

печатное издание ISSN 2224-5057  
электронное издание ISSN 2587-6813

malignanttumors.org

# ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫЕ ОПУХОЛИ

**РУКОВОДСТВО**  
по интерпретации  
клинически значимых соматических  
мутаций при солидных опухолях,  
выявленных методом **секвенирования**  
**следующего поколения (NGS)**,  
с целью их клинического  
использования



Международный ежеквартальный  
научно-практический журнал по онкологии

Официальный журнал Российского общества  
клинической онкологии (RUSSCO)

Гордиев М.Г., Бровкина О.И., Еникеев Р.Ф.,  
Никитин А.Г., Сакаева Д.Д.

**РУКОВОДСТВО**  
**по интерпретации**  
**клинически значимых соматических**  
**мутаций при солидных опухолях,**  
**выявленных методом секвенирования**  
**следующего поколения (NGS),**  
**с целью их клинического**  
**использования**

## Введение

Данное руководство по интерпретации клинически значимых соматических мутаций в солидных опухолях, выявленных с помощью методов секвенирования, в том числе массового параллельного секвенирования (*секвенирования последнего поколения — NGS*), разработаны для российских онкологов, генетиков и специалистов по биоинформационной обработке данных. В основу данного руководства легли рекомендации и протоколы, разработанные в США, Европе и России (*Standards and Guidelines for Interpretations and Reporting of Sequence Variants in Cancer, 2017*) [1]–[3]. Главной целью представленной работы является оптимизация процедуры по интерпретации соматических мутаций в солидных опухолях.

Стремительно развивающиеся технологии массового параллельного секвенирования/NGS позволили выйти молекулярной диагностике онкологических заболеваний на новый уровень развития [4]. Метод NGS позволяет осуществить одновременное прочтение сотен миллионов коротких последовательностей ДНК, что выгодно отличает его от ПЦР анализа и секвенирования по Сэнгеру [5]. Последующая биоинформатическая обработка данных NGS позволяет найти отличия в последовательности ДНК опухоли от референсной геномной последовательности. Выявленные отличия называются вариантами нуклеотидной последовательности или нуклеотидными вариантами. При этом нуклеотидные варианты могут быть либо герминальными (врожденными — патогенными, или полиморфизмами), либо соматическими мутациями, характерными для опухолевого процесса. Полиморфизмы часто встречаются в популяции (частота встречаемости >1%) и являются одним из вариантов нормы [6]. Герминальные патогенные мутации редки в популяции (частота встречаемости <1%) [6]. Соматические мутации не должны встречаться в популяционных базах данных. Для молекулярной диагностики онкологических заболеваний мутации (и соматические, и герминальные) имеют первостепенную роль.

## Характеристика мутаций

В данных рекомендациях под термином соматическая мутация предлагается рассматривать в первую очередь такие нуклеотидные варианты, отличные от референсных последовательностей, которые характерны только для опухолевого процесса и имеют клиническую значимость.

### 1. Мутации, если речь идет о ЗНО (злокачественные новообразования), делятся на два основных типа в зависимости от наследуемости:

- Соматические (приобретенные, характерные для опухолевого процесса)
- Герминальные (наследуемые)

Герминальные патогенные мутации возникают в половых клетках и наследуются в последующих поколениях. Такие наследственные мутации обнаруживаются во всех клетках организма, и для их диагностики в основном используется венозная кровь пациента. Доля герминальных патогенных мутаций в общей популяции невелика, но в некоторых онкологических нозологиях частота встречаемости патогенных мутаций, формирующих наследственные онкологические синдромы, может составлять 5–15% [7].

Соматические мутации могут возникать в любых клетках организма, за исключением яйцеклеток и сперматозоидов, и не наследуются в следующих поколениях [8]. Для диагностики соматических мутаций используется непосредственно опухолевая ткань (опухолевые клетки).

## 2. В зависимости от размера изменений в ДНК мутации подразделяются на:

- генные или точечные (точковые);
- хромосомные;
- геномные.

Генные мутации возникают внутри одного гена [9]. Структурно генные мутации делят на:

- замену нуклеотида;
  - а) синонимичная замена — не приводит к замене аминокислоты, но может вызвать нарушения в сплайсинге мРНК;
  - б) несинонимичная замена — приводят к замене аминокислоты, при этом замена аминокислоты не всегда ведет к патогенным изменениям в структуре белка;
- инсерции (вставку) нуклеотида/нуклеотидов;
- делеции (выпадение) нуклеотида.

По эффекту, который генные мутации оказывают на триплет (комбинацию из 3 нуклеотидов, кодирующих 1 аминокислоту), выделяют [10]:

- Сайленс-мутации — не приводят к изменениям в белковой структуре клетки и фенотипе организма. Часто такими мутациями выступают синонимичные замены, однако в некоторых случаях сайленс-мутацией может быть несинонимичная замена, не вызывающая изменений в структуре и функции белка.
- Миссенс-мутации — наиболее частый вариант несинонимичных замен.
- Фреймшифт-мутации — приводят к сдвигу рамки считывания, в результате чего последовательность нуклеотидов в гене прочитывается неверно. К таким мутациям относятся инсерции и делеции менее трех нуклеотидов.
- Нонсенс-мутации — один из вариантов несинонимичной замены, который способствует появлению стоп-кодона, на котором происходит преждевременный обрыв синтеза белка.
- Мутации сайта сплайсинга — один из вариантов несинонимичной замены, который происходит на интрон-экзонной границе и влекут за собой изменения в сплайсинге незрелой пре-мРНК, при которых происходит потеря экзона или включение интрона.

Метод NGS наиболее эффективен для обнаружения генных мутаций.

Хромосомные мутации затрагивают несколько белок-кодирующих генов и включают изменения в структуре целой хромосомы [11]. В результате выделяют следующие мутации:

- Транслокации — фрагмент одной хромосомы встраивается в новое положение на другой хромосоме.
- Делеции — выпадение участка хромосомы.
- Дупликации — создаются дополнительные копии генов на хромосоме.

- Инверсия — отдельный участок хромосомы встраивается обратно в противоположном направлении. При этом перичентрическая инверсия происходит на участке центромеры, а парацентрическая инверсия на коротком либо длинном плече хромосомы.
- Изохромосомы — удвоение короткого либо длинного плеча хромосомы.
- Отдельной группой выделяют вариации числа копий (*copy number variation, CNV*) — явление при котором в геноме повторяются хромосомные сегменты размером от 1 тыс. до нескольких млн. пар оснований. CNV возникают в результате несбалансированных хромосомных перестроек, таких как делеции и дупликации.

Анализ хромосомных мутаций с помощью NGS затруднителен из-за небольших размеров прочтенной последовательности ДНК. Поэтому данный метод для выявления хромосомных мутаций рекомендуется использовать в сочетании с другими (цитогенетическими, молекулярно-цитогенетическими, секвенированием третьего поколения), а также использовать при обработке полученных данных дополнительные алгоритмы анализа.

Геномные мутации влекут за собой изменения в числе хромосом [12]. При этом различают:

- полиплоидию — кратное увеличение гаплоидного набора хромосом;
- анеуплоидию — некратное изменение числа хромосом.

