

На правах рукописи

ТЮРИН

Владислав Ильич

**ИЗУЧЕНИЕ ПРЕДИКТИВНЫХ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ
МАРКЕРОВ ЭФФЕКТИВНОСТИ ТЕРАПИИ РАКА ЛЁГКОГО**

3.1.6. – онкология, лучевая терапия

1.5.4. – биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Санкт-Петербург

2021

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Петрова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

чл.-корр. РАН, доктор медицинских наук, профессор **Имянитов Евгений Наумович**

Официальные оппоненты:

Орлова Рашида Вахидовна – доктор медицинских наук, профессор, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет», заведующий кафедрой онкологии медицинского факультета

Байков Вадим Валентинович – доктор медицинских наук, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, профессор кафедры патологической анатомии

Ведущее учреждение: федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский научный центр радиологии и хирургических технологий имени академика А.М. Гранова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «__» _____ 2021 г. в ____ часов на заседании диссертационного совета 21.1.033.01 при ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России (197758, Санкт-Петербург, Песочный-2, ул. Ленинградская, д. 68).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России по адресу: 197758, Санкт-Петербург, пос. Песочный, ул. Ленинградская, д. 68, на сайте <http://www.niioncologii.ru>

Автореферат разослан «__» _____ 2021 г.

Учёный секретарь диссертационного совета,
доктор медицинских наук

Филатова Лариса Валентиновна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Рак лёгкого (РЛ) является самым распространённым злокачественным новообразованием и занимает первое место в структуре онкологической смертности. Ежегодно по всему миру фиксируют 2,1 млн новых случаев заболеваемости РЛ, 1,8 млн человек погибает от этого недуга [Bray et al., 2018].

Причиной возникновения подавляющего большинства (80–90%) случаев РЛ является курение, оставшиеся случаи обусловлены воздействием индустриальных, экологических и других факторов [Biesalski et al., 1998]. По результатам исследования «GATS», проведённого в России в 2016 году, 49,8% мужчин и 14,5% женщин являются активными курильщиками табака, что суммарно составляет 35,4 млн человек. Каждый из них входит в зону повышенного риска злокачественных заболеваний, особенно РЛ.

Длительное время считалось, что РЛ в значительной степени предотвратим путём ограничения употребления табака, однако недавние исследования продемонстрировали тревожный рост заболеваемости РЛ среди некурящих [Cufari et al., 2017]. Опухоли лёгкого курящих и некурящих имеют чётко выраженные молекулярно-генетические особенности (профили), что показывает необходимость в отличных друг от друга подходах при генетическом тестировании и ведении этих групп больных [Cancer Genome Atlas Research Network, 2014; Govindan et al., 2012; Swanton, Govindan, 2016].

В клинической практике и научных исследованиях рак лёгкого обычно делят на: немелкоклеточный – НМРЛ (80–85% случаев) и мелкоклеточный – МРЛ (10–15% случаев). МРЛ был выделен в особую группу ввиду своего необычно агрессивного течения, характеризующегося быстрым ростом первичного очага и ранним метастазированием, что практически не позволяет использовать хирургические методы лечения. До недавнего времени имеющиеся варианты лечения при распространённом МРЛ были ограничены использованием химио- и лучевой терапии, которые хоть и приводят к выраженному ответу, но весьма краткосрочному [Carter et al., 2014]. Современная анти-PD-L1 иммунотерапия (атезолизумаб, дурвалумаб) несколько улучшила результаты лечения МРЛ и изменила существующие более 20 лет терапевтические стандарты [Horn et al., 2018].

При НМРЛ опухолевый процесс также характеризуется весьма агрессивным течением, однако в данном случае существует большее разнообразие терапевтических подходов, включая хирургический на ранних стадиях заболевания. К сожалению, к моменту установления диагноза 40% больных имеют неоперабельную стадию [Thatcher, 2008]. В таких случаях приходится прибегать к неоперативным методам лечения – к лучевой и лекарственной терапии. В прошлом пациенты с распространённым НМРЛ не получали

системную химиотерапию из-за её высокой токсичности. Однако после проведённых исследований стало очевидно, что химиотерапия имеет ряд преимуществ относительно симптоматической терапии – увеличивает время до прогрессирования, выживаемость и качество жизни [Non-small Cell Lung Cancer Collaborative Group., 1995].

До середины 1990-х годов химиотерапия распространённого НМРЛ представляла собой по большей части монотерапию препаратами платины. Это было обусловлено тем, что добавление дополнительных цитостатиков не приводило к увеличению эффективности терапии относительно возросшей токсичности. Позднее, с внедрением препаратов нового поколения, появились комбинированные схемы, такие как цисплатин/карбоплатин и паклитаксел [Shiller et al., 2002]. Однако уже к началу 2000-ых стал очевиден предел эффективности химиотерапии на основе платины [Моисеенко, 2009; Belani, 1998; Stinchcombe, Socinski, 2009].

Появление в 2003 году первых таргетных анти-EGFR препаратов (гефитиниба и эрлотиниба) кардинально изменило подход к терапии распространённого НМРЛ. Стандартная химиотерапия первой линии была вытеснена таргетной терапией ввиду её высокой эффективности и низкой токсичности. На сегодняшний день таргетная терапия одобрена Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA) для опухолей лёгкого, несущих генетические изменения в следующих онкогенах EGFR, ALK, ROS1, RET, BRAF, KRAS, NTRK1,2,3. Препараты для остальных потенциальных мишеней (RET, MET, HER2) находятся в активной фазе клинических исследований [Yoda, Dagogo-Jack, Nata, 2019]. В нашей стране согласно клиническим рекомендациям на 2020 год от «Ассоциации онкологов России» и «Российского общества клинической онкологии» одобрены следующие таргетные препараты для лечения НМРЛ: анти-EGFR (гефитиниб, эрлотиниб, афатиниб, осимертиниб), анти-ALK (кризотиниб, церитиниб), анти-ROS1 (кризотиниб), анти-BRAF (дабрафениб).

Несмотря на выраженность и длительность ответа на таргетную терапию в некоторых случаях, опухоли большинства пациентов рецидивируют в течении нескольких лет в результате приобретения мутаций резистентности. Для преодоления лекарственной устойчивости уже созданы таргетные препараты следующего поколения и активно разрабатываются новые лекарственные субстанции [Yoda, Dagogo-Jack, Nata, 2019].

Таргетная терапия основана на прицельном подавлении активности белковых продуктов наиболее значимых для развития опухоли онкогенов. Существует три основных типа генетических нарушений, приводящих к активации онкогенов в опухолях лёгкого: точковые мутации (EGFR, BRAF, KRAS, MET), амплификация (MET, HER2), транслокация

(ALK, ROS1, RET). Для разработки эффективных диагностических тестов необходимо учитывать особенности каждого из типа нарушений.

Особенностью транслокаций, ассоциированных с РЛ, является наличие большого количества вариантов, что значительно усложняет скрининговую диагностику пациентов такими методами, как ПЦР. Несмотря на разнообразие существующих подходов к детекции транслокаций (флуоресцентная гибридизация *in situ* (FISH), иммуногистохимия (ИГХ), полимеразная цепная реакция (ПЦР), секвенирование нового поколения (NGS)), ни один из методов не является оптимальным по сочетанию чувствительности, простоты исполнения и стоимости.

Характерной чертой опухолей лёгкого, ассоциированных с транслокациями рецепторных тирозинкиназ (ALK, ROS1, RET), является преимущественное развитие их у некурящих пациентов молодого возраста [Takeuchi et al., 2012].

Встречаемость транслокаций гена ALK по обобщённым данным составляет около 5% среди НМРЛ [Yoda, Dagogo-Jack, Nata, 2019], однако разброс значений в разных исследованиях варьирует от 3% до 13%, что связано с особенностями анализируемых выборок и популяционными различиями [Kohno et al., 2015; Woo et al., 2017]. Перестройки ROS1, RET встречаются ещё реже: в европейской популяции около 1–2%, а в азиатских странах до 2–3% [Kohno et al., 2015; Pao et al., 2004; Takeuchi et al., 2012].

Таким образом, основополагающим принципом современной лекарственной противоопухолевой терапии больных раком лёгкого является индивидуализация лечения путём проведения молекулярно-генетического тестирования с целью выявления маркеров эффективности или неэффективности назначаемой терапии.

Одним из направлений в области улучшения результатов лечения злокачественных новообразований является расширение охвата пациентов, получающих таргетную терапию, за счёт повышения выявляемости сенсibiliзирующих мутаций, на что и нацелена данная работа.

Степень разработанности темы

Открытие повторяющихся мутаций EGFR и перестроек генов ALK, ROS1 вместе с разработкой эффективных таргетных препаратов стало настоящим прорывом в терапии опухолей лёгкого. Этим обусловлен повышенный интерес научного и клинического сообщества к поиску и изучению этих перестроек.

Особенности функционирования, внутриклеточной локализации, а также терапевтической эффективности ингибиторов рецепторной тирозинкиназы зависят от структуры химерного белка-мишени. Структура конкретного варианта транслокации определяется местом разрыва/слияния компаньонов перестройки, содержащих свои

функциональные домены. К сожалению, наиболее распространённые в клинической практике методы детекции транслокаций (ИГХ, FISH) не позволяют получить информацию о структуре химерного транскрипта. В связи с этим не вызывает сомнений необходимость в разработке метода ПЦР, позволяющего не только эффективно диагностировать перестройки, но и идентифицировать их вариант.

Целесообразность оценки встречаемости данных транслокаций в опухолях российских больных объясняется известной географической и этнической гетерогенностью рака лёгкого. В частности, в развитых странах и странах со средневысоким уровнем развития, включая Россию, в последние годы наблюдается доминирование РЛ железистого (аденокарцинома) гистологического типа, что связано с употреблением низкосмолистых «лёгких» сигарет. Оставшиеся страны по большей части характеризуются преобладанием плоскоклеточных карцином лёгкого, вызванных курением крепкого табака [Toh, 2009].

