

malignanttumors.org

ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫЕ ОПУХОЛИ

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

РУКОВОДСТВО по интерпретации клинически значимых **нуклеотидных вариантов** при солидных опухолях с целью выбора тактики терапии и предоставлению результатов, полученных методом секвенирования следующего поколения (NGS)



Международный ежеквартальный
научно-практический журнал по онкологии

Официальный журнал Российского общества
клинической онкологии (RUSSCO)

malignanttumors.org

ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫЕ ОПУХОЛИ

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

РУКОВОДСТВО по интерпретации клинически значимых нуклеотидных вариантов при солидных опухолях с целью выбора тактики терапии и предоставлению результатов, полученных методом секвенирования следующего поколения (NGS)



Международный ежеквартальный
научно-практический журнал по онкологии

Официальный журнал Российского общества
клинической онкологии (RUSSCO)

Введение

Данные рекомендации по интерпретации клинически значимых нуклеотидных вариантов в солидных опухолях, выявленных с помощью методов секвенирования, в том числе массового параллельного секвенирования (секвенирования следующего поколения — NGS), представляют собой второе издание [1], в котором были внесены следующие поправки:

1. Раздел «Значение характеристик опухолевого материала при интерпретации соматических мутаций» был дополнен информацией о деаминировании нуклеотидов.
2. Был добавлен новый раздел «Особенности применяемых методик секвенирования».
3. Был упрощен раздел «Категоризация клинически значимых вариантов с целью выбора оптимальной терапии».

Основой для представленной работы послужили рекомендации и протоколы, разработанные в США, Европе и России [2,3]. Главной целью представленной работы является оптимизация процедуры по интерпретации клинически значимых вариантов при солидных опухолях с последующим выбором оптимальной терапии. В первую очередь рекомендации рассчитаны на онкологов, врачей клинической лабораторной диагностики, биологов клинической лабораторной диагностики, лабораторных генетиков.

Стремительно развивающиеся технологии массового параллельного секвенирования/NGS позволили выйти молекулярной диагностике онкологических заболеваний на новый уровень развития [4]. Методом NGS возможно осуществить одновременное прочтение сотен миллионов коротких последовательностей ДНК, что выгодно отличает его от ПЦР анализа и секвенирования по Сэнгеру [5]. Последующая биоинформатиче-

ская обработка данных NGS выявляет отличия в последовательности ДНК опухоли от референсной геномной последовательности. Такие отличия называются вариантами нуклеотидной последовательности или нуклеотидными вариантами. При этом нуклеотидные варианты могут быть либо герминальными (врожденные — патогенные, или полиморфизмы), либо соматическими мутациями, характерными для опухолевого процесса. Полиморфизмы часто встречаются в популяции (частота встречаемости > 1%) и являются одним из вариантов нормы. 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. На сегодня как соматические, так и герминальные варианты могут быть клинически значимыми для выбора тактики терапии.

ХАРАКТЕРИСТИКА МУТАЦИЙ

В данных рекомендациях под термином 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, а для их диагностики чаще

всего 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:

1. 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 изменениям в структуре белка.
2. инсерции (вставку) нуклеотида/нуклеотидов;
3. делеции (выпадение) нуклеотида.

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

1. 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.

2. Миссенс-мутации — наиболее частый вариант несинонимичных замен.
 3. 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.
 4. Нонсенс-мутации — один из вариантов несинонимичной замены, который способствует появлению стоп-кодона, на котором происходит преждевременный обрыв синтеза белка.
 5. 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:
1. Транслокации — фрагмент одной хромосомы встраивается в новое положение на другой хромосоме.
 2. Делеции — выпадение участка хромосомы.
 3. Дупликации — создаются дополнительные копии генов на хромосоме.
 4. 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.
 5. Изохромосомы — удвоение короткого либо длинного плеча хромосомы.
 6. Отдельной группой выделяют вариации числа копий (copy number variation, CNV) — явление при котором в геноме повто-

ряются 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 больших размеров прочтений 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:

1. полиплоидию — кратное увеличение гаплоидного набора хромосом;
2. анеуплоидию — некрatное 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 [14]:

1. на активирующие;
2. инактивирующие.

