

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ПАТОГЕНЕЗА, РЕЦИДИВА  
ГЕПАТОЦЕЛЛЮЛЯРНОГО РАКА. ОПЫТ ПРОВЕДЕНИЯ СЕКВЕНИРОВАНИЯ  
НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ У ПАЦИЕНТОВ С ГЕПАТОЦЕЛЛЮЛЯРНЫМ РАКОМ**

**Камалова М. А. ORCID ID 0000-0003-0495-8585,  
Шегай П. В. ORCID ID 0000-0001-9755-1164,  
Трифанов В. С. ORCID ID 0000-0003-1879-6978,  
Шаталов П. А. ORCID ID 0000-0001-5374-8547**

*Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П. А. Герцена - филиал федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Российская Федерация, e-mail: milyausha.kamalova.97@mail.ru*

**Цель исследования:** оценить молекулярно-генетические особенности гепатоцеллюлярной карциномы методом NGS с последующим проведением корреляции с развитием рецидива и общей выживаемостью. **Материалы и методы:** в работу включены результаты молекулярно-генетических исследований 39 пациентов (соотношение мужчин к женщинам 25:14), прооперированных по поводу гепатоцеллюлярного рака в рамках МНИОИ им. П. А. Герцена с 2010 по 2024 г., медиана возраста составила 66 лет. Распределение пациентом по TNM: pT1N0M0 - 6, pT3N0M0 - 9, pT2N0M0 - 12, pT1N0M0 - 2, pT1bN0M0 - 1, pT4N0M0 - 1, pT3bN0M0 - 1, pT2N1M0 - 1, pT2bN1M0 - 1, pT2cN0M0 - 1, ypT1bN0M0 - 1, pT3aN0M0 - 1, pT3bN0M0 - 2 пациента. **Результаты:** у 39 пациентов был проведён анализ мутационного профиля опухоли. Наиболее часто встречались мутации в генах GATA1 и ATRX, реже определялись изменения в NRG1, RANBP2, KDM6A, FAT1, PTEN, APC. Наблюдается высокая частота соматических мутаций в ряде ключевых генов, определяющих молекулярные механизмы опухолевого роста: TP53 (~30%) и CTNNB1 (~10%), которые считаются основными драйверами канцерогенеза печени. Среди других значимых драйверных событий отмечаются активирующие мутации в генах EGFR и KRAS, участвующих в регуляции клеточного роста и передачи митогенных сигналов. Кроме того, нередко встречаются мутации в генах эпигенетических регуляторов KMT2C и KMT2D, однако в большинстве случаев они носят «пассажирский» характер и не оказывают ключевого влияния на развитие опухоли. **Выводы:** полученные данные свидетельствуют о том, что наличие мутаций в ряде генов - неблагоприятный признак, однако для подтверждения их значения необходимы более крупные выборки и расширенные методы анализа выживаемости.

**Ключевые слова:** секвенирование нового поколения, неалкогольный стеатогепатит, гепатоканцерогенез, генетические и эпигенетические маркеры.

***Благодарности:** авторский коллектив выражает огромную благодарность МНИОИ им. П. А. Герцена за предоставленную возможность выполнения исследования.*

**MOLECULAR GENETIC ASPECTS OF THE PATHOGENESIS AND RECURRENCE OF  
HEPATOCELLULAR CARCINOMA. EXPERIENCE WITH NEXT-GENERATION  
SEQUENCING IN PATIENTS WITH HEPATOCELLULAR CARCINOMA**

**Kamalova M. A. ORCID ID 0000-0003-0495-8585,  
Shegai P. V. ORCID ID 0000-0001-9755-1164,  
Trifanov V. S. ORCID ID 0000-0003-1879-6978,  
Shatalov P. A. ORCID ID 0000-0001-5374-8547**

*P. A. Herzen Moscow Scientific Research Oncological Institute is a branch of the Federal State Budgetary Institution "National Medical Research Center of Radiology" of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation, e-mail: milyausha.kamalova.97@mail.ru*

The aim of the study was to evaluate the molecular genetic characteristics of hepatocellular carcinoma using NGS and subsequently correlate them with recurrence and overall survival. **Materials and Methods:** The study included the results of molecular genetic studies of 39 patients (male to female ratio 25:14) who underwent surgery for hepatocellular carcinoma at the P. A. Herzen Moscow Oncology Research Institute from 2010 to 2024. The median age was 66 years. Patient distribution according to TNM staging: pT1N0M0-6, pT3N0M0-9, pT2N0M0-12, pT1N0M0-2, pT1bN0M0-1, pT4N0M0-1, pT3bN0M0-1, pT2N1M0-1, pT2bN1M0-1, pT2cN0M0-1, ypT1bN0M0-1, pT3aN0M0-1, pT3bN0M0-2. **Results:** Tumor mutation profiling was performed in 39 patients. The most common mutations were in the GATA1 and ATRX genes, while changes in NRG1, RANBP2, KDM6A, FAT1, PTEN, and APC was less common. A high frequency of somatic mutations is observed in several key genes that determine the molecular mechanisms of tumor growth: TP53 (~30%) and CTNNB1 (~10%), which are considered the main drivers of liver carcinogenesis. Other significant driver events include activating mutations in the EGFR and KRAS genes, which are involved in the regulation of cell growth and mitogenic signaling. Furthermore, mutations in the epigenetic regulatory genes KMT2C and KMT2D are common; however, in most cases, these are "passenger" mutations and do not have a key impact on tumor development. **Conclusions:** The obtained data indicate that the presence of mutations in several genes is an unfavorable indicator; however, larger sample sizes and more advanced survival analysis methods are needed to confirm their significance.

Keywords: next-generation sequencing, nonalcoholic steatohepatitis, hepatocarcinogenesis, genetic and epigenetic markers.

***Acknowledgements:** The author's team expresses its deep gratitude to the P. A. Herzen Moscow Institute of Physics and Technology for the opportunity to carry out the research.*

## **Введение**

Гепатоцеллюлярная карцинома (ГЦК) - шестой по распространённости вид рака и третья по значимости причина смертности от онкологических заболеваний во всём мире. По оценкам Всемирной организации здравоохранения, в 2020 году было зарегистрировано 905 677 новых случаев рака печени и 830 180 смертей от этого заболевания. Пятилетняя выживаемость при ГЦК составляет 18%, что указывает на неблагоприятный прогноз и ограниченность доступных методов лечения [1]. Выделение тяжести первичного рака печени имеет решающее значение, занимая шестое место по глобальной распространённости и третье по летальности [1]. Прогнозы предполагают 1,4 миллиона новых случаев и 1,3 миллиона смертных исходов к 2040 году [2].