Определение пloidности опухолевых клеток является важным прогностическим фактором и для этого также может применяться метод NGS. Однако анализ данных в этом случае требует введения дополнительных алгоритмов, определяющих пloidность, а также клональную гетерогенность опухолевых клеток.

### 3. Существуют также классификации непосредственно для соматических мутаций [13]. Так, в зависимости от эффекта мутации на канцерогенез клеток, выделяют:

- драйверные — дают преимущество в росте и развитии несущим их клонам опухолевых клеток;
- пассажирские — не оказывают существенного влияния на развитие клонов опухолевых клеток. Такие мутации присутствуют в клетках-предшественниках опухолевых клеток, когда те приобретают драйверные мутации, а потому распространяются среди клонов наравне с драйверными.

При этом драйверные мутации можно разделить функционально на [14]:

- активирующие;
- инактивирующие.

Активирующие (*gain-of-function, GoF*) мутации приводят к повышенной выработке сигнальных белков. Пример подобных мутаций — замена одной аминокислоты на другую, приводящая к аутофосфорилированию тирозинкиназных белков EGFR (рецептор эпидермального фактора роста) или ATM (мутантный при атаксии-телеангиэктазии белок). Аутофосфорилирование способствует стимуляции активности тирозинкиназ и передачи клеточных сигналов к росту и делению.

Инактивирующие (*loss-of-function, LoF*) мутации способствуют снижению или полному подавлению активности генов онкосупрессоров, таких как RB1 (ген ретинобластомы), TP53 (опухолевый белок 53), BCL2 (бета-клеточная лимфома 2), APC (аденоматозный полипоз кишки) и др. Потеря функций

онкосупрессоров влечет за собой нарушения в клеточном росте и делении. При этом вклад инактивирующих мутаций в геномную нестабильность опухолевой клетки существенно выше по сравнению с активирующими мутациями.

## Номенклатура нуклеотидных вариантов

На данный момент для обозначения нуклеотидных вариантов принято пользоваться номенклатурой, рекомендованной международным сообществом по анализу геномных вариантов человека (*Human Genome Variation Society, HGVS*). Полная версия рекомендаций приведена на сайте сообщества <https://varnomen.hgvs.org/>. Здесь мы обозначим ключевые моменты, встречающиеся при записи нуклеотидных вариантов.

- Необходимо обратить внимание на версию референсной геномной сборки, применяющуюся для биоинформатического анализа. Примеры часто используемых сборок: *GRCh38/hg38*, номер транскрипта, используемого для аннотации выявленного варианта, должен быть доступен в клинических базах данных или представлять собой наиболее длинный транскрипт (табл. 1).

**Таблица 1.** Референсные транскрипты

Название	Ссылка
RefSeq	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq</a>
Ensembl	<a href="http://www.ensembl.org/index.html">http://www.ensembl.org/index.html</a>
LRG	<a href="https://www.lrg-sequence.org">https://www.lrg-sequence.org</a>

- Для обозначения типа последовательности, используются следующие сокращения в начале описания:
  - «с.» для кодирующей ДНК (последовательность экзонов) (например, *c.2369C > T*)
  - «g.» для геномной ДНК (последовательность экзонов и интронов) (например, *g.1295234A > G*)
  - «p.» для белковых последовательностей (например, *p.Thr790Met*)
  - «r.» для РНК (например, *r.76a > u*)
- Способ описания ДНК, РНК и белковых также отличается:
  - Для последовательности ДНК используют заглавные буквы, цифры указывают на первый измененный нуклеотид (например, *c.34C > T*);
  - Для последовательности РНК используют строчные буквы, цифры указывают на первый измененный нуклеотид (например, *r.76a > u*);
  - Для белковой последовательности используют заглавные и строчные буквы, цифры указывают на первую измененную аминокислоту (например, *p.Gly12Asp*);

Нумерация нуклеотидов осуществляется с «с.1», нуклеотида А в АТГ-кодоне, с которого начинается трансляция, и заканчивается последним нуклеотидом в стоп-кодоне, которым заканчивается трансляция.

Для нумерации нуклеотидов в *нетранслируемой области (UTR)* используют символ «-» для кодонов, расположенных выше по цепи (к 5'-концу) от первого нуклеотида АТГ-кодона инициации трансляции (например с.-1, с.-2, с.-3 и т. д.), а для кодонов, находящихся ниже по цепи (к 3'-концу) от последнего нуклеотида стоп-кодона, используют символ «\*» (например с.\*1, с.\*2, с.\*3, и т. д.)

Для нумерации интронных областей используют символ «+» для нуклеотидов, располагающихся ниже по цепи от ближайшего экзона (например, с.87+1, с.87+2, с.87+3), или «-» для нуклеотидов, расположенных выше по цепи от ближайшего экзона (например, с.88-3, с.88-2, с.88-1). В середине интрона символ «+» меняется на «-» (например, с.87+676, с.87+677, с.87+678, с.88-678, с.88-677, с.88-676).

Для обозначения изменений в референсной последовательности используют следующие символы:

1. «>» обозначает нуклеотидную замену в ДНК (например, с.181C>A)
2. «\_» (нижнее подчеркивание) обозначает диапазон измененных нуклеотидов, разделяя первый и последний измененные нуклеотиды (например, с.2235\_2249del)
3. «del» обозначает делецию (например, с.2236\_2250del)
4. «dup» обозначает дупликацию (например, с.1-104\_1-83dup)
5. «ins» обозначает инсерцию (например, с.1086\_1087insGCCGTA)
6. «inv» обозначает инверсию (например, с.546\_2031inv)

Замены и инсерции/делеции должны обозначаться с использованием сокращений «р.» и «с.» (например, *BRAF* p.V600E, с.1799T>A). В обозначении хромосомных перестроек между двумя генами используются названия обоих генов, разделенные косой чертой (например, *EML4/ALK*).

Использование стандартной номенклатуры является важным требованием к оформлению отчетов по NGS анализу соматических мутаций. Тем не менее, взаимопонимание и коммуникация между лабораториями и специалистами клинического звена остается в приоритете, поэтому помимо стандартной номенклатуры рекомендуется приводить в отчете также устоявшиеся традиционные названия.

Например, для делеции в 19 экзоне гена *EGFR* приводится обозначение *g.729\_761del* согласно HGVS номенклатуре и *Ex19Del*, как традиционное.

## Значение характеристик опухолевого материала при интерпретации соматических мутаций

Материал для анализа соматических мутаций представляет собой зафиксированный формалином и заключенный в парафиновый блок образец опухолевой ткани [15]. Такой способ фиксации и хранения ткани приводит к повреждению двойных цепочек ДНК, поэтому очень важным является этап выделения нуклеиновых кислот наборами, специально адаптированными под данный вид выделения ДНК. Для получения достоверных результатов с помощью NGS метода необходимо, чтобы сред-

нее количество прочтений было не ниже 200× (рекомендуется не менее 500×), при оценке достоверности наличия мутации следует обращать внимание на количество содержащих альтернативный вариант прочтений (не менее 8–10) и распределение прямых и обратных прочтений (не должно быть смещения в сторону одного типа).

