



VILNIAUS UNIVERSITETAS
Gyvybės mokslų centras
Biomokslų institutas

AGNĖ ŠEŠTOKAITĖ

**Nesmulkialąstelinio plaučių vėžio ligonių skysčių
biopsijos mutacijų analizė**

Genetikos magistrinių studijų baigiamasis darbas

Darbas atliktas
Nacionaliniame vėžio institute
Genetinės diagnostikos laboratorijoje

Darbo vadovės:
dr. Rasa Sabaliauskaitė
Prof. dr. (HP) Sonata Jarmalaitė

Vilnius 2020

TURINYS

SANTRUMPOS.....	3
ĮVADAS	4
1. LITERATŪROS APŽVALGA.....	5
1.1 Plaučių vėžio epidemiologija.....	5
1.2 Plaučių vėžio rizikos veiksniai.....	6
1.2 Plaučių vėžio klasifikacija	9
1.3 Plaučių vėžio diagnozavimas ir gydymas	12
1.4 NSLPV vystymasis	16
1.5 Genomo molekuliniai pokyčiai būdingi NSLPV	19
1.5.1 Dažniausios genų mutacijos NSLPV	20
1.6 Skysčių biopsija	22
1.7 Cirkuliuojanti DNR.....	24
1.8 Naujos kartos sekoskaita.....	25
2. TYRIMO OBJEKTAS, MEDŽIAGOS IR METODAI.....	27
2.1 Tiriamųjų imtis ir tyrimo eiga.....	27
2.2 Tyrimo metu naudotos medžiagos, rinkiniai, aparatūra ir priemonės	28
2.3 Metodai	29
2.3.1 Mėginių paruošimas.....	29
2.2.3 Skysčių biopsijos DNR kokybės įvertinimas.....	31
2.2.3 DNR bibliotekų ruošimas	31
2.2.4 DNR sekoskaita	34
2.2.4 Rezultatų analizė.....	34
3. REZULTATAI.....	36
3.1 DNR gryninimo optimizavimas	36
3.2 Skysčių biopsijos DNR kokybės ir koncentracijos įvertinimas.....	36
3.3 Kraujo plazmos ir krūtinplėvės nuoplovų sekoskaitos rezultatų palyginimas.....	37
3.4 Mutacijų analizė kraujo plazmoje prieš progresiją	38
3.5 Mutacijų skaičiaus sąsajos su klinikiniais rodikliais	40
3.6 Mutacijų analizė kraujo plazmoje serijiniuose mėginiuose	42
4. REZULTATŲ APTARIMAS	47
IŠVADOS	50
SUMMARY	51
SANTRAUKA.....	52
LITERATŪROS SĄRAŠAS	53

SANTRUMPOS

- ALK* – anaplastinės limfomos kinazės receptorius (angl., *anaplastic lymphoma kinase*)
- APLK* – adenopleumorfinė karcinoma
- BRAF* – onkogenas B-RAF, serino/treonino baltymo kinazė B-RAF (angl. *proto-oncogene B-RAF, serine/treonine-protein kinase*)
- CYFRA 21-1* – citokeratino 19 fragmentas (angl., *cytokeratin 19*)
- cirDNR* – cirkuliuojanti DNR
- EGFR* – epidermio augimo faktoriaus receptorius (angl., *epidermal growth factor receptor*)
- ERBB2* – tirozino erb-b2 kinazės 2 receptorius (angl., *erb-b2 receptor tyrosine kinase 2*)
- FGFR* – fibroblastų augimo faktoriaus receptorius (angl., *fibroblast growth factor receptor*)
- INDEL* – iškrita–intarpas (angl. *insertions and deletions (indels)*)
- KRAS* – onkogenas, nustatytas žiurkių sarkomos ląstelėse (angl. *Kirsten-rous avian sarcoma*)
- MAP2K1* – mitogenų aktyvuojamo baltymo kinazės kinazė 1(angl., *mitogen-activated protein kinase kinase 1*)
- MET* – MET proto onkogenas (angl., *MET proto-oncogene*)
- NKS* – naujos kartos sekoskaita
- NRAS* – NRAS proto onkogenas, GTPazė (angl., *NRAS proto-oncogene, GTPase*)
- NSLPV* – nesmulkialąstelinis plaučių vėžys
- PA* – plaučių adenokarcinoma
- PD-L1* – programuotos ląstelių žūties ligandas 1 (angl., *programmed death-ligand 1*)
- PFK* – pleumorfinė karcinoma
- PIK3CA* – fosfatidilinozitolio 4,5-difosfato 3 kinazės fermentinis subvienetas alfa (angl., *phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha*)
- PPV* – plokščialąstelinis plaučių vėžys
- PV* – plaučių vėžys
- ROS1* – ROS 1 onkogenas, tirozino kinazės receptorius (angl. *c-ros oncogene 1, receptor tyrosine kinase*)
- SCCA* – plokščių ląstelių karcinomos antigenas (angl. *squamous cell carcinoma antigen*)
- SDSK* – smulkių plokščių ir stambių ląstelių karcinoma
- SLK* – stambių ląstelių karcinoma
- SLPV* – smulkialąstelinis plaučių vėžys
- TP53* – naviką slopinančio baltymo (angl. *tumor protein 53*) genas
- VNP* – vieno nukleotido polimorfizmas

IVADAS

Plaučių vėžys (PV) – tai vienas iš dažniausių onkologinių susirgimų bei mirštamumas nuo PV yra pats didžiausias iš visų onkologinių susirgimų. Dažniausiai sergama nesmulkiaūstelinio PV (NSLPV), daignozuojami histologiniai potipiai kaip plaučių adenokarcinoma (AP), plokščiaūstelinis plaučių vėžys (PPV). Sergantiems ligoniams būdingas trumpas išgyvenamumo laikotarpis nuo ligos daignozavimo. Trumpas išgyvenamumas yra susijęs su vėlyva ligos daignostika, ligos eigos sekimo molekulinų žymenų stoka ir greita ligos progresija. Rutiniškai ligos eigos sekimas vykdomas nejautriaus motodais, kurie nenustato molekulinų pokyčių vykthančių ligai progresuojant. Naujų naujų molekulinų žymenų atradimas sekti ligos eigai galėtų padėti sustabdyti greitą ligos progresiją, parinkti tikslingą gydymą ir plačiau charakterizuoti šio NSLPV potipo navikus.

NSLPV navikuose nustatomas didelis genominiis nestabilumas. Nustatomos daugelio genų dažnos somatinės mutacijos. Ypač dažnai nustatomos *EGFR*, *ALK*, *BRAF*, *ERBB2*, *KRAS*, *MAP2K1*, *MET*, *NRAS*, *PIK3CA*, *ROS1* ir *TP53* genų mutacijos. Šių genų produktai dalyvauja daugelyje signalinių kelių. Todėl šių genų mutacijos gali lemti nekontroliuojamą lūstelių augimą, plitimą, išgyvenamumo aktyvinimą, o šie procesai yra gali inicijuoti naviko formavimąsi.

Skysčių biopsija yra vienas iš būdų leidžiantis stebėti ligos eigą ir nustatyti šių genų patogeninius pokyčius, kurie atsiranda naviko vystymosi metu, atsako į gydymą vystymesi bei ligos progresijoje. Skysčių biopsijos ėminių periodinis rinkimas ir jų tyrimas tokiais tiksliais metodai kaip naujos kartos sekoskaita gali padėti padidinti ligonių išgyvenamumą daignozuojant ligą ir ligos progresiją anksčiau.

Darbo tikslas:

Įvertinti plaučių vėžiui vystymuisi svarbių genų mutacijų kitimą ligai progresuojant naujos kartos sekoskaitos metodu nesmulkiaūstelinio plaučių vėžio pacientų kraujo plazmoje ir krūtinplėvės nuoplovose.

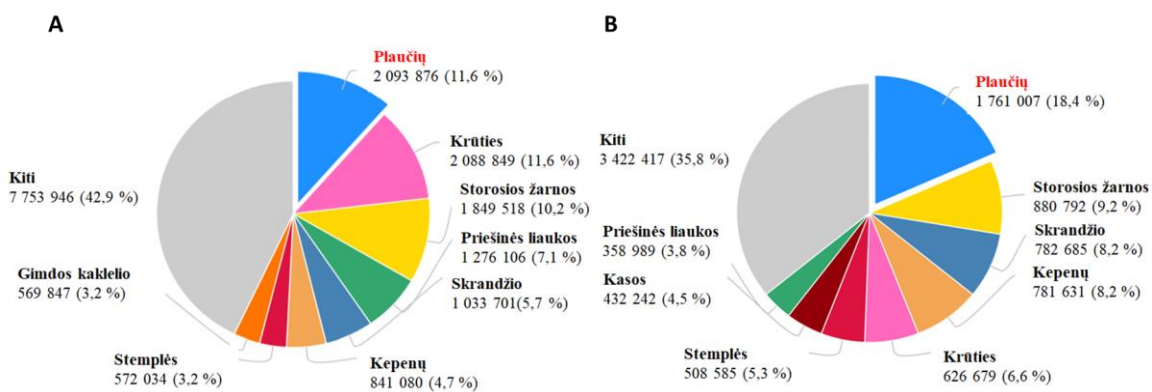
Darbo uždaviniai:

1. Atlikti cirkuliuojančios DNR iš kraujo plazmos, DNR iš krūtinplėvės nuoplovų sekoskaitą ir nustatyti dažniausias mutacijas NSLPV ligoniuose prieš gydymą;
2. Susieti ligonių prieš gydymą mutacijų skaičiaus, palyginių su mutacijomis skaičiaus kitimą su demografiniais ir klinikiniais–patologiniais rodikliais.
3. Įvertinti mutacijas, jų skaičių ir dažnį prieš progresiją ir ligai progresavus;

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1 Plaučių vėžio epidemiologija

Plaučių vėžys (PV) yra vienas dažniausiai diagnozuojamų onkologinių susirgimų pasaulyje. Naujausiais Pasaulio sveikatos organizacijos duomenimis plaučių vėžys buvo nustatytas, kartu su krūties vėžiu, kaip dažniausias vėžio tipas (11,6 %) (1.1 A pav.). Tačiau mirtingumas nuo PV siekia 18,4 % ir yra didesnis nei kitų dviejų dažniausių vėžio tipų, krūties ir storosios žarnos, kartu (6,6 % ir 9,2 %, atitinkamai) (*World Health Organisation*, pagal internetinę prieigą: <https://gco.iarc.fr/today>) (1.1 B pav.).



1.1 pav. Plaučių vėžio sergamumas (A) ir mirtingumas (B) pasaulyje 2018 m. (adaptuota pagal *Cancer Today, International Agency for Research on Cancer*; <https://gco.iarc.fr/today/>).

Žinoma, kad sergamumas daugumoje Europos regionų pastarajame dešimtmetyje yra sumažėjęs (Bray ir kt., 2018). Tačiau kituose rytų Europos regionuose, ypač mažiau ekonomiškai pažengusiose šalyse, kur cigarečių rūkymas yra paplitęs, PV sergamumas yra vis dar didelis (Alberg ir kt., 2013; Wong M ir kt., 2017). Iš visų rytų Europos šalių sergamumas didžiausias yra Vengrijoje tarp vyrų. O tuo tarpu moterų sergamumas yra didžiausias vakarų Europos regionuose, ypač Danijoje ir Olandijoje (Bray ir kt., 2018). Lietuvoje nuo 2008 iki 2012 m. buvo diagnozuoti 5365 nauji PV atvejai, iš kurių didžiąją dalį sudarė vyrai (81,8 %). Nuo 2003 m. Lietuvoje stebimas 12,5 % sergamumo sumažėjimas vyrams, o moterų sergamumas išliko beveik nepakitęs ir šiuo periodu nustatyta tik 1,4 % sumažėjusių atvejų (Gedvilaitė ir kt., 2019).

Intensyviai tyrinėjamos didelio mirštamumo nuo PV priežastys. Viena iš priežasčių gali būti, jog PV yra retai diagnozuojama jauniems žmonėms ir dažniausiai

nustatoma vyresniems nei 50 m. ligoniams, kurie gali sirgti ir kitomis gretutinėmis ligomis, pasunkinančiomis gydymo procesą (Nasim ir kt., 2019). Epidemiologinių tyrimų pagalba yra nustatyta, kad, kai liga nepasireiškia būdingais simptomais, 5 metus išgyvena 18 % ligonių, kai juntami pirminiai vėžio simptomai (kaip pvz.: kosulys, dusulys) – 12 %. Tačiau vėžiui išplitus, kai nustatomas metastazės, 5-ių metų išgyvenamumas yra mažesnis nei 6 % (Žemaitis ir kt., 2018). Dideli mirtingumo rodikliai siejami su sunkumais identifikuojant ligą ankstyvose stadijose, nes ligoniai kreipiasi per vėlai dėl simptomų primenančių peršalimo sukeltus pojūčius ir taikininio gydymo pritaikymo, ligos progresijos stebėjimo sunkumų (Alberg ir kt., 2013). Dėl šių priežasčių nedidelis laiko tarpas efektyviausiam gydymui yra prarandamas.

1.2 Plaučių vėžio rizikos veiksniai

Vėžio rizikos veiksniai, tai veiksniai, kurie padidina riziką susirgti vėžiu. Rizikos veiksniai gali būti specifiniai vėžio tipui, kaip pavyzdžiui padidėjęs hormono estrogeno kiekis siejamas su rizika susirgti krūties vėžiu. Rizikos veiksniai gali būti siejami su profesija, pavyzdžiui gamybos ir kasybos pramonėse nustatomas didesnis nei įprastai kancerogenų kiekis palyginus su kitomis profesijomis (Cancer reserch UK, pagal internetinę prieigą: <https://www.cancerresearchuk.org/>). Didžiausią riziką susirgti PV lemia rizikos veiksnys, kuris yra susijęs su žalingu įpročiu – rūkymu.

Rūkymas. Žinoma, kad 85 %, sergančių šia liga yra rūkantys arba metę rūkyti (Prokhorov ir kt., 2014). Dėl didelės rizikos rūkantiems, daug dėmesio skiriama tabako rūkymo prevencijai, tačiau pasaulyje kasmet dėl šio žalingo įpročio PV susergera 80 % vyrų ir 50 % moterų. Rizika didėja eksponentiškai kartu su ilgėjančia rūkymo trukme, manoma, kad rūkymo trukmė turi didesnę poveikį susirgti PV nei surūkomas tabako kiekis, kuris dažniausiai vertinamas kaip surūkytų cigarečių per dieną skaičius (Mao ir kt., 2016). Yra nustatyta, kad rūkantys > 15 m. ir surūkantys > 20 cigarečių per dieną 4,5 dažniau susirgo PV nei rūkantys < 15 m. ir < 20 cigarečių per dieną (Pavlovska ir kt., 2008). Žinoma, jog riziką didina ir rūkymo intensyvumas, vertinamas kaip giliai yra įtraukiami tabako dūmai į plaučius bei jų laikymo plaučiuose trukmė. Taip pat, rizika yra susijusi su vidutiniškai ir daug rūkančių amžiumi (10–20 ir 21–39 cigaretės per dieną, atitinkamai) (*IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*, 2004). Didžiausia rizika nustatoma rūkantiems jauniems žmonėms, nes atsiradus priklausomybei nuo nikotino, rūkymo intensyvumas didėja kartu su ilgėjančia rūkymo trukme (Mao ir kt., 2016). Tačiau nustojus rūkyti rizika sumažėja per 4 m.

Nustatyta, jog vyrams nustojus rūkyti daugiau nei prieš 40 m. susirgti PV vėžiu rizika iš 80 % sumažėjo iki 2 % (Peto ir kt., 2000). Pasyvūs rūkymas, kuris priskiriamas aplinkos rizikos veiksniams prilyginamas aktyviam tabako rūkymui dėl taip pat didelės rizikos paveiktiems individams susirgti PV. Tabako dūmuose, kurie patenka į aplinką yra nustatomos dulkės, kuriose yra kancerogeninių medžiagų, galinčių sukelti PV ir nerūkantiems individams (Al-Obaide ir kt., 2018).

Tabako dūmuose nustatoma > 70 kancerogeninių medžiagų, kurios gali sukelti genų mutacijas, pažeisti plaučių periferinius audinius ir sukelti dusulio jausmą. Taip pat, šių žalingų kancerogenų metabolizmo metu, veikiant kartu su kitais kancerogenais padidina riziką susirgti PV (Al-Obaide ir kt., 2018). Tabako dūmuose esančios žalingos medžiagos skaidomos iš aplinkos patekusių cheminių medžiagų metabolizmo metu fermentų šeimos citochromų 450 (CYP) priklausantiems CYP1A1 ir kartu veikiančiam CYP2E1. Metabolizmo metu susidaro dariniai su cigarečių dūmuose esančiais policikliniais aromatiniais angliavandeniliais, kurie aktyvuoja CYP1A1, ir DNR. Dėl šių darinių, pakeičiama erdvinė DNR struktūra ir trukdomas DNR pažaidų taisymo procesas. Dėl pažaidų taisymo proceso riboto veikimo, susidariusios kancerogenų sukeltos DNR pažaidos išlieka DNR replikacijos metu ir virsta mutacijomis, galinčiomis sukelti ląstelinius pokyčius pirminėse PV vystymosi stadijose (Mitsui ir kt., 2016). Taip pat, nikotinas, esantis cigarečių dūmuose nėra kancerogenas, tačiau nikotinui jungiantis su ląsteliniu receptoriumi yra didinama tarpląstelinio ciklinio adenozino monofosfato (cAMP, iš angl., *cyclic adenosine monophosphate*) koncentracija. Padidėjusio cAMP koncentracija yra žinoma kaip vienas iš PV sukeliančių veiksnių. Nikotinas netiesioginiai, taip pat, gali sukelti PV jo metabolizmo metu, kai yra gaunamas tarpinis nikotino produktas nitrozaminas. Iš nikotino gaunamas nitrozaminas yra siejamas su *KRAS* ir *P53* genų mutacijų atsiradimu (Shuller ir kt., 2019).

Šiuo metu pasaulio mastu analizuojama ir elektroninių cigarečių sukeliama rizika plaučių periferinio audinio pažeidimams bei rizika susirgti PV. Šio rizikos veiksnio poveikis plaučiams ir epidemiologiniai tyrimai šiuo metu yra svarbesni nei cigarečių rūkymo dėl didžiulio paplitimo tarp paauglių / jaunų žmonių. Elektroninės cigaretės turi karščiui atsparų kaitinimo elementą, kuris garina skystį, paprastai sudarytą iš daržovių glicerino, propileno glikolio, nikotino ir skonį suteikiančių cheminių medžiagų. Šis skystis kaitinimo elemente esančios dagties iš medvilnės yra sugeriamas ir baterijos pagalba yra kaitinamas. Susidarę garai traukiami į plaučius. Elektrinės cigaretės yra vertinamos kaip sveikesnė alternatyva, žmonėms, kurie nori

nustoti rūkyti. Elektroninių cigarečių sudaromuose garuose yra nustatoma žalingų medžiagų tokių kaip reaktyviosios deguonies rūšys, heterociklinis angliavandenilis furanas ir įvairūs metalai (nikelis, švinas ar chromas). Siekiant išsiaiškinti galimus žalingus elektroninių cigarečių padarinius atliekami tyrimai, apklausos.

Epidemiologinių tyrimų duomenimis, elektroninių cigarečių rūkymas yra siejamas su chronišku kosuliu, pagausėjusiu skreplių susidarymu, bronchitu rūkantiems paaugliams ar chroniška obstrukcine plaučių liga suaugusiems (Gotts ir kt., 2019). Su gyvūnais atliktų tyrimų metu, įrodyta, jog individai, kurie serga kvėpavimo takų ligomis elektroninių cigarečių, turinčių nikotino, rūkymas didina riziką susirgti PV (Shuller ir kt., 2019). *In vitro* tyrimų pagalba įrodyta, jog elektroninių cigarečių rūkymas taip pat gali sukelti imuninių ląstelių plaučiuose pažeidimus todėl dažniau sergama bakterinėmis kvėpavimo takų ligomis (Gotts ir kt., 2019). Tačiau dėl šio žalingo įpročio jaunumo tiksli rizika žmonėms susirgti PV yra nežinoma.

Radono dujos. Antras dažniausiai PV galintis sukelti rizikos veiksnys yra radono dujos. Šios dujos natūralių procesų metu susidaro urano skilimo metu, kurios turi α radioktyvių dalelių. Dažniausiai didelės radono dujų koncentracijos patalpose susidaro dėl dirvožemio ypatybių ir / ar statybinių medžiagų (Mao ir kt., 2016). Taip pat, siejamos su kasybos pramone: didelės koncentracijos nustatomos požeminėse šachtose (Field ir Withers, 2012). Radono dujose nustatomos radioktyvios dalelės sukelia DNR pažeidimus plaučių epitelinėse ląstelėse ir cigarečių dūmai kartu su radono dujomis veikia kartu dar efektyviau sukeldami DNR pažeidimus (Prokhorov ir kt., 2014).

Su profesija susiję rizikos veiksniai. Yra nustatytos cheminės medžiagos, kurių PV riziką didinantis poveikis siejamas su profesine veikla. Joms priklauso prieš tai minėtos radono dujos ir nikelis, arsenas, bis-chlormetilo eteris, berilis, kadmis, šašiavalentis chromas, kokso ir anglių deginimo produktai, silicio dioksidai bei asbestas (Mao ir kt., 2016). Asbestas yra vienas žinomiausių ir labiausiai tyrinėtų rizikos veiksnių. Žinoma, jog kasdien profesinėje aplinkoje paveikiami žmonės su šiuo kancerogenu, susiduria su 5 kartus padidėjusia rizika susirgti PV (Prokhorov ir kt., 2014). Įvairių tyrimų duomenimis asbestas ir cigarečių dūmai veikdami kartu sukelia padidėjusią riziką susirgti PV. Specifiškai asbestas sukelia uždegiminiuosius procesus kaip ir cigarečių dūmai, kurie lemia pakitusį ląstelinį atsaką ir ląstelės gali nevaldomai dalintis bei sudaryti naviką (Klebe ir kt., 2020). Taip pat, yra nustatyta, jog asbestas ir tabako dūmai veikdami kartu didina ir PV naviko piktybiškumą, t. y. liga progresuoja greičiau (Nasim ir kt., 2019). Tačiau dėl tokių tyrimų iš asbesto gaminamų statybinių medžiagų gamyba yra uždrausta daugelyje pasaulio šalių, tačiau 2013 m. duomenimis

Rusijoje, Kinijoje, Brazilijoje, Kazachstane, Indijoje ir Argentinoje yra vis dar gaminamos (Allen ir kt., 2018).

