

А.В. Резайкин^{1,2}, С.В. Сазонов^{1,2}

ПРИМЕНЕНИЕ СОВРЕМЕННЫХ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ДИАГНОСТИКИ В ОНКОЛОГИИ

¹ ГАУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий»,
г. Екатеринбург, Российская Федерация;

² ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский
университет», г. Екатеринбург, Российская Федерация

Резюме. Основными инструментами персонализированной онкологии считаются молекулярногенетические методы диагностики (МГМД), позволяющие определить риск развития опухоли, прогноз заболевания, выбор и предсказание ответа на лечение и другие факторы. Объектами тестирования, в этом случае, являются специфические для опухолей генетические нарушения — мутации, которые можно обнаруживать в различных типах биологических образцов. Важнейшим технологическим прорывом 20 века в молекулярной медицине стало появление высокопроизводительного параллельного секвенирования нового поколения (NGS). Технологии NGS позволяют проводить одновременный анализ широкого спектра генетических нарушений, включая точковые мутации, делеции, инсерции, вариации копийности, транслокации и др. По сравнению с традиционными МГМД, с точки зрения экономии биоматериала, затрат времени и финансов, технологии NGS более выгодны. В современной клинической онкологии можно выделить несколько направлений где уже сегодня активно применяют молекулярно-генетические маркеры, выявляемые с помощью МГМД, в том числе с помощью NGS. К таким направлениям относятся: 1) индикация герминальных (врожденных) мутаций; 2) персонализированное лечение онкологических заболеваний, включая определение маркеров прогноза и метастазирования; 3) исследование циркулирующей опухолевой ДНК (жидкостная

биопсия). Определение врожденных мутаций в семьях с отягощенной онкологической наследственностью, у бессимптомных носителей и больных значительно повышает эффективность профилактических мер, позволяет контролировать момент манифестации. Своевременная диагностика опухоли ведет к повышению эффективности лечения и снижению его стоимости. Знания механизмов канцерогенеза позволяет разрабатывать и эффективно применять новые химиопрепараты, воздействующие непосредственно на опухолевые клетки. Молекулярно-генетический анализ циркулирующей опухолевой ДНК дает возможность более комплексного изучения опухоли, с поправкой на ее гетерогенность. Активное внедрение технологий NGS в клиническую практику делает нас на шаг ближе к персонализированной медицине.

Ключевые слова: молекулярно-генетические методы, онкология, секвенирование нового поколения, персонализированная медицина, новообразования, диагностика, прогноз

Актуальность

Бурный рост числа онкологических заболеваний во всем мире диктует необходимость поиска и внедрения новых, инновационных и персонализированных подходов их диагностики и лечения. Традиционная тактика «одно средство для всех» вытесняется персонализированной медициной, которая подразумевает адаптацию терапии к индивидуальным особенностям пациента, включая его генетический профиль [1, 2, 3]. Одними из основных инструментов персонализированной медицины считаются молекулярногенетические методы исследования, направленные на установление риска развития опухоли, уточнение прогноза заболевания, выбор и предсказание ответа на лечение и другие факторы. В этом случае, объектами тестирования являются специфические для опухолей генетические нарушения — мутации, которые можно обнаруживать в различных типах биологических образцов [4, 5].

В 2016 году Всемирная организация здравоохранения, под-

черкивая значимость молекулярно-генетических методов для диагностики и точного прогноза онкологических заболеваний, рекомендовала новый подход к классификации опухолей. В основе новой классификации, кроме особенностей гистологического строения новообразования, обязательно учитывается наиболее значимая, молекулярно-генетическая характеристика или хромосомная aberrация [6, 7].

Спектр современных методов, применяемых для индикации генетических нарушений достаточно широк. Он включает в себя как относительно простые технологии, направленные на обнаружение единичных мутаций с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) или секвенирования фрагментов генома по Сенгеру, так и методы, позволяющие охарактеризовать весь опухолевый геном целиком, например, высокопроизводительное секвенирование нового поколения или биологические микрочипы [8, 9].

