

Для цитирования: Телышева Е.Н., Шайхаев Е.Г., Снигирева Г.П. Мутационный профиль *KRAS*-позитивного колоректального рака. Сибирский онкологический журнал. 2022; 21(1): 47–56. – doi: 10.21294/1814-4861-2022-21-1-47-56
For citation: Telysheva E.N., Shaikhaev E.G., Snigireva G.P. Mutational profile of *KRAS*-positive colorectal cancer. Siberian Journal of Oncology. 2022; 21(1): 47–56. – doi: 10.21294/1814-4861-2022-21-1-47-56

МУТАЦИОННЫЙ ПРОФИЛЬ *KRAS*-ПОЗИТИВНОГО КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА

Е.Н. Телышева, Е.Г. Шайхаев, Г.П. Снигирева

ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр нейрохирургии им. академика Н.Н. Бурденко» Минздрава России, г. Москва, Россия
Россия, 125047, г. Москва, 4-я Тверская-Ямская ул., 16

Аннотация

Цель исследования – изучение особенностей молекулярно-генетического профиля *KRAS*-позитивного колоректального рака (КРР). **Материал и методы.** В исследование было включено 42 пациента с диагнозом колоректальный рак, в опухолевой ткани которых методом ПЦР в режиме «реального времени» выявлена мутация в гене *KRAS*. С помощью технологии секвенирования нового поколения (NGS) на платформе Illumina были проанализированы гены, участвующие в молекулярном патогенезе КРР: *KRAS*, *BRAF*, *NRAS*, *APC*, *TP53*, *SMAD2*, *SMAD4*, *FBXW7*, *PIK3CA*, *CTNNB1*, *TCF7L2*, *MLH1*, *MSH2*, *MSH3*, *MSH6*, *ATM*, *TGF- β 2*, *AKT1*, *CDC27*, *CASP8*, *MAP2K4*, *DCC*, *DMD*, *MAP7*, *ERBB2*, *P3H3*, *MIER3*, *CADM1*, *FLT4*, *PTPN12*, *PIK3R1*, *EP300*. Пробоподготовку библиотек из выделенной ДНК проводили с использованием коммерческих наборов GeneRead DNASeq Targeted Panel v2 Human Colorectal Cancer («Qiagen», США); NEBNext Ultra DNA library Prep kit for Illumina и NEBNext Multiplex Oligos for Illumina («New England BioLabs»). **Результаты.** У 36 пациентов с *KRAS*-позитивным КРР зарегистрированы изменения в 13 генах, участвующих в молекулярном патогенезе заболевания. Всего было выявлено 82 соматические мутации. При этом у 9 больных дополнительно выявлено по одной мутации, у 17 – по 2 мутации, у 7 – по 3 мутации и у 3 – по 4 мутации. Сочетание сразу трех мутаций в ключевых генах, отвечающих за патогенез КРР (*KRAS*, *APC* и *TP53*), было выявлено у 15 (36 %) больных. Сочетание двух мутаций в генах *KRAS* и *APC* выявлено у 10 (24 %) больных, в генах *KRAS* и *TP53* – у 8 (19 %) больных. Самое большое количество соматических мутаций выявлено в генах *APC* (59,5 %) и *TP53* (54,7 %). Показано, что сочетание трех мутаций в ключевых генах (*KRAS*, *APC* и *TP53*) является наиболее неблагоприятным фактором прогноза и может свидетельствовать о более высокой агрессивности опухолевого процесса. **Заключение.** Полученная с помощью метода NGS информация о мутационном статусе *KRAS*-позитивной опухоли пациентов с КРР позволяет с учетом клинических характеристик персонифицировать тактику лечения, а также прогнозировать его течение.

Ключевые слова: колоректальный рак, соматические мутации, секвенирование нового поколения (NGS), таргетная терапия.

MUTATIONAL PROFILE OF *KRAS*-POSITIVE COLORECTAL CANCER

E.N. Telysheva, E.G. Shaikhaev, G.P. Snigireva

N.N. Burdenko National Medical Research Center of Neurosurgery of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia
16, 4th Tverskaya-Yamskaya St., 125047, Moscow, Russia

Abstract

Aim: to study the features of the molecular genetic profile of *KRAS*-positive colorectal cancer (CRC). **Material and Methods.** The study included 42 patients diagnosed with colorectal cancer. The *KRAS* gene mutation was detected in tumor tissue of these patients by real-time PCR. Using the next generation sequencing technology

(NGS) on the Illumina platform, the genes involved in the molecular pathogenesis of colorectal cancer, namely *KRAS*, *BRAF*, *NRAS*, *APC*, *TP53*, *SMAD2*, *SMAD4*, *FBXW7*, *PIK3CA*, *CTNNB1*, *TCF7L2*, *MLH1*, *MSH2*, *MSH3*, *MSH6*, *ATM*, *TGF- β 2*, *AKT1*, *CDC27*, *CASP8*, *MAP2K4*, *DCC*, *DMD*, *MAP7*, *ERBB2*, *P3H3*, *MIER3*, *CADM1*, *FLT4*, *PTPN12*, *PIK3R1*, and *EP300* were analyzed. Sample preparation of libraries from isolated DNA was carried out using commercial kits GeneRead DNASeq Targeted Panel v2 Human Colorectal Cancer (Qiagen, USA); NEBNext Ultra DNA library Prep kit for Illumina and NEBNext Multiplex Oligos for Illumina (New England Biolabs). **Results.** In 36 patients with *KRAS*-positive tumors, changes were observed in 13 genes involved in the molecular pathogenesis of colorectal cancer. A total of 82 somatic variants were identified. Moreover, 9 patients additionally had one mutation each, 17 patients had 2 mutations each, 7 patients had 3 mutations each, and 3 patients had 4 mutations each. Combination of three mutations in key genes involved in the pathogenesis of colorectal cancer (*KRAS*, *APC* и *TP53*) was detected in 15 (36 %) patients. Combination of two mutations in the *KRAS* and *APC* genes was detected in 10 (23.8 %) patients, and in the *KRAS* and *TP53* genes – in 8 (19.1 %) patients. The largest number of somatic mutations was found in the *APC* (59.5 %) and *TP53* (54.7 %) genes. It was shown that a combination of three mutations in key genes was the most unfavorable prognosis factor and indicated a higher aggressiveness of the tumor process. **Conclusion.** The information obtained using the NGS method on the mutational status of a *KRAS*-positive tumor in patients with colorectal cancer allows for personalized treatment as well as predicting the outcome.