Активирующие (gain-of-function, CoF) 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.

ЗНАЧЕНИЕ ХАРАКТЕРИСТИК ОПУХОЛЕВОГО МАТЕРИАЛА ПРИ ИНТЕРПРЕТАЦИИ СОМАТИЧЕСКИХ МУТАЦИЙ

Материал для анализа соматических мутаций представляет собой зафиксированный формалином и заключённый в парафиновый блок (formalin fixed paraffin embedded, FFPE) 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.

При выявлении соматических мутаций следует учитывать комплексность процесса канцерогенеза, при котором в ткани присутствуют

популяции клеток с различными соматическими вариантами [16]. Также в связи с наличием в опухолевом материале не опухолевых клеток (сосудистая ткань, жировая, соединительная ткань), оптимальное содержание ядер опухолевых клеток в парафиновом блоке должно быть 35% и выше, допустимое от 20% до 35%, пригодность образцов с содержанием ниже 20% должна оцениваться индивидуально.

Кроме того, в результате долгой экспозиции образца в формалине (более 24 часов) происходит деаминирование нуклеотидов, что может приводить к замещению С:G>Т:А. Чтобы нивелировать такой эффект, рекомендуется добавлять фермент урацил-N-гликозилазу при обработке FFPE образцов.

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
MANE	https://www.ensembl.org/info/genome/genebuild/mane.html
RefSeq	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq
Ensembl	http://www.ensembl.org/index.html
LRG	https://www.lrg-sequence.org

- Для обозначения типа последовательности используются следующие сокращения в начале описания:
 - **"с."** для кодирующей ДНК (последовательность экзонов) (например, с.2369С > Т);
 - **"g."** для геномной ДНК (последовательность экзонов и интронов) (например, g.1295234А > G);
 - **"р."** для белковых последовательностей (например, р.Thr790Met);
 - **"г."** для РНК (например, г.76а > ц).
- Способ описания ДНК, РНК и белковых последовательностей также отличается:
 - для последовательности ДНК используют **заглавные буквы**, цифры указывают на первый измененный нуклеотид (например, с.34G > Т);
 - для последовательности РНК используют **строчные буквы**, цифры указывают на первый измененный нуклеотид (например, г.76а > ц);
 - для белковой последовательности используют **заглавные и строчные буквы**, цифры указывают на первую измененную аминокислоту (например, р.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_1087insGCGTGA);
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.

ОСОБЕННОСТИ ПРИМЕНЯЕМЫХ МЕТОДИК СЕКВЕНИРОВАНИЯ

Метод секвенирования следующего поколения включает в себя этап подготовки библиотек ДНК и этап проведения секвенирования полученных библиотек на приборе. Наиболее распространенными способами подготовки библиотек являются гибридизационные (Roche KAPA HyperCap, Agilent SureSelect, IDT xGen Hyb) и амплификационные методики (Thermo AmpliSeq, Pillar), каждая из которых имеет свои преимущества и недостатки.

Основным достоинством амплификационных методик считают их простоту, но для целей детекции соматических мутаций оказываются критичными такие недостатки как неравномерность покрытия и повышенная вероятность ложноположительных вариантов.

Для получения достоверных результатов с помощью метода NGS необходимо, чтобы целевые регионы были прочитаны без пропусков и количество прочтений было не ниже определенного порога как в среднем по образцу, так и в точках обнаруженных мутаций. Различия в характеристиках методик не позволяют выработать универсальные критерии качества, поэтому приведенные в таблице 2 значения следует рассматривать как рекомендательные.

Таблица 2. Ключевые показатели качества для детекции соматических мутаций с содержанием от 5% и выше.