Традиционные молекулярно-генетические методы диагностики (МГМД) обладают достаточно высокой чувствительностью и специфичностью для индикации отдельных мутаций, однако необходимость одновременного тестирования сразу нескольких мутационных событий, затрагивающих разные гены, приводит к существенному увеличению временных и финансовых затрат [10, 11]. Важнейшим технологическим прорывом 20 века в молекулярной медицине стало появление высокопроизводительного параллельного секвенирования нового поколения (Next Generation Sequencing, NGS). Данный термин объединяет группу технологий, предложенных различными компаниями (Illumina, Thermo Fisher Scientific, Roche) основным принципом которых является одновременное параллельное секвенирование миллионов коротких фрагментов ДНК с дальнейшим восстановлением исходной последовательности нуклеотидов. Технологии NGS позволяют проводить одновременный анализ широкого спектра генетических нарушений, включая точковые мутации, делеции, инсерции, вариации копияности, транслокации и др. С точки зрения экономии биоматериала (опухолевой ткани), затрат времени и финансов, по сравнению с традицион-

ными МГМД, технологии NGS более выгодны [10, 11, 12].

Современные технологии NGS объединяют в себе целый набор стратегий крупномасштабных исследований генетической информации, отличающихся целевой направленностью и объемом выполняемых анализов. Помимо определения последовательности нуклеотидов всей кодирующей и некодирующей ДНК (полногеномное секвенирование, *whole genome sequencing*), возможно определение последовательности нуклеотидов только белок-кодирующих участков генома — полноэкзомное секвенирование (*whole exome sequencing*), секвенирование транскриптома (участков ДНК, переписываемых в мРНК), или таргетное (целевое) секвенирование — определение последовательности нескольких наиболее значимых коротких фрагментов генома [11, 13, 14, 15].

На сегодняшний день, таргетное секвенирование получило наибольшее практическое применение, что связано с самой низкой стоимостью анализа одного генома. Коммерческие таргетные панели охватывают не весь геном, а лишь небольшую его часть, связанную с клинически значимыми локусами («горячие экзоны» протоонкогенов и др.). Однако, таргетные NGS-панели могут включать в себя до нескольких сотен таких локусов, что позволяет выполнять исчерпывающее геномное профилирование (*comprehensive genomic profiling*) и получать информацию о наличии или отсутствии у пациента всех клинически значимых мутаций. В качестве примера можно привести коммерческую таргетную панель *TruSight Oncology 500* фирмы *Illumina*, которая позволяет провести анализ 523 генов на наличие однонуклеотидных замен, инсерций, делеций, нарушений копийности, нарушений сплайсинга и других мутаций [16].

Стоит отметить, что в настоящее время МГМД на основе NGS упоминается только в одной российской публикации клинических рекомендаций — «Рак молочной железы» (КР 379/1) 2020 года. В случае, если пациентки имеют личный/наследственный анамнез и у них не выявлены частые наследственные мутации в генах *BRCA1/2*, их следует направлять на расширенное исследование герминальных и/или соматических мутаций с исполь-

зованием NGS [17]. В то же время в зарубежных клинических рекомендациях технологии NGS значительно чаще (NCCN — 22 раза, ESMO — 9 раз) рекомендованы для широкого использования в качестве как основного, так и альтернативного метода исследования с целью диагностики, определения прогноза, выбора и оценки эффективности терапии. Данная ситуация свидетельствует о том, что технологии NGS еще недостаточно доступны и востребованы в отечественной клинической практике.

В современной клинической онкологии можно выделить несколько направлений где уже сегодня активно применяют молекулярно-генетические маркеры, выявляемые с помощью МГМД, в том числе с помощью NGS. К таким направлениям относятся: 1) индикация герминальных (врожденных) мутаций; 2) персонализированное лечение онкологических заболеваний, включая определение маркеров прогноза и метастазирования; 3) исследование циркулирующей опухолевой ДНК (жидкостная биопсия).

Индикация герминальных (врожденных) мутаций

Наследственные онкологические синдромы характеризуются накоплением в семье случаев новообразований определенного типа, передачей заболевания из поколения в поколение, ранней манифестацией, а также появлением множественных опухолей. Врожденные мутации в генах ответственных за возникновение наследственных форм рака возникают в гаметах родителей или *de novo* на ранних стадиях эмбриогенеза. Появление таких мутаций увеличивает риск развития опухоли в десятки и сотни раз [18, 19]. Основные наследственные онкологические синдромы представлены в таблице 1.

