

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Национальный медицинский исследовательский центр онкологии
имени Н.Н. Петрова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

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

Диссертация
на соискание учёной степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
чл.-корр. РАН, д.м.н., профессор
Имянитов Е.Н.

Санкт-Петербург

2021

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	13
1.1 Краткая история распространения рака лёгкого	13
1.2 Эпидемиология рака лёгкого	20
1.3 Патоморфологическая классификация рака лёгкого.....	23
1.4 Общие механизмы злокачественной трансформации.....	26
1.5 Роль курения в развитии рака лёгкого	28
1.6 Молекулярные механизмы патогенеза рака лёгкого	31
1.7 Рецепторные тирозинкиназы.....	38
1.7.1 ALK-транслокация.....	42
1.7.2 ROS1-транслокация	44
1.7.3 RET-транслокация	45
1.8 Способы детекции транслокаций	46
ГЛАВА II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	49
2.1 План работы и общее описание дизайна исследования	49
2.2 Материалы	50
2.3 Методы исследования	52
2.3.1 Выделение нуклеиновых кислот из парафиновых срезов	52
2.3.2 Разработка тестов для детекции транслокаций.....	56
2.3.3 Вариант-специфическая ПЦР	59
2.3.4 Проверка специфичности подобранных праймеров.....	60
2.3.5 Контроль работоспособности разработанных тестов	61
2.3.6 Протокол проведения ПЦР	62
2.3.7 Методика оценки несбалансированной экспрессии концевых фрагментов перестраиваемого гена	63
2.3.8 Учёт результатов ПЦР	64
2.3.9 NGS-идентификация химерных транскриптов	68
2.4 Статистическая обработка полученных результатов	70
ГЛАВА III. РЕЗУЛЬТАТЫ	71
3.1 Результаты тестирования.....	71
3.2 Сопоставление результатов тестирования обеими методиками	71

3.3	ТЕСТИРОВАНИЕ ДИСКОРДАНТНЫХ ОБРАЗЦОВ	75	
3.4	ВСТРЕЧАЕМОСТЬ И СПЕКТР ОБНАРУЖЕННЫХ ТРАНСЛОКАЦИЙ,	77	
ГЛАВА IV. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ И			
ЗАКЛЮЧЕНИЕ			84
ВЫВОДЫ			92
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ			94
ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ.....			95
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....			96
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ			99
ПРИЛОЖЕНИЕ А			113
ПРИЛОЖЕНИЕ Б			116
ПРИЛОЖЕНИЕ В			119

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы

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 [80].

Причиной возникновения подавляющего большинства (80–90%) случаев РЛ является курение, оставшиеся случаи обусловлены воздействием индустриальных, экологических и других факторов [68]. 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 [18]. 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 [100]. 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 [44; 79; 149].

В клинической практике и научных исследованиях рак лёгкого обычно делят на: немелкоклеточный – НМРЛ (80–85% случаев) и мелкоклеточный – МРЛ (10–15%). 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 [143]. Современная анти-PD-L1 иммунотерапия (атезолизумаб, дурвалумаб) несколько улучшила

результаты лечения МРЛ и изменила существующие более 20 лет терапевтические стандарты [72].

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 [156]. 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 [125].

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 [49]. Однако уже к началу 2000-ых стал очевиден предел эффективности химиотерапии на основе платины [11; 36; 148].

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. 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 [172].

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 [135].

Встречаемость транслокаций гена ALK по обобщённым данным составляет около 5% среди НМРЛ [172], однако разброс значений в разных исследованиях варьирует от 3% до 13%, что связано с особенностями анализируемых выборок и популяционными различиями [38; 58; 58]. Перестройки ROS1, RET встречаются ещё реже: в европейской популяции около 1–2%, а в азиатских странах до 2–3% [38; 64; 135].

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 сенсбилизирующих 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 зависит 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 [162].

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

Для достижения указанной цели были поставлены следующие задачи:

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 работы

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 [57; 58; 67].

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.

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

Настоящее исследование основано на ретроспективном изучении молекулярно-генетических и клинических характеристик опухолей лёгкого.

Сформированная группа образцов для исследования (1000 последовательных случаев немелкоклеточного рака лёгкого) была протестирована на предмет присутствия РЛ-ассоциированных транслокаций при помощи разработанного ПЦР-теста. Данный тест основан на комбинации двух методик: оценки уровня несбалансированной экспрессии 5'- и 3'-концевых фрагментов перестраиваемого гена и типирования известных химерных транскриптов (вариант-специфическая ПЦР). Результаты

тестирования обеими методиками сравнивались, а образцы, демонстрирующие дискордантную картину, если это было возможно, подвергались таргетному РНК-секвенированию нового поколения (NGS) с целью идентификации ранее неизвестных вариантов перестроек.

Полученные в ходе исследования данные подвергались статистическому анализу, а обобщённые результаты сопоставлялись с результатами, представленными в научной литературе.

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; ACTVex6/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 и апробация 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

Работа выполнена в рамках основных направлений исследования научной лаборатории молекулярной онкологии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России. Полученные результаты работы были внедрены в научно-практическую деятельность подразделения (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.

Структура и объём 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.

ГЛАВА I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Краткая история распространения рака лёгкого

Рак лёгкого в тени истории

Злокачественные заболевания существовали на протяжении всей истории человека, однако среди всех опухолей именно рак лёгкого долгое время оставался в тени [16; 54; 73; 77]. Создаётся ложное впечатление о том, что РЛ появился только в XIX веке. На самом деле его изучению препятствовал ряд причин.

Одна из них - медленное развитие диагностики внутригрудных заболеваний, обусловленное сложностью обследования пространства, защищённого грудной клеткой. Рак лёгкого отличается от других форм онкопатологии высокой степенью метастазирования, обусловленная миграцией злокачественных клеток из малого круга кровообращения через артериальную систему по всему организму. Нередко эти метастазы развиваются значительно быстрее, чем первичный очаг опухоли. Античные и средневековые врачи не умели различать первичные и вторичные очаги опухолевых заболеваний, зачастую их расценивали как отдельные нозологические формы заболеваний. Только с момента изобретения рентгеновской трубки в конце XIX века и открытия рентгеновского излучения медицинская наука смогла связать эти феномены воедино [16].

Ещё одной причиной являлась малая продолжительность жизни. Вплоть до XIX века большинство людей не доживало до возраста 60–70 лет, на который приходится пик заболеваемости РЛ [5]. К тому же малоинформативные старые методы диагностики долгое время не позволяли врачам клинически отличить лёгочные заболевания друг от друга, например, рак и пневмонию, особенно у пожилых пациентов [16]. Горное дело и добыча полезных ископаемых на протяжении большей части истории человека были одним из основных локомотивов промышленного развития, именно поэтому РЛ в основном был известен, как эндемичное заболевание горняков.

Неудивительно, что до конца XIX века первичный рак лёгкого считали редкостью: он либо был известен как болезнь горняков, либо его расценивали в качестве других нозологических форм заболеваний лёгких [16].

Заболеваемость РЛ связана с распространением вредных привычек и загрязнением окружающей среды, обусловленным промышленным развитием [16]. Начиная с XX века неуклонно растёт заболеваемость, а с ней и смертность от РЛ. Это связано в основном с увеличением популярности курения сигарет [3; 7; 170]. За последнее столетие РЛ превратился из редкого заболевания в глобальную угрозу.

Рак лёгкого, как профессиональное заболевание горняков

На протяжении медного, бронзового и железного веков горное дело получает развитие по всему миру, обеспечивая необходимыми ресурсами растущие цивилизации. Шахтёрский труд был известен, как один из самых опасных и тяжёлых. До недавнего времени само слово рудники были синонимом тяжёлого наказания, на которое обрекали заключённых и рабов. Однако, до Парацельса никто ранее так не подчёркивал исключительную вредность подземных работ. Написанная 1533-34 годах работа Парацельса "Von der Bersucht und anderen Bergkrankheiten", описывающая характерные заболевания горняков и литейщиков, является первым научным трактатом на тему профессиональных заболеваний. Парацельс считал, что при добыче драгоценных металлов в воздух попадают ядовитые пары, пагубно действующие на лёгкие. Также он подчёркивал, что в разных шахтах развиваются неодинаковые заболевания, даже при условии добычи руды одних и тех же металлов [16; 39]

Немецкий врач, учёный-минералог Г. Агрикола, и по совместительству совладелец серебряного рудника, посвятил около двадцати лет своей жизни написанию грандиозного 12-томного труда. Изданная в 1553 году, на следующий год после смерти Агриколы, «De Re Metallica» затрагивает такие темы, как геологоразведка, топография, металлургия, логистика, строительство шахт и плавильных печей, горнодобывающей техники, а также

освещает проблемы со здоровьем, обусловленные горным делом. В своём труде он пишет: "Грозная чахотка приводит горняков к преждевременной смерти. Чёрная рудничная пыль помфоликс разъедает раны до костей... Люди чахнут от пыли, разъедающей лёгкие" [16; 41]. В связи с этим Агрикола предложил первые профилактические рекомендации по охране труда – регулярное проветривание шахт, ношение специальной защитной одежды [16; 169].

В нашей стране всерьёз занимался этой проблемой известный русский учёный естествоиспытатель Михаил Васильевич Ломоносов. В своей работе "Первые основания металлургии и рудных дел" 1741 года он предложил ряд конкретных мер для облегчения тяжёлых условий труда в шахтах: создавать условия для естественного проветривания рудников, облегчить ручной труд рабочих, оборудовать места отдыха в шахтах, ввести семичасовые рабочие смены и отказаться от детского труда. Кроме того он придумал специальную защитную одежду и считал, что необходимо создать искусственную систему вентиляции шахт [9; 16]

Помимо добываемого металла, рудокопы сталкивались с сопутствующей рудой, которой не могли найти применение. Она сваливалась поблизости от места добычи, таким образом, вырастали отвалы. В отвалах встречались породы, содержащие неизвестные на тот момент минералы и элементы. Интерес к вторичной переработке и исследованию свойств неизученных минералов появился лишь в XIX веке.

Одним из таких минералов была смоляная обманка – смоляно-чёрный камень с зеленоватым, жёлтым или оранжевым оттенком. Смолка имела специфические свойства: могла слегка оплавляться в костре, имела пластичность подобно свинцу, а при длительном контакте с кожей и телом человека вызывала долго заживающие язвы. Немецкому химику М. Клапроту в 1789 году удалось выделить из неё новый элемент, который он назвал в честь недавно открытой планеты – ураном [10].

В 1879 году немецкие врачи Ф. Хартинг и В. Гессе доказали, что истинной причиной заболеваемости шахтёров раком лёгких является рудная пыль. Впоследствии эта работа послужит основой для исследований по обнаружению канцерогенов, содержащихся в шахтной пыли, и радиоактивного газа радона, проведённых в 1930 году. [82]. В 1896 году французский физик А. Беккерель, исследуя соли урана, открыл явление радиоактивности. Этим открытием он поделился со своими коллегами супругами Кюри, которые через два года обнаружат новый в миллион раз более радиоактивный элемент – радий. В том же 1898 году супруги Кюри открыли ещё один радиоактивный элемент полоний, также выделенный из урановой смолки.

Важно отметить, что смоляная обманка издавна использовалась в небольших количествах для производства знаменитого богемского стекла. Именно природный уран придавал богемскому стеклу флуоресцентные свойства. Сотни лет стеклодувы изготавливали стекло с добавлением оксида урана, вызывающего у них рак лёгких. И только в 1940-е годы это было запрещено [15].

Рост заболеваемости раком лёгкого на рубеже XIX-XX веков

Таким образом ещё 150 лет назад РЛ считался уникально редким заболеванием, эндемичным для горняков. Согласно данным аутопсии Института патологии при университете Дрездена в 1878 году рак лёгкого составлял около 1% от всех злокачественных заболеваний. Однако уже в 1918 году заболеваемость выросла почти до 10%, а затем до 14% к 1927 году [170].

В издании 1930 года авторитетного справочника по патологии Спрингера (Springer Handbook of Special Pathology) было отмечено, что заболеваемость РЛ начала расти на рубеже веков и ускорилась после Первой мировой войны. Также было замечено, что опухоли лёгкого преимущественно поражают мужчин, но при этом наблюдался устойчивый рост заболеваемости и у женщин. Продолжительность болезни с момента постановки диагноза

составляла от полугода до двух лет, и практически во всех случаях наблюдался длительный хронический бронхит [170].

Помимо этого, в справочнике Спрингера приводились возможные причины столь резкого роста заболеваемости РЛ: повышение уровня промышленной загрязнённости воздуха, асфальтирование дорог, рост автомобилизации, использование боевых газов в Первой мировой войне, испанский грипп 1918 году, активное использование бензина и других видов ископаемого топлива. Однако аналогичный уровень роста заболеваемости РЛ наблюдался и в странах с меньшим уровнем индустриализации, автомобилизации и малой протяжённостью асфальтированных дорог. К тому же ранее, после предыдущих пандемий гриппа, не наблюдался рост заболеваемости РЛ. Несмотря на некоторые подозрения, большинство исследователей не связывали потребление сигарет с раком лёгких [170].

Рак лёгкого, как заболевание курильщиков

Только в 1929 году была опубликована первая работа на данную тему – немецкий врач Л. Фритц указал на то, что большинство больных раком лёгкого являлись курильщиками. В Германии активно велись исследования этой проблемы на протяжении всех 1930-х годов [7]. А в 1940 году было опубликовано исследование "случай-контроль", в котором было категорически заявлено о том, что именно "необычайный рост потребления табака является единственной и наиболее важной причиной роста заболеваемости раком лёгких" [120]. Через три года в 1943 году Немецкий институт по исследованию опасности табака обнародовал результаты исследования, в котором из 109 больных раком лёгких, только 3 некурящие. Однако мировое научное сообщество сознательно проигнорировало работы, сделанные нацистскими учёными. К вопросу о роли курения эпидемиологи вернулись лишь в середине 1950-х годов, когда целый ряд независимых исследований убедительно продемонстрировал взаимосвязь между употреблением сигарет и риском развития рака лёгкого. В связи с этим

некоторый интерес представляет краткое изложение исторических аспектов табакокурения [61].

Краткая сводка по распространению табакокурения

Табак был ввезён в Европу ещё в XV веке Христофором Колумбом, однако заядлое курение широких народных масс не было характерным явлением до самого последнего времени. Долгое время наиболее доступным способом употребления табака было курение трубки, сопряжённое в меньшей степени с риском развития рака лёгких и никотиновой зависимости из-за невозможности глубокой ингаляции табачного дыма. Косвенно распространению курения способствовало изобретение безопасных "шведских" спичек в 1855 году. Существенную роль в истории курения сыграло изобретение машины для автоматизированного производства сигарет (1881 г.). Именно курение сигарет, в наибольшей степени связано с развитием никотиновой зависимости вследствие глубокой ингаляции табачного дыма. Длительное время сигареты изготавливались вручную, были дороги и малодоступны. В результате автоматизации производства стоимость сигарет резко снизилась и выросло число курильщиков. Однако к широкому распространению этой пагубной привычки привела Первая мировая война. Табак, ввиду своих адаптогенных свойств, входил в рационы солдат всех стран. Первая мировая война привела к тому, что с фронтов вернулось курящее поколение. Избавиться от этой привычки в мирное время оказалось крайне сложно [7; 8; 170].

Употребление табака достаточно быстро заняло своё место среди истинно мужских привычек. На протяжении всего XX века табачные компании пытались найти новых потребителей для своей продукции в лице женщин. Рекламодатели и маркетологи осознали важность двух факторов – изменения социальной роли женщины и рост культуры потребления. Они сделали из сигарет удивительно гибкий символ с целым набором значений, таких как независимость, бунтарство, гламур, сексуальная соблазнительность, что нашло отклик как у феминисток, так и у обычных девушек [40].

Таким образом, к началу XXI века потребление табака достигло уровня глобальной эпидемии. По данным «Атласа табака ВОЗ» на 2000 год в мире было 1,3 млрд курящих людей. Для удовлетворения их потребности в никотине ежегодно производилось 5,5 трлн сигарет, что составляло 1000 штук на каждого человека в мире, что по расчётам приводило к 4,2 млн преждевременных смертей [114].

Несмотря на то, что на сегодняшний день известны и более опасные канцерогены, чем табачный дым, курение, вероятно, является основным канцерогенным фактором, воздействие которого можно свести к минимуму [170]. Поэтому для снижения заболеваемости РЛ имеет большое значение проведение грамотной антитабачной кампании по всему миру.

Борьба с табакокурением

Для противодействия развитию этой эпидемии Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) разработала Рамочную конвенцию по борьбе против табака (РКБТ), целью которой является снижение смертности из-за употребления табака и сокращения использования табака во всём мире. Конвенция устанавливает международные стандарты и принципы борьбы с табаком посредством повышения цен и акцизов на табачные изделия, ограничения продажи несовершеннолетним, специальных требований к рекламе (указание о вреде и изображения, вызванных табаком заболеваний), противодействия незаконной торговли табачных изделий, борьбы с пассивным курением и с помощью других подходов [13]. Конвенция вступила в силу 27 февраля 2005 г., а Россия присоединилась к ней 11 мая 2008 г. [12].

Для наблюдения за ситуацией ВОЗ разработала инструмент – Глобальный опрос взрослого населения о потреблении табака (Global Adult Tobacco Survey – GATS). Полученные в ходе опроса локальные данные используются для эпидемиологических исследований и оценки эффективности принятых антитабачных мер.

В нашей стране первый опрос GATS прошёл в 2009 году. Согласно ему, исследователи (Giovino G.A. et al., 2012) поставили Россию на первое место

(39,4%) по уровню употребления сигарет в процентном отношении числа курильщиков к общему количеству граждан страны: мужчины оказались на первом месте (60,7%), а женщины на втором (21,7%) после Польши (24,4%) [161]. В 2015 году в связи с появлением более актуальных сведений по другим странам в «Атласе GATS» картина слегка изменилась: русские мужчины (60%) заняли второе место после индонезийцев (67%), а россиянки (22%) оказались на третьей позиции после гречанок (26%) и полячек (24%) [159].

Однако, несмотря на представленные выше неутешительные результаты, ситуация с курением в нашей стране начала меняться к лучшему. Так, согласно следующему проведённому опросу GATS распространённость курения взрослого населения России снизилась с 39,4% (2009 г.) до 30,9% (2016 г.): среди мужчин с 60,7% до 50,9%, среди женщин с 21,7% до 14,3% [18].

Наблюдаемое последние полтора десятка лет снижение употребления табака по всему миру эксперты связывают с эффективностью стратегии, заложенной в РКБТ ВОЗ [144]. Однако несмотря на то, что курение является основным канцерогенным фактором, воздействие которого можно свести к минимуму, недавние исследования продемонстрировали тревожный рост заболеваемости РЛ среди некурящих [100]. Опухоли лёгкого курящих и некурящих имеют чётко выраженные мутационные особенности (профили), что показывает необходимость в отличных друг от друга подходах при генетическом тестировании и ведении этих групп больных [44; 79; 149].