Paveldima rizika. Didžioji dalis ligonių sergančių PV (85 %) šia liga susergera dėl žalingų įpročių, specifiskai, tabako rūkymo. Tačiau < 20 % ligonių taip pat susergera PV, todėl, manoma, jog šie ligoniai susiduria su paveldima rizika šeimoje. Yra nustatyta, jog pirmos kartos sergančiojo palikuoniai taip pat turi 2 kartus didesnę tikimybę susirgti PV. Atliktų viso genomo asociacijos tyrimų (GWAS, iš angl. *genome-wide association studies*) pagalba nustatyti genomo regionai, kurie siejami su padidėjusia rizika susirgti PV. Pavyzdžiui, 15 chromosomos ilgojo peties 25 regionas (15q25) turi 3 su nikotino metabolizmu susijusių acetilcholino receptorių genus. Todėl, palikuonys turintys atitinkamus šių genų variantus turi didesnę tikimybę susirgti PV, jei taip pat rūko tabaką (Mao ir kt., 2016). Niekada nerūkiusiems PV ligoniams, turintiems paveldėtą *EGFR* (angl., *epidermal growth factor receptor*) mutaciją (T790M) yra nustatoma rizika susirgti PV, jei gyvenimo eigoje įgaunama antros šios geno kopijos T790M mutacija. Tokia paveldimo tipo PV rizika susirgti yra ypač reta (Gazdar ir kt., 2014).

1.2 Plaučių vėžio klasifikacija

Plaučių vėžio klasifikacija pagal naviko histologiją. Pagal naviko histologiją PV skirstomas į du pagrindinius tipus: 1) nesmulkialąstelinį PV (NSLPV) ir 2) smulkialąstelinį (SLPV). Didžiajai daliai, bent 85 %, ligonių, sergančių plaučių vėžiu, diagnozuojamas NSLPV tipas. Šis PV histologinis tipas vystosi plaučių epitelinėse ląstelėse ir yra skirstomas į daugelį histologinių potipų. Sergantys NSLPV bendrai visų stadijų ligoniai išgyvena tik 15–19 % praėjus 5 m. nuo ligos diagnozės (Siegel ir kt., 2018). Tačiau, kuo anksčiau liga nustatoma, tuo didesnė 5 m. išgyvenamumo tikimybė (1.1 lentelė).

1.1 lentelė. Nesmulkialąstelinio plaučių vėžio stadijos ir ligonių 5 metų išgyvenamumas (pritaikyta pagal Žemaitis ir kt., 2018)

Stadija	5 m. išgyvenamumas
Nesmulkialąstelinis plaučių vėžys	
IA1	92
IA2	83
IA3	77
IB	68
IIA	60
IIB	53
IIIC	13
IVA	10
IVB	0

Tačiau SLPV, yra agresyvesnis PV histologinis tipas nei NSLPV. Šio tipo PV navikai formuojasi bronchuose ir nustatomos ankstyvos metastazės anksčiau nei NSLPV ir išgyvenamumo prognozė negydant paprastai yra tik 2–4 mėn. (Gridelli ir kt., 2015). Todėl sergant SLPV svarbus ligos nustatymas kuo anksčiau. Ypač, kai po sėkmingo gydymo I stadijos ligonių išgyvenamumas padidėja iki 40 %. Palyginus su NSLPV, SLPV PV gydymas chemoterapija ar radiacijos terapija yra efektyvesnis (Blandin ir kt., 2017).

NSLPV dar skirstomas į potipius pagal ląstelių morfologiją. Pagrindiniai NSLPV tipai, kurie nustatomi, yra: 1) plaučių adenokarcinoma, sudaranti ~ 80 % visų susirgimų (PA) 2) plokščių ląstelių plaučių vėžys, sudarantis ~ 20 % visų susirgimų (PPV) ir 3) stambių ląstelių karcinoma (SLK), kuri nustatoma rečiau (Barta ir kt., 2019).

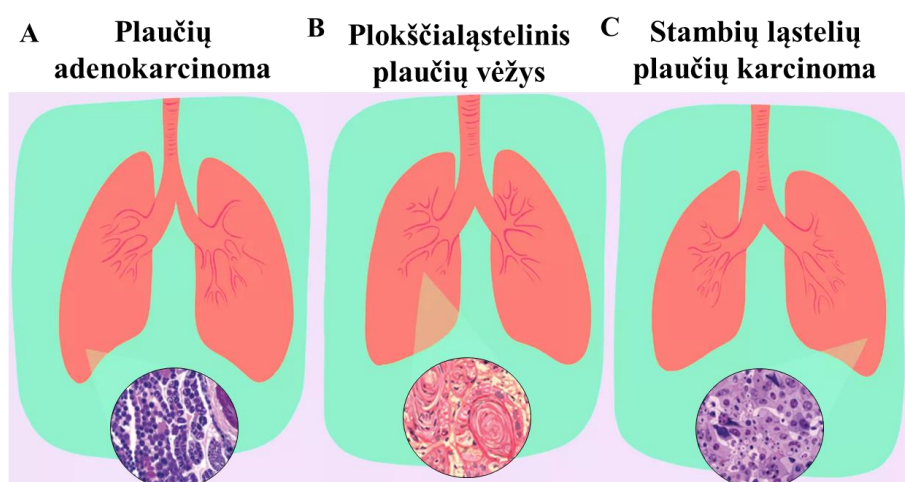
Dažniausiai iš NSLPV potipių diagnozuojama plaučių adenokarcinoma (PA). Šio potipio navikai dažniausiai aptinkami periferiniuose plaučių audiniuose, sekrecinėse ląstelėse, tačiau yra nustatomas pats didžiausias naviko heterogeniškumas nei bet kokio kito NSLPV potipio net tarp skirtingų individų. Tačiau PA auga ir plinta lėčiau nei kitos PV formos, dažniau serga moterys bei nerūkantys asmenys (Testa ir kt., 2018) (1.2 A pav.).

Plokščialąstelinio plaučių vėžio (PPV) histologiniu potipiu sergama rečiau. Tai susiję su cigarečių gaminimo industrijos pokyčiais (Gridelli ir kt., 2015). Šie navikai vystosi iš plokščių ląstelių, kurios randamos bronchuose. Joms būdingas nedidelis diferenciacijos lygis, jos greitai išplinta į stambiuosius kvėpavimo takus. Kitaip nei PA potipio navikai, PPV nenustatomas didelis heterogeniškumas, tačiau nustatyta, jog pasižymi didesniu genetiniu nestabilumu (*Cancer Genome Atlas Research Network*,

2012). Šio potipio navikai dažniausiai diagnozuojami vyrams ar rūkantiems asmenims (Langevin ir kt., 2015) (1.2 B pav.).

Stambių ląstelių karcinomos (SLK) ląstelės nuo kitų potipių išsiskiria savo dydžiu. Šioms ląstelėms nustatomas taip pat nedidelis diferenciacijos lygis, jos aptinkamos dažniausiai plaučių periferijos audiniuose. Tačiau šio histologinio potipio navikai nustatomi vis rečiau, dažniausiai kai neįmanoma diferencijuoti tarp PA ar PPV potipių (Niederhuber, 2014) (1.2 C pav.).

NSLPV skirstomas ir į kelis smulkesnius arba tarpinius histologinius potipius kaip pleomorfinė karcinoma (PFK), adenopleomorfinė karcinoma (APLK) ir smulkių plokščių bei didelių ląstelių karcinoma (SDSK) (Žemaitis ir kt., 2018). Tokie histologiniai potipai paprastai sudaryti iš prieš tai paminėtų pagrindinių trijų histologinių tipų. Specifiškai, PFK, kuri vystosi taip pat plaučių periferijoje, siekia krūtinplėvę ar APLK, kuri savo ląsteliniai pokyčiais primena nustatomus PA atveju (Sakashita ir kt., 2014).



1.2 pav. Nesmulkialąstelinio plaučių vėžio (NSLPV) histologiniai potipai: plaučių adenokarcinoma (A), plokščialąstelinis plaučių vėžys (B) ir stambių ląstelių karcinoma (C) (Lungevity, VeryWellHealth pritaikyta pagal internetinę prieigą <https://lungevity.org/> bei <https://www.verywellhealth.com/>)

Plaučių vėžio klasifikacija pagal išplitimą. NSLPV ir SLPV navikams naudojama TNM klasifikacijos sistema: pagal vėžio išplitimą ir apibūdinimą pagal pirminį naviką (T), netoliese susidariusias metastazes limfmazgiuose (N) bei organizme išplitusias metastazes (M) (Žemaitis ir kt., 2018). Išsami klasifikacija ir priskiriamais požymiais pateikta 1.2 lentelėje.

1.2 lentelė. Plaučių vėžio klasifikacija pagal TNM sistemą (pritaikyta pagal Žemaitis ir kt., 2018)

Klasifikatorius		Požymiai
T	T1	Didžiausias naviko dydis siekia ≤ 3 cm, yra apsuptas plaučio ar krūtinplėvės, plitimas ribotas;
	T2	Naviko dydis nuo > 3 cm iki ≤ 5 cm, gali būti išplitęs į bronchus, krūtinplėvę;
	T3	Naviko dydis nuo > 5 cm iki ≤ 7 cm, nustatomas išplitimas į krūtinplėvę, krūtinės sieną;
	T4	Didžiausias naviko dydis siekia > 7 cm, gali būti nustatomas išplitimas į diafragmą, tarpuplautį, širdį, didžiausias kraujagysles, trachėją, stuburą bei nustatomos naviko masės skirtingose plaučių skiltyse;
N	NX	Metastazės artimiausiuose limfmazgiuose negali būti nenustatomos;
	N0	Metastazių artimiausiuose limfmazgiuose nėra;
	N1	Metastazių artimiausiuose limfmazgiuose yra bei nustatomos tolimesniuose;
	N2	Metastazių artimiausiuose limfmazgiuose yra bei nustatomos tolimesniuose ir vienos pusės plaučių skiltyse;
	N3	Metastazių artimiausiuose limfmazgiuose yra bei nustatomos tolimesniuose, abiejų plaučių skiltyse;
M	M0	Organizme išplitusių metastazių nėra;
	M1	Organizme išplitusių metastazių yra.

Plaučių vėžys klasifikuojamas ir pagal nustatytą naviko piktybiškumą. Šios sistemos taikymas priklauso nuo vėžio tipo, tačiau paprastai I stadijos naviko ląstelės primena nenavikines, audinio pakitimų nenustatyta, II – nustatyti nedideli navikinių ląstelių ir audinio pokyčiai, III bei IV – naviko ląstelės turi išskirtinę morfologiją, nustatomi audinio pokyčiai, naviko plitimas į gretimus audinius (Danila ir kt., 2018). Tačiau jei klasifikavimo sistema nėra nurodyta taikoma ląstelių diferenciacijos sistema pagal G1 – G4 rodiklius (1.3 lentelė).

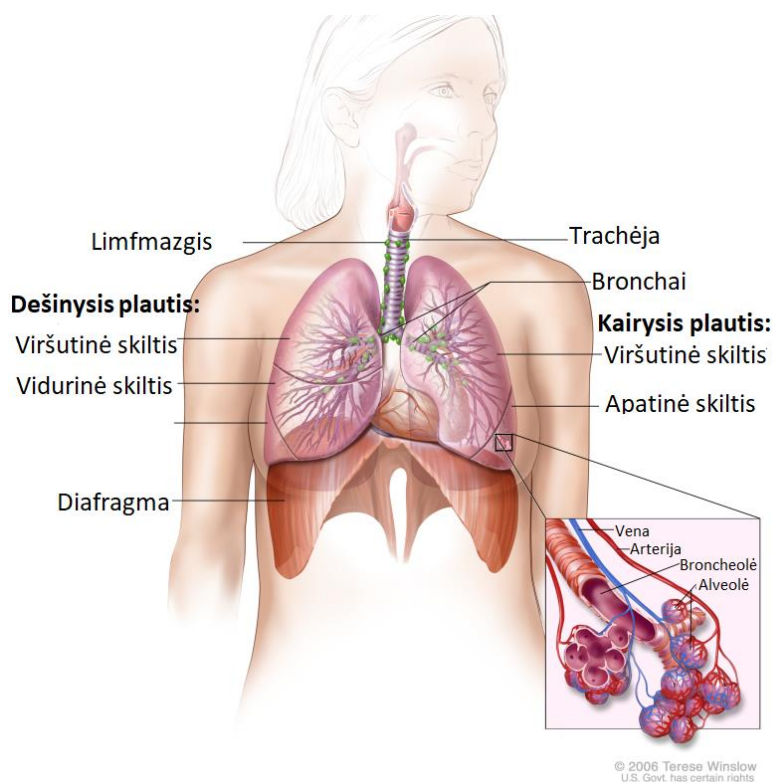
1.3 lentelė. Plaučių vėžio diferenciacija pagal G1 – G4 klasifikaciją (pritaikyta pagal Žemaitis ir kt., 2018)

G	Požymiai
GX	Diferenciacijos laipsnis nenustatytas
G1	Gerai diferencijuotas navikas
G2	Vidutiniškai diferencijuotas navikas
G3	Blogai diferencijuotas navikas
G4	Nediferencijuotas navikas

1.3 Plaučių vėžio diagnozavimas ir gydymas

PV yra klatinga ir sunkiai diagnozuojama liga, ypač ankstyvose stadijose. Ši liga yra sunkiai nustatoma dėl dviejų pagrindinių priežasčių, kurios susijusios su plaučių anatomija ir simptomų bendrumu su kitomis ligomis. Pirmoji priežastis yra

susijusi su plaučių periferijos sandara, kurią sudaro smulkios kapiliarais apvyniotos pūslelės ir skausmo receptorių trūkumo (1.3 pav.) (Danila ir kt., 2018).



1.3 pav. Žmogaus kvėpavimo sistemos sandara (*PDQ Cancer Information Summaries*, pritaikyta pagal internetines prieigą: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK65865/>)

Dėl šios priežasties naviko vystymasis gali nesukelti jokių nemalonių simptomų ir yra diagnozuojamas vėlyvose stadijose. PV simptomai sutampa su kitų nepiktybinių ligų simptomais, kaip kosulys, dusulys, krūtinės skausmas, kurie nesukelia didelių nepatogumų. Dėl to ligoniai kreipiasi į specialistus tik simptomams sunkėjant, kai liga progresuoja (Danila ir kt., 2013).

Diagnozavimas. Prevencinė PV patikros programa Lietuvoje nėra vykdoma taip kaip priešinės liaukos, storosios žarnos, krūties ir gimdos kaklelio vėžio programos. Diagnostiniai PV tyrimai atliekami tik asmenims, kurie patys kreipiasi į gydymo įstaigas arba atliekant privalomuosius tyrimus sveikatos priežiūros įstaigose. Pagrindiniai būdai, kurie taikomi įvertinti plaučių sveikatos būklę yra sveikatos istorija, fizinė apžiūra, krūtinės ląstos rentgeno tyrimas (Aalst ir kt., 2016). Tačiau jei įtariamas PV, asmenims taikoma platesnio masto sveikatos apžiūra. Taikomi mikroskopiniai skreplių tyrimai nustatyti vėžines ląsteles, imunohistocheminiai tyrimai, bronchoskopijos (trachėjos ir bronchų gleivinės apžiūra) taip pat audinio biopsijos iš bronchų gleivinės ar aspiracinė periferinio plaučių audinio biopsija (Žemaitis ir kt.,

2013). Taikoma ir branduolio magnetinio rezonanso, pozitronų emisijos, kompiuterinės tomografijos tyrimai, kurių metu nustatoma tiksli PV lokalizacija ir išplitimas. Jungtinėse Amerikos Valstijose, pradėta plačiau taikyti kompiuterinės tomografijos tyrimą didesnės rizikos grupei: asmenims surūkantiems daugiau nei 30 cigarečių pakelių per metus. Toks pirminės ankstyvos diagnostikos periodinis testas vykdytas asmenims 7 m. padėjo nustatyti PV anksti ir pagerino ligonių išgyvenamumą 20 % (Hirsch ir kt., 2016)

Diagnozuoti koks yra PV diferencijavimo laipsnis, gali būti taikomi ir serologiniai vėžio žymenys. Epitelinių ląstelių NSLPV serologiniai žymenys, kurie naudojami nustatant koks naviko histologinis tipas, yra struktūrinis ląstelių baltymas citokeratino 19 fragmentas (CYFRA 21-1 iš angl., *cytokeratin 19*) ir glikoproteinas SCCA (iš angl. *squamous cell carcinoma antigen*). Šie du žymenys siejami su NSLPV potipiu PPV (Pujol ir kt., 2001; Røijer ir kt., 2003). Baltymų kaip SCCA ir CYFRA 21-1 padidėjusi koncentracija kraujo serume gali būti naudinga nustatant ir atsaką į gydymą, įvertinti ligos progresiją (Edelman ir kt., 2012; Zamay ir kt., 2017). Kito histologinio PV tipo – SLPV serologiniai vėžio žymenys: neuronų specifinė enolazė (NSE, iš angl., *neuron specific enolase*) ir progastriną atpalaiduojantis peptidas (proGRP, iš angl., *gastrin releasing peptide*). Žinoma, kad jei šių žymenų koncentracija ligonių kraujyje yra padidėjusi, jie yra siejami su trumpesniu išgyvenamumu. Šiuo metu naudojamas ir dar vienas baltyminis žymuo esantis DNR replikatyvinės helikazės komplekse, kuris vadinamas PSF3 (angl., *GIN5 complex subunit 3*) ir yra specifinis tik AD histologiniam NSLPV potipiui (Zamay ir kt., 2017). Tačiau, ieškant naujų ir specifiškesnių baltyminių žymenų diagnostikai rasti aptamerai, kurių pritaikymas nepriklauso nuo prieš tai minėtų biologinių žymenų specifiškumo su antikūnais, nėra glaudžiai susiję su jų gamybos proceso sėkme. Aptamerų veikimas panašus į antikūnų, tačiau jie specifiškesni ir gali būti lengvai modifikuojami bei pritaikomi diagnostikoje su kitomis vaizdinėmis priemonėmis kaip magnetinio rezonanso vaizdavimu, pozitronų emisijos ar kompiuterine tomografija (Kamada, 2012). Tokių naujų diagnostinių žymenų pritaikymas, tobulinimas ir naujų kombinacijų ieškojimas yra efektyvus, tačiau laiko tarpas kol patvirtinamas jų efektyvumas yra didelis. Todėl didelis dėmesys skiriamas ir pirminių rodiklių, ieškojimams, kad ląstelė virsta navikine bei jų pritaikymas gydymui. Genetiniai molekuliniai žymenys plačiau aptariami 1.5 skyrelyje.

Gydymas. PV sergantiems asmenims skiriamas gydymas priklauso nuo naviko histologijos, ligos stadijos, bendros sveikatos būklės ir gretutinių ligų. Dažniausiai taikomi gydymo tipai yra chirurgija, radioterapija ir chemoterapija. Prieš parenkant

gydymą ypač svarbu nustatyti naviko histologiją, nes dviejų pagrindinių tipų NSLPV ir SLPV gydymas skiriasi. Vienas iš perspektyviausių gydymų t.y. naviko pašalinimas chirurginiu būdu taikomas tik NSLPV I, II ir tik tam tikriems III stadijos ligoniams. O tuo tarpu SLPV paprastai pirmiausia gydomas chemoterapija, nes šio histologinio tipo navikas ypač agresyvus ir ankstyvoje ligos eigoje jau yra nustatomas metastazės (pagal internetinę prieigą: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK65865/>).

Chirurginis gydymas NSLPV paprastai atliekamas pašalinant plaučių skiltį, kurioje nustatoma naviko masė. Tačiau gydymo sėkmė priklauso nuo daugelio faktorių ir taikoma skirtingai kiekvienam ligoniui. Prieš chirurginį gydymą kai kuriems ligoniams taip pat taikoma ir pirminė chemoterapija, kuri paprastai ilgina išgyvenamumą pirminių stadijų NSLPV navikams (Kodama ir kt., 2016). Tačiau ši terapija nėra taikoma plačiai ir reikalingi išsamesni tyrimai, kurie leistų įvertinti ar terapija yra veiksminga ir ar prailgina išgyvenamumą. Tačiau chemoterapijos taikymas po pirminio chirurginio gydymo ar radioterapijos yra veiksmingesnis. Yra nustatyta, jog II ir IIIA stadijų ligoniams po chirurginio taikomas chemoterapinis gydymas padėjo išgyventi 5,4 % be ligos progresijos (Duma ir kt., 2019). Navikams, kuriems negali būti taikomas chirurginis gydymas, ypač III stadijos NSLPV navikams, plačiausiai taikoma chemoterapija, tačiau JAV prieš metus taip pat pradėjo taikyti ir kitą gydymo būdą – imunoterapiją. Ši terapija paremta prieš programuotą ląstelės žūties ligandą 1 (PD-L1 iš angl., *programmed death-ligand 1*) ir specialiai sukurti antikūnai, kurie blokuoja PD-L1 ląstelės paviršiuje neleisdami jam prisijungti prie ligando receptorių. Tokiu būdu naviko ląstelės negali išvengti imuninio atsako ir jos yra naikinamos (Ribas ir kt., 2016; Rimm ir kt., 2017).

