

УДК 575.224.22

## СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ МУТАЦИЙ В БУККАЛЬНОМ ЭПИТЕЛИИ И КРОВИ У ПАЦИЕНТОВ С РАКОМ ЛЕГКИХ И ЗДОРОВЫХ ЛЮДЕЙ

© О. В. Сержантова<sup>1,2</sup>, А. Г. Новикова<sup>1,2</sup>, А. А. Михайлов<sup>1</sup>, И. П. Мошуров<sup>1</sup>, А. П. Гуреев<sup>2</sup>, \*

<sup>1</sup>Воронежский областной клинический онкологический диспансер, Воронеж, 394036 Россия

<sup>2</sup>Воронежский государственный университет, кафедра генетики, цитологии и биоинженерии, Воронеж, 394018 Россия

\*e-mail: gureev@bio.vsu.ru

Поступила в редакцию 04.10.2023 г.

После доработки 15.12.2023 г.

Принята к публикации 11.01.2024 г.

Рак легких является одной из основных причин смерти от рака. Поиск новых методов ранней и точной диагностики рака легких имеет решающее значение для эффективного лечения. Мы показали, что у пациентов с раком легких в буккальном эпителии больше мутаций в генах *FLT3*, *PDGFRA*, *KDR*, *PIK3CA*, *HRAS*, *FGFR3*, чем у людей без диагностированного рака легких. Таким образом, изучение молекулярных изменений может быть использовано как метод точной диагностики рака легких на ранних стадиях исследования.

*Ключевые слова:* рак легкого, секвенирование, буккальный эпителий, мутационный профиль, ген.

DOI: 10.31857/S0016675824050053 EDN: CJMKTT

На сегодняшний день рак легкого занимает ведущую позицию (16.1%) в структуре онкозаболеваний по России. По данным на 2019 год в России у мужчин рак легкого опережает все остальные новообразования. Среди женского населения рак легкого занимает 10-е место (3.8%), уступая по частоте встречаемости раку кожи (кроме меланомы) (15.2%), раку молочной железы (21.2%), шейки матки (5%), тела матки (7.8%), яичников (4.1%), гемобластозам (4.7%), раку желудка (4.4%), ободочной кишки (7.3%), прямой кишки (4.4%) и прочим (9.8%). За 2019 г. заболеваемость раком легкого составила 47005 человек. Рак легких является одной из ведущих причин смертности от онкозаболеваний [1]. Абсолютное число умерших от данного заболевания по России в 2019 г. составило 50046 человек. Более 1/4 (25.5%) случаев смерти среди мужчин обусловлены раком легкого, бронхов и трахеи. Среди женщин смертность от рака легкого занимает 7.1%. Высокая смертность во многом обусловлена тем, что у 75% пациентов рак легких диагностируется на поздних стадиях, когда возможности лечения сильно ограничены [2]. Поиск новых методов ранней и точной диагностики рака легких имеет решающее значение для его эффективного лечения.

На данный момент наиболее распространены инвазивные технологии диагностики рака легкого, к которым относят в первую очередь

бронхоскопические исследования (brush-биопсия, бронхоальвеолярный лаваж и эндобронхиальная ультразвуковая биопсия) [3]. Однако инвазивность и необходимость в привлечении высококвалифицированного врача не дает возможности использовать данные методы для популяционного скрининга [4]. Неинвазивными методами можно анализировать мокроту и буккальный эпителий. Для диагностики рака легкого в мокроте анализируются клеточные аберрации с использованием цитологических методов, профили метилирования генов, соматические мутации, анализируют микроРНК [5]. Но зачастую исследователи сталкиваются с трудностями во время сбора мокроты. Обычно эти трудности возникают при работе с некурящими пациентами и людьми без воспалительных заболеваний дыхательных путей [6]. Буккальный эпителий, который располагается в ротовой полости гораздо более доступный объект исследования. Пациенты с раком легкого подвергают легкие и полость рта воздействию одних и тех же повреждающих факторов, к которым в первую очередь относятся канцерогены, содержащиеся в табачном дыме [7].

Было показано, что изменения профиля метилирования в бронхиальных тканях, вызванные курением, коррелируют с изменениями в метилировании в ткани ротовой полости [8]. У пациентов с раком легкого увеличивается цитогенетическая нестабильность, что проявляется в увеличении числа клеток с микроядрами, увеличивается частота

Таблица 1. Подробное описание экспериментальной и контрольной групп

| Параметр  | Контроль<br>(n = 9) | Рак легкого<br>(n = 20) |
|---|---------------------|-------------------------|
| Возраст (средний $\pm$ ст.отк.)   | 61.2 $\pm$ 8.7      | 46.7 $\pm$ 10.7         |
| Пол (муж./жен.)   | 0/9                 | 18/2                    |
| Статус курения (не курит/курил ранее/курит)   | 7/0/2               | 4/4/12                  |
| Количество пациентов с детектируемым H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> в КВВ  | 3                   | 14                      |
| Средняя концентрация H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> в КВВ (нмоль)  | 49.2 $\pm$ 25.9     | 506.7 $\pm$ 96.5        |
| Гистология  |                     |                         |
| Мелкоклеточный рак легкого  | –                   | 2                       |
| Плоскоклеточный рак легкого   | –                   | 1                       |
| Крупноклеточная карцинома   | –                   | 2                       |
| Аденокарцинома  | –                   | 15                      |
| Стадия (I/II/IIIА/IIIВ/IV)  | –                   | 0/3/6/8/3               |
| Первичная опухоль (T <sub>x</sub> /T <sub>1</sub> /T <sub>2</sub> /T <sub>3</sub> /T <sub>4</sub> )               | –                   | 0/2/8/2/8               |
| Региональные лимфатические узлы (N <sub>x</sub> /N <sub>0</sub> /N <sub>1</sub> /N <sub>2</sub> /N <sub>3</sub> ) | –                   | 1/2/5/10/2              |
| Отдаленные метастазы (M <sub>x</sub> /M <sub>0</sub> /M <sub>1</sub> )  | –                   | 0/17/3                  |

полиморфизмов в генах *P53* и *murine double minute 2 (MDM2)* [9].

Цель данного исследования – изучить мутационный профиль клеток буккального эпителия пациентов с раком легкого в сравнении с буккальным эпителием контрольной группы (лиц без диагностированных злокачественных новообразований), а также с герминативными мутациями в крови пациентов.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Участниками исследования являлись пациенты Воронежского областного клинического онкологического диспансера с диагностированным раком легкого, которые не подвергались лечению на момент сбора биологического материала для исследования. В контрольную группу входили пациенты онкологического диспансера без диагностированного рака легкого или иных заболеваний дыхательных путей. Подробное описание параметров экспериментальной и контрольной групп представлено в табл. 1. Протокол исследования был одобрен этическим комитетом Воронежского государственного университета и соответствовал основным положениям Хельсинкской декларации. От всех участников было получено информированное письменное согласие на включение в исследование. Все участники были проинформированы о последующих генетических исследованиях, проводимых с их биологическим материалом.

Сбор образцов буккального эпителия осуществлялся медицинским работником с помощью щетки FloqSwab и помещался в пробирку с консервирующим ДНК раствором (Helikon, Россия). Для сбора периферической крови медицинский

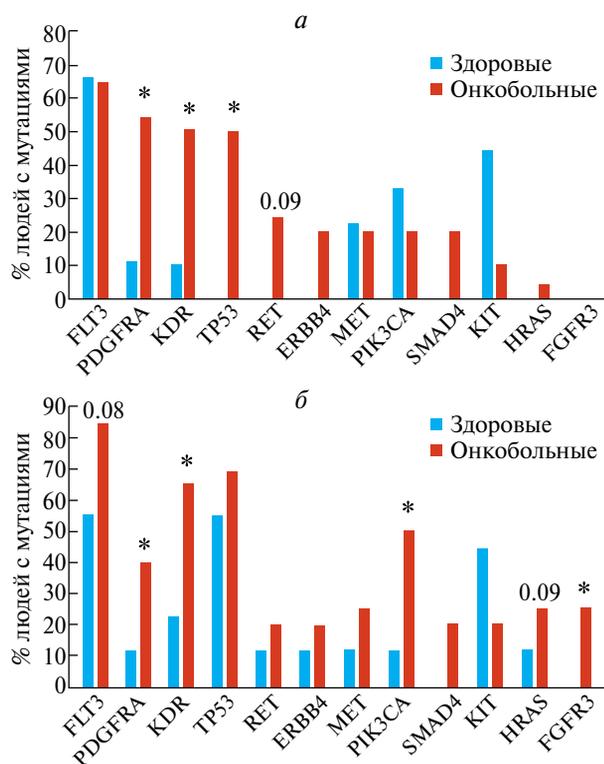
работник использовал вакуумные пробирки, покрытые гепарином.

Геномная ДНК была выделена из клеток буккального эпителия и крови с использованием набора Quick-DNA Miniprep Plus Kit (Zymo Research, США) согласно прилагаемому протоколу. Качественный анализ изолированной ДНК осуществляли с помощью горизонтального электрофореза в 2%-ном агарозном геле в 1x TAE-буфере с окрашиванием бромистым этидием. Измерение концентрации ДНК проводили при помощи флуориметрической системы Qubit (Thermo Fisher Scientific, США) в соответствии с прилагаемым протоколом.

Для последующего секвенирования проводилась таргетная амплификация с использованием панели праймеров AmpliSeq Cancer HotSpot Panel v2 (Thermo Fisher Scientific, США) на платформе Ion Torrent PGM. Библиотеки для секвенирования готовили, используя набор реактивов Ion AmpliSeq™ Library Kit 2.0 (Thermo Fisher Scientific). Библиотеки были мультиплексированы с использованием уникальных баркодов из пула IonXpress.