Таким образом, рак лёгкого за свою долгую историю взаимоотношений с человеком претерпел ряд изменений. Сначала он был известен, как редкое спорадическое заболевание, затем, как профессиональная эндемичная патология, теперь как повсеместно распространённый недуг, являющийся глобальной проблемой человечества.

1.2 Эпидемиология рака лёгкого

На сегодняшний день рак лёгкого является самым распространённым злокачественным новообразованием, занимая первое место в онкологической

смертности у мужчин и второе место (после рака молочной железы) у женщин [80]. Согласно сведениям всемирной базы данных по онкологической заболеваемости GLOBOCAN, в 2018 году были зафиксированы 2,1 млн новых случаев рака лёгкого, что составляет 11,6% от всех злокачественных заболеваний. В том же году от РЛ погибло 1,8 млн человек, что составило 18,4% от общей онкологической смертности [80].

Заболеваемость

Уровень заболеваемости РЛ по всему миру неодинаков, в разных географических регионах среди мужчин регистрируют от 5,3 до 99,7 новых случаев на 100 тыс. человек, а среди женщин в 6–10 раз меньше [152]. Региональные различия в большой степени обусловлены уровнем экологического благополучия региона, а гендерное различие – уровнем распространения курения.

В настоящее время в развитых западных странах рост заболеваемости РЛ у мужчин замедлился или даже несколько снизился. Согласно данным Национального института изучения рака США (NCI), за последние три десятка лет стандартизированный показатель заболеваемости мужчин снизился на 36%, с максимального в 1984 году (68,0 заболевших на 100 тыс.) до минимального в 2016 году (43,4 на 100 тыс.) [140]. Это обусловлено тем, что количество курящих мужчин достигло некоего предела и начала снижаться, благодаря антитабачной политике и поддержке здорового образа жизни.

Заболеваемость женщин, напротив, неуклонно росла вплоть до последнего времени. Согласно данным ранее упомянутого NCI, уровень заболеваемости женщин (стандартизированный показатель) в США увеличился на 129%: с минимального в 1975 году (17,4 случаев на 100 тыс.) до наибольшего в 2005 году (39,9 на 100 тыс.) [140]. Одна из возможных причин – социальная эмансипация и смена образа жизни современных женщин. В начале XX века было разрушено табу на публичное курение женщин, сигареты стали символом свободы, а в США феминистки даже называли их факелом свободы «Torches of Freedom» [40]. С тех пор в мире количество курящих

женщин преимущественно росло, а вместе с ним росла и заболеваемость РЛ. Согласно последним опубликованным данным NCI (2016 г.) за прошедшие десять лет показатель стандартизированной заболеваемости женщин РЛ снизился на 12,3% и составил 35,0 на 100 тыс. [140].

Ежегодно в России обнаруживается более 60 тыс. новых случаев РЛ [2; 4]. Согласно эпидемиологическим данным в 2016 году было зарегистрировано 60 467 заболевших, среди которых 48 058 мужчин и 12 409 женщин [2; 4]. Мужчины в России заболевают РЛ в 6 раз чаще, чем женщины (индекс отношения 6,33) [2; 4].

За прошедшие десять лет уровень заболеваемости (стандартизированный показатель) в России снизился у мужчин с 56,6 до 48,9 на 100 тыс. (на 14,6%) и увеличился у женщин с 6,7 до 7,7 на 100 тыс. (на 14,9%) [2; 4; 17].

Выживаемость

На сегодняшний день показатель пятилетней выживаемости (стандартизированный по возрасту) больных с РЛ остаётся весьма низок. В дюжине стран с высочайшим уровнем оказания медицинской помощи он находится на уровне 20–30% в то время, как в большинстве остальных стран, среди которых и Россия (13,7%), он составляет всего 10–20% [81].

Несмотря на это за прошедшие сорок лет был достигнут серьёзный прогресс в лечении, казалось бы, этого неизлечимого заболевания. Так, в 1973 году относительная пятилетняя выживаемость в США составляла всего 10,7%, а к 2010 году достигла уровня 19,8% [164]. Этот успех обусловлен революционными изменениями в онкологии, начиная с разработки принципиально новых препаратов для таргетной и иммунной терапии, появления высокопрецизионных видов лучевой терапии, улучшения технологий оперативного вмешательства, заканчивая новыми методами диагностики злокачественных заболеваний.

1.3 Патоморфологическая классификация рака лёгкого

Рак лёгкого – гетерогенное заболевание, включающее в себя различные гистологические подтипы, отличающиеся по патологическим, генетическим и клиническим характеристикам [136; 157; 172]. Основываясь на основных гистологических, прогностических и клинических характеристиках в медицинской практике и научных исследованиях рак лёгкого разделяют на две основные группы: мелкоклеточный (15-20%) и немелкоклеточный (80-85%) [35; 136].

Мелкоклеточный рак лёгкого (МРЛ) – наиболее неблагоприятная форма, характеризующаяся молниеносным бессимптомным ростом (удвоение массы опухоли происходит в среднем в течение месяца) и ранней генерализацией. На момент диагностики у большинства пациентов наблюдается опухоль неоперабельной стадии с выраженной диссеминацией. Лечебная тактика обычно сводится к паллиативной химиотерапии [143]. Без лечения большинство пациентов с МРЛ умирают в течение 2-4 месяцев с момента постановки диагноза [143]. Современная анти-PD-L1 иммунотерапия (атезолизумаб, дурвалумаб) несколько улучшила результаты лечения МРЛ и изменила существующие более 20 лет терапевтические стандарты [71]. Важно заметить, что МРЛ наблюдается преимущественно у курящих, и практически никогда не встречается у некурящих [1].

В группу немелкоклеточного рака лёгкого (НМРЛ) включают самые разнообразные морфологические формы рака. Тактика лечения опухолей этой группы практически не отличается друг от друга, а результат лечения и прогноз сопоставимы. Основной метод лечения – хирургический, однако при обнаружении предиктивных мутаций может быть выбрана таргетная терапия. Использование его в сочетании с адъювантной лучевой и/или химиотерапией, а также комбинированное лечение, даёт больному шанс на излечение.

В прошлом при патоморфологической диагностике основное внимание акцентировалось на определении принадлежности исследуемой опухоли к одной из групп (НМРЛ и МРЛ), поскольку терапевтические рекомендации не

учитывали особенности подтипов НМРЛ. Однако с внедрением в практику молекулярного профилирования, иммуногистохимии и таргетной терапии появился интерес к дальнейшему уточнению гистологического подтипа [86; 102; 136; 157; 163]. К основным подтипам НМРЛ, которые будут рассмотрены подробнее, относятся аденокарцинома и её варианты, плоскоклеточный рак и крупноклеточная карцинома.

Аденокарцинома лёгкого (АЛ) – железистый рак, развивается из мелких бронхов на периферии бронхиального дерева. Наиболее полезными ИГХ-маркерами для классификации аденокарцином являются муцин, напсин А, тиреоидный фактор транскрипции-1 (ТТФ-1), р63 и цитокератин 5/6 (СК5/6) [136; 166].

В последние годы в развитых странах растёт доля аденокарцином в заболеваемости РЛ. Это обусловлено увеличением популярности низкосмолистых сигарет, употребление которых ассоциировано с аденокарциномой [171]. Также именно на аденокарциному приходится наибольшее число случаев РЛ у некурящих и у женщин [123]. На сегодняшний день это самый частый вариант рака лёгкого в развитых странах, он встречается в 30–45% случаев РЛ [55; 122].

Плоскоклеточный рак лёгкого (ПРЛ) – развивается чаще всего в бронхах 2–4-го порядка и нередко на периферии бронхиального дерева [136]. Гистологически ПРЛ определяется классификацией ВОЗ, как злокачественная эпителиальная опухоль, демонстрирующая кератинизацию и/или межклеточные мостики, или экспрессирующая ИГХ-маркеры плоскоклеточного рака (p40, p63, СК5/6) [136; 157]. Данный тип РЛ в большей степени ассоциирован с употреблением крепких сигарет [171]. Плоскоклеточный рак встречается в развитых странах с приблизительной частотой 20% случаев РЛ, занимая второе место после аденокарциномы [55]. В нашей стране, у пациентов старше 60 лет преобладает именно эта форма РЛ, что обусловлено большей популярностью крепких сигарет среди пожилых мужчин [7; 14].

Крупноклеточный рак лёгкого (КРЛ) – наименее дифференцированная форма РЛ с высокой степенью злокачественности. КРЛ определяется ВОЗ, как недифференцированный НМРЛ, не имеющий гистологических или ИГХ-характеристик плоскоклеточного, железистого (аденокарцинома) и мелкоклеточного рака лёгкого [157]. Диагностика КРЛ требует большего объёма забора образца опухоли для исследования с целью последовательного исключения остальных форм РЛ. В КРЛ отсутствует продукция муцина и экспрессия ТТФ-1, p40, но может быть позитивным на цитокератины [136; 157]. На крупноклеточную форму приходится 2,9% от всех случаев рака лёгкого [55].

Другие подтипы рака лёгкого, неупомянутые тут, такие как опухоли по типу слюнных желёз, саркоматоидные и др., представляют собой лишь незначительную часть от общего объёма опухолей лёгкого.

Накопленные данные крупномасштабных геномных исследований свидетельствуют о том, что РЛ представляет собой группу гистологически и молекулярно-генетически гетерогенных заболеваний даже в пределах одного и того же гистологического подтипа [99]. Пересмотренная в 2015 году гистопатологическая классификация ВОЗ была составлена с учётом последних открытий в области молекулярной патологии опухолей лёгкого [157]. Новой категорией в классификации стала «нейроэндокринная опухоль», которая включают в себя МРЛ, крупноклеточную нейроэндокринную карциному и карциноидную опухоль (типичную/атипичную) [99].

По результатам молекулярно-генетического пролиферирования, проведённого консорциумом CLCGP (Clinical Lung Cancer Genome Project), было показано, что большинство случаев крупноклеточного рака лёгкого могут быть молекулярно отнесены к аденокарциномам, либо к крупноклеточным нейроэндокринным опухолям [20]. В работе (Shtivelman et al., 2014) РЛ был разделён согласно молекулярным характеристикам (мутации, активированные сигнальные пути) на три группы: аденокарцинома, плоскоклеточный и мелкоклеточный рак лёгкого [119].

1.4 Общие механизмы злокачественной трансформации

Прежде чем перейти к обзору основного вопроса, которому посвящена данная работа, следует вкратце осветить общие механизмы злокачественной трансформации.

Злокачественные новообразования возникают тогда, когда появляются клеточные клоны с неограниченным пролиферативным потенциалом, которые способны в ходе роста выходить за пределы своей ткани и распространяться на территорию других органов и тканей.

Неопластические клетки обладают высокой генетической изменчивостью. В ходе селекции, происходящей под давлением со стороны организма, в популяции неопластических клеток происходит отбор наиболее агрессивного и автономного клона. Этот феномен называется «опухоловой прогрессией». В результате образуется конгломерат злокачественных опухолевых клеток, обладающий характерными свойствами, которые приведены ниже [3; 7; 84; 85]:

- самоподдержание сигналинга к пролиферированию;
- нечувствительность к сигналам угнетения клеточного роста;
- сопротивление клеточной гибели;
- неограниченный репликативный потенциал (иммортализация);
- стимуляция собственного неоангиогенеза;
- активация инвазии и метастазирования;
- перепрограммирование энергетического обмена;
- избегание надзора (уничтожения) со стороны иммунной системы.

В англоязычной литературе эти свойства называют ключевыми признаками рака «The Hallmarks of Cancer» [84; 85].

На сегодняшний день считается доказанным, что возникновение опухолевого процесса и его особенности определяются изменениями в генетическом аппарате клеток [3; 7; 84; 85]. Эти изменения могут быть как наследуемыми абберациями, так и появляться *de novo* в клетках под

воздействием канцерогенов и других повреждающих факторов. Список возможных изменений крайне разнообразен: амплификация (увеличение копийности) генов, вставки (инсерции) и делеции, транслокации (перестройки), микромутации, множественные повторы фрагментов и т. п. [3; 7].

Основная суть всех молекулярно-генетических изменений, происходящих в неопластических клетках, сводится к трём компонентам [7; 37]:

- 1) активирующие мутации в онкогенах;
- 2) инактивирующие мутации в антионкогенах;
- 3) геномная нестабильность.

Онкогены – это группа генов, в норме участвующих в регуляции процессов роста и дифференцировке клеток и/или препятствующих клеточной гибели. Нормальная работа онкогенов находится под строгим контролем сигнальных систем организма, а в результате соматических мутаций может происходить нарушение естественной регуляции этих процессов. Клетка становится независимой от внешних регулирующих воздействий и приобретает опухолевые свойства [3].

По степени значимости в онкогенах выделяют следующие мутации:

Драйверные (Driver mutation) – наличие которых достаточно для развития онкологического процесса. Эти мутации определяют основные особенности опухолей.

Пассажирские (Passenger mutation) – наличие которых необязательно для развития онкологического процесса. Такие мутации возникают из-за присущей опухолям геномной нестабильности.

Антионкогены (супрессоры) – это группа генов, отвечающих за негативную регуляцию клеточного деления и дифференцировки и/или способствующие клеточной гибели (апоптозу). Инактивация этих генов приводит к исчезновению их антагонистического влияния на онкогены и может привести к возникновению онкологического процесса [3].

Также выделяют гены, не отвечающие за злокачественную трансформацию, но способствующие распространению опухоли в организме, их называют генами-модуляторами [3].

В ходе опухолевой прогрессии трансформирующийся клон приобретает способность к ускоренному мутагенезу, называемому геномной нестабильностью. Данный феномен был экспериментально подтверждён в конце 1990-х годов. [111].

В геноме опухолевых клеток помимо «ключевых» мутаций в онкогенах и антионкогенах имеется огромное количество побочных «нейтральных» изменений. Единичная активация онкогена или инактивация антионкогена практически всегда компенсируется и не ведёт к дальнейшему развитию процесса. Озлокачествление (малигнизация) происходит только после накопления как минимум 5–9 сочетанных мутаций в нескольких онкогенах и антионкогенах [19; 112].

1.5 Роль курения в развитии рака лёгкого

Огромное значение в патогенезе РЛ играет курение. В этиологии РЛ курение обуславливает 80–90% случаев, а промышленные и экологические факторы составляют всего 10–20% [3; 68]. Регулярное употребление сигарет увеличивает риск развития РЛ в 20–40 раз [7].

Сегодня общепризнанным фактом является канцерогенный эффект продуктов горения табака [68]. В состав табачного дыма входят: никотин; полициклические ароматические углеводороды (ПАУ), нитрозамины, винилхлорид, альдегиды и формальдегиды, бензол, нитрозосоединения, свободные радикалы, кадмий и др. Никотин обуславливает наркотическую зависимость от табака, остальные соединения обладают токсичным и канцерогенным эффектом [3].

Стаж курения, «крепость» сигарет взаимосвязаны с развитием конкретных гистологических форм РЛ. Так употребление «крепких» сигарет с высоким содержанием смолы чаще всего вызывает плоскоклеточный РЛ. В

высокосмолистых сигаретах преобладают ПАУ, а в низкосмолистых – нитрозамины. Употребление «лёгких» ассоциируют с развитием аденокарцином. Последнюю четверть века приобретают популярность «лёгкие» сигареты, в которых снижены концентрации смолы и никотина. В связи с этим наблюдается увеличение доли аденокарцином [171].

О вреде курения знают все курящие, более 70% пытаются «бросить», причём 46% делают это ежегодно [7]. Неудачи обусловлены аддитивными свойствами никотина, а также генетическими особенностями человека. За последние пару десятилетий были открыты некоторые наследственные аспекты никотиновой зависимости [112].

Рецептор допамина DRD2 отвечает за функционирование центра вознаграждения в головном мозге. Четверть людей унаследовали полиморфизм гена DRD2 (NM_000795), кодирующий малоактивный вариант рецептора. Для поддержания оптимальной активности центра вознаграждения необходимо компенсаторное употребление допаминомиметиков, к которым в том числе относится и никотин [117; 124].

Фермент семейства цитохромов P450 2A6 (CYP2A6) участвует в метаболизме никотина, является его главным инактиватором (90%). Существует полиморфизм, кодирующий неактивный вариант фермента. У носителей этого варианта гена уровень никотина снижается медленно. Такие люди употребляют малое количество табачных изделий, но, к сожалению, имеют увеличенный риск развития РЛ [141].

Фермент глутатион-трансфераза (GSTM1) участвует в инактивации такого компонента сигаретного дыма как ПАУ. У тех людей, у которых имеются полиморфизмы гена GSTM1, снижающие активность кодируемого им фермента, увеличена предрасположенность к РЛ. Сочетания неблагоприятных генотипов CYP2A6 и GSTM1 увеличивает риск развития РЛ в 2 раза [52; 98].

Важную роль в развитии онкологических заболеваний играют полиморфизмы, отвечающие за функционирование систем программируемой

клеточной гибели. Так человек, обладающий полиморфизмом с субоптимальным уровнем функционирования апоптоза, может иметь повышенную предрасположенность к РЛ [96].

Схема взаимодействий между неблагоприятными социальными факторами, наследственными особенностями индивидуума и процессом накопления генетических аномалий представлена на Рисунке 1.



Рисунок 1 – Схема взаимосвязей патогенеза РЛ [по Имянитов и др., 2007]

Как видно из схемы, социальные факторы, благоприятствующие курению, и генетические полиморфизмы ферментов метаболизма никотина приводят к

формированию стойкой зависимости от курения. Канцерогенный эффект продуктов горения табака в сочетании с возможным наследственным дефицитом репарации ДНК вызывают повреждения генетического аппарата клеток лёгких [117]. Со временем мутации происходят в онкогенах и антионкогенах, а накопление критической массы таких поломок в конце концов приводит озлокачествлению трансформирующихся клеток.

Особую группу больных (10–15% случаев РЛ) составляют некурящие молодые пациенты, чаще всего у них обнаруживают аденокарциному лёгкого. Единая этиологическая причина в таких случаях не установлена однозначно. Согласно некоторым исследованиям, важную роль в возникновении РЛ у некурящих играет вирус папилломы человека, в других исследованиях основной причиной считают радиоактивный газ радон. По-видимому, в развитии РЛ у некурящих участвует целая группа разнообразных этиологических факторов.

С развитием фундаментальной онкологии и молекулярной диагностики в НМРЛ был обнаружен целый спектр генетических нарушений (мутаций), к некоторым из которых были разработаны эффективные таргетные препараты. Рассмотрим подробнее генетические нарушения, ассоциированные с развитием рака лёгкого.

1.6 Молекулярные механизмы патогенеза рака лёгкого

Молекулярный механизм патогенеза рака лёгкого (РЛ) – это весьма сложный процесс, в котором участвует множество молекул и вовлекаются все основные сигнальные пути, участвующие в канцерогенезе [119].