При выявлении соматических мутаций следует учитывать комплексность процесса канцерогенеза, при котором в ткани присутствуют популяции клеток с различными мутациями [16]. В связи с наличием в опухолевом материале нормальных клеток (сосудистая ткань, жировая, соединительная ткань), оптимальное содержание опухолевых клеток в парафиновом блоке должно быть 20% и выше. Подбор опухолевого материала должен осуществляться совместно с врачом-патологоанатомом (патоморфологом).

## Этапы интерпретации клинической значимости соматических мутаций

### Базы данных

Для того, чтобы оценить клиническую значимость выявленного нуклеотидного варианта, необходимо в первую очередь найти его в базах медицинских данных (табл. 2). При аннотации нуклеотидных вариантов с помощью доступных баз данных клинические лаборатории должны соблюдать следующие правила:

1. Иметь представление о содержании базы данных и способе сбора данных. Обычно информация об источнике и типе данных содержится в документации базы, а также в связанных с ней публикациях (<https://oncobrcr.ru>).
2. Обязательно учитывать ограничения каждой базы данных, чтобы избежать ложной интерпретации (<https://research.nhgri.nih.gov/bic/>).
3. Обращать внимание на версию сборки генома человека и ссылки на референсные транскрипты.

**Таблица 2.** Базы данных для интерпретации нуклеотидных вариантов онкологических больных

Назначение	Название	Ссылка
Популяционные базы для исключения нуклеотидных вариантов без клинической значимости	1000 Genomes Project	<a href="http://browser.1000genomes.org">http://browser.1000genomes.org</a>
	Exome Variant Server	<a href="http://evs.gs.washington.edu/EVS">http://evs.gs.washington.edu/EVS</a>
	dbSNP	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp</a>
	dbVar	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbvar">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbvar</a>
	gnomAD	<a href="https://gnomad.broadinstitute.org">https://gnomad.broadinstitute.org</a>



Назначение	Название	Ссылка
Базы данных для поиска вариантов, связанных с онкологическими заболеваниями	Catalog of Somatic Mutations in Cancer	<a href="http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic">http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic</a>
	My Cancer Genome	<a href="http://www.mycancergenome.org">http://www.mycancergenome.org</a>
	OncoBRCA	<a href="https://oncobrca.ru/">https://oncobrca.ru/</a>
	Personalized cancer therapy, MD Anderson Cancer Center	<a href="https://pct.mdanderson.org">https://pct.mdanderson.org</a>
	cBioPortal	<a href="https://www.cbioportal.org/">https://www.cbioportal.org/</a>
	BRCA Exchange	<a href="https://brcaexchange.org">https://brcaexchange.org</a>
	Intogen	<a href="https://www.intogen.org/search">https://www.intogen.org/search</a>
	ClinicalTrials.gov	<a href="https://clinicaltrials.gov">https://clinicaltrials.gov</a>
	IARC (WHO) TP53 mutation database	<a href="http://p53.iarc.fr">http://p53.iarc.fr</a>
	Pediatric Cancer Genome Project	<a href="http://explorepcgp.org">http://explorepcgp.org</a>
	International Cancer Genome Consortium	<a href="https://dcc.icgc.org">https://dcc.icgc.org</a>
Репозитории с нуклеотидными последовательностями	NCBI Genome	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome</a>
	RefSeqGene	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/rsg">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/rsg</a>
	Locus Reference Genomic	<a href="http://www.lrg-sequence.org">http://www.lrg-sequence.org</a>
	UCSC table browser	<a href="https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTables">https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTables</a>
	Ensemble BioMart	<a href="http://useast.ensembl.org/biomart/martview">http://useast.ensembl.org/biomart/martview</a>
Другие базы данных, содержащие информацию для интерпретации вариантов при онкологических заболеваниях	ClinVar	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar</a>
	Human Gene Mutation Database	<a href="http://www.hgmd.org">http://www.hgmd.org</a>
	Leiden Open Variation Database	<a href="http://www.lovd.nl">http://www.lovd.nl</a>
	OncoKB	<a href="https://www.oncokb.org/">https://www.oncokb.org/</a>
	VarSome	<a href="https://varsome.com/">https://varsome.com/</a>

## Геномные базы данных

В геномных базах данных осуществляется поиск информации, необходимый для точной аннотации, а также категоризации нуклеотидных вариантов.

Некоторые ресурсы, такие как база данных Американского Национального Института Онкологии (<https://gdc.cancer.gov>) объединяют информацию из нескольких баз данных (The Cancer Genome Atlas (TCGA), Therapeutically Applicable Research to Generate Effective Therapies (TARGET), Cancer Genome Characterization Initiative (CGCI)). База данных COSMIC считается наиболее содержательной по количеству различных мутаций для множества типов онкологических заболеваний.

## Базы данных с референсными последовательностями

Базы данных с референсными последовательностями предоставляют информацию о версии геномной сборки, а также о геномных координатах обнаруженных вариантов. Сведения о идентификационном номере и версии транскрипта мРНК необходимы для точного обозначения варианта по системе HGVS. Основные базы данных с референсными последовательностями представлены в табл. 1. Местоположения варианта (в кодирующей области, в некодирующей области или в сайте сплайсинга) и направление нити ДНК может быть определено с помощью перечисленных баз данных. Для автоматизации и упрощения процесса аннотации рекомендуется пользоваться специализированными инструментами — такими как Annotvar, SnpEff или VEP.

## Популяционные базы данных

Популяционные базы данных включают данные о представленности аллелей в искомом локусе среди различных демографических когорт. Такие базы данных используются для того, чтобы отфильтровать доброкачественные варианты на основании минимальной частоты аллеля в популяции (*minimal allele frequency*, *MAF*). Тем не менее, единого стандартного механизма для такой фильтрации не существует. В отсутствии парной нормальной ткани, рекомендуется отсеивать варианты с частотой больше 1%, при этом стоит учитывать также этническую принадлежность пациента.

Использовать популяционные базы данных следует с осторожностью. Предполагается, что информация в них получена от здоровых на момент исследования добровольцев. Несмотря на это, в эти базы попали в качестве герминальных вариантов несколько соматических мутаций ассоциированных с развитием онкологических заболеваний. Например, мутация *NM\_004972.3 (JAK2):c.1849G > T (c.V617F)*, детектируемая при миелопролиферативных новообразованиях и являющаяся показанием для лечения JAK ингибиторами, была включена в популяционные базы ExAC и Exome Variant Server.

## Онкологические базы данных (специализированные)

Базы данных, специализирующиеся на онкологических заболеваниях, предоставляют информацию о распространенности нуклеотидных вариантов среди различных типов онкологии. В таких базах данных также представлена дополнительная информация об опубликованных статьях, сигнальных путях, таргетной терапии, клинических испытаниях, а также ссылки на другие базы данных, содержащие найденный вариант. Информацию о распространенности следует оценивать с осторожностью.

стью, так как единые стандарты диагностики отсутствуют, а контроль источников приведенных вариантов является слабым. Например, доброкачественный герминальный вариант *NM\_000222.2 (KIT): c.1627A > C (p.M541L)* был представлен в базе данных COSMIC как соматический.