Цирроз печени, вирусный гепатит, неалкогольная жировая болезнь печени (НАЖБП) или повреждения печени, вызванные алкоголем, - все это хронические заболевания, которые имеют тесную связь с патогенезом ГЦК. Ключевым фактором прогрессирования этих заболеваний до ГЦК является активация сигнального пути рецептора эпидермального фактора роста (EGFR). Семейство рецепторных тирозинкиназ ErbB, которое включает EGFR, необходимо для воспаления, клеточного деления и регенерации печени. При ГЦК экспрессия и гиперактивация EGFR тесно связаны с ростом опухоли, метастазированием и прогнозом пациента [3; 4].

ГЦК у человека обычно развивается на фоне активного воспалительного процесса при циррозе печени. Ежегодно у 1–4% пациентов с циррозом печени развивается ГЦК [5]. Цирроз печени может быть вызван различными причинами, такими как алкогольная болезнь печени, вызванная чрезмерным употреблением алкоголя, и стеатогепатит, связанный с нарушением

обмена веществ, вызванный общим употреблением западной диеты, а также прогрессирующими формами алкогольного стеатогепатита и стеатогепатита, связанного с нарушением обмена веществ соответственно [6; 7]. Другими экзогенными факторами, которые могут вызывать хроническое воспаление печени, не обязательно приводящее к циррозу, являются инфекции, вызванные вирусами гепатита, такими как вирус гепатита В (HBV) и вирус гепатита С (HCV), а также такие факторы риска, как воздействие афлатоксинов, курение и генетическая предрасположенность.

По данным ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, за последнее десятилетие зарегистрирован рост заболеваемости первичными злокачественными новообразованиями печени и внутрипечёночных желчных протоков на 43,36%. Заболеваемость ГЦК в 2024 году в Российской Федерации – 7,47 случая на 100 тыс. населения [8].

### **Канцерогенез ГЦК**

Развитие гепатоцеллюлярной карциномы - многоэтапный процесс, в его основе лежит длительное воздействие факторов риска, приводящее к аккумуляции молекулярных и клеточных нарушений. Длительная экспозиция вирусных, токсических и метаболических агентов изменяет активность внутриклеточных сигнальных каскадов и регуляторов транскрипции, что сопровождается перестройкой экспрессии генов в гепатоцитах и их последующей злокачественной трансформацией [9].

Воздействие тех или иных этиологических факторов ГЦК ассоциировано с активацией определённых сигнальных путей канцерогенеза и формированием уникального спектра геномных изменений. Молекулярные изменения нарушают контроль клеточного цикла, угнетают апоптоз и ускоряют пролиферацию трансформированных клеток, что способствует образованию первичного опухолевого узла [4].

Опухолевая прогрессия является следующим этапом гепатоканцерогенеза, для него характерно усиление злокачественного фенотипа, автономный рост и неоангиогенез, индуцируемый проангиогенными факторами, и эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП), при котором опухолевые клетки лишаются эпителиальных признаков, овладевают способностью передвигаться и ремоделировать внеклеточный матрикс, что обеспечивает инвазию в прилежащие ткани и формирование метастатических очагов [10].

Характеризуется гепатоцеллюлярная карцинома на молекулярном уровне выраженной гетерогенностью молекулярных изменений - результат скопления широкого спектра соматических мутаций, эпигенетических перестроек и нарушений сигнальной регуляции, вследствие воздействия разнообразных этиологических факторов. Именно эти механизмы определяют вариабельность профилей экспрессии генов при ГЦК [11].

Современные исследования демонстрируют, что ГЦК формируется через множество перекрещивающихся молекулярных каскадов, активация которых зависит от конкретного этиологического воздействия. При интеграции ДНК вируса гепатита В в геном клетки-хозяина синтезируются четыре вирусные мРНК, кодирующие семь белков [12], среди которых ключевое значение имеет полипептид НВх ( $\approx 17$  кДа). Полипептид НВх преобразует активность сигнального пути Wnt/ $\beta$ -катенина, регулирует пролиферацию и апоптоз, усиливает транскрипционную активность NF- $\kappa$ B и одновременно угнетает TNF $\alpha$ -опосредованный апоптоз, что способствует выживанию трансформированных клеток. Индукции митохондриального стресса и повышению образования активных форм кислорода способствуют как ДНК HBV, так и РНК HCV, это способствует запуску стресса эндоплазматического ретикулума и развитию развёрнутого белкового ответа, сопровождающегося аутофагией, что поддерживает персистенцию вируса [13].

Вирус гепатита С является РНК-содержащим (в отличие от вируса гепатита В-ДНК-содержащий), в связи с чем его интеграция в геном вирусоносителя невозможен, чем и обусловлен опосредованный канцерогенез - влиянием вируса на дерегуляцию разных клеточных механизмов, включая усиление пролиферации гепатоцитов и стеатоз, индукцию вирусного воспаления и окислительного стресса, вызывающих геномные мутации и геномную нестабильность, а также путем повреждения митохондрий и индукции иммунного ответа хозяина. Развитие ГЦР на фоне гепатита С происходит только в цирротически измененной печени. Риск возникновения ГЦР у пациентов с HCV-индуцированным ЦП в 17 раз выше, чем в здоровой популяции, и составляет 1–4% в год (в японской когорте – до 8% в год) [14]. Для HCV-ассоциированной ГЦК характерна избыточная экспрессия ряда генов (MMP9, RPS5, KRT8, ATP5F1, IGFBP2, MAP3K5, CCND1, NFKB1, CFLAR, BCL2, Mcl-1, SOCE) и взаимодействие вирусных белков NS5A, E2, NV5a, NS5B с ключевыми сигнальными путями (RAF/MAPK/ERK, E2F1), что изменяет клеточный цикл, пролиферацию и апоптоз [15]. NV5a дополнительно ингибирует p53-зависимый контроль деления клеток.

Употребление алкоголя является третьей по значимости причиной ГЦК. Этанол увеличивает образование железо-индуцированных активных форм кислорода (АФК), нарушающих репарацию ДНК, а образующийся при метаболизме ацетальдегид ковалентно модифицирует белки и нуклеиновые кислоты, усиливая мутагенез [16]. При постоянном и увеличенном употреблении спирта происходит индукция цитохрома P450 2E1 (CYP2E1), которая приводит к чрезмерному производству активных форм кислорода (АФК) в перивезикулярной зоне печеночной дольки. АФК вызывают окислительный стресс, повреждение гепатоцитов и апоптоз. Ацетальдегид, основной токсический метаболит этанола, является высокореактивным мутагеном, который образует устойчивые соединения с ДНК,

вызывает точечные мутации, подавляет репарацию ДНК и в условиях индуцированного СУР2Е1 активирует про-канцерогены. Также алкоголь и его метаболиты активируют звёздчатые клетки печени (ЗКП), которые являются основным источником внеклеточного матрикса при печёночном фиброзе. Нарушение баланса между синтезом и деградацией внеклеточного матрикса приводит к чрезмерному накоплению коллагена и прогрессированию фиброза [16].