Ligoniams sergantiems PV taip pat taikomas gydymas, kuris vadinamas molekuline „taikinine“ arba specializuota terapija. Vienas iš didžiausių tokio gydymo privalumų yra vaistų specifiškumas. Dėl tokio specifiškumo vaistai nėra toksiški kitoms ląstelėms, audiniams kaip po radioterapijos, chemoterapijos metu (Hirsch *et al.*, 2016). Šio gydymo tikslas yra nustatyti genetinius molekulinis taikinius, kurių blokavimas stabdytų vėžio ląstelių formavimąsi ir dalijimąsi. Genomo pokyčiai, kurie virsta mutacijomis, yra viena iš priežasčių lemiančių somatinės ląstelės virstimą į vėžinę. Tokie pokyčiai įvykę DNR molekulėje po transliacijos į pakitusius baltymus gali būti nevaldomo ląstelės dalijimo ar mirties procesų išjungimo priežastimi (Lee ir kt., 2018). Potencialūs genetiniai molekuliniai taikiniai, kurie gali būti blokuojami terapijos metu yra įvairūs ląstelės augimo faktoriai, signalinės molekulės, ląstelės ciklą, apoptozę reguliuojančios molekulės ir angiogenezės proceso reguliatoriai (Hirsch ir kt., 2016).

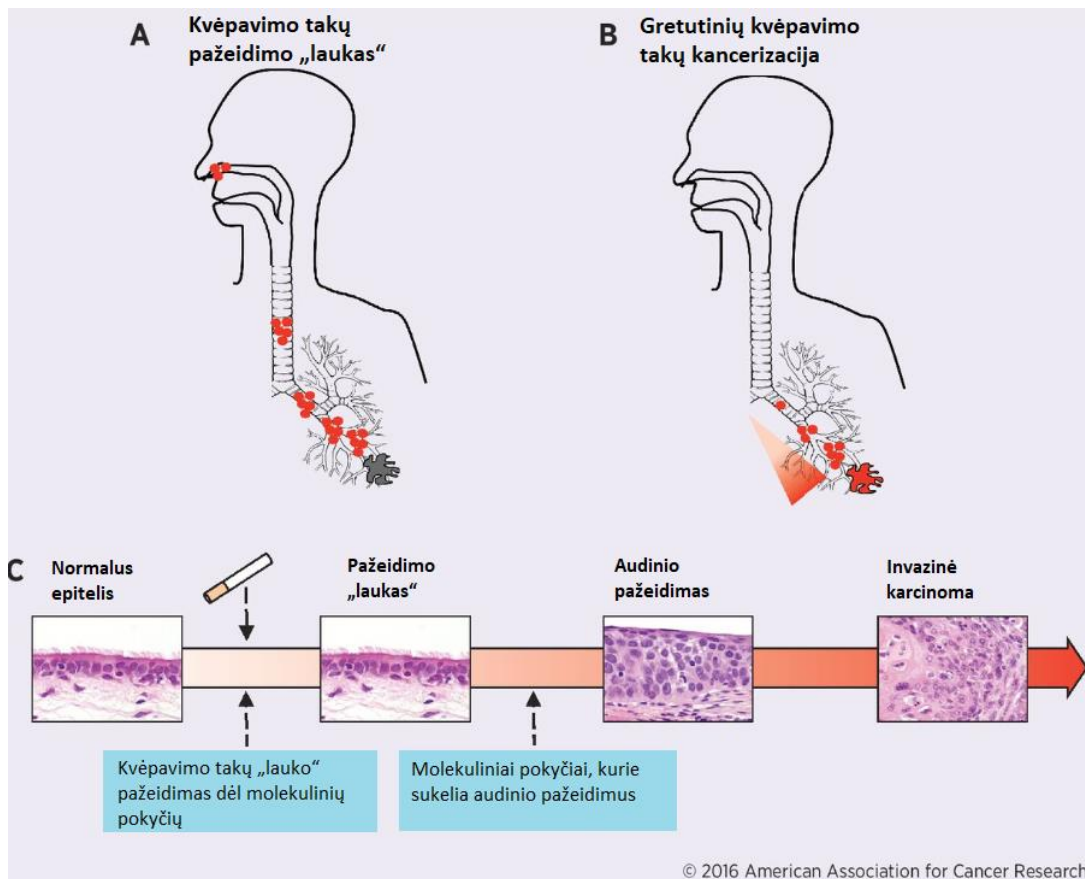
Žinoma, kad 69 % III–IV stadijos PV ligonių turi nustatomų mutacijų ir tokių sutrikusio veikimo baltymų veikimo stabdymas yra vykdomas pasirenkant taikiniu pačią navikinę ląstelę arba jos mikroaplinką (Hill ir kt., 2019). Jei NSLPV taikomas gydymas nukreiptas į vėžinę ląstelę, priklausomai nuo detektuotų genetinių pakitimų, skiriami epidermio augimo faktoriaus receptorių (*EGFR*, angl., *epidermal growth factor receptor*), anaplastinės limfomos kinazės receptorių (*ALK*, angl., *anaplastic lymphoma kinase*) ar reaktyvaus deguonies rūšies (*ROS1*, angl., *reactive oxygen species*) tirozino kinazės receptorių blokatoriai (Hirsch ir kt., 2016). Šių genų tirozino kinazės blokatorių pritaikymas NSLPV ligonių gydymui padeda sulėtinti ligos progresiją. Specifiškai EGFR blokatoriai taikomi kartu su chemoterapija pirminio gydymo metu daugeliu atveju ~ 10 mėn. sulėtino ligos progresiją. Tačiau blokatoriai veikiantys prieš ALK didesnę efektyvumą turi be papildomo chemoterapinio gydymo ir ligoniai be progresijos išgyveno ilgiau nei gydomi chemoterapija (16,6 vs 8,1 mėn.). Panašaus efektyvumo nustatyti ir prieš ROS1 veikiantys blokatoriai, kurie taip pat sulėtino ligos progresiją (Duma ir kt., 2019). Kiti blokatoriai taip pat taikomi NSLPV gydyme, kurie veikia naviko mikroaplinką. Vienas iš jų blokuojantis naviko augimą yra kraujagyslių endotelio augimo faktoriaus (*VEGF*, angl., *vascular endothelial growth factor*) receptorių blokatorius. Jų naudojimas kartu su chemoterapija padidino ligonių išgyvenamumo trukmę kaip ir *EGFR* mutacijų turinčių ligonių. Tačiau žinomi ir šalutiniai šio vaisto naudojimo poveikiai, kaip širdies ritmo, kraujo krešėjimo sutrikimai ir jo skyrimas yra nerekomenduojamas III–IV stadijos NSLPV ligoniams (Lee ir kt., 2018). Šių genų mutacijas turintiems ligoniams gydymo privalumai yra klinikinių tyrimų duomenims patvirtinti. Tačiau taip pat ieškomos ir kitų genų mutacijos, kurios yra retos, tačiau yra potencialūs taikiniai terapijai. Pavyzdžiui *BRAF* (angl., *v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1*), *MET* (angl., *MET proto-oncogene*), *RET* (angl., *rearranged during transfection*) genų pakitusio baltymo blokavimas taip pat yra patvirtintas klinikiniais tyrimais, tačiau tokių genų kaip *KRAS* (angl., *Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*) ar *PIK3CA* (angl., *phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha*) baltymų blokavimo efektyvumas vis dar tiriamas (Duma ir kt., 2019).

1.4 NSLPV vystymasis

Žmogaus epiteliniai navikai kaip NSLPV yra susijęs su pamažu ląstelėse besikaupiančiomis DNR pažaidomis, kurios, manoma, nėra viena nuo kitos susijusios,

tačiau paprastai veikia svarbiausiuose ląstelės gyvavimo ir dalijimosi procesuose. Šios pažaidos, dažniausiai įvyksta dėl genotoksinį poveikį turinčių medžiagų, kurios, pavyzdžiui, randamos cigarečių dūmuose (Waqar ir kt. 2017). Šiuose pagrindiniuose signaliniuose keliuose veikia baltymai, kurie yra navikų augimą slopinančių genų (NSG) ir naviko augimą skatinančių (NAS) genų produktai. Genai, kurie vadinami NSG stabdo ląstelių dalijimosi ciklą neigiamai veikiančius reguliatorius. Šie genai užtikrina ląstelės ciklo sustojimą „patikros punktuose“ (angl. *check point*), kuriuose ląstelės tikrinamos dėl DNR pažaidų. Tuo tarpu genai, kurie vadinami NAS yra žinomi kaip ląstelės dalijimąsi ir dauginimąsi skatinantys ląstelės ciklo dalyviai (Pagel ir kt., 2019). Tiksliai laiko juosta kurio metu ir kurie pokyčiai vyksta genų sekose iki šiol nagrinėjama, analizuojamas specifiskumas įvairiems genotoksiniams, kaip pvz.: policikliniai aromatiniai angliavandeniliai tabako dūmuose ar asbestas (Waqar ir kt. 2017). Tačiau visi pokyčiai genų koduojamose sekose susiję su svarbiausiais vėžinės ląstelės bruožais: sumažėjęs jautrumas ląstelės augimą stabdantiems reguliatoriams ar intensyvi jų gamyba, užprogramuotos ląstelės mirties išvengimas, ląstelės diferenciacija iš epitelinių į mezenchimines pasiekti šalia esantiems audiniams, nepertraukiama angiogenezė ar jos iniciacija, ląstelės metabolizmo pokyčiai ir imuninio atsako išvengimas (Imielinski ir kt., 2014).

Yra žinoma, kad įvairių molekulinės kilmės ląstelių pokyčių susidaro iki vėžiniai audinio pažeidimai, kuriems progresuojant išsivysto navikas. Molekulinius pokyčius ir atitinkamai ląstelių bei audinio pažeidimus gali sukelti rūkymas (1.4 A pav.). Tokių pirminių molekulinų pokyčių ir iki vėžinių audinio pažaidų ieškojimas gali būti naudingas ankstyvų stadijų NSLPV diagnozavimui (Kadara ir kt., 2016). Dėl specifinės plaučių sandaros, toksiškų medžiagų poveikio kvėpuojant molekuliniai pokyčiai paveikia ne tik tam tikrą iki vėžinio pažeidimo regioną, bet ir gretutinius kvėpavimo takus (3.11 B pav.). Todėl molekulinų pokyčių analizė ir gretutiniuose kvėpavimo takuose gali padėti išsiaiškinti NSLPV vystymosi procesus (3.11 C pav.). Gretutinių audinių naudingumas NSLPV vystymosi analizei buvo įrodytas naudojant 232 genų raiškos pokyčius, kurių skirtumai padeda diagnozuoti ankstyvus iki vėžinio audinio pokyčius ir, atitinkamai, prognozuoti susirgimą NSLPV (Whitney ir kt., 2015) Jei norima nustatyti iki vėžinio audinio regionų pažeidimus ir gretutinių kvėpavimo takų pažeidimus, skysčių biopsija gali būti labai patogus tyrimo objektas (Kadara ir kt., 2014).



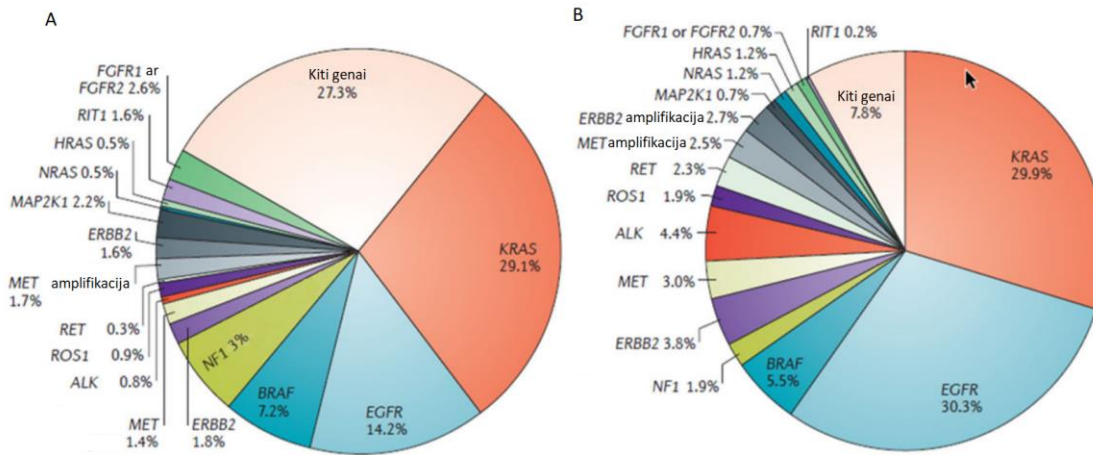
1.4 pav. NSLPV vystymosi etapai dėl molekulinų pokyčių ir jų poveikis iki vėžinio kvėpavimo takų „lauke“ (A), gretutiniuose kvėpavimo takuose (B) ir šių procesų progresija iki invazinės karcinomos (C); raudoni taškai – genų raiškos pokyčiai (parengta pagal Kadara ir kt., 2016)

Dažniausio NSLPV potipio AD plaučių periferinės ikinavikinės pažaidos vystosi iš II tipo pneumocitų, kurie vykdo dujų apykaitą. Tačiau pneumocitų diferenciacija į navikines ląsteles yra iširta vienoje ikinavikinėje epitelinio audinio pažaidoje – netipinėje adenomatoziniėje hiperplazijoje (angl., *atypical adenomatous hyperplasia*). Hiperplazija – tai audinių kiekio padidėjimas, nustatomas dažniausiai navikuose dėl nevaldomo ląstelių dalijimosi ir net 40 % NSLPV ligonių ši pažaida yra nustatoma. Hiperplazija nustatoma šalia plaučių alveolių ir nuo kitų panašaus tipo pažaidų skiriasi tuo, kad invazija į gretimus audinius nevyksta (Kadara ir kt., 2014). Tačiau šio tipo hiperplazija yra būdinga tik keletui NSLPV potipių, o daugelio potipių, ne tik AD, vystymasis iki naviko nėra iki galo žinomas. Viena iš perspektyviausių vystymosi analizių yra molekulinų pažaidų analizė. Daug daugiau yra žinoma apie molekulinis pokyčius kurie vyksta ikinavikinėse ląstelėse iki progresijos. Molekuliniai pokyčiai yra naudojami nustatyti kaip vystosi NSLPV, bet ir įvertinti būdingus pokyčius skirtingiems histologiniams potipiams, pokyčių skirtumams tarp rizikos grupių susirgti PV (pavyzdžiui, tarp rūkančių).

1.5 Genomo molekuliniai pokyčiai būdingi NSLPV

Visi PV tipai yra žinomi kaip navikai, kuriuose nustatomas didelis skaičius somatinių mutacijų, chromosomų pečių ir tarpchromosominių įvykusių translokacijų, genų kopijų skaičiaus pakitimų (Imielinski ir kt., 2014). Genų pažaidos, kurios vyksta egzonuose yra plačiausiai ištyrinėtos. Pačios paprasčiausios mutacijos, kuriose įvykęs nukleotido pokytis vadinamos vieno nukleotido polimorfizmu (VNP). Neteisingai įjungta azotinė bazė replikacijos ar reparacijos metu gali lemti aminorūgšties pokytį baltyme ir taip pakeisti baltymo funkciją. DNR sekos nekeičiančios mutacijos kaip insercijos, iškritos ir sudėtingi šių mutacijų variantai, nekeičiantys aminorūgščių sekų, yra rečiau analizuojami onkologijoje. Nekeičiančios aminorūgščių mutacijos vadinamos tokiomis dėl kurių nukleotidų iškritos arba insercijos vyksta nukleotidų skaičiumi dalinamu iš trijų, todėl yra nesutrikdomos informacijos RNR (iRNR) sekos, kuriose trys nukleotidai vykstant translacijai koduojami aminorūgštimis (Pagel ir kt., 2019).

Genomo molekuliniai pokyčiai būdingi AD. Šis histologinis NSLPV potipis žinomas kaip egzonuose turintis vidutiniškai 12 mut. / Mb., taip pat turi 26 regionus, kuriuose gali vykti viso chromosomos peties amplifikacija ar iškrita, 31 regioną, kuriuose gali vykti genų kopijų skaičiaus pokyčiai ir 98 chromosomų persitvarkymo trūkių taškus. Šių molekulių pokyčių gausa neleidžia įvertinti, kurie pokyčiai yra pagrindiniai, lemiantys naviko vystymąsi ir, kurie pokyčiai atsiranda dėl bendro genomo nestabilumo (Imielinski ir kt., 2014). Pirmieji genomo molekuliniai pokyčiai, kurie buvo nustatyti AD yra *Kirsten* žiurkių sarkomos (*KRAS*, atitinkamai iš angl., *Kirsten rat sarcoma*), neuroblastomos RAS onkogeno virusinio homologo (*NRAS*, atitinkamai iš angl., *neuroblastoma RAS viral oncogene homolog*), naviko baltymo p53 (*TP53*, atitinkamai iš angl., *tumor protein p53*) genams. Didėjant technologijų gausai atrasti ir kiti AD būdingi genai, tokie kaip: *EGFR*, *ERBB2* (angl., *erb-b2 receptor tyrosine kinase 2*), *BRAF* (angl., *b-raf proto-oncogene*) ir *ALK* (Skoulidis ir Heymach, 2019). Žinoma, kad tam tikrų genų mutacijos dažniausiai nustatomos rūkantiems, pavyzdžiui, *KRAS*, *TP53* pokyčiai, o nerūkantiems nustatomos dažniau *EGFR*, *ERBB2* bei *ALK*, *RET* (angl., *rearranged during transfection*) ir *ROS1* translokacijos. Moksliskai įrodyta, kad progresuojant AD nustatomos skirtingos mutacijos ar jų dažniai (Chu, 2020) (1.5 pav.).



1.5 pav. Pagrindiniai genai ir jų mutacijų dažniai, kurios nustatomi NSCLP potipiui AD (A) ir AD progresuojant (B) (pritaikyta pagal Skoulidis ir Heymach, 2019)

Genomo molekuliniai pokyčiai būdingi PPV. Šis histologinis NSCLP potipis pasižymi dar nestabilesniu genomu negu AD. Dažniausiai mutacijos nustatomos CpG dinukleotidų sekose ir nustatomos net 20,6 mut. / Mb. Genų raiška taip pat yra pakitusi palyginus su AD. Dažniausi genai, kurių raiška yra pakitusi PPV potipyje yra *SOX2* (angl., *SRY-box transcription factor 2*), *PIK3CA* (angl., angl., *phosphoinositide-3-inase, catalytic, α polypeptide*), *NOTCH1* (angl., *neurogenic locus notch homolog protein 1*) ir *TP63* (angl., *tumor protein p63*). *SOX2* genas yra žinomas, kaip vienas iš pagrindinių genų plokščių ląstelių diferenciacijoje. PPV, kitaip nei AD potipyje, *EGFR* ir *KRAS* mutacijos nustatomos retai, tačiau dažnos *FGFR* (ang., *fibroblast growth factor receptor*) ir *ERBB2* genų amplifikacijos (Skoulidis ir Heymach, 2019).

1.5.1 Dažniausios genų mutacijos NSCLP

***EGFR* geno mutacijos.** Šis receptorių pirmą kartą buvo aprašytas prieš ~ 20 m. ir *EGFR* geno mutacijos yra ypač plačiai ištyrinėtos. Šio receptorių padidėjęs aktyvumas nustatomas esant įvairiems navikams, taip pat ir NSPV. Padidėjęs *EGFR* aktyvumas dėl *EGFR* geno didesnės raiškos, amplifikacijos, aktyvuojančių mutacijų ar ligandų didesnės raiškos yra susijęs su AD vystymosi procesais (Sakashita ir kt., 2014). Dažniausios mutacijos, nustatomos net 90 % visų atvejų yra 18 egzone (pvz., aminorūgščių pokytis G719A), 19 egzone nustatomos iškritos (pvz., esančios 746 aminorūgšties pozicijoje), 20 ir 21 egzonuose nustatomi VNP (pvz., T790M ir L858R) (Isaksson ir kt., 2013). PV navikai turintys *EGFR* mutacijas dažniausiai taip pat turi *TP53* (54,6–64,6 %) ir *PIK3CA* (9–12,4 %) mutacijas (Skoulidis ir Heymach, 2019). *EGFR* geno mutacijos dažniausiai nustatomos nerūkantiems, Azijos gyventojams, moterims ir jaunesnio amžiaus ligoniams (Hill ir kt., 2019).

ALK geno translokacijos. Geno seka yra išsidėsčiusi 2 chromosomos trumpajame petyje 23 regione (2p23). Šis genas koduoja receptorių, kuris priklauso insulino receptorių superšeimai. Šio geno mutacijos NSLPV yra dažniausiai atsirandančios dėl chromosomų pečių translokacijų su *EML4* (angl., *echinoderm microtubule-associated protein-like 4*) (Hill ir kt., 2019). Susidaręs pakitęs ir nuolat aktyvus baltymas nustatomas 2–7 % NSLPV navikuose ir dažniausiai nustatomas AD potipyje, nerūkantiems ir jaunesniems ligoniams (Oberndorfer ir Mullauer, 2017).

BRAF geno mutacijos. Šis genas pirmą kartą nustatytas buvo 2002 m., jo baltymas priklauso serino – treonino kinazių šeimai ir jų pagrindinė funkcija yra ląstelių plitimo ir išgyvenimo signalų perdavimas (Hill ir kt., 2019). *BRAF* mutacijos yra nustomos 1–3 % NSLPV navikų. Pati dažniausia (50 %) aktyvuojanti mutacija yra V600E, kuri susidaro dėl vienos bazės pakaitos. Kitos žinomos, tačiau retesnės ir priešingo poveikio šio geno mutacijos yra G469A, D594G, K601E, G464E, G596R, A598T, G606R bei G469V. Šio geno mutacijos nustatomos PA potipyje ir rūkančių ligonių navikuose, paprastai nėra susijusios su kitų genų mutacijomis (Oberndorfer ir Mullauer, 2017).

ERBB2 geno mutacijos. Genas išsidėstęs 17 chromosomos ilgojo peties 12 regione (17q12) ir dar vadinamas *HER2* (angl., *human epidermal growth factor receptor 2*). Šio geno mutacijos nustatomos 1–4 % NSLPV navikų (Hill ir kt., 2019). Dažniausiai mutacijos įvyksta geno 20 egzone ir yra aktyvuojanti kitus signalinius kelius, kaip, pvz., PI3K/AKT/mTOR (Oberndorfer ir Mullauer, 2017).