Key words: colorectal cancer, somatic mutations, next generation sequencing (NGS), targeted therapy.

Введение

Колоректальный рак (КРР), по данным ВОЗ, занимает третье место в структуре онкологических заболеваний, являясь одной из наиболее частых причин смерти [1, 2]. Отмечается неуклонный рост заболеваемости КРР, которая в ближайшем десятилетии может значительно возрасти, в том числе и среди молодых людей [3, 4]. Повысить эффективность лечения и улучшить показатели выживаемости при КРР позволяет внедрение новых высокотехнологичных методов лечения, включая таргетную терапию.

В основе патогенеза КРР лежит взаимодействие экологических и генетических факторов. Известно большое количество молекулярно-генетических маркеров, которые участвуют в развитии КРР, определяя клиническую картину заболевания [5]. Пациенты со схожими гистологическими типами опухоли часто имеют различные прогностические перспективы, что может быть связано с молекулярно-генетическими особенностями опухоли, лежащими в основе канцерогенеза [5, 6]. Информация о молекулярном разнообразии опухоли при КРР помогает не только совершенствовать диагностику, но и разрабатывать новые подходы к эффективной персонифицированной терапии [7].

В настоящее время лишь несколько генетических маркеров, участвующих в процессах малигнизации и опухолевой прогрессии, нашли применение в клинической практике. Основные рекомендации по лечению пациентов с КРР предполагают определение мутационного статуса генов семейства *RAS* и гена *BRAF*. Мутации, выявляемые в генах семейства *RAS*, являются валидированными показателями резистентности к анти-*EGFR*-таргетной терапии. Что касается мутаций в гене *BRAF*, то имеющиеся в литературе данные не однозначны и в основном свидетельствуют об очень ограниченной пользе ингибиторов *EGFR* при лечении КРР [8]. Несмотря на тестирование мута-

ционного статуса генов семейства *RAS*, число чувствительных к таргетной терапии пациентов пока невелико. Примерно в 35–40 % случаев при КРР выявляются активирующие мутации в гене *KRAS*, которые не позволяют назначать анти-*EGFR*-таргетную терапию [9]. Кроме того, эффективность анти-*EGFR*-таргетной терапии у пациентов с диким типом гена *KRAS* часто снижается из-за развития вторичной резистентности в процессе лечения. Неудивительно, что предметом все возрастающего числа исследований является поиск новых мишеней для лечения КРР [8, 10–13].

Благодаря применению нового высокоточного метода секвенирования нового поколения (NGS) были выявлены многочисленные молекулярно-генетические изменения (мутации, транслокации и амплификации), которые лежат в основе развития КРР и определяют высокую пластичность и устойчивость клеток опухоли к лекарственным препаратам и лучевой терапии. До недавнего времени персонифицированная медицина, основанная на индивидуальном секвенировании генома, была дорогостоящей и трудоемкой. Постоянное усовершенствование технологии NGS, ее активное внедрение в практическую медицину, благодаря реальной возможности проведения анализа десятков и сотен генов в одном исследовании, позволяют зачастую заменить ряд рутинных молекулярно-генетических методов, в частности метод полимеразной цепной реакции и метод секвенирования по Сенгеру.

Целью исследования явилось изучение особенностей молекулярно-генетического профиля *KRAS*-позитивного КРР.

Материал и методы

В исследование были включены 42 пациента в возрасте от 48 до 86 лет (средний возраст – 67,7 ± 8,8 года) с диагнозом колоректальный рак, из них 17 женщин и 25 мужчин. У 27 больных опухоль

располагалась в ободочной кишке, у 15 – в прямой кишке. Диагноз верифицирован инструментально и морфологически. Гистологическую классификацию опухоли и стадирование заболевания проводили согласно системе TNM (7 издание, 2010). Распределение по стадиям заболевания: I стадия – 11, II – 9, III – 10, IV – 12 пациентов. Во всех случаях была аденокарцинома различной степени дифференцировки: низкодифференцированная – 3, умереннодифференцированная – 24, высокодифференцированная – 15. Все пациенты проходили хирургическое лечение в Российском научном центре рентгенорадиологии МЗ РФ в период с 2014 по 2019 г. Неoadъювантное лечение не проводилось. У всех пациентов в опухолевой ткани, полученной после операции, методом ПЦР в режиме «реального времени» были выявлены мутации в гене *KRAS*. Представленная работа одобрена этическим комитетом Российского научного центра рентгенорадиологии МЗ РФ (протокол № 3, от 17 марта 2014 г.). Все пациенты подписали письменное информированное согласие на участие в исследовании.

ДНК выделяли из операционного материала, хранящегося в формалин-фиксированных парафиновых блоках (FFPE) и содержащего не менее 60 % опухолевых клеток. Для выделения ДНК использовали коммерческие наборы DNA FFPE kit («Qiagen», США). Концентрацию ДНК измеряли флуоресцентным методом с использованием наборов Qubit dsDNA HS Assay kit («Invitrogen») на приборе Qubit («Invitrogen»). Концентрация двухцепочечной ДНК каждого образца составляла не менее 5 нг/мкл. Качество ДНК перед пробоподготовкой библиотек оценивали методом ПЦР в режиме «реального времени» с использованием наборов GeneRead DNA QuantiMize («Qiagen», США) на приборе 7500 real-time PCR systems («Applied Biosystems», США) с последующей обработкой полученных данных с помощью программного обеспечения GeneRead DNA QuantiMize 96 DataAnalysis.

Пробоподготовку библиотек из выделенной ДНК для последующего анализа методом NGS проводили с использованием коммерческих наборов GeneRead DNASeq Targeted Panel v2 Human Colorectal Cancer («Qiagen», США); NEBNext Ultra DNA library Prep kit for Illumina и NEBNext Multiplex Oligos for Illumina («New England BioLabs») в соответствии с рекомендациями производителя. Таргетная панель «GeneRead DNASeq Targeted Panel v2 Human Colorectal Cancer» включала следующие гены, участвующие в молекулярном патогенезе КРР: *KRAS*, *BRAF*, *NRAS*, *APC*, *TP53*, *SMAD2*, *SMAD4*, *FBXW7*, *PIK3CA*, *CTNNB1*, *TCF7L2*, *MLH1*, *MSH2*, *MSH3*, *MSH6*, *ATM*, *TGFBR2*, *AKT1*, *CDC27*, *CASP8*, *MAP2K4*, *DCC*, *DMD*, *MAP7*, *ERBB2*, *P3H3*, *MIER3*, *CADMI*, *FLT4*, *PTPN12*, *PIK3R1*, *EP300*.