Процесс онкогенеза в контексте неалкогольного стеатогепатита (НАСГ) многогранен и включает несколько этапов, включая различные метаболические характеристики и онкогенную активность. Развитие ГЦК на фоне НАСГ включает одновременную активацию сигнальных путей, вовлеченных в патогенез НАСГ. Это сложное взаимодействие между многочисленными путями приводит к сверхактивации проонкогенных механизмов при одновременном подавлении механизмов, подавляющих опухоль. Таким образом, более глубокое понимание молекулярных сигнальных путей, участвующих в развитии MASH-ГЦК, необходимо для выявления новых молекул-мишеней для терапевтических и профилактических стратегий.

В развитии ГЦК на фоне НАСГ можно выделить 3 отдельные стадии: предопухолевый процесс, онкогенез, состояние после образования опухоли. Первая стадия соответствует прогрессирующему НАСГ, а третья стадия характеризуется видимым ростом опухоли. На второй стадии в результате сильного стресса, пережитого на первой стадии, возникают генетические мутации. Эти мутации продолжают накапливаться, что в итоге приводит к образованию солидной опухоли на третьей стадии [17].

### **Генетические и эпигенетические нарушения при ГЦР**

Современные методы высокопроизводительного секвенирования, включая полноэкзомный и полногеномный анализ, радикально расширили возможности изучения молекулярного ландшафта гепатоцеллюлярной карциномы (ГЦК) и других опухолей печени. Эти технологии позволяют выявлять широкий спектр соматических событий, преобладающих в патогенезе ГЦК: однонуклеотидные замены, изменения числа копий генов (амплификации, потери гетерозиготности), крупные хромосомные перестройки (делеции, дупликации, инверсии, транслокации), малые инсерции и делеции [10]. Мутационная нагрузка повышена на гены, кодирующие компоненты теломеразы, регуляторы клеточного цикла, модификаторы хроматина, а также элементы сигнальных каскадов Wnt/ $\beta$ -катенин и PI3K/Akt/mTOR, p53 [18].

В одном из крупных европейских исследований, проведенном совместно с медицинскими исследователями из Франции, Италии, Испании, при детальном анализе 243 парных образцов опухолевой и здоровой ткани выделено одиннадцать ключевых молекулярных путей, объединяющих регуляцию длины теломер, контроль клеточного цикла,

дифференцировку гепатоцитов, эпигенетическую перестройку и ремоделирование хроматина, ответ на окислительный стресс, а также активацию внутриклеточных сигнальных каскадов TGF- $\beta$ , PI3K/Akt/mTOR, Wnt/ $\beta$ -катенин, MAPK и JAK/STAT [19].

Эпигенетическая дерегуляция составляет особое место в развитии ГЦР. Для ГЦК описаны нарушения ковалентных модификаций гистонов, общее снижение уровня метилирования ДНК, гиперметилирование промоторов опухолевых супрессоров и перестройка экспрессии ферментов-модификаторов хроматина, микроРНК и длинных некодирующих РНК [20]. К хромосомной нестабильности приводит гипометилирование ДНК, что коррелирует с неблагоприятным прогнозом. К наиболее часто метилируемым при ГЦК относят гены опухолевых супрессоров p73, p53, и WT1, регуляторов клеточного цикла (E2F1, pRb, p27, p15, p21<sup>CIP1/WAF1</sup>, p16<sup>INK4a</sup>), а также эпителиального маркера Е-кадгерина [20]. Эти изменения ассоциированы с прогрессированием заболевания и рассматриваются как потенциальные прогностические маркеры.

### **Изменение экспрессии генов при гепатоканцерогенезе**

Определение дифференциально экспрессируемых генов (ДЭГ) является ключевым этапом полногеномного профилирования экспрессии. Для этого традиционно используют одномерные статистические подходы: Significance Analysis of Microarrays (SAM) или Linear Models for Microarray Data (LIMMA) при работе с кДНК-микрочипами; для данных РНК-seq - модели на основе отрицательного биномиального распределения, реализованные в DESeq, или эмпирические методы анализа цифровой экспрессии в пакете edgeR [21]. Систематическое изучение ДЭГ при канцерогенезе позволяет глубже понять вклад генетических и эпигенетических нарушений в формирование опухолевого фенотипа, что определяет растущий интерес к транскриптомным исследованиям при ГЦК.

По данным NGS-исследования и анализов гибридизации у пациентов с ГЦК ученые предлагают выделить два основных молекулярных класса: пролиферативный и непролиферативный. Характеристики пролиферативного варианта: активация каскадов Ras и mTOR, амплификация локуса FGF19 и частая ассоциация с инфекцией HBV.

В зависимости от молекулярно-генетических изменений выделяют две подгруппы: с преобладанием активации TGF- $\beta$ -регулируемого пути и Wnt/ $\beta$ -катенина и с транскриптомным профилем клеток-предшественников гепатоцитов.

Характеристиками непролиферативного класса является низкий уровень дифференцировки, сосудистая инвазия, экспрессия маркера гепатобластов EpCAM, гиперэкспрессия  $\alpha$ -фетопротейна (АФП) и активация каскадов Notch и IGF2 и частая ассоциация с HCV-инфекцией или алкогольной болезнью печени, средняя или высокая степень дифференцировки, низкая секреция АФП и активация пути Wnt/ $\beta$ -катенина [10].

**Цель исследования:** оценить молекулярно-генетические особенности гепатоцеллюлярной карциномы методом NGS с последующим проведением корреляции с развитием рецидива и общей выживаемостью.

### Материалы и методы исследования

В работу включены результаты молекулярно-генетических исследований 39 пациентов (соотношение пациентов мужского и женского пола составило 25:14), прооперированных по поводу ГЦР в рамках МНИОИ им. П. А. Герцена с 2010 по 2024 г. Медиана возраста составила 66 лет.