Как ранее было сказано, в клинической практике и научных исследованиях рак лёгкого обычно делят на: немелкоклеточный (НМРЛ) и мелкоклеточный (МРЛ). Однако при молекулярном профилировании его чаще разделяют на три группы: аденокарцинома лёгкого (АЛ), плоскоклеточный (ПРЛ) и мелкоклеточный рак лёгкого [119]. В каждой из групп наблюдается

свой спектр генетических изменений, активирующих сигнальные пути, данная информация наглядно представлена в Таблицах 1 и 2.

Таблица 1 – Клеточные сигнальные пути РЛ, активируемые в результате соматических изменений [no Shtivelman et al, 2014]

Сигнальный путь	Аденокарцинома (АЛ)		Плоскоклеточный РЛ (ПРЛ)		Мелкоклеточный (МРЛ)	
	%	Вовлечённые гены	%	Вовлечённые гены	%	Вовлечённые гены
РТК (рецепторные тирозинкиназы)	50	EGFR, ALK, MET, ERBB2, ROS1, RET	27	EGFR, FGFR1-3, ERBB2, ERBB3, DDR2	6	FGFR1
RAS/RAF	25	KRAS, NF1, BRAF, NRAS	22	NF1, KRAS, HRAS, NRAS, RASA1, BRAF		
PI3K/АКТ	10-12	PIK3CA, PTEN, АКТ1	59	PIK3CA, PTEN, АКТ1, АКТ2, TSC1-2	10	PTEN
LKB1/АМПК	15-30	LKB1				
TP53	50	TP53, MDM	80	TP53	80-90	TP53
RB1/CDKNA2	15-20	CDKNA2	79	CDKNA2, RB1	100	RB1, CCNE1
MYC	30	MYC				
Эпигенетическая регуляция	22	SMARCA4, ARID1A, SETD2	20	MLL2	19	EP300, CREBBP, MLL
Пути развития	20	NKX2.1/TTF1	44	SOX2, TP63, NOTCH1-2, ASCL4, FOXP1	20	SLIT2, EPHA7
Ответ на окислительный стресс	10	KEAP1	34	KEAP1, NRF2, CUL3		

Таблица 2 – Основные соматические генетические изменения при РЛ
[по Shtivelman et al, 2014]

Ген	Путь	Аберрация	% АЛ	% ПРЛ	% МРЛ
EGFR	РТК	Мутация	20–30%	редко	
		Амплификация	>20%	7%	
ALK		Транслокация	3-13%		
MET		Мутации	5%		
		Амплификация после лечения EGFR-ингибиторами	20%		
ERBB2		Мутации	2–4%		
		Амплификация	5–10%		
ERBB3		Мутация			2%
ROS1		Транслокация	1,5%		
RET		Транслокаций	1–2%		
FGFR1		Амплификация	1–3%	22%	6%
DDR2		Мутация			3,8%
IGFR1		Гиперэкспрессия	ND	ND	95%
KRAS	RAS	Мутации	30%	5%	
NF1			8–10%	11%	
HRAS				3%	
NRAS			<1%	<1%	
RASA1				4%	
BRAF	RAF	Мутации	6%	4%	
PIK3CA	PI3K	Мутации	редко	16%	
PTEN		Делеции	редко	8%	
AKT1-3		Мутации	редко	16% (AKT3) 20% all	
TSC1-2				6%	
LKB1	LKB1/AMPK	Мутации	15-30%	2%	
TP53	TP53	Мутации	50%	80%	70%
		Потеря копияности	20%		
MDM2		Амплификация	20%		
CDKNA2/p16INK4	RB1/CDK	Делеция, сайленсинг, мутация	>20%	72%	
RB1		Мутация	редко	7%	100%
CCNE1		Увеличение копияности	12%		

MYC	Регуляторы транскрипции	Амплификация	31%	редко	16%
MYCN					
MYCL					
SMARCA4	Эпигенетическая регуляция	Мутация	10%		
ARID1A		Мутация	8%		
SETD2		Мутация	5%		
MLL2		Мутация		19%	
EP300		Мутация			9%
CREBBP		Мутация			9%
MLL		Мутация			10%
KEAP1		Ответ на окислительный стресс	Мутация	11%	12%
NRF2	Мутация			19%	
CUL3	Мутация			7%	
NKX2.1/TTF1	Пути развития	Амплификация	20%		
SOX2		Амплификация, гиперэкспрессия		21%	
TP63		Амплификация, гиперэкспрессия		16%	
NOTCH1-2		Мутация		8 и 5%	
ASCL4		Мутация		3%	

Проведённые крупные экзомные исследования методом секвенирования нового поколения (NGS) установили, что в каждой из вышеперечисленных групп наблюдается разный уровень мутационной нагрузки – ТМВ (tumor mutational burden). ТМВ используется, в качестве предиктивного фактора, для прогноза эффективности иммунотерапии новообразований. Так, в аденокарциномах лёгкого (АЛ) средняя частота экзомных соматических мутаций для некурящих составляет 2,9/Мб против 12,9/Мб у курящих [115]. При ПРЛ, развивающемся преимущественно у курящих, показатель ТМВ – 8,1/Мб [43]. В МРЛ, встречаемом почти исключительно у заядлых курильщиков, средняя частота соматических мутаций составила 7,4/Мб [101]. Таким образом, если упростить, то опухоли лёгких заядлых курильщиков более иммуногены, чем у некурящих.

Более подробно остановимся на каждой из групп и разберём основные соматические генетические нарушения в них.

Открытие повторяющихся мутаций EGFR (20% АЛ), ALK- (3–13% АЛ), ROS1-транслокаций (1,5%) и мутаций других рецепторных тирозинкиназ (РТК) вместе с разработкой эффективных таргетных препаратов стало настоящим прорывом в терапии НМРЛ [97]. На сегодняшний день основные потенциальные мишени для таргетной терапии преимущественно встречаются именно в группе аденокарцином лёгкого. Пациенты, в опухолях которых присутствуют такие мутации, лучше отвечают на таргетные препараты, чем на обычную химиотерапию, что сделало их стандартом лечения [145]. В меньшей степени наблюдается эффективность мультикиназных ингибиторов в случае терапии RET-позитивных опухолей лёгкого (1–2%), что долгое время не позволяло сделать их общепринятым стандартом лечения [42; 132; 172]. Однако в мае 2020 по результатам клинического испытания LIBRETTO-001 был зарегистрирован FDA новый селективный RET-ингибитор – селперкатиноб (LOXO-292), который, вероятно, наравне с ALK и ROS1-ингибиторами со временем войдёт в мировые стандарты терапии НМРЛ [71; 153].

В то же время при плоскоклеточном раке лёгкого (ПРЛ) эти мутации (EGFR, ALK, ROS1, RET) встречаются крайне редко. В них обнаруживаются изменения других потенциально таргетируемых генов РТК – мутации DDR2 (3,8%) и амплификация гена FGFR1 (22%). Однако, к сожалению, пока не удалось разработать таргетные препараты эффективные против этих мишеней [106; 119; 144]. Также при ПРЛ наблюдается нарушения сигнального пути развития в виде амплификации SOX2 и мутаций генов NFE2L2 и KEAP1 [43; 119].

Мутация KRAS является одной из самых распространённых в НМРЛ, встречающейся в 30% АЛ и в 5% ПРЛ [119]. Точечные мутации в «хот-спот» кодонах 12, 13, 61 гена KRAS приводят к конститутивной активации белка и потере способности гидролизовать ГТФ в ГДФ, что сопровождается утратой механизма негативной авторегуляции и последующей активации по RAS/RAF/MEK/MAPK каскаду [117]. KRAS-мутации чаще наблюдаются у

курящих (26%) по сравнению с никогда не курящими (6%) [109; 119]. Разработанные первые анти-KRAS препараты (ингибиторы фарнезилтрансферазы) не смогли продемонстрировать эффективность в клинических испытаниях. Как попытки ингибировать нижележащие эффекторы в каскаде RAF/MEK или PI3K/AKT, так и использование комбинированной терапии ввиду её высокой токсичности не привели к успеху [23; 158; 172]. Среди разрабатываемых препаратов наиболее многообещающие результаты в доклинических испытаниях показывает специфический G12C-ингибитор (ARS-1620) [154; 172]. Настоящим прорывом в данном направлении стала разработка и регистрация (FDA май 2021) для медицинского использования другого G12C-ингибитора – соторасиба (AMG 510) [70]. Таким образом, теперь до 13% больных НМРЛ, имеющих мутацию KRAS p. G12C, смогут получить ранее недоступную таргетную терапию, пока только в США, а со временем в том числе и в России [70].

Мутации в гене BRAF присутствуют в 2–4% НМРЛ [172]. Большинство случаев мутации BRAF приходится на замену V600E, которая успешно таргетируется несколькими препаратами [47; 121]. Для терапии распространённого НМРЛ Евросоюзом была одобрена комбинация дабрафениба (BRAF-ингибитор) и траметиниб (MEK-ингибитор) [103].

Мелкоклеточный рак лёгкого (МРЛ) – наиболее агрессивная опухоль лёгкого. Прогноз течения заболевания крайне плох, несмотря на чувствительность к химиотерапии, пациенты рецидивируют в течение нескольких месяцев [143]. Согласно геномным исследованиям в МРЛ почти повсеместно инактивированы основные пути супрессии опухолевого роста TP53 и RB1, а также наблюдается амплификация регуляторов транскрипции – генов семейства MYC [101; 119]. Кроме того, были обнаружены повторяющиеся мутации в генах-модификаторах гистонов CREBBP, EP300 и MLL, участвующих в эпигенетической регуляции [119]. Среди генетических нарушений в генах РТК в МРЛ встречаются, только амплификация FGFR1 (6%) и гиперэкспрессия IGF1R (95%) [119]. Несмотря на заманчивость

использовать эти абберрации в качестве мишеней для таргетной терапии, особенно ввиду ограниченности терапевтических подходов при МРЛ, попытки разработать эффективные препараты не увенчались успехом [22; 25; 51; 119].

На сегодняшний день имеющиеся эффективные таргетные препараты (ИТК) умеют подавлять функцию активированных онкогенов, таким образом снижая активность нижележащих сигнальных путей. Однако большинство встречаемых генетических нарушений в опухолях лёгкого это инактивирующие мутации в генах супрессорах опухолевого роста (антионкогенах). В случаях АЛ чаще всего инактивированы какие-либо из следующих антионкогенов: TP53, STK11, CDKN2A, SMARCA4 и KEAP1. Спектр инактивированных генов онкосупрессоров при ПРЛ: CDKN2A, PTEN, KEAP1, MLL2, HLA-A, NFE2L2, NOTCH1 и RB1. Перечисленные выше антионкогены являются сложными мишенями для терапии, однако несмотря на это продолжается работа над препаратами непрямого таргетирования. Стратегия разработки таких препаратов основана на ингибировании других белков, находящихся ниже по активированному сигнальному каскаду [119].

Таким образом, рецепторные тирозинкиназы представляют не только теоретический интерес для понимания механизмов онкогенеза, но и практический, так как являются мишенью важной группы таргетных препаратов – ингибиторов тирозинкиназ (ИТК). Преимуществом таргетных препаратов является их направленность на определённый белок-мишень, зачастую активно работающий исключительно в опухолевых клетках или находящийся в мутантном виде в опухоли. Это делает их более избирательными по отношению к опухолевым клеткам, что снижает риск побочных эффектов и повышает эффективность. И хотя со временем развивается резистентность к таргетной терапии, этот процесс более предсказуем, что позволяет заранее планировать дальнейшую тактику лечения. Другим преимуществом является возможность назначения препарата на основании наличия молекулярной мишени для его действия, а не

гистологического типа, что делает их более универсальным инструментом в борьбе с онкологическими заболеваниями. Так, в ноябре 2018 года FDA одобрило применение ларотректиниба для лечения любых солидных опухолей, содержащих транслокации генов NTRK. Это первый случай одобрения ИТК для лечения опухолей вне зависимости от их тканевого происхождения.

Суммировав всё вышеизложенное, можно сказать, что несмотря на большое разнообразие потенциальных мишеней в опухолях лёгкого, разработка новых таргетных препаратов крайне сложна, а многие из многообещающих лекарственных субстанций оказываются недостаточно эффективными. Выбор по большей части ограничен ингибиторами тирозинкиназ EGFR, ALK, ROS1. Расширение терапевтических подходов основано на нахождении предиктивных маркеров (мутаций) к уже существующим препаратам. Например, как в случае с кризотинибом, который первоначально был разработан в качестве MET-ингибитора, однако продемонстрировал эффективность также по отношению к ALK-, ROS1-транслокациям [27]. Одним из подходов к улучшению результатов терапии пациентов с распространённым НМРЛ является усовершенствование методов молекулярной диагностики с целью выявления редких (неизвестных) или тяжело детектируемых вариантов мутаций и последующим определением их чувствительности к препарату.

1.7 Рецепторные тирозинкиназы

Одной из важнейших групп молекул, принимающих участие в молекулярном патогенезе злокачественных неоплазий, являются рецепторные тирозинкиназы (РТК). Как следует из названия, это группа трансмембранных белков, выполняющих функцию рецепторов для внеклеточных сигнальных молекул (ростовых факторов, гормонов, цитокинов) путём фосфорилирования своих субстратов по тирозинам. К их числу относятся важнейшие онкогены, участвующие в патогенезе НМРЛ, представленные на Рисунке 2 [110].

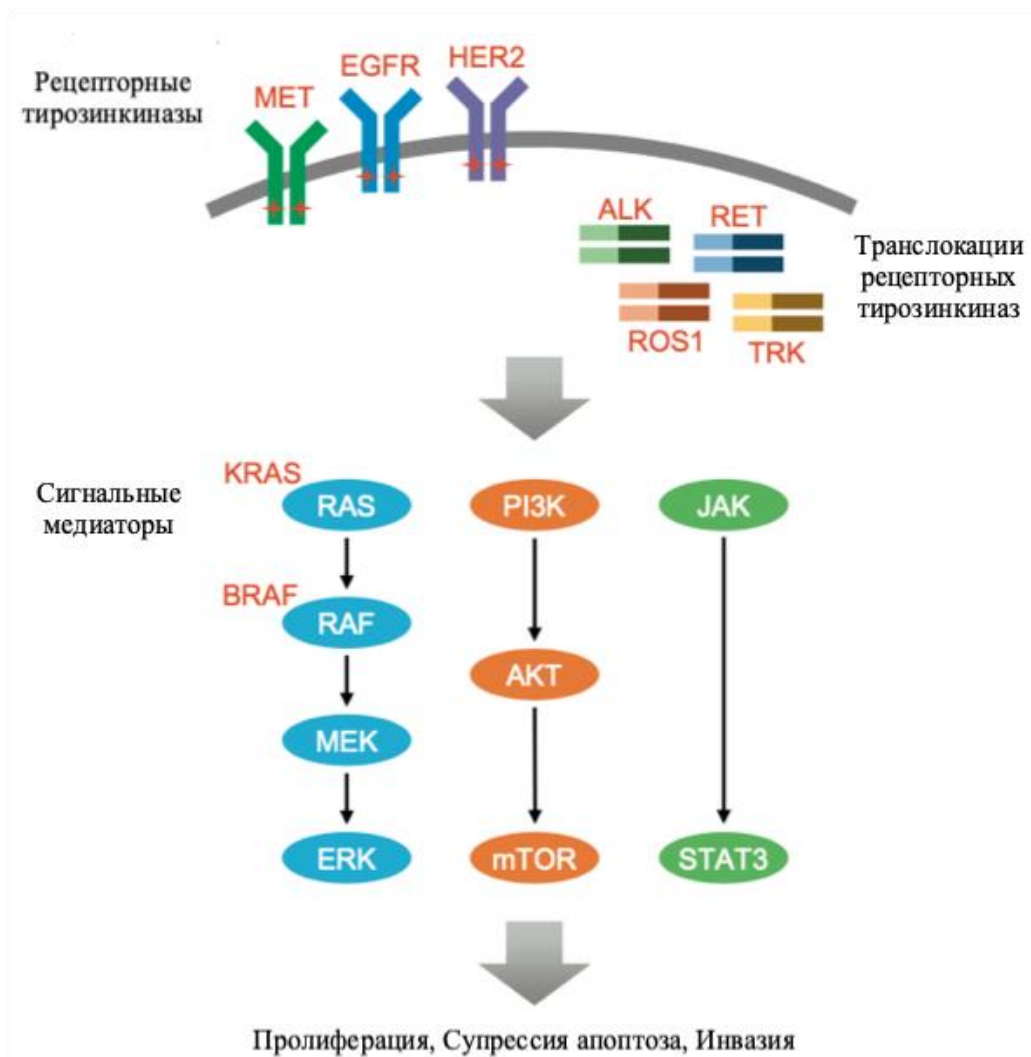


Рисунок 2 – Важнейшие онкогены в НМРЛ. Активирующие генетические изменения в онкогенах (показы красными крестиками) ведут к конститутивной активации нижележащих сигнальных путей роста и выживания [no Yoda et al, 2019]

В структуре РТК обычно присутствуют внеклеточный регион, содержащий сайт связывания с лигандом, трансмембранный домен и С-концевой регион, ответственный за ферментативную активность тирозинкиназы (рис. 3) [110].