Готовые библиотеки ДНК разводили до концентрации 4 нМ, смешивали в эквимольных количествах и затем подвергали кластеризации с использованием стандартной проточной ячейки. Секвенирование осуществляли на платформе MiSeq (Illumina, США) с использованием набора реагентов MiSeq v2 (300 циклов).

Биоинформатический анализ данных – получение VCF файлов (variant call format) из файлов формата FASTQ – проводили с использованием программного обеспечения MiSeq Reporter (Illumina, США), которое позволяло картировать и выравнивать отсеквенированные таргетные последовательности на референсную последовательность генома человека (GRCH37/hg19).

Для аннотирования и интерпретации генетических вариантов использовали программное обеспечение Variant Studio 2.0 (Illumina), которое работает с VCF файлами. Для исключения артефактных и некачественных нуклеотидных вариантов были установлены следующие параметры фильтрации: глубина прочтения составляла не менее $\times 100$, глубина прочтения альтернативного варианта – не менее $\times 10$. Для исследования выбраны генетические варианты, соответствующие параметрам фильтрации. Все соматические мутации, найденные в образцах ДНК ткани опухоли, были подтверждены методом прямого секвенирования по Сенгеру.

Генетические варианты были аннотированы и интерпретированы с использованием базы данных однонуклеотидных полиморфизмов (dbSNP), баз данных COSMIC, cBioPortal и других. Для визуализации генетических вариантов применяли программу IGV (Integrative Genomics Viewer), в которой прочитанные таргетные участки ДНК выравниваются на референсный геном человека (GRCH37/hg19).

Результаты

Помимо мутаций в гене *KRAS*, которые предварительно были выявлены методом ПЦР в режиме «реального времени» у всех 42 обследованных пациентов, изменения в других генах обнаружены у 36 человек. Всего было выявлено 82 соматические мутации в 13 генах (табл. 1).

В генах *NRAS*, *BRAF*, *MLH1*, *MSH2*, *MSH3*, *MSH6*, *TGFBR2*, *MAP2K4*, *AKT1*, *CDC27*, *CASP8*, *ERBB2*, *P3H3*, *CADMI*, *MIER3*, *EP300*, *PTPN12*, *FLT4* соматические мутации не были обнаружены ни у одного обследованного пациента. Самое большое количество соматических мутаций было выявлено в генах *APC* – у 25 (59,5 %) и *TP53* – у 23 (54,7 %) пациентов.

Мутации в гене *APC* выявлены у 25 человек, при этом около 70 % всех изменений, обнаруженных в гене *APC*, являются нонсенс-мутациями, приводящими к образованию преждевременно-го стоп-кодона и в дальнейшем к образованию укороченного белка (табл. 2). Реже встретились

Таблица 1/Table 1

Спектр и частота мутаций, выявленных в обследованной группе больных
Spectrum and frequency of mutations detected in the examined group of patients

Ген/Gene	Число мутаций/ Number of mutations	Число пациентов с мутациями/ Number of patients with mutations
<i>APC</i>	29 (35,4 %)	25 (59,5 %)
<i>TP53</i>	23 (28,0 %)	23 (54,7 %)
<i>FBXW7</i>	8 (9,8 %)	7 (16,7 %)
<i>SMAD4</i>	3 (3,7 %)	3 (7,1 %)
<i>SMAD2</i>	3 (3,7 %)	3 (7,1 %)
<i>ATM</i>	3 (3,7 %)	2 (4,8 %)
<i>PIK3CA</i>	3 (3,7 %)	3 (7,1 %)
<i>DMD</i>	3 (3,7 %)	3 (7,1 %)
<i>CTNNB1</i>	2 (2,4 %)	2 (4,8 %)
<i>TCF7L2</i>	2 (2,4 %)	2 (4,8 %)
<i>DCC</i>	1 (1,2 %)	1 (2,4 %)
<i>MAP7</i>	1 (1,2 %)	1 (2,4 %)
<i>PIK3R1</i>	1 (1,2 %)	1 (2,2 %)

изменения, представленные инделами со сдвигом рамки считывания: в 5 образцах ДНК опухолевой ткани обнаружены делеции со сдвигом рамки считывания, в 2 образцах – инсерции со сдвигом рамки считывания. В одном образце ДНК выявлена миссенс-мутация. Все выявленные мутации, за исключением 4 вариантов, представлены в базах данных по мутациям как «вероятно патогенные» или «патогенные». Четыре мутации – p.Q1204*, p.Q1291*, p.K1310RfsTer11 и p.E1353* – были выявлены впервые, и в базах данных по мутациям не описаны. Следует отметить, что у 4 больных обнаружены по 2 мутации в гене *APC*.

Мутации в гене *TP53* выявлены у 23 человек и в основном представлены миссенс-мутациями, приводящими к замене аминокислоты в белке (табл. 3). В двух случаях обнаружены редкие для гена *TP53* мутации: инсерция со сдвигом рамки считывания – p.V147GfsTer25 и нонсенс-мутация – p.R342*, приводящая к образованию преждевременного стоп-кодона в белковом продукте. Большая часть найденных мутаций, за исключением 3 вариантов – p.V147GfsTer25, p.R213* и p.R342*, – находится в так называемых «горячих точках» – наиболее часто мутирующих областях гена *TP53*. Мутация p.V147GfsTer25 выявлена впервые и не описана в базах данных. Все остальные мутации представлены в базах данных как «вероятно патогенные» или «патогенные».

В остальных генах обнаружено значительно меньше изменений. В гене *FBXW7* – у 7 пациентов, причем у одного из них были выявлены 2 мутации. По три мутации было выявлено в генах *SMAD4*, *SMAD2*, *ATM*, *DMD* и *PIK3CA*, по 2 мутации – в генах *CTNNB1*, *TCF7L2* и по одной мутации – в генах *DCC*, *MAP7* и *PIK3R1*. У одного обследованного пациента было обнаружено 2 мутации в гене *ATM* (табл. 4).