Показатель	Гибридизационные методики	Амплификационные методики
Среднее покрытие, не менее	500x	1000x
Минимальное покрытие любого целевого региона	250x	250x
Минимальное количество прочтений с мутацией	14–15	14–15
Количество непокрытых нуклеотидов в панели	0	0

Несмотря на то, что метод NGS обладает гораздо более высокой чувствительностью по сравнению с методом секвенирования по Сэнгеру, следует с осторожностью интерпретировать варианты с содержанием мутантного аллеля менее 5% (показатель VAF, variant allele frequency — процент прочтений, приходящихся на конкретный аллельный вариант, косвенно отражает долю молекул ДНК с мутацией в исследуемом образце).

При анализе образцов с оптимальным процентом опухолевых ядер мутации с низким VAF (менее 10%), как правило, являются субклональными, что необходимо учитывать при оценке клинической значимости.

Без применения специальных лабораторных и биоинформационных подходов реальную чувствительность метода NGS следует оценивать не выше 5–10% (что близко к пределу обнаружения секвенирования по Сэнгеру), так как суммарные ошибки аппаратной платформы и используемого метода подготовки библиотек могут превышать 1%.

Чтобы детектировать соматическую мутацию с VAF 5% и вероятностью ложноположительного результата 0,1%, необходимо достигнуть покрытия 564x, а снижение порога до VAF 2% приводит к необходимости достижения покрытия 5276x, так как распределение вероятностей ложноположительных результатов подчиняется биномиальному закону.

С учетом этих закономерностей для обеспечения вероятности ложноположительных результатов анализа не выше 0,5% необходимо минимальное покрытие любого региона в панели не менее 250 x, количество содержащих альтернативный вариант прочтений не менее 12, а среднее покрытие должно составлять не менее 500 x для гибридационных методик и не менее 1000 x для амплификационных. Предел обнаружения при этом будет составлять 5%.

В некоторых обстоятельствах возможны отступления от рекомендованных значений (например, наблюдаемый VAF более 50%), но целесообразность должна быть обоснована исходя из количества и качества прочтений, также необходимо провести переоценку предела обнаружения с учетом VAF и покрытия.

В таблице 3 приведены ориентировочные значения показателей при разных уровнях покрытия и достигаемый предел обнаружения метода.

Таблица 3. Расчетные показатели качества при различных значениях покрытия для вероятности ложноположительных результатов не более 0,5%.

Покрытие региона	Предел обнаружения	Минимальное количество альтернативных прочтений
50 x -60 x	30%	20
100 x	20%	20
200 x	10%	20
500 x	5%	25

Важно отметить, что инструменты для поиска соматических нуклеотидных вариантов (например, Mutect2) имеют тенденцию к пропуску вариантов, присутствующих в популяционных базах данных (такие как R132C гена IDH1), поэтому представляется оправданным использование дополнительных программ анализа (Strelka2, DRAGEN), особенно для обнаружения герминальных вариантов, присутствующих в опухоли.

ЭТАПЫ ИНТЕРПРЕТАЦИИ КЛИНИЧЕСКОЙ ЗНАЧИМОСТИ НУКЛЕОТИДНЫХ ВАРИАНТОВ ПРИ СОЛИДНЫХ ОПУХОЛЯХ

Базы данных

Для того, чтобы оценить клиническую значимость выявленного нуклеотидного варианта, необходимо в первую очередь найти его в базах медицинских данных (табл. 4). 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://oncobrc.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 4. Базы данных для интерпретации нуклеотидных вариантов онкологических больных.

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

Рекомендации по интерпретации мутаций

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

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 таблице 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 Annovar, 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 стан-

дартного 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, так как единые стандарты диагностики отсутствуют, а контроль источников приведенных вариантов является слабым. Например, доброкачественный герминальный вариант NM_000222.2(KIT):c.1621A>C(p.M541L) был представлен в базе данных COSMIC как соматический.

Базы данных по герминальным мутациям

Зачастую 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://oncobrca.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. 5).

