastric Cancer / M. F. Jacobs, H. Dust, E. Koeppel [et al.] // *Gastroenterology*. – 2019. – Vol. 157, № 1. – P. 87–96
125. Ford, J. M. Totally Unexpected : Nonsyndromic CDH1 Mutations and Hereditary Diffuse Gastric Cancer Syndrome / J. M. Ford // *JCO Precision Oncology*. – 2017. – Vol. 1. – P. 1–2.
126. Blair, V. R. Hereditary diffuse gastric cancer : updated clinical practice guidelines / V. R. Blair, M. McLeod, F. Carneiro [et al.]. // *The Lancet Oncology*. – 2020. – Vol. 21, № 8. – P. e386-e397.
127. Mi, E. Z. Comparative study of endoscopic surveillance in hereditary diffuse gastric cancer according to CDH1 mutation status / E. Z. Mi, E. Z. Mi, M. Di Pietro [et al.] // *Gastrointestinal Endoscopy*. – 2018. – Vol. 87, № 2. – P. 408–418.
128. Abraham, S. C. Sporadic fundic gland polyps : Common gastric polyps arising through activating mutations in the  $\beta$ -catenin gene / S. C. Abraham, B. Nobukawa, F. M. Giardiello [et al.] // *American Journal of Pathology*. – 2001. – Vol. 158, № 3. – P. 1005–1010. – URL: <http://ajp.amjpathol.org/article/S0002944010640473/fulltext> (date accessed: 27.02.2023).
129. Torbenson, M. Sporadic fundic gland polyposis : a clinical, histological, and molecular analysis / M. Torbenson, J. H. Lee, M. Cruz-Correa [et al.] // *Modern pathology*. – 2002. – Vol. 15, № 7. – P. 718–723. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12118109/> (date accessed: 27.02.2023).
130. Genta, R. M. No association between gastric fundic gland polyps and gastrointestinal neoplasia in a study of over 100,000 patients / R. M. Genta, C. M. Schuler, C. I. Robiou, R. H. Lash // *Clinical gastroenterology and hepatology*. – 2009. – Vol. 7, № 8. – P. 849–854. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19465154/> (date accessed: 27.02.2023).
131. Levy, M. D. Sporadic Fundic Gland Polyps With Low-Grade Dysplasia : A Large Case Series Evaluating Pathologic and Immunohistochemical Findings and Clinical Behavior / M. D. Levy, B. Bhattacharya // *American journal of clinical pathology*. – 2015. – Vol. 144, № 4. – P. 592–600. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26386080/> (date accessed: 27.02.2023).
132. Kishikawa, H. Fundic gland polyps accurately predict a low risk of future gastric carcinogenesis / H. Kishikawa, S. Kaida, S. Takarabe [et al.] // *Clinics and Research in Hepatology*

and Gastroenterology. – 2014. – Vol. 38, № 4. – P. 505–512. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24637176/> (date accessed: 27.02.2023).

133. Worthley, D. L. Gastric adenocarcinoma and proximal polyposis of the stomach (GAPPS) : a new autosomal dominant syndrome / D. L. Worthley, K. D. Phillips, N. Wayte [et al.] // Gut. – 2012. – Vol. 61, № 5. – P. 774–779.

134. Yanaru-Fujisawa, R. Familial fundic gland polyposis with gastric cancer / R. Yanaru-Fujisawa, S. Nakamura, T. Moriyama [et al.]. – Text : electronic // Gut. – 2012. – Vol. 61, № 7. – P. 1103–1104. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22027476/> (date accessed: 27.02.2023).

135. Li, J. Point Mutations in Exon 1B of APC Reveal Gastric Adenocarcinoma and Proximal Polyposis of the Stomach as a Familial Adenomatous Polyposis Variant / J. Li, S. L. Woods, S. Healey [et al.] // American journal of human genetics. – 2016. – Vol. 98, № 5. – P. 830–842. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27087319/> (date accessed: 27.02.2023).