Мутации в других генах, участвующих в патогенезе КРР, выявлены у 36 человек. При этом в 9 случаях дополнительно было выявлено по одной мутации, в 17 случаях – по 2 мутации, в 7 – по 3 мутации, в 3 случаях – по 4 мутации. Сочетание трех мутаций в ключевых генах *KRAS*, *APC* и *TP53* выявлено у 15 (36 %) больных. Сочетание двух мутаций – в генах *KRAS* и *APC* – у 10 (24 %), а в генах *KRAS* и *TP53* – у 8 (19 %) больных.

Обсуждение

Колоректальный рак представляет собой гетерогенную группу опухолей, отличающихся по молекулярно-генетическим характеристикам. Поэтому при назначении лечения больным КРР очень важно учитывать не только клинические факторы и функциональный статус пациента, но и молекулярный профиль опухоли. Известно, что примерно в 50–80 % случаев при КРР в опухоли наблюдается гиперэкспрессия гена *EGFR*, которая приводит к активному росту и делению клеток вследствие активации сигнального пути *EGFR-RAS-RAF-MEK-MAPK* [14]. При лечении КРР с диким типом гена *KRAS* применяют моноклональные антитела, способные блокировать рецептор *EGFR*. Однако мутации в гене *KRAS*, которые встречаются достаточно часто, делают такую блокировку рецептора *EGFR* бесполезной, а лечение неэффективным. Накопление данных о мутационном профиле опухоли и определение их связи с клинико-патологическими характеристиками помогают получить важную информацию о патогенезе заболевания, а также позволяют вести поиск новых возможностей для лечения КРР. Метод секвенирования нового поколения позволяет одновременно проанализировать большое количество генов и гораздо большие области, что обеспечивает высокую чувствительность данного

Таблица 2/Table 2

Характеристика мутаций, выявленных в гене APC
Characterization of mutations identified in the APC gene

Экзон/ Exon	Нуклеотидный вариант/ Nucleotide variant	Белковый вариант/ Protein variant	Тип мутации/ Type of mutation	База/Database COSMIC/cBioPortal	База/ DatabasedbSNP
6	p.R213*	c.637C > T	Нонсенс/ Nonsense	Вероятно патогенная/ Probably pathogenic	Данные отсутствуют/ No data
7	p.R216*	c.646C > T	Нонсенс/ Nonsense	Вероятно патогенная/ Probably pathogenic	Патогенная/ Pathogenic
11	p.S457*	c.1370C > A	Нонсенс/ Nonsense	Вероятно патогенная/ Probably pathogenic	Данные отсутствуют/ No data
14	p.R564*	c.1690C > T	Нонсенс/ Nonsense	Вероятно патогенная/ Probably pathogenic	Патогенная/ Pathogenic
16	p.R1114*	c.3340C > T	Нонсенс/ Nonsense	Вероятно патогенная/ Probably pathogenic	Патогенная/ Pathogenic
16	p.Q1204*	c.3610C > T	Нонсенс/ Nonsense	Данные отсутствуют/ No data	Данные отсутствуют/ No data
16	p.Q1291*	c.3871C > T	Нонсенс/ Nonsense	Данные отсутствуют/ No data	Данные отсутствуют/ No data
16	p.Q1294*	c.3880C > T	Нонсенс/ Nonsense	Вероятно патогенная/ Probably pathogenic	Данные отсутствуют/ No data
16	p.Q1303*	c.3907C > T	Нонсенс/ Nonsense	Вероятно патогенная/ Probably pathogenic	Данные отсутствуют/ No data
16	p.K1310RfsTer11	c.3926delA	Делеция со сдвигом рамки считывания/ Frameshift deletion	Данные отсутствуют/ No data	Данные отсутствуют/ No data
16	p.G1312EfsTer9	c.3934delG	Делеция со сдвигом рамки считывания/ Frameshift deletion	Вероятно патогенная/ Probably pathogenic	Данные отсутствуют/ No data
16	p.E1353*	c.4057G > T	Нонсенс/ Nonsense	Данные отсутствуют/ No data	Данные отсутствуют/ No data
16	p.Q1367*	c.4099C > T	Нонсенс/ Nonsense	Вероятно патогенная/ Probably pathogenic	Данные отсутствуют/ No data
16	p.Y1376*	c.4128T > G	Нонсенс/ Nonsense	Вероятно патогенная/ Probably pathogenic	Вероятно патогенная/ Probably pathogenic
16	p.Q1378*	c.4132C > T	Нонсенс/ Nonsense	Вероятно патогенная/ Probably pathogenic	Данные отсутствуют/ No data
16	p.S1400*	c.4199C > A	Нонсенс/ Nonsense	Вероятно патогенная/ Probably pathogenic	Вероятно патогенная/ Probably pathogenic
16	p.Q1406*	c.4216C > T	Нонсенс/ Nonsense	Вероятно патогенная/ Probably pathogenic	Данные отсутствуют/ No data
16	p.Q1444*	c.4330C > T	Нонсенс/ Nonsense	Вероятно патогенная/ Probably pathogenic	Данные отсутствуют/ No data
16	p.R1450*	c.4348C > T	Нонсенс/ Nonsense	Вероятно патогенная/ Probably pathogenic	Данные отсутствуют/ No data
16	p.S1465WfsTer3	c.4393_4394delAG	Делеция со сдвигом рамки считывания/ Frameshift deletion	Вероятно патогенная/ Probably pathogenic	Патогенная/ Pathogenic
16	p.L1488YfsTer19	c.4463delT	Делеция со сдвигом рамки считывания/ Frameshift deletion	Вероятно патогенная/ Probably pathogenic	Данные отсутствуют /No data
16	p.L1488FfsTer26	c.4463dupT	Инсерция со сдвигом рамки считывания/ Frameshift insertion	Вероятно патогенная/ Probably pathogenic	Данные отсутствуют/ No data
16	p.E1536*	c.4606G > T	Нонсенс/ Nonsense	Вероятно патогенная/ Probably pathogenic	Данные отсутствуют/ No data
16	p.T1556NfsTer3	c.4666dup	Инсерция со сдвигом рамки считывания/ Frameshift insertion	Вероятно патогенная/ Probably pathogenic	Данные отсутствуют/ No data

Таблица 3/Table 3

Характеристика мутаций, выявленных в гене *TP53*
Characteristics of mutations identified in the *TP53* gene