В связи с тем, что ALK-транслокации в опухолях лёгкого были открыты ещё в 2007 году, они характеризуются относительно неплохим уровнем изученности в нашей стране, однако сведения о более «новых» и более редких перестройках ROS1, RET ограничиваются малым количеством наблюдений.

Цель исследования

Целью настоящего диссертационного исследования является оптимизация молекулярно-генетического тестирования для отбора пациентов с раком лёгкого на терапию ингибиторами тирозинкиназ.

Задачи исследования

1. Разработать новый ПЦР-метод детекции перестроек с участием генов ALK, ROS1, RET.
2. Оценить встречаемость и спектр транслокаций ALK, ROS1, RET в опухолях лёгкого российских больных.
3. Изучить клинико-демографические особенности обнаруженных случаев с транслокациями.
4. Определить оптимальный алгоритм молекулярно-генетического тестирования для индивидуализации лечения больных раком лёгкого на основании полученных данных.

Научная новизна

Впервые разработан комбинированный диагностический подход, который позволяет не только выявлять известные химерные транскрипты, но и также идентифицировать новые варианты транслокаций. Благодаря данному подходу впервые были выявлены 8 транслокаций, не описанных ранее в научной литературе. Идентификация вариантов

перестройки является важным преимуществом разработанного комбинированного подхода, поскольку согласно некоторым последним исследованиям существует корреляция между эффективностью лечения и вариантом транслокации [Sabir et al., 2017; Woo et al., 2017; Yoshida et al., 2016].

Впервые был установлен спектр транслокаций рецепторных тирозинкиназ ALK, ROS1, RET в российской популяции, что представляется актуальным в связи с известной этнической и географической гетерогенностью рака лёгкого.

Теоретическая и практическая значимость работы

В рамках диссертационного исследования был разработан набор ПЦР-тестов, апробирован целый ряд эффективных подходов по повышению их чувствительности. С учётом молекулярно-эпидемиологических данных о частоте присутствия конкретных вариантов РЛ-ассоциированных перестроек в опухолях российских больных, нами была сформулирована наиболее оптимальная стратегия молекулярно-генетического тестирования пациентов.

Методология и методы исследования

Данное диссертационное исследование направлено на оптимизацию молекулярно-генетического тестирования для отбора пациентов с раком лёгкого на терапию ингибиторами тирозинкиназ.

В рамках выбранного дизайна исследования было выполнено:

1. Был разработан новый ПЦР-метод детекции перестроек с участием генов ALK, ROS1, RET:

- отобрана из имеющейся коллекции образцов группа образцов кДНК (РНК), выделенных из опухолей лёгкого;
- разработан дизайн, произведена оптимизация и контроль работоспособности ПЦР-тестов;
- протестирована отобранная группа образцов с помощью метода оценки несбалансированной экспрессии концевых фрагментов перестраиваемых генов;
- те же образцы были протестированы с помощью контрольной методики – вариант-специфической ПЦР;
- были сопоставлены результаты обеих методик, что позволило получить пороговое значение (ΔC_t) несбалансированной экспрессии для исследуемых генов, а также выявить дискордантные образцы;

- наиболее подозрительные дискордантные образцы были подвергнуты таргетному РНК-секвенированию нового поколения (NGS) с целью идентификации ранее неизвестных перестроек.
2. Оценена встречаемость и спектр транслокаций ALK, ROS1, RET в опухолях лёгкого российских больных.
 3. Определен оптимальный алгоритм молекулярно-генетического тестирования для индивидуализации лечения больных раком лёгкого на основании полученных данных.

Положения, выносимые на защиту

1. Разработанный комбинированный подход, базирующийся на комбинации двух методик – оценки несбалансированной экспрессии концевых фрагментов реарранжированного гена и вариант-специфической ПЦР – позволяет проводить эффективную диагностику РЛ-ассоциированных ALK- и RET-транслокаций.
2. Методика оценки несбалансированной экспрессии имеет ограниченную эффективность при анализе перестроек гена ROS1.
3. Анализ несбалансированной экспрессии концевых фрагментов реарранжированного гена позволяет идентифицировать ранее новые варианты транслокаций.
4. В рамках исследования обнаружено 8 новых вариантов транслокаций: EML4ex6/ALKex19; EML4ex19/ALKex20; EML4ex21/ALKex20; EML4ex13-ALKex3-ALKex20; UBCex1/ALKex18; CD74ex6/ROS1ex35; ACTBex6/ROS1ex35; EML4ex15/GOLGA3ex9.
5. Встречаемость РЛ-ассоциированных перестроек в опухолях лёгкого у российских больных составила:
 - для ALK-транслокации: 6,1%;
 - для ROS1-транслокации: 2,5%;
 - для RET-транслокации: 1,1%.
6. Наличие ALK- и ROS1-перестроек ассоциировано с молодым возрастом и женским полом. Транслокации ALK характерны для некурящих пациентов. Для реарранжировок RET-транслокации выявлена статистически значимая ассоциация с женским полом.

Степень достоверности результатов

Достоверность результатов настоящего исследования обусловлена достаточным объёмом выборки, высоким методологическим и методическим уровнем лаборатории,

использованием современных молекулярно- генетических методов, а также корректной статистической обработкой полученных экспериментальных данных.

Апробация результатов

Апробация диссертации состоялась 18 июня 2020 в виде научного доклада об основных результатах подготовленной научно-квалификационной работы на заседании государственной экзаменационной комиссии «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России. Результаты работы были представлены на «30-м конгрессе европейских патологов» (г. Бильбао, Испания, 8–12 сентября 2018 г.), на конгрессе Европейского общества медицинской онкологии (г. Мюнхен, Германия, 19–23 октября 2018 г.), а также на V и VI Петербургском онкологическом форуме «Белые Ночи» (20–23 июня 2019 г. и 26 июня 2020 г.).

Публикация результатов исследования

По теме диссертации опубликовано 10 работ, из которых 2 – в рецензируемых научных журналах и изданиях, рекомендованных ВАК, 8 – в зарубежных изданиях, индексируемых в Web of Science и Scopus.

Внедрение результатов

Разработанные диагностические подходы и основные положения диссертации были внедрены в научно-практическую деятельность лаборатории молекулярно-генетической диагностики (Акт внедрения результатов от 28 июля 2021г.).

Личный вклад автора

Личный вклад автора состоит в разработке дизайна используемых ПЦР-тестов, в непосредственном выполнении молекулярно-генетических исследований на всех этапах: выделение нуклеиновых кислот, выполнение ПЦР и секвенирования, анализ результатов. Автором выполнена обработка, обобщение и интерпретация полученных экспериментальных данных.

Соответствие диссертации паспорту научных специальностей

Настоящая диссертационная работа «Изучение предиктивных молекулярно-генетических маркеров эффективности терапии рака лёгкого», представленная на соискание учёной степени кандидата медицинских наук, соответствует паспорту специальности «3.1.6 – онкология, лучевая терапия» по п. 2, 3, 6 и «1.5.4 – биохимия» по п. 1, 10, 11.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 120 страницах и состоит из введения, глав обзора литературы, материалов и методов, результатов, обсуждения полученных результатов, заключения и выводов. Работа проиллюстрирована 21 рисунком и 11 таблицами, содержит 3 приложения с таблицами. Библиографический указатель включает 172 источников, в том числе 18 отечественных и 154 зарубежных.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Материалы

Для исследования была использована коллекция 1000 последовательных случаев НМРЛ (преим. аденокарциномы) с сохранной РНК (кДНК) в образце ($Ct\ SDHA \leq 36$). В исследуемой группе преобладали мужчины (666 чел.) пожилого возраста (медиана 63 года). Среди курящих пациентов (304 чел.) также доминировали мужчины (284 чел.), что составило 93,4%.

2. Методы исследования

2.1. Выделение нуклеиновых кислот и реакция обратной транскрипции

Полученный после микродиссекции парафиновый срез, содержащий максимальную долю опухолевых клеток, подвергался депарафинизации с последующей экстракцией нуклеиновых кислот (ДНК и РНК) по модифицированной методике Хомчинского (Chomczynski et al., 1987). С образцом нуклеиновых кислот выполнялась реакция обратной транскрипции с использованием случайных декамеров и ген-специфических праймеров для получения из РНК комплементарной ДНК (кДНК), которая в дальнейшем исследовалась молекулярно-генетическими методами.

2.2. Комбинированный подход к детекции перестроек

Важной особенностью разработанного подхода к тестированию транслокаций является комбинированное использование двух ПЦР-методик:

- оценки несбалансированной экспрессии концевых 5'- и 3'-концевых фрагментов соответствующего гена тирозинкиназы (ΔCt), позволяющая выявить подозрительные на присутствие перестройки образцы;
- постановки вариант-специфической ПЦР с целью идентификации известных вариантов транслокаций.

Оценка уровня несбалансированности экспрессии концевых фрагментов гена (ΔCt) определялась по формуле (1).

$$\Delta Ct [gene] = Ct5'[gene] - Ct3'[gene] \quad (1)$$

Где:

- $Ct5'[gene]$ – величина порогового цикла 5'-фрагмента исследуемого гена;
- $Ct3'[gene]$ – величина порогового цикла 3'-фрагмента исследуемого гена.

C_t – это цикл, на котором флуоресценция преодолевает пороговое значение, т.е. становится достоверно отличимой от приборного шума, и при этом наблюдается экспоненциальный рост сигнала. Визуально C_t отображается как пересечение кривой амплификации пороговой линии (threshold). Значение C_t обратно пропорционально логарифму исходной концентрации амплифицируемого фрагмента. Расчёт threshold'a происходит автоматически программой анализа амплификатора, либо задаётся вручную экспериментатором.