### **Базы данных по герминальным мутациям**

Частую выявленные варианты могут относиться к группе герминальных патогенных мутаций, связанных с различными наследственными онкологическими синдромами. Возможны также случаи, когда соматическая мутация полностью совпадает по положению с хорошо изученными герминальными вариантами. Тогда такие базы, как Human Gene Mutation Database, ONCOBRCA (<https://oncobrc.ru>), BRCA Exchange (<https://brcaexchange.org>), являются незаменимыми ресурсами для оценки подобных вариантов. ClinVar — еще одна полезная база данных из этой группы. Она содержит информацию о редких наследственных вариантах, как патогенных, так и доброкачественных, а также доказательную клиническую базу для данных вариантов.

### **Внутрилабораторные базы данных**

Лабораториям, осуществляющим секвенирование образцов от пациентов с онкологическими заболеваниями, рекомендуется создавать внутренние аннотированные базы данных для идентифицированных вариантов. На настоящий момент нет единого стандарта для оформления внутрилабораторной базы данных, однако стоит острая необходимость в его разработке для осуществления обмена данными между лабораториями.

## **Предсказательные программы для выявления соматических мутаций**

Компьютерные (*in silico*) программы часто используются для прогнозирования возможных влияний нуклеотидной замены на структуру и функцию белка. Алгоритмы в данных программах можно разделить на две группы: предсказание изменений структуры белка и сплайсинга транскрипта (табл. 3).

**Таблица 3.** Предсказательные программы для выявления соматических мутаций

Назначение	Название	Ссылка
Прогнозирование изменения структуры белка	PolyPhen <sup>2</sup>	<a href="http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2">http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2</a>
	SIFT	<a href="http://sift.jcvi.org">http://sift.jcvi.org</a>
	MutationAssessor	<a href="http://mutationassessor.org">http://mutationassessor.org</a>
	MutationTaster	<a href="http://www.mutationtaster.org">http://www.mutationtaster.org</a>
	PROVEAN	<a href="http://provean.jcvi.org/index.php">http://provean.jcvi.org/index.php</a>
	Condel	<a href="http://bg.upf.edu/blog/2012/12/condel-for-prioritization-of-variants-involved-in-hereditary-diseases-and-transic-for-cancer">http://bg.upf.edu/blog/2012/12/condel-for-prioritization-of-variants-involved-in-hereditary-diseases-and-transic-for-cancer</a>
	CoVEC	<a href="https://sourceforge.net/projects/covec">https://sourceforge.net/projects/covec</a>
	CADD	<a href="http://cadd.gs.washington.edu">http://cadd.gs.washington.edu</a>
	GERP++	<a href="http://mendel.stanford.edu/sidowlab/downloads/gerp/index.html">http://mendel.stanford.edu/sidowlab/downloads/gerp/index.html</a>
	PhyloP and PhastCons	<a href="http://compgen.bscb.cornell.edu/phast">http://compgen.bscb.cornell.edu/phast</a>
Прогнозирование изменения сплайсинга транскрипта	Human Splicing Finder	<a href="http://www.umd.be/HSF3">http://www.umd.be/HSF3</a>
	MaxEntScan	<a href="http://genes.mit.edu/burgelab/maxent/Xmaxentscan_scoreseq.html">http://genes.mit.edu/burgelab/maxent/Xmaxentscan_scoreseq.html</a>
	NetGene <sup>2</sup>	<a href="http://www.cbs.dtu.dk/services/NetGene2">http://www.cbs.dtu.dk/services/NetGene2</a>
	NNSplice	<a href="http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html">http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html</a>
	GeneSplicer	<a href="http://www.cbcb.umd.edu/software/GeneSplicer/gene_spl.shtml">http://www.cbcb.umd.edu/software/GeneSplicer/gene_spl.shtml</a>

Важно помнить, что приведенные выше инструменты предсказания имеют специфичность от 60 до 80% с тенденцией к завышению вероятности патогенного эффекта от делеций. Поэтому интерпретация нуклеотидных вариантов не должна осуществляться на основании только результатов прогностических программ.

## Аннотация нуклеотидных вариантов

Аннотация нуклеотидных вариантов представляет собой ключевой этап в идентификации соматических мутаций. На данном этапе биоинформатики используют определенный формат файлов, такой как *variant call format (VCF)*. Обязательные поля данных файлов включают в себя информацию

о геномных координатах нуклеотидного варианта, референсной последовательности и о качестве прочтения. Такие метрики VCF-файла, как глубина прочтения и частота аллели (VAF), имеют решающее значение для интерпретации, особенно в случаях отсутствия парной нормальной ткани и высокой гетерогенности опухоли. Поэтому рекомендуется включать данные показатели в итоговый отчет об интерпретации.

Существуют, однако, определенные сложности, связанные со спецификой VCF-формата. Так, при переводе из геномной последовательности в соответствующую последовательность кДНК или белковую последовательность могут возникать ошибки в случае с инсерциями/делециями, связанные с начальной ошибкой при выравнивании последовательности на референсный геном.

При этом система HGVS рекомендует правостороннее выравнивание, в то время как в VCF-формате реализуется левостороннее выравнивание. Отсутствие стандартизации выравнивания может оказывать существенное влияние на точность геномных координат, а, следовательно, и на номенклатуру нуклеотидных вариантов.

Для получения VCF-файлов существуют различные программы с разными алгоритмами поиска и аннотации нуклеотидных вариантов. При биоинформационной обработке необходимо учитывать, что многие популярные инструменты (например, GATK Mutect2) имеют тенденцию к пропуску соматических вариантов, совпадающих с герминальными мутациями, присутствующими в популяционных базах данных, это может приводить к ложноотрицательным результатам анализа. Простым способом избежать такой ситуации является использование дополнительной программы по поиску именно герминальных вариантов (например, GATK HaplotypeCaller или Strelka2) с объединением получающихся VCF-файлов.

При необходимо различать герминальные и соматические варианты между собой, то единственным надежным способом становится секвенирование принадлежащих одному пациенту парных образцов «опухоль» и «норма». Алгоритмические оценки вероятности принадлежности мутации к одному из классов, как правило, имеют надежность не более 70–80%.

Важно, чтобы лаборатории использовали геномные координаты для хранения данных во избежание разночтений при выравнивании.

## Категоризация соматических вариантов

В отличие от интерпретации герминальных вариантов, которая направлена в первую очередь на выявление патогенности варианта (который мог явиться причиной заболевания, или наследственного онкологического синдрома) целью интерпретации соматических вариантов является, в первую очередь, определение их терапевтического значения (чувствительности и резистентности к определенному виду терапии).

Соматическая мутация (вариант) может считаться значимым биомаркером, если она:

- ассоциирована с чувствительностью, резистентностью к определенной терапии;
- изменяет функцию гена таким образом, что его белковый продукт становится молекулярной мишенью для таргетных препаратов;
- служит критерием включения в клинические испытания;

- влияет на прогноз заболевания;
- помогает в постановке диагноза.

Предлагается сгруппировать биомаркеры по пяти уровням в зависимости от их доказательной базы и терапевтического эффекта (табл. 4).