136. Repak, R. The first European family with gastric adenocarcinoma and proximal polyposis of the stomach : case report and review of the literature / R. Repak, D. Kohoutova, M. Podhola [et al.]. – Text : electronic // Gastrointestinal endoscopy. – 2016. – Vol. 84, № 4. – P. 718–725. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27343414/> (date accessed: 27.02.2023).

137. Beer, A. Gastric adenocarcinoma and proximal polyposis of the stomach (GAPPS) – a rare recently described gastric polyposis syndrome - report of a case / A. Beer, B. Streubel, R. Asari [et al.] // Zeitschrift fur Gastroenterologie. – 2017. – Vol. 55, № 11. – P. 1131–1134. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29141268/> (date accessed: 27.02.2023).

138. Mitsui, Y. First report of an Asian family with gastric adenocarcinoma and proximal polyposis of the stomach (GAPPS) revealed with the germline mutation of the APC exon 1B promoter region / Y. Mitsui, R. Yokoyama, S. Fujimoto [et al.] // Gastric cancer : official journal of the International Gastric Cancer Association and the Japanese Gastric Cancer Association. – 2018. – Vol. 21, № 6. – P. 1058–1063. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29968043/> (date accessed: 27.02.2023).

139. Tsuchiya, T. Distinct methylation patterns of two APC gene promoters in normal and cancerous gastric epithelia / T. Tsuchiya, G. Tamura, K. Sato [et al.] // Oncogene. – 2000. – Vol. 19, № 32. – P. 3642–3646. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10951570/> (date accessed: 27.02.2023).

140. Hosoya, K. Adenomatous polyposis coli 1A is likely to be methylated as a passenger in human gastric carcinogenesis / K. Hosoya, S. Yamashita, T. Ando [et al.] // Cancer letters. – 2009. – Vol. 285, № 2. – P. 182–189. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19527921/> (date accessed: 27.02.2023).

141. Boer, W. B. De. Neoplastic Lesions of Gastric Adenocarcinoma and Proximal Polyposis Syndrome (GAPPS) Are Gastric Phenotype / W. B. De Boer, H. Ee, M. P. Kumarasinghe // *The American Journal of Surgical Pathology*. – 2018. – Vol. 42, № 1. – P. 1–8. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29112017/> (date accessed: 27.02.2023).
142. Carvalho, J. Redefinition of familial intestinal gastric cancer : clinical and genetic perspectives / J. Carvalho, P. Oliveira, J. Senz [et al.] // *Journal of medical genetics*. – 2021. – Vol. 58, № 1. – P. 1–11. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32066632/> (date accessed: 27.02.2023).
143. Vogelaar, I. P. Gastric cancer in three relatives of a patient with a biallelic IL12RB1 mutation / I. P. Vogelaar, R. S. Van der Post, E. Van de Vosse [et al.]. – Text : electronic // *Familial cancer*. – 2015. – Vol. 14, № 1. – P. 89–94. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25467645/> (date accessed: 27.02.2023).
144. Chen, H. Identification of the potential molecular mechanism and driving mutations in the pathogenesis of familial intestinal gastric cancer by whole exome sequencing / H. Chen, J. Wang, Y. Zhuang, H. Wu. – Text : electronic // *Oncology reports*. – 2018. – Vol. 40, № 4. – P. 2316–2324. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30106433/> (date accessed: 27.02.2023).
145. Corso, G. History, pathogenesis, and management of familial gastric cancer : original study of John XXIII's family / G. Corso, F. Roncalli, D. Marrelli [et al.] // *Biomed Research International*. – 2013. – Vol. 2013. – ID 385132. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23484115/> (date accessed: 27.02.2023).
146. Gullo, I. Recent advances in the pathology of heritable gastric cancer syndromes / I. Gullo, R. S. Van der Post, F. Carneiro. – Text : electronic // *Histopathology*. – 2021. – Vol. 78, № 1. – P. 125–147. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33382491/> (date accessed: 27.02.2023).
147. Daly, M. B. Familial High-Risk Assessment : Breast, ovarian, and Pancreatic: clinical. Guidelines / M. B. Daly, T. Pal, Z. AlHilli [et al.] // *NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines)*. – Internet resource. – Version 3.2023. – URL: <https://www.nccn.org/>
148. Lu, K. H. American society of clinical oncology expert statement : collection and use of a cancer family history for oncology providers / K. H. Lu, M. E. Wood, M. Daniels [et al.] // *Journal of Clinical Oncology*. – 2014. – Vol. 32, № 8. – P. 833–840.
149. Adam, M. P. GeneReviews® / ed. M. P. Adam, G. M. Mirzaa, R. A. Pagon [et al.]. // *National Center for Biotechnology Information genreviews*. – Internet resource. – 2023. – P. 1–20. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK11116/> (date accessed: 25.03.2023).
150. PDQ® Cancer Genetics Summaries – NCI. – Internet resource. – 2023. – URL: <https://www.cancer.gov/publications/pdq/information-summaries/genetics> (date accessed: 25.03.2023).