Если экспрессия киназной 3'-порции гена намного превышает экспрессию 5'-участка, то можно предполагать наличие транслокации. Образцы считались подозрительными на наличие транслокации, если разница в экспрессии (ΔC_t) преодолевали пороговое значение, а 3'-фрагмент исследуемого гена экспрессировался, как правило, раньше или на уровне гена-рефери SDHA. К негативным случаям относились образцы, у которых не наблюдалась несбалансированная экспрессия 3'-фрагмента или вообще отсутствовала экспрессия концевых фрагментов исследуемого гена.

Далее на Рисунках 1–2 представлены примеры образцов со сбалансированной и несбалансированной экспрессией. Данные рисунки состоят из четырёх графиков: первые три демонстрируют уровень экспрессии исследуемых генов (А – ALK, Б – ROS1, В – RET), на четвёртом графике (Г) показаны результаты ПЦР-тестирования на известные варианты транслокаций (вариант-специфическая ПЦР). На каждом из графиков присутствуют S-образные кривые амплификации: зелёная кривая соответствует уровню экспрессии гена рефери SDHA, синяя и красная кривая – 5'- и 3'-фрагменту исследуемого гена.

P6923 – ALK (WT), ROS1 (WT), RET (WT)

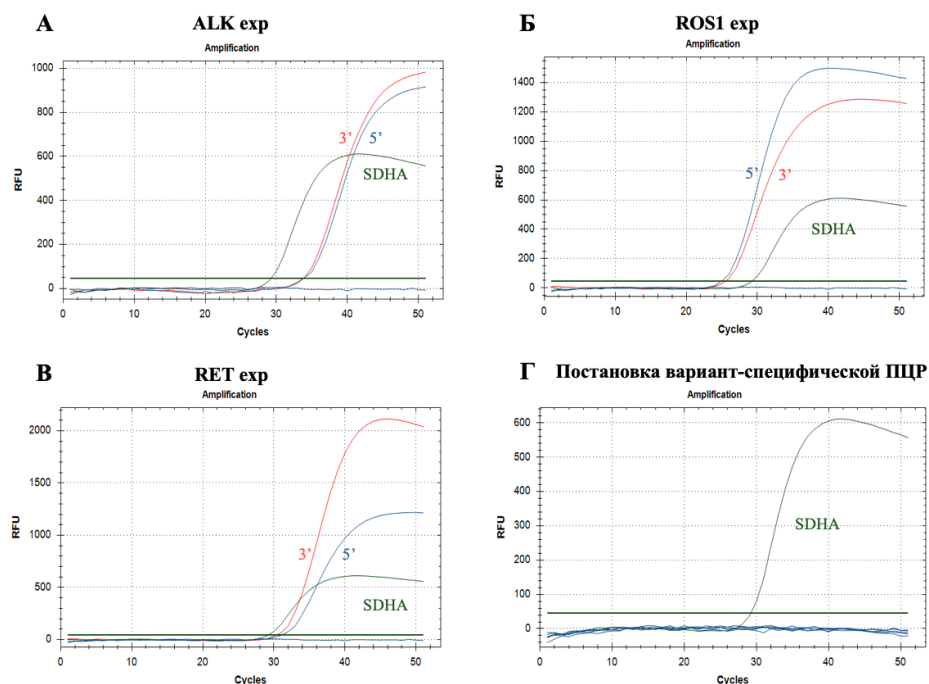


Рисунок 1 – Пример негативного образца P6923

Из Рисунка 1 видно, что разница (ΔC_t) в экспрессии между концевыми фрагментами исследуемых генов минимальна, что означает, что образец P6923 сбалансирован. Проверка на химерные транскрипты также показывает отсутствие известных вариантов транслокаций ALK, ROS1, RET в данном образце.

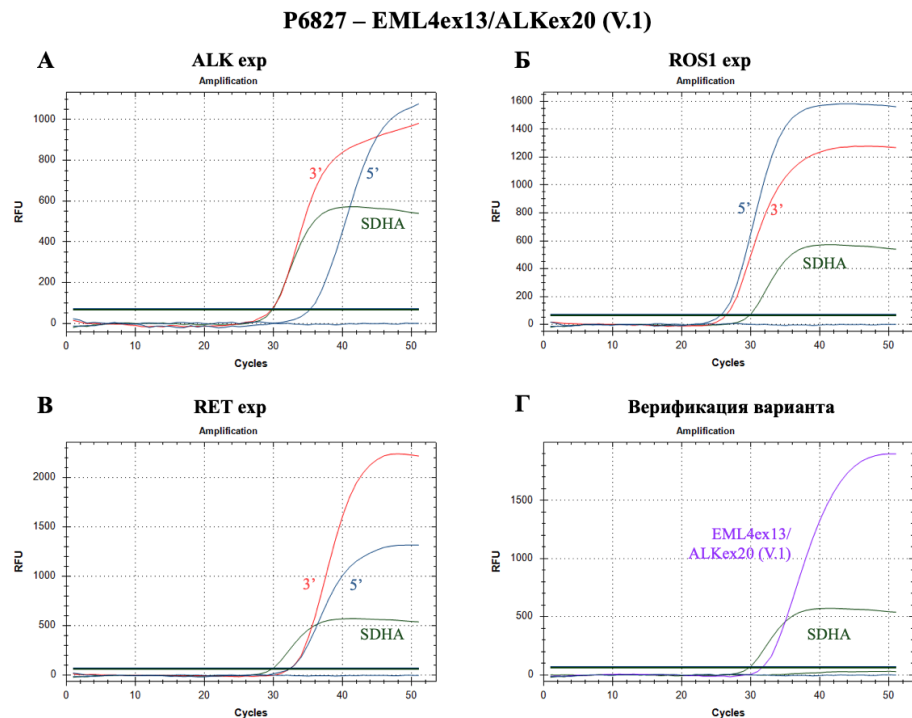


Рисунок 2 – Пример ALK-позитивного образца P6827

На Рисунке 2 представлена ПЦР-картина позитивного случая. В образце P6827 наблюдается гиперэкспрессия 3'фрагмента ALK, его кривая находится очень близко к SDHA и преодолевает пороговую линию (threshold) на том же цикле, её C_t составляет 29,6. Фрагмент 5' ALK экспрессируется значительно позже, его C_t составляет 35,3. Разница в экспрессии (ΔC_t) двух порций гена ALK составляет 5,7, что говорит о крайне выраженной несбалансированной экспрессии. Постановка ПЦР на известные варианты ALK-транслокации позволила верифицировать обнаруженную перестройку как EML4ex13/ALKex20 (V.1).

2.3. NGS-идентификация химерных транскриптов

Идентификация наиболее подозрительных дискордантных образцов, демонстрирующих выраженную несбалансированную экспрессию и не содержащих известных химерных транскриптов, выполнялась посредством метода секвенирования нового поколения (Next generation sequencing, NGS). Для этого был выбран набор для таргетного РНК-секвенирования «TruSight RNA Fusion Panel» (Illumina), адаптированный для идентификации перестроек 16 тирозинкиназ-кодирующих генов (ALK, EGFR, ERBB3, CSF1R, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4, FLT3, NTRK1, NTRK2, NTRK3, PDGFRA,

PDGFRB, RET, ROS1). Выбранная панель характеризуется удобным технологическим процессом, включающим в себя приготовление библиотек, секвенирование и анализ данных.

При анализе данных NGS химерные транскрипты были идентифицированы с использованием программного обеспечения Illumina RNA-Sequencing Alignment software (V.2.0.0) и STAR-Fusion pipeline (V.1.4.0). Все обнаруженные транслокации также верифицировались секвенированием по Сэнгеру.

2.4. Статистическая обработка полученных результатов

Статистическая обработка данных проводилась с использованием свободной среды разработки RStudio для работы с языком программирования R. При анализе данных были использованы следующие функции языка R, реализующие соответствующие им статистические критерии:

`shapiro.test (...)` – критерий Шапиро-Уилка был использован для проверки исследуемых распределений на нормальность;

`wilcox.test (...)` – критерий Манна-Уитни использовался для анализа различий в распределении групп пациентов по возрасту U;

`fisher.test (...)` – точный критерий Фишера использовался для сравнения статуса курения между группами пациентов, а также для оценки распределения пациентов по полу.

Везде, где это представлялось возможным, был использован двухсторонний вариант критерия.

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Результаты ПЦР–тестирования перестроек

Отобранная группа из 1000 образцов немелкоклеточного рака лёгкого (преимущественно аденокарциномы) была протестирована на предмет присутствия несбалансированной экспрессии 5' и 3'- концевых фрагментов для всех трёх генов (ALK, ROS1, RET). Также все образцы были проанализированы на наличие основных вариантов ALK-транслокации (вариант-специфической ПЦР).

Однако в ходе выполнения тестирования оставшихся транслокаций (ROS1, RET) существенной проблемой стала нехватка имеющегося объёма образцов для типирования их на все имеющиеся варианты. Вследствие этого удалось протестировать на варианты перестройки ROS1 только 440 образцов, а поскольку для RET-транслокации на данный момент в России не зарегистрирован ни один таргетный препарат, то было принято решение протестировать небольшую выборку, состоящую из 37 образцов, в которую вошли 15 наиболее подозрительных случаев ($\Delta C_t > 3$) и 22 образца с промежуточными значениями ΔC_t (1,4-3).

Таким образом, в результате типирования образцов на варианты удалось обнаружить:

- 58 ALK-транслокаций из 1000 протестированных образцов;
- 9 ROS1-транслокаций из 440 протестированных образцов;
- 11 RET-транслокаций из 37 протестированных образцов.

При этом среди обнаруженных ALK-позитивных образцов сразу 2 случая несли вариант ALK-транслокации, который ранее не был описан в научной литературе: EML4ex6/ALKex19 и EML4ex19/ALKex20.

Сопоставление результатов тестирования обеими методиками

При использовании методики оценки несбалансированной экспрессии концевых фрагментов для выявления образцов, подозрительных на предмет присутствия транслокаций, необходимо знать пороговое значение ΔC_t . Для вычисления этого порогового значения ΔC_t изучаемых генов были сопоставлены данные о найденных транслокациях и уровне несбалансированности экспрессии концевых фрагментов.