Таблица 1
Наследственные онкологические синдромы *

Название синдрома	Поврежденный ген	Локализация опухоли
Семейный рак молочной железы и яичника	BRCA1, BRCA2, PALB2	Рак молочной железы, яичника, желудка; рак предстательной железы и поджелудочной железы
Семейный рак молочной железы: новые гены и/или гены с умеренной пенетрантностью	CHEK2, ATM, BARD1, BLM, BRIP1, NBS/ NBN, MRE11, RAD50, RAD51C, RAD51D, FANCC, FANCM	Рак молочной железы
Синдром Линча (наследственный неполнозный рак толстой кишки)	MLH1, MSH2, MSH6, PMS2, EPCAM	Карциномы толстой кишки, эндометрия, яичника, желудка, тонкой кишки, уретелия
Наследственный рак толстой кишки	POLE, POLD1	Полипоз толстой кишки, коло-ректальный рак
Семейный аденоматозный полипоз	APCM	множественные аденомы толстой кишки, десмоидные опухоли, рак толстой кишки
MUTYH-ассоциированный полипоз	MUTYH	Умеренное количество аденом толстой кишки, рак толстой кишки
NTHL1-ассоциированный полипоз	NTHL1	Полипоз толстой кишки, коло-ректальный рак
Ювенильный полипоз	SMAD4, BMPR1A	Полипоз толстой кишки, коло-ректальный рак, другие опухоли желудочно-кишечного тракта
Синдром Peutz-Jeghers	STK11	Гамартомы, опухоли желудочно-кишечного тракта
Наследственный рак желудка	CDH1	Рак желудка
Синдром Li-Fraumeni	TP53	Саркомы мягких тканей, рак молочной железы, опухоли мозга, карциномы надпочечников

Название синдрома	Поврежденный ген	Локализация опухоли
Множественная эндокринная неоплазия, тип 1	MEN1	Опухоли паращитовидных желез, гипофиза, желудка, тонкой кишки, поджелудочной железы
Множественная эндокринная неоплазия, тип 2	RET	Медулярный рак щитовидной железы, феохромоцитомы
Синдром Von Hippel-Lindau	VHL	Светлоклеточные карциномы почки, гемангиобластомы, другие опухоли
Синдром Cowden	PTEN	Множественные гамартомы, рак молочной железы, рак щитовидной железы
Семейная ретинобластома	RB1	Билатеральная ретинобластома
Семейная множественная меланома	CDKN2A, CDK4	Меланомы

* таблица составлена на основе [20, 21]

Выявление герминальных мутаций при бессимптомном носительстве позволяет контролировать манифестацию онкологического процесса, а при некоторых типах опухолей, например раке молочной железы или раке почки, влияет на тактику профилактики и лечения, вносит коррекцию в объем хирургического вмешательства и спектр химиотерапевтического лечения [22].

В настоящее время для анализа локусов, ассоциированных с наследственными онкологическими синдромами, широко используются традиционные МГМД, основанные на ПЦР и секвенировании фрагментов генома по Сэнгеру. Однако данные методы применимы только для поиска известных, наиболее распространенных мутаций и, чаще всего, требуют выполнения отдельного исследования для каждого маркера. Данные, приведенные в таблице 1 показывают, что индикация генетических изменений, связанных с развитием опухолей определенного типа, нередко, требует исследования нескольких маркеров в нескольких генах. NGS в сочетании с таргетным секвенированием позволяет в короткие сроки, одновременно провести исследование всех необходимых «горячих» генов на наличие в них кли-

тически значимых генетических изменений, а следовательно, легко решает эту задачу.

Диагностика и персонализированное лечение онкологических заболеваний

Благодаря совершенному за последние два десятилетия технологическому прорыву в понимании геномных, транскрипционных, протеомных, эпигенетических и иммунных механизмов канцерогенеза, появилась реальная возможность создания таргетных препаратов целенаправленно воздействующих на определенные этапы патогенеза опухоли, блокирующие ее рост, распространение и метастазирование [23, 24]. Основными мишенями таргетных препаратов являются факторы роста и их рецепторы (рецепторы эпидермального фактора роста и фактора роста эндотелия сосудов), белки проведения митогенных сигналов от рецепторных молекул, нерцепторные тирозинкиназы, белки семейства RAS, циклинзависимые киназы, молекулы, контролирующие апоптоз и ангиогенез [23, 25, 26]. Для успешного применения этих препаратов необходима предварительная оценка используемого ими патогенетического звена канцерогенеза. Исследование мутаций в генах белков-мишеней возможно только с помощью МГМД.

Одним из важных событий прошлого десятилетия можно считать почти случайное обнаружение мутаций в гене рецептора эпидермального фактора роста (EGFR), ассоциированных с ответом на терапию ингибиторами данной киназы (гефитиниб и эрлотиниб). Данные таргетные препараты оказались крайне эффективными, однако только по отношению к EGFR, содержащему специфические генетические изменения [27, 28].