Для идентификации полиморфизмов использовалось Ion Torrent Suite версии 5.10 и Torrent Variant Caller plugin версии 5.10.0.16. Все полиморфизмы с низким качеством прочтения и/или недостаточным покрытием были отфильтрованы. Аннотация полиморфизмов проводилась с использованием ENSEMBL Variant Effect Predictor версии 97. Для последующей обработки использовалось VCFtools версии 0.1.13.

Сравнение частот встречаемости мутантных вариантов гена и вариантов гена дикого типа проводили по критерию  $\chi^2$  Пирсона. Правильность



**Рис. 1.** Частота встречаемости мутаций в крови (а) и буккальном эпителии (б) здоровых людей и пациентов с раком легкого. \* –  $p < 0.05$ , различия частот встречаемости по  $\chi^2$  Пирсона статистически достоверны.

распределения проверяли с помощью критерия Шапиро–Уилкса. Для оценки достоверности различий между группами использовался  $U$  критерий Манна–Уитни.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### Мутационный профиль в крови

Наибольшее количество мутаций в крови было выявлено в гене *FLT3* (66.7% среди здоровых и 65% среди людей с раком легкого), а именно мутация rs2491231. Ген *FLT3* (FMS-like tyrosine kinase 3) кодирует тирозинкиназу рецептора III класса, регулирующую кроветворение и играющую важную роль в выживании и пролиферации гемопоэтических стволовых клеток и клеток-предшественников.

### Мутационный профиль в крови и буккальном эпителии

Высокая мутабельность наблюдалась в гене *PDGFRA* (Platelet-derived growth factor receptor alpha) (55% у пациентов с раком легкого против 11.1% у здоровых людей,  $p < 0.05$  по  $\chi^2$  Пирсона).

Наиболее часто в этом гене встречалась мутация rs1560480581. Данная мутация представляет собой однонуклеотидный полиморфизм. Ген *PDGFRA* кодирует рецептор тирозинкиназы клеточной поверхности для членов семейства факторов роста тромбоцитов. Эти факторы роста являются митогенами для клеток мезенхимального происхождения. Исследования показывают, что этот ген играет роль в развитии органов, заживлении ран и прогрессировании опухолей.

Также высокая мутабельность наблюдалась в гене *KDR* (50% у пациентов с раком легкого против 11.1% у здоровых людей,  $p < 0.05$  по  $\chi^2$  Пирсона). Ген *KDR* (kinase insert domain receptor) кодирует один из двух рецепторов VEGF (фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) является основным фактором роста эндотелиальных клеток). Этот рецептор, известный как рецептор домена вставки киназы, представляет собой рецепторную тирозинкиназу типа III. Он функционирует как главный медиатор VEGF-индуцированной пролиферации эндотелия, выживания, миграции, морфогенеза канальцев и прорастания.

У здоровых людей в крови не было обнаружено мутаций в генах *TP53* (tumor protein p53), *RET* (ret proto-oncogene), *ERBB4* (erb-b2 receptor tyrosine kinase 4), *SMAD4* (SMAD family member 4), *HRAS* (HRas proto-oncogene, GTPase), однако они были обнаружены у пациентов с раком легкого (50% для гена *TP53*,  $p < 0.05$  по  $\chi^2$  Пирсона; 25% для гена *RET*,  $p = 0.09$  по  $\chi^2$  Пирсона; 20% для генов *ERBB4*, *SMAD4*, различий по  $\chi^2$  Пирсона не было выявлено; 5% для гена *HRAS*, различий по  $\chi^2$  Пирсона не было выявлено) (рис. 1).

Было выявлено, что в буккальном эпителии мутации в гене *FLT3*, встречаются у 85% пациентов с раком легкого, в то время как у контрольной группы только в 55.6% случаев ( $p = 0.08$  по  $\chi^2$  Пирсона). Мутации в гене *PDGFRA* встречаются у 40% пациентов с раком легкого и 11.1% людей из контрольной группы ( $p < 0.05$  по  $\chi^2$  Пирсона). Мутации в гене *KDR* встречаются у 65% пациентов с раком легкого и 22.2% людей из контрольной группы ( $p < 0.05$  по  $\chi^2$  Пирсона). Мутации в гене *PIK3CA* встречаются у 50% пациентов с раком легкого и у 11.1% людей из контрольной группы ( $p < 0.05$  по  $\chi^2$  Пирсона). Мутации в гене *HRAS* встречаются у 25% пациентов с раком легкого и 11.1% людей из контрольной группы ( $p = 0.09$  по  $\chi^2$  Пирсона). У контрольной группы не было обнаружено мутаций в буккальном эпителии в гене *FGFR3*, в то время как 25% пациентов с раком легкого были выявлены мутации ( $p < 0.05$  по  $\chi^2$  Пирсона).

Мы не выявили различий в частотах встречаемости мутаций в крови и буккальном эпителии пациентов в зависимости от стадии рака (табл. 2, 3). Также мы показали, что курение не влияет на

**Таблица 2.** Сравнение частот встречаемости мутаций в буккальном эпителии пациентов с раком легкого на разных стадиях. Различия частот встречаемости по  $\chi^2$  Пирсона

| Ген           | II            |            | IIIА          |            | IIIВ          |            | IV            |            | Критерий Пирсона |
|---------------|---------------|------------|---------------|------------|---------------|------------|---------------|------------|------------------|
|               | дикий тип (%) | мутант (%) |                  |
| <i>ERBB4</i>  | 1 (33.3)      | 2 (66.7)   | 5 (83.3)      | 1 (16.7)   | 7 (87.5)      | 1 (12.5)   | 3 (100)       | 0 (0)      | <0.16071         |
| <i>FLT3</i>   | 0 (0)         | 3 (100)    | 1 (16.7)      | 5 (83.3)   | 1 (12.5)      | 7 (87.5)   | 1 (33.3)      | 2 (66.7)   | <0.71198         |
| <i>JAK3</i>   | 3 (100)       | 0 (0)      | 5 (83.3)      | 1 (16.7)   | 8 (100)       | 0 (0)      | 3 (100)       | 0 (0)      | <0.48327         |
| <i>KDR</i>    | 2 (66.7)      | 1 (33.3)   | 1 (16.7)      | 5 (83.3)   | 3 (37.5)      | 5 (62.5)   | 1 (33.3)      | 2 (66.7)   | <0.52520         |
| <i>MET</i>    | 2 (66.7)      | 1 (33.3)   | 4 (66.6)      | 2 (33.4)   | 6 (75)        | 2 (25)     | 3 (100)       | 0 (0)      | <0.72123         |
| <i>PDGFRA</i> | 0 (0)         | 3 (100)    | 2 (33.4)      | 4 (66.6)   | 5 (62.5)      | 3 (37.5)   | 1 (33.3)      | 2 (66.7)   | <0.27765         |
| <i>SMAD4</i>  | 3 (100)       | 0 (0)      | 4 (66.6)      | 2 (33.4)   | 7 (87.5)      | 1 (12.5)   | 2 (66.7)      | 1 (33.3)   | <0.56595         |
| <i>TP53</i>   | 0 (0)         | 3 (100)    | 2 (33.4)      | 4 (66.6)   | 3 (37.5)      | 5 (62.5)   | 1 (33.3)      | 2 (66.7)   | <0.67132         |
| <i>CSF1R</i>  | 3 (100)       | 0 (0)      | 5 (83.3)      | 1 (16.7)   | 8 (100)       | 0 (0)      | 3 (100)       | 0 (0)      | <0.48327         |
| <i>FGFR1</i>  | 3 (100)       | 0 (0)      | 5 (83.3)      | 1 (16.7)   | С             | 0 (0)      | 3 (100)       | 0 (0)      | <0.48327         |
| <i>PIK3CA</i> | 2 (66.7)      | 1 (33.3)   | 2 (33.4)      | 4 (66.6)   | 4 (50)        | 4 (50)     | 2 (66.7)      | 1 (33.3)   | <0.72123         |
| <i>RET</i>    | 1 (33.3)      | 2 (66.7)   | 5 (83.3)      | 1 (16.7)   | 7 (87.5)      | 1 (12.5)   | 3 (100)       | 0 (0)      | <0.16071         |
| <i>HRAS</i>   | 2 (66.7)      | 1 (33.3)   | 4 (66.6)      | 2 (33.4)   | 7 (87.5)      | 1 (12.5)   | 2 (66.7)      | 1 (33.3)   | <0.77439         |
| <i>FGFR3</i>  | 2 (66.7)      | 1 (33.3)   | 5 (83.3)      | 1 (16.7)   | 6 (75)        | 2 (25)     | 2 (66.7)      | 1 (33.3)   | <0.93092         |
| <i>KIT</i>    | 2 (66.7)      | 1 (33.3)   | 6 (100)       | 0 (0)      | 7 (87.5)      | 1 (12.5)   | 2 (66.7)      | 1 (33.3)   | <0.51412         |
| <i>ATM</i>    | 3 (100)       | 0 (0)      | 4 (66.6)      | 2 (33.4)   | 8 (100)       | 0 (0)      | 3 (100)       | 0 (0)      | <0.15873         |
| <i>RBI</i>    | 3 (100)       | 0 (0)      | 6 (100)       | 0 (0)      | 7 (87.5)      | 1 (12.5)   | 3 (100)       | 0 (0)      | <0.66417         |
| <i>NRAS</i>   | 3 (100)       | 0 (0)      | 5 (83.3)      | 1 (16.7)   | 8 (100)       | 0 (0)      | 3 (100)       | 0 (0)      | <0.48327         |
| <i>EZH2</i>   | 3 (100)       | 0 (0)      | 5 (83.3)      | 1 (16.7)   | 8 (100)       | 0 (0)      | 2 (66.7)      | 1 (33.3)   | <0.4303          |
| <i>KRAS</i>   | 2 (66.7)      | 1 (33.3)   | 6 (100)       | 0 (0)      | 8 (100)       | 0 (0)      | 3 (100)       | 0 (0)      | <0.11333         |
| <i>STK11</i>  | 3 (100)       | 0 (0)      | 6 (100)       | 0 (0)      | 8 (100)       | 0 (0)      | 2 (66.7)      | 1 (33.3)   | <0.11333         |
| <i>IDH1</i>   | 3 (100)       | 0 (0)      | 5 (83.3)      | 1 (16.7)   | 8 (100)       | 0 (0)      | 3 (100)       | 0 (0)      | <0.48327         |
| <i>PTEN</i>   | 3 (100)       | 0 (0)      | 6 (100)       | 0 (0)      | 7 (87.5)      | 1 (12.5)   | 3 (100)       | 0 (0)      | <0.66417         |
| <i>EGFR</i>   | 3 (100)       | 0 (0)      | 6 (100)       | 0 (0)      | 7 (87.5)      | 1 (12.5)   | 3 (100)       | 0 (0)      | <0.66417         |
| <i>MLH1</i>   | 3 (100)       | 0 (0)      | 5 (83.3)      | 1 (16.7)   | 8 (100)       | 0 (0)      | 3 (100)       | 0 (0)      | <0.48327         |
| <i>FGFR2</i>  | 3 (100)       | 0 (0)      | 6 (100)       | 0 (0)      | 6 (75)        | 2 (25)     | 3 (100)       | 0 (0)      | <0.34303         |