ALK-транслокация

Используя инструментарий языка программирования R и полученные данные об уровне экспрессии 5'- и 3'- концевых фрагментов гена ALK и наличии транслокаций, была построена диаграмма распределения образцов по уровню показателя ΔC_t , которая представлена на Рисунке 3. Высота и направление столбиков соответствует значению

показателя ΔCt , красным цветом обозначены подтверждённые ALK-позитивные случаи, зелёным — негативные образцы.

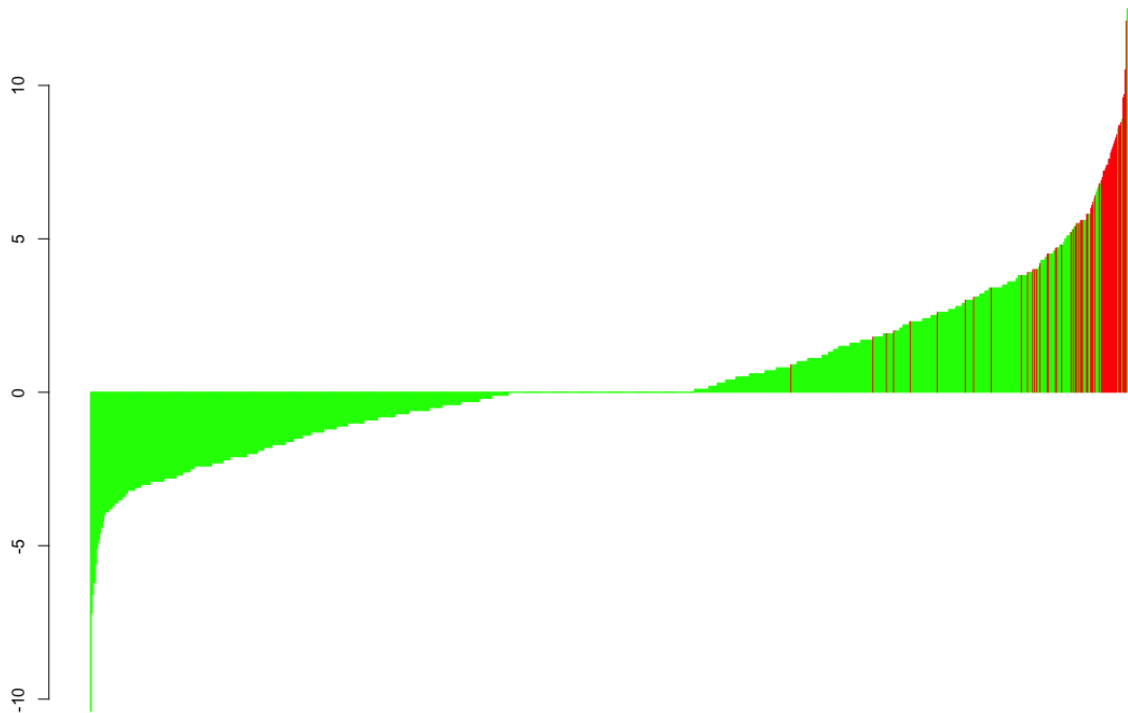


Рисунок 3 – Диаграмма распределения образцов по уровню ΔCt ALK

Как видно из диаграммы (рис. 3) позитивные образцы преобладают в правой её части. При пороговом значении $\Delta Ct \geq 3$ находится 89,7% ALK-позитивных образцов (52 из 58), по другую сторону при $\Delta Ct < 3$ располагаются 88,9% негативных (837 из 942). В результате было получено 105 (942 – 837) дискордантных образцов, демонстрирующих несбалансированную экспрессию, но не несущих протестированные варианты перестройки ALK.

Для уменьшения числа дискордантных образцов был разработан и использован дополнительный подход – сравнение экспрессии 3'-порции ALK относительно экспрессии фрагмента на стыке 19 и 20 экзонов гена ALK, где наиболее часто происходит разрыв при транслокации. В результате перестройки именно этот фрагмент изменяет (снижает) свою экспрессию наисильнейшим образом, что приводит к лучшему разделению образцов по показателю ΔCt (19/20-3'), что представлено ниже на Рисунке 4.

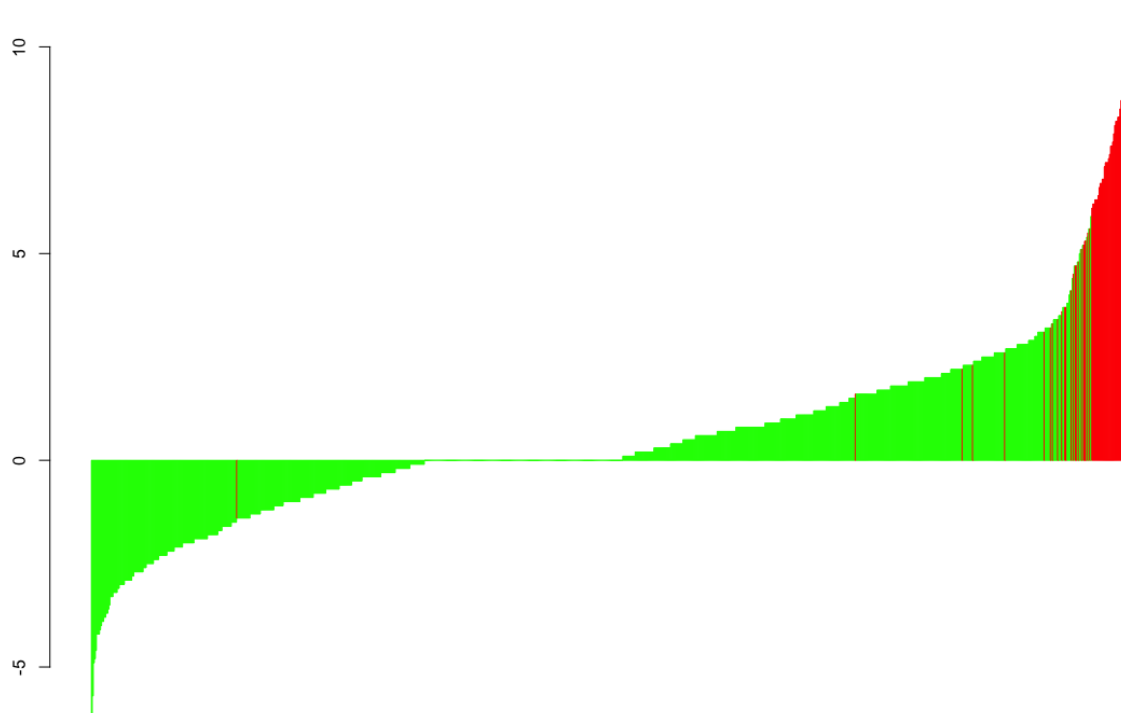


Рисунок 4 – Диаграмма распределения образцов по уровню ΔC_t (19/20-3') ALK

Таким образом, при использовании данного подхода позитивные и негативные образцы кластеризуются значительно лучше. Так, при пороговом значении ΔC_t (19/20-3') ≥ 3 находится 91,4% (53 из 58) ALK-позитивных образцов, а при значении < 3 располагаются 96% (904 из 942) негативных случаев.

ROS1-транслокация

Диаграмма распределения 1000 исследованных образцов по уровню ΔC_t ROS1 выглядела следующим образом (рис. 5). Высота и направление столбиков соответствует значению показателя ΔC_t , красным цветом обозначены подтверждённые ROS1-позитивные случаи, зелёным – негативные образцы, серым – образцы, непроверенные на наличие химерных транскриптов.

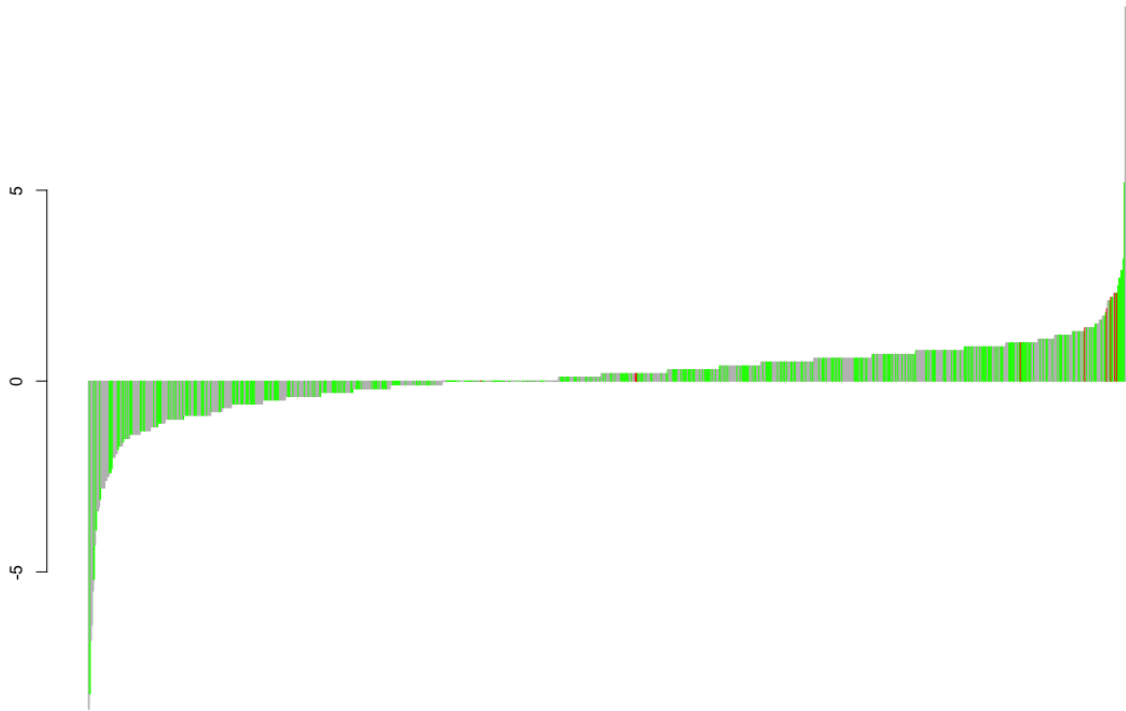


Рисунок 5 – Диаграмма распределения образцов по уровню ΔC_t ROS1

На представленной диаграмме не наблюдается кластеризации позитивных образцов, что не позволяет определить порогового значения (ΔC_t) уровня дисбаланса экспрессии 5'- и 3'-концевых фрагментов гена ROS1. Тем не менее, положительные образцы были однозначно идентифицированы с помощью вариант-специфической ПЦР, благодаря которой были обнаружены 9 перестроек ROS1. Всё это говорит о невозможности использования метода оценки несбалансированной экспрессии в отрыве от прямого тестирования химерных транскриптов ROS1

RET-транслокация

Все образцы (1000 шт.) были оценены на уровень дисбаланса экспрессии концевых фрагментов гена RET, однако на предмет присутствия химерных транскриптов RET было протестировано только 37 образцов. Однако, несмотря на это, тест на несбалансированную экспрессию гена RET показал себя эффективным. Особенно наглядно это демонстрируется на диаграмме распределения образцов по уровню ΔC_t RET (рис. 6).