151. Home – NIH Genetic Testing Registry (GTR) / National Center for Biotechnology (NCBI). – Internet resource. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gtr/> (date accessed: 25.03.2023).
152. Treatment by Cancer Type / NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines). – Internet resource. – 2023. – URL: [https://www.nccn.org/guidelines/category\\_1](https://www.nccn.org/guidelines/category_1) (date accessed: 25.03.2023).
153. Molecular Testing and Biomarkers / ASCO. – Internet resource. – 2023. – URL: <https://old-prod.asco.org/practice-patients/guidelines/molecular-testing-and-biomarkers> (date accessed: 25.03.2023).
154. Шельгин, Ю. А. Аденоматозный полипозный синдром : клинические рекомендации / Ю. А. Шельгин, Е. Н. Имянитов, С. И. Куцев [и др.]. – Москва, 2022. – 51 с. – URL: <https://endoexpert.ru/stati/adenomatoznyy-polipoznyy-sindrom-klinicheskie-rekomendatsii-2022/> (date accessed: 25.03.2023).
155. Md, V. Efficient Architecture-Aware Acceleration of BWA-MEM for Multicore Systems / V. Md, S. Misra, H. Li, S. Aluru // 2019 IEEE International Parallel and Distributed Processing Symposium (IPDPS). – IEEE, 2019. – P. 314–324.
156. Picard Tools / Broad Institute. – Internet resource. – 2023. – URL: <https://broadinstitute.github.io/picard/> (date accessed: 27.03.2023).
157. Poplin, R. Scaling accurate genetic variant discovery to tens of thousands of samples / R. Poplin, V. Ruano-Rubio, M. A. Depristo [et al.] // BioRxiv. – 2018. – P. 201178. – URL: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/201178v3> (date accessed: 27.03.2023).
158. Harrison, S. M. Overview of specifications to the ACMG/AMP variant interpretation guidelines / S. M. Harrison, L. G. Biesecker, H. L. Rehm // Current Protocols in Human Genetics. – 2019. – Vol. 103, № 1. – P. E93. – URL: </pmc/articles/PMC6885382/> (date accessed: 27.03.2023).
159. Danishevich, A. M. Landscape of KRAS, BRAF, and PIK3CA mutations and clinical features of ebv-associated and microsatellite unstable gastric cancer / A. M. Danishevich, N. I. Pospheva, A.M. Stroganova [et al.] // Molecular Biology. – 2023. – Vol. 57, №. 1. – P. 71–84.
160. Deyhimi, P. Study of Epstein-Barr virus expression in Burkitt's lymphoma by polymerase chain reaction and in situ hybridization: A study in Iran / P. Deyhimi, M. Kalantari // Dental Research Journal. – 2014. – Vol. 1, №. 3. – P. 380–385.
161. Tavakoli, A. Association between Epstein-Barr virus infection and gastric cancer: a systematic review and meta-analysis / A. Tavakoli, S. H. Monavari, F.S. Mohammadi / BMC Cancer. – 2020. – Vol. 20. – P. 493.
162. Camargo, M. C. Improved survival of gastric cancer with tumour Epstein-Barr virus positivity: an international pooled analysis / M.C. Camargo, W.H. Kim, A.M. Chiaravalli [et al.] // Gut. – 2014. – Vol.63, №. 2. – P. 236–243.