Таблица 5. Предсказательные программы для выявления соматических мутаций.

Назначение	Название	Ссылка
Прогнозирование изменения структуры белка	PolyPhen2	http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2
	SIFT	http://sift.jcvi.org
	MutationAssessor	http://mutationassessor.org
	MutationTaster	http://www.mutationtaster.org
	PROVEAN	http://provean.jcvi.org/index.php
	Condel	http://bg.upf.edu/blog/2012/12/condel-for-prioritization-of-variants-involved-in-hereditary-diseases-and-transfcr-for-cancer
	CoVEC	https://sourceforge.net/projects/covec
	CADD	http://cadd.gs.washington.edu
	GERP++	http://mendel.stanford.edu/sidowlab/downloads/gerp/index.html
Прогнозирование изменения сплайсинга транскрипта	PhyloP and PhastCons	http://compugen.bscb.cornell.edu/phast
	Human Splicing Finder	http://www.umd.be/HSF3
	MaxEntScan	http://genes.mit.edu/burgelab/maxent/Xmaxentscan_scoreseq.html
	NetGene2	http://www.cbs.dtu.dk/services/NetGene2
	NNSplice	http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html
	GeneSplicer	http://www.cbcu.umd.edu/software/GeneSplicer/gene_spl.shtml

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 одних 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 изначальной 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.

Если необходимо различать герминальные и соматические варианты между собой, то единственным надежным способом будет 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 клинические лаборатории использовали геномные координаты для хранения данных во избежание разночтений при выравнивании.

КАТЕГОРИЗАЦИЯ КЛИНИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫХ ВАРИАНТОВ С ЦЕЛЬЮ ВЫБОРА ОПТИМАЛЬНОЙ ТЕРАПИИ

В отличие от интерпретации только герминальных вариантов, которая направлена в первую очередь на диагностику наследственных онкологических синдромов, целью интерпретации вариантов, которые могут влиять на лечебную тактику, является в первую очередь определение их терапевтического значения. При этом этиология клинического значимого варианта может быть различной — как герминальной, так и соматической.

Нуклеотидный вариант может считаться клинически значимым вариантом, если он:

- ассоциирован с чувствительностью, или 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 установлении онкологического диагноза.

Предлагается сгруппировать биомаркеры по пяти уровням в зависимости от их доказательной базы и терапевтического эффекта (табл. 6).

1. Биомаркеры уровня А позволяют предсказать чувствительность или резистентность к препаратам, одобренным отечественным национальным регулятором (Минздрав РФ) для терапии определенного типа злокачественных новообразований. Такие биомаркеры так же включены в отечественные профессиональные онкологические руководства и рекомендации (RUSSCO и АОР) в качестве терапевтических, или диагностических 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 (рекомендованы экспертами Российского общества клинической онкологии (RUSSCO) и/или Ассоциации онкологов России (АОР), и могут находиться на стадии включения в рубрику рекомендаций МЗ РФ).
3. Биомаркеры уровня С позволяют предсказать чувствительность или резистентность к препаратам одобренными только зарубежными национальными регуляторами (FDA и др) и/или включенными в зарубежные профессиональные онкологические руководства и рекомендации (NCCN, ESMO, ASCO и др) в качестве терапевтических или диагностических биомаркеров для терапии определенного типа злокачественных новообразований.
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 только на основании исследований.

5. Биомаркеры уровня E имеют вероятную терапевтическую значимость на основании доклинических испытаний. Такие биомаркеры могут служить в качестве диагностических/прогностических мишеней как самостоятельно, так и в совокупности с другими биомаркерами на основании небольших исследований с малыми выборками или описаний клинических случаев.

Таблица 6. Категории биомаркеров на основании их доказательной базы и терапевтического эффекта.