**Таблица 3.** Сравнение частот встречаемости мутаций в крови пациентов с раком легкого на разных стадиях. Различия частот встречаемости по  $\chi^2$  Пирсона

| Ген           | II            |            | IIIА          |            | IIIВ          |            | IV            |            | Критерий Пирсона |
|---------------|---------------|------------|---------------|------------|---------------|------------|---------------|------------|------------------|
|               | дикий тип (%) | мутант (%) |                  |
| <i>ERBB4</i>  | 3 (100)       | 0 (0)      | 4 (66.6)      | 2 (33.4)   | 7 (87.5)      | 1 (12.5)   | 2 (66.7)      | 1 (33.3)   | <0.74104         |
| <i>FLT3</i>   | 1 (33.3)      | 2 (66.7)   | 1 (16.7)      | 5 (83.3)   | 4 (50)        | 4 (50)     | 0 (0)         | 3 (100)    | <0.24807         |
| <i>KDR</i>    | 2 (66.7)      | 1 (33.3)   | 2 (33.4)      | 4 (66.6)   | 5 (62.5)      | 3 (37.5)   | 1 (33.3)      | 2 (66.7)   | <0.60771         |
| <i>MET</i>    | 3 (100)       | 0 (0)      | 4 (66.6)      | 2 (33.4)   | 7 (87.5)      | 1 (12.5)   | 2 (66.7)      | 1 (33.3)   | <0.51412         |
| <i>PDGFRA</i> | 1 (33.3)      | 2 (66.7)   | 2 (33.4)      | 4 (66.6)   | 5 (62.5)      | 3 (37.5)   | 1 (33.3)      | 2 (66.7)   | <0.64814         |
| <i>SMAD4</i>  | 3 (100)       | 0 (0)      | 4 (66.6)      | 2 (33.4)   | 7 (87.5)      | 1 (12.5)   | 2 (66.7)      | 1 (33.3)   | <0.05756         |
| <i>TP53</i>   | 2 (66.7)      | 1 (33.3)   | 2 (33.4)      | 4 (66.6)   | 5 (62.5)      | 3 (37.5)   | 2 (66.7)      | 1 (33.3)   | <0.47681         |
| <i>CSF1R</i>  | 3 (100)       | 0 (0)      | 5 (83.3)      | 1 (16.7)   | 8 (100)       | 0 (0)      | 3 (100)       | 0 (0)      | <0.11333         |
| <i>PIK3CA</i> | 3 (100)       | 0 (0)      | 4 (66.6)      | 2 (33.4)   | 7 (87.5)      | 1 (12.5)   | 2 (66.7)      | 1 (33.3)   | <0.16071         |
| <i>RET</i>    | 3 (100)       | 0 (0)      | 3 (50)        | 3 (50)     | 7 (87.5)      | 1 (12.5)   | 2 (66.7)      | 1 (33.3)   | <0.19790         |
| <i>HRAS</i>   | 3 (100)       | 0 (0)      | 5 (83.3)      | 1 (16.7)   | 8 (100)       | 0 (0)      | 3 (100)       | 0 (0)      | <0.48327         |
| <i>KIT</i>    | 3 (100)       | 0 (0)      | 4 (66.6)      | 2 (33.4)   | 8 (100)       | 0 (0)      | 3 (100)       | 0 (0)      | <0.41205         |
| <i>ATM</i>    | 3 (100)       | 0 (0)      | 4 (66.6)      | 2 (33.4)   | 8 (100)       | 0 (0)      | 3 (100)       | 0 (0)      | <0.41205         |
| <i>RBI</i>    | 3 (100)       | 0 (0)      | 4 (66.6)      | 2 (33.4)   | 8 (100)       | 0 (0)      | 3 (100)       | 0 (0)      | <0.34303         |
| <i>NRAS</i>   | 3 (100)       | 0 (0)      | 5 (83.3)      | 1 (16.7)   | 8 (100)       | 0 (0)      | 3 (100)       | 0 (0)      | <0.66417         |
| <i>HNFIА</i>  | 3 (100)       | 0 (0)      | 5 (83.3)      | 1 (16.7)   | 8 (100)       | 0 (0)      | 3 (100)       | 0 (0)      | <0.11333         |
| <i>IDH1</i>   | 3 (100)       | 0 (0)      | 5 (83.3)      | 1 (16.7)   | 8 (100)       | 0 (0)      | 3 (100)       | 0 (0)      | <0.48327         |
| <i>PTEN</i>   | 3 (100)       | 0 (0)      | 4 (66.6)      | 2 (33.4)   | 8 (100)       | 0 (0)      | 3 (100)       | 0 (0)      | <0.79677         |
| <i>GNAQ</i>   | 3 (100)       | 0 (0)      | 5 (83.3)      | 1 (16.7)   | 8 (100)       | 0 (0)      | 3 (100)       | 0 (0)      | <0.11333         |
| <i>MLH1</i>   | 3 (100)       | 0 (0)      | 4 (66.6)      | 2 (33.4)   | 8 (100)       | 0 (0)      | 3 (100)       | 0 (0)      | <0.11333         |
| <i>GNAS</i>   | 3 (100)       | 0 (0)      | 5 (83.3)      | 1 (16.7)   | 8 (100)       | 0 (0)      | 3 (100)       | 0 (0)      | <0.48327         |

**Таблица 4.** Сравнение частот встречаемости мутаций в буккальном эпителии пациентов с раком легкого в зависимости от курения. Различия частот встречаемости по  $\chi^2$  Пирсона.

| Ген           | Не курит      |            | Курил ранее   |            | Курит         |            | Критерий Пирсона |
|---------------|---------------|------------|---------------|------------|---------------|------------|------------------|
|               | дикий тип (%) | мутант (%) | дикий тип (%) | мутант (%) | дикий тип (%) | мутант (%) |                  |
| <i>ERBB4</i>  | 4 (100)       | 0 (0)      | 2 (50)        | 2 (50)     | 10 (83.3)     | 2 (16.7)   | <0.18888         |
| <i>FLT3</i>   | 1 (25)        | 3 (75)     | 1 (25)        | 3 (75)     | 1 (8.3)       | 11 (91.7)  | <0.59281         |
| <i>JAK3</i>   | 4 (100)       | 0 (0)      | 3 (75)        | 1 (25)     | 12 (100)      | 0 (0)      | <0.12181         |
| <i>KDR</i>    | 0 (0)         | 4 (100)    | 2 (50)        | 2 (50)     | 5 (41.6)      | 7 (58.4)   | <0.24859         |
| <i>MET</i>    | 3 (75)        | 1 (25)     | 2 (50)        | 2 (50)     | 10 (83.3)     | 2 (16.7)   | <0.41111         |
| <i>PDGFRA</i> | 1 (25)        | 3 (75)     | 1 (25)        | 3 (75)     | 6 (50)        | 6 (50)     | <0.53526         |
| <i>SMAD4</i>  | 3 (75)        | 1 (25)     | 3 (75)        | 1 (25)     | 10 (83.3)     | 2 (16.7)   | <0.90108         |
| <i>TP53</i>   | 1 (25)        | 3 (75)     | 1 (25)        | 3 (75)     | 4 (33.4)      | 8 (64.6)   | <0.92370         |
| <i>CSF1R</i>  | 3 (75)        | 1 (25)     | 4 (100)       | 0 (0)      | 12 (100)      | 0 (0)      | <0.12181         |
| <i>FGFR1</i>  | 3 (75)        | 1 (25)     | 4 (100)       | 0 (0)      | 12 (100)      | 0 (0)      | <0.12181         |
| <i>PIK3CA</i> | 2 (50)        | 2 (50)     | 3 (75)        | 1 (25)     | 5 (41.6)      | 7 (58.4)   | <0.51342         |
| <i>RET</i>    | 2 (50)        | 2 (50)     | 3 (75)        | 1 (25)     | 11 (91.7)     | 1 (8.3)    | <0.18888         |
| <i>HRAS</i>   | 3 (75)        | 1 (25)     | 3 (75)        | 1 (25)     | 9 (75)        | 3 (25)     | <1.0000          |
| <i>FGFR3</i>  | 3 (75)        | 1 (25)     | 3 (75)        | 1 (25)     | 9 (75)        | 3 (25)     | <1.0000          |
| <i>KIT</i>    | 3 (75)        | 1 (25)     | 3 (75)        | 1 (25)     | 10 (83.3)     | 2 (16.7)   | <0.90108         |
| <i>ATM</i>    | 3 (75)        | 1 (25)     | 4 (100)       | 0 (0)      | 11 (91.7)     | 1 (8.3)    | <0.47676         |
| <i>RB1</i>    | 3 (75)        | 1 (25)     | 4 (100)       | 0 (0)      | 11 (91.7)     | 1 (8.3)    | <0.70407         |
| <i>NRAS</i>   | 4 (100)       | 0 (0)      | 4 (100)       | 0 (0)      | 12 (100)      | 0 (0)      | <0.12181         |
| <i>EZH2</i>   | 4 (100)       | 0 (0)      | 4 (100)       | 0 (0)      | 10 (83.3)     | 2 (16.7)   | <0.47676         |
| <i>KRAS</i>   | 4 (100)       | 0 (0)      | 4 (100)       | 0 (0)      | 11 (91.7)     | 1 (8.3)    | <0.70407         |
| <i>STK11</i>  | 4 (100)       | 0 (0)      | 4 (100)       | 0 (0)      | 11 (91.7)     | 1 (8.3)    | <0.70407         |
| <i>IDH1</i>   | 4 (100)       | 0 (0)      | 4 (100)       | 0 (0)      | 11 (91.7)     | 1 (8.3)    | <0.70407         |
| <i>PTEN</i>   | 4 (100)       | 0 (0)      | 4 (100)       | 0 (0)      | 11 (91.7)     | 1 (8.3)    | <0.70407         |
| <i>EGFR</i>   | 4 (100)       | 0 (0)      | 4 (100)       | 0 (0)      | 11 (91.7)     | 1 (8.3)    | <0.70407         |
| <i>MLH1</i>   | 4 (100)       | 0 (0)      | 4 (100)       | 0 (0)      | 11 (91.7)     | 1 (8.3)    | <0.70407         |
| <i>FGFR2</i>  | 4 (100)       | 0 (0)      | 4 (100)       | 0 (0)      | 11 (91.7)     | 1 (8.3)    | <0.47676         |