163. Pyo, J.S. Prognostic Implication of EBV Infection in Gastric Carcinomas: A Systematic Review and Meta-Analysis / J.S. Pyo, N.Y. Kim, D.W. Kang [et al.] // *Medicina (Kaunas)*. – 2023. – Vol. 59, № 5. – P. 834.
164. Samadder, N. J. Comparison of universal genetic testing vs guideline-directed targeted testing for patients with hereditary cancer syndrome / N. J. Samadder, D. Riegert-Johnson, L. Boardman [et al.] // *JAMA Oncology*. – 2021. – Vol. 7, № 2. – P. 230–237. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33126242/> (date accessed: 08.04.2023).
165. Tedaldi, G. Multigene Panel Testing Increases the Number of Loci Associated with Gastric Cancer Predisposition / G. Tedaldi, F. Pirini, M. Tebaldi [et al.] // *Cancers*. – 2019. – Vol. 11, № 9. – P. 1340. – URL: </pmc/articles/PMC6769562/> (date accessed: 08.04.2023).
166. Stewart, M. D. Homologous Recombination Deficiency : Concepts, Definitions, and Assays / M. D. Stewart, D. M. Vega, R. C. Arend [et al.] // *The Oncologist*. – 2022. – Vol. 27, № 3. – P. 167. – URL: </pmc/articles/PMC8914493/> (date accessed: 30.05.2023).
167. Momozawa, Y. Expansion of Cancer Risk Profile for BRCA1 and BRCA2 Pathogenic Variants / Y. Momozawa, R. Sasai, Y. Usui [et al.] // *JAMA Oncology*. – 2022. – Vol. 8, № 6. – P. 871. – URL: </pmc/articles/PMC9011177/> (date accessed: 08.05.2023).
168. Li, S. Cancer Risks Associated With BRCA1 and BRCA2 Pathogenic Variants / S. Li, V. Silvestri, G. Leslie [et al.] // *Journal of Clinical Oncology*. – 2022. – Vol. 40, № 14. – P. 1529. – URL: </pmc/articles/PMC9084432/> (date accessed: 23.05.2023).
169. Sun, P. Clinical characteristics and prognostic implications of BRCA-associated tumors in males : a pan-tumor survey / P. Sun, Y. Li, X. Chao [et al.] // *BMC Cancer*. – 2020. – Vol. 20, № 1. – P. 1–16. – URL: <https://link.springer.com/articles/10.1186/s12885-020-07481-1> (date accessed: 23.05.2023).
170. Ichikawa, H. Pathogenic Germline BRCA1/2 Mutations and Familial Predisposition to Gastric Cancer / H. Ichikawa, T. Wakai, M. Nagahashi [et al.] // *JCO Precision Oncology*. – 2018. – Vol. 2, № 2. – P. 1–8. – URL: </pmc/articles/PMC6788804/> (date accessed: 23.05.2023).
171. Buckley, K. H. Gastric Cancer Risk and Pathogenesis in BRCA1 and BRCA2 Carriers / K. H. Buckley, B. A. Niccum, K. N. Maxwell, B. W. Katona // *Cancers*. – 2022. – Vol. 14, № 23. – P. 5953. – URL: <https://www.mdpi.com/2072-6694/14/23/5953/htm> (date accessed: 23.05.2023).
172. Machlowska, J. Status of CHEK2 and p53 in patients with early-onset and conventional gastric cancer / J. Machlowska, P. Kapusta, M. Szlendak [et al.] // *Oncology Letters*. – 2021. – Vol. 21, № 5. – URL: </pmc/articles/PMC7967923/> (date accessed: 08.05.2023).
173. Солодкий, В. А. CHEK2-ассоциированный рак молочной железы / В. А. Солодкий, О. С. Ходорович, А. А. Калинина-Масри, К. Д. Саркисян // *Вестник*

Российского научного центра рентгенорадиологии. – 2019. – Т. 19, № 2. – С. 40-51. – URL: <https://elibrary.ru/item.asp?id=38501247> (date accessed: 23.05.2023).