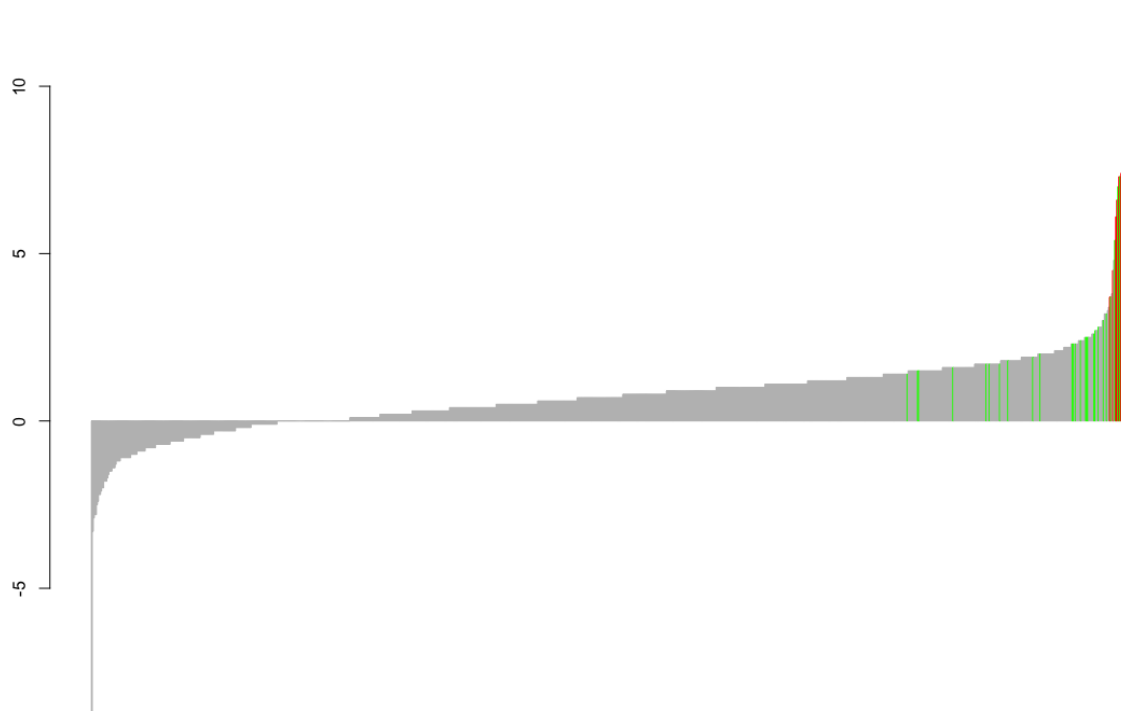


Рисунок 6 – Диаграмма распределения образцов по уровню ΔC_t RET

Образец P7892 демонстрировал наименьшее значение ΔC_t среди позитивных случаев, равное 3,7. Если принять это значение за пороговое, то при $\Delta C_t \geq 3,7$ все найденные 11 (100%) позитивных образцов попадают в хорошо ограниченную область несбалансированной экспрессии. В область сбалансированной экспрессии при $\Delta C_t < 3,7$ попадают 22 из 26 (84,6%) подтверждённых негативных образцов и 959 из 963 (99,6%) образцов, не подвергнутых тестированию на отдельные варианты RET-транслокации.

Тестирование дискордантных образцов

В связи с тем, что секвенирование нового поколения является весьма сложным и дорогостоящим методом исследования перед нами стояла необходимость сузить группу дискордантных образцов для дальнейшего тестирования.

Предпочтение отдавалось образцам, имеющим в наличии достаточный объём опухолевого материала, а также наиболее подозрительным на предмет присутствия транслокаций по следующим критериям: выраженная несбалансированная экспрессия концевых фрагментов (ΔC_t) или гиперэкспрессия исследуемого гена относительно гена-рефери (ΔC_t SDHA – 3'), молодой возраст, женский пол, некурящие. После сопоставления всех перечисленных критериев для дальнейшего таргетного РНК-секвенирования методом секвенирования нового поколения (NGS) было отобрано 15 образцов, обнаружение транслокаций в которых представлялось наиболее вероятным.

В Таблице 1 представлена информация по отобраным образцам и результаты проведённого NGS-исследования. Критерии, по которым осуществлялся отбор каждого конкретного образца, отмечены красным цветом.

Таблица 1 – Образцы отобранные для NGS-исследования

№	Пол	Возраст	Курение	ΔCt ALK			ΔCt ROS1		ΔCt RET		Результат NGS
				5'-3'	19/20 -3'	SDHA -3'	5'-3'	SDHA -3'	5'-3'	SDHA -3'	
P7061	ж	63	нет	5,2	9,4	1,8	2,3	10,7	1,2	-1,9	EML4ex21/ALKex20
P7067	ж	42	нет	3	5,9	3	-1,0	5,1	0	1,6	WT
P7072	ж	42	нет	-0,30	4,8	-1,1	1,7	7,3	-0,3	-1,7	CD74ex6/ROS1ex35
P7347	м	78	-	5,8	3,7	3,1	0,5	3,7	-0,5	1,1	WT
P7420	ж	42	да	1,8	3,4	1,9	-0,1	7,3	1,1	0,6	WT
P7505	м	65	да	4,8	3,1	4,8	1,2	0,4	3,8	4,8	EML4ex15/GOLGA3ex9
P7550	ж	42	нет	5,1	3	2,5	0,7	7,8	1,8	-1,7	ACTBex6/ROS1ex35
P8059	м	62	-	6,7	2,5	1,7	-1,1	-1,5	0,7	0,0	WT
P8230	м	48	да	3,8	2	0,4	0,4	4,4	2,4	-1,4	WT
P8272	м	57	нет	2,6	1,9	0,4	0,8	10,2	1,3	2,3	WT
P8424	м	43	нет	12,5	1,7	-2,1	0,5	9	0,9	0,6	UBCex1/ALKex18
P8478	м	66	да	5,6	0,4	2	0,1	7,3	0,2	0,6	WT
P8501	ж	59	нет	6,3	0,4	9,4	0,3	8,1	0,2	-1,1	EML4ex13-ALKex3- ALKex20
P8676	ж	78	нет	3,7	-1,1	3,7	-0,2	4,5	0,8	-0,5	WT
P8731	м	53	да	3,4	-2,1	3,4	0,5	3,7	0,7	5,1	WT

В результате выполнения NGS-исследования были обнаружены 6 транслокаций, ранее не описанных в научной литературе: EML4ex21/ALKex20; EML4ex13-ALKex3-ALKex20; UBCex1/ALKex18; CD74ex6/ROS1ex35; ACTBex6/ROS1ex35; EML4ex15/GOLGA3ex9.

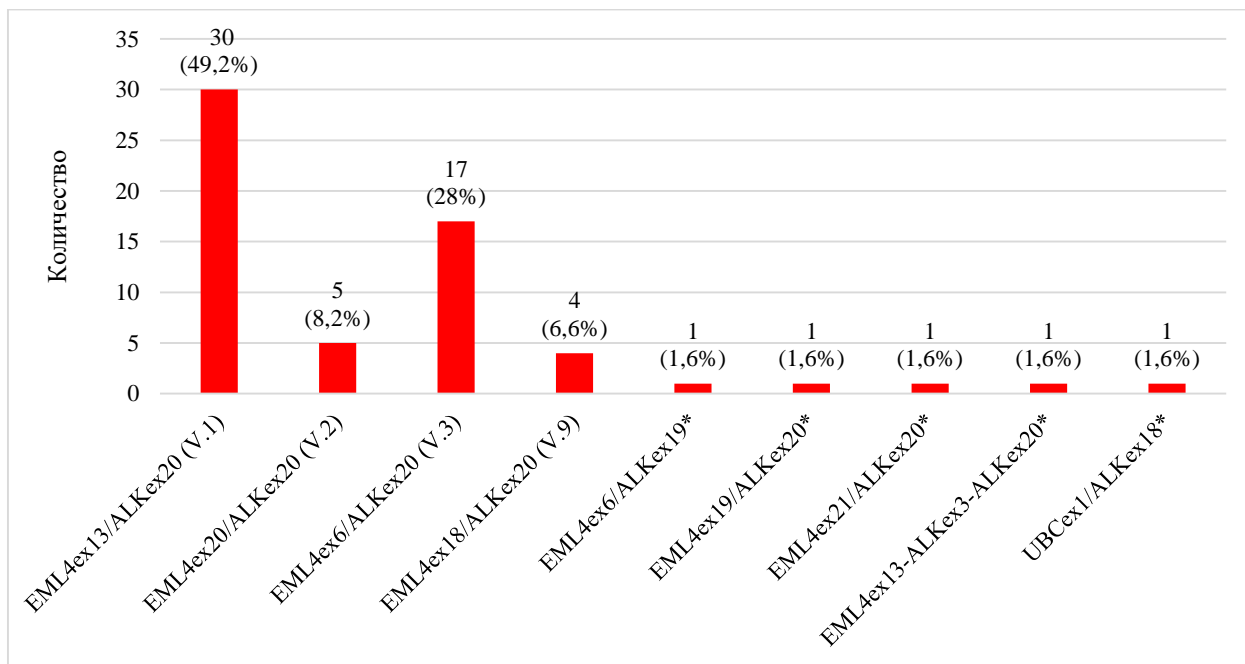
Ещё 2 случая с ранее не описанными вариантами перестройки ALK (EML4ex6/ALKex19 и EML4ex19/ALKex20) были выявлены в результате секвенирования по Сэнгеру подозрительных образцов, демонстрирующих поздний цикл амплификации фрагмента при выполнении вариант-специфической ПЦР.