частоту встречаемости мутаций у пациентов с раком легкого (табл. 4).

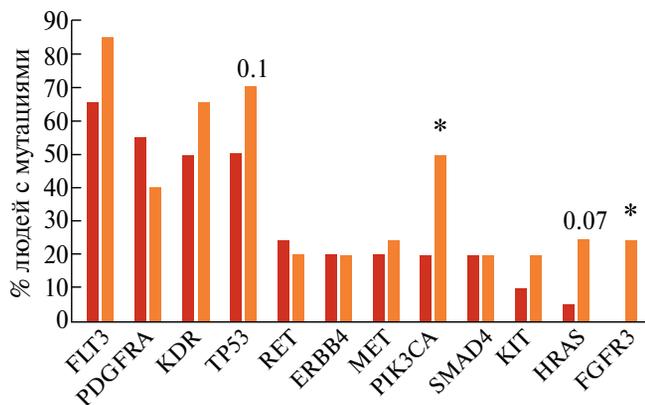
*Сравнение типов мутаций в крови и буккальном эпителии у пациентов с раком легкого*

В ходе анализа мутационного профиля в буккальном эпителии и крови у больных с диагностированным раком легкого мы выявили, что в клетках буккального эпителия содержится значительно больше мутаций в генах *FGFR3* (fibroblast growth factor receptor 3) и *PIK3CA* (phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha) по сравнению с кровью ( $p < 0.05$ ). Также в гене *HRAS* было выявлено большее количество мутаций в буккальном эпителии ( $p = 0.07652$ ). В гене *FGFR3* была обнаружена мутация rs7688609. В гене *PIK3CA* наиболее частой мутацией была rs3729674. Этот

однонуклеотидный полиморфизм расположен в интроне, ранее не был ассоциирован с раком легкого. В гене *HRAS* была выявлена мутация rs12628. Данный вариант расположен в кодоне 27 экзона 1.

В среднем у здоровых людей мутационная нагрузка в буккальном эпителии составила 22.2 мутации на одну мегабазу генома. У пациентов с диагностированным раком легких мутационная нагрузка в буккальном эпителии составила 36.5 мутаций на одну мегабазу генома. В крови здоровых людей мутационная нагрузка составила 15.6 мутаций на одну мегабазу генома, а у пациентов с раком легкого – 25.5 мутаций на одну мегабазу генома.

В 21.9% генов наблюдалось одинаковое количество мутаций в клетках буккального эпителия и крови у пациентов с диагностированным раком легкого. В 6.25% генов не было выявлено мутаций ни в буккальном эпителии, ни в крови у пациентов



**Рис. 2.** Частота встречаемости мутаций в крови и буккальном эпителии пациентов с раком легкого. \*  $p < 0.05$ , различия частот встречаемости по  $\chi^2$  Пирсона статистически достоверны.

с диагностированным раком легкого (только у здоровых пациентов) (рис.2).

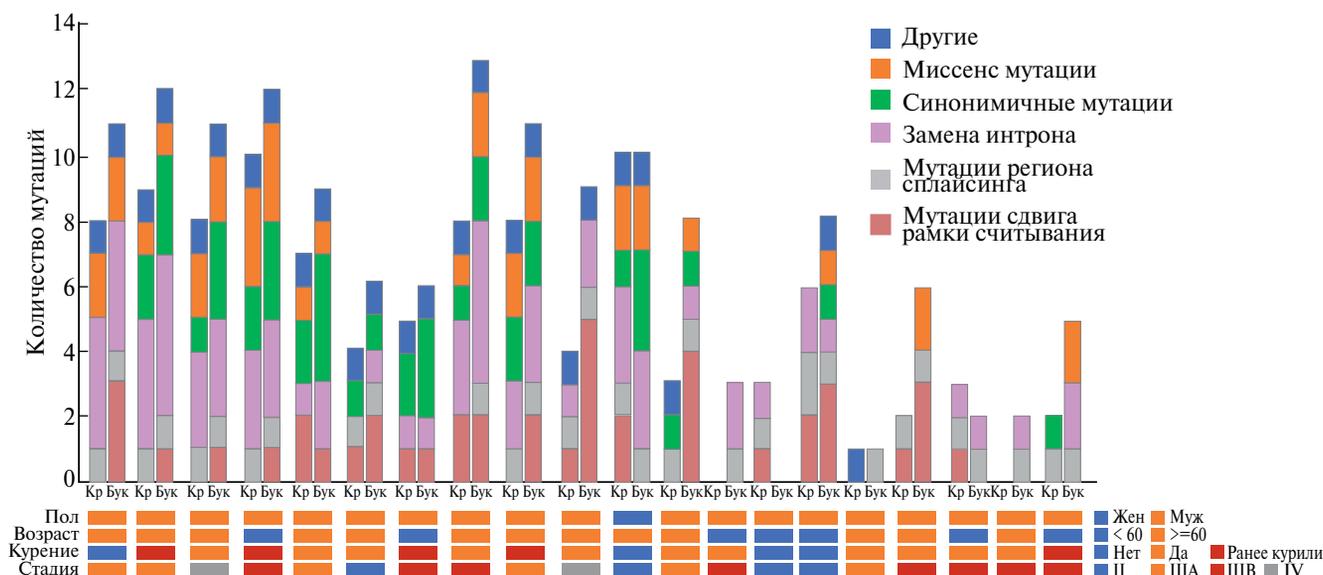
В ходе секвенирования исследуемого материала было обнаружено 98 полиморфизмов в 32 генах. 38 из 98 несинонимичных мутаций были обнаружены более чем у 1% индивидуумов. Большая часть мутаций встречается редко – 61.22% были обнаружены не более одного раза во всей выборке. Мы обнаружили, что 35% всех мутаций не были описаны ранее (не встречаются в базах данных dbSNP, COSMIC актуальных ревизий). Анализ мутационного ландшафта вариантов выявил, что 27.6% всех вариантов относятся к однонуклеотидным полиморфизмам, 37.7% – к инсерциям, 22.4% – к сдвигу

рамки считывания, 7.14% – к делециям, 6.6% – к многонуклеотидным полиморфизмам. Подробное описание всех типов выявленных мутаций представлено в табл. 5.

Было выявлено, что в буккальном эпителии содержится больше мутаций сдвига рамки считывания на 67.4% и синонимичных мутаций на 63.4%, чем в крови. Мутации типа миссенс, замена интрона, мутации региона сплайсинга и другие встречались одинаковое число раз в буккальном эпителии и крови у пациентов с диагностированным раком легкого. В группу “Другие” входили мутации типа мутации акцептора сплайсинга, мутация кодирующей последовательности/мутация донора сплайсинга/точечная мутация, мутация 3’-нетранслируемой области, мутации внутри рамки считывания (рис. 3).