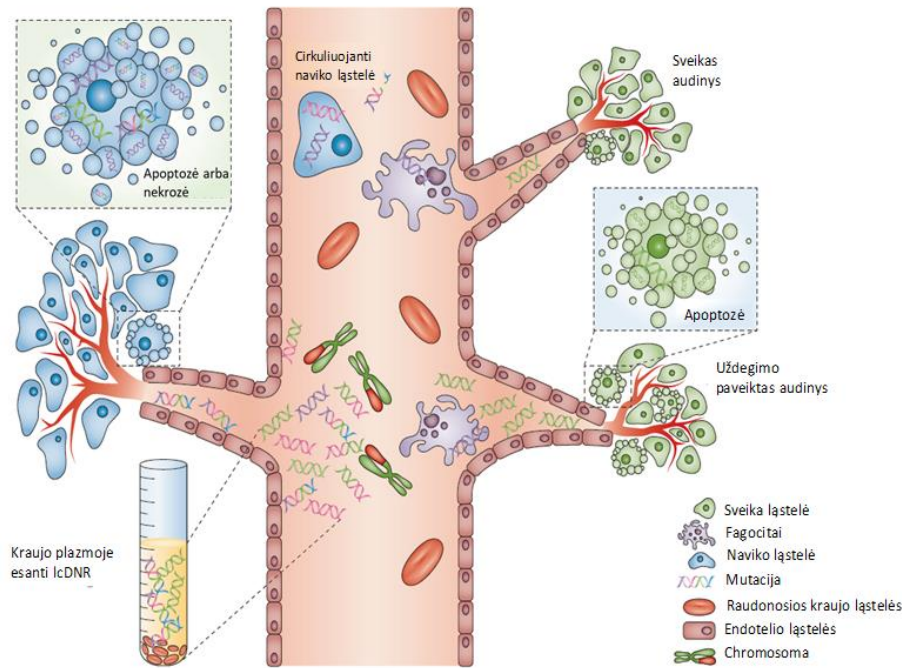
KRAS geno mutacijos. Geno seka išsidėsčiusi 12 chromosomos trumpojo peties 12.1 regione (12p12.1) ir pagrindinė jo funkcija yra ląstelės dalijimosi reguliavimas. Šis genas priklauso MAPK (angl., *mitogen-activated protein kinase*) signaliniam keliui, kuris reguliuoja ne tik dalijimąsi, bet ir angiogenezę, ląstelių diferenciaciją. Tai vienas iš dažniausiai nustatomų mutuočių genų NSLPV (20–30 %), o *KRAS* geno G12C mutacija dažniausiai būdinga rūkantiems (Hill ir kt., 2019).

MET geno mutacijos. Tirozino kinazės hepatocitų augimo faktorius yra išsidėstęs 7 chromosomos ilgojo peties 31 regione (7q31), pirmą kartą aprašytas XX a. pabaigoje. MET baltymo pagrindinė funkcija yra tarpmembraninio signalo perdavimas MAPK signaliniame kelyje. Geno pažaidos gali būti įvairios, pvz., geno padauginimas, pertvarkymas ir mutacijos (Hill ir kt., 2019). Geno padauginimas nustatomas 2–4 % NSLPV navikuose. 3 % PA navikų turi ir 14 egzono splaisingo srityje nustatomų mutacijų, dėl kurių įvyksta viso 14 egzono iškrita. Dėl šios mutacijos baltymas skatina navikinių ląstelių paplitimą (Oberndorfer ir Mullauer, 2017).

ROS1 geno translokacijos. Geno seka išsidėsčiusi 6 chromosomos ilgojo peties 22 regione (6q22) ir, kaip *ALK*, priklauso insulino receptorių superšeimai. Šio geno pastovi raiška yra siejama su kitų signalinių kelių, pvz., MEK / ERK ar PI3K / AKT aktyvinimu. NSLPPV navikuose *ROS1* mutacijos nustatomos dėl chromosomų translokacijų su, pvz., *FIG* (angl., *fused in glioblastoma*) ar *SDS* (angl., *serine dehydratase*) (Hill ir kt., 2019). *ROS1* susiliejimas su kitais genais yra nustatomas 1 % PA navikų ir ši mutacija labiau būdinga jauniems bei nerūantiems ligoniams (Oberndorfer ir Mullauer, 2017).

1.6 Skysčių biopsija

Siekiant nustatyti molekulinis pokyčius vykstančius ląstelėse, dažniausiai pasitelkiama audinio biopsija. Tačiau, tai ypač sudėtinga procedūra PV ligoniams, kuri kartais neįmanoma (~ 30 %), nes NSLPPV potipio navikams gali būti būdingas vystymasis sunkiai pasiekiamuose regionuose (Elazezy ir Joosse, 2018). Jei biopsijos paėmimas yra įmanomas dažnai mėginio kiekis yra labai nedidelis ir paprastai tik nedidelė dalis audinio yra navikinės ląstelės. Antros biopsijos paėmimas ligos gydymo eigoje ar jai progresuojant dažnai yra neįmanomas (Herbreteau ir kt., 2018). Taip pat, po tokios procedūros daliai ligonių pasireiškia komplikacijos, kurios gali varijuoti nuo kraujavimo, kvėpavimo sutrikimų iki širdies veiklos sutrikimų, pvz.: aritmijos (Wan ir kt., 2017). Yra žinoma, kad dėl naviko heterogeniškumo audinio biopsijos metu nustatomi genetiniai molekuliniai pokyčiai ne visada atspindi visą įvairovę (Said ir kt., 2020). Dėl šių priežasčių viena iš geriausių alternatyvų yra skysčių biopsija. Taip pat, skysčių biopsija atspindi ne tik naviko heterogeniškumą, bet ir naviko metastazavimo lygį (Herbreteau ir kt., 2018). Skysčių biopsija gali būti laikomas kraujas, šlapimas, seilės, krūtinplėvės nuoplovos ar kiti kūno skysčiai. Skysčių biopsijos privalumas lygiant su audinio biopsija yra minimaliai invazyvus mėginio surinkimas. Metodų naujumas ir pritaikymas skystosios biopsijos tyrimuose yra toks pat inovatyvus kaip ir naudojamiems audinio biopsijoje. Gali būti parenkami ir patys naujausi viso genomo analizės metodai kaip naujos kartos sekoskaita (NKS) (Li Y ir kt., 2018). Skystosios biopsijos tyrimuose ieškoma navikui specifinių produktų, kaip, pavyzdžiui, cirkuliuojančios DNR (cirDNR) ir RNR, baltymų, cirkuliuojančių vėžio ląstelių, egzosomų (Siravegna ir kt., 2017) (1.6 pav.).

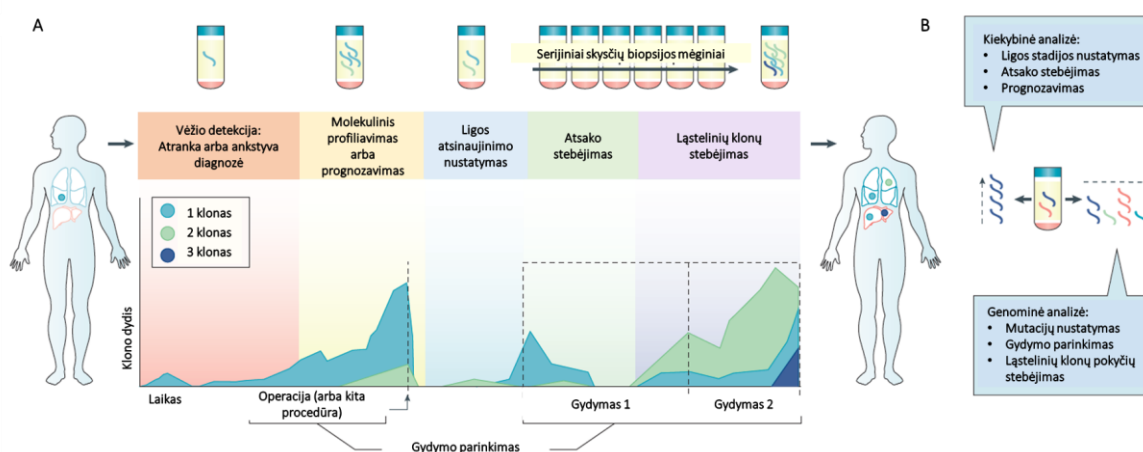


1.6 pav. Cirkuliuojančios DNR patekimas į kraują ir jos skyrimas (parengta pagal Crowley ir kt., 2013)

Svarbiausia priežastis atspindinti skysčių biopsijos pranašumą prieš audinio biopsiją yra ta, kad ėminys gali būti pakartotinai renkamas ir būti naudojamas ne tik įvertinti ligos gydymo tinkamumą, efektyvumą, bet ir ligos progresiją (Li Y ir kt., 2018). Vienas iš geriausiai žinomų skystosios biopsijos pritaikymo klinikoje būdų yra *EGFR* 790M mutacijos nustatymas cirkDNR. Tai padeda įvertinti ar ligoniui taikininės terapijos pritaikymas bus efektyvus (Santarpia ir kt., 2018). Taip pat atlikti ir kiti tyrimai, kurie padėjo stebėti ligos progresiją ir atsinaujinimą. Pavyzdžiui, Diehl ir kolegų storosios žarnos vėžio ligoniams po operacinio gydymo skystoji biopsija padėjo nustatyti ligos atsinaujinimą ištyrus kraujo plazmos mėginius, kuriuose nustatytos ligai būdingos *KRAS*, *PIK3CA* ir *TP53* genų mutacijos (Diehl ir kt., 2008). Panašaus tipo tyrimas, kuris buvo atliktas vėliau taip pat naudojant skysčių biopsiją nustatyti ligos atsinaujinimą krūties vėžio ligoniams (Garcia-Murillas ir kt., 2015). Skysčių biopsijos jautrumas ir specifiskumas taip pat buvo įrodytas nustatant ligos pasireiškimo riziką ar ligos progresiją, kai klinikoje naudojamos vaizdavimo technologijos (pvz., kompiuterinė tomografija) yra nejautrios tokių nedidelių pokyčių nustatymui. Chen ir kolegų tyrime cirkDNR koncentracijos pokyčiai padėjo 8 mėn. anksčiau nustatyti ligos atsinaujinimą, palyginus su vien klinikoje naudojamais prognozavimo metodais (Chen ir kt. 2017).

1.7 Cirkuliuojanti DNR

Skysčių biopsijoje, pvz., periferiniame kraujyje ar kituose onkologinėmis ligomis sergančių ligonių kūno skysčiuose nustatoma cirDNR (Said ir kt., 2020). Per pastaruosius dešimtmečius buvo įrodyta, jog vėžiu sergantys ligoniai turi padidėjusią cirDNR koncentraciją palyginus su sveikais individualais kraujo plazmoje, šlapime (Bronkhorst ir kt., 2019). Taip pat buvo nustatyta, jog, šios nedidelio ilgio iki 200 nt DNR sekos, gali būti panaudojamos analizuoti specifinius genominius ir eipigenominius pokyčius vykčius ląstelėje iš kurios DNR tapo cirkuliuojančia (Wan ir kt., 2017). Šios DNR molekulės gali būti panaudotos daugybėje sričių, kaip stadijos ir prognozės nustatymui, naviko lokalizacijai organizme, gydymo pritaikymui, atsakui į jį, ligonio stebėsenai (Bronkhorst ir kt., 2019) (1.7 pav.). Nepaisant didžiulių pritaikymo galimybių, nėra žinoma tiksli cirDNR kilmė. Manoma, jog galimi trys keliai: apoptozės, nekrozės metu ar vykstant sekrecijai ląstelėje (Wan ir kt., 2017).



1.7 pav. Kraujo plazmoje nustatomos cirDNR panaudojimas stebėti ligos progresijai (A) bei gydymo pritaikymui (B) schema; klonas – naviko išplitimas skirtingose organizmo srityse (parengta pagal Wan ir kt., 2017)

Cirkuliuojančios DNR kilmės teorija apoptozės būdų yra prieštaringa. Atliktus DNR molekulių ilgio eksperimentus po apoptozės buvo įvertinta, kad didžioji dalis DNR grandinių atitiko 166 bp ilgį, kuris yra pakankamas apsidvynioti DNR grandinei apie nukleosomą. Tokiu būdu, kai ląstelė ruošiasi mirčiai, chromatino struktūra dalinai išlieka ir už ląstelės ribų aptinkamos panašaus ilgio DNR molekulės. Tačiau vėlesnių tyrimų metu buvo rasta dar įvairesnių ilgių grandinių, varijuojančių nuo 90 bp iki 498 bp ar net ilgesnių (Bordelli ir kt., 2017). Ilgesni fragmentai ~ 10 tūkst. bp aptinkami vėžiu sergančiuose ligoniuose ir tai, manoma, yra susiję su nekroze, kai ląstelės mirties metu vykstantys procesai nėra gerai kontroliuojami (Bronkhorst ir kt.,

2019). Taip pat, kai kurie ligoniai susiduria su ypač agresyviu gydymu todėl galimi ir kiti ląstelinės mirties būdai.

CirDNR naudingumas nustatytas atlikus NSLPV tyrimą iš ligonių kraujo plazmos mėginių, kurio metu buvo sukurta dažniausių mutacijų biblioteka. Sveikų kontrolinių grupių ir pacientų, sergančių NSLPV, metodo įvertinimo grupėje buvo gautas 85 % ir 96 % cirDNR jautrumas ir specifiškumas. Taip pat nustatyta koreliacija tarp naviko tūrio ir cirDNR kiekio pacientams bėgant laikui, tai padėjo stebėti atsaką į gydymą, nes cirDNR molekulių buvo aptikta visais vėlyvų NSLPV stadijų atvejais, tačiau tik 50 % ankstyvose stadijose (Newman ir kt., 2014). Viename tyrime nustatytos mutacijos audinyje buvo 3 kartus rečiau nustatytos plazmoje (Maheswaran ir kt., 2008). Tačiau šis dažnio nesutapimas yra dėl taikytos radioterapijos, kurios metu cirDNR dažniai gali pakisti. Tačiau ligos stebėsenos metu padidėjusi cirDNR koncentracija ir nustatytos naujos mutacijos buvo ligos progresijos rodikliai (Maheswaran ir kt., 2008). Panašūs rezultatai gauti Gorges ir kolegų atliktame tyrime. NSLPV eigoje įvertinus audinyje ir kraujo plazmoje nustatytas mutacijas, pavyzdžiui, *EGFR* T790M mutacija, buvo nustatyta tik kraujo plazmoje kartu su kitomis papildomomis (Gorges ir kt., 2016). Dėl šių ir kitų panašių tyrimų cirDNR pranašumas prieš audinyje atliekamą molekulinį pokyčių analizę yra didelis, nes naudojant cirDNR ligos progresija nustatoma anksčiau, o tai gali padidinti ligonių išgyvenamumą (1.7 pav.). Specifiškai, vieno tyrimo metu buvo nustatyta, jog cirDNR sekoskaita gali padėti nustatyti ligos atsistatymą 70 dienų anksčiau nei kompiuterinės tomografijos tyrimas ir gali padėti įvertinti naviko išplitimo ir jo klonų pokyčius ligai metastazavus (Abbosh ir kt., 2017).

1.8 Naujos kartos sekoskaita

Naujos kartos sekoskaitos (NKS) technologija palaipsniui vykdo fermentines ir duomenų gavimo procedūras, leidžiančias gauti sekoskaitos duomenis iš daugybės vienu metu vykstančių fermentinių reakcijų DNR sekose. Pastaraisiais metais didėjant NKS lėšų prieinamumui, panaudojimo galimybėms ir technologijų gausai, šis molekulinis analizės metodas tampa vis populiarsnis (McCombie ir kt., 2019). Tai vienas pagrindinių metodų, leidžiančių nustatyti genomo variantus ir jų įvairovę. NKS metodu galima nustatyti DNR / RNR pokyčius specifiniuose taikiniuose, koduojančioje genomo dalyje ar visame genome (Behjati ir kt., 2013). Tačiau, genomo variantų nustatymui vis dar yra svarbu įvertinti gautų rezultatų patikimumą, ir paties metodo jautrumą bei specifiškumą. Privaloma NKS rezultatų patikra būtina dėl prasto genomo padengimo t. y. kiek kartų seka buvo pakartotinai sintetinama. Mažą padengimą

turintys genomo regionai gali lemti, jog nustatytas genomo variantas bus palaikytas klaida (Wang ir kt., 2019). Taip pat regionuose, kuriuose gausu pasikartojančių ar didelį dažnį turinčių GC nukleotidų, galima didelė klaidų tikimybė ir sekoskaitos tikslumas yra sumažinamas (Behjati ir kt., 2013). Sekoskaitos rezultatus galima klaidingai įvertinti ir dėl analizės klaidų, kai pasirenkamos netinkamos programos, neatsižvelgiama į analizės įrankių gausą, netinkamai pasirenkamas genomai ar referentinė seka (Koboldt ir kt., 2013).

Tyrimuose kaip ir klinikinėje praktikoje NKS pranašumas yra akivaizdus. Vienos reakcijos metu galima nustatyti visus ligoonio ėminyje esamus genomo pokyčius. Ypač svarbus šios technologijos pritaikymas onkologijoje dėl daugeliui navikų būdingų tik somatinių mutacijų ir vykdomų tarptautinių projektų. Duomenys iš šių globalių tyrimų yra kaupiami duomenų bazėse. Taip vėžio identifikavimo, klasifikavimo, vystymosi, progresijos ir atsparumo į gydymą ar jo pritaikymą žinios yra plečiamos (Behjati ir kt., 2013).

Šiuo metu plačiausiai naudojamos yra nukleorūgščių sinteze paremtos technologijos, kurios nukleotidus sujungiant į vieną seką fermentų pagalba skleidžiamas įvairaus tipo signalas, kuris yra registruojamas. Šia technologija paremtos sekoskaitos sistemos taip pat išsiskiria analizuojamos mėginių gausos pasirinkimu arba taikinių gausos pasirinkimu. Paprastai, mėginiai yra apjungiami į DNR „bibliotekas“ ir šio apjungimo metu mėginio DNR fragmentai yra sujungiami su specifines žymes turinčiomis molekulėmis (žinomos sekos oligonukleotidų molekulės). Mėginio fragmentų padauginimo metu dėl naudojamų žymių, kiekvienas fragmentas turi specifinę koordinatę sekvenavimo platformoje ir gavus rezultatus kiekvienas mėginio fragmentas yra žinomas (Koboldt ir kt., 2013).

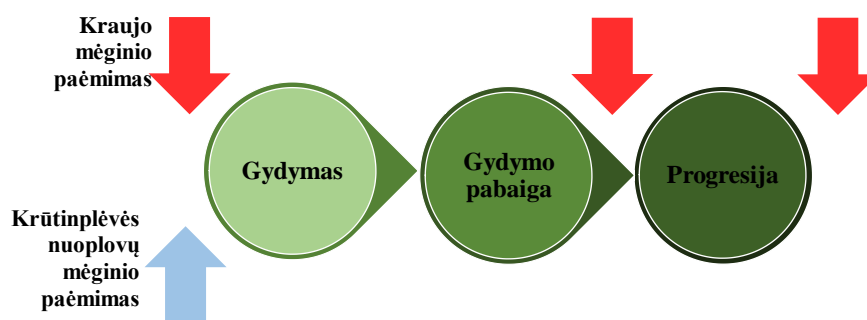
Viena iš tokių sinteze paremtų sekvenavimo sistemų yra *Ion Torrent* pagrįsta puslaidininkių technologija, kai integruoti specifiniai elektriniai jutikliai, registruoja vandenilio jonų atsipalaidavimą į seką įjungiamos naujos bazės metu (Wang ir kt., 2019). Dėl šios technologijos yra nereikalingos sudėtingos šviesos registravimo, skenavimo sistemos ir sekoskaitos procesas yra greitesnis ir pigesnis (Deshpande ir kt., 2018).

2. TYRIMO OBJEKTAS, MEDŽIAGOS IR METODAI

2.1 Tiriamųjų imtis ir tyrimo eiga

Tyrimas atliktas Nacionalinio vėžio instituto Genetinės diagnostikos laboratorijoje. Tyrime naudoti 31 plaučių vėžio mėginiai, 23 serijiniai ir 8 krūtinplėvės nuoplovų mėginiai, kurie rinkti 2018–2020 metais. Tiriamą grupę sudarė asmenys, kuriems diagnozuotas pT1–pT4 stadijos NSLPV vėžys ir tokių ligonių mėginiai rinkti prieš gydymą, po gydymo taikymo ir kai nustatyta ligos progresija (2.1 pav.).

Tyrimo metu 31 kraujo plazmos mėginys buvo paimti prieš ligos progresiją, iš kurių 8 buvo poriniai su krūtinplėvės nuoplovų mėginiais. Kraujo plazmos 23 serijiniai mėginiai sudaryti iš 16 mėginių paimtų po gydymo ligai neprogresavus ir 7 mėginių, kuriems iš kart po gydymo pabaigos nustatyta progresija (5) ir, kuriems ligos progresija vyko lėčiau (2).



2.1 pav. Tyrime naudotų mėginių paėmimo schema pagal laiko skalę

Visi tyrimo dalyviai raštiškai patvirtino sutikimą, leidžiantį jų biologinius mėginius perduoti tyrėjams. Sudarytas protokolas patvirtintas Lietuvos bioetikos komiteto leidimu. Mėginiai Genetinės diagnostikos laboratorijai perduoti per 1 valandą nuo mėginio paėmimo, kurie buvo iš karto paruošti DNR skyrimui ir užšaldyti $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ tolimesniam saugojimui. Ligonų pasiskirstymas pagal demografinius ir klinikinius rodiklius pateiktas 2.1 lentelėje.