Таким образом, благодаря оценке несбалансированной экспрессии концевых фрагментов генов ALK, ROS1, RET и дальнейшему NGS-секвенированию были дополнительно обнаружены ещё 5 позитивных образцов с ранее неизвестными вариантами перестроек генов ALK и ROS1 и одно новое слияние EML4ex15/GOLGA3ex9 с неизвестным клиническим значением.

Встречаемость и спектр обнаруженных транслокаций, клиническая характеристика позитивных случаев

ALK-транслокация

Всего был обнаружен 61 случай (6,1%) подтверждённых перестроек гена ALK из 1000 протестированных образцов лёгкого. Спектр выявленных вариантов перестройки ALK и их соотношение представлены в виде гистограммы на Рисунке 7.



*Рисунок 7 – Спектр выявленных вариантов ALK-транслокации
* - ранее не описанные варианты*

Наиболее встречаемыми оказались варианты EML4ex13/ALKex20 (V.1), EML4ex6/ALKex20 (V.3), EML4ex20/ALKex20 (V.2), EML4ex18/ALKex20 (V.9) – на них пришлось 92% всех случаев.

Были проанализированы клинические характеристики ALK-позитивных случаев в сравнении с негативными образцами, что представлено в Таблице 2.

Возраст пациентов с перестройкой ALK варьировал от 35 до 77 лет (медиана 58 лет); в группе отрицательных образцов диапазон возраста составлял от 20 до 86 лет (медиана 63 года). Различия в возрасте оказались статистически значимыми ($p = 0,006963$, U-критерий Манна-Уитни).

Женщинам принадлежали 38 из 61 (62,3%) ALK-позитивного образца, оставшиеся 23 случая (37,7%) относились к мужчинам. Встречаемость ALK-транслокации в группе женщин составила 11,4%, в группе мужчин 3,5%. Наблюдаемое различие по полу было достоверным ($p = 1.45 \cdot 10^{-6}$, точный критерий Фишера).

Статус курения был известен только для 640 образцов. Среди них у курильщиков было обнаружено 12 (3,9%) ALK-позитивных случаев, в то время как у некурящих 30

(8,9%). Различия в статусе курения также являются достоверными ($p = 0,0226$, точный критерий Фишера).

Таблица 2 – Клиническая характеристика ALK-позитивных и негативных случаев

	ALK-транслокация		p-уровень значимости	Суммарно
	Присутствует	Отсутствует		
Возраст:				
Медиана (диапазон)	58 (35–77)	63 (20–86)		63 (20–86)
≤ 40	6 (19,4%)	25 (80,6%)	p = 0,006963, U-критерий Манна-Уитни	31 (100%)
41-50	9 (8,8%)	93 (91,2%)		102 (100%)
51-60	22 (7,9%)	255 (92,1%)		277 (100%)
61-70	15 (3,5%)	414 (96,5%)		429 (100%)
> 70	7 (5,2%)	127 (94,8%)		134 (100%)
Неизвестно	2 (7,4%)	25 (92,6%)		27 (100%)
Пол:				
Мужчины	23 (3,5%)	643 (96,5%)	p = 1,45*10 ⁻⁶ , точный критерий Фишера	666 (100%)
Женщины	38 (11,4%)	296 (88,6%)		334 (100%)
Статус курения:				
Курящие	12 (3,9%)	292 (96,1%)	p = 0,0226, точный критерий Фишера	304 (100%)
Некурящие	30 (8,9%)	306 (91,1%)		336 (100%)
Неизвестно	19 (5,3%)	341 (94,7%)		360 (100%)
Суммарно:	61 (6,1%)	939 (93,9%)		1000 (100%)

Таким образом, наши данные демонстрируют, что перестройки гена ALK чаще встречаются у молодых, некурящих пациентов, среди которых значительно преобладают женщины.

ROS1-транслокация

Наличие транслокации гена ROS1 было обнаружено в 11 из 440 (2,5%) протестированных на варианты образцов. Спектр обнаруженных химерных транскриптов ROS1 представлен на Рисунке 8.

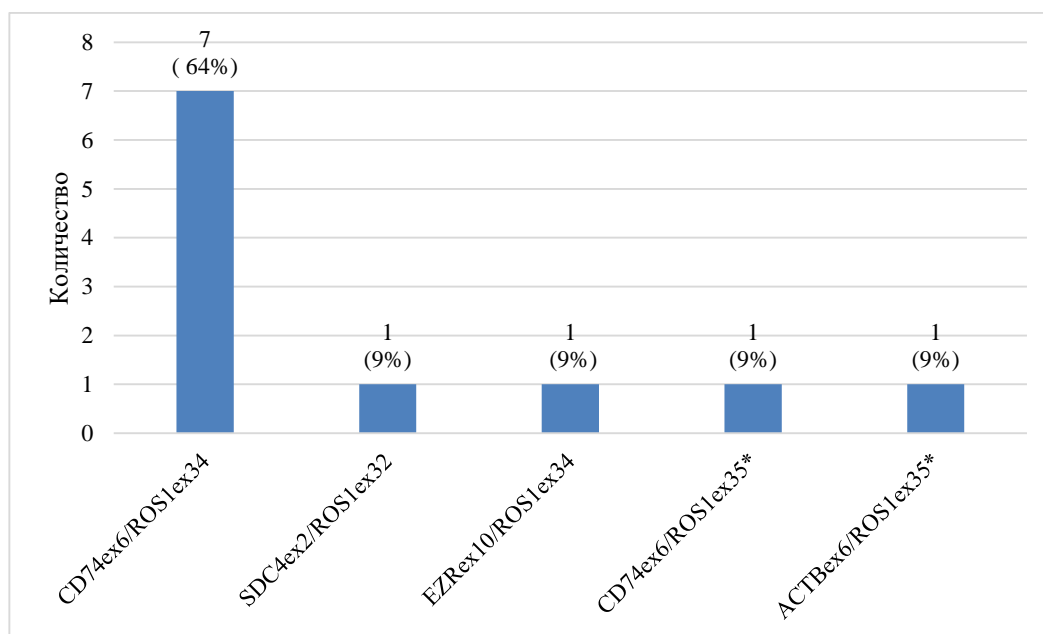


Рисунок 8 – Спектр выявленных вариантов ROS1-транслокации
* - ранее не описанные варианты

Как видно из гистограммы самый распространённый вариант – CD74ex6/ROS1ex34 – на него пришлось 64% всех позитивных случаев. Другие же 4 варианта, в том числе 2 ранее не описанных, встретились единожды.

В Таблице 3 представлены клинические характеристики ROS1-позитивных и негативных случаев.

Таблица 3 – Клиническая характеристика ROS1-позитивных и негативных случаев

	ROS1-транслокация		p-уровень значимости	Суммарно
	Присутствует	Отсутствует		
Возраст:				
Медиана (диапазон)	48 (28–71)	63 (20–82)		63 (20–82)
≤ 40	2 (14,3%)	12 (85,7%)	p = 0,02249, U-критерий Манна-Уитни	14 (100%)
41-50	4 (8,9%)	41 (91,1%)		45 (100%)
51-60	0 (0%)	112 (100%)		112 (100%)
61-70	2 (1%)	198 (99%)		200 (100%)
> 70	1 (2,2%)	45 (97,8%)		46 (100%)
Неизвестно	2 (8,7%)	21 (91,3%)		23 (100%)
Пол:				
Мужчины	2 (0,7%)	302 (99,3%)	p = 0,000634, точный критерий Фишера	304 (100%)
Женщины	9 (6,6%)	127 (93,4%)		136 (100%)
Статус курения:				
Курящие	1 (0,8%)	126 (99,2%)	p = 0,1206, точный критерий Фишера	127 (100%)
Некурящие	6 (4,5%)	127 (95,5%)		133 (100%)
Неизвестно	4 (2,2%)	176 (97,8%)		180 (100%)
Суммарно:	11 (2,5%)	438 (97,5%)		440 (100%)

Возраст пациентов с перестройкой ROS1 был в диапазоне от 28 до 71 года с медианой в 48 лет. В группе негативных случаев наблюдался диапазон возрастов от 20 до 82 лет (медиана в 63 года). Различие в возрасте между группами оказалось статистически значимым (p = 0,02249, U-критерий Манна-Уитни). Соотношение ROS1-позитивных и негативных случаев в разных возрастных группах представлено на Рисунке 19.

Наибольшая доля ROS1-позитивных случаев приходилась на женщин 81,8% (9 из 11). Встречаемость перестройки ROS1 у женщин (6,6%) была в 9,4 раза выше, чем у мужчин (0,7%). Гендерные различия в частоте встречаемости ROS1-транслокации оказались статистически значимыми (p = 0,000634, точный критерий Фишера).

Среди исследованных образцов с известным статусом курения, только у 7 была обнаружена ROS1-транслокация: 6 случаев приходилось на некурящих и 1 случай на курящего пациента. Различие в статусе курения оказалось недостоверным (p = 0,1206, точный критерий Фишера).