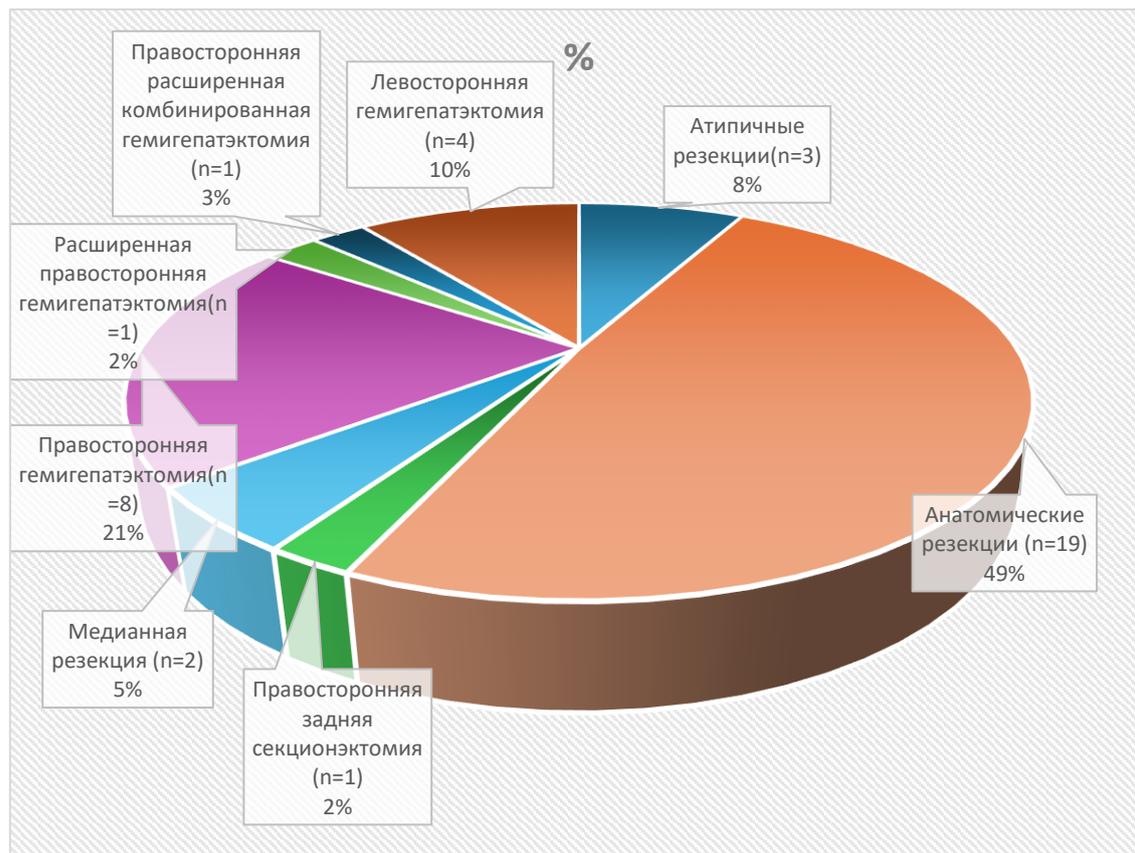


Рис. 1. Распределение пациентов по объемам хирургического вмешательства

Условные обозначения: n - количество пациентов в абсолютных числах

Примечание: составлено авторами по результатам данного исследования.

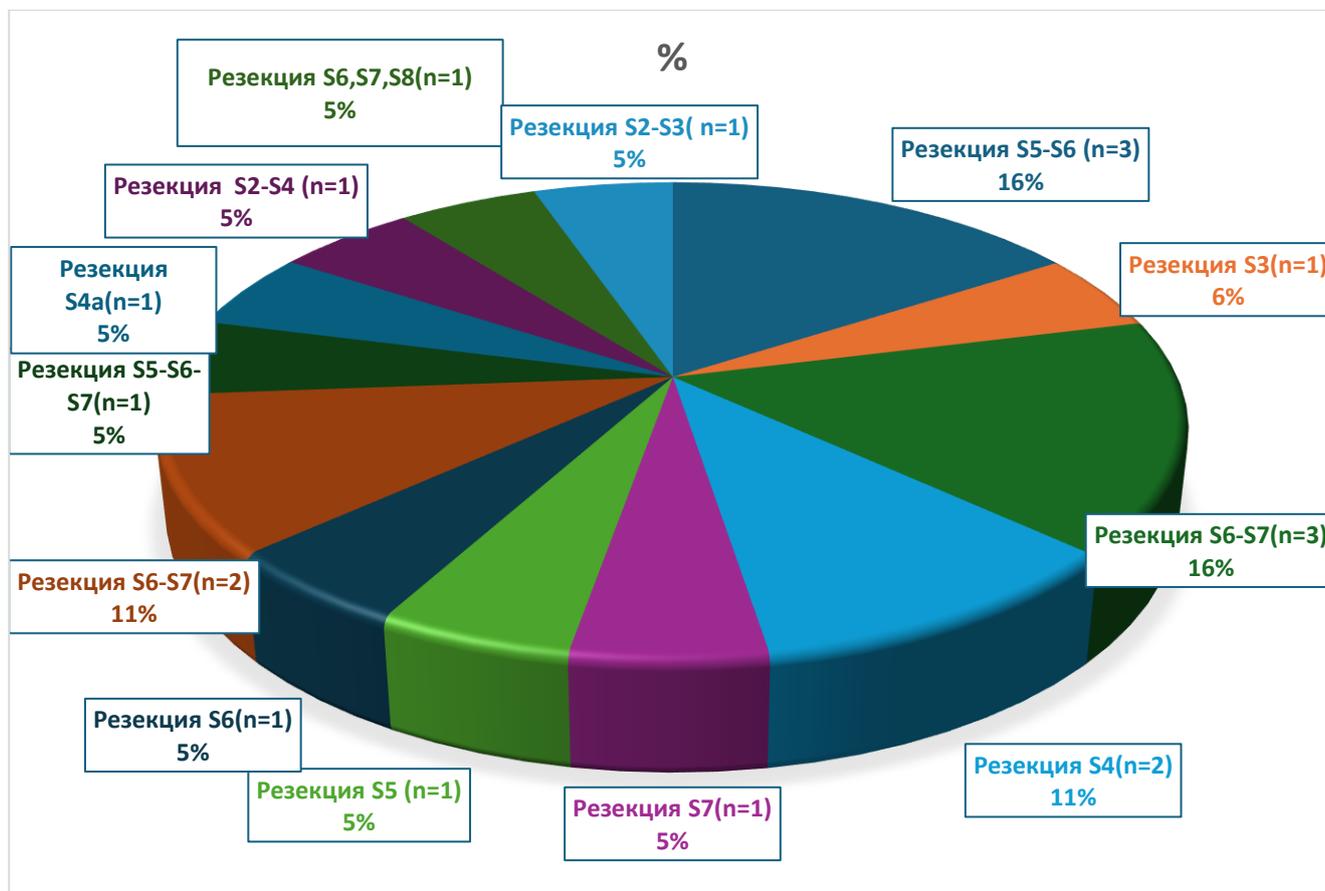


Рис. 2. Распределение пациентов по объемам анатомических резекций

Условные обозначения: n - количество пациентов в абсолютных числах

Примечание: составлено авторами по результатам данного исследования.