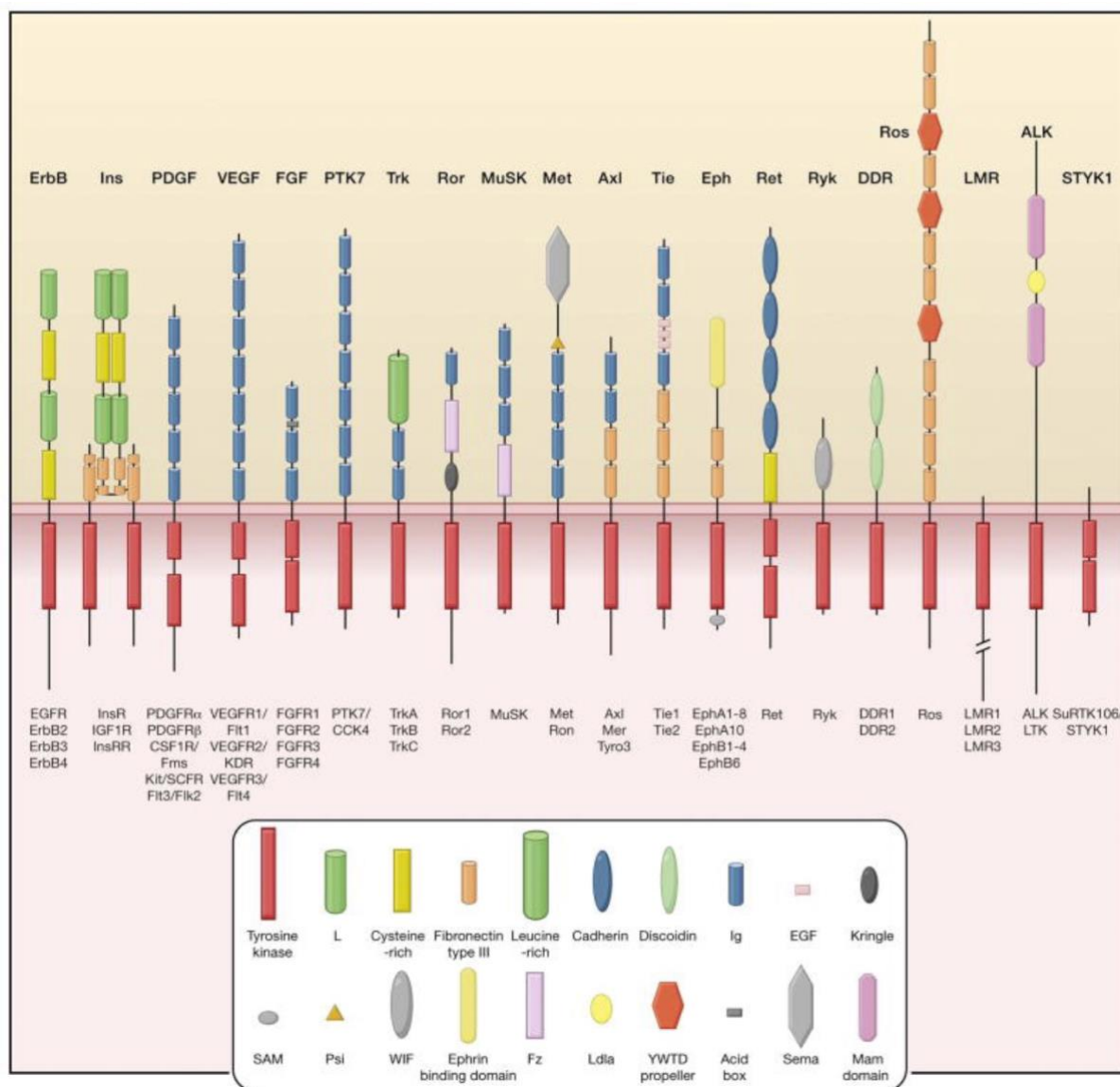


Рисунок 3 – Структура основных подсемейств рецепторных тирозинкиназ человека. Типичные представители перечислены под схемой соответствующего подсемейства [по Lemton et. al, 2010]

Физиологическая активация РТК происходит при связывании с лигандом и димеризации рецептора на клеточной мембране. При этом рецептор трансфосфорилируется своим партнёром, активируя сайты связывания для SH2- и фосфотирозин-связывающего (РТВ) доменов. Связывание и активация белков, содержащих подобные домены, приводит к дальнейшей передаче сигнала на нижележащие сигнальные каскады, такие как путь MAPK/ERK, запускающий клеточный цикл и процесс деления клетки, PI3K/АКТ/mTOR путь, ингибирующий процесс апоптоза, и др. [110].

Роль РТК в выживании клеток и стимуляции пролиферативной активности делает их классическими онкогенами. Их активация ведёт к непрерывному получению сигналов к пролиферации и неконтролируемому делению клеток. К подобной активации может привести множество разных событий:

- Замены в кодирующей последовательности гена. Так, в гене EGFR может возникнуть замена L858R или делеция в экзоне 19, что приведёт к лиганд-независимой активации рецептора. [30; 65].

- Гиперэкспрессия гена, чаще всего путём его амплификации. Повышенная экспрессия рецептора ведёт к повышению чувствительности клетки к внешним ростовым факторам, а в некоторых случаях к димеризации в отсутствие лиганда и самоактивации. Амплификации гена MET в исходном НМРЛ это редкое событие (3%), однако при анти-EGFR терапии это один из основных способов (22%) избегания лекарственной чувствительности опухоли [31; 118].

- Транслокация с формированием химерного гена. Если при хромосомной перестройке 3'-конец гена РТК, кодирующий тирозинкиназный домен, присоединится к 5'-концу другого гена, то в химерном белке киназный домен перестанет быть зависим от наличия лиганда и может быть постоянно активирован, непрерывно посылая клетке сигналы к пролиферации. Так, клинически значимым примером являются транслокации EML4/ALK, характерные для немелкоклеточного рака лёгкого (НМРЛ) [126].

- Мутации, нарушающие деградацию белка. К этому типу относится потеря (пропуск) 14 экзона в структуре белка MET. При утрате юкстамембранного домена теряется сайт связывания убиквитин-лигазы Cbl и нарушается процесс эндоцитоза и деградации рецептора. В результате нормальная экспрессия MET на уровне мРНК будет приводить к повышенной экспрессии белка.

Для назначения таргетного препарата необходимо выявить наличие генетического нарушения, что в случае с консервативными мутациями EGFR

и MET не представляет колоссальную проблему. Абсолютно противоположная ситуация наблюдается с транслокациями ALK, ROS1, RET. Данные перестройки имеют большое разнообразие вариантов, эффективная детекция и идентификация которых представляет собой нетривиальную задачу.

1.7.1 ALK-транслокация

В 1994 году у больных анапластической крупноклеточной лимфомой Ходжкина были обнаружены транслокации с участием гена CD246. После этого открытия ген CD246 приобрёл своё более известное имя ALK (anaplastic lymphoma kinase) [75]. ALK представляет собой рецепторную тирозинкиназу, кодируемую геном, расположенным на 2p23. Нормальная физиологическая роль ALK-киназы всё ещё не совсем ясна, но предполагается, что она играет определённую роль в развитии нервной системы [32; 160].

В 2007 году японские учёные обнаружили транслокацию EML4-ALK у нескольких пациентов с РЛ [95]. Частота встречаемости транслокации ALK, по обобщённым данным, составляет около 5% НМРЛ [172], однако разброс значений в разных исследованиях весьма велик от 3% до 13%, что связано с особенностями анализируемых выборок и популяционными различиями [38; 58; 58].

На сегодняшний день известно более 20 генов-компаньонов ALK-перестройки, их них в НМРЛ были описаны EML4 (основной), KIF5B, TFG, KLC1, HIP1, DCTN1 и SQSTM1 [21; 66; 83; 88; 89; 92; 107; 126]. Транслокации ALK с участием DCTN1 и SQSTM1 в опухолях лёгкого были впервые описаны нашим коллективом в работе (Iyevleva, et al., 2015). Перечень основных химерных транскриптов, встречаемых в НМРЛ, представлен на Рисунке 4.

Как видно из схемы (рис. 4.) точка разрыва транслокации практически всегда расположена в 19 интроне и редко в 20 экзоне. Таким образом, в состав химерного транскрипта в его 3'-участок всегда входит консервативная часть – 20-29 экзоны ALK (киназный домен), в то время как 5'-порция представлена разными компаньонами. Однако важной особенностью генов-компаньонов ALK является наличие «coiled-coil» («спиральная катушка») домена, обеспечивающего димеризации и спонтанную активацию химерного белка.

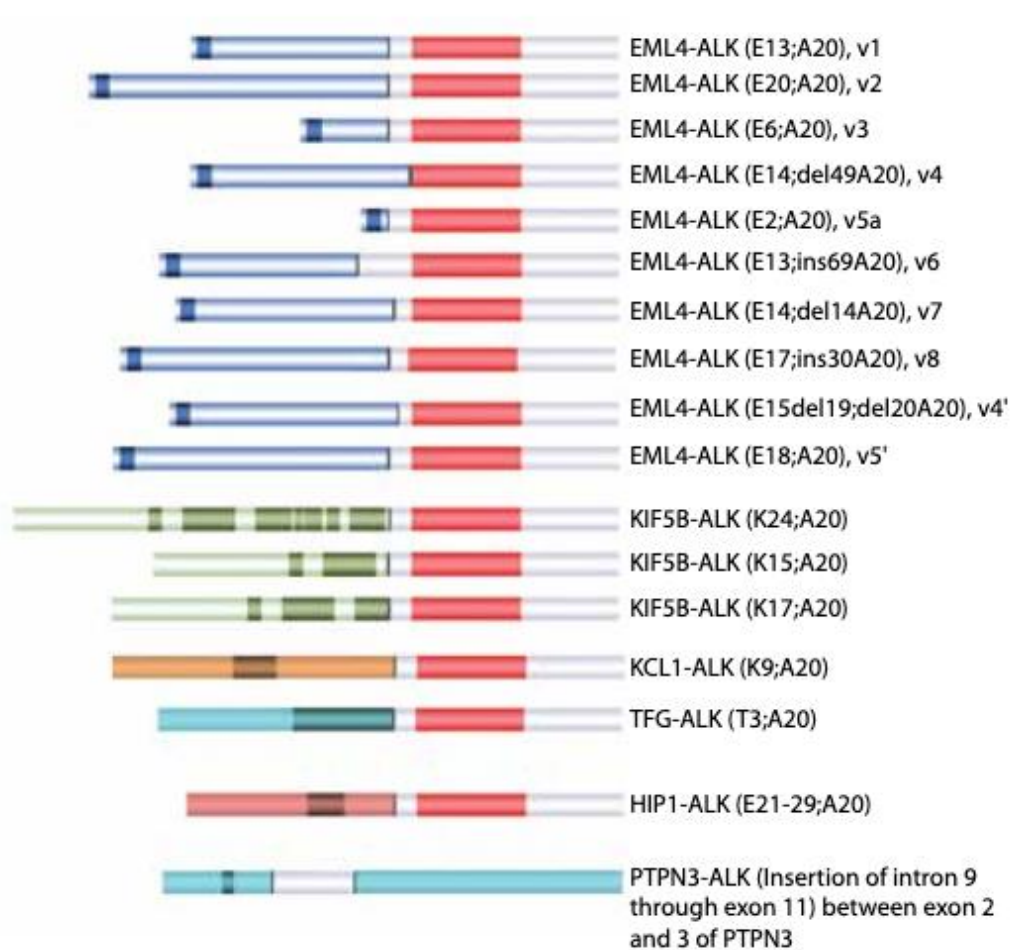


Рисунок 4 – Схема структуры основных химерных транскриптов ALK. Гены и их домены выделены различными цветами. В генах-компаньонах темно окрашенный участок обозначает «coiled-coil» домен, а красный – киназный домен ALK [по Tsao et al, 2016]

Как и в случае с EGFR, почти все опухоли лёгкого при терапии ингибиторами ALK приобретают резистентность, обусловленную в 20–40% случаев точковыми мутациями (также представлены на рис. 4) в сайтах связывания препарата [53; 91; 113; 130]. Новым поколениям препаратов удалось преодолеть развившуюся вторичную резистентность [172].

1.7.2 ROS1-транслокация

Ген ROS1 (6p22) кодирует рецепторную тирозинкиназу эволюционно родственную ALK, их АТФ-связывающие домены на 77% идентичны, что обуславливает их чувствительность к общим ингибиторам [29]. ROS1 был открыт более 20 лет назад, когда обнаружили, что он является гомологом куриного гена C-ROS и протоонкогена V-ROS вируса птичьей саркомы UR2 [29; 45; 116]. ROS1 – рецептор-сирота, последний из тирозинкиназ человека, к которому до сих пор не удалось найти активирующий лиганд, что создаёт существенные сложности для понимания его нормальной физиологической функции в организме [69; 138].

Первая онкогенная транслокация с участием ROS1 была обнаружена в глиобластоме человека, в связи с чем ген-компаньон GOPC стал также называться как FIG (fusion in glioblastoma) [46; 76]. В дальнейшем транслокация FIG-ROS1 была также обнаружена в холангиокарциномах и аденокарциномах лёгкого [139]. Частота встречаемости ROS1-транслокации в НМРЛ составляет 1-2% [137]. За прошедшие годы в опухолях лёгкого было обнаружено большое число компаньонов ROS1: SLC34A2, CD74, TPM3, SDC4, EZR, LRIG3, KDELR2, LIMA1, MSN, CLTC, CCDC6, TMEM106 и TPD52L1. Схема основных комбинаций «ген-партнёр/ROS1» представлена на Рисунке 5.

В отличие от ALK-транслокации ROS1 имеет несколько точек разрыва: в 31, 33, 35 и 36 интроне. С учётом этого и большого числа компаньонов существует крайне большое число вариаций ROS1-транслокации на уровне мРНК-транскрипта и белка.

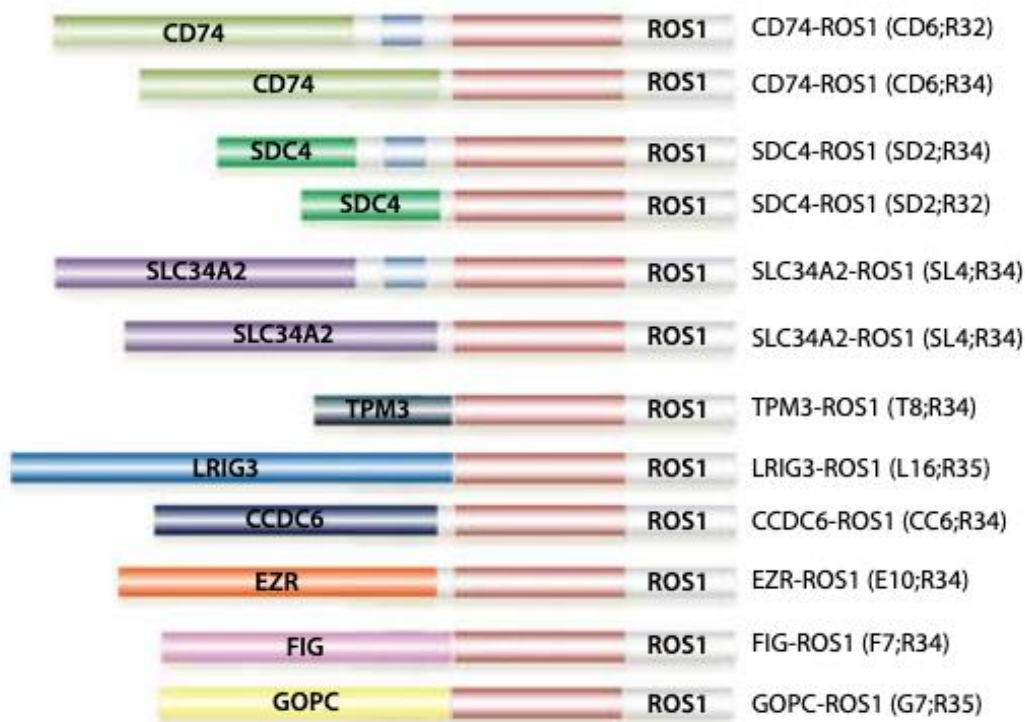


Рисунок 5 - Схема структуры основных химерных транскриптов ROS1. Трансмембранный и киназный домен ROS1 окрашены в коричневый цвет, гены партнёры показаны разными цветами [по Tsao et al, 2016]

Механизм активации ROS1 остаётся не до конца ясным [135]. Многие компаньоны, но не все (в отличие от ALK), сохраняют в составе химерного транскрипта свои димеризационные домены, что приводит к конститутивной активации белка. На данный момент все описанные химерные транскрипты содержат в себе киназный домен ROS1, однако иногда они теряют его трансмембранную часть. В других случаях в составе химерного белка включается трансмембранный домен гена-компаньона. Всё это приводит к тому, что разные химерные варианты ROS1 имеют различную субклеточную локализацию, которая обуславливает их возможность взаимодействовать (активировать) различные субстраты [59; 165].

1.7.3 RET-транслокация

Ген RET (REarrangement during Transfection) был идентифицирован в качестве протоонкогена в 1985 г. в результате эксперимента по трансфекции ДНК, выделенной из Т-клеточной лимфомы, в клеточную линию NIH-3T3

[134; 150]. Ген RET расположен на 10q11, кодируемая им РТК играет важную роль в развитии нервной системы и почек [90].

Первая онкогенная транслокация CCDC6-RET была детектирована в 1990 году в папиллярной карциноме щитовидной железы [128]. Встречаемость RET-транслокаций в папиллярных карциномах щитовидной железы составляет 13–43% [108; 151].

В 2012 году сразу несколькими независимыми коллективами были обнаружены перестройки KIF5B-RET в опухолях лёгкого [28; 94; 105; 107]. На сегодняшний день известно не менее 15 компаньонов RET-транслокации: KIF5B, CCDC6, NCOA4, TRIM33, RUFY2, CUX1, KIAA1468, CLIP1, ERC1, MYO5C, ERNA5, PICALM, FRMD4A, KIF13A, WAC [33; 42; 62; 74; 93; 133; 133; 155; 167; 168]. Встречаемость RET-транслокаций в НМРЛ составляет 1–3%, подавляющее большинство случаев приходится на аденокарциномы, хотя ряд авторов также сообщают о случаях обнаружения в аденосквамозном и плоскоклеточном раке лёгкого [104; 133; 134; 146].

RET-транслокация, как и ROS1 имеет несколько точек разрыва, расположенных в области 7, 10, и 11 интронов [26]. Так же, как и в случае с ALK все компаньоны перестройки имеют «coiled-coil» («спиральная катушка») димеризационный домен, обеспечивающий активацию киназы. С учётом числа точек разрыва и количества компаньонов RET-транслокация также имеет большое разнообразие возможных вариантов перестроек.

1.8 Способы детекции транслокаций

Современные методы детекции транслокаций с участием генов ALK, ROS1 и RET включают в себя флуоресцентную гибридизацию *in situ* (FISH), иммуногистохимический (ИГХ) анализ, метод мультиплексного цифрового анализа NanoString nCounter, обратнo-транскрипционную ПЦР (ОТ-ПЦР) и секвенирование нового поколения (NGS), причём каждый из методов имеет свои преимущества и недостатки.

Метод FISH является общепринятым в качестве «золотого стандарта» при оценке транслокаций рецепторных тирозинкиназ [91]. Преимуществом FISH является возможность детектировать присутствие транслокации независимо от гена партнёра, в том числе и новые неизвестные химерные варианты перестроек. Однако для анализа FISH требуется не менее 50 опухолевых клеток в образце, что делает невозможным использовать этот метод в 20% случаев биопсий опухолей лёгкого [63; 91; 127]. К другим недостаткам можно отнести низкую пропускную способность метода, высокую стоимость теста, малое количество оснащённых лабораторий и необходимость специализированного обучения для интерпретации результатов [26; 91].

Иммуногистохимический анализ (ИГХ) – повсеместно распространённый, сравнительно простой метод, используемый для скрининга РЛ-ассоциированных перестроек. ИГХ определяет присутствие транслокации по паттерну экспрессии исследуемого белка, что теоретически позволяет детектировать любой химерный вариант. Преимуществом метода является относительно невысокая стоимость исследования, быстрое обучение и внедрение в рабочий процесс. Однако на сегодняшний день ИГХ-детекция перестроек в опухолях лёгкого характеризуется низкой межлабораторной воспроизводимостью и сложностями в стандартизации теста [91]. К возможным причинам относятся особенности аффинности разных антител, а также низкий уровень экспрессии и нетипичная внутриклеточная локализация некоторых вариантов химерных белков [29].

Обратно-транскрипционная ПЦР (ОТ-ПЦР) является высокоспецифичным методом, предоставляющим наиболее подробную информацию о строении химерного транскрипта, его нуклеотидную последовательность, что представляется особенно актуальным в свете нескольких работ, показавших отличающийся показатель ответа на терапию при разных вариантах ALK-транслокаций [57; 58; 131]. Также преимуществом ОТ-ПЦР является экономность к объёму биологического образца и возможность использовать нетипичный материал (аспирационная жидкость,

опухолевый выпот, мокрота и т. п.) для исследования [24]. Недостатком, по мнению некоторых авторов, является требовательность к качеству интактной мРНК, плохо сохраняющаяся в архивных патоморфологических образцах (FFPE) [91].