174. Бит-Сава, Е. М. Наследственные характеристики BRCA1 5382insC/ CHEK2/ BLM -ассоциированного рака молочной железы / Е. М. Бит-Сава // Сибирский онкологический журнал. – 2014. – № 6. – С. 15–18.

175. Bilyalov, A. Application of Multigene Panels Testing for Hereditary Cancer Syndromes // A. Bilyalov, S. Nikolaev, L. Shigapova [et al.] // *Biology (Basel)*. – 2022. – Vol. 11, № 10. – P. 1–11.

176. Girard, E. Familial breast cancer and DNA repair genes : insights into known and novel susceptibility genes from the GENESIS study, and implications for multigene panel testing / E. Girard, S. Eon-Marchais, R. Olasso [et al.] // *International Journal of Cancer*. – 2019. – Vol. 144, № 8. – P. 1962. – URL: </pmc/articles/PMC6587727/> (date accessed: 08.05.2023).

177. Goldgar, D. E. Rare variants in the ATM gene and risk of breast cancer / D. E. Goldgar, S. Healey, J. G. Dowty [et al.] // *Breast Cancer Research*. – 2011. – Vol. 13, № 4. – P. R73. – URL: </pmc/articles/PMC3236337/> (date accessed: 08.05.2023).

178. Kim, J. H. Genetic polymorphisms of ataxia telangiectasia mutated affect lung cancer risk / J. H. Kim, H. Kim, K. Y. Lee [et al.] // *Human Molecular Genetics*. – 2006. – Vol. 15, № 7. – P. 1181–1186. – URL: <https://academic.oup.com/hmg/article/15/7/1181/715415> (date accessed: 08.05.2023).

179. Thompson, D. Cancer risks and mortality in heterozygous ATM mutation carriers / D. Thompson, S. Duedal, J. Kirner [et al.] // *Journal of the National Cancer Institute*. – 2005. – Vol. 97, № 11. – P. 813–822. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15928302/> (date accessed: 08.05.2023).

180. Pritchard, C. C. Inherited DNA-Repair Gene Mutations in Men with Metastatic Prostate Cancer / C. C. Pritchard, J. Mateo, M. F. Walsh [et al.] // *The New England journal of medicine*. – 2016. – Vol. 375, № 5. – P. 443. – URL: </pmc/articles/PMC4986616/> (date accessed: 08.05.2023).

181. Roberts, N. J. ATM mutations in hereditary pancreatic cancer patients / N. J. Roberts, Y. Jiao, J. Yu [et al.] // *Cancer Discovery*. – 2012. – Vol. 2, № 1. – P. 41. – URL: </pmc/articles/PMC3676748/> (date accessed: 08.05.2023).

182. Chaffee, K. G. Prevalence of germline mutations in cancer genes among pancreatic cancer patients with positive family history / K. G. Chaffee, A. L. Oberg, R. R. McWilliams [et al.] // *Genetics in Medicine*. – 2018. – Vol. 20, № 1. – P. 119. – URL: </pmc/articles/PMC5760284/> (date accessed: 08.05.2023).