1. Биомаркеры уровня А позволяют предсказать чувствительность или резистентность к препаратам одобренные отечественным национальным регулятором (для Российской Федерации МЗ РФ) для терапии определенного типа злокачественных новообразований. Такие биомаркеры так же включены в отечественные профессиональные онкологические руководства и рекомендации (RUSSCO, АОР и др) в качестве терапевтических, диагностических или прогностических биомаркеров для определенных типов злокачественных новообразований.
2. Биомаркеры уровня В, позволяющие предсказать чувствительность или резистентность к терапии, устанавливаются на основании доказательной базы и наличия консенсуса среди отечественных экспертов в этой области. Данные биомаркеры также выступают в качестве прогностических маркеров для определенных типов злокачественных новообразований. Находятся на стадии одобрения МЗ РФ.
3. Биомаркеры уровня С позволяют предсказать чувствительность или резистентность к препаратам, одобренным зарубежными национальными регуляторами и/или включенными в зарубежные профессиональные онкологические руководства и рекомендации в качестве терапевтических, диагностических или прогностических биомаркеров для терапии определенного типа злокачественных новообразований. Одобрены только зарубежными профессиональными сообществами и регуляторами.
4. Биомаркеры уровня D определяют чувствительность или резистентность к терапии препаратами, одобренными отечественными или зарубежными национальными регуляторами или/и отечественными или зарубежными профессиональными сообществами, по другим показаниям или для терапии других типов злокачественных новообразований (с иным морфологическим диагнозом) — off-label use. Данные биомаркеры так же служат критерием включения в клинические испытания или имеют диагностическую/прогностическую значимость на основании исследований с малыми выборками.
5. Биомаркеры уровня Е имеют вероятную терапевтическую значимость на основании доклинических испытаний. Такие биомаркеры могут служить в качестве диагностических/прогностических средств как самостоятельно, так и в совокупности с другими биомаркерами на основании небольших исследований с малыми выборками или описаний клинических случаев.

**Таблица 4.** Категории биомаркеров на основании их доказательной базы и терапевтического эффекта

Уровень	Определение	Доказательная база и клиническая значимость
Уровень А	<ul style="list-style-type: none"> <li>Биомаркеры с терапевтической значимостью, включенные в профессиональные руководства для терапии определенного типа опухолей</li> <li>Биомаркеры с прогностической значимостью, включенные в профессиональные руководства для терапии определенного типа онкологии</li> </ul>	Одобрены отечественным национальным регулятором и включены в отечественные профессиональные руководства (RUSSCO, АОР и др) для терапии данных типов злокачественных новообразований
Уровень В	<ul style="list-style-type: none"> <li>Биомаркеры с терапевтической значимостью, выявленные на основании масштабных исследований и согласия экспертов в данной области</li> <li>Биомаркеры с прогностической значимостью, выявленные на основании масштабных исследований и согласия экспертов в данной области</li> </ul>	Выявлены на основании масштабных исследований и согласия отечественных экспертов в данной области для определенных типов злокачественных новообразований. Находятся на стадии одобрения МЗ РФ
Уровень С	Биомаркеры с терапевтической и прогностической значимостью, выявленные на основании масштабных исследований и согласия экспертов в данной области	Выявлены на основании масштабных исследований и согласия зарубежных экспертов в данной области и/или зарубежных национальных регуляторов (FDA и др). для терапии определенных типов злокачественных новообразований. Одобрены только зарубежными профессиональными сообществами и регуляторами
Уровень D	Биомаркеры с терапевтической и прогностической значимостью, выявленные на основании множества небольших исследований; или рекомендованы по другим показаниям или для терапии других типов злокачественных новообразований (с иным морфологическим диагнозом)	Одобрены национальными регуляторами и включены в профессиональные руководства по другим показаниям или для терапии других типов злокачественных новообразований (с иным морфологическим диагнозом). Служат критерием включения в клинические исследования
Уровень E	Биомаркеры, которые могут помочь в определении ответа на терапию заболевания отдельно или вместе с другими биомаркерами на основе малых выборок или нескольких клинических случаев	Обладают вероятной терапевтической значимостью, выявленной в доклинических исследованиях для терапии данного типа опухоли

Некоторые маркеры уровня А и В относятся как к терапевтической, так и к прогностической группе, поэтому разделение на подгруппы в таблице 4 является условным.

Важно помнить, что молекулярная онкология — постоянно развивающаяся область медицины, поэтому значимость многих биомаркеров постоянно пересматривается и может быть изменена. Так, например, биомаркеры уровня С могут стать биомаркерами уровня В, если после успешного прохождения клинических исследований будут рекомендованы отечественными профессиональными сообществами (RUSSCO, АОР и др). И наоборот, новые исследования могут опровергнуть, что биомаркеры уровня D имеют клинический потенциал для данного типа злокачественных новообразований. Так же не исключено, что некоторые биомаркеры могут одновременно относиться к уровню С и D.

По клинической значимости нуклеотидных вариантов предлагается подразделить на четыре класса (табл. 5).

Классы I и II включают биомаркеры различных уровней, важные для принятия терапевтической стратегии (уровни А, В, С, D, E). Данные варианты **должны присутствовать** в лабораторном заключении.

В класс III входят нуклеотидные варианты с неизвестным клиническим значением. Такие варианты, как правило, не должны иметь высоких частот в популяции (согласно базам данных 1000 Genomes Project database, Exome Variant Server, or Exome Aggregation Consortium database). Различные предсказательные *in silico* программы позволяют оценить структуру и функции белкового продукта генов с вариантами класса III. Однако результаты предсказательных программ не должны быть использованы в качестве единственного параметра для оценки клинической значимости. Помимо результатов *in silico* программ, варианты класса III должны быть аннотированы согласно их типу мутации, минимальной частоты аллеля в популяции и литературным данным. Включать такие варианты в лабораторный отчет следует с осторожностью, и только после согласования с клиническим онкологом, так как большинство вариантов с неизвестным клиническим значением выявляется среди здоровых людей. **Если возможность согласования с клиническим онкологом такого варианта отсутствует, в лабораторном заключении он присутствовать не должен.**

Класс IV как правило включает в себя редкие полиморфизмы с частотой аллеля в клетках, равной 50% или 100% и наблюдаются с существенной частотой в общей популяции или у определенных этнических групп. Варианты класса IV не представляют собой клинической значимости для терапии злокачественных новообразований. Такие варианты не должны присутствовать в лабораторном заключении.



**Таблица 5.** Категоризация соматических вариантов по клинической значимости

Класс	Уровень биомаркеров	Клиническая значимость	Тип мутаций	Представленность мутантного аллеля относительно аллеля дикого типа (Variant allele frequency, VAF)	Минимальная частота аллеля (Minimal allele frequency, MAF) в популяции*
Класс I	Уровень А, В, С	Сильная клиническая значимость	Активирующие, Мутации, приводящие к потере функции белка: миссенс, нонсенс, инсерции/делеции, сплайс-сайт мутации, хромосомные перестройки	Неравномерная	Отсутствует
Класс II	Уровень D, E	Потенциальная клиническая значимость	Активирующие, Мутации, приводящие к потере функции белка: миссенс, нонсенс, инсерции/делеции, сплайс-сайт мутации, хромосомные перестройки	Неравномерная	Отсутствует
Класс III	Отсутствует*	Неустановленная клиническая значимость	Мутации с установленным влиянием на функции белка: в основном миссенс мутации,	Неравномерная	Отсутствует или чрезвычайно низкая
Класс IV	Отсутствует*	Добро-качественные варианты или вероятно добро-качественные варианты	Мутации с несущественным или неясным влиянием на функции белка: в основном миссенс мутации	Преимущественно равномерная: 50% для гетерозигот, 100% для гомозигот	≥ 1, может быть высокой в некоторых популяциях. В данном случае нуклеотидный вариант относится к полиморфизмам

\* Согласно базам данных ESP, dbSNP, 1000Genome, ExAC

## Класс I

В класс I входят варианты с высокой клинической значимостью и сильной доказательной базой.