Специфический ингибитор тирозинкиназы ALK — кризотиниб, эффективен в качестве специфической терапии рака легкого при наличии транслокации данного гена [29]. В результате направленного поиска молекулярных мишеней в опухолевых клетках были синтезированы специфические ингибиторы мутированной киназы BRAF — вемурафениб и дабрафениб [30]. В настоящее время применяются МГМД ассоциированные с при-

менением таргетных препаратов. В качестве примера можно привести мутации в генах RAS, MET, RET, NTRK и др. [21, 31].

Однако нельзя забывать, что под давлением таргетных препаратов атипичные клетки эволюционируют и могут принципиально изменять свои биологические свойства. Постепенное накопление в процессе терапии вторичных мутации ведет к потере мишени и выходу опухоли из под прессинга химиотерапии [32, 33]. В качестве примера можно привести мутацию T790M в гене EGFR, которая наблюдается примерно у половины пациентов с приобретённой резистентностью к гефитинибу, эрлотинибу или афатинибу [34, 35].

Подобное поведение новообразований заставляет включать в структуру клинических испытаний практику повторного анализа характеристик опухоли в процессе лечения. Однако, следует учитывать, что повторная биопсия всегда связана с этическими и техническими проблемами. Инвазивный отбор опухолевых тканей сопряжён с рискованным и неприятным для пациента хирургическим вмешательством, при этом данная процедура не учитывает возможную биологическую гетерогенность опухолевой ткани, что может привести к ложному результату.

Исследование циркулирующей опухолевой ДНК (жидкостная биопсия)

Образец атипичной ткани при рутинной биопсии получается в фиксированный момент времени (перед началом лечения и/или на момент прогрессирования), и изменения происходящие в опухоли в процессе эволюции на фоне противоопухолевой терапии не могут быть адекватно оценены в динамике. Достижение полной регрессии клинически определяемых очагов далеко не всегда обозначает полное излечение. Рецидив после ранее достигнутого эффекта может быть обусловлен наличием резистентного клона, который существовал на момент начала терапии или возник в процессе ее проведения, но не был замечен [36, 37, 38].

Одним из методов, позволяющих решить эту проблему, является определение циркулирующей в кровотоке опухолевой ДНК

— жидкостная биопсия. Эта ДНК представляет собой короткие фрагменты (до нескольких сотен пар оснований) генома погибших опухолевых клеток, попавшие в кровоток [39]. Свободно циркулирующие фрагменты опухолевого генома потенциально позволяют получить гораздо более полную информацию о генетических характеристиках опухоли. Они могут быть измерены количественно (для определения истинного объема опухоли), и оценены качественно, являясь в идеале «отпечатками пальцев» всей опухоли, а не ее отдельного фрагмента. По литературным данным уровень циркулирующей опухолевой ДНК увеличивается с прогрессированием заболевания и снижается после успешного терапевтического и хирургического лечения, что позволяет применять данный неинвазивный метод для мониторинга опухолевого ответа на терапию [40].

Существенным недостатком жидкостной биопсии является относительно низкая чувствительность, однако использование в качестве МГМД технологий NGS, отличающихся крайне высокой чувствительностью при низкой копияности патологически измененной ДНК поможет решить эту проблему[41].

Заключение

Применение МГМД в клинической онкологии позволяет не только понять фундаментальные механизмы канцерогенеза, но и принести практическую пользу. Диагностика предрасположенности к онкологическим заболеваниям имеет прямой выход в профилактическую медицину. Определение врожденных мутаций в семьях с отягощенной онкологической наследственностью, у бессимптомных носителей и больных значительно повышает эффективность профилактических мер, позволяет контролировать момент манифестации. Своевременная диагностика опухоли ведет к повышению эффективности лечения и снижению его стоимости. Знания механизмов канцерогенеза позволяет разрабатывать и эффективно применять новые химиопрепараты, воздействующие непосредственно на опухолевые клетки. Диагностика маркеров прогноза дает дополнительные возможности для коррекции тактики лечения. Молекулярно-ге-

нетический анализ циркулирующей опухолевой ДНК дает возможность более комплексного изучения опухоли, с поправкой на ее гетерогенность, и позволяет надеяться на преодоление ключевых недостатков, характерных для рутинной биопсии. Благодаря своей высокой производительности, чувствительности и относительно низкой себестоимости, технологии NGS составляют достойную конкуренцию классическим методам МГМД (ПЦР, секвенирование фрагментов по Сенгеру, гибридизация). Активное внедрение этих технологий в клиническую практику делает нас на шаг ближе к персонализированной медицине.