183. Bilyalov, A. Novel pathogenic variants in hereditary cancer syndromes in a highly heterogeneous cohort of patients: insights from multigene analysis / A. Bilyalov, A. Danishevich, S. Nikolaev [et al.] // *Cancers (Basel)*. – 2024. – Vol. 16, № 1. – P. 85.
184. Hall, M. J. Germline pathogenic variants in the ataxia telangiectasia mutated (ATM) gene are associated with high and moderate risks for multiple cancers / M. J. Hall, R. Bernhisel, E. Hughes [et al.] // *Cancer Prevention Research*. – 2021. – Vol. 14, № 4. – P. 433–440. – URL: <https://aacrjournals.org/cancerpreventionresearch/article/14/4/433/666130/Germline-Pathogenic-Variants-in-the-Ataxia> (date accessed: 08.05.2023).
185. Seal, S. Truncating mutations in the Fanconi anemia J gene BRIP1 are low-penetrance breast cancer susceptibility alleles / S. Seal, D. Thompson, A. Renwick [et al.] // *Nature Genetics*. – 2006. – Vol. 38, № 11. – P. 1239–1241. – URL: <https://www.nature.com/articles/ng1902> (date accessed: 23.05.2023).
186. Weitzel, J. N. Pathogenic and likely pathogenic variants in PALB2, CHEK2, and other known breast cancer susceptibility genes among 1054 BRCA-negative Hispanics with breast cancer / J. N. Weitzel, S. L. Neuhausen, A. Adamson [et al.] // *Cancer*. – 2019. – Vol. 125, № 16. – P. 2829–2836.
187. Ramus, S. J. Germline Mutations in the BRIP1, BARD1, PALB2, and NBN Genes in Women With Ovarian Cancer / S. J. Ramus, H. Song, E. Dicks [et al.] // *Journal of the National Cancer Institute*. – 2015. – Vol. 107, № 11. – P. djv214. – URL: <https://academic.oup.com/jnci/article/107/11/djv214/2457668> (date accessed: 30.05.2023).
188. Pilié, P. G. Germline genetic variants in men with prostate cancer and one or more additional cancers / P. G. Pilié, A. M. Johnson, K. L. Hanson [et al.] // *Cancer*. – 2017. – Vol. 123, № 20. – P. 3925–3932.
189. Ji, K. Characteristics of cancer susceptibility genes mutations in 282 patients with gastric adenocarcinoma / K. Ji, S. Ao, L. He [et al.] // *Chinese Journal of Cancer Research*. – 2020. – Vol. 32, № 4. – P. 508. – URL: [/pmc/articles/PMC7491540/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34411540/) (date accessed: 30.05.2023).
190. Lizard, S. The transfer of multigene panel testing for hereditary breast and ovarian cancer to healthcare : what are the implications for the management of patients and families? / S. Lizard, M. Eliade, J. Skrzypski [et al.] // *Journal of Clinical Oncology*. – 2016. – Vol. 34, № 15. – P. E13116-e13116.
191. Dal Buono, A. Defects in MMR Genes as a Seminal Example of Personalized Medicine: From Diagnosis to Therapy / A. Dal Buono, F. Gaiani, L. Poliani [et al.] // *Journal of Personalized Medicine*. – 2021. – Vol. 11, Page 1333. – 2021. – Vol. 11, № 12. – P. 1333. – URL: <https://www.mdpi.com/2075-4426/11/12/1333/htm> (date accessed: 30.05.2023).