Экзон/ Exon	Нуклеотидный вариант/ Nucleotide variant	Белковый вариант/ Protein variant	Тип мутации/ Type of mutation	База/Database COSMIC/ cBioPortal	База/ Database dbSNP
5	p.V147GfsTer25	c.435_439dupGTGGG	Инсерция со сдвигом рамки считывания/ Frameshift insertion	Данные отсутствуют/ No data	Данные отсутствуют/ No data
5	p.R175H	c.524G>A	Миссенс/Missense	Патогенная/Pathogenic	Патогенная/Pathogenic
6	p.H193N	c.577C>A	Миссенс/Missense	Вероятно патогенная/ Probably pathogenic	Данные отсутствуют/ No data
6	p.R213*	c.637C>T	Нонсенс/Nonsense	Вероятно патогенная/ Probably pathogenic	Данные отсутствуют/ No data
7	p.Y234H	c.700T>C	Миссенс/Missense	Вероятно патогенная/ Probably pathogenic	Данные отсутствуют/ No data
7	p.C238W	c.714T>G	Миссенс/Missense	Патогенная/Pathogenic	Патогенная/Pathogenic
7	p.C238Y	c.713G>A	Миссенс/Missense	Патогенная/Pathogenic	Данные отсутствуют/ No data
7	p.G245S	c.733G>A	Миссенс/Missense	Патогенная/Pathogenic	Патогенная/Pathogenic
7	p.R248W	c.742C>T	Миссенс/Missense	Вероятно патогенная/ Probably pathogenic	Патогенная/ Pathogenic
8	p.R273C	c.817C>T	Миссенс/Missense	Вероятно патогенная/ Probably pathogenic	Патогенная/ Pathogenic
8	p.R273L	c.818G>T	Миссенс/Missense	Вероятно патогенная/ Probably pathogenic	Патогенная/ Pathogenic
8	p.P278R	c.833C>G	Миссенс/Missense	Вероятно патогенная/ Probably pathogenic	Данные отсутствуют/ No data
8	p.R282W	c.844C>T	Миссенс/Missense	Вероятно патогенная/ Probably pathogenic	Патогенная/ Pathogenic
10	p.R342*	c.1024C>T	Нонсенс/Nonsense	Вероятно патогенная/ Probably pathogenic	Данные отсутствуют/ No data

Таблица 4/Table 4

Характеристика мутаций в других генах, выявленных в обследованной группе
Characterization of mutations in other genes identified in the examined group

Ген/ Gene	Экзон/ Exon	Нуклеотид- ный вариант/ Nucleotide variant	Белковый вариант/ Protein variant	Тип мутации/ Type of mutation	База/Base COSMIC/cBioPortal	База / Database dbSNP
FBXW7	4	p.A204T	c.610G>A	Миссенс/Missense	Данные отсутствуют/ No data	Неизвестное значение/ Unknown value
	8	p.T385ins	c.1149_1153dupGATCA	Инсерция со сдвигом рамки считывания/ Frameshift insertion	Данные отсутствуют/ No data	Данные отсутствуют/ No data
	9	p.R465H	c.1394G>A	Миссенс/Missense	Вероятно патогенная/ Probably pathogenic	Данные отсутствуют/ No data
	10	p.R479P	c.1436G>C	Миссенс/Missense	Вероятно патогенная/ Probably pathogenic	Данные отсутствуют/ No data
	10	p.R479Q	c.1436G>A	Миссенс/Missense	Патогенная/ Pathogenic	Данные отсутствуют/ No data
	10	p.S546*	c.1637C>A	Миссенс/Missense	Вероятно патогенная/ Probably pathogenic	Данные отсутствуют/ No data
	12	p.R689W	c.2065C>T	Миссенс/Missense	Вероятно патогенная/ Probably pathogenic	Данные отсутствуют/ No data

Окончание таблицы 4/End of Table 4

PIK3CA	2	p.R88*	c.262C>T	Нонсенс/ Nonsense	Данные отсутствуют/ No data	Данные отсутствуют/ No data
	2	p.G106V	c.317G>T)	Миссенс/ Missense	Патогенная/ Pathogenic	Данные отсутствуют/ No data
	20	p.H1047R	c.3140A>G	Миссенс/ Missense	Патогенная/ Pathogenic	Патогенная/ Pathogenic
SMAD4	9	p.P356R	c.1067C>G	Миссенс/ Missense	Неизвестное значение/ Unknown value	Данные отсутствуют/ No data
	12	p.D537G	c.1610A>G	Миссенс/ Missense	Вероятно патогенная/ Probably pathogenic	Данные отсутствуют/ No data
	12	p.D537V	c.1610A>T	Миссенс/ Missense	Вероятно патогенная/ Probably pathogenic	Данные отсутствуют/ No data
SMAD2	4	p.R120*	c.352C>T	Нонсенс/ Nonsense	Данные отсутствуют/ No data	Данные отсутствуют/ No data
	8	p.C312G	c.934T>G	Миссенс/ Missense	Данные отсутствуют/ No data	Данные отсутствуют/ No data
	11	p.*468K	c.1402T>A	Потеря стоп кодона/ Stop codon loss	Данные отсутствуют/ No data	Данные отсутствуют/ No data
DMD	7	p.G208S	c.622G>A	Миссенс/ Missense	Данные отсутствуют/ No data	Данные отсутствуют/ No data
	23	p.E1026D	c.3078G>T	Миссенс/ Missense	Неизвестное значение/ Unknown value	Данные отсутствуют/ No data
	59	p.K2957N	c.8871G>T	Миссенс/ Missense	Данные отсутствуют/ No data	Данные отсутствуют/ No data
ATM	16	p.R805*	c.2413C>T	Нонсенс/ Nonsense	Вероятно патогенная/ Probably pathogenic	Данные отсутствуют/ No data
	18	p.S934N	c.2801G>A	Миссенс/ Missense	Данные отсутствуют/ No data	Данные отсутствуют/ No data
	63	p.R3008H	c.9023G>A	Миссенс/ Missense	Патогенная/ Pathogenic	Данные отсутствуют/ No data
CTNIB1	4	p.A152T	c.454G>A	Миссенс/ Missense	Данные отсутствуют/ No data	Данные отсутствуют/ No data
	15	p.W776*	c.2328G>A	Нонсенс/ Nonsense	Данные отсутствуют/ No data	Данные отсутствуют/ No data
TCF7L2	6	p.G229R	c.685G>A	Миссенс/ Missense	Неизвестное значение/ Unknown value	Данные отсутствуют/ No data
	15	p.A562T	c.1684G>A	Миссенс/ Missense	Данные отсутствуют/ No data	Данные отсутствуют/ No data
MAP7	4	p.P80L	c.239C>T	Миссенс/ Missense	Данные отсутствуют/ No data	Данные отсутствуют/ No data
DCC	15	p.A769T	c.2305G>A	Миссенс/ Missense	Неизвестное значение/ Unknown value	Данные отсутствуют/ No data
PIK3R1	16	p.A682PfsTer12	c.2043_2044insTTTTT	Инсерция со сдвигом рамки считывания/ Frameshift insertion	Данные отсутствуют/ No data	Данные отсутствуют/ No data

метода по сравнению с секвенированием по Сэнгеру или методом ПЦР.