Технология NanoString позволяет проводить прямое мультиплексное измерение уровня экспрессии транскрипционной активности генов. В основе метода лежит детекция меченных уникальным цветовым штрих-кодом зондов, специфичных к исследуемой мишени. Благодаря прямому измерению концентрации изучаемых транскриптов, метод избавлен от искажений, вносимых этапом амплификации при ПЦР-исследованиях. Группа энтузиастов уже используют данный метод для детекции РЛ-ассоциированных перестроек [26]. Главным недостатком технологии NanoString является её закрытость.

Метод секвенирования нового поколения (NGS), а точнее его таргетная модификация для РНК-секвенирования генов, замешанных в клинически значимых перестройках, позволяет идентифицировать практически любой химерный транскрипт [50]. Существенными недостатками NGS являются высокая стоимость, сложность выполнения и анализа данных, и обусловленная всем этим ограниченность распространения среди медицинских учреждений.

Исходя из вышесказанного, становится очевидной необходимость в разработке и оптимизации молекулярно-генетических методик для тестирования транслокаций рецепторных тирозинкиназ ALK, ROS1, RET с целью повсеместного выполнения предтерапевтического тестирования больных РЛ.

ГЛАВА II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 План работы и общее описание дизайна исследования

Данное диссертационное исследование направлено на оптимизацию молекулярно-генетического тестирования для отбора пациентов с раком лёгкого на терапию ингибиторами тирозинкиназ. Исследование было выполнено на базе научной лаборатории молекулярной онкологии НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова, одобрено локальным этическим комитетом (протокол № 20 от 23.11.2017).

В рамках исследования планировалось:

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

- отобрать из имеющейся коллекции образцов группу образцов кДНК (РНК), выделенных из опухолей лёгкого;
- разработать дизайн, оптимизировать и провести контроль работоспособности ПЦР-тестов;
- протестировать отобранную группу образцов с помощью метода оценки несбалансированной экспрессии концевых фрагментов перестраиваемых генов;
- протестировать те же образцы с помощью контрольной методики – вариант-специфической ПЦР;
- сопоставить результаты обеих методик, что позволит получить пороговое значение (ΔC_t) несбалансированной экспрессии для исследуемых генов, а также выявить дискордантные образцы;
- при возможности наиболее подозрительные дискордантные образцы и подвергнуть таргетному РНК-секвенированию нового поколения (NGS) с целью возможной идентификации ранее неизвестных перестроек.

2. Оценить встречаемость и спектр транслокаций ALK, ROS1, RET в опухолях лёгкого российских больных.
3. Определить оптимальный алгоритм молекулярно-генетического тестирования для индивидуализации лечения больных раком лёгкого на основании полученных данных

2.2 Материалы

Для апробации разрабатываемых тестов, а также для анализа спектра и встречаемости транслокаций ALK, ROS1, RET в аденокарциномах лёгких российских больных была использована коллекция образцов нуклеиновых кислот (ДНК и кДНК) из опухолей лёгкого, имеющаяся в распоряжении научной лаборатории молекулярной онкологии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России.

Было принято решение набрать 1000 последовательных образцов опухолей лёгкого. При отборе образцов использовались следующие критерии:

- гистологический тип опухоли – немелкоклеточный рак лёгкого, преимущественно аденокарциномы. (прим. в исходной имеющейся коллекции преобладали практически только одни аденокарциномы, на другие гистологические типы приходились единичные случаи, дополнительный патоморфологический пересмотр не производился);
- сохранность РНК (кДНК) в образце ($Ct\ SDNA \leq 36$, подробнее в разделе 2.3.2)

В ходе отбора образцов из-за низкой сохранности РНК были отсеяны 126 случаев, что составило 11,2 % неудач при получении кДНК.

Таким образом, в исследование были включены 1000 последовательных случаев немелкоклеточного рака лёгкого от российских больных. Для отобранных образцов имелась в наличии информация о результатах

тестирования мутаций EGFR, а также клинические данные, включающие в себя пол, возраст и статус курения пациента.

Распределение исследуемых пациентов по полу и возрасту представлено в Таблице 3. Как видно из таблицы, среди исследуемых пациентов с РЛ преобладают мужчины пожилого возраста (медиана 63 года).

Таблица 3 – Распределение исследуемых пациентов по полу и возрасту

Возраст	Мужчины	Женщины	Суммарно
Медиана (диапазон)	62 (20–86)	63 (28–82)	63 (20–86)
≤ 40	12 (38,7%)	19 (61,3%)	31 (100%)
41-50	60 (58,8%)	42 (41,2%)	102 (100%)
51-60	203 (73,3%)	74 (26,7%)	277 (100%)
61-70	299 (69,7%)	130 (30,3%)	429 (100%)
> 70	70 (52,2%)	64 (47,8%)	134 (100%)
Неизвестно	22 (81,5%)	5 (18,5%)	27 (100%)
Суммарно	666 (66,6%)	334 (33,4%)	1000 (100%)

В Таблице 4 представлено распределение исследуемых пациентов по статусу курения. Среди курящих пациентов также преобладают мужчины.

Таблица 4 – Статус курения исследуемых пациентов

Статус курения	Мужчины	Женщины	Суммарно
Курящие	284 (93,4%)	20 (6,6%)	304 (100%)
Некурящие	140 (41,7%)	196 (58,3%)	336 (100%)
Неизвестно	242 (67,2%)	118 (32,8%)	360 (100%)
Суммарно	666 (66,6%)	334 (33,4%)	1000 (100%)

2.3 Методы исследования

2.3.1 Выделение нуклеиновых кислот из парафиновых срезов

Материалом для генетического анализа транслокаций рецепторных тирозинкиназ является РНК. Обусловлено это тем, что мРНК-транскрипт обладает меньшей вариабельностью и протяжённостью, в связи с отсутствием интронов. Выделение мРНК наиболее эффективно из свежемороженой опухолевой ткани. К сожалению, в большинстве случаев у пациентов отсутствует возможность сохранить образцы в криоусловиях. Однако нуклеиновые кислоты могут быть получены и из архивных образцов тканей, заключённых в парафиновые блоки. Нуклеиновые кислоты, полученные из архивного опухолевого материала, в значительной степени фрагментированы, но всё же пригодны для анализа [34; 56].

Для надёжной молекулярной диагностики крайне важно правильное проведение микродиссекции опухолевого материала опытным патоморфологом под контролем световой микроскопии. Получаемый парафиновый срез должен содержать максимальное возможное число опухолевых клеток, если объём опухоли значительно меньше окружающих здоровых тканей, то необходимо указать процент опухолевых клеток для помощи в дальнейшей интерпретации результатов.

Полученные парафиновые срезы образцов толщиной 15 мкм тщательно депарафинизировались в двух сменах ксилола объёмом 500 мкл по 5 минут. Затем образцы промывались в двух сменах 96% этанола по 2 минуты. После тщательного удаления и испарения остатков этанола к образцам добавлялся лизирующий буфер (10 ммоль Tris-HCl (pH=8.0), 0,1 ммоль ЭДТА; pH=8,0, 2% додецилсульфат натрия) и протеиназа К (20 мг/мл; AMRESCO, USA). Далее образцы подвергались инкубации в термостате при 60 °С в течение 8–16 часов до полного лизиса тканей. После процесса лизирования образцы очищались фенол-хлороформным методом от оставшихся в них органических примесей (сахара, липиды, переваренные белки, компоненты растворов ферментативных реакций). Для этого к лизату клеток добавлялся однократный

объём реагента TRIzol (Invitrogen) и 0,3 объёма смеси хлороформ-изоамиловый спирт (24:1). После интенсивного встряхивания пробирок в течение 10 минут пробы центрифугировались при 15 000 об/мин в течение 20 минут. В результате центрифугирования смесь разделялась на три фракции по плотности: верхнюю – более лёгкую, содержащую водный раствор ДНК; нижнюю – более плотную, состоящую из фенола и хлороформа с растворёнными в них органическими примесями; и интерфазу, которая состоит из денатурированных белков.

Далее осторожно, не захватывая интерфазу, в чистые пробирки отбиралась надосадочная ДНК-содержащая жидкость, в которые добавлялся 0,1 объёма 3М ацетата Na (рН=4.0) и 0,3 объёма хлороформа. После интенсивного встряхивания образцы ещё раз центрифугировались при 15000 об/мин в течение 20 минут. Полученный раствор помимо нуклеиновых кислот содержал ряд различных химических реактивов, которые были использованы для выделения ДНК/РНК. Очистка производилась путём преципитации (осаждения) нуклеиновых кислот с использованием спирта в присутствии солей. Для этого супернатант отбирался в чистые пробирки. После добавления гликогена (20 мг/мл) и 1 объёма холодного изопропанола образцы инкубировались при -20 °С не менее 3 часов. Затем пробы центрифугировались (в последний раз) при 15000 об/мин в течение 30 минут. Изопропанол удалялся, а полученный осадок однократно промывался в 70% этаноле в течение 10 минут. После тщательного удаления этанола осадок подсушивался в термостате при 40 °С, а затем растворялся в 30 мкл стерильной воды при 65 °С в течение 10 минут. В итоге получался раствор нуклеиновых кислот, содержащий ДНК и РНК.

Реакция обратной транскрипции

Молекулы РНК со временем деградирует в результате воздействия РНКаз, а хранение под слоем ингибитора не представляется практичным. Поэтому для её сохранения РНК переводят в форму комплементарной ДНК (кДНК) с помощью реакции обратной транскрипции. Важно заметить, что для

поиска транслокаций очень важно эффективное прохождение данной реакции. РНК, выделенная из материала, фиксированного в парафине, как правило, сильно фрагментирована, а полученные образцы зачастую содержат примеси, препятствующие прохождению обратной транскрипции (ОТ). Эти два фактора определяют основные направления оптимизации, использованные при разработке тестов в данной работе:

1. Увеличение концентрации случайных декамеров до 1нМ и использование ген-специфических праймеров в реакции обратной транскрипции приводит к увеличению количества точек инициации реакции и большему количеству синтезированных фрагментов кДНК [87; 147]. Таким образом, вероятность использования в реакции даже коротких фрагментов РНК возрастает. В случае интактной РНК, напротив, реакция, стартовавшая в одной единственной точке, может привести к синтезу молекулы кДНК, имеющей длину целого транскрипта.

2. Использование ген-специфичных праймеров также приводит к увеличению инициации обратной транскрипции в заранее определённых местах «интереса». Последовательности подобранных ген-специфических праймеров представлены в Таблице 5.

3. Уменьшение размера ПЦР-фрагментов также способствует тому, что большее количество коротких молекул кДНК задействуется в реакции. Мы стремились, чтобы размер исследуемых фрагментов был не более 100 п.о.

Таблица 5 – Ген-специфичные праймеры для обратной транскрипции

Фрагмент	Название	Последовательность 5`-3`
SDHA	SDHA6-R_out	CACTCCCCGTTCTCCATCA
ALK-5' (ex9-10)	ALKex10-R_out	CACGATGGCTCTGGATCCTT
ALK-3' (ex22-23)	ALKex23-R_out	AGCTCCAGCAGGATGAACC
ALK variants (ex20)	ALKex20-R_out	TTGCTCAGCTTGTACTCAGG
ROS1-5' (ex17-18)	ROS1ex18-R_out	CAGTGCATTCTGGGAAATTC

ROS1-3' (ex38-39)	ROS1ex38-R_out	ATATCTACACACAGGTCTACA
ROS1 variants (ex32)	ROS1ex32-R_out	GCTTTCTCCCACTGTATTGA
ROS1 variants (ex34)	ROS1ex34-R_out	AGTGGGATTGTAACAACCAGA
ROS1 variants (ex35)	ROS1ex35-R_out	CTTTGTCTTCGTTTATAAGCAC
RET-5' (ex6-7)	RETex7R_out	CCACTGAATGCCTGGCAGT
RET-3' (ex13-14)	RETex14R_out	CCCACCTTTGCGGCTCTCG
RET variants (ex8)	RETex8-R_out	CGCCACACTCCTCACACTC
RET variants (ex11)	RETex11-R_out	AGCAGCACCGAGACGATGA
RET variants (ex12)	RETex12-R_out	TCCAAATTCGCCTTCTCCTA

В результате реализации этих подходов наш протокол постановки обратной транскрипции выглядел следующим образом:

1) Сначала в пробирку с 5 мкл РНК, полученной на тапе выделения, добавлялись 2 мкл праймеров в концентрации 1000 pM (случайные декамеры и ген-специфические праймеры) и мкл dNTPmix (по 20 мкмоль каждого из дезоксинуклеотид-трифосфатов: дАТФ, дЦТФ, дГТФ, дТТФ). Всё перемешивалось и инкубировалось 3 минуты при 70 °С (денатурация РНК), 3 минуты при 60 °С (отжиг праймеров) и 2 минуты при 0 °С (охлаждение перед добавлением в реакцию ферментов).

2) Затем в пробирку добавлялась заранее подготовленная смесь, содержащая ОТ-буфер, ингибитор РНКаз (Thermo Scientific RiboLock RNase Inhibitor, 0,5 мкл, 20МЕ), обратную транскриптазу (Thermo Scientific RevertAid Reverse Transcriptase, 1 мкл, 200МЕ) и воду, таким образом, что общий объём реакции составлял 20 мкл.

3) Для реакции обратной транскрипции использовался следующий температурный режим:

- 20 °С - 10 мин (отжиг случайных праймеров)
- 38 °С - 20 мин (элонгация)
- 42 °С - 10 мин (элонгация CG-богатых участков)

- 45°C - 10 мин (элонгация CG-богатых участков)
- 95 °C - 5 мин (инактивация фермента)
- 10 °C - хранение

4) Полученная смесь разводилась водой в 2 раза, т. к. имеются сведения о негативном влиянии компонентов реакции ОТ на протекание последующей ПЦР, которые, в целом, подтверждаются нашим опытом. Готовые образцы хранились при – 20 °C.

2.3.2 Разработка тестов для детекции транслокаций

Важной особенностью используемого подхода к тестированию транслокаций является комбинированное использование двух методик:

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

Подбор праймеров

Последовательности праймеров и меток подбирались самостоятельно с помощью геномного браузера Ensembl (www.ensembl.org/), созданного EBI, European Bioinformatics Institute and WTSI, Wellcome Trust Sanger Institute, программы для подбора праймеров Gene Runner (<http://generunner.net/>, Copyright © 1992-2021 Frank Vuquicchio) и инструментария облачного сервиса для молекулярной биологии Benchling (<https://benchling.com/>, Copyright © 2021 Benchling).

При подборе олигонуклеотидов использовался ряд критериев: температура плавления около 60 °C для праймеров и 72 °C для меток, а также небольшая длина ПЦР-продукта около 100 п.о. Выбор небольшой длины ПЦР-продукта обусловлен фрагментацией нуклеиновых кислот в парафинированных образцах.

Оценка эффективности экстракции РНК (кДНК) производилась путём постановки ПЦР-теста на уровень экспрессии гена SDHA. Выбор гена обусловлен тем, что SDHA входит в так называемую группу генов «домашнего хозяйства». Это гены, необходимые повсеместно для поддержания важнейших жизненных функций клетки на всех стадиях жизненного цикла, и, следовательно, они экспрессируются во всех тканях на относительно постоянном уровне. Ген SDHA (Succinate Dehydrogenase Complex, Subunit A) кодирует фермент сукцинатдегидрогеназу, участвующую в цикле трикарбоновых кислот.

Образцы, демонстрирующие значение $Ct\ SDHA \leq 36$ считались успешно выделенными и использовались в дальнейшем. Последовательность используемых праймеров для оценки экспрессии SDHA представлена в Таблице 6.

Праймеры для оценки несбалансированной экспрессии были подобраны по определённому принципу: одна пара праймеров с 5'-конца транскрипта должна располагаться до киназного домена, а другая с 3'-конца в киназном домене исследуемого гена. Для исследования ALK-транслокаций были также дополнительно подобраны праймеры для амплификации фрагмента, находящегося в основной точке разрыва – стык 19 и 20 экзонов.

Также праймеры для измерения экспрессии, должны амплифицировать только РНК для этого они находятся на стыке экзонов, либо в экзонах, разделённых большими интронами.

Для детекции искомого фрагмента в ходе ПЦР и увеличение специфичности были подобраны флуоресцентные метки комплементарные к каждому из фрагментов. С целью повышения удобства при постановке и анализе результатов ПЦР было принято решение мультиплексировать реакцию — амплифицировать оба фрагмента (5' и 3') в одной пробирке, для

чего использовалась следующая комбинация пар флуорофор-гаситель: FAM/BHQ-1 и R6G/BHQ-2.

Последовательность олигонуклеотидов для детекции несбалансированной экспрессии концевых фрагментов генов РТК представлены ниже в Таблице 6.