192. De'angelis, G. L. Microsatellite instability in colorectal cancer / G. L. De'angelis, L. Bottarelli, C. Azzoni [et al.] // *Acta Bio-medica : Atenei Parmensis*. – 2018. – Vol. 89, № 9–S. – P. 97–101. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30561401/> (date accessed: 08.05.2023).
193. Hienonen, T. Little evidence for involvement of MLH3 in colorectal cancer predisposition / T. Hienonen, P. Laiho, R. Salovaara [et al.] // *International Journal of Cancer*. – 2003. – Vol. 106, № 2. – P. 292–296. – URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/ijc.11218> (date accessed: 08.05.2023).
194. Mohd, A. B. Truncation of the C-terminus of human MLH1 blocks intracellular stabilization of PMS2 and disrupts DNA mismatch repair / A. B. Mohd, B. Palama, S. E. Nelson [et al.] // *DNA repair*. – 2006. – Vol. 5, № 3. – P. 347–361. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16338176/> (date accessed: 08.05.2023).
195. Olkinuora, A. Biallelic germline nonsense variant of MLH3 underlies polyposis predisposition / A. Olkinuora, T. T. Nieminen, E. Mårtensson [et al.] // *Genetics in Medicine: Official Journal of the American College of Medical Genetics*. – 2019. – Vol. 21, № 8. – P. 1868–1873. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30573798/> (date accessed: 08.05.2023).
196. Korhonen, M. K. The first functional study of MLH3 mutations found in cancer patients / M. K. Korhonen, E. Vuorenmaa, M. Nyström // *Genes, Chromosomes & Cancer*. – 2008. – Vol. 47, № 9. – P. 803–809. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18521850/> (date accessed: 08.05.2023).
197. Qi Sui, Q. A frameshift mutation in exon 19 of MLH1 in a Chinese Lynch syndrome family : a pedigree study / Q. Qi Sui, W. Jiang, X. Dan Wu [et al.] // *Journal of Zhejiang University. Science. B*. – 2019. – Vol. 20, № 1. – P. 105. – URL: [/pmc/articles/PMC6331328/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3131328/) (date accessed: 08.05.2023).
198. Amadou, A. Revisiting tumor patterns and penetrance in germline TP53 mutation carriers : temporal phases of Li-Fraumeni syndrome / A. Amadou, M. I. W. Achatz, P. Hainaut // *Current Opinion in Oncology*. – 2018. – Vol. 30, № 1. – P. 23–29. – URL: [https://journals.lww.com/coinoncology/Fulltext/2018/01000/Revisiting\\_tumor\\_patterns\\_and\\_penetrance\\_in.5.aspx](https://journals.lww.com/coinoncology/Fulltext/2018/01000/Revisiting_tumor_patterns_and_penetrance_in.5.aspx) (date accessed: 30.05.2023).
199. Mai, P. L. Risks of first and subsequent cancers among TP53 mutation carriers in the National Cancer Institute Li-Fraumeni syndrome cohort / P. L. Mai, A. F. Best, J. A. Peters [et al.] // *Cancer*. – 2016. – Vol. 122, № 23. – P. 3673–3681.
200. Kato, S. Understanding the function–structure and function–mutation relationships of p53 tumor suppressor protein by high-resolution missense mutation analysis / S. Kato, S. Y. Han, W. Liu [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2003. – Vol. 100, № 14. – P. 8424. – URL: [/pmc/articles/PMC166245/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/166245/) (date accessed: 30.05.2023).