2.1 lentelė. Ligonių imtis pagal demografinius, klinikinius rodiklius

PARAMETRAI	NSLPV stadija			
	I	II	III	IV
LIGONIAI, N	2	7	9	14
AMŽIUS, vidurkis ± SN*, metai	58 ± 5,7	65,1 ± 8,0	64,2 ± 5,6	64,2 ± 10,5
Intervalas, metai	54–62	56–75	53–73	44–78
LYTIS				
Vyrai, N (%)	1(50)	5 (71)	7 (78)	10 (77)
Moterys, N (%)	1(50)	2 (29)	2(22)	4 (31)
NAVIKO HISTOLOGIJA				
Plaučių adenokarcinoma (AD), N (%)	-	2 (29)	1 (11)	8 (62)
Plaučių plokščialąstelinė karcinoma (PLK), N (%)	2(100)	4 (57)	3 (33)	6 (38)
Plaučių adenoplokščialąstelinė karcinoma (PAPK), N (%)	-	1 (14)	5 (56)	-

Tyrime naudoti II stadijos 8 kraujo plazmo

2.2 Tyrimo metu naudotos medžiagos, rinkiniai, aparatūra ir priemonės

Magistrinio darbo metu naudotos medžiagos ir rinkiniai pateikti 2.2 lentelėje, o aparatūra ir priemonės pateikti 2.3 lentelėje.

2.2 lentelė. Darbo metu naudotos medžiagos ir rinkiniai.

Medžiaga / rinkinio pavadinimas	Gamintojas
<i>MagMAX™ Cell-Free DNA Isolation</i> rinkinys	<i>Life Technologies</i>
<i>Oncomine™ Lung cfDNA Assay</i> rinkinys	<i>Thermo Scientific™</i>
<i>E.coli DH10B Ion Control Library</i> rinkinys	<i>Thermo Scientific™</i>
<i>Qubit™ 4 NGS Starter</i> rinkinys	<i>Thermo Scientific™</i>
<i>Agilent DNA 1000</i> rinkinys	<i>Agilent Thennologies</i>
<i>Proteinase K Solution (20 mg/mL)</i> reagentas	<i>Thermo Scientific™</i>
<i>Sodium Dodecyl Sulfate (SDS), C12</i> reagentas	<i>Thermo Scientific™</i>
Žemės ūkio kilmės etilo alkoholis	Žemės ūkis
<i>Instamed 9.55 g/l PBS Dulbeco w/o Ca²⁺ w/o Mg²⁺</i> reagentas	<i>Biochrom GmbH</i>

2.3 lentelė. Darbo metu naudota aparatūra ir priemonės.

Aparatūra / priemonė	Gamintojas
Vertikalus oro traukos spinta	
Laminarinė traukos spinta <i>Heraafe KS 15</i>	<i>Thermo Scientific™</i>
Švaraus oro spinta <i>UVT-S-AR</i>	<i>Biosan</i>
Centrifuga ir purtyklė <i>FVL-2400N</i>	<i>Biosan</i>
Centrifuga <i>Megafuge 8R</i>	<i>Heraeus™, Thermo Scientific™</i>
Termomaišyklė <i>TS-100C</i>	<i>Biosan</i>
Spektrofotometras <i>NanoDrop 2000</i>	<i>Thermo Scientific™</i>
Amplifikatorius <i>ProFlex™ 3 x 32-well PCR System</i>	<i>Applied Biosystems™</i>
Amplifikatorius <i>ProFlex™ 96-well PCR System</i>	<i>Applied Biosystems™</i>
<i>QuantStudio 5 Real-Time PCR System</i>	<i>Applied Biosystems™</i>
Plokštelės 96 šulinėlių 0,1 ml	<i>MicroAmp™, Applied Biosystems™</i>
Kintamo tūrio vienkanalės pipetės <i>F2</i>	<i>FinnPipette™, Thermo Scientific™</i>
Vandens kaitinimo vonelė 10L <i>General Purpose Water Bath</i>	<i>Thermo Scientific™</i>

2.3 Metodai

2.3.1 Mėginių paruošimas

Kraujo plazmos paruošimas. Ligonių kraujo plazma, kuri atskirta nuo veninio kraujo, surinkto iš dviejų *PAXgene Blood ccfDNA (Qiagen)* 10 ml mėgintuvėlių centrifuguojant mėgintuvėlius $1600 \times g$ greičiu 15 min *Megafuge* centrifuga (*8RHeraeus™, Thermo Scientific™*). Atskirta plazma surenkama, nepaimant leukocitų ar eritrocitų ir supilama į 15 ml mėgintuvėlį. Toliau mėgintuvėlis centrifuguojamas $1600 \times g$ 10 min ir supernatantas su plazma surenkamas ir išpilstomas į 2 ml šaldymui skirtus mėgintuvėlius.

Krūtinplėvės nuoplovų paruošimas. Krūtinplėvės nuoplovos gaunamos įvairaus tūrio ir ruošiamas visas įmanomas kiekis. Krūtinplėvės nuoplovos plaunamos 1 ml *Instamed 9.55 g/l PBS Dulbeco (Biochrom GmbH)* PBS tirpalu ir centrifuguojamos $2000 \times g$ 15 min, supernatantas pašalinamas, nuosėdos plaunamos 2 ml PBS tirpalu ir vėl centrifuguojamos tokiu pačiu greičiu. Supernatantas pašalinamas ir nuoplovos sumaišomos su 2 ml PBS tirpalo. Taip paruoštos krūtinplėvės nuoplovos saugotos $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje.

2.2.2 DNR gryninimas

DNR gryninimui iš skysčių biopsijos naudotas *MagMAXTM Cell-Free DNA Isolation (Thermo ScientificTM)* rinkinys. Pagal gamintojo rekomendacijas buvo naudotas 1 ml – 5,4 ml kraujo plazmos tūris. Tačiau po kelių gryninimo reakcijų optimaliu tūriu pasirinktas 5,4 ml tūris.

Reakcijos metu naudotas 5,4 ml kraujo plazmos, o krūtinplėvės nuoplovų – 1 ml. Prieš atliekant DNR gryninimą pasirošiami 20 % SDS (*Sodium Dodecyl Sulfate (SDS), C12, Thermo ScientificTM*) tirpalas ir kiekvienam etapui naujas 80 % etanolio (Žemės ūkio kilmės distiliuoto etilo alkoholis, Žemės ūkis) tirpalas. Kiekvienas atšildytas plazmos ir krūtinplėvės nuoplovų mėginys sumaišomas su mėginių lizavimo reagentais pagal 2.4 lentelėje nurodytus tūrius.

2.4 lentelė. Mišinio komponentai mėginių lizavimui 5,4 ml plazmos ir 1 ml krūtinplėvės nuoplovų tūriams

Mišinio komponentas	Reakcijos tūris 5,4 ml	Reakcijos tūris 1 ml
<i>Proteinase K (Thermo Fisher Scientific), 20 mg/ml</i>	81 µl	15 µl
SDS, 20 % tirpalas	270 µl	50 µl

Taip pat pagal gamintojo rekomendacijas inkubacija atlikta 60 ° 20 min., tačiau inkubacijos laikas buvo nepakankamai ilgas, kai kraujo plazmos tūris naudotas DNR gryninimui buvo padidintas iki 5,4 ml. Todėl paruošti mėginiai inkubuojami 60 °C 30 min vandens kaitinimo vonelėje *10L General Purpose Water Bath (Thermo ScientificTM)*. Paruošiamas magnetinių dalelių mišinys visiems mėginiams bendrai. Praėjus inkubacijos laikui mėginiai perkeliama į ledo vonelę 5 min.

2.5 lentelė. Magnetinių dalelių mišinio komponentai 1 ml mėginio

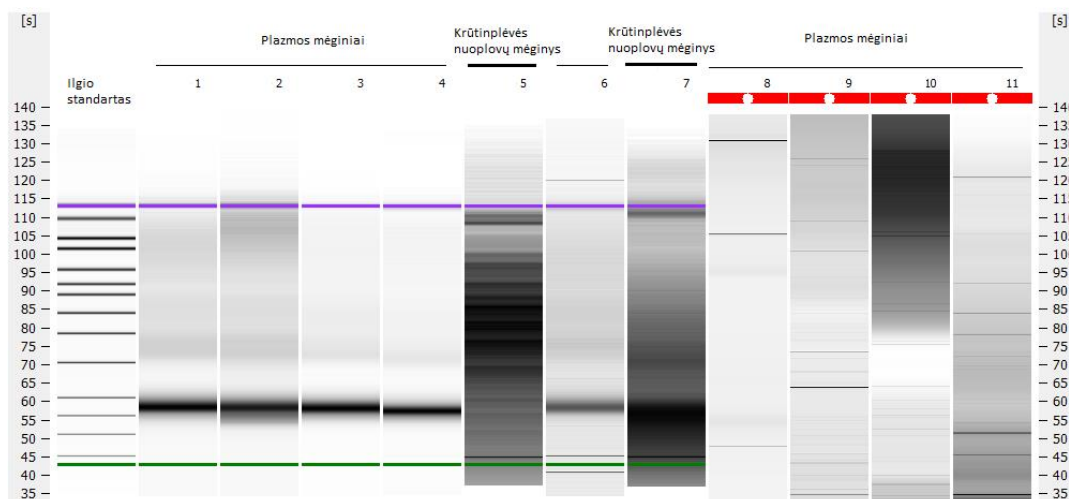
Mišinio komponentas	Reakcijos tūris 1 ml
<i>MagMAXTM Cell Free DNA Lysis/Binding reagentas</i>	1,25 µl
<i>MagMAXTM Cell Free DNA magnetinės dalelės</i>	15 µl

Magnetinių dalelių mišinio komponentų tūriai pateikti 2.5 lentelėje. DNR gryninimas atliktas pagal gamintojo rekomendacijas. Tačiau nesulaukta optimalios / tyrimui reikalingos DNR koncentracijos, todėl buvo nuspręsta optimizuoti protokolą. Po protokolo optimizacijos, mėginiai su magnetinėmis dalelėmis buvo be perstojo purtomi 7 min *FVL-2400N* purtykle (*Biosan*). Taip pat gamintojo rekomenduojamas eliacijos tūris buvo per didelis gaunamoms DNR koncentracijoms todėl visų mėginių

eliucija buvo vykdyta 20 μ l, naudojant *MagMAXTM Cell Free DNA Elution buffer*.
Mėginiai laikomi -20 °C temperatūroje.

2.2.3 Skysčių biopsijos DNR kokybės įvertinimas

Išskirtos skystosios biopsijos DNR kokybė įvertinta dviem būdais: *2100 Bioanalyzer* (Agilent Technologies) DNR fragmentų ilgio analizatoriumi *Qubit 4 Fluorometer* (Thermo ScientificTM) DNR koncentracijų fluorometru (2.2 pav.).



2.2 pav. Skysčių biopsijos – krūtinplėvės nuoplovų ir plazmos mėginių DNR ilgio fragmentų frakcijos sekundėmis *2100 Bioanalyzer* (Agilent Technologies) ilgio fragmentų analizatoriumi

2.2.3 DNR bibliotekų ruošimas

NKS bibliotekų ruošimui yra naudojama 20 ng išgrynintos NSLPV DNR pagal *OncomineTM Lung cfDNA Assay* (Thermo ScientificTM) rinkinio gamintojo rekomendacijas.

Taikinių padauginimas iš cirDNR. DNR atskiesta iki 20 ng toliau maišoma su PGR reagentais taikinių padauginimui pagal 2.6 lentelėje pateiktą lentelę.

2.6 lentelė. Taikinių padauginimo PGR metodu mišinio komponentų tūriai vienam mėginiui

Mišinio komponentas	Tūris, 1x
DNR	X μ l
Vanduo be nukleazių (<i>Thermo ScientificTM</i>)	13 – X μ l
<i>DNA Panel</i> reagentas	2 μ l
<i>DNA Library PCR Master Mix</i> reagentas	15 μ l

Mėginiai su reakcijos mišinio komponentais sumaišomi ant šaldomo stovėlio 0,2 ml tūrio mėgintuvėliuose, jų turinys supurtomas, trumpai centrifuguojamas ir *ProFlex™ 3 x 32-well PCR System (Applied Biosystems™)* amplifikatoriuje pasirenkama *Veriti™* simuliuojančią programą, vykdoma reakcija pagal 2.7 lentelėje pateiktą temperatūrinį režimą.

2.7 lentelė. Taikinių padauginimo PGR metodu temperatūrinis režimas

Ciklai	Temperatūra	Laikas
1	98 °C	2 min.
2	98 °C	30 s.
	64 °C	2 min.
	62 °C	2 min.
	60 °C	4 min.
	58 °C	2 min.
	72 °C	30 s.
1	72 °C	2 min.
1	4 °C	∞

Padaugintų taikinių valymas atliekamas pagal gamintojo rekomendacijas ir 23 µl išvalyto PGR produkto perkeliama į kitą 0,2 ml mėgintuvėlį.

Padaugintų taikinių barkodavimas. Išvalyti produktai sumaišomi su PGR reakcijos reagentais ir pasirinktais barkodais pagal 2.8 lentelėje nurodytus tūrius.

2.8 lentelė. Taikinių barkodavimo PGR metodu mišinio komponentų tūriai vienam mėginiui

Mišinio komponentas	Tūris 1×
DNR	23 µl
<i>Tag Sequencing BC</i> reagentas	1 µl
<i>DNA Library Primer P1</i> pradmuo	1 µl
<i>DNA Library PCR Master Mix</i> reagentas	25 µl

Mėgintuvėliai su reakcijos mišiniu supurtomi, centrifuguojami, vykdoma PGR pagal 2.9 lentelėje pateiktą temperatūrinį režimą.

2.9 lentelė. Taikinių padauginimo PGR metodu temperatūrinis režimas

Ciklai	Temperatūra	Laikas
1	98 °C	2 min.
18	98 °C	15 s.
	64 °C	15 s.

	72 °C	15 s.
1	72 °C	5 min.
1	4 °C	∞

Barkoduotų bibliotekų valymas. Po PGR, kurio metu buvo prijungti mėginių barkodai, vėl atliekamas valymas tokia pat eilės tvarka kaip ir padaugintų taikinių valymo etape pagal gamintojo rekomendacijas 0,2 ml mėgintuvėlyje. Po to atliekamas dar vienas barkoduotų bibliotekų valymas, cirDNR fragmentų ilgio atrinkimui pagal gamintojo rekomendacijas.

Bibliotekų koncentracijų nustatymas. Paruoštų bibliotekų sekoskaitai koncentracija yra įvertinama kiekybiniu PGR (kPGR) metodu naudojant standartinę kreivę, kuri sudaryta iš *E.coli DH10B Ion Control Library* (Thermo Scientific™). Bibliotekų koncentraciją įvertinti galima tuomet, kai kPGR standartinės kreivės efektyvumas svyruoja nuo 95 iki 105 %. Tyrimui naudotas *Ion Torrent* rekomenduojamas *Ion Library TaqMan® Quantification* rinkinys (Thermo Scientific™). Atskiestos bibliotekos 1 : 1000 santykiu 9 µl maišomos su 11 µl PGR reakcijos mišiniu parengtu pagal 2.10 lentelę.

2.10 lentelė. Bibliotekų koncentracijų nustatymui kiekybinės PGR metodu mišinio komponentų tūriai vienam mėginiui

Mišinio komponentas	Tūris 1×
2× <i>TaqMan® Master Mix</i> reagentas	10 µl
2× <i>TaqMan® Assay</i> reagentas	1 µl

Vykdoma kPGR reakcija pagal gamintojo rekomendacijas 2.11 lentelėje pateiktą temperatūrinį režimą.

2.11 lentelė. Bibliotekų koncentracijų nustatymui kPGR metodu temperatūrinis režimas

Ciklai	Temperatūra	Laikas
1	50 °C	2 min.
18	95 °C	20 s.
1	95 °C	1 s.
1	60 °C	20 s.

Neskiestų mėginių bibliotekų koncentracija nustatoma gautus kPGR rezultatus padauginus iš 1000.

2.2.4 DNR sekoskaita

DNR sekoskaita atliekama naudojant *Ion ChefTM* (*Thermo ScientificTM*) ir *Ion Torrent S5* (*Thermo ScientificTM*) sistemas pagal *OncomineTM cfDNA Assays* rekomendacijas vartotojui. Bibliotekos pirmiausia buvo skiedžiamos iki 50 pM, tačiau dėl susidariusio per didelio kiekio pliklonų sekų, koncentracija sumažinta iki 40 pM, 25 µl, kurios prieš pat *Ion ChefTM* sistemos įjungimą yra sumaišomos po 5 µl. Sekoskaita trunka ~ 3 val. (2.3 pav.).

2.2.4 Rezultatų analizė

Gauti DNR sekoskaitos rezultatai analizuojami *Ion ReporterTM* (v.5.10) programa, naudojant *OncomineTM Lung Liquid Biopsy* analizės algoritmą, kuris modifikuotas pagal projekto poreikius. Nusekvenuotų sekų palyginiai analizuojami naudojant hg19 referentinį žmogaus genomą. Analizuojami 11 (*EGFR, ALK, BRAF, ERBB2, KRAS, MAP2K1, MET, NRAS, PIK3CA, ROS1, TP53*) genų, kurių mutacijos būdingos PV ligoniams. Pagal *Ion ReporterTM* programos pateiktus duomenis apie genų variantus ir intarpus-iškirtas (INDEL), šių genų pokyčių patogeniškumas, poveikis atsakui į gydymą ar buvo įvertintas pagal ClinVar (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>) ir COSMIC (*Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer*) (<https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>) duomenų bazes. Jei bent vienoje iš šių duomenų bazių geno mutacija vertinama kaip patogeninė, tai šiame darbe mutacija yra laikoma patogenine, jei šiose duomenų bazėse informacijos apie mutacijos patogeniškumą nebuvo, mutacija laikyta kaip nežinomo poveikio.

Statistinė rezultatų analizė. Rezultatų analizė atlikta naudojantis *QuantStudioTM Design & Analysis Software* (*The Applied BiosystemsTM*), *Excel* (*Microsoft*), *GraphPad Prism 8.01* (*GraphPad Software*) programomis. Analizė taip pat atlikta ir naudojant palyginių peržiūros programą *Integrative Genomics Viewer* (IGV) (*Broad Institute and the Regents of the University of California*) mutacijoms įvertinti.

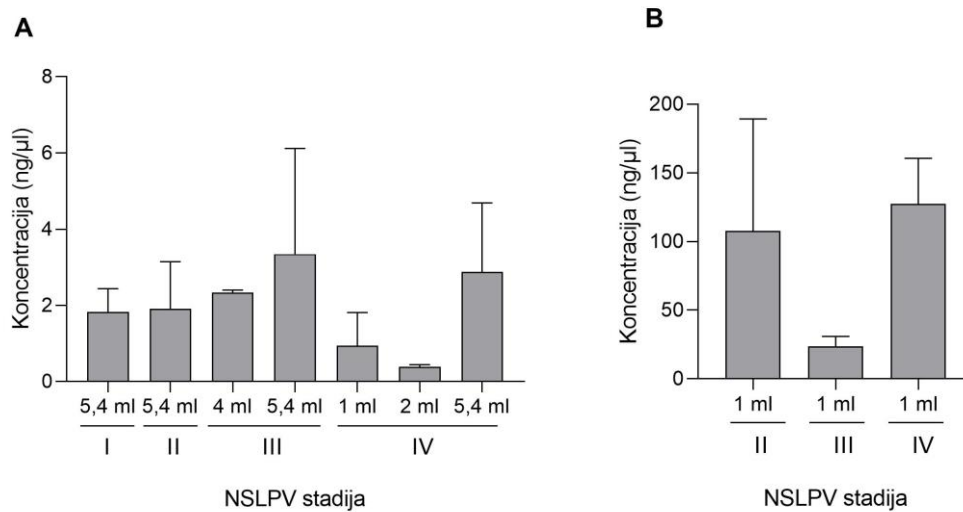
Nustatyti mutacijų pokyčius tarp ligonių grupių ir serijinių mėginių naudojami mutacijų skaičiaus (visų genų bendras patogeninių mutacijų skaičius nustatytas ligonio mėginyje), palyginių su mutacija skaičius (su referentiniu genomu palyginių, kuriuose nustatyta mutacija bendras skaičius nustatytas ligonio mėginyje) bei mutacijų dažnio (su referentiniu genomu palyginių, kuriuose nustatytos mutacijos skaičiaus santykis su palyginiais be mutacijos) rodikliai. Taip pat kiekybinei rezultatų analizei naudotas Mano–Vitnio rangų sumos kriterijus (angl. *Mann-Whitney rank-sum test*), o kokybiniam įvertinimui taikyta Spirmeno ranginė koreliacija (angl. *Spearman rank-order correlation*). Išgyvenamumo analizei naudotas Kaplano–Mejerio kreivės (angl.,

Kaplan-Meier curves) bei and logaritminis ranginis Mantelio–Kokso (angl., *log-rank Mantel-Cox test*) testas.

3. REZULTATAI

3.1 DNR gryninimo optimizavimas

Atlikus cirDNR gryninimą pagal rinkinio *MagMAX™ Cell-Free DNA Isolation* (*Thermo Scientific™*) gamintojo rekomendacijas, nustatyta, jog didžiausia DNR koncentracija gaunama iš 5,4 ml kraujo plazmos III ir IV stadijos NSLPV ligonių mėginiuose (3.1 A pav.). Tuo tarpu krūtinplėvės nuoplovų mėginių DNR skyrimui naudotas 1 ml, didžiausia cirDNR koncentracija taip pat buvo gauta IV stadijos NSLPV ligonių mėginiuose (3.1 B pav.)



3.1 pav. DNR koncentracijų skirtumai pagal skysčių biopsijos tipą: kraujo plazma (A) ir krūtinplėvės nuoplovos (B), naudojamo mėginio tūrį bei NSLPV ligos stadiją

Taip pat DNR gryninimo optimizavimo metu buvo įvertinta, jog:

- 1) optimalus mėginio inkubacijos laikas buvo ne 20 min, kurios nurodytos gamintojo protokole, bet 30 min;
- 2) DNR molekulių prijungimo prie magnetinių dalelių etapas buvo neveiksmingas ir mėginys purtomas ne 10 min, o 7 min be pertraukos;
- 3) įvertinus DNR koncentracijas, mėginio eliacijos tūris buvo sumažintas iki 20 ml.