ОБСУЖДЕНИЯ

Молекулярный механизм патогенеза рака легкого – сложный процесс, в котором участвует множество молекул и вовлекаются все основные сигнальные пути, участвующие в канцерогенезе [10]. Ранее было показано, что мутации в 18 генах приводят к развитию аденокарциномы легкого. Наиболее часто мутировал ген *TP53* (46%). Мутации *KRAS* (33%) были взаимоисключающими с мутациями *EGFR* (14%). Другая группа генов, часто мутирующих, представлена *BRAF* (10%), *PIK3CA* (7%), *MET* (7%), *RT1*, и малыми ГТФзамами (2%). Группа генов-супрессоров опухолей, включая *STK11* (17%), *KEAP1* (17%), *NF1* (11%), *RB1* (4%) и *CDKN2A* (4%), также часто мутировала. Другая группа частых мутаций включает набор генов, модифицирующих



**Рис. 3.** Количество различных типов мутаций у пациентов с раком легкого в буккальном эпителии и крови.

Таблица 5. Подробное описание выявленных мутаций

| Ген          | Вариант мутации                      | Локализация          | Аллель | Последствия                               | Аберрация                    |
|--------------|--------------------------------------|----------------------|--------|---|------------------------------|
| <i>ERBB4</i> | rs839541                             | chr2:212812097_T/C   | C      | Замена интрона                            | Однонуклеотидный полиморфизм |
|              | Новая мутация<br>chr2:212576812_T/TC | chr2:212576812_T/TC  | C      | Мутация сдвига рамки считывания           | Инсерция                     |
|              | rs1356577968                         | chr2:212578395_GT/AG | AG     | Замена интрона                            | Замена                       |
|              | rs75580865                           | chr13:28602292_T/C   | C      | »   | Однонуклеотидный полиморфизм |
| <i>FLT3</i>  | rs2491231                            | chr13:28610183_A/G   | G      | Замена области сплайсинга, замена интрона | »                            |
|              | Новая мутация<br>chr13:28602279_C/CT | chr13:28602279_C/CT  | T      | Замена интрона                            | Инсерция                     |
|              | Новая мутация<br>chr13:28610146_A/AG | chr13:28610146_A/AG  | G      | Мутация сдвига рамки считывания           | »                            |
|              | Новая мутация<br>chr13:28608256_A/AG | chr13:28608256_A/AG  | G      | »   | »                            |
|              | Новая мутация<br>chr19:17945670_A/AG | chr19:17945670_A/AG  | G      | »   | »                            |
|              | rs3213409                            | chr19:17945696_C/T   | T      | Миссенс-мутация                           | Однонуклеотидный полиморфизм |
| <i>JAK3</i>  | rs373418967                          | chr19:17945674_A/AC  | C      | Мутация сдвига рамки считывания           | Инсерция                     |
|              | Новая мутация<br>chr4:55953804_T/TA  | chr4:55953804_T/TA   | A      | »   | »                            |
|              | rs7692791                            | chr4:55980239_C/T    | T      | Замена интрона                            | Однонуклеотидный полиморфизм |
|              | rs1870377                            | chr4:55972974_T/A    | A      | Миссенс-мутация                           | »                            |
| <i>KDR</i>   | rs157813263                          | chr4:55962545_T/TG   | G      | Замена интрона                            | Инсерция                     |
|              | Новая мутация<br>chr4:55979617_A/AC  | chr4:55979617_A/AC   | C      | Мутация сдвига рамки считывания           | »                            |
|              | rs10006115                           | chr4:55946354_G/T    | T      | Замена интрона                            | Однонуклеотидный полиморфизм |
|              | rs1342902707                         | chr4:55979575_G/GA   | A      | Мутация сдвига рамки считывания           | Инсерция                     |
|              | Новая мутация<br>chr4:55946134_TC/T  | chr4:55946134_TC/T   | -      | »   | Делеция                      |

|               |  |                                       |            |   |                              |
|---------------|--|---------------------------------------|------------|---|------------------------------|
| <i>MET</i>    | rs5985569  | chr7:116339642_G/T                    | T          | Миссенс-мутация   | Однонуклеотидный полиморфизм |
|               | rs35775721                                       | chr7:116339672_C/T                    | T          | Синонимичная мутация  | »                            |
|               | rs33917957                                       | chr7:116340262_A/G                    | G          | Миссенс-мутация   | »                            |
|               | Новая мутация<br>chr7:116403177_ТССССТGA/ТССССТG | chr7:116403177_ТССССТGA/ТССССТG       | ССССТG     | Мутация сдвига рамки считывания, мутация преждевременного завершения трансляции | Инсерция                     |
|               | rs1208881531                                     | chr7:116403215_A/AC                   | C          | Мутация сдвига рамки считывания   | замена                       |
|               | rs56391007                                       | chr7:116411990_C/T                    | T          | Миссенс-мутация   | Однонуклеотидный полиморфизм |
|               | Новая мутация<br>chr7:116403220_ТТССA/ТСС        | chr7:116403220_ТТССA/ТСС              | СС         | Мутация сдвига рамки считывания   | Инсерция                     |
|               | rs1794847963                                     | chr7:116411966_T/TA                   | A          | »   | »                            |
|               | rs1560480581                                     | chr4:55141051_G/T                     | G          | Делеция внутри рамки считывания   | »                            |
|               | rs2228230  | chr4:55152040_C/T                     | T          | Синонимичная мутация  | Однонуклеотидный полиморфизм |
| <i>PDGFRA</i> | rs1723633126                                     | chr4:55141050_AGCCCAGATGGACATGA/AA    |            | Делеция внутри рамки считывания   | Инсерция                     |
|               | rs948588   | chr18:48586344_C/T                    | T          | Замена интрона  | Однонуклеотидный полиморфизм |
| <i>SMAD4</i>  | rs374687785                                      | chr18:48584629_ТААААААТСТ/ТААААААТСТТ | ААААААТСТТ | »   | Инсерция                     |
|               | rs1042522  | chr17:7579472_G/C                     | C          | Миссенс-мутация   | Однонуклеотидный полиморфизм |
| <i>TP53</i>   | rs745751553                                      | chr17:7573940_T/TC                    | C          | Мутация сдвига рамки считывания   | Инсерция                     |
|               | rs587782423                                      | chr17:7579470_GG/CGC                  | CG         | »   | »                            |
|               | rs530941076                                      | chr17:7578191_AGGGCAC/AGGCAC          | AGGCAC0    | »   | »                            |
| <i>CSF1R</i>  | rs20666934                                       | chr5:149433596_TG/GA                  | GA         | »   | Изменение последовательности |
| <i>FGFR1</i>  | Новая мутация<br>chr8:38282247_C/CG              | chr8:38282247_C/CG                    | G          | Замена интрона  | Инсерция                     |

Таблица 5 (продолжение)

|        |   |  |               |                                 |                              |
|--------|---|--|---------------|---------------------------------|------------------------------|
|        | rs3729674   | chr3:178917005_A/G                                   | G             | »                               | Однонуклеотидный полиморфизм |
|        | rs761258531   | chr3:178927952                                       | TATTTTAAATTGT | »                               | Инсерция                     |
|        | rs2230461   | chr3:178927410_A/G                                   | G             | Миссенс-мутация                 | Однонуклеотидный полиморфизм |
|        | rs141098973   | chr3:178916856_AT/AA                                 | -             | Мутация сдвига рамки считывания | Изменение последовательности |
|        | rs200868796   | chr3:178916780 ACCCCCT/<br>ACCCCT                    | CCCCCT        | »                               | Инсерция                     |
| PIK3CA | Новая мутация<br>chr3:178927954<br>ATTTTCTTTGT/<br>ATTTTAAATTGT | chr3:178927954<br>ATTTTCTTTGT/<br>ATTTTAAATTGT       | TTTTTAAATTGT  | Замена интрона                  | »                            |
|        | Новая мутация<br>chr3:178947872_G/GC                            | chr3:178947872_G/GC                                  | C             | Мутация сдвига рамки считывания | »                            |
|        | Новая мутация<br>chr3:178938918_A/C                             | chr3:178938918_A/C                                   | C             | Миссенс-мутация                 | Однонуклеотидный полиморфизм |
|        | rs1553825421  | chr3:178947853_AT/AGT                                | GT            | Мутация сдвига рамки считывания | Изменение последовательности |
|        | rs761258531   | chr3:178927952<br>ATAATTTTCTTTGT/<br>ATAATTTTAAATTGT | TATTTTAAATTGT | Замена интрона                  | Инсерция                     |
| RET    | rs1800861   | chr10:43613843_G/T                                   | T             | Синонимичная мутация            | Однонуклеотидный полиморфизм |
|        | rs1800863   | chr10:43615633_C/G                                   | G             | »                               | »                            |
| HRAS   | rs12628   | chr11:534242_A/G                                     | G             | »                               | »                            |
| FGFR3  | rs7688609   | chr4:1807894_G/A                                     | A             | »                               | »                            |
|        | rs3822214   | chr4:55593464_A/C                                    | C             | Миссенс-мутация                 | »                            |
| KIT    | Новая мутация<br>chr4:55594270_G/A                              | chr4:55594270_G/A                                    | A             | »                               | »                            |
|        | rs55986963  | chr4:55593481_A/G                                    | G             | Синонимичная мутация            | »                            |
|        | Новая мутация<br>chr4:55597448_T/GC                             | chr4:55597448_T/GC                                   | C             | Замена интрона                  | Инсерция                     |



Таблица 5 (окончание)

|       |                                       |   |   |   |                              |
|-------|---------------------------------------|---|---|---|------------------------------|
| EZH2  | rs757534855                           | chr7:148508767_ТАААААТС/ТАААААТ   | ААААТ   | »   | »                            |
|       | Новая мутация<br>chr7:148508744_АТ/А  | chr7:148508744_АТ/А   | А   | »   | »                            |
| HNF1A | Новая мутация<br>chr12:121431456_G/GA | chr12:121431456_G/GA  | А   | »   | »                            |
|       | Новая мутация<br>chr12:25378635_A/AC  | chr12:25378635_A/AC   | С   | »   | »                            |
| STK11 | rs1034888250                          | chr19:1223052_A/АТ  | Т   | »   | »                            |
| FGFR3 | Новая мутация<br>chr10:123257991_GT/G | chr10:123257991_GT/G  | -   | Замена интрона  | Делеция                      |
|       | rs755350933                           | chr10:123258032_A/АТ  | Т   | Мутация сдвига рамки считывания                                     | Инсерция                     |
| PTEN  | rs121909231                           | chr10:89720851_CCG/C  | G/T/C   | Мутация<br>прежвременного завершения трансляции                     | »                            |
|       | rs542808377                           | chr10:89717542_GT/G   | -   | Замена интрона  | Изменение последовательности |
|       | rs1589663424                          | chr10:89717710_GC/AG  | G   | Мутация сдвига рамки считывания                                     | Инсерция                     |
|       | rs786203847                           | chr10:8968269_GGTTTTT<br>GGATCSAAAGCATAAAAA<br>CCATTACAAGATATACAA<br>TCT/AGTTTTTGGATTCA<br>AAGCATAAAAACCCATTAC<br>AAGATATACAAATCT | AGTTTTGGAGT<br>CAAAGCATAAAA<br>ACCATTACAAGA<br>TATACAATCT | Мутация кодирующей последовательности, мутация акцептора сплайсинга | »                            |
|       | Новая мутация<br>chr10:89717584_A/AC  | chr10:89717584_A/AC   | С   | Замена интрона  | »                            |
|       | rs746280047                           | chr10:89711920_T/TC   | С   | Мутация сдвига рамки считывания                                     | »                            |