Уровень	Определение	Доказательная база и клиническая значимость
Уровень А	Биомаркеры с терапевтической значимостью, включенные в профессиональные руководства для терапии определенного типа онкологии	Одобрены отечественным национальным регулятором (МЗ РФ) и включены в отечественные профессиональные руководства (RUSSCO и AOP) для терапии данных типов злокачественных новообразований.
Уровень В	Биомаркеры с терапевтической значимостью, выявленные на основании масштабных исследований и согласия экспертов	Выявлены на основании масштабных исследований и согласия отечественных экспертов (RUSSCO и AOP) для определенных типов злокачественных новообразований.
Уровень С	и согласия экспертов в данной области	Выявлены на основании масштабных исследований и согласия зарубежных экспертов в данной области (NCCN, ESMO, ASCO и др) и /или зарубежных национальных регуляторов (FDA и др). для терапии определенных типов злокачественных новообразований.

Уровень	Определение	Доказательная база и клиническая значимость
Уровень D	Биомаркеры с терапевтической значимостью, выявленные на основании исследований; или рекомендованы по другим показаниям или для терапии других типов злокачественных новообразований (с иным морфологическим диагнозом).	Одобрены национальными регуляторами (как отечественными, так и зарубежными) и включены в профессиональные руководства (как отечественные, так и зарубежные) 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

Важно помнить, что молекулярная онкология — постоянно развивающаяся ветвь 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 испытаний будут рекомендованы отечественными профессиональными сообществами (RUSSCO и АОР). 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 выделять четыре класса (табл. 7).

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, могут являться пассажирскими соматическими вариантами или 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 III не представляют собой клинической значимости для терапии злокачественных новообразований. Такие варианты не должны присутствовать в лабораторном заключении, 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 возможности согласования с клиническим онкологом такого варианта отсутствует — в лабораторном заключении данных вариант 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 7. Категоризация соматических вариантов по клинической значимости.*

<p>Класс I</p> <p>Сильная клиническая значимость</p> <p>Биомаркер уровня А</p> <p>Биомаркер уровня В</p> <p>Биомаркер уровня С</p>	<p>Класс II</p> <p>Потенциальная клиническая значимость</p> <p>Биомаркер уровня D</p> <p>Биомаркер уровня E</p>	<p>Класс III</p> <p>Неустановленная клиническая значимость</p>	<p>Класс IV</p> <p>Доброкачественные варианты или вероятно доброкачественные варианты</p>
<p>Активирующие мутации. Мутации, приводящие к потере функции белка: миссенс, нонсенс, инсерции/делеции, Сплайс-сайт мутации, хромосомные перестройки</p>	<p>Активирующие мутации. Мутации, приводящие к потере функции белка: миссенс, нонсенс, инсерции/делеции, Сплайс-сайт мутации, хромосомные перестройки</p>	<p>Мутации с неустановленным влиянием на функции белка: в основном миссенс мутации</p>	<p>Мутации с несущественным или неясным влиянием на функции белка: в основном миссенс мутации</p>

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

Примеры вариантов

КЛАСС I

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

1. Варианты с терапевтической значимостью уровня А

Примером таких вариантов служат герминальные патогенные варианты в генах BRCA1/2, при Her2 отрицательном статусе РМЖ. Рекомендован национальным регулятором (МЗ РФ) и отечественными экспертами (RUSSCO и АОР).

2. Варианты с терапевтической значимостью уровня С

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 (≤ 10 мутаций/Mb), среднюю (10–20 мутаций/Mb) и высокую (≥ 20 мутаций/Mb) мутационную нагрузку. Пациенты с высоким значением TMB имеют хороший ответ на ингибиторы контрольных точек иммунитета [17,18].

КЛАСС II

Варианты этой группы включают соматические мутации и герминальные варианты с неопределенной 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/метастатическим НМРЛ в генах STK11, KEAP1 и KRAS. Результаты исследований показывают, что больные НМРЛ с разной эффективностью отвечают на иммунотерапию [19].

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 солидной онкологии), MRD представляет собой оставшиеся

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 [20].