Таблица 6 – Праймеры и метки для оценки несбалансированной экспрессии концевых фрагментов генов ALK, ROS1, RET и уровня экспрессии гена-рефери SDHA

Фрагмент	Название	Последовательность 5`-3`	Длина
SDHA	SDHAex5-F	CCACTCGCTATTGCACACC	78 п.о.
	SDHAex6-R	TCCAAGGCAA[LNA-A]ATACTCCAC	
	SDHAex5/6-P	[R6G]AAGGTCTCTGCGATATGATACC[BHQ2]	
ALK-5' (ex9-10)	ALKex9-F	GATGGTGTTCCTCTCCTC	63 п.о.
	ALKex10-R	CCCCACCATGCGACCATC	
	ALKex9/10-P	[FAM]ATGTGTCTGACAGGTTCTGGCTG[BHQ1]	
ALK разрыв 19/20	ALKex19-F	TCTCCGGCATCATGATTGTG	72 п.о.
	ALKex20-R	GGGCTCTGCAGCTCCATCT	
	ALKex19/20-P	[FAM]ATGGCTTGCAGCTCCTGGTGCT[BHQ1]	
ALK-3' (ex22-23)	ALKex22-F	GATTCCTCATGGAAGCCCT	66 п.о.
	ALKex23-R	CCCAATGCAGCGAACAATGT	
	ALKex22/23-P	[R6G]ATCATCAGCAAATTCAACCACCAG[BHQ2]	
ROS1-5' (ex17-18)	ROS1ex17-F	TGTACACAGCTGTTCTTCGG	66 п.о.
	ROS1ex18-R	TCCAGGCTGCAAATTCTGTG	
	ROS1ex17/18-P	[FAM]ACAGAGCACTGGGGATACCACC[BHQ1]	
ROS1-3' (ex38-39)	ROS1ex38-F	GAGACCTTCTACTTATTTGCG	75 п.о.
	ROS1ex39-R	GTCAACCAAGGTGAGTAAAGG	
	ROS1ex38/39-P	[R6G]AGCCCGGATGGCAACGTTTTATG[BHQ2]	

RET-5' (ex6-7)	RETex6-F	AGGAGGGCTCGCCGATTTG	70 п.о.
	RETex7-R	TGATGCCACTGAATGCCTG	
	RETex6/7-P	[FAM]CAGTTTTCCACACAGACTTTCCC[BHQ1]	
RET-3' (ex13-14)	RETex13-F	TCATCAAATTGTATGGGGCCT	67 п.о.
	RETex14-R	TATTTGGCGTACTCCACGATG	
	RETex13/14-P	[R6G]AGCCAGGATGGCCCGCTCCTC[BHQ2]	

2.3.3 Вариант-специфическая ПЦР

Для верификации конкретного варианта транслокации ALK, ROS1, RET были подобраны пары праймеров и метки, специфичные к основным химерным транскриптам, встречаемым при раке лёгкого:

ALK-транслокация

- EML4ex13/ALKex20 (V.1)
- EML4ex20/ALKex20 (V.2)
- EML4ex6/ALKex20 (V.3)
- EML4ex14/del12ALKex20 (V.4)
- EML4ex2/ALKex20 (V.5)
- EML4ex13/ALKex20 (V.6)
- EML4ex14/del12ALKex20 (V.7)
- EML4ex15/ALKex20 (V.8)
- EML4ex18/ALKex20 (V.9)
- KIF5Bex24/ALKex20 (V.10)
- KIF5Bex17/ALKex20 (V.11)
- KIF5Bex15/ALKex20 (V.12)
- TFGex3/ALKex20 (V.13)
- KLC1ex9/ALKex20 (V.14)
- SQSTM1ex5/ALKex20
- DCTN1ex26/ALKex20
- TPRex15/ALKex20
- SEC31Aex21/ALKex20
- HIP1ex21/ALKex20
- HIP1ex28/ALKex20
- SOCS5ex2/ALKex20

ROS1-транслокация

- CD74ex6/ROS1ex32
- CD74ex6/ROS1ex34
- SDC4ex2/ROS1ex32
- SDC4ex2/ROS1ex34
- SDC4ex4/ROS1ex34
- SDC4ex4/ROS1ex32
- SLC34A2ex4/ROS1ex32
- SLC34A2ex4/ROS1ex34
- SLC34A2ex13/ROS1ex34
- SLC34A2ex13/ROS1ex32
- EZRex10/ROS1ex32
- EZRex10/ROS1ex34
- FIGex7/ROS1ex35
- TPM3ex8/ROS1ex35
- LRIGex16/ROS1ex35

RET-транслокация

- KIF5Bex24/RETex7
- KIF5Bex24/RETex8
- KIF5Bex15/RETex11
- KIF5Bex24/RETex11
- KIF5Bex15/RETex12
- KIF5Bex16/RETex12
- KIF5Bex22/RETex12
- KIF5Bex23/RETex12
- KIF5Bex24/RETex12
- CCDC6ex1/RETex12
- NCOA4ex7/RETex12

При подборе праймеров учитывались особенности химерных РНК-транскриптов. Химерные транскрипты не присутствуют в норме, т. к. состоит из частей разных генов, входящих в перестройку. Например, наиболее часто встречаемой в РЛ парой компаньонов является EML4/ALK.

Обнаружение амплификации такого РНК-транскрипта подтверждает наличие определённого варианта транслокации в опухоли. Так как наиболее консервативным участником ALK-транслокации является экзон 20 гена ALK, то обратный праймер ALKex20-R и флуоресцентная метка ALKex20-P подобраны к нему. Таким образом, данная пара олигонуклеотидов использовались в большинстве реакций для идентификации вариантов ALK-транслокации. Аналогичный подход также применялся при подборе праймеров к перестройкам генов ROS1 и RET. Нуклеотидные последовательности праймеров и меток для детекции изучаемых перестроек представлены в Приложениях А, Б, В.

2.3.4 Проверка специфичности подобранных праймеров

Специфичность подобранных праймеров, т.е. какие именно продукты получают в ходе ПЦР, проверялась с помощью веб-сервиса Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>), разработанного NCBI (National Center for Biotechnological Information, USA). Алгоритм BLAST производит поиск комплементарной последовательности к заданным праймерам или меткам в геномной ДНК или РНК, учитывая при этом неспецифические места связывания праймеров и меток, а также демонстрируя при этом возможные неспецифичные продукты реакции.

В качестве примера на Рисунке 6 представлен фрагмент отчёта Primer-BLAST'a по проверке специфичности праймеров к гену SDHA. Из отчёта видно, что подобранные праймеры комплементарны к искомому продукту – фрагменту РНК-транскрипта гена SDHA длиной 78 п.о., что соответствует поставленной задаче.

Таким же образом были проверены все используемые в работе праймеры.

NIH U.S. National Library of Medicine NCB I National Center for Biotechnology Information Sign in to NCBI

Primer-BLAST >> JOB ID:fXeig0XgSEhvdUzXxN2QSUIZ3MIG3xuCQ

Primer-BLAST Results

Input PCR template none
 Specificity of primers Target templates were found in selected database: Refseq mRNA (Organism limited to Homo sapiens)
 Other reports > Search Summary

Detailed primer reports

Primer pair 1

	Sequence (5'→3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	CCACTCGCTATTGCACACC	19	58.91	57.89	4.00	0.00
Reverse primer	TCCAAGGCAAAATACTCCAC	20	55.63	45.00	2.00	0.00

Products on target templates
 >NM_004168.4 Homo sapiens succinate dehydrogenase complex flavoprotein subunit A (SDHA), transcript variant 1, mRNA

product length = 78
 Forward primer 1 CCACTCGCTATTGCACACC 19
 Template 627 645
 Reverse primer 1 TCCAAGGCAAAATACTCCAC 20
 Template 704 685

Рисунок 6 – Отчёт Primer-BLAST после проверки пары праймеров SDHA на специфичность

2.3.5 Контроль работоспособности разработанных тестов

Контроль работоспособности производился с помощью контрольных образцов известного генотипа. Для этой цели в лаборатории имеются позитивные контроли распространённых вариантов транслокаций, а также негативные образцы кДНК (РНК), выделенные из неопухолевой ткани.

Для дополнительной проверки специфичности тестов позитивные образцы подверглись гель-электрофорезу для подтверждения соответствия наблюдаемой длины ПЦР-продукта прогнозируемой на этапе разработки дизайна теста. Случаи, вызывающие сомнение, секвенировались при помощи метода Сэнгера, что позволяло верифицировать результат по нуклеотидной последовательности транскрипта.

Для отслеживания возможного загрязнения (контаминации) нуклеиновыми кислотами компонентов реакции использовался контроль NTC (No Template Control). NTC – это реакция ПЦР без добавления ДНК-матрицы (образца), которая бы могла амплифицироваться. При отсутствии контаминации в пробирке NTC не наблюдается S-образной кривой амплификации.

2.3.6 Протокол проведения ПЦР

ПЦР в режиме реального времени проводилась на приборе «CFX96 Real-Time PCR Detection System» (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). ПЦР-амплификация происходит в объеме 20 мкл. В состав реакционной смеси входит: 1МЕ Taq М-полимеразы «Intifisa» (Алкор Био, г. Санкт-Петербург), 1х ПЦР буфер (Applied Biosystems GeneAmp, Thermo Fisher Scientific, Austin, TX), 50 нг образца кДНК, 1,5-3,0 миллимоль MgCl₂, по 200 мкмоль каждого из дезоксинуклеотидтрифосфатов (дАТФ, дЦТФ, дГТФ, дТТФ) и по 100 нмоль каждого необходимого в реакции олигонуклеотида (прямого и обратного праймера и метки).

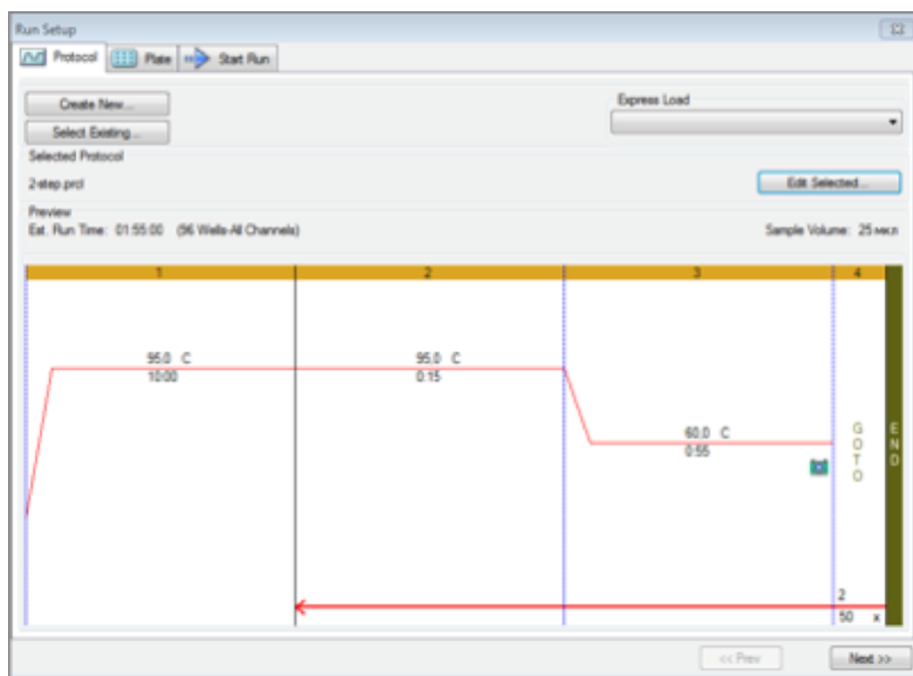


Рисунок 7 - ПЦР протокол «2-step»

При выполнении ПЦР использовался протокол «2-step», представленный на Рисунке 7. Реакция начиналась с фазы активации Taq-полимеразы (95 °C в течение 10 минут). Далее выполнялись 50 циклов, состоящие из двух шагов: шага денатурации (95 °C 15 секунд) и шага, совмещающего отжиг праймеров и элонгацию цепи (58 °C 55 секунд). После выполнения каждого цикла происходило считывание уровня флуоресценции.

Оптимизация условий ПЦР – подбор концентрации MgCl₂ и температуры отжига праймеров – производилась эмпирически с целью увеличения специфичности и исключения ошибочных результатов.

2.3.7 Методика оценки несбалансированной экспрессии концевых фрагментов перестраиваемого гена

Данная методика основана на выявлении дисбаланса экспрессии 5'- и 3'-концевых фрагментов гена рецепторной тирозинкиназы. Причиной несбалансированной экспрессии перестроенного гена является сама транслокация, при которой 3'-концевая порция гена оказывается в составе химерного транскрипта и, таким образом, подпадает под контроль «чужого» промотора гена компаньона. Преимуществом подобного подхода является не только его простота, но и способность выявлять все активирующие транслокации вне зависимости от конкретного вовлечённого гена-партнёра.

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

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;

- $Ct_{3'[\text{gene}]}$ – величина порогового цикла 3'-фрагмента исследуемого гена.

При перестройке гена помимо несбалансированной экспрессии происходит также его активация, что отображается в виде его выраженной гиперэкспрессии. При оценке уровня экспрессии исследуемого гена в образце сравнивают его экспрессию с экспрессией гена-рефери, в нашем случае это SDHA. Для этого в Формулу 1 на первое место (вычитаемого) ставится пороговое значение (Ct) гена-рефери SDHA.

Поскольку некоторые образцы могут совсем не экспрессировать изучаемые гены или их концевые фрагменты, то для вычисления показателя ΔCt в таких случаях этим фрагментам присваивалось крайнее значение Ct равное 38.

2.3.8 Учёт результатов ПЦР

Как было написано в предыдущем разделе детекция транслокаций производилась путём сравнения экспрессии 5'- и 3'-концевых фрагментов РНК-транскрипта исследуемого гена (Формула 1). 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 (ΔCt) преодолевала пороговое значение, а 3'-фрагмент исследуемого гена экспрессировался, как правило, раньше или на уровне гена-рефери SDHA. Подробнее о нахождении порогового значения ΔCt будет рассказано в разделе 3.2.

К негативным случаям относились образцы, у которых не наблюдалась несбалансированная экспрессия 3'-фрагмента или вообще отсутствовала экспрессия концевых фрагментов исследуемого гена.

Примеры ПЦР-картин позитивных и негативных случаев

Далее на Рисунках 8–11 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.

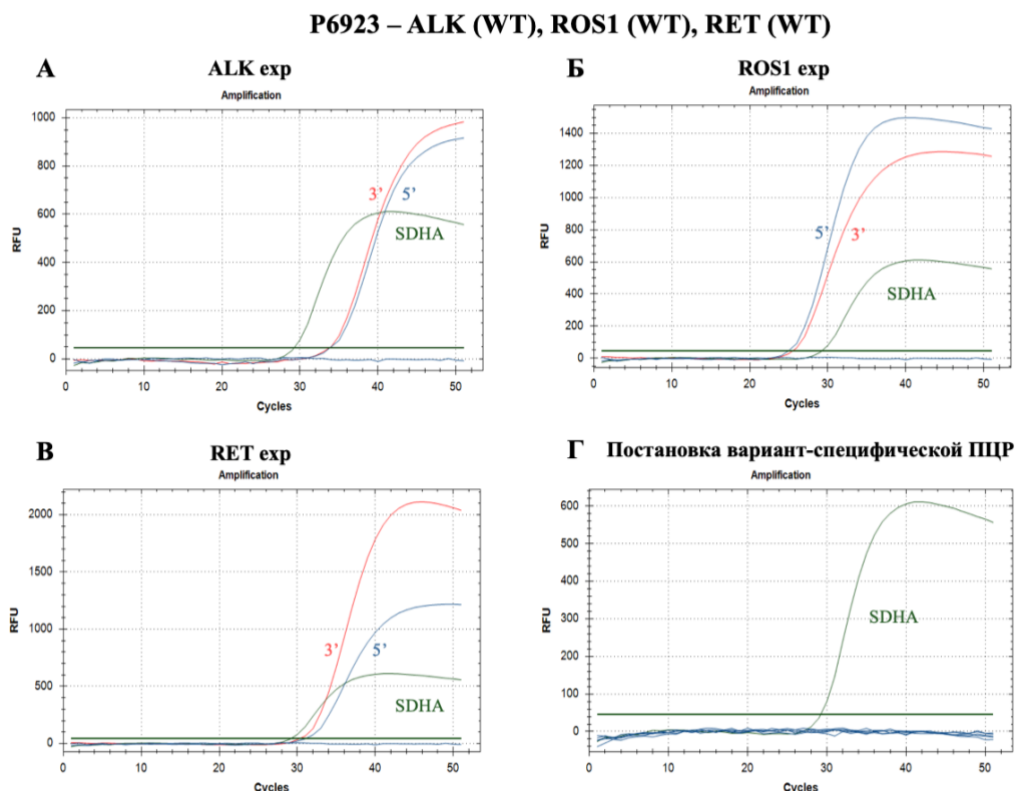


Рисунок 8 – Пример негативного образца P6923

На Рисунке 8 представлен негативный образец P6923. На изображении 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.

Примеры позитивных образцов с выраженной несбалансированной экспрессией представлены на Рисунках 9–11. Рассмотрим их подробнее.

P6827 – EML4ex13/ALKex20 (V.1)

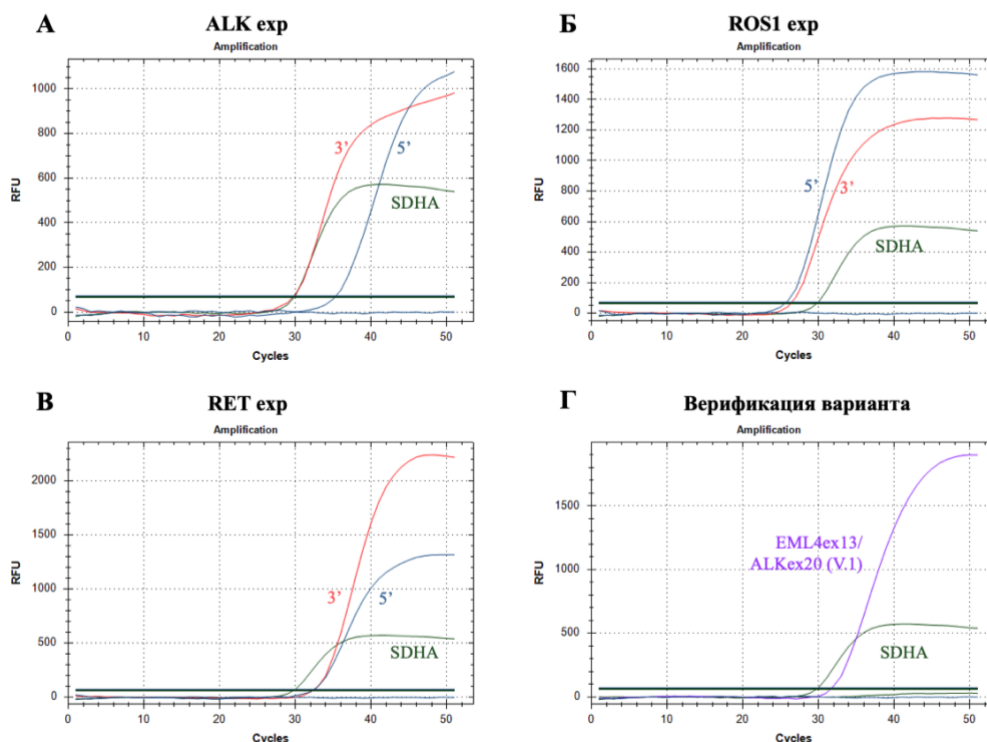


Рисунок 9 – Пример ALK-позитивного образца P6827

Для образца P6827 (рис. 9) величина порогового цикла SDHA (Ct) составляет 29,8. В этом образце наблюдается гиперэкспрессия 3'фрагмента ALK, его кривая находится очень близко к SDHA и преодолевает threshold на том же цикле, её Ct составляет 29,6. Фрагмент 5' ALK экспрессируется значительно позже, его Ct составляет 35,3. Разница в экспрессии (ΔCt) двух порций гена ALK составляет 5,7, что говорит нам о высоко выраженной несбалансированной экспрессии. Постановка ПЦР на известные варианты ALK-транслокации позволила верифицировать обнаруженную перестройку как EML4ex13/ALKex20 (V.1).