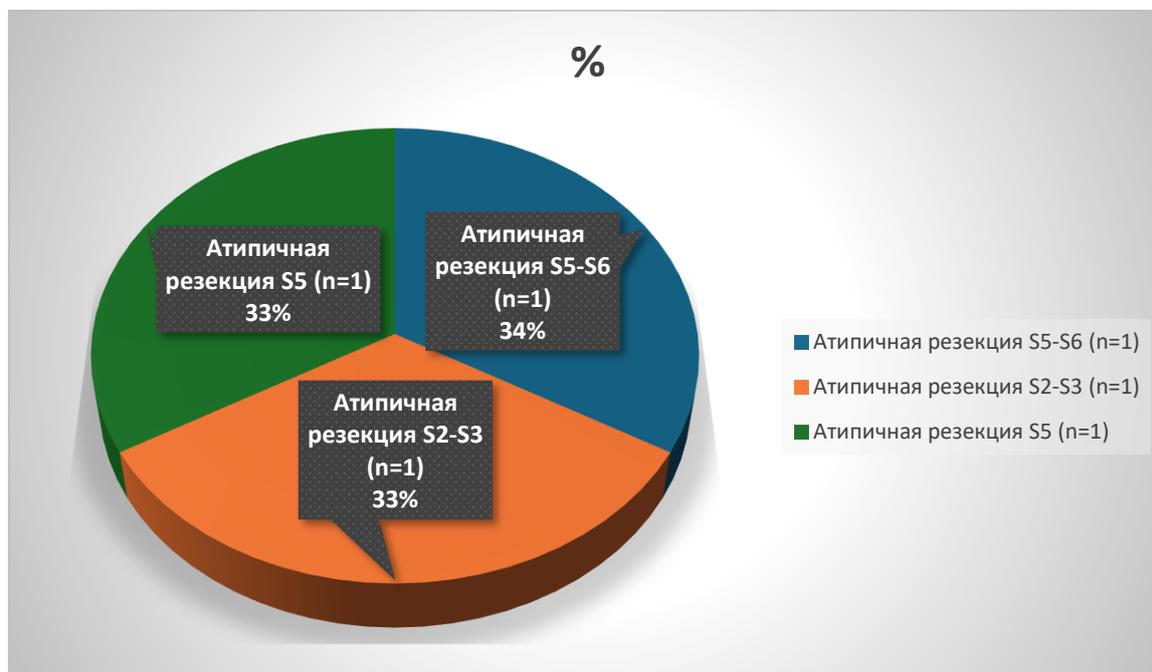


Рис. 3. Распределение пациентов по объемам атипичных резекций

Условные обозначения: n - количество пациентов в абсолютных числах

Примечание: составлено авторами по результатам данного исследования.

В исследование было включено 39 пациентов, которым были проведены хирургические вмешательства в следующих объемах: атипичные резекции - 3 (атипичная резекция S5-S6 сегментов - 1, атипичная резекция II-III сегментов печени - 1, атипичная резекция V сегмента печени - 1), анатомические резекции печени - 19 (резекция S5-S6 сегментов печени - 3, резекция 3-го сегмента печени - 1, резекция S6-S7-3, резекция S4 - 2, резекция S7 - 1, резекция S5 печени - 1, резекция S6 печени - 1, резекция S6-S7 печени - 2, резекция S5-S6-S7 печени - 1, резекция S4A сегмента печени - 1, резекция II-IVA сегментов печени - 1, резекция S6, S7, S8 сегментов печени - 1, резекция II-III сегментов печени - 1), правосторонней задней секционэктомии - 1, медианной резекции - 2, правосторонней гемигепатэктомии - 8, расширенной правосторонней гемигепатэктомии - 1, правосторонней расширенной комбинированной гемигепатэктомии - 1, левосторонней гемигепатэктомии - 4 (рис. 1-3).

В ходе приготовления библиотеки для секвенирования выяснилось, что достаточное количество и качество ДНК было получено из блоков только у 39 пациентов, которые и вошли в исследование. Распределение пациентом по TNM: pT1N0M0 - 6, pT3N0M0 - 9, pT2N0M0 - 12, pT1N0M0 - 2, pT1bN0M0 - 1, pT4N0M0 - 1, pT3bN0M0 - 1, pT2N1M0 - 1, pT2bN1M0 - 1, pT2cN0M0 - 1, ypT1bN0M0 - 1, pT3aN0M0 - 1, pT3bN0M0 - 2 пациента.

Для оценки молекулярно-генетических аспектов прогрессирования были экстрагированы ДНК из парафиновых блоков пациентов, прооперированных с 2010 по 2024 г.

### **Приготовление библиотек для высокопроизводительного параллельного секвенирования**

Соматическую ДНК выделяли из FFPE-образцов опухолевой ткани с использованием набора Qiagen QIAamp DNA FFPE Tissue Kit в соответствии с инструкцией производителя.

Библиотеки для секвенирования подготавливали с использованием набора VAHTS Universal Plus DNA Library Prep Kit v2 с ферментативной фрагментацией и последующим фракционированием по размеру. После лигирования адаптеров проводили PCR-амплификацию и нормализацию библиотек.

### **Таргетное обогащение и секвенирование**

Таргетное обогащение выполняли с помощью панели Nanodigmbio NanOnco Plus Panel v3.0 (637 генов). Секвенирование проводили на платформе MGI в режиме парных чтений 2×100 п.н. Концентрацию ДНК измеряли флуориметрически с использованием Qubit dsDNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific). Чистоту оценивали спектрофотометрически с помощью Nanodrop.

Биоинформатическую обработку данных осуществляли с использованием стандартного пайплайна, схожего с GATK BestPractice (GATK, Broad Institute). Качество исходных прочтений оценивали с помощью FastP, после чего выполняли обрезку адаптерных последовательностей

и низкокачественных. Полученные чтения выравнивали на референсный геном человека hg19 с помощью BWA-MEM2. Результирующие BAM-файлы обрабатывали путём маркирования дубликатов (STREAMMD), фильтрации и сортировки (Sambamba), а также выполняли рекалибровку качества оснований (BaseRecalibrator + ApplyBQSR, GATK).

Выявление соматических вариантов проводили с помощью Mutect2 в режиме анализа без герминального образца (single-sample mode), с применением панели нормальных образцов (Panel of Normals, PoN) и баз данных артефактов секвенирования для фильтрации ложноположительных результатов. Фильтрацию и аннотацию вариантов выполняли с использованием FilterMutectCalls (GATK) и инструментов аннотации (VEP, OpenCravat).

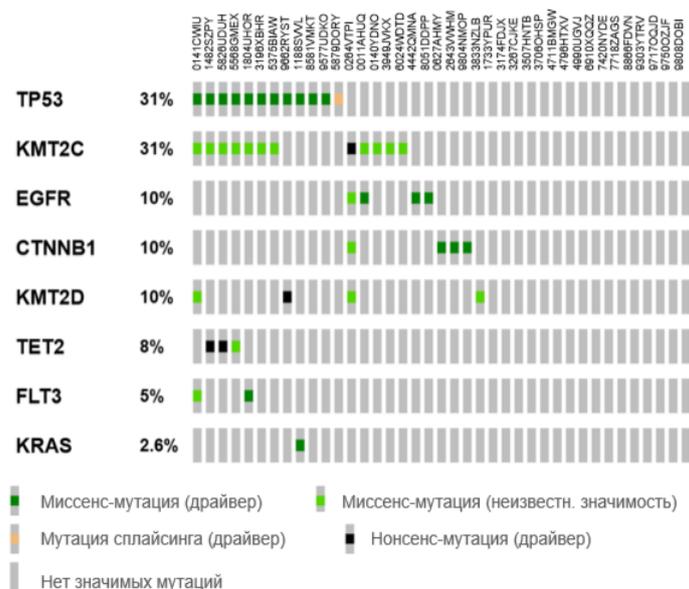
Для повышения точности интерпретации результатов исключали варианты, расположенные в участках с низким качеством картирования ( $GQ < 30$ ,  $DP < 20$ ). Фильтрация по частотам популяционных баз данных (gnomAD) позволяла исключить вероятные герминальные полиморфизмы. Окончательная валидация клинически значимых находок проводилась экспертным пересмотром.