### 1. Варианты с терапевтической значимостью уровня A

Примером таких вариантов служит активирующая мутация в гене EGFR L858R, обуславливающая ответ на ингибитор тирозин-киназы (ТКИ) при мелкоклеточном раке легкого.

Определение микросателлитной нестабильности (*microsatellite instability, MSI*) играет существенную роль в терапии ингибиторами контрольных точек иммунитета при раке ободочной кишки [17].

### 2. Варианты с прогностической значимостью уровня A

Мутации в генах KRAS (экзоны 2, 3 и 4) и NRAS (экзоны 2 и 3), связанные с резистентностью и плохим прогнозом на терапию моноклональными антителами к рецептору эпидермального фактора роста [18].

Примером прогностического и терапевтического варианта уровня A является мутация в гене EGFR T790M, связанная с резистентностью к ТКИ [19].

### 3. Варианты с прогностической значимостью уровня B

Прогностическим вариантом уровня B служит мутация BRAF (обычно V600E), которая используется в качестве диагностического и прогностического маркера папиллярной карциномы щитовидной железы [20].

### 4. Варианты с терапевтической значимостью уровня C

К этой группе можно относиться показатель мутационной нагрузки опухоли (*tumor mutation burden, TMB*). TMB — это количество мутаций, содержащихся в 1 мегабазе кодирующего генома опухолевых клеток. Различают низкую ( $\leq 10$  мутаций/Mb), среднюю (10–20 мутаций/Mb) и высокую ( $\geq 20$  мутаций/Mb) мутационную нагрузку. Пациенты с высоким значением TMB имеют хороший ответ на ингибиторы контрольных точек иммунитета [21], [22].

## Класс II

В класс II входят варианты с потенциальной клинической значимостью.

### 1. Варианты с терапевтической значимостью уровня D

Варианты этой группы одобрены национальными регуляторами, и/или профессиональными сообществами для терапии других типов опухолей, или являются критериями включения в исследования.

В качестве примера можно привести соматические мутации при нерезектабельном/метастатическом НМРЛ в гене ERBB2, кодирующем рецептор HER2. Результаты недавних исследований показали, что конъюгат, состоящий из моноклональных антител против рецептора HER2 и цитотоксического ин-

гибитора топоизомеразы I (трастузумаб дерукстекан), может быть эффективен у пациентов НМРЛ с мутацией в ERBB2 [23].

## 2. Варианты с терапевтической значимостью уровня E

Показатель минимальной остаточной болезни (*minimal residual disease, MRD*) является прогностическим маркером уровня E. Его оценка возможна как по отдельным циркулирующим опухолевым ДНК (цоДНК) так и по циркулирующим опухолевым клеткам. Наиболее часто (если говорить о солидных опухолях), MRD представляет собой оставшиеся в послеоперационном периоде цоДНК при ранних стадиях заболевания. Считается, что оценка MRD сможет помочь в выявлении пациентов с высоким риском рецидива на ранних стадиях при различных типах злокачественных новообразований [24].

Также варианты этой группы связаны с таргетной терапией, находящейся на стадии доклинических испытаний. В частности, в настоящий момент ведутся исследования персонализированной терапии BLU-945 для лечения пациентов с тройной мутацией гена EGFR [25]. При этом важную роль играет расположение мутации EGFR C797S: если данная мутация находится в транс-положении к мутации T790M, то пациенты чувствительны к терапии ТКИ, в то время как для пациентов с данной мутацией в цис-положении характерна резистентность к ТКИ [26]

## Класс III

Варианты этой группы включают соматические мутации с неопределенной клинической значимостью. Большинство вариантов в генах, несвязанных с развитием онкологии, относятся к классу III. Для классификации вариантов в генах, связанных с онкологиями, необходимо учитывать тип мутации, функции белкового продукта гена, а также результаты *in silico* алгоритмов для предсказания структуры и функции белкового продукта мутантного гена.

Как правило, варианты класса III не имеют доказательной базы для установления их патогенности и в соответствии с базами данных 1000 Genomes, Exome Variant Server, Exome Aggregation Consortium варианты этой группы имеют низкие показатели минимальной частоты аллеля MAF в популяции.

## Класс IV

Варианты класса IV, как правило, относятся к герминальному типу. Для них характерны равномерная представленность аллеля: 50% для гетерозигот, 100% для гомозигот и значительная популяционная частота. Такие варианты не должны быть представлены в лабораторном заключении о выявленных соматических мутациях.

## Дифференциация соматических и герминальных мутаций

При анализе соматических вариантов важно разделять спорадические (приобретенные) мутации и наследственные (герминальные патогенные и полиморфизмы). Важное отличие герминальных мутаций заключается в том, что они представлены в 100% клеток организма с частотой аллеля 50 или 100% в исследуемых клетках. При этом для соматических мутаций характерна частота аллеля <50% из-за присутствия нормальных клеток в опухолевой ткани.

Для того, чтобы минимизировать ошибки в дифференциации соматических и герминальных мутаций рекомендуется по возможности в параллели с опухолевой тканью анализировать нормальную ткань (либо венозную кровь).

В случаях, когда контроль неопухолевой тканью невозможен, предлагается оценивать выявленный нуклеотидный вариант по нескольким критериям. Важнейший из критериев — частота аллеля в клетках. Для герминальных мутаций данный показатель должен составлять либо 50% для гетерозиготных вариантов либо 100% для гомозиготных. При этом возможны исключения: наличие крупных хромосомных перестроек может повлиять на избирательную амплификацию либо обогащение в сторону нормального аллеля. В таких случаях, частота аллеля герминального варианта может быть <50%.

Для установления природы мутаций так же важны клинические показатели. Важно проанализировать следующую клиническую информацию:

- возраст манифестации — ранний возраст ассоциирован с наследственными онкологическими синдромами;
- латеральность опухоли — билатеральные опухоли вероятнее имеют наследственную природу;
- отягощенный семейный онкологический анамнез — наличие таковой может быть доводом в сторону наследственного типа рака.

Поиск нуклеотидного варианта в базах данных по герминальным мутациям также может помочь в установлении происхождения происхождения варианта (табл. 6).