В настоящем исследовании мы изучали мутационный статус опухолей у 42 пациентов с КРР с использованием коммерчески доступной панели NGS GeneRead DNASeq Targeted Panel v2 Human Colorectal Cancer («Qiagen», США) из 32 генов, участвующих в молекулярном патогенезе заболевания и выполняющих важную роль в регуляции клеточного роста, трансформации, адгезии, апоп-

тозе и т.д. Полученные данные позволили идентифицировать мутации не только в горячих точках генов, обычно участвующих в патогенезе КРР, но и редкие и новые варианты, которые еще не описаны в базах данных по мутациям. Для многих выявленных вариантов генов уже имеется информация относительно их потенциальной роли в качестве прогностических и предиктивных маркеров. Значение других мутаций предстоит оценить в крупных клинических исследованиях.

Несколько ранее проведенных исследований были посвящены анализу мутационного статуса генов при КРР с применением метода NGS для выявления прогностически значимых маркеров и поиска новых мишеней для таргетной терапии [15–18]. В основном эти исследования проводились с использованием панели AmpliSeq Cancer Hotspot Panel v2 (Life Technologies, США). В этих работах показана возможность успешного применения одного мультиплексного теста для анализа мутаций множества генов, ассоциированных с КРР. Авторы сходятся во мнении, что такой подход, с включением в обследование высокопроизводительного секвенирования, облегчает выявление лиц с высоким риском, помогает идентифицировать новые мутации, которые могут быть использованы в качестве мишеней для разработки лекарств, а также принимать решение при назначении терапии.

Известно, что для КРР характерна стадийность морфологической трансформации, обусловленная постепенным накоплением мутаций в онкогенах и супрессорных генах, ассоциированных с развитием заболевания [19]. Ключевыми генетическими изменениями при КРР являются мутации в генах *KRAS*, *APC* и *TP53*. Ген *KRAS* – протоонкоген, участвующий в активации сигнального пути *EGFR* (*RAS/RAF/MAPK*), тесно связан с пролиферацией опухолевых клеток. Активирующие мутации в гене *KRAS* приводят к конститутивной активации сигнальной трансдукции, что способствует клеточной пролиферации и злокачественной трансформации. Ген *APC* – ген-супрессор опухоли, основными функциями которого является участие в регуляции транскрипции, апоптозе, клеточной адгезии, а также контроле клеточного цикла. Он является негативным регулятором сигнального каскада Wnt. В норме *APC* ингибирует клеточную пролиферацию путем связывания β -катенина с последующим его разрушением. Однако при возникновении мутации он теряет способность связывать и разрушать β -катенин, в результате чего последний проникает в ядро и активирует транскрипцию ряда онкогенов, в том числе *c-myc*, *циклин D1*, которые являются промоторами клеточной пролиферации. Мутации в гене *APC* при спорадическом КРР встречаются довольно часто и могут составлять до 75 % случаев, мутации, как правило, возникают уже на ранней стадии развития опухоли [20, 21]. Ген *TP53*, изменения в котором наряду с геном *APC* чаще всего встретились в обследованной группе, является наиболее известным опухолевым супрессором, отвечающим за стабильное состояние генома. Он часто мутирует в различных типах опухолей. По данным литературы, мутации в гене *TP53* при спорадическом КРР наблюдаются в 40–50 % [22]. По данным литературы, сочетание мутаций в трех

ключевых генах (*KRAS*, *APC*, *TP53*) свидетельствует о более агрессивном характере заболевания [13, 16, 23].

В нашем исследовании из пациентов с комбинацией мутаций в трех ключевых генах (*KRAS*, *APC*, *TP53*) большинство – 10 (67 %) – имели III и IV стадии заболевания. В этой группе прогрессирование заболевания отмечено у 10 (67 %) пациентов (у 8 – с КРР III или IV стадий, у 2 – с КРР II стадии), из них 8 больных (53 %) умерли в период наблюдения (27 мес). В то же время в группах с мутациями в двух генах *KRAS/APC* или *KRAS/TP53* прогрессирование заболевания отмечено в 4 (40 %) и 4 (50 %) случаях соответственно. В течение всего периода наблюдения умерло 2 (25 %) больных из группы с мутациями в генах *KRAS/TP53* и 3 (30 %) пациентов с мутациями в генах *KRAS/APC*. В группе пациентов, у которых не выявлены мутации в генах *APC* и *TP53*, а имелась лишь мутация в гене *KRAS*, 7 (77 %) человек имели КРР I или II стадии, 2 – КРР III или IV стадии. У 2 пациентов с КРР III и IV стадии отмечено прогрессирование заболевания, и они умерли в течение периода наблюдения.

Предварительные результаты исследования продемонстрировали, что сочетание 3 мутаций в ключевых генах, отвечающих за патогенез КРР (*KRAS*, *APC*, *TP53*), является наиболее неблагоприятным фактором прогноза и свидетельствует о более высокой агрессивности опухолевого процесса. Дальнейшие исследования позволяют уточнить полученные данные и, возможно, выявить новые особенности молекулярно-генетического профиля, характерные для КРР. Таким образом, поиск и идентификация генных мутаций у пациентов с КРР имеют важное значение не только для выбора тактики лечения, но и для прогноза заболевания. Дальнейшие исследования в этом направлении позволяют уточнить выявленные закономерности и, возможно, получить ответ на вопросы, связанные с патогенезом КРР.