### **Результаты исследования и их обсуждение**

В когорте из 39 пациентов с гепатоцеллюлярной карциномой были проанализированы мутации в панели из 637 онкогенов. В результате секвенирования и биоинформационного анализа выявлены соматические изменения в 95 различных генах.

По типам вариантов распределение оказалось следующим: миссенс-мутации (missense\_variant) - 290 случаев; сдвиги рамки считывания (frameshift\_variant) - 16 случаев; мутации, приводящие к преждевременному стоп-кодону (stop\_gained) - 10 случаев; варианты в донорных сайтах сплайсинга (splice\_donor\_variant) - 9 случаев; варианты в акцепторных сайтах сплайсинга (splice\_acceptor\_variant) - 4 случая; инфрейм-делеции (inframe\_deletion) - 6 случаев.

У 39 пациентов был проведён анализ мутационного профиля опухоли. Наиболее часто встречались мутации в генах GATA1 и ATRX, реже определялись изменения в NRG1, RANBP2, KDM6A, FAT1, PTEN, APC.



**Частота соматических мутаций при гепатоцеллюлярной карциноме (HCC): преобладают изменения в TP53 и CTNNB1**

Наиболее часто выявляются мутации в *TP53* (~30%) и *CTNNB1* (~10%), которые являются ключевыми драйверами канцерогенеза печени. Среди других драйверных изменений следует отметить активирующие мутации в генах *EGFR*, *KRAS*.

Изменения в генах эпигенетических регуляторов *KMT2C/KMT2D* в большинстве случаев являются "пассажирскими" мутациями.

*Рис. 4. Частота соматических мутаций при гепатоцеллюлярной карциноме*

Инструкция по чтению онкопринта: строки (по вертикали) - отдельные гены (например, TP53, KMT2C, EGFR). Цифра справа от названия гена - доля пациентов, у которых выявлены изменения в этом гене (например, TP53 мутирован у 31% пациентов). Столбики (по горизонтали) - отдельные пациенты. Каждый столбик соответствует одному образцу.

Цвета внутри квадратиков - тип мутации:

- зелёный - миссенс-мутации (замена аминокислоты);
- тёмно-зелёный - вероятный драйвер (значимая мутация);
- светло-зелёный - значение неизвестно;
- оранжевый - сплайс-мутации (значение неизвестно);
- чёрный - усечённые (truncating) мутации, вероятные драйверы (например, nonsense или frameshift);
- серый фон - мутации в данном гене у конкретного пациента не выявлены.

Примечание: составлено авторами по результатам данного исследования.

Наблюдается высокая частота соматических мутаций в ряде ключевых генов, определяющих молекулярные механизмы опухолевого роста. Наиболее часто выявляются изменения в генах **TP53** (~30%) и **CTNNB1** (~10%), которые считаются основными драйверами канцерогенеза печени. Мутации в **TP53** приводят к утрате функции опухолевого супрессора и способствуют геномной нестабильности, тогда как изменения в **CTNNB1** активируют сигнальный путь Wnt/ $\beta$ -катенина, усиливая пролиферацию и выживаемость опухолевых клеток (рис. 4).

Среди других значимых драйверных событий отмечаются активирующие мутации в генах **EGFR** и **KRAS**, участвующих в регуляции клеточного роста и передачи митогенных

сигналов. Кроме того, нередко встречаются мутации в генах эпигенетических регуляторов **KMT2C** и **KMT2D**, однако в большинстве случаев они носят «пассажирский» характер и не оказывают ключевого влияния на развитие опухоли (рис. 4).

Таким образом, спектр соматических мутаций при ГЦК характеризуется сочетанием драйверных изменений в сигнальных и регуляторных путях с дополнительными мутациями, отражающими генетическую гетерогенность опухоли.

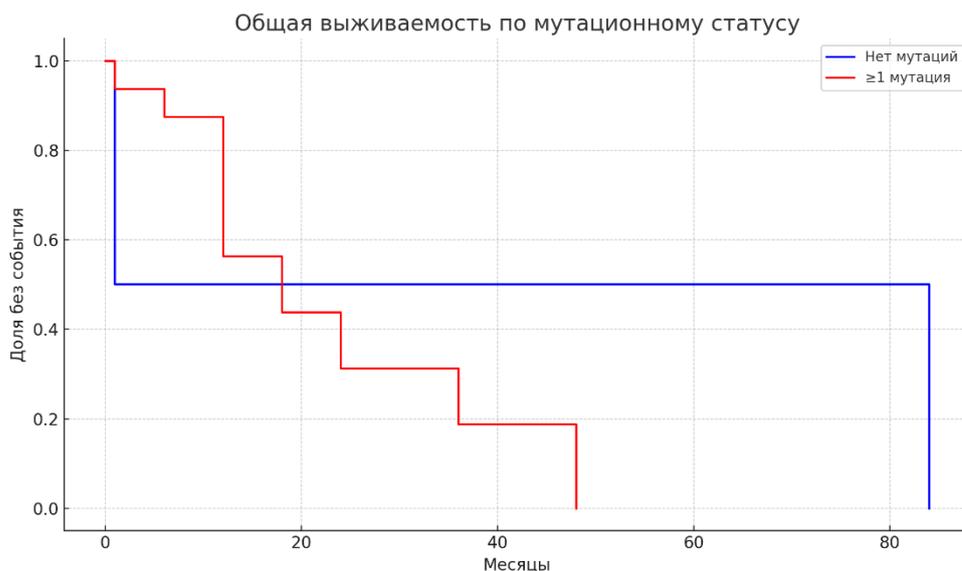


Рис. 5. Кривые Каплана – Майера для общей выживаемости в зависимости от мутационного статуса

Примечание: составлено авторами по результатам данного исследования.