|         |                                       |                                     |        |                                    |                                 |
|---------|---------------------------------------|-------------------------------------|--------|------------------------------------|---------------------------------|
| CDH1    | rs1284989530                          | chr16:68835612_AГТТТТТС/<br>АГТТТТС | ТТТТТС | »                                  | »                               |
|         | Новая мутация<br>chr16:68835648_A/AG  | chr16:68835648_A/AG                 | G      | »                                  | »                               |
| IDH1    | rs11554137                            | chr2:209113192_G/A                  | A      | Синонимичная мутация               | Однонуклеотидный<br>полиморфизм |
|         | rs780642190                           | chr2:209113151_CG/C                 | C      | Мутация сдвига<br>рамки считывания | Инсерция                        |
| GNAS    | rs113203829                           | chr20:57484635_G/GC                 | C      | Мутация донора<br>сплайсинга       | »                               |
| SMARCB1 | Новая мутация<br>chr22:24133993_СТ/ТС | chr22:24133993_СТ/ТС                | ТС     | Миссенс-мутация                    | Изменение<br>последовательности |
|         | Новая мутация<br>chr3:37067294_AAC/A  | chr3:37067294_AAC/A                 | -      | Мутация сдвига<br>рамки считывания | Делеция                         |
| MLH1    | Новая мутация<br>chr3:37067310_GC/G   | chr3:37067310_GC/G                  | -      | »                                  | Изменение<br>последовательности |
|         | Новая мутация<br>chr9:80409384_Т/ТС   | chr9:80409384_Т/ТС                  | C      | »                                  | Инсерция                        |
| GNAQ    | rs1587919422                          | chr9:80409384_Т/ТС                  | G      | »                                  | »                               |
|         | rs201720393                           | chr7:55249192_CGGGGAG/<br>CGGGA     | GGGA   | Замена интрона                     | »                               |
| EGFR    | rs1281578598                          | chr7:55233008_Т/ТС                  | C      | Мутация сдвига<br>рамки считывания | »                               |
|         | Новая мутация<br>chr10:123257991_GT/G | chr10:123257991_GT/G                | -      | Замена интрона                     | Делеция                         |
| FGFR2   | rs755350933                           | chr10:123258032_A/AT                | T      | Мутация сдвига<br>рамки считывания | Инсерция                        |

хроматин, таких как *SETD2* (9%), *ARID1A* (7%) и *SMARCA4* (6%), а также два гена сплайсинга РНК *RBM10* (8%) и *U2AF1* (3%). Мутации гена *MGA* наблюдаются у 8% пациентов [11]. Также наблюдалось изменение числа копий генов *NKX2-1*, *TERT*, *MDM2*, *KRAS*, *EGFR*, *MET*, *CCNE1*, *CCND1*, *TERC* и *MECOM* [12]. Анализ aberrантных транскриптов РНК обнаружил слияния с участием *ALK*, *ROS1* и *RET*. Пропуск экзона 14 *MET* в РНК приводит к стабилизации белка MET и активации. Общий обзор мутационного статуса 230 пациентов с аденокарциномой показал, что 62% из них демонстрируют активирующие мутации в известных онкогенах-драйверах (такие как мутации *EGFR*, *KRES*, *BRAF*, *ALK*, *ROS1* и слияния *RET*), у остальных 38% пациентов не было видимой мутации онкогена *RTK / RAS / RAF*. Однако тщательный анализ показал, что мутации *TP53*, *KEAP1*, *NF1* и *RIT1* обогащены онкоген-негативной группой аденокарцином легких. Ключевым изменениям при аденокарциноме легких подвергались следующие биохимические пути: путь *RTK / RAS / RAF* (76%), путь *PI3K-mTOR* (25%), путь p53 (63%), клеточный цикл (64%), сплайсинг хроматина и РНК (22%) [13]. Важно отметить, что показатель активации MAPK выше среди аденокарцином легких с мутантным *KRAS*, но он также присутствует среди аденокарцином *KRAS WT*. Путь *mTOR* может быть активирован в аденокарциномах легких посредством трех различных молекулярных механизмов: мутации *PI3KCA*, мутации *STK11*, связанной или не связанной с низкими уровнями *LKB1* [14].

Важно отметить, что наблюдались некоторые заметные различия в частоте возникновения некоторых онкогенных мутаций в аденокарциномах легких у пациентов разного этнического происхождения [15]. Таким образом, жители Восточной Азии демонстрируют более высокий уровень мутаций *EGFR* и более низкий уровень мутаций *KRAS*, чем европейские популяции. Эти различия существенно влияют на ведение аденокарциномы легких на уровне региональных онкологических центров и на дизайн клинических испытаний в разных странах. Среди пациентов из Восточной Азии наиболее часто мутировали гены *EGFR* (46.7%), *TP53* (21.2%), *ALK* (12.1%, из которых 8.8% мутации и 3.3% реаранжировки), *KRAS* (9.8%), *EZH2* (9.4%), *ERBB2* (5.5%), *STK11* (3.1%), *PDGFRA* (2.7%), *NF1* (2.7%) и *ERBB4* (2.4%) [16].

В 2013 г. было проведено всестороннее исследование генетических аномалий, встречающихся в плоскоклеточном раке легкого, в контексте проекта Атлас генома рака, обеспечивающего фундаментальное комплексное исследование аномалий числа копий ДНК, соматических экзонных мутаций, секвенирования мРНК, экспрессии мРНК и метилирования промотора, анализа микроРНК и секвенирования всего генома. Результаты этого

комплексного анализа предоставили всестороннюю картину геномных и эпигеномных изменений при плоскоклеточном раке легкого [17]. Наиболее заметными результатами этого анализа были следующие: 1) было обнаружено, что 10 генов часто мутировали, и они включают *TP53* (мутировавший примерно в 90% случаев), *CDKN2A* (15%), *PTEN* (8%), *PIK3CA* (16%), *KEAP1* (12%), *MLL2* (20%), *HLA-A* (3%, мутации с потерей функции), *NFE2L2* (15%), *NOTCH1* (8%, усекающие мутации, по-видимому связанные с потерей функции), *RBI* (7%); 2) многие из частых соматических мутаций, обнаруживаемых в плоскоклеточном раке легкого, являются движущими силами важных путей, участвующих в инициации опухоли или в прогрессии опухоли. Реакция на окислительный стресс изменяется в 34% случаев через мутации *KEAP1*, *CUL3* и *NFE2L2*; гены дифференцировки клеток (*SOX2*, *NOTCH1*, *NOTCH2*, *TP63*, *FOXPI*) изменены в 44% образцов; гены клеточного цикла, такие как *CDKN2A* и *RBI*, в — 72% опухолей [18], гены пути *PI3K* в — 47% опухолей. Также были опубликованы данные о мутационном спектре плоскоклеточного рака легкого у пациентов из Восточной Азии, демонстрирующем паттерн, аналогичный наблюдаемому в европейских популяциях. Наблюдались следующие частоты повторных мутаций генов: *TP53* (73%), *MLL2* (24%), *NFE2L2* (17%), *RBI* (15%), *PTEN* (11%), *KEAP1* (16%), *PI3KCA* (9%), *CD117* (13%), *NF1* (12%), *SWI / SNF* (15%), *NOTCH* (15%). Частые изменения числа копий наблюдались на уровне: *SOX2* (79%), *PI3KCA* (77%), *TP63* (75%), *FGFR1* (31%), *CDKN2A* (38%), *PDGFRA* (18%), *PTEN* (31%) [19].

Ранее был установлен ряд мутаций, возникающих при немелкоклеточном раке легкого. Основными молекулярными особенностями этих опухолей являлись мутации в генах *EGFR* (31.6%), *KRAS* (10.5%), *AKT1* (2–6%), мутации вставки *ERBB2* (1.3%), мутации *PI3KCA* (1.3%), слияния генов *ALK* (5.3%) и слияния *KIF5B-RETR* (4%); *BRAF*-мутации не обнаружены. Мутационные профили и клинико-патологические особенности немелкоклеточного рака легкого очень похожи на таковые у низкодифференцированных аденокарцином [20].

При мелкоклеточном раке легкого основную роль играют инактивирующие мутации *TP53* и *RBI*. Другая группа повторяющихся мутаций встречается на уровне трех генов: *CREBBP*, *EP300* и *MLL*, которые кодируют модификаторы гистонов: учитывая глобальную частоту геномных изменений этих трех гистон-модифицирующих ферментов, становится очевидным, что они представляют второй по частоте мутации класс генов при мелкоклеточном раке легкого. Другая группа мутаций касается трех генов-супрессоров опухолей: *PTEN*, *SLIT2* и *EPHA7*. Мутации *MYC* часто встречаются при мелкоклеточном раке легкого. Эти мутации включают

несколько генов семейства *MYC*, таких как *MYC*, *MYCL1* и *MYCN* [21].

В проведенном настоящем исследовании мы выяснили, что мутационный профиль в крови и клетках буккального эпителия схож с азиатской популяцией (разница в том, что в азиатской популяции при раке легкого преобладают мутации гена *EGFR*, а в нашем исследовании — *KDR*), и практически полностью отличается от европейской за исключением основных протоонкогенов, например *TP53*) [22].