Заключение

Эффективное лечение большинства злокачественных новообразований, включая КРР, предполагает исследование молекулярного профиля опухоли. Одним из наиболее чувствительных и надежных способов идентификации мутаций в опухолевой ткани является метод секвенирования нового поколения (NGS), позволяющий анализировать десятки и сотни генов в одном исследовании. Полученная информация о мутационном статусе опухоли с учетом клинических характеристик позволяет персонифицировать тактику лечения, включая применение комбинации таргетных препаратов.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Arnold M., Sierra M.S., Laversanne M., Soerjomataram I., Jemal A., Bray F. Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. *Gut*. 2017; 66(4): 683–91. doi: 10.1136/gutjnl-2015-310912.
2. Stewart B.W., Bray F., Forman D., Ohgaki H., Straif K., Ullrich A., Wild C.P. Cancer prevention as part of precision medicine: 'plenty to be done'. *Carcinogenesis*. 2016; 37(1): 2–9. doi: 10.1093/carcin/bgv166.
3. Состояние онкологической помощи населению России в 2016 году / под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, Г.В. Петровой. М., 2017. 236 с. [The state of cancer care for the population of Russia in 2016 / Eds. A.D. Kaprin, V.V. Starinskiy, G.V. Petrov. Moscow, 2017. 236 p. (in Russian)].
4. Каприн А.Д., Старинский В.В., Петрова Г.В. Злокачественные новообразования в России в 2015 году (заболеваемость и смертность). М., 2017. 250 с. [Kaprin A.D., Starinskiy V.V., Petrova G.V. Malignant neoplasms in Russia in 2015 (morbidity and mortality). Moscow, 2017. 250 p. (in Russian)].
5. Armaghany T., Wilson J.D., Chu Q., Mills G. Genetic alterations in colorectal cancer. *Gastrointest Cancer Res*. 2012; 5(1): 19–27.
6. Кум О.И., Водолажский Д.И. Молекулярная биология колоректального рака в клинической практике. Молекулярная биология. 2015; 49(4): 531–40. [Kit O.I., Vodolazhskii D.I. The molecular biology of colorectal cancer in clinical practice. *Molecular Biology*. 2015; 49(4): 531–40. (in Russian)].
7. Price T.J., Tang M., Gibbs P., Haller D.G., Peeters M., Arnold D., Segelov E., Roy A., Tebbutt N., Pavlakis N., Karapetis C., Burge M., Shapiro J. Targeted therapy for metastatic colorectal cancer. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2018; 18(10): 991–1006. doi: 10.1080/14737140.2018.1502664.
8. Cai Z.X., Tang X.D., Gao H.L., Tang C., Nandakumar V., Jones L., Ye H., Lou F., Zhang D., Sun H., Dong H., Zhang G., Liu Z., Dong Z., Guo B., Yan H., Yan C., Wang L., Su Z., Wang F.Y., Wan J.J., Fang F.O., Chen H.L., Shang D., Huang X.F., Chen S.Y., Guo H.S. APC, FBXW7, KRAS, PIK3CA, and TP53 Gene Mutations in Human Colorectal Cancer Tumors Frequently Detected by Next-Generation DNA Sequencing. *J Mol Genet Med*. 2014; 8: 4. doi: 10.4172/1747-0862.1000145.
9. Afrăsănie V.A., Marinca M.V., Alexa-Stratulat T., Gafton B., Păduraru M., Adavidoaiei A.M., Miron L., Rusu C. KRAS, NRAS, BRAF, HER2 and microsatellite instability in metastatic colorectal cancer – practical implications for the clinician. *Radiol Oncol*. 2019; 53(3): 265–74. doi: 10.2478/raon-2019-0033.
10. Lupini L., Bassi C., Mlcochova J., Musa G., Russo M., Vychytilova-Faltejskova P., Svoboda M., Sabbioni S., Nemecek R., Slaby O., Negrini M. Prediction of response to anti-EGFR antibody-based therapies by multigene sequencing in colorectal cancer patients. *BMC Cancer*. 2015; 15: 808. doi: 10.1186/s12885-015-1752-5.
11. Гервас П.А., Литвяков Н.В., Попова Н.О., Добродеев А.Ю., Тарасова А.С., Юмов Е.Л., Иванова Ф.Г., Черемисина О.В., Афанасьев С.Г., Гольдберг В.Е., Чердынцева Н.В. Проблемы и перспективы совершенствования молекулярно-генетической диагностики для назначения таргетных препаратов в онкологии. Сибирский онкологический журнал. 2014; 2: 46–55. [Gervas P.A., Litviakov N.V., Popova N.O., Dobrodeev A.Yu., Tarasova A.S., Yumov E.L., Ivanova F.G., Cheremisina O.V., Afanasyev S.G., Goldberg V.E., Cherdyntseva N.V. Problem and perspective to improve molecular testing to choose appropriate target therapy. *Siberian Journal of Oncology*. 2014; 2: 46–55. (in Russian)].
12. Therkildsen C., Bergmann T.K., Henrichsen-Schnack T., Ladelund S., Nilbert M. The predictive value of KRAS, NRAS, BRAF, PIK3CA and PTEN for anti-EGFR treatment in metastatic colorectal cancer: A systematic review and meta-analysis. *Acta Oncol*. 2014; 53(7): 852–64. doi: 10.3109/0284186X.2014.895036.
13. Lin P.S., Semrad T.J. Molecular Testing for the Treatment of Advanced Colorectal Cancer: An Overview. *Methods Mol Biol*. 2018; 1765: 281–97. doi: 10.1007/978-1-4939-7765-9_18.
14. Ben Brahim E., Ayari I., Jouini R., Atafi S., Koubaa W., Elloumi H., Chadli A. Expression of epidermal growth factor receptor (EGFR) in colorectal cancer: An immunohistochemical study. *Arab J Gastroenterol*. 2018; 19(3): 121–4. doi: 10.1016/j.ajg.2018.08.002.
15. Gleeson F.C., Kipp B.R., Voss J.S., Campion M.B., Minot D.M., Tu Z.J., Klee E.W., Sciallis A.P., Graham R.P., Lazaridis K.N., Henry M.R., Levy M.J. Endoscopic ultrasound fine-needle aspiration cytology mutation profiling using targeted next-generation sequencing: personalized care for rectal cancer. *Am J Clin Pathol*. 2015; 143(6): 879–88. doi: 10.1309/AJCPU3J7FGAYQBRL.
16. Chang P.Y., Chen J.S., Chang N.C., Chang S.C., Wang M.C., Tsai S.H., Wen Y.H., Tsai W.S., Chan E.C., Lu J.J. NRAS germline variant G138R and multiple rare somatic mutations on APC in colorectal cancer patients in Taiwan by next generation sequencing. *Oncotarget*. 2016; 7(25): 37566–80. doi: 10.18632/oncotarget.8885.
17. Cornejo K.M., Cosar E.F., Paner G.P., Yang P., Tomaszewicz K., Meng X., Mehta V., Sirintrapun S.J., Barkan G.A., Hutchinson L. Mutational Profile Using Next-Generation Sequencing May Aid in the Diagnosis and Treatment of Urachal Adenocarcinoma. *Int J Surg Pathol*. 2020; 28(1): 51–9. doi: 10.1177/1066896919872535.
18. Dallol A., Buhmeida A., Al-Ahwal M.S., Al-Maghrabi J., Bajouh O., Al-Khayyat S., Alam R., Abusanad A., Turki R., Elaimi A., Alhadrami H.A., Abuzenadah M., Banni H., Al-Qahtani M.H., Abuzenadah A.M. Clinical significance of frequent somatic mutations detected by high-throughput targeted sequencing in archived colorectal cancer samples. *J Transl Med*. 2016; 14(1): 118. doi: 10.1186/s12967-016-0878-9.
19. Имянитов Е.Н. Клинико-молекулярные аспекты колоректального рака: этиопатогенез, профилактика, индивидуализация лечения. Практическая онкология. 2005; 6 (2): 65–70. [Imyanitov E.N. Clinical and molecular aspects of colorectal cancer: etiopathogenesis, prevention, individualization of treatment. *Practical Oncology*. 2005; 6 (2): 65–70. (in Russian)].
20. Schell M.J., Yang M., Teer J.K., Lo F.Y., Madan A., Coppola D., Monteiro A.N., Nebozhyn M.V., Yue B., Loboda A., Bien-Wilner G.A., Greenawalt D.M., Yeatman T.J. A multigene mutation classification of 468 colorectal cancers reveals a prognostic role for APC. *Nat Commun*. 2016; 7: 11743. doi: 10.1038/ncomms11743.
21. Wang C., Ouyang C., Cho M., Ji J., Sandhu J., Goel A., Kahn M., Fakih M. Wild-type APC Is Associated with Poor Survival in Metastatic Microsatellite Stable Colorectal Cancer. *Oncologist*. 2021; 26(3): 208–14. doi: 10.1002/onco.13607.
22. Li X.L., Zhou J., Chen Z.R., Chng W.J. P53 mutations in colorectal cancer – molecular pathogenesis and pharmacological reactivation. *World J Gastroenterol*. 2015; 21(1): 84–93. doi: 10.3748/wjg.v21.i1.84.
23. Conlin A., Smith G., Carey F.A., Wolf C.R., Steele R.J. The prognostic significance of K-ras, p53, and APC mutations in colorectal carcinoma. *Gut*. 2005; 54(9): 1283–6. doi: 10.1136/gut.2005.066514.