P7619 – SLC34A2ex13/ROS1ex32

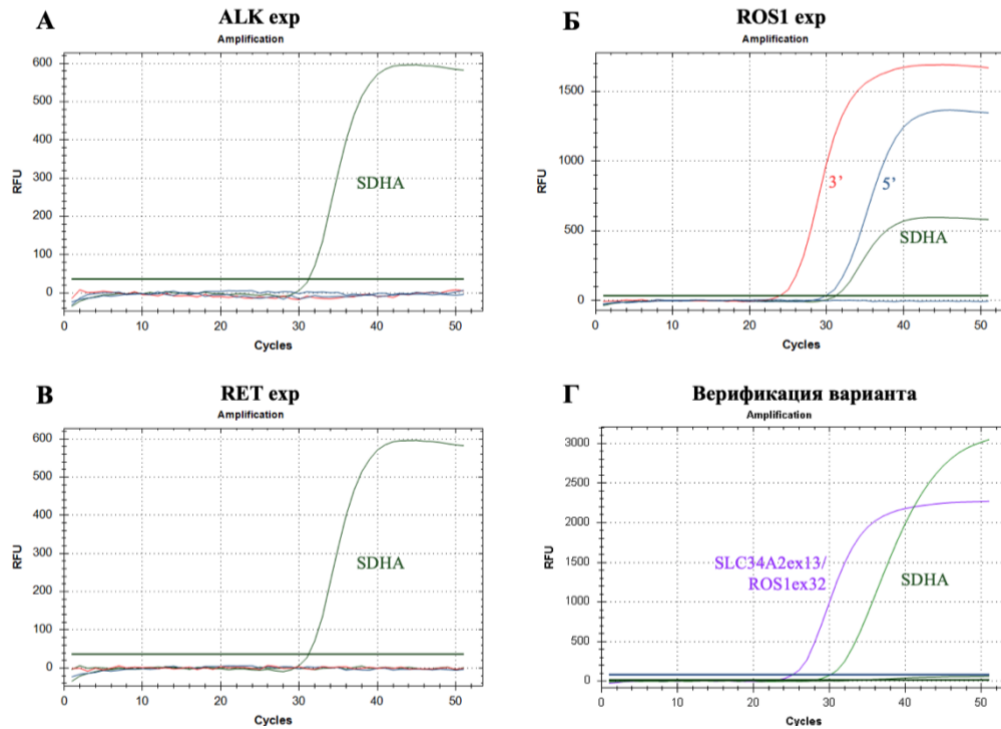


Рисунок 10 – Пример ROS1-позитивного образца P7619

Этот ROS1-позитивный образец P7619 (Рисунок 10) не входил в исследуемую выборку и был представлен тут, только в качестве примера. Примечателен он тем, что в нём полностью отсутствует экспрессия генов ALK, RET, в то время как ген ROS1 гиперэкспрессирован и демонстрирует крайне выраженную несбалансированность ($\Delta Ct = 5,9$). Картина столь выраженной несбалансированной экспрессии является весьма нетипичной для гена ROS1. Перестройку удалось идентифицировать как SLC34A2ex13/ROS1ex32.

Образец P8758 (Рисунок 11) несёт транслокацию KIF5Bex15/RETex12, что также видно по его несбалансированной экспрессии ($\Delta Ct = 6,4$).

P8758 – KIF5Bex15/RETex12

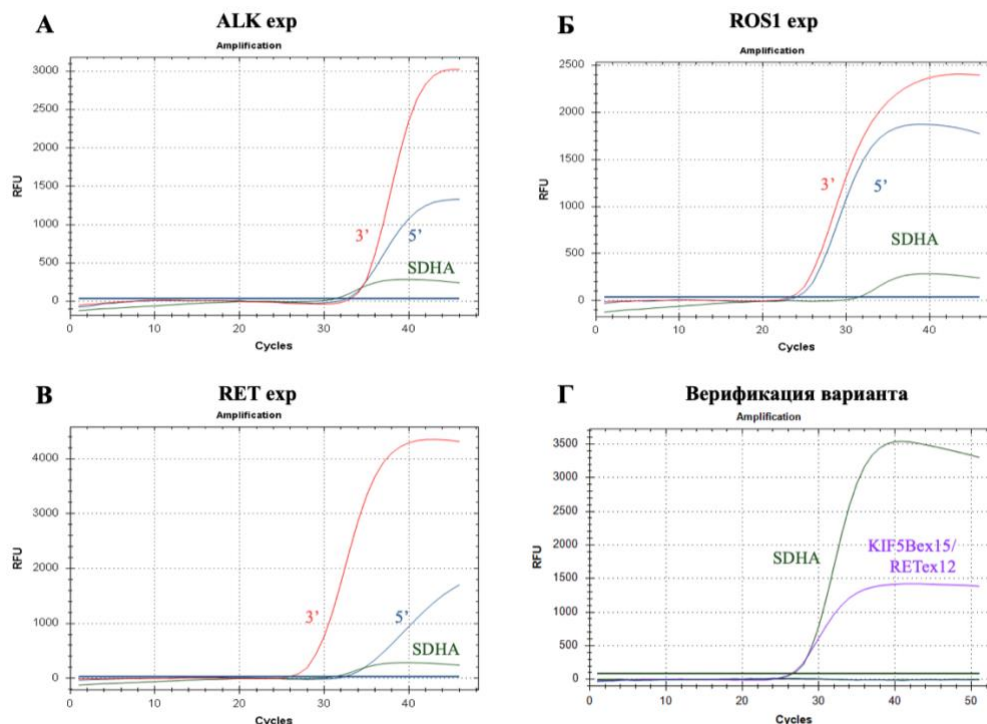


Рисунок 11 – Пример RET-позитивного образца P8758

Величины пороговых циклов, а также показатели разницы в экспрессии концевых фрагментов (Ct) исследуемых генов в образцах, приведённых в качестве примеров, представлены в Таблице 7.

Таблица 7 – Пример вычисления уровня несбалансированной экспрессии концевых фрагментов генов при перестройке

№	SDHA (Ct)	ALK (Ct)			ROS1 (Ct)			RET (Ct)			Результат
		5'	3'	Δ Ct	5'	3'	Δ Ct	5'	3'	Δ Ct	
P6923	25,8	33,2	33,5	-0,3	24,9	25,5	-0,6	31,1	30,4	0,7	WT
P6827	29,8	35,3	29,6	5,7	25,6	26,3	-0,7	32,4	32,3	0,1	EML4ex13/ALKex20
P7619	31,2	-	-	-	29,9	24,0	5,9	-	-	-	SLC34A2ex13/ROS1ex32
P8758	31,4	32,8	33,2	-0,4	24,0	23,2	0,8	32,5	26,1	6,4	KIF5Bex15/RETex12

2.3.9 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.

Используемая панелью TruSight RNA Fusion метод создания библиотеки основан на простом химическом захвате целевых областей из общего массива выделенной РНК. Подготовка библиотек выполнялась по рекомендуемому производителем протоколу и включала следующие этапы:

- фрагментация РНК
- синтез первой нити кДНК
- синтез второй нити кДНК
- аденилирование 3'-концов
- лигирование адаптеров
- первая ПЦР-амплификация
- гибридизация зондов
- захват гибридизовавшихся зондов
- вторая гибридизация зондов
- второй захват гибридизовавшихся зондов
- очистка захваченной библиотеки
- вторая ПЦР-амплификация
- очистка амплифицированной обогащённой библиотеки

По окончании всех этапов целевая библиотека готова к генерации кластеров и дальнейшему секвенированию. Готовая библиотека денатурировалась и помещалась в картридж для секвенирования в прибор MiSeq (Illumina).

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 [129].

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.

ГЛАВА III. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1 Результаты тестирования

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 ($\Delta C > 3$) 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 (подробнее в главе IV).

3.2 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 ΔCt . Для вычисления этого порогового значения ΔCt 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 ΔCt , которая представлена на Рисунке 12. Высота и направление столбиков соответствует значению показателя ΔCt , красным цветом обозначены подтверждённые ALK-позитивные случаи, зелёным — негативные образцы.

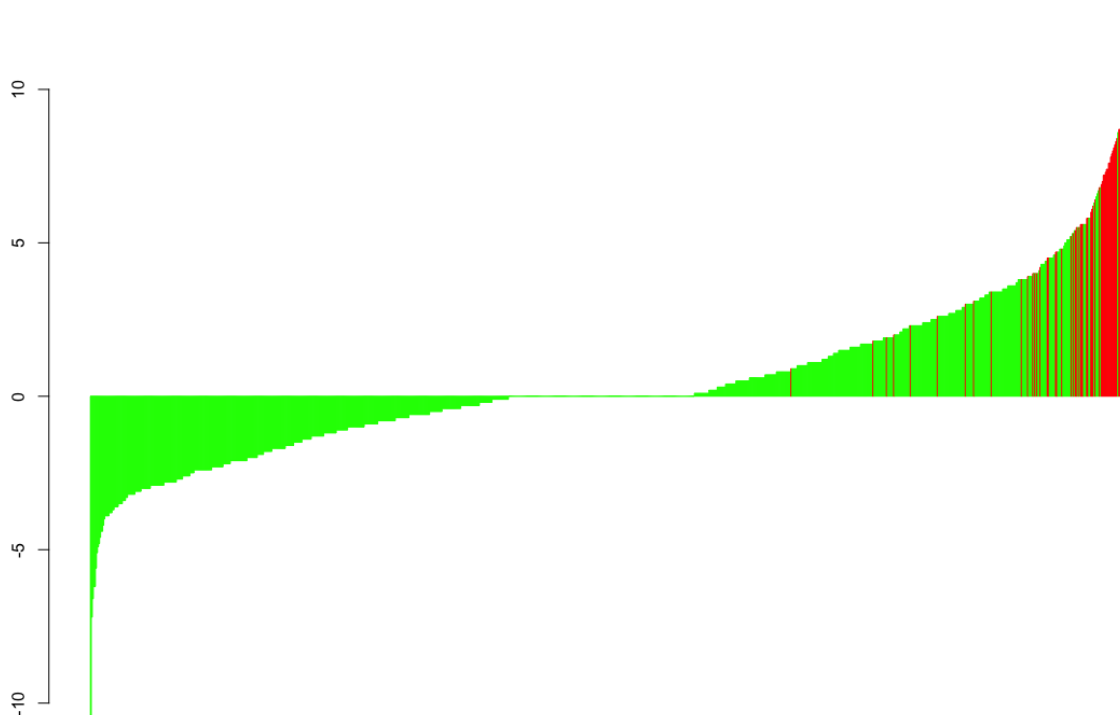


Рисунок 12 – Диаграмма распределения образцов по уровню ΔCt ALK

Как видно из диаграммы 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 $\Delta Ct (19/20-3')$, что представлено ниже на Рисунке 13.

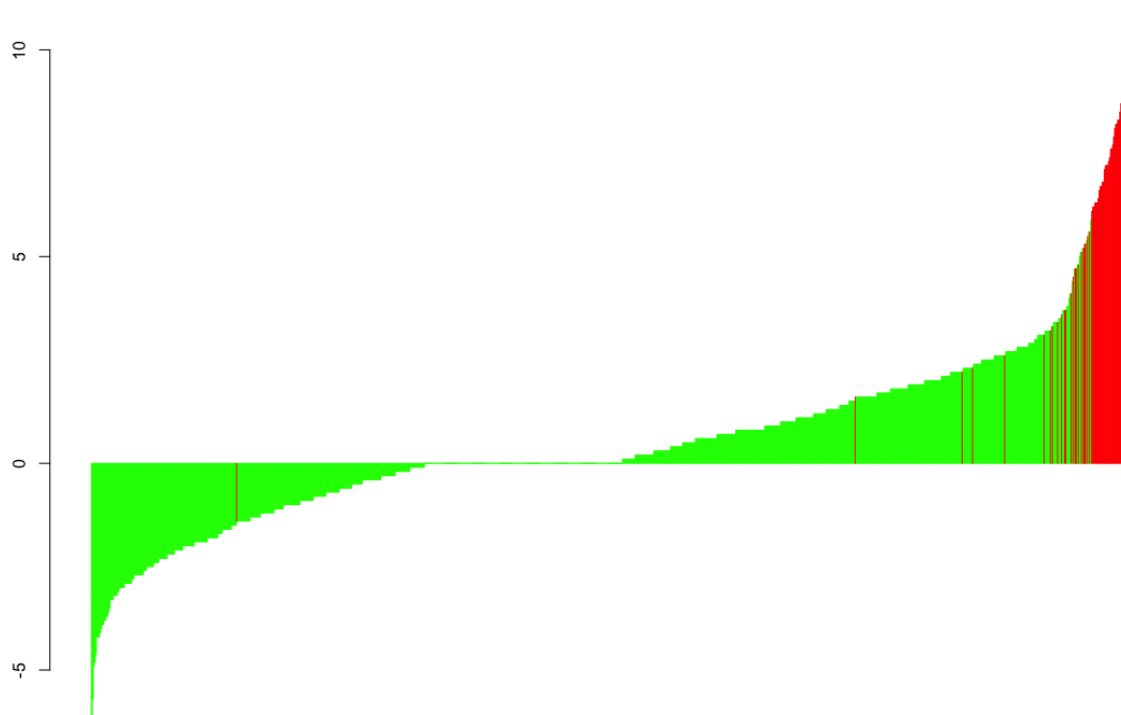


Рисунок 13 – Диаграмма распределения образцов по уровню $\Delta Ct (19/20-3')$ ALK

Таким образом, при использовании данного подхода позитивные и негативные образцы кластеризуются значительно лучше. Так, при пороговом значении $\Delta Ct (19/20-3') \geq 3$ 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 ΔCt ROS1 выглядела следующим образом (рис. 14). Высота и направление

столбиков соответствует значению показателя ΔC_t , красным цветом обозначены подтверждённые ROS1-положительные случаи, зелёным – негативные образцы, серым – образцы, непроверенные на наличие химерных транскриптов.

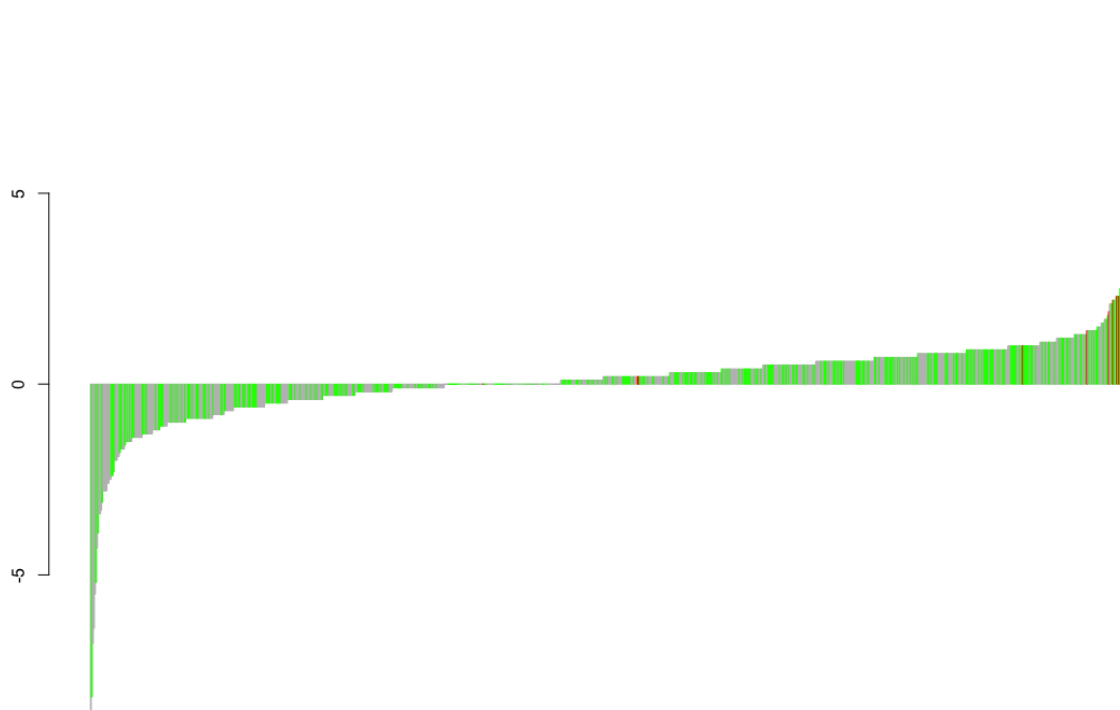


Рисунок 14 – Диаграмма распределения образцов по уровню ΔC_t ROS1

На диаграмме не наблюдается кластеризации позитивных образцов, что не позволяет определить порогового значения (ΔC_t) 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 хорошо это видно на диаграмме распределения образцов по уровню ΔCt RET, которая представлена на Рисунке 15.



Рисунок 145 – Диаграмма распределения образцов по уровню ΔCt RET

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

3.3 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 (ΔCt) или гиперэкспрессия исследуемого гена относительно гена-рефери (ΔCt 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 8 представлена информация по отобранным образцам и результаты проведённого NGS-исследования. Критерии, по которым осуществлялся отбор каждого конкретного образца, отмечены красным цветом.

Таблица 8 – 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. Более подробно данные перестройки будут рассматриваться в главе IV.

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.

3.4 Встречаемость и спектр обнаруженных транслокаций,

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 16.

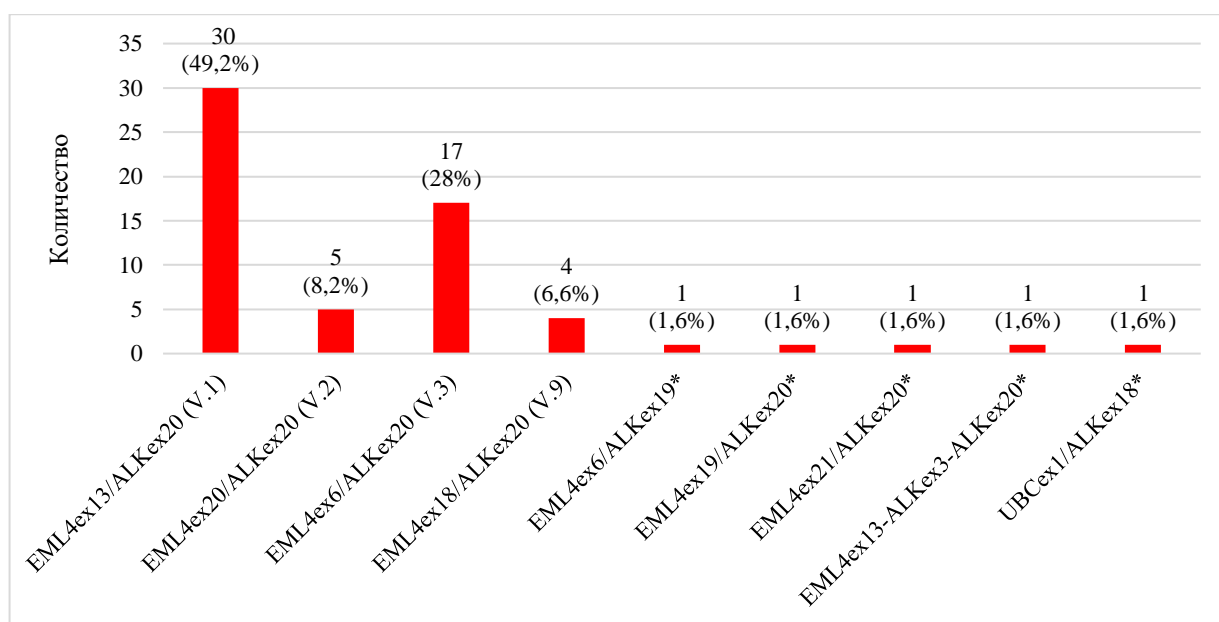


Рисунок 16 – Спектр выявленных вариантов ALK-транслокации
* - ранее не описанные варианты

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 9.