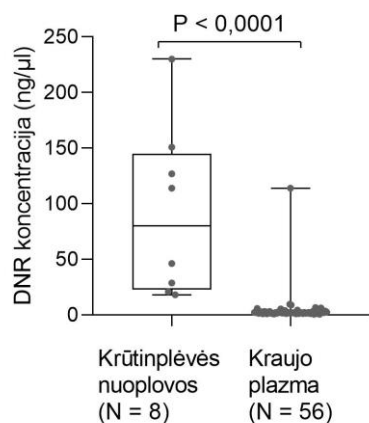
Po metodo metodo optimizavimo DNR koncentracija III ir IV ligos stadijos kraujo plazmos mėginiuose 3 kartus (3.1 A pav.).

3.2 Skysčių biopsijos DNR kokybės ir koncentracijos įvertinimas

Fluorometru *Qubit 4 Fluorometer* gautos cirDNR koncentracijos visuose plazmos mėginiuose vidutiniškai siekė 2 ng/μl, o krūtinplėvės nuoplovų buvo nustatyta

70 ng/μl vidutinė koncentracija. Išanalizavus DNR ilgio fragmentus, kraujo plazmos mėginiuose cirDNR būdingų fragmentų ilgis buvo ~ 200 bp, ko atlikus analizę negalime pasakyti apie nuoplovų DNR ilgio fragmentus, jie buvo įvairaus ilgio, net ir genominei DNR būdingų ilgio fragmentų, todėl krūtinplėšs nuoplovų mėginiuose buvo ir navikinių ląstelių (2.1 pav.).

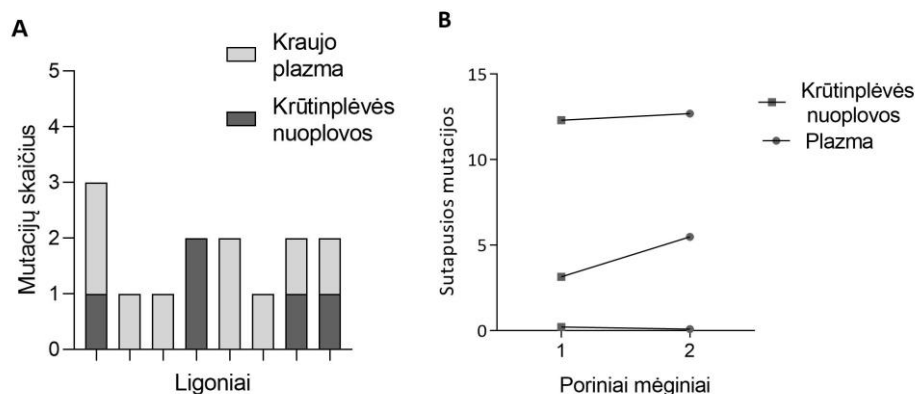
DNR koncentracijų palyginimas skysčių biopsijoje. Analizuojant du skysčių biopsijos tipus – krūtinplėšs nuoplovas ir kraujo plazmos DNR buvo siekiama įvertinti DNR koncentracijų skirtumus. Iš visų plazmos ir krūtinplėšs nuoplovų mėginių (N = 56 ir N = 8, atitinkamai), buvo nustatyta, jog didesnė DNR koncentracija buvo krūtinplėšs nuoplovoje dėl po DNR gryninimo likusių genominei DNR būdingų ilgio fragmentų ($P < 0,0001$) (3.2 pav.).



3.2 pav. Krūtinplėšs nuoplovų ir plazmos DNR koncentracijų palyginimas visuose išskirtuose mėginiuose

3.3 Kraujo plazmos ir krūtinplėšs nuoplovų sekoskaitos rezultatų palyginimas

Atlikus DNR sekoskaitą krūtinplėšs nuoplovų mėginiuose, mutacijos nustatytos 4 iš 8 mėginių (50,0 %) (3.3 A pav.). Iš 56 analizuotų plazmos mėginių, mutacijos nustatytos 36 mėginiuose (64,3 %). Taip pat, po sekoskaitos nustatyta, jog poriniuose mėginiuose sutapusių mutacijų dažnis abiejuose skysčių tipuose nesiskyrė, išskyrus antrą porinį mėginį – mutacijos dažnis buvo 2 kartus didesnis kraujo plazmos mėginyje (3,1 % vs 5,5 %, atitinkamai) (3.3 B pav.).



3.3 pav. Krūtinplėvės nuoplovų ir plazmos mutacijų skaičiaus (A) ir sutapusių mutacijų (B) palyginimas visuose išskirtuose poriniuose mėginiuose.

Įvertinus, jog 50 % porinių mėginių (4 / 8 porų) mutacijų sekoskaistos metodu nepavyko aptikti, toliau skysčių biopsijos mutacijų analizę atlikta tik kraujo plazmoje.

Taip pat, norint įvertinti ar ligonių kraujo plazmoje nustatytos patologijos aptiktos ir audinyje, gauti rezultatai buvo palyginti ir su rutiniškai ligoniams, sergantiems AD, taikomais tyrimais – dažniausių *EGFR* geno patologijų paieška, taikant IVD (angl., *in-vitro diagnostic*) rinkinį. Iš 3 ligonių, kuriems operacijos metu paimtame audinyje standartiniu IVD testu buvo nustatytos *EGFR* mutacijos, 3 / 3 (100 %) ligonių atlikus plazmos cirkuliuojančios DNR sekoskaitą šie pokyčiai.

3.4 Mutacijų analizė kraujo plazmoje prieš progresiją

Iš 31-o ligonių ištirtų kraujo plazmos mėginių paimtų prieš progresiją, po sekoskaitos nustatytos 47 patologijos VNP ir 1 INDEL. Dažniausiai pasireiškiančios mutacijos buvo *KRAS* – 24 / 48 (50,0 %) ir *PIK3CA* – 13 / 48 (27,1 %) genų. Iš jų – nustatytos 2 mutacijos, kurios lemia atsaką į gydymą – *EGFR* (p.M766_A767insASV ir p.L858R).

3.1 lentelė. Nustatyti patogenės ir atsaką į gydymą lemiančios genų mutacijos ligoniams prieš gydymą

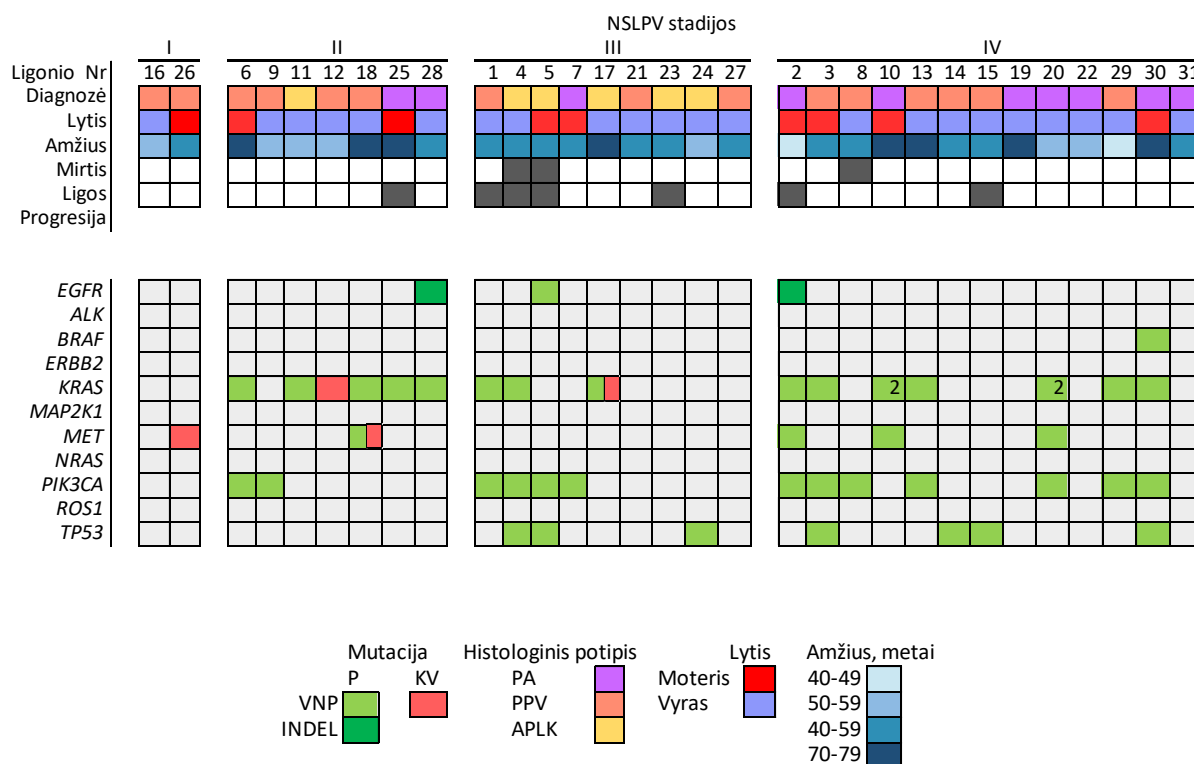
Genas	Ligonio nr.	Patologinis variantas			Amino rūgšties pokytis	dbSNP, rs
		Variantas	Tipas	Egzonas		
<i>PIK3CA</i>	1	c.1634A>C	VNP	10	p.E545A	rs121913274
	2					
	3					
	4					
	5					
	6					

	7						
	8						
	9						
	29						
	30						
	13	c.3140A>G	VNP	21	p.H1047R	rs121913279	
	20						
KRAS	1	c.43G>A	VNP	2	p.G15S		
	2						
	3						
	4						
	6						
	10						
	11						
	13						
	17						
	18						
	20						
	25						
	28						
	30						
	20	c.34G>T	VNP	2	p.G12C	rs121913530	
	10	c.176C>G	VNP	3	p.A59G	rs104886029	
	29	c.35G>T	VNP	2	p.G12V	rs121913529	
EGFR	2	c.2308_2309insCCAGCGTGG	INDEL	20	p.M766_A767insASV		
	28						
		5	c.2573T>G	VNP	21	p.L858R	rs121434568
TP53	4	c.533A>C	VNP	5	p.H178P	rs786202525,rs863223300	
	5						
		14	c.672G>A	VNP	6	p.(=)	
		3	c.542G>C	VNP	5	p.R181P	rs397514495
		15	c.725G>A	VNP	7	p.C242Y	rs121912655
		24	c.523C>T	VNP	5	p.R175C	rs138729528
		30	c.473G>A	VNP	5	p.R158H	rs587782144
MET	2	c.3029C>T	VNP	14	p.T1010I	rs56391007	
	10						
	18						
	20						
BRAF	30	c.1799T>A	VNP	15	p.V600E	rs113488022	

Patologijos ligonių plazmos mėginiuose analizuotos pagal jų pasiskirstymą tarp histologinių tipų, lyčių, amžiaus grupių ir susietos su progresijos (N = 7) bei mirties atvejais (N = 3). Daugiausia mutacijų buvo nustatyta III ir IV stadijos ligonių mėginiuose (12 / 51 (23,5 %) ir 26 / 51 (51,0 %), atitinkamai). Specifiškai ankstyvų

stadijų (I ir II) navikuose mutacijos nustatytos 6 / 9 (66,7 %) ligoniams, o vėlyvų stadijų (III ir IV) navikuose mutacijos nustatytos 14 / 19 (73,7 %) ligonių (3.4 pav.).

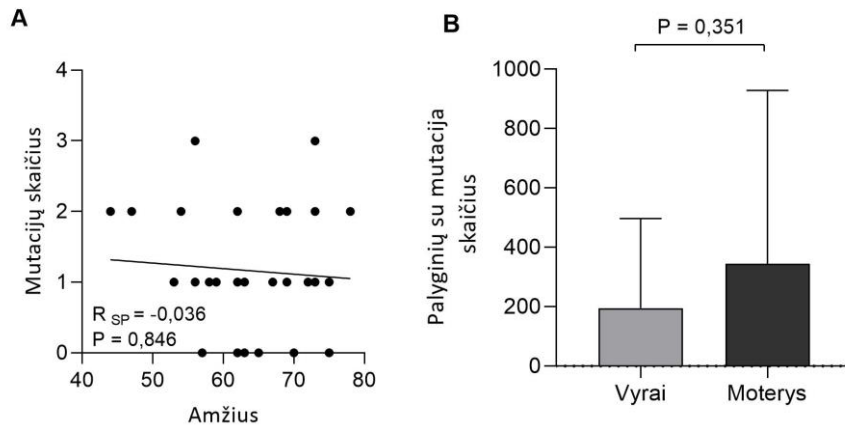
Taip pat dažniausių prieš gydymą mutacijų *KRAS* ir *PIK3CA* pagal histologinius NSLPV potipius ligoniuose daugiausia nustatyta *KRAS* AD grupės 7 / 10 (70,0 %) ligoniuose, o *PIK3CA* šioje grupėje rastas 2 / 10 (20,0 %) ligonių. Ligonų grupėse pagal PPV 5 / 15 ligonių (33,3 %) nustatyta *KRAS*, o 4 / 15 (26,7 %) – *PIK3CA* mutacija (3.4 pav.).



3.4 pav. Nustatytų pataloginių mutacijų ligonių plazmos mėginiuose prieš progresiją sąsajos su demografiniais ir klinikiniais rodikliais, P – kraujo plazma, KV – krūtinplėvės nuoplovos, PA – plaučių adenokarcinoma, PPV – plokščialąstelinis plaučių vėžys, APLK – adenoplokščialąstelinė karcinoma

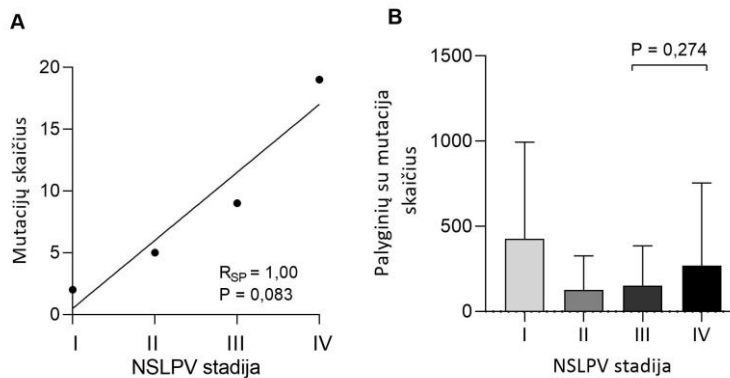
3.5 Mutacijų skaičiaus sąsajos su klinikiniais rodikliais

Siekiant įvertinti mutacijų poveikį ir skirtumus tarp skirtingų ligonių grupių, mutacijų skaičius ir dažnis buvo įvertintas pagal demografinius bei klinikius rodiklius. Pirmiausia įvertintos mutacijų skaičiaus sąsajos su demografiniais rodikliais. Nustatyta, jog amžius ir mutacijų skaičius nekoreliavo ($R_{SP} = -0,036$; $P = 0,0846$) (3.4 A pav.), tačiau mutacijų skaičius buvo 2 kartus didesnis moterų grupėje ($P = 0,351$) (3.4 B pav.).



3.5 pav. Mutacijų skaičius ligonių plazmos mėginiuose palyginimas grupėse pagal amžių (A) ir palyginių su mutacija skaičiaus palyginimas pagal lytį (B); R_{SP} – Spirmeno ranginės koreliacijos koeficientas

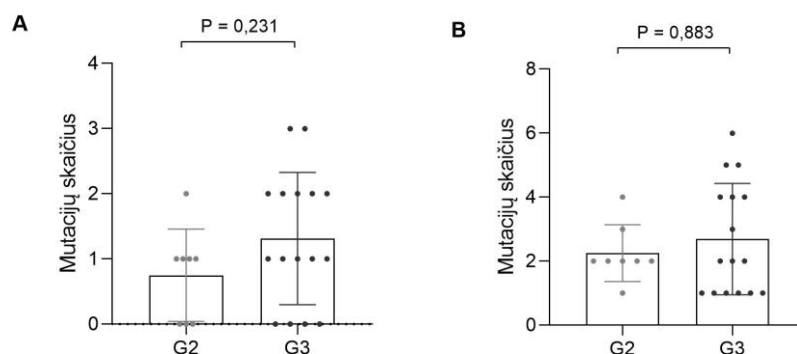
Atskirai buvo įvertintas visų mutacijų skaičių pokyčiai tarp NSLPV ligonių prieš progresiją plazmos mėginiuose pagal ligos stadiją. Nustatyta, jog patogeninių mutacijų skaičius ligai progresuojant ligoniuose didėjo eksponentiškai ir buvo susijęs su ligos stadija ($R_{SP} = 1,00$; $P = 0,083$) (3.6 A pav.). Palyginus palyginių su mutacija skaičių pagal ligos stadiją, pastebėta tendencija, jog skaičius 2 kartus didesnis IV stadijoje lyginant su III NSLPV stadija (289,9 vs 152,5, atitinkamai, $P = 0,234$) (3.5 B pav.).



3.6 pav. Patogeninių mutacijų skaičius ligonių plazmos mėginiuose palyginimas grupėse pagal NSLPV stadiją (A) ir palyginių su mutacija skaičius ligonių plazmos mėginiuose palyginimas grupėse pagal NSLPV stadiją (B)

Siekiant įvertinti, ar mutacijų skaičius gali lemti didesnę naviko diferenciacijos laipsnį, buvo palygintos dvi grupės: ligoniai, kuriems nustatyti G2 ir G3 naviko diferenciacijos laipsniai. Didėsniės diferenciacijos naviko grupėje (G3) patogeninių mutacijų skaičius buvo didesnis nei mažesnio ($P = 0,231$) (3.7 A pav.). Taip pat, buvo įvertintas patogeninių kartu su nežinomo poveikio ar nepatogeninių mutacijų skaičiaus

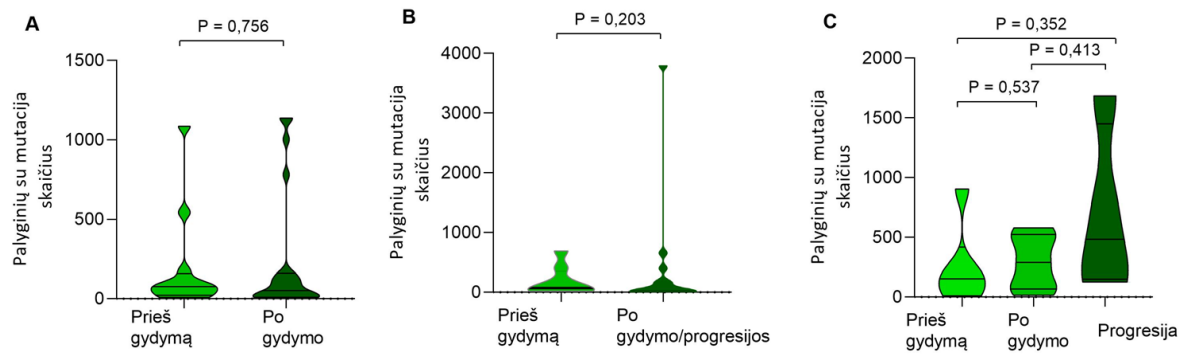
pokytis pagal naviko diferenciacijos laipsnį. Mutacijų skaičius buvo nustatytas didesnis didesnio diferenciacijos laipsnio grupėje (3.7 B pav.) ($P = 0,883$).



3.7 pav. Patogeninių mutacijų skaičiaus ligonių plazmos mėginiuose palyginimas grupėse pagal naviko diferenciacijos laipsnį (A) ir visų mutacijų skaičiaus palyginimas pagal naviko diferenciacijos laipsnį (B)

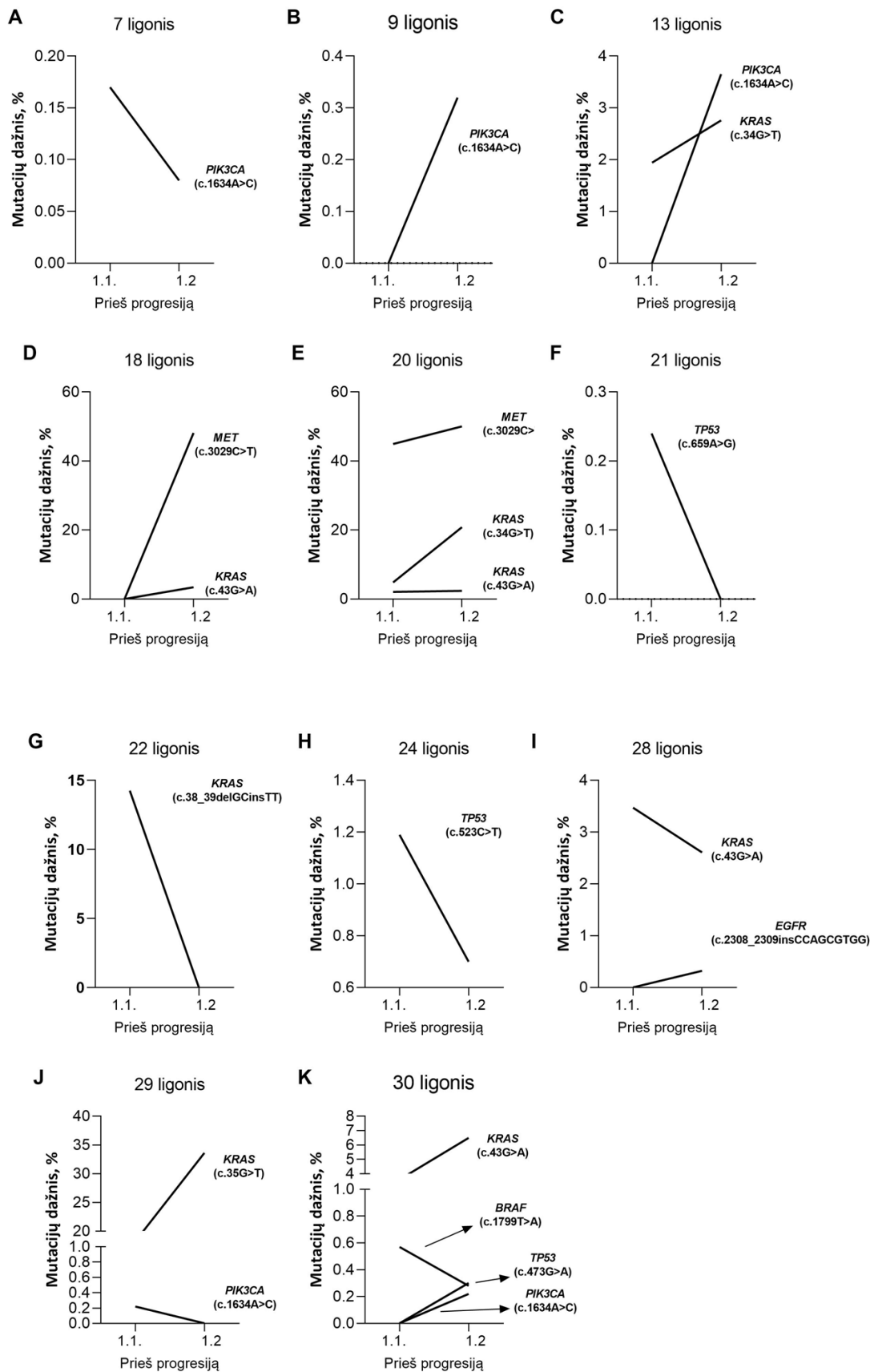
3.6 Mutacijų analizė kraujo plazmoje serijiniuose mėginiuose

Serijiniuose mėginiuose prieš progresiją ir po progresijos įvertintas bendras visų palyginių su patogeninėmis mutacijomis skaičius. Nustatyta, kad ligonių grupėje prieš progresiją ($N = 8$) vidutinis palyginių su mutacijomis skaičius nesiskyrė (189,8 vs 228,6, $P = 0,756$) (3.8 A pav.). Tačiau ligonių grupėje ($N = 5$) po gydymo / progresijos palyginus palyginių su mutacijomis skaičių prieš progresiją, ligai progresavus vidutinis palyginių skaičius padidėjo 2 kartus (186,4 vs 383,5, $P = 0,203$) (3.8 B pav.). Trečioje ligonių grupėje, kuriems ligos progresija vyko lėčiau ($N = 2$) palyginių skaičius po gydymo nepakito (247,8 i 294,8, $P = 0,537$), tačiau po progresijos lyginant su skaičiumi prieš gydymą padidėjo 2 kartus (247,8 vs 694,8, $P = 0,352$) (3.8 C pav.).