Поступила/Received 21.05.2021

Принята в печать/Accepted 26.01.2022

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Тельшева Екатерина Николаевна, кандидат биологических наук, патологоанатомическое отделение, ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр нейрохирургии им. академика Н.Н. Бурденко» Минздрава России (г. Москва, Россия). SPIN-код: 8700-1335. Research ID: X-9043-2018. Author ID (Scopus): 57193142191. ORCID: 0000-0002-0370-8667.

Шайхаев Евгений Гаджирамазанович, кандидат биологических наук, патологоанатомическое отделение, ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр нейрохирургии им. академика Н.Н. Бурденко» Минздрава России (г. Москва, Россия). SPIN-код: 5504-8523. Research ID: AAB-4981-2020. Author ID (Scopus): 55053528200. ORCID: 0000-0002-7882-2579.

Снигирева Галина Петровна, доктор биологических наук, патологоанатомическое отделение, ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр нейрохирургии им. академика Н.Н. Бурденко» Минздрава России (г. Москва, Россия). E-mail: G.Snigireva@nsi.ru. SPIN-код: 4247-0600. Research ID: Y-4302-2018. Author ID (Scopus): 6602153865. ORCID: 0000-0002-2584-802X.

ВКЛАД АВТОРОВ

Тельшева Екатерина Николаевна: разработка концепции научной работы, подбор больных, анализ и интерпретация данных, подготовка рукописи.

Шайхаев Евгений Гаджирамонович: биоинформационный анализ полученных данных, редактирование окончательного варианта статьи.

Снигирева Галина Петровна: разработка концепции научной работы, редактирование окончательного варианта статьи с внесением ценного интеллектуального содержания.

Финансирование

Это исследование не потребовало дополнительного финансирования.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ABOUT THE AUTHORS

Ekaterina N. Telysheva, PhD, Pathoanatomical Department, N.N. Burdenko National Medical Research Center of Neurosurgery of the Ministry of Health of the Russia (Moscow, Russia). SPIN-code: 8700-1335. Research ID: X-9043-2018. Author ID (Scopus): 57193142191. ORCID: 0000-0002-0370-8667.

Eugene G. Shaikhaev, PhD, Pathoanatomical Department, N.N. Burdenko National Medical Research Center of Neurosurgery of the Ministry of Health of the Russia (Moscow, Russia). SPIN-code: 5504-8523. Research ID: AAB-4981-2020. Author ID (Scopus): 55053528200. ORCID: 0000-0002-7882-2579.

Galina P. Snigireva, DSc, Pathoanatomical Department, N.N. Burdenko National Medical Research Center of Neurosurgery of the Ministry of Health of the Russia (Moscow, Russia). E-mail: G.Snigireva@nsi.ru. SPIN-code: 4247-0600. Research ID: Y-4302-2018. Author ID (Scopus): 6602153865. ORCID: 0000-0002-2584-802X.

AUTHOR CONTRIBUTION

Ekaterina N. Telysheva: study conception, data analysis and interpretation, drafting of the manuscript.

Eugene G. Shaikhaev: bioinformatic analysis of the obtained data, editing of the final version of the manuscript.

Galina P. Snigireva: study conception, editing of the manuscript, critical revision for important intellectual content.

Funding

This study required no funding.

Conflict of interests

The authors declare that they have no conflict of interest.