RET-транслокация

В ходе исследования были выявлены 11 RET-позитивных случаев из 1000 протестированных образцов (11%). 10 из них были представлены единственным вариантом KIF5Bex15/RETex12 (91%), один – CCDC6ex1/RETex12 (9%).

Возраст RET-положительных пациентов был в диапазоне от 41 до 76 лет (медиана 64 года). В группе отрицательных случаев наблюдался диапазон возрастов от 20 до 86 лет (медиана 62,5 года). Различия в возрасте между группами оказались статистически недостоверными ($p = 0,3931$, U-критерий Манна-Уитни).

Среди RET-положительных пациентов также преобладали женщины 72,7% (8 из 11). Встречаемость перестройки RET среди женщин составила 2,5%, против 0,5% у мужчин. Наблюдаемая корреляция оказалась статистически значимой ($p = 0,008614$, точный критерий Фишера).

Не удалось установить статистически достоверной взаимосвязи между статусом курения пациента и присутствием перестройки RET ($p = 0,6257$ точный критерий Фишера), что наиболее вероятно также и в случае с ROS1 связано с отсутствием информации о статусе курения для значительной части образцов.

Подробная клиническая характеристика RET-положительных и отрицательных случаев представлена в Таблице 4.

Таблица 4 – Клиническая характеристика RET-положительных и отрицательных случаев

	RET-транслокация		p-уровень значимости	Суммарно
	Присутствует	Отсутствует		
Возраст:				
Медиана (диапазон)	64 (41–76)	62,5 (20–86)		63 (20–86)
≤ 40	0 (0%)	31 (100%)	$p = 0,3931$, U-критерий Манна-Уитни	31 (100%)
41-50	1 (0,98%)	101 (99,02%)		102 (100%)
51-60	2 (0,7%)	275 (99,3%)		277 (100%)
61-70	6 (1,4%)	423 (98,6%)		429 (100%)
> 70	2 (1,5%)	132 (98,5%)		134 (100%)
Неизвестно	0 (0%)	27 (100%)		27 (100%)
Пол:				
Мужчины	3 (0,5%)	663 (99,5%)	$p = 0,008614$, точный критерий Фишера	666 (100%)
Женщины	8 (2,4%)	326 (97,6%)		334 (100%)
Статус курения:				
Курящие	1 (0,3%)	303 (99,7%)	$p = 0,6257$ точный критерий Фишера	304 (100%)
Некурящие	3 (0,9%)	333 (99,1%)		336 (100%)
Неизвестно	7 (1,9%)	353 (98,1%)		360 (100%)
Суммарно:	11 (1,1%)	989 (98,9%)		1000 (100%)

Алгоритм молекулярно-генетического тестирования

Исходя из полученных данных и особенностей разработанного нами теста, был сформулирован оптимальный алгоритм для предтерапевтического молекулярно-генетического тестирования пациентов с немелкоклеточным раком лёгкого (рис. 9).

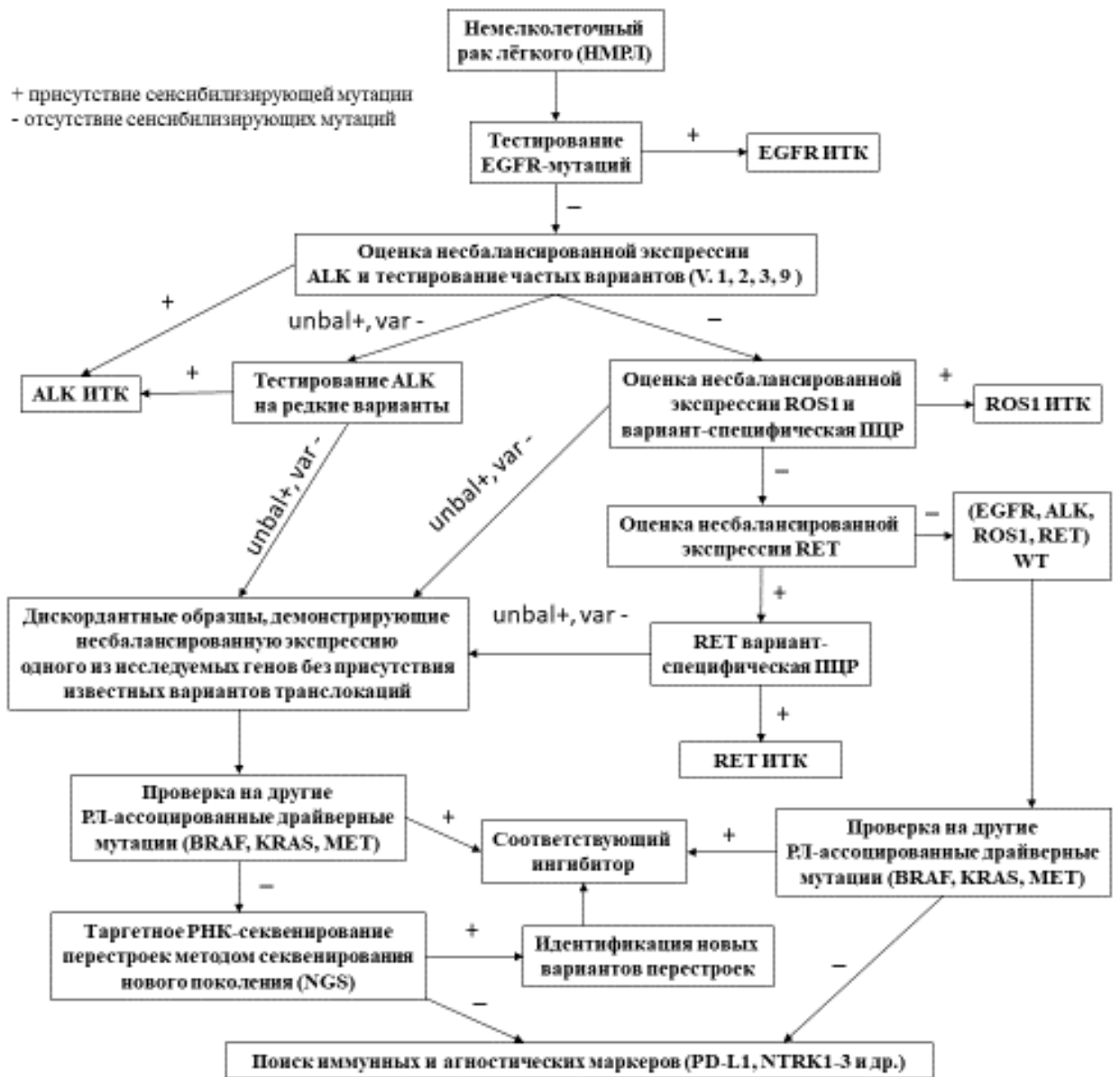


Рисунок 9 – Алгоритм молекулярно-генетического тестирования пациентов с НМРЛ.

Рассмотрим представленный алгоритм подробнее:

1) Проведение молекулярно-генетического тестирования опухолей целесообразно начинать с наиболее распространённых мутаций в гене EGFR (делеция 19 экзона, р. L858R, по возможности более редкие варианты).

2) Далее EGFR-негативные образцы должны подвергаться комплексному ПЦР-тестированию (оценка несбалансированной экспрессии концевых фрагментов и вариант-специфическая ПЦР) на наличие перестроек ALK, ROS1, RET. Однако в связи с большой длительностью последовательного выполнения тестирования РЛ-ассоциированных транслокаций рекомендуется одновременно выполнять оценку уровня несбалансированной экспрессии концевых фрагментов всех перестраиваемых генов. Это позволит сразу

отсеивать наиболее подозрительные на предмет присутствия перестроек образцы и идентифицировать их при помощи вариант-специфической ПЦР.

3) Дискордатные образцы, демонстрирующие несбалансированную экспрессию при отсутствии известных вариантов транслокаций, рекомендуется подвергать таргетному РНК-секвенированию нового поколения (NGS). В связи с трудоёмкостью и высокой стоимостью NGS-исследования рекомендуется исключить наличие в образцах других РЛ-ассоциированных драйверных мутаций (BRAF, KRAS, MET). Известно, что основные драйверные мутации при РЛ находятся между собой преимущественно в реципрокном взаимоотношении.

4) Ввиду ограниченной доступности секвенирования нового поколения (NGS) рекомендуется при возможности верифицировать дискордантные образцы посредством альтернативных диагностических методов (ИГХ, FISH).

5) При отсутствии других терапевтических опций и возможности верификации альтернативным диагностическим методом образцы, демонстрирующие несбалансированную экспрессию, могут рассматриваться врачебной комиссией как позитивные с целью назначения таргетной терапии.

6) Случаи без мутаций EGFR, ALK, ROS1, RET рекомендуется также протестировать на предмет присутствия других клинически значимых мутаций BRAF, KRAS, MET.

7) При отсутствии всех вышеперечисленных драйверных мутаций рекомендуется приступить к поиску иммунных и агностических маркеров терапии (PD-L1, NTRK1–3 и др.).