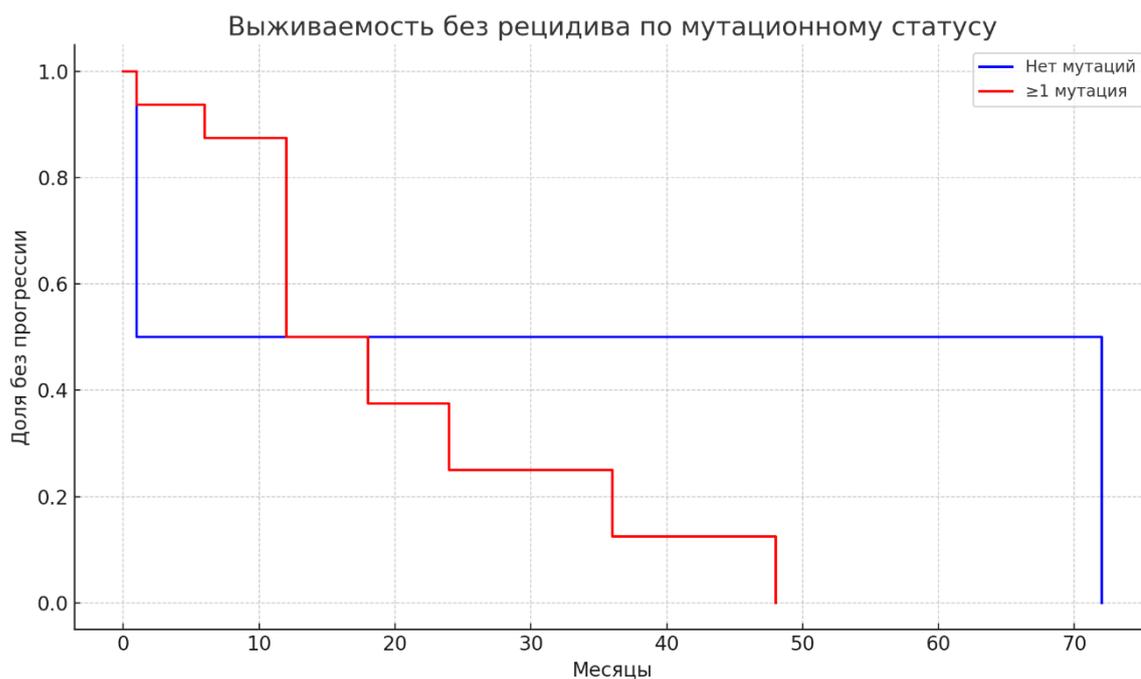


Рис. 6. Кривые Каплана – Майера для выживаемости без рецидива в зависимости от мутационного статуса

Примечание: составлено авторами по результатам данного исследования.

Сравнение пациентов без мутаций и с наличием хотя бы одной мутации показало различия в медианах общей выживаемости (42,5 против 18,0 месяцев) и выживаемости без рецидива (36,5 против 15,0 месяцев). Несмотря на выраженное снижение медианных значений в группе с мутациями, статистическая значимость различий не подтверждена ( $p=1,00$  по критерию Манна – Уитни), что объясняется малым числом пациентов в подгруппе без мутаций. Анализ отдельных генов выявил, что мутации ATRX и GATA1 ассоциировались с тенденцией к более низкой выживаемости, однако достоверных различий получено не было. Для редких мутаций (NRG1, RANBP2, KDM6A, FAT1, PTEN, APC) малые размеры подгрупп не позволили провести убедительную статистическую оценку (рис. 5, 6).

Результаты высокопроизводительного параллельного секвенирования ГЦР МНИОИ им. П. А. Герцена в сравнении с другими NGS (г. Москва)

Ген	МНИОИ им. П. А. Герцена (2025), n=39	Li J. et al. (2025), n=50 [22]	Mohmed M. M. et al. (2025), n=21 [23]
<b>TERT</b>	-	16п (32%)	-
<b>AKT</b>	-	-	12 (57%)
<b>NRAS</b>	-	-	4 (16,6%)
<b>TP53</b>	11п (30%)	24п (48%)	-
<b>GATA1</b>	39п (100%)	-	-
<b>ATRX</b>	39п (100%)	-	-
<b>CTNNB1</b>	3 (10%)	9п (18,0%)	-
<b>AXIN1</b>	-	7п (14%)	-

Примечание: составлено авторами по результатам данного исследования, на основе источников.

## **Сравнение результатов секвенирования нового поколения методом NGS у пациентов разных стран**

По сравнению с результатами МНИОИ им. П. А. Герцена, в исследовании, проведенном на когорте из 50 пациентов с ГЦК в больнице Западного Китая при Сычуаньском университете (Китай, 2025), осуществлено секвенирование на панели из 1021 гена (табл.). Результаты секвенирования показали, что наиболее часто мутировали гены TP53 (48,0%, 24/50) и TERT (32,0%, 16/50), за ними следуют LRP1B (26,0%, 13/50), CTNNB1 (18,0%, 9/50) и AXIN1 (14%, 7/50) [22]. Кроме того, проведена корреляция результатов генетического анализа с результатами иммуногистохимического исследования и данными клиники. У пациентов с TP53m наблюдалась значительная связь с умеренно дифференцированными опухолями и ранним рецидивом. В то же время наличие мутации в гене TERT в значительной степени были связаны с мужским полом и более низким уровнем АФП в сыворотке крови. Однако ни мутация в гене TP53, ни мутация в гене TERT не были связаны с возрастом, размерами тела, характеристиками опухоли или другими клиническими и лабораторными показателями, что указывает на более сложную взаимосвязь между этими генетическими изменениями и клиническими проявлениями. Из 50 пациентов с ГЦК у 23 наблюдался рецидив внутрипечёночной опухоли или отдалённые метастазы, у 9 была обнаружена только мутация TP53, у 3 - только TERT, у 6 - обе мутации, а у 5 - ни одной. Согласно этим данным, можно сделать вывод, что у пациентов с мутациями TP53 вероятность рецидива опухоли выше, чем у пациентов без мутаций. Хотя частота рецидивов ГЦК у пациентов с мутацией в гене TERT статистически не отличалась от частоты рецидивов у пациентов с отсутствием мутации в гене TERT, наличие мутации в гене TERT повышало вероятность рецидива опухоли у пациентов с 41,2 до 56,3%, особенно в отношении ранних рецидивов - с 23,5 до 43,8%. Однако у пациентов с мутацией в гене TP53 и TERT не было выявлено существенной разницы в частоте рецидивов по сравнению с пациентами с отрицательным результатом по TP53m и отрицательным результатом по TERT. Напротив, сочетание TERT<sup>mut</sup> и TP53<sup>mut</sup> указывало на более высокую вероятность рецидива опухоли и плохую выживаемость без прогрессирования. Это открытие представляет интерес, поскольку указывает на потенциальный синергетический эффект этих мутаций. Эта гипотеза подтверждается известным взаимодействием между p53 и TERT [22].

В исследовании Mohmed M. M. et al., проведенном на когорте из 21 пациента с ГЦК, проходивших лечение в отделении Национального института печени в Менуфии, всего было выявлено 16 соматических мутаций (12 в гене AKT1, 4 в гене NRAS). Наиболее частой мутацией в гене AKT1 была p.Asp32Glu, которая наблюдалась во многих клинических группах. Другие варианты, в том числе p.Glu40Gly и p.Asn31Ile, затрагивали консервативные участки киназного домена. Мутации в гене AKT1 чаще встречались на промежуточных и

поздних стадиях ГЦК, что указывает на их роль в прогрессировании опухоли. В отличие от этого, мутации NRAS встречались редко и были равномерно распределены по стадиям с ограниченной клинической корреляцией. В когорте пациентов с ГЦК было обнаружено 16 соматических мутаций в генах NRAS (n = 4) и AKT1 (n = 12) с различными закономерностями распределения по клиническим и геномным категориям. Две вариации NRAS, p.Asp47Glu и p.Asp47Ala, были выявлены во всех клинических группах, но не в геномных подгруппах. Одна из них была обнаружена у пациента с положительным результатом на ВГС, что указывает на случайное возникновение мутации, на которое могли повлиять вирусные причины [23].