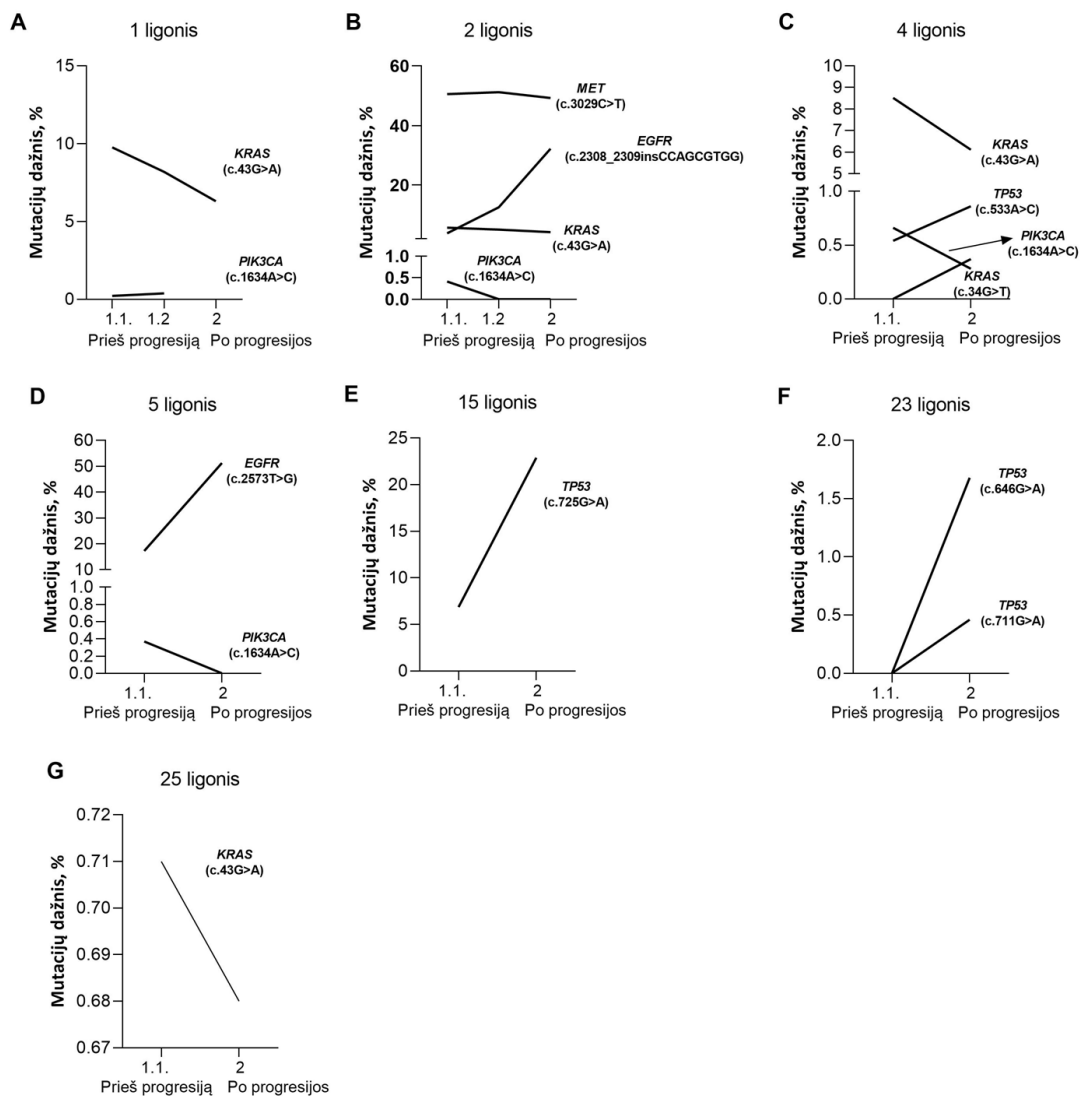
3.8 pav. Bendro visų patogeninių mutacijų skaičiaus palyginimas ligonių grupėse prieš progresiją (A) ir po progresijos (B, C)

Siekiant įvertinti kokios VNP ir INDEL mutacijos nustatytos ir ar mutacijų dažnis kito ligai progresuojant ligonių serijiniai mėginiai buvo analizuoti atskirai. Prieš progresiją, specifiskai prieš ligoniams taikant gydymą, po analizės buvo nustatyta jog 5 / 11 (45,5 %) ligoniams po gydymo mutacijos buvo nerastos, o prieš buvo nustatytos (9, 13, 18, 28, 30 ligoniai, atitinkamai) (3.9 B–D, J, K pav.). O tuo tarpu kitos mutacijos, kaip pavyzdžiui *TP53* geno pokyčiai, buvo nustatyti tik po gydymo surinktuose 6 / 11 (54,5 %) ligonių mėginiuose (7, 21, 22, 24, 28, 29 ligoniai, atitinkamai) (3.9 A, F–J pav.).



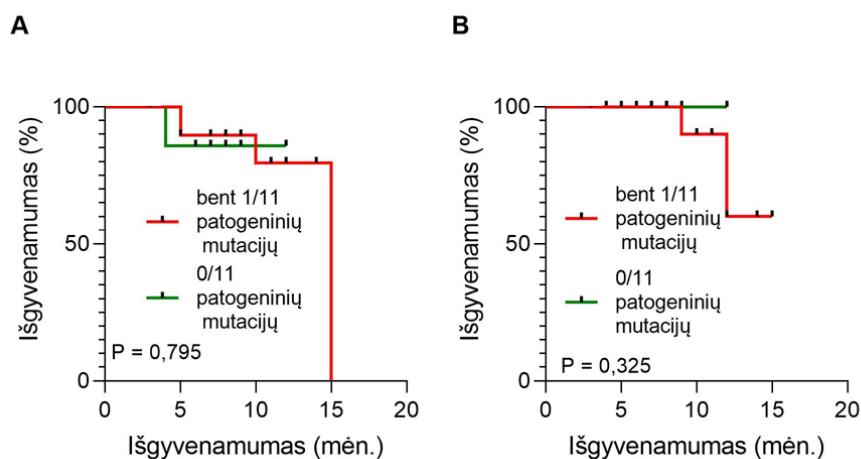
3.9 pav. Ligonų prieš progresiją du kartus paimtuose serijiniuose mėginiuose – prieš ir po gydymo nustatytas genų mutacijų dažnis (A–K); 1.1 – prieš gydymą, 1.2 – po gydymo

Įvertinus ligonių, kuriems buvo nustatyta klinikinė progresija, patogeninių mutacijų dažnio pokyčius lyginant su prieš progresiją nustatytais genų variantais, 2 / 7 (28,6 %) ligonių nustatytos naujos mutacijos (4 ir 23 ligonis, atitinkamai) ir 6 / 7 (86 %) padidėjęs mutacijų dažnis (1, 2, 4, 5, 15 ir 23 ligonis, atitinkamai) (3.10 C ir F, ir A–F pav., atitinkamai). Specifiškai, 2 ligonio *EGFR* INDEL mutacijos, dažnis padidėjo 10 kartų (3,8 % vs 32,2 %), 4 ligonio *TP53* patologinio varianto dažnis padidėjo ~ 2 kartus (0,5 % vs 0,9 %). 15-tam ligoniui nustatytas prieš tai nerastas *TP53* patogeninis variantas, kurio mutacijos dažnis padidėjo 4 kartus, atitinkamai (6,9 % vs 22,9 %).



3.10 pav. Ligonių prieš progresiją du kartus paimtuose serijiniuose mėginiuose nustatytų genų mutacijų dažnių palyginimas po progresijos (A–B); 1.1 – prieš gydymą, 1.2 – po, 2 – progresija. Po gydymo nustatytos progresijos ligonių grupės mutacijų dažnio palyginimas su prieš progresiją, specifiškai prieš gydymą, paimtu mėginiu (C – G); 1.1 – prieš gydymą, 2 – progresija

Taip pat, siekiant nustatyti ar mutacijų skaičius lėmė greitesnę ligos progresiją ir galiausiai mirtį, atlikta išgyvenamumo analizė. Ligoniams, kuriems nustatyta bet viena iš analizuotų 11 mutacijų išgyvenamumas be ligos progresijos buvo ~ 70 % trumpesnis nei be patogeninių mutacijų ($P = 0,795$) (3.11 A pav.). Ligoniams, kuriems nustatyta bent viena iš analizuotų 11 mutacijų bendras išgyvenamumas buvo ~ 50 % trumpesnis nei be patogeninių mutacijų ($P = 0,325$) (3.11 pav.).



3.11 pav. Ligonų išgyvenamumo be progresijos analizė grupėse pagal nustatytų patogeninių mutacijų skaičių (A) ir bendro išgyvenamumo analizė pagal nustatytų mutacijų skaičių (B)

4. REZULTATŲ APTARIMAS

Plaučių vėžys (PV) yra vienas dažniausiai diagnozuojamų vėžinių susirgimų pasaulyje, o mirštamumas nuo PV yra didžiausias nei bet kurio kito vėžio tipo (Bray ir kt., 2018). Žinoma daugelis priežasčių kodėl PV mirštamumo rodikliai yra tokie dideli, tačiau vienos svarbiausių yra vėlyva ligos diagnostika ir greita ligos progresija (Alberg ir kt., 2013). PV navikų ligos eigos stebėjimas yra sudėtingas dėl plaučių morfologijos. Ypač, kai iki šiol vienas dažniausiai naudojamų tyrimo objektų stebėti ligos progresijai molekuliniam lygyje yra audinio biopsija, kurios paėmimas yra sudėtingas ir dažnai neįmanomas (Elazezy ir Joosse, 2018). Skysčių biopsijos naudojimas, specifiskai, cirkuliuojančios DNR (cirDNR) molekulių pokyčių stebėjimui ligos eigoje yra vienas iš perspektyviausių metodų. Skysčių biopsijos ėminys gaunamas neinvazyviu būdu gali būti renkamas pakartotinai ir sekti ligos eigą, progresavimą, atsaką į gydymą (Siravegna ir kt., 2017). Šių procesų metu, ypač nesmulkiąstelinio PV (NSLPV) tipo, somatinių ląstelių mutacijos yra vienas iš pagrindinių molekulių pokyčių, kurių pokyčiai galėtų padėti suprasti šiuos procesus (Imielinski ir kt., 2014). Magistrinio darbo metu buvo analizuotos trijų NSLPV potipių mutacijos ir jų pokyčiai prieš ligos progresiją ir ligai progresavus serijiniuose skysčių biopsijos mėginiuose (kraujo plazmoje ir krūtinplėvės nuoplovose). Skysčių biopsijoje esanti cirDNR buvo panaudota mutacijų analizei naujos kartos sekoskaitos metodu, kuris dėl reikalingo nedidelio ėminio kiekio bei didelio tikslumo yra vienas iš geriausių būdų analizuoti cirDNR (Li Y ir kt., 2018).

Pirmiausia buvo įvertinti DNR koncentracijų ir nustatytų mutacijų skirtumai skysčių biopsijos tipuose. Atlikus DNR gryninimą gauta koncentracija buvo didesnė krūtinplėvės nuoplovų mėginiuose ($P < 0,0001$). Įvertinus nustatytų mutacijų skaičių krūtinplėvės nuoplovose, jos nustatytos rečiau (4 / 8 (50 %) mėginiuose), o tuo tarpu kraujo plazmos mėginiuose nustatytos mutacijos buvo 36 / 56 (64,3 %). Šis nedidelis mutacijų skaičius, kuris buvo nustatytas kraujo plazmoje yra vienas iš cirDNR trūkumų. Dalis mutacijų yra įvertinamos kaip nepatikimos dėl nedidelio jų molekulių dažnio cirDNR (Guo N ir kt., 2016). Remiantis kitų tyrėjų duomenimis krūtinplėvės nuoplovos yra tinkamas objektas mutacijų tyrimams Guo ir kolegų atliktame tyrime jos buvo nustatytos dažniau (16 / 17 (94,1 %) (Guo ir kt., 2018). Palyginus porinius krūtinplėvės nuoplovų ir kraujo plazmos mėginius šio tyrimo metu gautas tik 3 / 8 (37,8 %) sutapimas, o prieš tai minėto kito tyrimo metu sutapimas siekė 100 % (Guo ir kt., 2018). atlikto magistrinio darbo metu retai nustatomos mutacijos krūtinplėvės nuoplovose gali būti susijusios ir su mėginio paėmimo procedūra. Jei kūno ertmė praplaunama fiziologiniu tirpalu tik kartą, didelė tikimybė, jog tik labai nedidelė

dalį vėžinių ląstelių paimama kartu su mėginiu, tačiau pakartotinis plovimas yra neetiškas dėl padidintos tikimybės navikinių ląstelių sklaidos. Ypač, kai vėžinės ląstelės gali būti platinamos ir tarp sveiko audinio ląstelių bei cirDNR gali sukelti vėžinius pakitimus ir gretimose ląstelėse (Bronkhorst ir kt., 2019). Guo ir kolegų mėginio paėmimo procedūros neįvardijo, todėl didelis mutacijų skaičiaus skirtumas gali būti susijęs su tuo.

Įvertinus mutacijų skaičių prieš ligos progresiją daugiausia buvo nustatyta *KRAS* ir *PIK3CA* genų variantų (50,0 % ir 27,1 %). Remiantis prieš tai atliktais tyrimais *KRAS* mutacija yra labiau būdinga plaučių adenokarcinomos (AD) potipiui kaip ir šiame tyrime iš 10 AD sergančių ligonių 7 nustatyti *KRAS* variantai (70 %) (Skoulidis ir Heymach, 2019). Tačiau plokščialąstelinio plaučių vėžio (PPV) ligoniams (N = 13) nustatytos taip pat 5 ligoniams (38,5 %). O *PIK3CA*, kurio mutacijos dažniau nustatomos PPV, šio tyrimo metu AD atveju rastos 2 / 10 (20 %) ligonių, o PPV ligoniams 2 kartais dažniau (4 / 13 (30,1 %)) (Imielinski ir kt., 2014). Šie skirtumai būdingi šiam tyrimui gali būti susiję su nedidele ligonių mėginių imtimi, kurioje nustatytos šios dvi mutacijos.

Analizuojant mutacijų skaičių ir palyginių su mutacija skaičių ligonių grupėse pagal amžių ir lytį, koreliacija su amžiumi nebuvo nustatyta, kaip ir patikimas skirtumas tarp vyrų ir moterų grupių ($R_{SP} = -0,036$; $P = 0,0846$ ir $P = 0,351$, atitinkamai). Tačiau buvo nustatyti palyginių su mutacija skaičiaus skirtumai tarp ligonių grupių suskirstytų pagal NSLPV ligos stadiją ir pastebėta tendencija, jog skaičius buvo 2 kartus didesnis IV ligos stadijoje lyginant su III (289,9 vs 152,5, atitinkamai, $P = 0,234$), o su ankstyvomis stadijomis dėl galimai per mažos imties, skirtumų nenustatyta. Kito tyrimo duomenis mutacijų skaičius ankstyvų ir vėlyvų stadijų NSLPV ligoniams nustatytas toks pat mutacijų skaičiaus dažnis (7 / 11 (63,3 %) I ir II stadijos ligoniai bei 6 / 10 (60 %) III ir IV stadijos ligoniai) (Guo Q ir kt., 2018). Magistrinio darbo metu atliktame tyrime gauti panašūs rezultatai 9 I ir II stadijos nustatyta 6 / 9 ligoniams mutacijos (66,7 %) bei III ir IV 14 / 19 ligonių nustatytos mutacijos (73,7 %).

Išanalizavus serijiniuose mėginiuose nustatytas mutacijas kai kuriems ligoniams prieš progresiją, specifiskai po gydymo, mutacijos buvo nerastos, nors buvo nustatytos prieš gydymą (9, 13, 18, 28, 30 ligoniai, atitinkamai). Tokie patys rezultatai gauti ir Guo N ir kt. atliktame tyrime, kur po operacinio gydymo mutacijų dažnis taip pat buvo 0 %, kuris kai kuriems ligoniams buvo nustatytas net po operacinio gydymo praėjus 2 dienoms (Guo ir kt., 2016). Tačiau kai kuriems ligoniams šiame tyrime buvo nustatytas ir naujų mutacijų atsiradimas po gydymo (7, 21, 22, 24, 28, 29 ligoniai, atitinkamai). Naujų mutacijų atsiradimas ir jų dažnio padidėjimas taip pat buvo nustatytas Jiang ir kolegų tyrime, kur 5 ligoniams įvertintas padidėjusi mutacinė našta po 2 ir 4 chemoterapijos gydymo atlikimo (Jiang ir kt., 2017). Tai gali būti susiję su NSLPV taikomu agresyviu gydymu, dėl kurio

žuvusios vėžinės ląstelės padidino cirDNR koncentraciją ir DNR sekoskaitos metodu pavyko nustatyti prieš tai nerastas mutacijas. Taip pat išanalizavus ligonių grupės mutacijų dažnio pokyčius po ligos progresijos palyginus su prieš progresiją nustatytais, 2 / 7 ligonių (28,6 %) buvo nustatytos prieš tai neaptiktos mutacijos (4 ir 23 ligonis, atitinkamai) ir 6 / 7 ligonių (85,7 %) padidėjęs mutacijų dažnis (1, 2, 4, 5, 15 ir 23 ligonis, atitinkamai). Todėl šio magistrinio tyrimo darbu metu nustatyti mutacijų skaičiaus, palyginių su mutacija skaičiaus ir mutacijų dažnio pokyčiai gali būti susiję su padidėjusia mutacine našta ligai progresuojant ar ligos atsinaujinimu ir įrodo, jog cirDNR mutacijų analizė gali būti taikoma stebėti ligos eigai.

IŠVADOS

1. Iš visų prieš progresiją ištirtų ligonių kraujo plazmos mėginių, dažniausios ligoniams nustatytos mutacijos buvo *KRAS* 24 / 48 (50,0 %) ir *PIK3CA* 13 / 48 (27,1 %).
NSLPV ligonių krūtinplėvės nuoplovų ir kraujo plazmos mėginių mutacijos sutapo 3 / 8 (37,8 %) ligonių poriniuose mėginiuose.
2. Ligonų grupėse pagal NSLPV stadiją, nustatyta bendro mutacijų skaičiaus sąsaja su ligos stadija ($R_{SP} = 1,00$; $P = 0,083$) bei palyginių su mutacija skaičius nustatytas 2 kartus padidėjęs IV vs III (289,9 vs 152,5, atitinkamai, $P = 0,234$). Ligoniams prieš gydymą nustatytų mutacijų su amžiumi ir skirtumų su lytimi nebuvo nustatyta ($R_{SP} = -0,036$; $P = 0,0846$ ir $P = 0,351$)
3. Mutacijų dažnis ligoniams prieš progresiją nustatytas sumažėjęs 5 / 11 (45,5 %), o 6 / 11 (54,5 %) nustatytos naujos mutacijos, o ligai progresavus, 6 / 7 (85,7 %) ligoniams nustatytas dažnio pokytis ir 2 / 7 (28,6 %) naujos mutacijos.

VILNIUS UNIVERSITY
Life Sciences Center
Institute of Biosciences

AGNĖ ŠEŠTOKAITĖ

Mutation Analysis in Liquid Biopsy from Non-Small Cell Lung Cancer Patients

Master Thesis

SUMMARY

Lung cancer (LC) is one of the most common cancer worldwide with lowest survival rate among other cancer types. Routine disease monitoring using liquid biopsy could allow to detect disease progression earlier and consequently lower the death rate. PV is known for 11 most common *EGFR*, *ALK*, *BRAF*, *ERBB2*, *KRAS*, *MAP2K1*, *MET*, *NRAS*, *PIK3CA*, *ROS1* and *TP53* somatic mutations. Changes in these genes by mutation, mutation frequency during disease progression could be used as molecular markers to detect LC formation, disease progression. The study was focused on analysing 11 gene attributed to LC mutations, mutation count and frequency in non-small cell LC subtypes lung adenocarcinoma (LA), squamous cell lung cancer (SCLC) and pleomorphic adenocarcinoma (PA) in blood plasma (BP) and pleural effusion (PE) samples.