КЛАСС III

Большинство вариантов в генах, не связанных с развитием онкологии, относятся к классу III. Для классификации вариантов в генах, связанных с онкологией, 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 опухолевой ткани при выборе тактики последующей терапии в некоторых случаях возможно 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 неопухолевую ткань (либо венозную кровь).

В случаях, когда контроль неопухолевой ткани 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%.

Клинические показатели также важны в установлении природы мутации. Важно проанализировать следующую информацию:

- возраст манифестации — ранний возраст ассоциирован с наследственными онкологическими синдромами;
- латеральность опухоли — билатеральные опухоли вероятнее имеют наследственную природу;
- отягощенный семейный онкологический анамнез — наличие такового 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. 8).

Таблица 8. Базы данных по герминальным мутациям.

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

Рекомендуется включать в отчет выявленные патогенные герминальные мутации с выраженным клиническим эффектом. Например, пациенты с клинически значимыми вариантами в генах гомологичной рекомбинации (homologous recombination repair, HRR) определяют чувствительность к ингибиторам PARP-полимеразы [21]. В случае обнаружения герминальных патогенных мутаций, имеющих установленные рекомендации для назначения терапии, их также необходимо включить в отчет.

ТРЕБОВАНИЯ К ПРЕДОСТАВЛЕНИЮ РЕЗУЛЬТАТОВ, ПОЛУЧЕННЫХ МЕТОДОМ СЕКВЕНИРОВАНИЯ СЛЕДУЮЩЕГО ПОКОЛЕНИЯ С ЦЕЛЬЮ ВЫБОРА ТАКТИКИ ТЕРАПИИ

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.

В краткие гистологические сведения об анализируемом материале также рекомендуется включать в отчет и номер гистологического блока, с которого проводилось исследование.

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;
- 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 и версию геномной сборки;
- генная область (экзон, интрон, нетранслируемая область);
- референсный транскрипт;
- номенклатура варианта по стандартам HGVS;
- традиционное название, если имеется;
- генотип и VAF;
- 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).

В случае анализа парного образца на герминальные патогенные мутации, рекомендуется делать отдельный отчет. Если такой образец отсутствует, герминальные патогенные и соматические мутации указываются в одном отчете с примечанием, что данный NGS анализ не позволяет однозначно дифференцировать герминальные и соматические варианты.

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 к непредсказуемым и неблагоприятным итогам дальнейшей лечебной тактики.

Пример заключения

Реквизиты
и контактные данные
Вашей организации
Лаборатория эпитомики

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



ПАЦИЕНТ		ОБРАЗЕЦ	
№ амб. карты	123/456	Лабораторный №	9876543210
Диагноз	НМРЛ	Номер гистологического блока	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	chr12:25398285С>А NM_033360.3 с.34С>Т 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, ROS1, BRAF, NTRK 1,2,3, RET, MET, BRAF, KIT, KRAS, NRAS, HER2, PIK3CA*.

Биоинформационный анализ выполнялся следующим образом:

СТАТИСТИКА СЕКВИРОВАНИЯ

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	312x	Процент покрытия $\geq 50\times$	97%