Нами было установлено, что у пациентов с раком легкого в буккальном эпителии больше мутаций в генах *FLT3*, *PDGFRA*, *KDR*, *PIK3CA*, *HRAS*, *FGFR3*, чем у лиц без диагностированного рака легкого. Более того, мы показали, что у пациентов с раком легкого мутаций в буккальном эпителии на 44% больше, чем в крови. В 50% генов, в которых были обнаружены мутации, их количество в буккальном эпителии было выше, чем в крови. При этом статистически достоверные различия были показаны для генов *FGFR3* и *PIK3CA* ( $p < 0.05$ ). Для гена *HRAS*  $p = 0.07652$ . В 25% генов наблюдалось одинаковое количество мутаций в клетках буккального эпителия и крови у пациентов с диагностированным раком легкого. Также в 25% генов было обнаружено больше мутаций в крови, чем в буккальном эпителии, но данные варианты встречались единично — одна мутация была выявлена у одного пациента.

Наибольшее количество мутаций наблюдается в генах, кодирующих рецепторные тирозинкиназы: *KDR*, *FLT3*, *FGFR3*, *PDGFRA*. Установлено, что рецепторные тирозинкиназы являются ключевыми регуляторами нормальных клеточных процессов и играют критическую роль в развитии и прогрессировании многих типов злокачественных опухолей. Мутации в генах, кодирующих рецепторные тирозинкиназы, приводят к активации сигнальных каскадов, вызывая изменение экспрессии белка и пролиферацию клеток. [23].

Ген *FLT3* (FMS-like tyrosine kinase 3) кодирует тирозинкиназу рецептора III класса, регулиующую кроветворение, и играет важную роль в выживании и пролиферации гемопоэтических стволовых клеток и клеток-предшественников. Ранее не было показано, что мутации в этом гене ассоциированы с развитием рака легкого, однако установлено, что они могут приводить к конститутивной активации этого рецептора тирозинкиназы и развитию острого миелоидного и лимфобластного лейкозов [24]. Мутация rs2491231, обнаруженная нами в этом гене, также ранее не была ассоциирована с раком легкого, но она была обнаружена при тройном негативном раке молочной железы [25].

Были обнаружены мутации в гене *PDGFRA*, который кодирует рецептор тирозинкиназы клеточной поверхности для членов семейства факторов

роста тромбоцитов. Исследования показывают, что этот ген играет роль в развитии органов, заживлении ран и прогрессировании опухолей. Мутации в этом гене связаны с идиопатическим гиперэозинофильным синдромом, соматическими и семейными опухолями стромы желудочно-кишечного тракта и множеством других видов рака, в том числе и рака легкого [26]. Однако обнаруженная нами мутация rs1560480581 ранее не была ассоциирована с раком легкого.

Высокая мутабельность наблюдалась в гене *KDR*, который кодирует один из двух рецепторов VEGF. Мутации этого гена вовлечены в инфантильные капиллярные гемангиомы [27]. Мутация rs7692791, которую мы обнаружили у пациентов с раком легкого, встречается при раке желудка [28], почечно-клеточной карциноме [29] и некоторых других патологиях [30], но ранее эта мутация не была ассоциирована с раком легкого. В гене *FGFR3* была обнаружена мутация rs7688609. Данный однонуклеотидный полиморфизм расположен в экзоне 13 гена *FGFR3* и не был ранее ассоциирован с раком легкого, однако он был обнаружен при некоторых других онкозаболеваниях, таких как аденокарцинома краниофарингиома [31], опухоль яичек [32] и плоскоклеточный рак пищевода [33]. В гене *PIK3CA* наиболее частой мутацией была rs3729674. Этот однонуклеотидный полиморфизм расположен в интроне, ранее он не был ассоциирован с раком легкого. В гене *HRAS* была выявлена мутация rs12628. Данный вариант расположен в кодоне 27 экзона 1. Ранее он не был ассоциирован с раком легкого, но был обнаружен при таких видах рака как меланома [34] и папиллярная карцинома щитовидной железы [35].

Считается, что мутации в гене *TP53* являются причиной рака легкого [36]. Ген-супрессор опухоли *TP53* в целом часто мутирует при раке человека. Аномалия гена *TP53* является одним из наиболее значимых событий при раке легких и играет важную роль в онкогенезе эпителиальных клеток легких [37]. Действительно, мы не выявили у здоровых людей в крови мутаций в гене *TP53*, однако они были обнаружены у пациентов с раком легкого (50%,  $p < 0.05$  по  $\chi^2$  Пирсона). Статистически значимых различий по частоте встречаемости мутаций в гене *TP53* в буккальном эпителии не было выявлено. Однако у пациентов с раком легкого мутации в гене *TP53* в буккальном эпителии встречаются чаще, чем в крови (но различия статистически недостоверны,  $p = 0.1$ , различия частот встречаемости по  $\chi^2$  Пирсона) (рис. 2).

Наиболее подвержен мутациям в буккальном эпителии ген *PIK3CA*. В крови пациентов с раком легкого мутации в гене *PIK3CA* встречаются даже реже, чем у здоровых людей (20% против 33%). При этом в буккальном эпителии мутации в гене *PIK3CA* встречаются у 50% пациентов с раком легкого

и у 11.1% людей из контрольной группы ( $p < 0.05$  по  $\chi^2$  Пирсона). В некоторых исследованиях была установлена взаимосвязь между плоскоклеточным раком легкого и мутациями в гене *PIK3CA* [38]. Установлено, что мутации в гене *PIK3CA* также обнаружены при таких типах рака легкого как сквамозно-клеточная карцинома (8.9%) и аденокарцинома (2.9%). Наиболее частой мутацией *PIK3CA* был экзон 9 E545K. Рак легких с мутацией *PIK3CA* часто развивается у пациентов с предшествующими злокачественными новообразованиями [39].

Мы не обнаружили мутаций в гене *FGFR3* в крови здоровых людей и пациентов с раком легкого (рис. 1). Также не было обнаружено мутаций в гене *FGFR3* в буккальном эпителии здоровых людей, но они были обнаружены у 25% пациентов с раком легкого ( $p < 0.05$  по  $\chi^2$  Пирсона). Ранее было установлено, что мутации в гене *FGFR3* способствуют росту клеток при раке легкого. Это связано с тем, что гены семейства *FGFR* участвуют в регуляции множества биологических процессов, включая восстановление тканей, ангиогенез, пролиферацию, дифференцировку, миграцию и выживание клеток [40]. Повышенная экспрессия *FGFR3* указывает на неблагоприятный прогноз для людей с аденокарциномой легких и способствует увеличению метастатического потенциала клеток аденокарциномы легких [41].

В настоящей работе мы показали, что у пациентов с раком легкого увеличивается количество мутаций сдвига рамки считывания в буккальном эпителии, которые возникают, как правило, при увеличении уровня окислительного стресса. Мутации сдвига рамки считывания являются наиболее опасными мутациями, которые приводят к неправильной трансляции белка, а следовательно, к аномальному синтезу белковых продуктов с неправильной аминокислотной последовательностью [42]. Наибольшее количество соматических мутаций в буккальном эпителии пациентов с раком легкого наблюдается в генах *PIK3CA* и *FGFR3*. Наиболее мутабельными оказались гены, которые кодируют рецепторные тирозинкиназы. В совокупности эти данные подтверждают предположение о том, что ротовая полость является “молекулярным зеркалом рака легкого” [7].

Исследование выполнено при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках Государственного задания университетам в сфере научной деятельности на 2020–2022 гг. (проект FZGU-2020-0044).

Исследование одобрено Этическим комитетом Воронежского государственного университета (протокол 42-03 от 8 октября 2020 г.).

Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствуют этическим стандартам институционального и/или национального

комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики.

От каждого из включенных в исследование участников было получено информированное добровольное согласие. Все обследованные – совершеннолетние.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Каприн А.Д., Старинский В.В., Шахзадова А.О. Злокачественные новообразования в России в 2019 году (заболеваемость и смертность). М.: МНИ-ОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ “НМИЦ радиологии” Минздрава России 2020. 252 с.
2. Wadowska K., Bil-Lula I., Trembecki Ł., Śliwińska-Mossoń M. Genetic Markers in Lung Cancer Diagnosis: A Review // Int. J. Mol. Sci. 2020. V. 21. № 13. <https://doi.org/10.3390/ijms21134569>
3. Rodionov E.O., Tuzikov S.A., Miller S.V. et al. Methods for early detection of lung cancer (review) // Sib. J. Oncology. 2020. V. 19. № 4. P. 112–122. <https://doi.org/10.21294/1814-4861-2020-19-4-112-122>
4. Nanavaty P., Alvarez M.S., Alberts W.M. Lung cancer screening: advantages, controversies, and applications // Cancer Control. 2014. V. 21. № 1. P. 9–14. <https://doi.org/10.1177/107327481402100102>
5. Hubers A.J., Prinsen C.F., Sozzi G. et al. Molecular sputum analysis for the diagnosis of lung cancer // Br. J. Cancer. 2013. V. 109. № 3. P. 530–537. <https://doi.org/10.1038/bjc.2013.393>
6. Ganeev A.A., Gubal A.R., Lukyano G.N. et al. Analysis of exhaled air for early-stage diagnosis of lung cancer: opportunities and challenges // Russ. Chemical Reviews. 2017. V. 87. № 9. P. 904–921. <https://doi.org/10.1070/RCR4831>
7. Sidransky D. The oral cavity as a molecular mirror of lung carcinogenesis // Cancer Prev. Res. (Phila). 2008. V. 1. № 1. P. 12–14. <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-08-0093>
8. Bhutani N., Burns D.M., Blay H.M. DNA Demethylation dynamics // Cell. 2011. V. 146. № 6. P. 866–872. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.08.042>
9. Kömerik N., Yüce E., Calapoğlu N.S. et al. Oral mucosa and lung cancer: Are genetic changes in the oral epithelium associated with lung cancer? // Nigerian J. Clin. Practice. 2017. V. 20. № 1. P. 12–18. <https://doi.org/10.4103/1119-3077.181396>
10. Shtivelman E., Hensing T., Simon G.R. et al. Molecular pathways and therapeutic targets in lung cancer // Oncotarget. 2014. V. 5. № 6. P. 1392–1433. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.1891>
11. Collisson E.A., Campbell J.D., Brooks A.N. et al. The Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma // Nature. 2014. V. 511. P. 543–550. <https://doi.org/10.1038/nature13385>