**Таблица 6.** Базы данных по герминальным мутациям

Название	Ссылка
Online Mendelian Inheritance in Man	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim</a>
Human Gene Mutation Database	<a href="http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php">http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php</a>
ClinVar	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/</a>
OncoBRCA	<a href="https://oncobrca.ru">https://oncobrca.ru</a>
BRCA Exchange	<a href="https://brcaexchange.org">https://brcaexchange.org</a>

Рекомендуется включать в отчет выявленные патогенные герминальные мутации с выраженным клиническим эффектом. Например, пациенты с мутациями в генах гомологичной рекомбинации (*homologous recombination repair, HRR*) чувствительны к ингибиторам PARP-полимеразы [27]. В случае обнаружения герминальных патогенных мутаций, имеющих показания для клинического наблюдения пациента, их также необходимо включить в отчет. Так, например, определенные герминальные патогенные варианты в гене TP53 приводят к синдрому Ли–Фраумени, наследственному онкологическому синдрому, ассоциированному с широким спектром злокачественных новообразований, таких как саркома, лейкоз, рак молочной железы и ряду других, поэтому эти варианты могут являться маркером повышенного риска развития второй опухоли у пациента [28], [29].

## Требования к оформлению отчета о результатах исследования соматических вариантов

Отчет является важной частью NGS анализа и должен содержать необходимую информацию, подтверждающую достоверность интерпретации.

В отчете должны быть краткие клинические сведения о пациенте:

- пол;
- возраст;
- диагноз клинический, морфологический.

Рекомендуется указывать методику секвенирования:

- название набора реагентов, с помощью которых осуществлялась подготовка библиотек;
- наименование способа секвенирования: полногеномное, полноэкзомное, клинический экзом, таргетное секвенирование;
- в случае таргетного секвенирования — название генетической панели или перечень генов, если было кастомное составление панели;
- название прибора, на котором проводилось секвенирование.

Биоинформатическая часть отчета должна включать:

- краткое описание процесса обработки (пайплайн);
- указание минимальной глубины покрытия, включенной в анализ;
- перечень баз данных, использованных для аннотирования и интерпретации результатов.

При оформлении результатов необходимо указывать:

- название гена, в котором был обнаружен нуклеотидный вариант;
- геномные координаты варианта;
- генная область (экзон, интрон, нетранслируемая область);
- референсный транскрипт;
- номенклатура варианта по стандартам HGVS;
- традиционное название, если имеется;

- генотип;
- количество прочтений для варианта при секвенировании;
- категорию варианта по клинической значимости. При этом варианты указываются, начиная с максимальной клинической значимости (класс I) в убывающем порядке. Варианты класса III включать в лабораторный отчет следует с осторожностью, и только после согласования с клиническим онкологом. Варианты класса IV в отчет включать не следует.

Отрицательные результаты также могут быть включены в отчет, если они влияют на выбор терапевтической стратегии (например, отсутствие клинически значимых мутаций в гене EGFR у пациентов с раком легкого или отсутствие мутаций в гене BRAF у пациентов с меланомой).

Рекомендации о выборе метода лечения на основе отчета должны быть сделаны лечащим врачом онкологом, так как именно клинический онколог обладает наиболее полной клинической информацией. Важно понимать, что для выбора терапии важны не только генетические факторы, но и знания и понимание течения заболевания. Исключение какого-либо фактора из полной картины заболевания может привести непредсказуемым и неблагоприятным итогам дальнейшей лечебной тактики.

## Пример заключения

Реквизиты  
и контактные данные  
Вашей организации  
Лаборатория эпигенетики

123456, Город, Почтовый адрес., д. 3, стр. 2  
тел. +7 (987) 654-32-10  
www.site-sample.med  
info-epib@yourmailserver.med



ПАЦИЕНТ				ОБРАЗЕЦ	
№ амб. карты	123/456	Лабораторный №	9876543210		
Диагноз	НМРЛ	№ гистологического заключения	0123456789		
Возраст	49	Дата забора	02.12.20		
Фамилия	Иванов	Дата отчета	11.12.20		
Имя	Иван				
Отчество	Иванович				
Пол (М/Ж)	М				

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ по результатам секвенирования ДНК

### ОБНАРУЖЕННЫЕ ВАРИАНТЫ

Ген	Вариант (GRCh37/hg19)	Область	Экзон	Частота аллеля в популяции	Содержание аллеля в образце	Глубина прочтения	Класс мутации
KRAS	chr12:25398285C>A NM_033360.3 с.34G>T p.G12C	Экзон	2	Нет данных	2%	220x	Класс I (уровень A)

Выявленный класс мутации относится к Классу I (уровень A).

### ТЕХНИЧЕСКИЕ ДАННЫЕ

Концентрация ДНК в материале составляла 32 нг/мкл. Подготовка библиотек для секвенирования осуществлялась с помощью ..... и рекомендуемых производителем реактивов. Методом таргетного секвенирования на приборе *Illumina MiSeq* была проанализирована панель генов: *EGFR, AKL, ROST, BRAF, NTRK 1,2,3, RET, MET, BRAF, KIT, KRAS, NRAS, HER2, PIK3CA*.

Биоинформационный анализ выполнялся следующим образом: .....

### СТАТИСТИКА СЕКВЕНИРОВАНИЯ

Параметр	Показатель	Параметр	Показатель
Всего прочтений	1 213 482	Всего выявлено вариантов	1328
Прочитано нуклеотидов	176 345 287	Процент покрытия $\geq 100\times$	87%
Среднее покрытие	312 x	Процент покрытия $\geq 50\times$	97%