Analysis by next generation sequencing was conducted in before progression 31 BP and 8 PE samples and in 23 serial KP samples. Out of all analysed before progression most common were *KRAS* 24/48 (50.0%) and *PIK3CA* 13/48 (27.1%) mutations. Mutations were cooccurring in 3/8 (37.8%) paired BP and PE samples. After mutation count and read count with mutation comparison according to stage overall mutation count was highest in stage IV ($R_{SP}=1.00$; $p=0.083$) and read count with mutations was 2-fold higher in IV vs III (289.9 vs 152.5; $p=0.234$). Correlation with age and differences according to sex were not detected ($R_{SP}=-0.036$; $p=0.0846$ and $p=0.351$). In serial samples before progression mutation frequency was lower in 5/11 (45.5%) while in 6/11 (54.5%) patients mutations were not found. After disease progression in 6/7 (85.7%) mutation frequency varied while in 2/7 (28.6%) new mutations were found.

Mutation count, frequency differences in liquid biopsy samples could be due to non-small cell LC progression and these differences could be used as prognostic biomarker.

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Gyvybės mokslų centras

Biomokslų institutas

AGNĖ ŠEŠTOKAITĖ

**Nesmulkialąstelinio plaučių vėžio ligonių skysčių biopsijos
mutacijų analizė**

Genetikos magistro studijų baigiamasis darbas

SANTRAUKA

Plaučių vėžys (PV) yra vienas iš dažniausių ir didžiausią mirtinumą sukeliančių vėžio formų pasaulyje. Rutiniškas ligos sekimas naudojant skysčių biopsiją galėtų padėti anksčiau nustatyti ligos progresiją ir sumažinti mirštamumą. Žinomos PV dažniausios 11 genų *EGFR*, *ALK*, *BRAF*, *ERBB2*, *KRAS*, *MAP2K1*, *MET*, *NRAS*, *PIK3CA*, *ROS1* ir *TP53* somatinės mutacijos. Todėl šių genų mutacijų, jų skaičiaus kitimas ligai progresuojant gali būti naudojami kaip skysčių biopsijoje nustatomi molekuliniai žymenys įvertinti PV formavimąsi, ligos progresiją. Šiame tyrime buvo nustatytos 11 genų būdingų PV mutacijos, jų skaičius, dažnis nesmulkialąstelinio PV potipio adenokarcinomos (PA), plokščialąstelinio PV (PPV) ir adenopleumorfines karcinomos (APLK) kraujo plazmos (KP) ir krūtinplėvės nuoplovų (KN) mėginuose.

Naujos kartos sekoskaitos metodu išanalizuoti prieš ligos progresiją 31 KP ir 8 KN mėginiai bei 23 serijiniai KP mėginiai. Iš visų ištirtų ligonių KP mėginių, dažniausios nustatytos mutacijos buvo *KRAS* 24 / 48 (50,0 %) ir *PIK3CA* 13 / 48 (27,1 %). Mutacijos sutapo 3 / 8 (37,8 %) poriniuose KP ir KN mėginuose. Po mutacijų ir palyginių su mutacija skaičiaus analizės ligonių grupėse pagal ligos stadiją, bendras mutacijų skaičius didėjo ligai progresuojant ($R_{SP} = 1,00$; $P = 0,083$), palyginių su mutacija skaičius padidėjo 2 kartus IV vs III ligos stadiją (289,9 vs 152,5, atitinkamai, $P = 0,234$). Sąsajos su amžiumi ir skirtumų tarp lyčių nenustatyta ($R_{SP} = -0,036$; $P = 0,0846$ ir $P = 0,351$). Serijiniuose mėginuose prieš progresiją mutacijų dažnis buvo sumažėjęs 5 / 11 (45,5 %), o 6 / 11 (54,5 %) nustatytos naujos mutacijos. Ligai progresavus, 6 / 7 (85,7 %) ligoniams nustatytas dažnio pokytis ir 2 / 7 (28,6 %) naujos mutacijos.

Mutacijų, jų skaičiaus ir dažnio pokyčiai skysčių biopsijoje gali būti susiję su ligos progresija NSLPV ir gali būti naudojami kaip potencialūs žymenys, kurie nustatomi skysčių biopsijoje.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

Internetiniai šaltiniai

1. lungevity.org [internetinė svetainė]. Lungevity, Inc; [Atnaujinta 2020-01-09; cituota 2020-05-10]. Adresas: <https://lungevity.org/>
2. myvmc.com [internetinė svetainė]. My Virtual Medical Centre, Inc; [Atnaujinta 2006-06-27; cituota 2020-05-10]. Adresas: <https://www.myvmc.com/>
3. ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK65865 [internetinė svetainė]. PDQ Cancer Information Summaries; [Atnaujinta 2020-05-07; cituota 2020-05-10]. Adresas: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK65865/>
4. gco.iarc.fr [internetinė svetainė]. International Agency for Research on Cancer; [Atnaujinta 2020-06-01; cituota 2020-05-10]. Adresas: <https://gco.iarc.fr/today>
5. cancerresearchuk.org [internetinė svetainė]. Cancer research UK, Inc; [Atnaujinta 2017-05-16; cituota 2020-05-10]. Adresas: <https://www.cancerresearchuk.org/>

Literatūriniai šaltiniai

1. Aalst CM, Haaf KT, Koning HJ. Lung cancer screening: latest developments and unanswered questions. *Lancet Respir Med.* 2016;4:749–61
2. Abbosh C, Birkbak NJ, Wilson GA, Jamal-Hanjani M, Constantin T, Salari R, Le Quesne J, Moore DA, Veeriah S, Rosenthal R, Marafioti T, Kirkizlar E, Watkins T, McGranahan N, Ward S, Martinson L, Riley J, Fraioli F, Al Bakir, M, Grönroos E, Swanton C. Phylogenetic ctDNA analysis depicts early-stage lung cancer evolution. *Nature.* 2017; 545(7655), 446–451.
3. Abbosh, C., Birkbak, N. J., Wilson, G. A., Jamal-Hanjani, M., Constantin, T., Salari, R., ... & Marafioti, T. (2017). Phylogenetic ctDNA analysis depicts early-stage lung cancer evolution. *Nature*, 545(7655), 446-451.
4. Alberg AJ, Brock MV, Ford JG, Samet J M, Spivack SD. Epidemiology of lung cancer: Diagnosis and management of lung cancer, 3rd ed: American College of Chest Physicians evidence-based clinical practice guidelines. *Chest*, 143(5 Suppl). 2013;e1S–e29S.
5. Allen LP, Baez J, Stern MEC, Takahashi K, George F. Trends and the Economic Effect of Asbestos Bans and Decline in Asbestos Consumption and Production Worldwide. *Int J Environ Res Public Health.* 2018;15(3):531.
6. Al-Obaide MAI, Ibrahim BA, Al-Humaish S, Abdel-Salam AG. Genomic and Bioinformatics Approaches for Analysis of Genes Associated with Cancer Risks Following exposure to Tobacco Smoking. *Front Public Health.* 2018;20(6):84
7. Bardelli A, Pantel K. Liquid Biopsies, What We Do Not Know (Yet). *Cancer Cell.* 2017;31(2):172-179.
8. Behjati S, Tarpey PS. What is next generation sequencing?. *Arch Dis Child Educ Pract Ed.* 2013;98(6):236-238.
9. Blandin Knight S, Crosbie PA, Balata H, Chudziak J, Hussell T, Dive C. Progress and prospects of early detection in lung cancer. *Open Biol.* 2017;7(9):170070

10. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2018;68(6):394-424.
11. Bronkhorst AJ, Ungerer V, Holdenrieder S. The emerging role of cell-free DNA as a molecular marker for cancer management. *Biomol Detect Quantif.* 2019;17:100087.
12. Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive genomic characterization of squamous cell lung cancers [published correction appears in *Nature*. 2012 Nov 8;491(7423):288. Rogers, Kristen [corrected to Rodgers, Kristen]]. *Nature.* 2012;489(7417):519-525.
13. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018. *CA Cancer J Clin.* 2018;68(1):7-30.
14. Chen YH, Hancock BA, Solzak JP, Brinza D, Scafe C, Miller KD, Radovich M. Next-generation sequencing of circulating tumor DNA to predict recurrence in triple-negative breast cancer patients with residual disease after neoadjuvant chemotherapy. *NPJ Breast Cancer.* 2017;3:24.
15. Chu QS. Targeting non-small cell lung cancer: driver mutation beyond epidermal growth factor mutation and anaplastic lymphoma kinase fusion. *Ther Adv Med Oncol.* 2020;12:1758835919895756.
16. Crowley E, Di Nicolantonio F, Loupakis F, Bardelli A. Liquid biopsy: monitoring cancer-genetics in the blood. *Nat Rev Clin Oncol.* 2013;10(8):472-484.
17. Žemaitis, Marius, et al. "Plaučių vėžio diagnostikos ir gydymo rekomendacijos." Kaunas2013.
18. Danila, E., et al. "Plaučių vėžio diagnostikos ir gydymo gairės." Vilnius: *Vaistų žinios* (2013).
19. Deshpande A, Lang W, McDowell T, et al. Strategies for identification of somatic variants using the Ion Torrent deep targeted sequencing platform. *BMC Bioinformatics.* 2018;19(1):5.
20. Diehl F, Schmidt K, Choti MA, et al. Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. *Nat Med.* 2008;14(9):985-990.
21. Duma N, Santana-Davila R, Molina JR. Non-Small Cell Lung Cancer: Epidemiology, Screening, Diagnosis, and Treatment. *Mayo Clin Proc.* 2019;94(8):1623-1640.
22. Edelman MJ, Hodgson L, Rosenblatt PY, et al. CYFRA 21-1 as a prognostic and predictive marker in advanced non-small-cell lung cancer in a prospective trial: CALGB 150304. *J Thorac Oncol.* 2012;7(4):649-654
23. Elazezy M, Joosse SA. Techniques of using circulating tumor DNA as a liquid biopsy component in cancer management. *Comput Struct Biotechnol J.* 2018;16:370-378.
24. Elazezy M, Joosse SA. Techniques of using circulating tumor DNA as a liquid biopsy component in cancer management. *Comput Struct Biotechnol J.* 2018;16:370-378.
25. Field RW, Withers BL. Occupational and environmental causes of lung cancer. *Clin Chest Med.* 2012;33(4):681-703.
26. Garcia-Murillas I, Schiavon G, Weigelt B, et al. Mutation tracking in circulating tumor DNA predicts relapse in early breast cancer. *Sci Transl Med.* 2015;7(302):302ra133.

27. Gazdar A, Robinson L, Oliver D, et al. Hereditary lung cancer syndrome targets never smokers with germline EGFR gene T790M mutations. *J Thorac Oncol*. 2014;9(4):456-463.
28. Gedvilaitė V, Danila E, Cicėnas S, Smailytė G. Lung Cancer Survival in Lithuania: Changes by Histology, Age, and Sex From 2003-2007 to 2008-2012. *Cancer Control*. 2019;26(1):1073274819836085.
29. Gorges TM, Riethdorf S, von Ahsen O, et al. Heterogeneous PSMA expression on circulating tumor cells: a potential basis for stratification and monitoring of PSMA-directed therapies in prostate cancer. *Oncotarget*. 2016
30. Gotts JE, Jordt SE, McConnell R, Tarran R. What are the respiratory effects of e-cigarettes? [published correction appears in *BMJ*. 2019 Oct 15;367:l5980]. *BMJ*. 2019;366:l5275.
31. Gridelli C, Rossi A, Carbone DP, Guarize J, Karachaliou N, Mok T, Petrella F, Spaggiari L, Rosell R. Non-small-cell lung cancer. *Nat Rev Dis Primers*. 2015;1:15009
32. Guo N, Lou F, Ma Y, et al. Circulating tumor DNA detection in lung cancer patients before and after surgery. *Sci Rep*. 2016;6:33519.
33. Guo Q, Wang J, Xiao J, et al. Heterogeneous mutation pattern in tumor tissue and circulating tumor DNA warrants parallel NGS panel testing. *Mol Cancer*. 2018;17(1):131.
34. Guo Z, Xie Z, Shi H, et al. Malignant pleural effusion supernatant is an alternative liquid biopsy specimen for comprehensive mutational profiling. *Thorac Cancer*. 2019;10(4):823-831
35. Herbreteau G, Vallée A, Charpentier S, Normanno N, Hofman P, Denis MG. Circulating free tumor DNA in non-small cell lung cancer (NSCLC): clinical application and future perspectives. *J Thorac Dis*. 2019;11
36. Hiley CT, Quesne JL, Santis G, Sharpe R, Gonzalez de Castro D, Middleton G, Swanton C. Challenges in molecular testing in non-small-cell lung cancer patients with advanced disease. *Lancet*. 2016;388:1002-11
37. Hill A, Gupta R, Zhao D, Vankina R, Amanam I, Salgia R. Targeted Therapies in Non-small-Cell Lung Cancer. *Cancer Treat Res*. 2019;178:3-43
38. Hirsch FR, Suda K, Wiens J, Bunn PA Jr. New and emerging targeted treatments in advanced non-small-cell lung cancer. *Lancet*. 2016;388:1012-24
39. Hirsch FR, Scagliotti GV, Mulshine JL, et al. Lung cancer: current therapies and new targeted treatments. *Lancet*. 2017;389(10066):299-311.
40. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Tobacco smoke and involuntary smoking. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum*. 2004;83:1-1438.
41. Imielinski M, Hammerman PS, Thomas R, Meyerson M. Somatic Genome Alterations in Human Lung Cancers. *Lung Cancer*. 2014;67-89.
42. Jiang T, Li X, Wang J, et al. Mutational Landscape of cfDNA Identifies Distinct Molecular Features Associated With Therapeutic Response to First-Line Platinum-Based Doublet Chemotherapy in Patients with Advanced NSCLC. *Theranostics*. 2017;7(19):4753-4762.
43. Kadara H, Wistuba II. Molecular biology of lung preneoplasia. *Lung cancer*. Fourth ed. Hoboken: Wiley. 2014;110-28.

44. Kadara H, Scheet P, Wistuba II, Spira AE. Early Events in the Molecular Pathogenesis of Lung Cancer. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2016;9(7):518-527.
45. Kamada K. The GINS complex: structure and function. *Subcell Biochem*. 2012;62:135-156.
46. Kim Y, Kim DH. CpG island hypermethylation as a biomarker for the early detection of lung cancer Cancer Epigenetics. *Methods Mol Biol*. 2015;1238:147-71
47. Klebe S, Leigh J, Henderson DW, Nurminen M. Asbestos, Smoking and Lung Cancer: An Update. *Int J Environ Res Public Health*. 2019;17(1):258.
48. Koboldt DC, Steinberg KM, Larson DE, Wilson RK, Mardis ER. The next-generation sequencing revolution and its impact on genomics. *Cell*. 2013;155(1):27-38.
49. Kodama K, Higashiyama M, Okami J, et al. Oncologic Outcomes of Segmentectomy Versus Lobectomy for Clinical T1a N0 M0 Non-Small Cell Lung Cancer. *Ann Thorac Surg*. 2016;101(2):504-511.
50. Lee YT, Tan YJ, Oon CE. Molecular targeted therapy: Treating cancer with specificity. *Eur J Pharmacol*. 2018;834:188-196.
51. Lemjabbar-Alaoui H, Hassan OU, Yang YW, Buchanan P. Lung cancer: Biology and treatment options. *Biochim Biophys Acta*. 2015;1856(2):189-210.
52. Li Y, Lv J, Wan S, et al. High Sensitive and Non-invasive ctDNAs Sequencing Facilitate Clinical Diagnosis And Clinical Guidance of Non-small Cell Lung Cancer Patient: A Time Course Study. *Front Oncol*. 2018;8:491.
53. Maheswaran S, Sequist LV, Nagrath S, et al. Detection of mutations in EGFR in circulating lung-cancer cells. *N Engl J Med*. 2008;359(4):366-377.
54. Mao Y, Yang D, He J, Krasna MJ. Epidemiology of Lung Cancer. *Surg Oncol Clin N Am*. 2016;25(3):439-445.
55. McCombie WR, McPherson JD, Mardis ER. Next-Generation Sequencing Technologies. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2019;9(11):a036798.
56. Mitsui Y, Chang I, Kato T, et al. Functional role and tobacco smoking effects on methylation of CYP1A1 gene in prostate cancer. *Oncotarget*. 2016;7(31):49107-49121.
57. Newman AM, Bratman SV, To J, et al. An ultrasensitive method for quantitating circulating tumor DNA with broad patient coverage. *Nat Med*. 2014;20(5):548-554.
58. Niederhuber JE, Armitage JO, Doroshow JH, Kastan MB, Tepper JE. *Abeloff's Clinical Oncology E-Book*. Elsevier Health Sciences. 2014;5th edition
59. Oberndorfer F, Müllauer L. Molecular pathology of lung cancer: current status and perspectives. *Curr Opin Oncol*. 2018;30(2):69-76.
60. Pagel KA, Antaki D, Lian A, et al. Pathogenicity and functional impact of non-frameshifting insertion/deletion variation in the human genome. *PLoS Comput Biol*. 2019;15(6):e1007112.
61. Pavlovskaja I, Orovchanec N, Zafirova-Ivanovska B. Lung cancer and the smoking habit - case control study. *Prilozi*. 2008;29(2):269-280.
62. Peto R, Darby S, Deo H, Silcocks P, Whitley E, Doll R. Smoking, smoking cessation, and lung cancer in the UK since 1950: combination of national statistics with two case-control studies. *BMJ*. 2000;321(7257):323-29.
63. Prokhorov AV, Hudmon KS. Smoking Prevention and Cessation. *Lung Cancer*, 2014;1-24.

64. Pujol JL, Boher JM, Grenier J, Quantin X. Cyfra 21-1, neuron specific enolase and prognosis of non-small cell lung cancer: prospective study in 621 patients. *Lung Cancer*. 2001;31(2-3):221-231.
65. Ribas A, Hu-Lieskovan S. What does PD-L1 positive or negative mean?. *J Exp Med*. 2016;213(13):2835-2840.
66. Rimm DL, Han G, Taube JM, et al. A Prospective, Multi-institutional, Pathologist-Based Assessment of 4 Immunohistochemistry Assays for PD-L1 Expression in Non-Small Cell Lung Cancer. *JAMA Oncol*. 2017;3(8):1051-1058.
67. Röijer E, Kosinska U, Andersson I, Nilsson K, Nilsson O. Rearrangement of squamous cell carcinoma antigen genes--detection of SCCA fusion transcripts. *Tumour Biol*. 2003;24(1):46-52.
68. Sakashita S, Sakashita M, Sound Tsao M. Genes and pathology of non-small cell lung carcinoma. *Semin Oncol*. 2014;41(1):28-39.
69. Santarpia M, Liguori A, D'Aveni A, et al. Liquid biopsy for lung cancer early detection. *J Thorac Dis*. 2018;10(Suppl 7):S882-S897.
70. Schuller HM. The impact of smoking and the influence of other factors on lung cancer. *Expert Rev Respir Med*. 2019;13(8):761-769.
71. Siravegna G, Marsoni S, Siena S, Bardelli A. Integrating liquid biopsies into the management of cancer. *Nat Rev Clin Oncol*. 2017;14(9):531-548.
72. Skoulidis F, Heymach JV. Co-occurring genomic alterations in non-small-cell lung cancer biology and therapy. *Nat Rev Cancer*. 2019;19(9):495-509.
73. Wan JCM, Massie C, Garcia-Corbacho J, et al. Liquid biopsies come of age: towards implementation of circulating tumour DNA. *Nat Rev Cancer*. 2017;17(4):223-238.
74. Waqar SN, Morgensztern D. Treatment advances in small cell lung cancer (SCLC). *Pharm Ther*. 2017;180:16-23
75. Whitney DH, Elashoff MR, Porta-Smith K, et al. Derivation of a bronchial genomic classifier for lung cancer in a prospective study of patients undergoing diagnostic bronchoscopy. *BMC Med Genomics*. 2015;8:18.
76. Wong MCS, Lao XQ, Ho KF, Goggins WB, Tse SLA. Incidence and mortality of lung cancer: global trends and association with socioeconomic status. *Sci Rep*. 2017;7(1):14300.
Zhu C, Zhuang W, Chen L, Yang W, Ou WB. Frontiers of ctDNA, targeted therapies, and immunotherapy in non-small-cell lung cancer. *Transl Lung Cancer Res*. 2020;9(1):111-138.

MAGISTRO METU ATLIKTO DARBO PRISTATYMAS

KONFERENCIJOSE:

- ESGH konferencija, stendinis pranešimas: 2020.06.06 – 06.09: Sonata Jarmalaitė, Agnė Šeštokaitė, Rasa Sabaliauskaitė, Vaida Gedvilaitė, Saulius Cicėnas. Mutation Analysis in Liquid Biopsy from Lithuanian Non-Small Cell Lung Cancer Patients. Dėl COVID-19 vyko nuotoliniu būdu
- OpenReading2020 konferencija, stendinis pranešimas: 2020.03.17-20: Agnė Šeštokaitė, Rasa Sabaliauskaitė, Vaida Gedvilaitė, Saulius Cicėnas, Sonata Jarmalaitė. Mutation Analysis In Liquid Biopsy From Non-Small Cell Lung Cancer Patients. Atšaukta dėl COVID-19.
- VitaSciencia2020 konferencija, stendinis pranešimas: 2020.01.03: Sestokaite A, Sabaliauskaite R, Gedvilaite V, Cicenass S, Jarmalaite S. Mutation Analysis in Cell-Free DNA from Lithuanian Non-Small Cell Lung Cancer Patients

PADĖKA

Nuoširdžiai dėkoju savo darbo vadovėms dr. Rasai Sabaliauskatei ir prof. dr. (HP) Sonatai Jarmalaitei už neišsenkančią pagalbą, patarimus, kantrybę ir visokeriopai puikų vadovavimą magistro studijų baigiamojo darbo rengimo metu. Taip pat dėkoju Ievai Viaciekauskaitei už vertingas pastabas, pasiūlymus ir palaikymą atliekant eksperimentus bei visam COVID-19 laboratorijos tyrimų kolektyvui už supratingumą ir palaikymą.