12. *Imielinski M., Berger A.H., Hammerman P.S. et al.* Mapping the hallmarks of lung adenocarcinoma with massively parallel sequencing // *Cell*. 2012. V. 150. № 6. P. 1107–1120. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.08.029>
13. *Rodgers K.* Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma // *Nature*. 2018. V. 559. № 7715. <https://doi.org/10.1038/s41586018-0228-6>
14. *Levy M.A., Lovly C.M., Pao W.* Translating genomic information into clinical medicine: lung cancer as a paradigm // *Genome Res*. 2012. V. 22. № 11. P. 2101–2108. <https://doi.org/10.1101/gr.131128.111>
15. *Drilon A., Wang L., Arcila M.E. et al.* Broad, hybrid capture-based next-generation sequencing identifies actionable genomic alterations in lung adenocarcinomas otherwise negative for such alterations by other genomic testing approaches // *Clin. Cancer Res*. 2015. V. 21. № 16. P. 3631–3639. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-2683>
16. *Liu L., Liu J., Shao D. et al.* Comprehensive genomic profiling of lung cancer using a validated panel to explore therapeutic targets in East Asian patients // *Cancer Sci*. 2017. V. 108. № 12. P. 2487–2494. <https://doi.org/10.1111/cas.13410>
17. *Rooney M., Devarakonda S., Govindan R.* Genomics of squamous cell lung cancer // *Oncologist*. 2013. V. 18. № 6. P. 707–716. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2013-0063>
18. *Rodgers K.* Cancer genome atlas research network. Comprehensive genomic characterization of squamous cell lung cancers // *Nature*. 2012. V. 489. № 7417. P. 519–525. <https://doi.org/10.1038/nature11404>
19. *Kim Y., Hammerman P.S., Kim J. et al.* Integrative and comparative genomic analysis of lung squamous cell carcinomas in East Asian patients // *J. Clin. Oncol*. 2014. V. 32. № 2. P. 121–128. <https://doi.org/10.1200/JCO.2013.50.8556>
20. *Wang R., Pan Y., Li C. et al.* Analysis of major known driver mutations and prognosis in resected adenosquamous lung carcinomas // *J. Thorac. Oncol*. 2014. V. 9. № 6. P. 760–768. <https://doi.org/10.1097/JTO.0b013e3182a406d1>
21. *Voortman J., Lee J.H., Killian J.K. et al.* Array comparative genomic hybridization-based characterization of genetic alterations in pulmonary neuroendocrine tumors // *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* 2010. V. 107. № 29. P. 13040–13045. <https://doi.org/10.1073/pnas.1008132107>
22. *Imielinski M., Berger A.H., Hammerman P.S. et al.* Mapping the hallmarks of lung adenocarcinoma with massively parallel sequencing // *Cell*. 2012. V. 150. № 6. P. 1107–1120. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.08.029>
23. *Zwick E., Bange J., Ullrich A.* Receptor tyrosine kinase signalling as a target for cancer intervention strategies // *Endocrine-Related Cancer J*. 2001. V. 8. № 3. P. 161–173. <https://doi.org/10.1677/erc.0.0080161>
24. *Small D.* FLT3 mutations: biology and treatment // *Hematology*. 2006. V. 1. P. 178–184. <https://doi.org/10.1182/asheducation-2006.1.178>
25. *Uscanga-Perales G.I., Santuario-Facio S.K., Sanchez-Dominguez C.N. et al.* Genetic alterations of triple negative breast cancer (TNBC) in women from Northeastern Mexico // *Oncol. Lett*. 2019. V. 17. № 3. P. 3581–3588. <https://doi.org/10.3892/ol.2019.9984>
26. *Guo M., Tomoshige K., Meister M. et al.* Gene signature driving invasive mucinous adenocarcinoma of the lung // *EMBO Mol. Med*. 2017. V. 9. № 4. P. 462–481. <https://doi.org/10.15252/emmm.201606711>
27. *Qiu Z., Ye B., Wang K. et al.* Unique genetic characteristics and clinical prognosis of female patients with lung cancer harboring RET fusion gene // *Sci. Rep*. 2020. V. 10. № 10387. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-66883-0>
28. *Zhuo Y.J., Shi Y., Wu T.* NRP-1 and KDR polymorphisms are associated with survival time in patients with advanced gastric cancer // *Oncol. Lett*. 2019. V. 18. № 5. P. 4629–4638. <https://doi.org/10.3892/ol.2019.10842>
29. *Cebrián A., Gómez Del Pulgar T., Méndez-Vidal M.J. et al.* Functional PTGS2 polymorphism-based models as novel predictive markers in metastatic renal cell carcinoma patients receiving first-line sunitinib // *Sci. Rep*. 2017. V. 7. № 41371. <https://doi.org/10.1038/srep41371>
30. *O'Brien T.J., Harralson A.F., Tran T. et al.* Kinase insert domain receptor/vascular endothelial growth factor receptor 2 (KDR) genetic variation is associated with ovarian hyperstimulation syndrome // *Reprod. Biol. Endocrinol*. 2014. V. 12. № 36. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-12-36>
31. *Jastania R.A., Saeed M., Al-Khalidi H. et al.* Adamantinomatous craniopharyngioma in an adult: A case report with NGS analysis // *Int. Med. Case Rep. J*. 2020. V. 13. P. 123–137. <https://doi.org/10.2147/IMCRJ.S243405>
32. *Goriely A., Hansen R.M., Taylor I.B. et al.* Activating mutations in FGFR3 and HRAS reveal a shared genetic origin for congenital disorders and testicular tumors // *Nat. Genet*. 2009. V. 41. № 11. P. 1247–1252. <https://doi.org/10.1038/ng.470>
33. *Рахимова С.Е., Саматкызы Д., Кожамкулов У.А. и др.* Опыт применения панели для секвенирования следующего поколения AmpliSeq Cancer HotSpot v.2 у казахстанских пациентов с плоскоклеточным раком пищевода // *Вестник Казахского Нац. Мед. Ун-та*. 2020. № 3. С. 76–80.
34. *Tomei S., Adams S., Uccellini L. et al.* Association between HRAS rs12628 and rs112587690 polymorphisms with the risk of melanoma in the North American population // *Med. Oncol*. 2012. V. 29. № 5. P. 3456–3461. <https://doi.org/10.1007/s12032-012-0255-3>
35. *Jin M., Li Z., Sun Y. et al.* Association analysis between the interaction of RAS family genes mutations and papillary thyroid carcinoma in the Han Chinese population // *Int. J. Med. Sci*. 2021. V. 18. № 2.

- P. 441–447.  
<https://doi.org/10.7150/ijms.50026>
36. *Testa U., Castelli G., Pelosi E.* Lung cancers: Molecular characterization, clonal heterogeneity and evolution, and cancer stem cells // *Cancers (Basel)*. 2018. V. 10. № 8.  
<https://doi.org/10.3390/cancers10080248>
37. *Mogi A., Kuwano H.* TP53 Mutations in nonsmall cell lung cancer // *J. Biomedicine and Biotechnology*. 2011. V. 2011. № 583929.  
<https://doi.org/10.1155/2011/583929>
38. *Tao D., Han X., Zhang N. et al.* Genetic alteration profiling of patients with resected squamous cell lung carcinomas // *Oncotarget*. 2016. V. 7. № 24. P. 36590–36601.  
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.9096>
39. *Scheffler M., Bos M., Gardizi M. et al.* PIK3CA mutations in non-small cell lung cancer (NSCLC): Genetic heterogeneity, prognostic impact and incidence of prior malignancies // *Oncotarget*. 2015. V. 6. № 2. P. 1315–1326.  
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.2834>
40. *Beenken A., Mohammadi M.* The FGF family: biology, pathophysiology and therapy // *Nat. Reviews. Drug Discovery*. 2013. V. 8. № 3. P. 235–253.  
<https://doi.org/10.1038/nrd2792>
41. *Jing P., Zhao N., Xie N. et al.* miR-24-3p/FGFR3 signaling as a novel axis is involved in epithelial-mesenchymal transition and regulates lung adenocarcinoma progression // *J. Immunol. Res.* 2018. V. 2018. № 2834109.  
<https://doi.org/10.1155/2018/2834109>
42. *Gasche C., Chang C.L., Rhee J. et al.* Oxidative stress increases frameshift mutations in human colorectal cancer cells // *Cancer Research*. 2001. V. 61. P. 7444–7448.

## Comparative Analysis of Mutation in the Buccal Epithelium and Blood in Patients with Lung Cancer and Healthy People

**O.V. Serzhantova<sup>1,2</sup>, A.G. Novikova<sup>1,2</sup>, A.A. Mikhailov<sup>1</sup>, I.P. Moshurov<sup>1</sup>, A. P. Gureev<sup>2\*</sup>**

<sup>1</sup>*Voronezh Regional Clinical Oncological Dispensary, Voronezh, 394036 Russia*

<sup>2</sup>*Department of Genetics, Cytology and Bioengineering, Voronezh State University, Voronezh, 394018 Russia*

*\*e-mail: gureev@bio.vsu.ru*

Lung cancer is one of the leading causes of cancer death. Finding new methods for the early and accurate diagnosis of lung cancer is critical for effective treatment. We have shown that patients with lung cancer have more mutations in the *FLT3*, *PDGFRA*, *KDR*, *PIK3CA*, *HRAS*, *FGFR3* genes in the buccal epithelium than people without diagnosed lung cancer. Thus, study of molecular alterations may be used as a method for the accurate diagnosis of lung cancer in the early stages of investigational procedure.

**Keywords:** lung cancer; sequencin, buccal epithelium, mutation profile, gene.