### **Выводы**

В когорте из 39 пациентов с гепатоцеллюлярной карциномой промежуточный анализ показал выявление соматических изменений в 95 различных генах на панели из 637 онкогенов. Полученные данные свидетельствуют о том, что наличие мутаций в исследуемых генах, выявленное методом NGS, может влиять на показатели общей и безрецидивной выживаемости, однако для подтверждения их значения необходимы расширенные методы анализа выживаемости, что послужит предметом дальнейших исследований.

### **Список литературы**

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2021;71(3):209–249. doi: 10.3322/caac.21660.
2. Rungay H, Arnold M, Ferlay J, et al. Global burden of primary liver cancer in 2020 and predictions to 2040. *J Hepatol.* 2022;77(6):1598–1606. doi: 10.1016/j.jhep.2022.08.021.
3. Al-Awadhi SSA, Patil P, Shetty P, Shetty PK, Shetty RA, Shetty VV. Potential role of epidermal growth factor receptors (EGFR) signaling in the pathogenesis and management of hepatocellular carcinoma. *Bioimpacts.* 2025 Jul 1; 15:30905. doi: 10.34172/bi.30905. PMID: 40761521; PMCID: PMC12319217.
4. Bhushan B, Michalopoulos GK. Role of epidermal growth factor receptor in liver injury and lipid metabolism: emerging new roles for an old receptor. *Chem Biol Interact* 2020; 324:109090. doi: 10.1016/j.cbi.2020.109090.
5. Moon AM, Singal AG, Tapper EB. Contemporary epidemiology of chronic liver disease and cirrhosis. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2020; 18:2650–66.
6. Tacke F, Horn P, Wai-Sun Wong V, Ratziu V, Bugianesi E, Francque S, et al. EASL–EASD–EASO Clinical Practice Guidelines on the management of metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease (MASLD). *J Hepatol.* 2024; 81:492–542.

7. Mackowiak B, Fu Y, Maccioni L, Gao B. Alcohol-associated liver disease. *J Clin Investig.* 2024;134: e176345.
8. Злокачественные новообразования в России в 2024 году (заболеваемость) /под ред. А. Д. Каприна [и др.] М.: МНИОИ им. П. А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2025. 276 с.
9. Liu J, Xiong S, Zhao Y, Yang X, Shen J, He Z, Zhang Y, Zhang Y, Guo L, Liang T. Unraveling the multifaceted landscape of hepatocellular carcinoma evolution: From pivotal genetic drivers to therapeutic horizons. *Biochem Pharmacol.* 2025; 242(Pt2):117229. doi: 10.1016/j.bcp.2025.117229. Epub 2025 Aug 9. PMID: 40789370.
10. Меньшиков К. В., Султанбаев А. В., Мусин Ш. И., Рахматуллина И. Р., Меньшикова И. А., Абдеев Р. Р., Султанбаева Н. И., Попова Е. В., Серебренников Г. А. Гепатоцеллюлярная карцинома: этиологические факторы и механизмы развития. Обзор литературы. *Креативная хирургия и онкология.* 2022;12(2):139-150. doi: 10.24060/2076-3093-2022-12-2-139-150.
11. Шерифова А. И., Парсаданян А. М. Обзор предикторов развития рака печени. *Креативная хирургия и онкология.* 2023;13(3):229–237. doi: 10.24060/2076-3093-2023-3-229-237.
12. Crouchet E., Schuster C., Baumert T. F. Liver cell circuits and therapeutic discovery for advanced liver disease and cancer. *C R Biol.* 2021; 344 (3):233–248. DOI: 10.5802/crbio.64. PMID: 35786628; PMCID: PMC7613418.
13. Зубков Р. А., Забобонин К. Н., Симонова Е. В., Зубкова Е. Р. Гепатоцеллюлярная карцинома и особенности ее развития. *Лечащий Врач.* 2025; 2(28):32–37. doi: 10.51793/OS.2025.28.2.005.
14. Кузнецов О. Е., Цыркунов В. М. Вирус-ассоциированный гепатоцеллюлярный рак печени. *Гепатология и гастроэнтерология.* 2021; 5(1):17–24. doi: 10.25298/2616-5546-2021-5-1-17-24.
15. Goossens N, Hoshida Y. Hepatitis C virus-induced hepatocellular carcinoma. *Clin Mol Hepatol.* 2015; 21(2):105–114.
16. Краснова Д. С., Леженина С. В. Аналитический обзор алкоголь-ассоциированных заболеваний в смертности населения. *Вестник науки* 2026; 1 (94):2084–2098. г. ISSN: 2712–8849. URL: <https://www.вестник-науки.пф/article/28378>.
17. Wang X, Zhang L, Dong B. Molecular mechanisms in MASLD/MASH-related HCC. *Hepatology.* 2025; 1;82(5):1303-1324. doi: 10.1097/HEP.0000000000000786.
18. Shibata T, Aburatani H. Exploration of liver cancer genomes. *Gastroenterol Hepatol* 2014;11(6):340–9. doi: 10.1038/nrgastro. 2014.6. PMID: 24473361.

19. Schulze K, Imbeaud S, Letouzé E. et al. Exome sequencing of hepatocellular carcinomas identifies new mutational signatures and potential therapeutic targets. *Nat Genet* 2015; 44:505–11. doi: 10.1038/ng.3252. PMID: 25822088.
20. Wahid B, Ali A, Rafique S, Idrees M. New insights into the epigenetics of hepatocellular carcinoma. *Biomed ResInt* 2017;2017: 1609575. doi: 10.1155/2017/1609575.PMID: 28401148.
21. Gao F, Xia Y, Wang J. et al. Integrated analyses of DNA methylation and hydroxymethylation reveal tumor suppressive roles of ECM1, ATF5, and EOMES in human hepatocellular carcinoma. *Genome Biol* 2014; 15(12):533. doi: 10.1186/s13059-014-0533-9.PMID: 25517360.
22. Li J, Bai L, Xin Z et al. TERT-TP53 mutations: a novel biomarker pair for hepatocellular carcinoma recurrence and prognosis. *Sci Rep.* 2025; 15:3620. doi: 10.1038/s41598-025-87545-z.
23. Mohmed MM, Talaat RM, Sakr MA et al. Genomic profiling of AKT1 and NRAS mutations using NGS in Egyptian hepatocellular carcinoma. *Discov Onc.* 2025; 16:2191 doi: 10.1007/s12672-025-04015-8.

**Конфликт интересов:** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Conflict of interest:** The authors declare that there is no conflict of interest.