## Список литературы

- [1] M.M. Li et al., *Standards and Guidelines for the Interpretation and Reporting of Sequence Variants in Cancer: A Joint Consensus Recommendation of the Association for Molecular Pathology, American Society of Clinical Oncology, and College of American Pathologists*, *J. Mol. Diagn.*, vol. 19, no. 1, pp. 4–23, Jan. 2017, doi: 10.1016/j.jmoldx.2016.10.002.
- [2] О.П. Рыжкова et al., *Руководство по интерпретации данных последовательности ДНК человека, полученных методами массового параллельного секвенирования (MPS)* (редакция 2018, версия 2), *Медицинская генетика*, 2019. <https://www.medgen-journal.ru/jour/article/view/642> (accessed Sep. 13, 2020).
- [3] M. Claustres et al., *Recommendations for reporting results of diagnostic genetic testing (biochemical, cytogenetic and molecular genetic)*, *Eur. J. Hum. Genet. EJHG*, vol. 22, no. 2, pp. 160–170, Feb. 2014, doi: 10.1038/ejhg.2013.125.
- [4] J. Gagan and E.M. Van Allen, *Next-generation sequencing to guide cancer therapy*, *Genome Med.*, vol. 7, no. 1, p. 80, Jul. 2015, doi: 10.1186/s13073-015-0203-x.
- [5] Д.В. Ребриков, Д.О. Коростин, Е.С. Шубина, and вв. Ильинский, *NGS: высокопроизводительное секвенирование*, 2014, Accessed: Oct. 08, 2020. [Online]. Available: <https://istina.msu.ru/publications/book/7960809/>.
- [6] R. Karki, D. Pandya, R.C. Elston, and C. Ferlini, *Defining mutation and polymorphism in the era of personal genomics*, *BMC Med. Genomics*, vol. 8, Jul. 2015, doi: 10.1186/s12920-015-0115-z.
- [7] A.J. Griffiths, J.H. Miller, D.T. Suzuki, R.C. Lewontin, and W.M. Gelbart, *Somatic versus germinal mutation*, *Introd. Genet. Anal. 7th Ed.*, 2000, Accessed: Oct. 08, 2020. [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21894/>.
- [8] K.C. Akdemir et al., *Somatic mutation distributions in cancer genomes vary with three-dimensional chromatin structure*, *Nat. Genet.*, pp. 1–11, Oct. 2020, doi: 10.1038/s41588-020-0708-0.
- [9] A. Eyre-Walker and P.D. Keightley, *The distribution of fitness effects of new mutations*, *Nat. Rev. Genet.*, vol. 8, no. 8, Art. no. 8, Aug. 2007, doi: 10.1038/nrg2146.
- [10] L. Loewe and B. Charlesworth, *Inferring the distribution of mutational effects on fitness in Drosophila*, *Biol. Lett.*, vol. 2, no. 3, pp. 426–430, Sep. 2006, doi: 10.1098/rsbl.2006.0481.
- [11] D.G. Albertson, C. Collins, F. McCormick, and J.W. Gray, *Chromosome aberrations in solid tumors*, *Nat. Genet.*, vol. 34, no. 4, pp. 369–376, Aug. 2003, doi: 10.1038/ng1215.
- [12] A.C. Gerstein, *Mutational effects depend on ploidy level: all else is not equal*, *Biol. Lett.*, vol. 9, no. 1, Feb. 2013, doi: 10.1098/rsbl.2012.0614.
- [13] M.R. Stratton, P.J. Campbell, and P.A. Futreal, *The cancer genome*, *Nature*, vol. 458, no. 7239, pp. 719–724, Apr. 2009, doi: 10.1038/nature07943.
- [14] M.A. Aldred and R.C. Trembath, *Activating and inactivating mutations in the human GNAS1 gene*, *Hum. Mutat.*, vol. 16, no. 3, pp. 183–189, Sep. 2000, doi: 10.1002/1098-1004(200009)16:3<183::AID-HUMU1>3.0.CO;2-L.
- [15] T.J. Kokkat, M.S. Patel, D. McCarvey, V.A. LiVolsi, and Z.W. Baloch, *Archived Formalin-Fixed Paraffin-Embedded (FFPE) Blocks: A Valuable Underexploited Resource for Extraction of DNA, RNA, and Protein*, *Biopreservation Biobanking*, vol. 11, no. 2, pp. 101–106, Apr. 2013, doi: 10.1089/bio.2012.0052.
- [16] I. Dagogo-Jack and A.T. Shaw, *Tumour heterogeneity and resistance to cancer therapies*, *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, vol. 15, no. 2, Art. no. 2, Feb. 2018, doi: 10.1038/nrclinonc.2017.166.
- [17] М.Ю. Федянин, О.А. Гладков, С.С. Гордеев, И.В. Рыков, and А.А. Трякин, *Практические рекомендации по лекарственному лечению рака ободочной кишки и ректосигмоидного соединения, Злокачественные опухоли*, vol. 7, no. 3–52, 2017, doi: 10.18027/2224-5057-2017-7-3s2-261-294.
- [18] H.J. Andreyev et al., *Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the RASCAL II study*, *Br. J. Cancer*, vol. 85, no. 5, pp. 692–696, Sep. 2001, doi: 10.1054/bjoc.2001.1964.
- [19] H. Kimura et al., *A case of EGFR mutation-positive lung adenocarcinoma in which the T790M allele fraction was increased by repeated EGFR-TKI treatment*, *Cancer Commun.*, vol. 39, no. 1, p. 67, Nov. 2019, doi: 10.1186/s40880-019-0413-5.
- [20] M.N. Nikiforova, A.I. Wald, S. Roy, M.B. Durso, and Y.E. Nikiforov, *Targeted next-generation sequencing panel (ThyroSeq) for detection of mutations in thyroid cancer*, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 98, no. 11, pp. E1852–1860, Nov. 2013, doi: 10.1210/jc.2013-2292.



- [21] J.-D. Fumet, C. Truntzer, M. Yarchoan, and F. Ghiringhelli, *Tumour mutational burden as a biomarker for immunotherapy: Current data and emerging concepts*, *Eur. J. Cancer*, vol. 131, pp. 40–50, May 2020, doi: 10.1016/j.ejca. 2020.02.038.
- [22] C. for D. E. and Research, *FDA approves pembrolizumab for adults and children with TMB-H solid tumors*, FDA, Jun. 2020, Accessed: Nov. 05, 2020. [Online]. Available: <https://www.fda.gov/drugs/drug-approvals-and-databases/fda-approves-pembrolizumab-adults-and-children-tmb-h-solid-tumors>.
- [23] E. F. Smit et al., *Trastuzumab deruxtecan (T-DXd; DS - 8201) in patients with HER2-mutated metastatic non-small cell lung cancer (NSCLC): Interim results of DESTINY-Lung01.*, *J. Clin. Oncol.*, vol. 38, no. 15\_suppl, pp. 9504–9504, May 2020, doi: 10.1200/JCO. 2020.38.15\_suppl. 9504.
- [24] AstraZeneca, *A Phase III, Randomized, Multicenter, Double-blind, Placebo-controlled Study to Determine the Efficacy of Adjuvant Durvalumab in Combination With Platinum-based Chemotherapy in Completely Resected Stage II-III NSCLC (Mermaid - 1)*, *clinicaltrials.gov*, Clinical trial registration NCT04385368, Sep. 2020. Accessed: Oct. 14, 2020. [Online]. Available: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04385368>.
- [25] S. S. Schalm et al., *1296P BLU -945, a highly potent and selective 4th generation EGFR TKI for the treatment of EGFR T790M/C797S resistant NSCLC*, *Ann. Oncol.*, vol. 31, p. S839, Sep. 2020, doi: 10.1016/j.annonc. 2020.08.1610.
- [26] Z. Wang et al., *Lung Adenocarcinoma Harboring EGFR T790M and In Trans C797S Responds to Combination Therapy of First-and Third-Generation EGFR TKIs and Shifts Allelic Configuration at Resistance*, *J. Thorac. Oncol.*, vol. 12, no. 11, pp. 1723–1727, Nov. 2017, doi: 10.1016/j.jtho. 2017.06.017.
- [27] B. Kaufman et al., *Olaparib Monotherapy in Patients With Advanced Cancer and a Germline BRCA1/2 Mutation*, *J. Clin. Oncol.*, vol. 33, no. 3, pp. 244–250, Jan. 2015, doi: 10.1200/JCO. 2014.56.2728.
- [28] M. L. Ballinger, G. Mitchell, and D. M. Thomas, *Surveillance recommendations for patients with germline TP53 mutations*, *Curr. Opin. Oncol.*, vol. 27, no. 4, pp. 332–337, Jul. 2015, doi: 10.1097/CCO. 0000000000000200.
- [29] M. B. Daly et al., *NCCN Guidelines Insights: Genetic/Familial High-Risk Assessment: Breast, Ovarian, and Pancreatic, Version 1.2020*, *J. Natl. Compr. Cancer Netw. JNCCN*, vol. 18, no. 4, pp. 380–391, 2020, doi: 10.6004/jnccn. 2020.0017.