ЛИТЕРАТУРА

1. Tsimberidou A.M., Fountzilas E., Nikanjam M., Kurzrock R. Review of precision cancer medicine: Evolution of the treatment paradigm. *Cancer Treat Rev.* 2020; 86:102019. doi:10.1016/j.ctrv.2020.102019
2. Malone E.R. et al. Molecular profiling for precision cancer therapies. *Genome Med.* 2020, Vol. 12, № 1. P. 8.
3. Jackson S.E., Chester J.D. Personalised cancer medicine. *Int J Cancer.* 2015 Jul 15; 137(2): 262-6.
4. Begum R. A decade of Genome Medicine: toward precision medicine. *Genome Med. BioMed Central,* 2019. Vol. 11, № 1. P. 13.
5. Shukla K.K., Sharma P., Misra S. Molecular diagnostics in cancer patients. *Mol. Diagnostics Cancer Patients.* 2019. P. 1 - 341.
6. Louis D.N., Ohgaki H., Wiestler O.D., Cavenee W.K. (Eds): *WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System (Revised 4th edition).* IARC: Lyon, 2016. 408 p.
7. Louis D.N., Perry A., Reifenberger G. et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathologica.* – 2016. - Vol. 131. - P. 803 - 820
8. D'Angelo G., Di Rienzo T., Ojetti V. Microarray analysis in gastric cancer: a review. *World J Gastroenterol.* 2014 Sep 14; 20(34):11972-6.
9. Barkhatov I.M., Predeus A. V., Chukhlovina A. B. Next-Generation Gene Sequencing and Its Applications in Oncohematology.

Oncohematology. 2016. Vol. 11, № 4. P. 56–63.

10, Malone E.R. et al. Molecular profiling for precision cancer therapies. *Genome Med.* 2020, Vol. 12, № 1. P. 8.

11. Kchouk M., Gibrat J.-F., Elloumi M. Generations of Sequencing Technologies: From First to Next Generation. *Biol. Med.* 2017. Vol. 09.

12. Новикова Е.И., Снигирева Г.П. Секвенирование «нового поколения» (NGS): применение для молекулярно-генетических исследований в онкологии. *Вестник Российского научного центра рентгенорадиологии.* 2016. Т.16. № 1. С. 6.

13. Teer J.K., Mullikin J.C. Exome sequencing: the sweet spot before whole genomes. *Hum Mol Genet.* 2010 Oct 15; 19(R2):R145-51.

14. Slatko B.E., Gardner A.F., Ausubel F.M. Overview of Next-Generation Sequencing Technologies. *Curr Protoc Mol Biol.* 2018 Apr; 122(1):e59.

15. Kumar K.R., Cowley M.J., Davis R.L. Next-Generation Sequencing and Emerging Technologies. *Semin Thromb Hemost.* 2019 Oct; 45(7):661-673.

16. Zehir A, Benayed R, Shah RH, et al. Mutational landscape of metastatic cancer revealed from prospective clinical sequencing of 10,000 patients. *Nat Med.* 2017; 23(6):703-713.

17. Клинические рекомендации «Рак молочной железы»; Ассоциация онкологов России, Российское общество клинической онкологии, Российское общество онкомаммологов. 2020,

18. Lener M.R., Kashyap A., Kluźniak W., et al. The Prevalence of Founder Mutations among Individuals from Families with Familial Pancreatic Cancer Syndrome. *Cancer Res Treat.* 2017; 49(2):430-436.

19. Lynch H.T., Deters C.A., Lynch J.F., Brand R.E. Familial pancreatic carcinoma in Jews. *Fam Cancer.* 2004; 3(3-4):233-40,

20, Имянитов Е.Н. Роль молекулярно-генетической диагностики в практической онкологии. *Практическая онкология.* 2019. Т.20, № 4. С.261-273.

21. Sokolenko A.P., Imyanitov E.N. Molecular Diagnostics in Clinical Oncology. *Front Mol Biosci.* 2018; 5:76.

22. Paradiso A., Formenti S. Hereditary breast cancer: clinical features and risk reduction strategies. *Ann Oncol* 2011; Suppl. 1: 31-36.

23. Tsimberidou A.M. Targeted therapy in cancer. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2015 Dec; 76(6):1113-32.