201. Giacomelli, A. O. Mutational processes shape the landscape of TP53 mutations in human cancer / A. O. Giacomelli, X. Yang, R. E. Lintner [et al.] // *Nature genetics*. – 2018. – Vol. 50, № 10. – P. 1381–1387. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30224644/> (date accessed: 30.05.2023).
202. Villani, A. Biochemical and imaging surveillance in germline TP53 mutation carriers with Li-Fraumeni syndrome : a prospective observational study / A. Villani, U. Tabori, J. Schiffman [et al.]. – Text : electronic // *The Lancet. Oncology*. – 2011. – Vol.12, №6. – P. 559–567. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21601526/> (date accessed: 30.05.2023).
203. Mcintyre, J. F. Germline mutations of the p53 tumor suppressor gene in children with osteosarcoma / J. F. Mcintyre, B. Smith-Sorensen, S. H. Friend [et al.] // *Journal of Clinical Oncology*. – 1994. – Vol. 12, № 5. – P. 925–930. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8164043/> (date accessed: 30.05.2023).
204. Gonzalez, K. D. High frequency of de novo mutations in Li-Fraumeni syndrome / K. D. Gonzalez, C. H. Buzin, K. A. Noltner [et al.]. – Text : electronic // *Journal of medical genetics*. – 2009. – Vol. 46, № 10. – P. 689–693. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19556618/> (date accessed: 30.05.2023).
205. AlHarbi, M. Rare TP53 variant associated with Li-Fraumeni syndrome exhibits variable penetrance in a Saudi family / M. AlHarbi, N. Mubarak, L. Almubarak [et al.]. – Text : electronic // *NPJ genomic medicine*. – 2018. – Vol. 3, № 1. – P. 35. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30588330/> (date accessed: 30.05.2023).
206. Stoltze, U. Clinical characteristics and registry-validated extended pedigrees of germline TP53 mutation carriers in Denmark / U. Stoltze, A. B. Skytte, H. Roed [et al.] // *PloS one*. – 2018. – Vol. 13. – № 1. – P. e0190050. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29324801/> (date accessed: 30.05.2023).
207. Wang, B. Mapping the p53 transcriptome universe using p53 natural polymorphs / B. Wang, D. Niu, T. H. Lam [et al.] // *Cell death and differentiation*. – 2014. – Vol. 21, № 4. – P. 521–532. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24076587/> (date accessed: 30.05.2023).
208. Dearth, L. R. Inactive full-length p53 mutants lacking dominant wild-type p53 inhibition highlight loss of heterozygosity as an important aspect of p53 status in human cancers / L. R. Dearth, H. Qian, T. Wang [et al.] // *Carcinogenesis*. – 2007. – Vol. 28, № 2. – P. 289–298. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16861262/> (date accessed: 30.05.2023).
209. Данишевич, А. М. Наследственный диффузный рак желудка , ассоциированный с неописанным герминальным вариантом с . 1596G > А в гене CDH1 / А. М. Данишевич, Т.С. Лисица, С.Э. Николаев [и др.]. // *Успехи молекулярной онкологии*. – 2023. – Т. 10, № 1. – С. 87–93.

210. Melo, S. Predicting the functional impact of CDH1 missense mutations in hereditary diffuse gastric cancer / S. Melo, J. Figueiredo, M. S. Fernandes [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2017. – Vol. 18, № 12. – P. 1–18.
211. Yasmeen, A. Erbb receptors and complex in human carcinomas / A. Yasmeen, T. A. Bismar, A.- E. Al. Moustafa // *Future oncology*. – 2006. – Vol. 2, № 6. – P. 765–781.
212. Hoang, T. Gene mutations distinguishing gastric from colorectal and esophageal adenocarcinomas / T. Hoang, A. K. Ganesan, D. Hiyama, F. Dayyani. – Text : electronic // *Journal of Gastrointestinal Oncology*. – 2020. – Vol. 11, № 1. – P. 45. – URL: [/pmc/articles/PMC7052769/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38123456/) (date accessed: 08.05.2023).
213. Benusiglio, P. R. CDH1 germline mutations and the hereditary diffuse gastric and lobular breast cancer syndrome : a multicentre study / P. R. Benusiglio, D. Malka, E. Rouleau [et al.] // *Journal of Medical Genetics*. – 2013. – Vol. 50, № 7. – P. 486–489.
214. Mastracci, T. L. E-cadherin alterations in atypical lobular hyperplasia and lobular carcinoma in situ of the breast / T. L. Mastracci, S. Tjan, A. L. Bane [et al.] // *Modern Pathology*. – 2005. – Vol. 18, № 6. – P. 741–751.
215. Spiker, A. M. Gorlin Syndrome / A. M. Spiker, T. Troxell, M. L. Ramsey. – Text : electronic // *StatPearls*. – 2023. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK430921/>. (date accessed: 30.05.2023).
216. Altaraihi, M. A healthy individual with a homozygous PTCH2 frameshift variant : are variants of PTCH2 associated with nevoid basal cell carcinoma syndrome? / M. Altaraihi, K. Wadt, J. Ek [et al.] // *Human Genome Variation*. – 2019. – Vol. 6. – № 1. – P. 10.
217. Smith, M. J. PTCH2 is not a strong candidate gene for gorlin syndrome predisposition / M. J. Smith, D. G. Evans // *Familial Cancer*. – 2022. – Vol. 21, № 3. – P. 343–346.