Список литературы

- ¹ Руководство по интерпретации клинически значимых соматических мутаций при солидных опухолях, выявленных методом секвенирования следующего поколения (NGS), с целью их клинического использования. Р. 25.
- ² Рыжкова О.П. et al. Руководство по интерпретации данных последовательности ДНК человека, полученных методами массового параллельного секвенирования (MPS) (редакция 2018, версия 2) [Electronic resource] : Text.Serial.Journal 2 // Медицинская генетика. 2019. Vol. 18, № 2. P. 3–23–23. URL : <https://www.medgen-journal.ru/jour/article/view/642> (accessed : 13.09.2020).
- ³ Li M.M. et al. Standards and Guidelines for the Interpretation and Reporting of Sequence Variants in Cancer// J.Mol. Diagn. JMD. 2017. Vol. 19, №1. P. 4–23.
- ⁴ Gagan J., Van Allen E.M. Next-generation sequencing to guide cancer therapy // Genome Med. 2015. Vol. 7, № 1. P. 80.
- ⁵ Ребриков Д.В. et al. NGS: высокопроизводительное секвенирование. 2014.
- ⁶ Karki R. et al. Defining "mutation" and "polymorphism" in the era of personal genomics// BMC Med. Genomics. 2015. Vol. 8.
- ⁷ Griffiths A.J. et al. Somatic versus germinal mutation// Introd. Genet. Anal. 7th Ed.W. H. Freeman, 2000.
- ⁸ Akdemir K.C. et al. Somatic mutation distributions in cancer genomes vary with three-dimensional chromatin structure// Nat. Genet. Nature Publishing Group, 2020. P. 1–11.
- ⁹ Eyre-Walker A., Keightley P.D. The distribution of fitness effects of new mutations : 8 // Nat.Rev. Genet. Nature Publishing Group, 2007. Vol. 8, № 8. P. 610–618.
- ¹⁰ Loewe L., Charlesworth B. Inferring the distribution of mutational effects on fitness in Drosophila// Biol. Lett. 2006. Vol. 2, № 3. P. 426–430.
- ¹¹ Albertson D.G. et al. Chromosome aberrations in solid tumors // Nat. Genet. 2003. Vol. 34, № 4. P. 369–376.
- ¹² Gerstein A.C. Mutational effects depend on ploidy level : all else is not equal// Biol. Lett. 2013. Vol. 9, № 1.
- ¹³ Stratton M.R., Campbell P.J., Futreal P.A. The cancer genome // Nature. 2009. Vol. 458, № 7239. P. 719–724.
- ¹⁴ Aldred M.A., Trembath R.C. Activating and inactivating mutations in the human GNAS1 gene// Hum. Mutat. 2000. Vol. 16, № 3. P. 183–189.
- ¹⁵ Kokkat T.J. et al. Archived Formalin-Fixed Paraffin-Embedded (FFPE) Blocks: A Valuable Underexploited Resource for Extraction of DNA, RNA, and Protein // Biopreservation Bioscience. 2013. Vol. 11, № 2. P. 101–106.
- ¹⁶ Dagogo-Jack I., Shaw A.T. Tumour heterogeneity and resistance to cancer therapies : 2// N at.Rev. Clin. Oncol. Nature Publishing Group, 2018. Vol. 15, № 2. P. 81–94.
- ¹⁷ Fumet J.–D. et al. Tumour mutational burden as a biomarker for immunotherapy: Current data and emerging concepts// Eur. J. Cancer. 2020. Vol. 131. P. 40–50.

¹⁸ Research C. for D. E. and. FDA approves pembrolizumab for adults and children with TMB-H solid tumors // FDA. FDA, 2020.

¹⁹ Johnson M.L. et al. Durvalumab With or Without Tremelimumab in Combination With Chemotherapy as First-Line Therapy for Metastatic Non-Small-Cell Lung Cancer: The Phase III POSEIDON Study // J. Clin. Oncol. Wolters Kluwer, 2022. P. JCO. 22.00975.

²⁰ 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): Clinical trial registration NCT04385368. clinicaltrials. gov, 2020.

²¹ Kaufman B. et al. Olaparib Monotherapy in Patients With Advanced Cancer and a Germline BRCA1/ 2 Mutation // J. Clin. Oncol. 2015. Vol. 33, № 3. P. 244–250.

²² Ballinger M.L., Mitchell G., Thomas D.M. Surveillance recommendations for patients with germline TP53 mutations // Curr. Opin. Oncol. 2015. Vol. 27, № 4. P. 332–337.

²³ Daly M.B. et al. NCCN Guidelines Insights : Genetic/ Familial High-Risk Assessment : Breast, Ovarian, and Pancreatic, Version 1.2020 // J. Natl. Compr. Cancer Netw. JNCCN. 2020. Vol. 18, № 4. P. 380–391.



malignanttumors.org