24. Tsimberidou A.M. Initiative for Molecular Profiling and Advanced Cancer Therapy and challenges in the implementation of precision medicine. *Curr Probl Cancer.* 2017 May-Jun; 41(3):176-181.

25. Yamaoka T, Kusumoto S, Ando K, Ohba M, Ohmori T. Receptor Tyrosine Kinase-Targeted Cancer Therapy. *Int J Mol Sci.* 2018 Nov 6; 19(11):3491.

26. Jiang W, Ji M. Receptor tyrosine kinases in PI3K signaling: The therapeutic targets in cancer. *Semin Cancer Biol.* 2019 Dec; 59:3-22.

27. Paez J.G., Jänne P.A., Lee J.C., Tracy S., Greulich H., Gabriel S., Herman P., Kaye F.J., Lindeman N., Boggon T.J., Naoki K., Sasaki H., Fujii Y., Eck M.J., Sellers W.R., Johnson B.E., Meyerson M. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science.* 2004. Vol. 304, No 5676. P.1497–500,

28. Pao W., Miller V., Zakowski M., Doherty J., Politi K., Sarkaria I., Singh B., Heelan R., Rusch V., Fulton L., Mardis E., Kupfer D., Wilson R., Kris M., Varmus H. EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from «never smokers» and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004. Vol.101, No 36. P. 13306 - 11.

29. Shaw A.T., Ou S.H., Bang Y.J., Camidge D.R., Solomon B.J., Salgia R., Riely G.J., Varella-Garcia M., Shapiro G.I., Costa D.B., Doebele R.C., Le L.P., Zheng Z., Tan W., Stephenson P., Shreeve S.M., Tye L.M., Christensen J.G., Wilner K.D., Clark J.W., Iafrate A.J. Crizotinib in ROS1-rearranged non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med.* 2014. Vol. 371, No 21. P.1963 - 71.

30, Planchard D., Smit E.F., Groen H.J.M., Mazieres J., Besse B., Helland A., Giannone V., D'Amelio A.M.Jr., Zhang P., Mookerjee B., Johnson B.E. Dabrafenib plus trametinib in patients with previously untreated BRAF (V600E)-mutant metastatic non-small-cell lung cancer: an open-label, phase 2 trial // *Lancet Oncol.* 2017. Vol. 18,

No 10, P.1307 - 1316

31. Sokolenko A.P., Imyanitov E.N. Molecular Tests for the Choice of Cancer Therapy. *Curr Pharm Des.* 2017. Vol. 23, No 32. P.4794 - 4806.

32. Greaves M., Maley C.C. Clonal evolution in cancer. *Nature* 2012; 481(7381):306–13.

33. Desai J., Shankar S., Heinrich M.C. et al. Clonal evolution of resistance to imatinib in patients with metastatic gastrointestinal stromal tumors. *Clin Cancer Res* 2007; 13 (18 Pt 1):5398–405.

34. Janne P.A., Yang J.C., Kim D.W., Planchard D., Ohe Y., Ramalingam S.S., Ahn M.J., Kim S.W., Su W.C., Horn L., Haggstrom D., Felip E., Kim J.H., Frewer P., Cantarini M., Brown K.H., Dickinson P.A., Ghiorghiu S., Ranson M. AZD9291 in EGFR inhibitor-resistant non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med.* 2015. Vol. 372, No 18. P.1689 - 99.

35. Aleksakhina S.N., Kashyap A., Imyanitov E.N. Mechanisms of acquired tumor drug resistance. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer.* 2019. Vol.1872, No 2. P.188310,

36. Gerlinger M., Rowan A.J., Horswell S. et al. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N Engl J Med* 2012;366(10):883–92.

37. Taniguchi K., Okami J., Kodama K. et al. Intratumor heterogeneity of epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer and its correlation to the response to gefitinib. *Cancer sci* 2008;99(5):929 - 35.

38. Campbell L.L., Polyak K. Breast tumor heterogeneity: cancer stem cells or clonal evolution? *Cell Cycle* 2007;6(19):2332–8.

39. Jahr S., Hentze H., Englisch S. et al. DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer Res* 2001;61(4):1659 - 65.

40. Geurickx E., Hendrix A. Targets, pitfalls and reference materials for liquid biopsy tests in cancer diagnostics. *Mol Aspects Med.* 2019. pii: S0098-2997(19)30084-6.

41. Chen M, Zhao H. Next-generation sequencing in liquid biopsy: cancer screening and early detection. *Hum Genomics.* 2019 Aug 1;13(1):34.