ВЫВОДЫ

1. Разработан комбинированный подход, базирующийся на сочетании двух методик – оценки несбалансированной экспрессии концевых фрагментов реарранжированного гена и вариант-специфической ПЦР, который позволяет выполнять эффективную диагностику РЛ-ассоциированных ALK- и RET-транслокаций. Для выявления перестроек гена ROS1 метод оценки несбалансированной экспрессии оказался недостаточно эффективным в связи с высоким уровнем эндогенной экспрессии этого гена в ткани лёгкого; для диагностики ROS1-транслокаций в опухолях лёгкого предпочтительнее использовать вариант-специфическую ПЦР.
2. Анализ несбалансированной экспрессии концевых фрагментов реарранжированного гена позволяет идентифицировать ранее неизвестные варианты транслокаций. Использование NGS-анализа для образцов с несбалансированной экспрессией позволило выявить 8 новых вариантов перестроек: EML4ex6/ALKex19; EML4ex19/ALKex20; EML4ex21/ALKex20; EML4ex13/ALKex3-ALKex20; UBCex1/ALKex18; CD74ex6/ROS1ex35; ACTVex6/ROS1ex35; EML4ex15/GOLGA3ex9.
3. Частота транслокаций с участием генов ALK, ROS1 и RET при аденокарциномах лёгкого составила 6,1%, 2,5% и 1,1%, соответственно.
4. Изучен спектр перестроек генов ALK, ROS1, RET в опухолях лёгких российских пациентов. На четыре наиболее часто встречающихся варианта перестройки ALK пришлось 92% обнаруженных случаев (EML4ex13/ALKex20 (V.1): 49,2%; EML4ex6/ALKex20 (V.3): 28.0%; EML4ex20/ALKex20 (V.2): 8.2%; EML4ex18/ALKex20 (V.9): 6.6%). На каждый из оставшихся пяти вариантов (EML4ex6/ALKex19; EML4ex19/ALKex20; EML4ex2/ALKex20; EML4ex13/ALKex3-ALKex20; UBCex1/ALKex18) пришлось по 1,6% случаев РЛ, что суммарно составило всего 8% ALK-позитивных случаев. Вариант CD74ex6/ROS1ex34 составляет 64% перестроек гена ROS1; ещё по 9% транслокаций гена ROS1 приходится на варианты SDC4ex2/ROS1ex32; EZRex10/ROS1ex34; CD74ex6/ROS1ex35 и ACTVex6/ROS1ex35. Спектр выявленных вариантов RET-транслокации ограничился двумя транскриптами: 91% случаев представлено вариантом KIF5Bex15/RETex12, а 9% транслокаций приходится на CCDC6ex1/RETex12.
5. Наличие перестроек с участием рецепторных тирозинкиназ ассоциировано с женским полом (ALK, ROS1, RET), молодым возрастом (ALK, ROS1) и отрицательным статусом курения (ALK).
6. Оптимизированный в рамках данной работы алгоритм молекулярно-генетического тестирования позволяет эффективно детектировать основные клинически значимые мутации на базе единой ПЦР-платформы.

Практические рекомендации

1. Одним из важных преимуществ разработанного комбинированного подхода к детекции перестроек ALK, ROS1, RET является возможность одновременного его выполнения с другими основными молекулярно-генетическими тестами (EGFR, BRAF, KRAS, MET) в рамках единой ПЦР платформы, что позволяет более эффективно расходовать имеющийся опухолевый материал по сравнению с методами FISH и ИГХ.

2. Для проведения надёжной молекулярной-диагностики важна качественная микродиссекция опухолевого материала. Получаемый под контролем световой микроскопии парафиновый срез должен содержать максимальное возможное число опухолевых клеток. Если объём опухоли значительно меньше окружающих здоровых тканей, то необходимо указать процент опухолевых клеток, что поможет в дальнейшей интерпретации результатов.

3. По нашему клиническому опыту, в 5–10% образцов наблюдается низкий уровень сохранности нуклеиновых кислот (ДНК и/или РНК) в предоставленном гистологическом материале. В таких случаях рекомендуется исследовать образцы альтернативными методами – ИГХ, FISH.

4. В реальной клинической практике для экономии времени молекулярно-генетические исследования при возможности выполняются параллельно. Однако логика принятия решения о назначении генетических исследований и приоритизации их выполнения, в условиях нехватки образца, должна соответствовать предложенному нами алгоритму (рис. 21) с учётом технических возможностей лабораторий.

Перспективы разработки темы

Представляется целесообразным продолжение молекулярно-эпидемиологических исследований, направленных на уточнение частоты, спектра РЛ-ассоциированных транслокаций (ALK, ROS1, RET) у российских больных.

Также представляет крайне интересным провести более глубокое изучение возможных причин возникновения несбалансированной экспрессии в оставшихся дискордантных образцах, в которых не удалось выявить методом NGS никаких химерных транскриптов.

Помимо этого, представляется крайне актуальным разработать тест с использованием аналогичных подходов, для исследования опухолей других локализаций на предмет присутствия транслокаций с участием генов NTRK1–3 и FGFR1–3.

Список работ, опубликованных по теме диссертации:

1. Orlov S.V., Iyevleva A.G., Filippova E.A., Lozhkina A.M., Odintsova S.V., Sokolova T.N., Mitushkina N.V., Tiurin V.I., Preobrazhenskaya E.V., Romanko A.A., Martianov A.S., Ivantsov A.O., Aleksakhina S.N., Togo A.V., Imyanitov E.N. Efficacy of lorlatinib in lung carcinomas carrying distinct ALK translocation variants: The results of a single-center study // *Translational Oncology*. – 2021. – Vol. 14. – № 8. – P. 101121.
2. Preobrazhenskaya E.V., Iyevleva A.G., Suleymanova A.M., Tiurin V.I., Mitiushkina N.V., Bizin I.V., Ivanstov A.O., Gorustovich O.A., Shelekhova K.V., Kachanov D.Y., Varfolomeeva S.R., Roschin V.Y., Kazakova A.N., Litvinov D.V., Shamanskaya T.V., Savelov N.A., Suspitsin E.N., Imyanitov E.N. Gene rearrangements in consecutive series of pediatric inflammatory myofibroblastic tumors // *Pediatric Blood & Cancer*. – 2020. – Vol. 67. – № 5. – P. e28220.
3. Mitiushkina N.V., Kholmatov M.M., Tiurin V.I., Romanko A.A., Yatsuk O.S., Sokolova T.N., Ivantsov A.O., Kuligina E.S., Stepanov I.A., Belyaev A.M., Togo A.V., Imyanitov E.N. Comparative analysis of expression of mutant and wild-type alleles is essential for reliable PCR-based detection of MET exon 14 skipping // *Biochimie*. – 2019. – Vol. 165. – P. 267-274.
4. Mitiushkina N.V., Kholmatov M.M., Venina A.R., Tiurin V.I., Yanus G.A., Sokolova T.N., Yatsuk O.S., Zaitseva O.A., Ivantsov A.O., Kuligina E.Sh., Togo A.V., Imyanitov E.N. PCR-based detection of EGFR, ALK, KRAS and BRAF mutations in Russian patients with lung adenocarcinoma: a single-center experience // *Neoplasma*. – 2018. – Vol. 65. – № 6. – P. 972-979.
5. Lavdovskaia E.D., Iyevleva A.G., Sokolenko A.P., Mitiushkina N.V., Preobrazhenskaya E.V., Tiurin V.I., Ivantsov A.O., Bizin I.V., Stelmakh L.V., Moiseyenko F.V., Karaseva N.A., Orlov S.V., Moiseyenko V.M., Korzhenevskaya M.A., Zaitsev I.A., Kozak A.R., Chistyakov I.V., Akopov A.L., Volkov N.M., Togo A.V., Imyanitov E.N. EGFR T790M Mutation in TKI-Naïve Clinical Samples: Frequency, Tissue Mosaicism, Predictive Value and Awareness on Artifacts // *Oncology Research and Treatment*. – 2018. – Vol. 41. – № 10. – P. 634-642.
6. Mitiushkina N.V., Tiurin V.I., Iyevleva A.G., Kholmatov M.M., Filippova E.A., Moiseyenko F.V., Levchenko N.E., Sardaryan I.S., Odintsova S.V., Lozhkina A.M., Volkov N.M., Karaseva N.A., Moiseyenko V.M., Orlov S.V., Imyanitov E.N. Variability in lung cancer response to ALK inhibitors cannot be explained by the diversity of ALK fusion variants // *Biochimie*. – 2018. – Vol. 154. – P. 19-24.

7. Demidova I., Grinevich V., Avdalian A., Imyanitov E., Gikalo M., Savelov N., Novikova I., Samuilenkova O., Tiurin V., Ulianova E., Tsimafeyeu I., Tjulandin S. Detection of ALK rearrangements in 4002 Russian patients: The utility of different diagnostic approaches // Lung Cancer. – 2017. – Vol. 103. – P. 17-23.

8. Iyevleva A.G., Raskin G.A., Tiurin V.I., Sokolenko A.P., Mitiushkina N.V., Aleksakhina S.N., Garifullina A.R., Strelkova T.N., Merkulov V.O., Ivantsov A.O., Kuligina E.Sh., Pozharisski K.M., Togo A.V., Imyanitov E.N. Novel ALK fusion partners in lung cancer // Cancer Letters. – 2015. – Vol. 362. – № 1. – P. 116-121.

9. Моисеенко Ф.В., Тюрин В.И., Левченко Н.Е., Левченко Е.В., Иевлева А.Г., Имянитов Е.Н., Митюшкина Н.В. Использование молекулярно-генетического теста на транслокацию ROS1 при раке легкого для выявления единичных опухолевых клеток (описание клинического случая)//Вопросы Онкологии. – 2018. – Т. 64. – № 3. – С. 331-334.

10. Нефедов А.О., Тюрин В.И., Имянитов Е.Н., Митюшкина Н.В. Использование молекулярно-генетического тестирования для подтверждения диагноза первично-множественного рака лёгкого (ПМРЛ): описание клинического случая//Вопросы Онкологии. – 2017. – Т. 63. – № 4. – С. 655-656.

Благодарности

Выражаю глубокую признательность и благодарность руководителю диссертационной работы – член-корреспонденту РАН, доктору медицинских наук, профессору Евгению Наумовичу Имянитову за внимание и содействие при выполнении работы.

Благодарю за помощь в работе старшего научного сотрудника научной лаборатории молекулярной онкологии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России кандидата биологических наук Алексахину Светлану Николаевну, старшего научного сотрудника научной лаборатории молекулярной онкологии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России кандидата медицинских наук Иевлеву Аглаю Геннадиевну, научного сотрудника научной лаборатории молекулярной онкологии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России кандидата биологических наук Митюшкину Наталью Владимировну.

Выражаю глубокую благодарность всему коллективу научной лаборатории молекулярной онкологии за доброжелательное отношение.