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). Соотношение ALK-позитивных и негативных случаев в разных возрастных группах представлено на Рисунке 17.

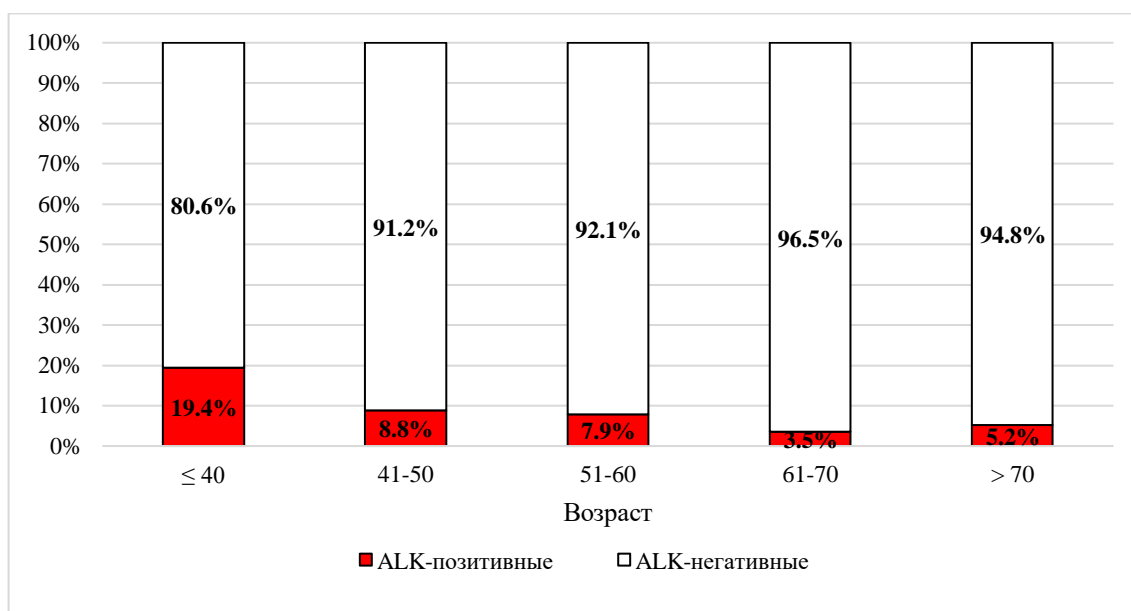


Рисунок 17 – Соотношение ALK-позитивных и негативных случаев в разных возрастных группах

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).

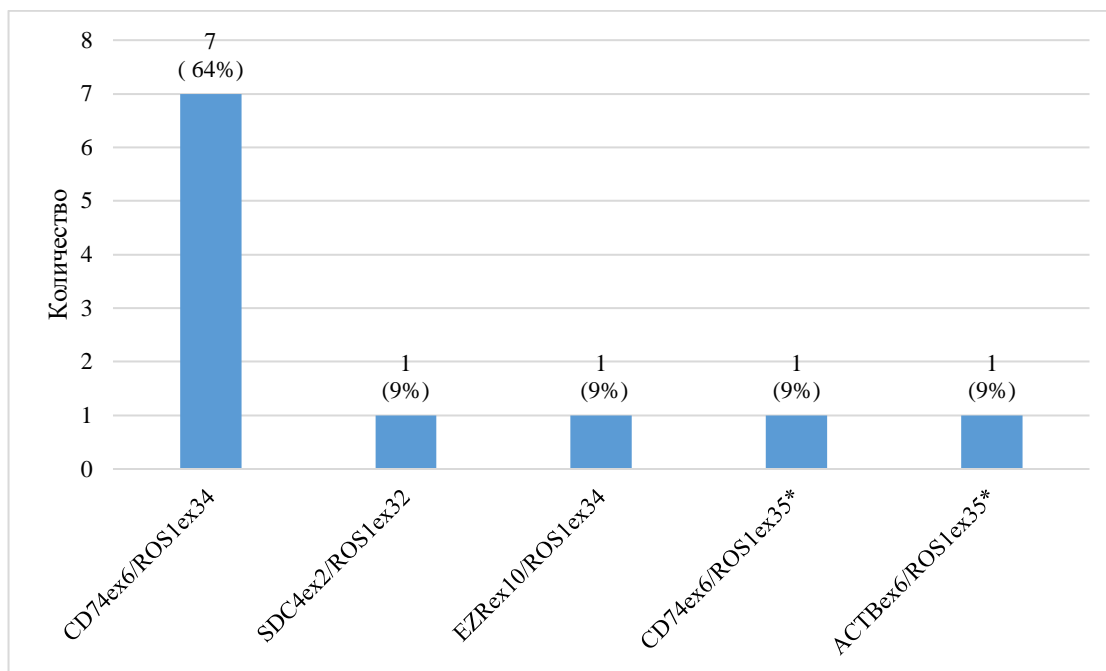
Таким образом, наши данные демонстрируют, что перестройки гена ALK чаще встречаются у молодых, некурящих пациентов, среди которых значительно преобладают женщины (табл. 9).

Таблица 9 – 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%)

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 18.



*Рисунок 18 – 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.

Ниже в Таблице 10 представлены клинические характеристики ROS1-позитивных и негативных случаев.

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.

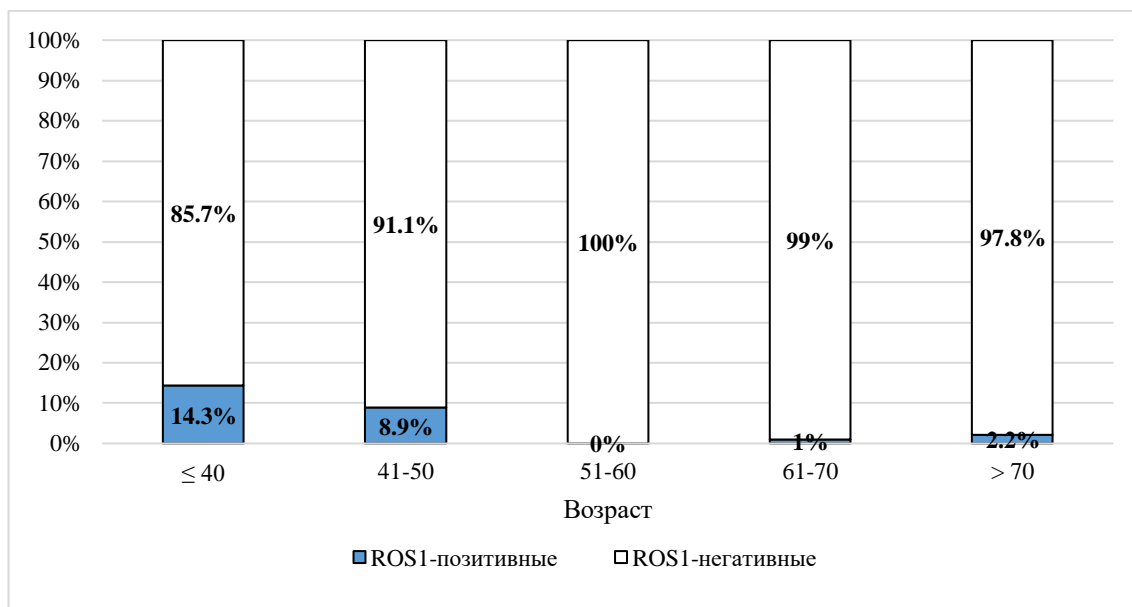


Рисунок 19 – Соотношение ROS1-позитивных и негативных случаев в разных возрастных группах

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). В метаанализе, проведённом (Zhu Q et.al, 2015) на выборке из 9898 пациентов с НМРЛ была обнаружена значимая ассоциация между наличием ROS1-транслокации и некурящим статусом пациента [48]. Отсутствие этой значимой взаимосвязи в нашем исследовании может быть связано с отсутствием информации о статусе курения для значительной части образцов.

Таблица 10 – 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%)

RET-транслокация

В ходе исследования были выявлены 11 RET-позитивных случаев. 10 из них были представлены единственным вариантом KIF5Bex15/RETex12 (91%), один – CCDC6ex1/RETex12 (9%), что представлено на Рисунке 20.

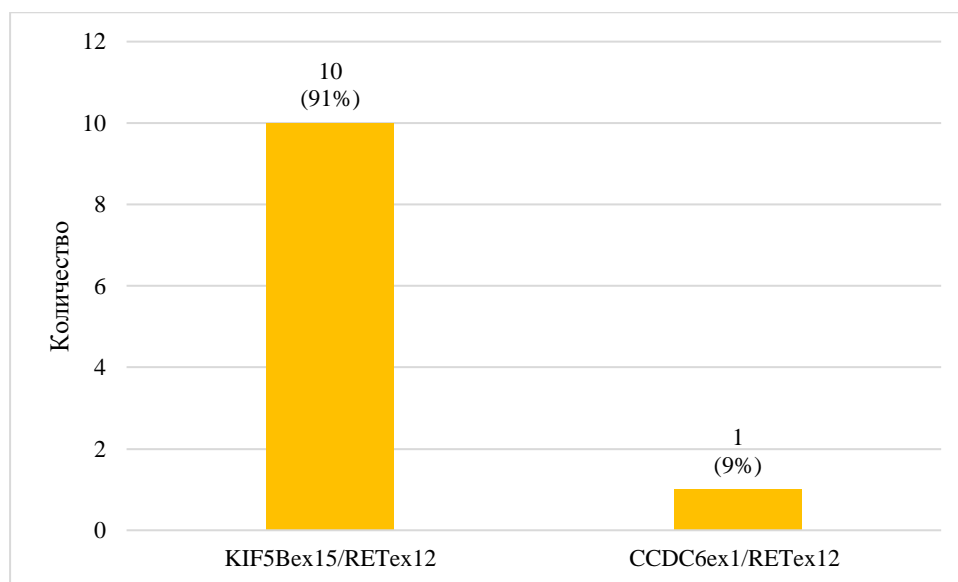


Рисунок 20 – Спектр выявленных вариантов RET-транслокации

Возраст RET-позитивных пациентов был в диапазоне от 41 до 76 лет (медиана 64 года). В группе негативных случаев наблюдался диапазон возрастов от 20 до 86 лет (медиана 62,5 года). Различия в возрасте между

группами оказалось статистически недостоверным ($p = 0,3931$, U-критерий Манна-Уитни).

Среди RET-позитивных 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 характеристики RET-позитивных и негативных случаев представлена в Таблице 11.

Таблица 11 – Клиническая характеристика RET-позитивных и негативных 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%)

ГЛАВА IV. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ И ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе представлены результаты разработки и апробации новой ПЦР-методики детекции РЛ-ассоциированных перестроек с участием генов ALK, ROS1, RET.

Все существующие современные методики детекции перестроек имеют свои преимущества и недостатки. Например, два самых распространённых метода – FISH и ИГХ – не позволяют определить тип химерного транскрипта, что может представлять особенный интерес ввиду появившейся информации о разной терапевтической чувствительности разных вариантов перестроек [57; 58; 67]. В то же время NGS и NanoString лишены этого недостатка, однако являясь закрытыми и дорогостоящими научно-исследовательскими системами, они не могут повсеместно использоваться для клинического тестирования пациентов. ОТ-ПЦР лишена всех этих недостатков, но большое разнообразие возможных вариантов перестроек делает её трудновыполнимой при массовом тестировании пациентов, тем более объёма выделенного образца кДНК может запросто не хватить на типирование всех химерных транскриптов.

В связи со всем вышеперечисленным было принято решение разработать новую ПЦР-методику детекции РЛ-ассоциированных перестроек, основанную на комбинировании двух подходов:

- оценки уровня несбалансированной экспрессии 5' и 3'- концевых фрагментов перестраиваемого гена (основана на работе Wang et al, 2012);
- типирования известных химерных транскриптов (вариант-специфическая ПЦР).

ALK-транслокация

В ходе апробации разработанного теста на ALK-транслокацию было обнаружено, что использование дополнительного теста на несбалансированную экспрессию 3'-фрагмента относительно разрыва между

19 и 20 экзон позволяет выявлять консервативные варианты перестройки с большей чувствительностью (91,4%) и специфичностью (96%), против 89,7% и 88,9% при оценивании несбалансированности 5' и 3'-концевых фрагментов.

При наличии несбалансированной экспрессии по обоим тестам, в образце наиболее вероятно присутствие транслокаций, включающих в свой состав 20 экзон ALK. К таким перестройкам относятся, в том числе, и наиболее изученные химерные транскрипты, к которым были подобраны праймеры, что позволило верифицировать транслокации при постановке вариант-специфической ПЦР.

При наличии несбалансированной экспрессии ALK только по 5'- и 3'-концевым фрагментам и при отсутствии других драйверных мутаций, мы можем подозревать присутствие более редких или даже неизвестных вариантов перестроек, что даёт нам право рекомендовать данный образец на проведение NGS-исследования.

Так, в данной работе с помощью секвенирования по Сэнгеру и таргетного РНК-секвенирования нового поколения (NGS) были выявлены 4 новых варианта ALK-транслокации (EML4ex6/ALKex19, EML4ex18/ALKex20, EML4ex21/ALKex20; EML4ex13-ALKex3-ALKex20) и 2 новых ранее не описанных слияний UBCex1/ALKex18 и EML4-GOLGA3. Рассмотрим их подробнее:

- EML4ex6/ALKex19 – данная перестройка является редким вариантом распространённого слияния EML4-ALK. При анализе результатов ПЦР образец P7111 демонстрировал неожиданно позднюю амплификацию (Ct ~ 38) варианта EML4ex6/ALKex20 (V.3), что может быть характерно для фрагментов с большей длиной. Для проверки был выполнен гель-электрофорез, подтвердивший увеличенную длину фрагмента, после чего была идентифицирована последовательность транскрипта методом секвенирования по Сэнгеру. Также в данном образце также наблюдалась несбалансированная экспрессия концевых 5'- и 3'-фрагментов ALK ($\Delta Ct = 6$);

- EML4ex19/ALKex20 – данная перестройка также является редким вариантом слияния EML4-ALK и была идентифицирована аналогичным способом. Образец P6968 демонстрировал несбалансированную экспрессию ALK ($\Delta Ct = 7,4$) и амплификацию известного варианта EML4ex18/ALKex20 (V.9) на позднем цикле ($Ct\ 34,1$), после чего был взят на гель-электрофорез с дальнейшим секвенированием.

- EML4ex21/ALKex20 – данная перестройка является крайне редким вариантом распространённого слияния EML4-ALK;

- EML4ex13/ALKex3-ALKex20 – необычный химерный транскрипт, большая часть последовательности соответствует наиболее частому варианту EML4ex13/ALKex20 (V.1), однако при этом включает в себя небольшой фрагмент 3 экзона ALK.

- UBCex1/ALKex18 – ранее не описанное слияние генов UBC (Ubiquitin-C) и ALK. Поскольку в состав химерного белка входит эффекторный компонент транслокации – киназный домен ALK, то предположительно данное слияние является чувствительным к таргетной терапии ингибиторами тирозинкиназ. Интересно, что роль 5'-компаньона перестройки (UBC) в канцерогенезе и в качестве терапевтической мишени активно изучается некоторыми исследователями [142].

- EML4ex15/GOLGA3ex9 – является весьма неожиданной находкой. Это слияние хорошо изученного компаньона ALK-транслокации – EML4 с геном GOLGA3, кодирующим комплексный белок аппарата Гольджи подсемейства A3. Поскольку в составе этого химерного транскрипта отсутствует эффекторный компонент перестройки — киназный домен рецепторной тирозинкиназы, на который воздействуют таргетные препараты, то назначение ингибиторов тирозинкиназ в данном случае не показано. Общая клиническая значимость данного нарушения, как и взаимосвязь его с несбалансированной экспрессии неизвестна и требует дальнейшего изучения.

Встречаемость обнаруженных ALK-транслокаций составила 6,1% (61 из 1000), что согласуется с общемировыми показателями в 5% [172]. Спектр

перестроек ALK, помимо описанных выше «новых» перестроек включал также хорошо известные варианты EML4ex13/ALKex20 (V.1), EML4ex20/ALKex20 (V.2), EML4ex6/ALKex20 (V.3), EML4ex18/ALKex20 (V.9), на которые суммарно пришлось 92% всех позитивных образцов. Таким образом, используя тесты на несбалансированную экспрессию ALK и типирруя только эти частые варианты, можно легко выявить большинство позитивных образцов.

ROS1-транслокация

Разница в уровнях экспрессии 5'- и 3'-концевых фрагментов гена ROS1 в группе позитивных образцов определялась не столь хорошо, как предполагалось. Объясняется это тем, что в отличие от гена ALK, ген ROS1 обладает исходно высоким эндогенным уровнем экспрессии в лёгочной ткани, скрывающим на своём фоне возможную гиперэкспрессию 3'-фрагмента. Эта особенность гена ROS1 значительно осложняет детекцию транслокаций как методом оценки несбалансированной экспрессии, так и иммуногистохимически [91]. Тем не менее положительные образцы могут быть однозначно идентифицированы с помощью вариант-специфической ПЦР. Картина выраженной несбалансированной экспрессии концевых фрагментов ROS1 при транслокации в опухолях лёгкого встречается крайне редко, она показана на примере образца P7619 в разделе 3.1. В опухолях других локализаций тест на несбалансированную экспрессию концевых фрагментов гена ROS1 работает значительно лучше, что было показано нашим коллективом на примере воспалительных миофибробластических опухолей в работе (Preobrazhenskaya et al, 2020) [78].

С помощью таргетного РНК-секвенирования нового поколения (NGS) был выявлен 1 новый вариант перестройки CD74ex6/ROS1ex35 и 1 новое ранее не описанное слияние ACTBex6/ROS1ex35. Рассмотрим их подробнее:

- CD74ex6/ROS1ex35 – по-видимому, данная перестройка, является крайне редким вариантом распространённого слияния CD74-ROS1;

- АСТВex6/ROS1ex35 – также ранее неизвестное слияние генов АСТВ и ROS1. Описаны повторяющиеся соматические мутации в гене бета-актина (АСТВ), связанные с развитием диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы [60].

Встречаемость обнаруженных ROS1-транслокаций составила 2,5% (11 из 440), что согласуется с общемировыми показателями 1–2% [172]. Спектр перестроек включал в себя также 3 известных варианта CD74ex6/ROS1ex34, SDC4ex2/ROS1ex32, EZRex10/ROS1ex34. На самый распространённый вариант – CD74ex6/ROS1ex34 – пришлось более половины (64%) всех позитивных образцов, на оставшиеся 4 варианта по 9%.

Суммируя вышесказанное, при тестировании опухолей лёгкого на предмет присутствия перестройки ROS1, помимо оценки несбалансированной экспрессии концевых фрагментов, необходимо также выполнять прямое тестирование известных вариантов транслокаций.

RET-транслокация

Несмотря на малое число образцов (37), протестированных на варианты транслокации, тест на несбалансированную экспрессию концевых фрагментов гена RET показал себя очень хорошо. Все позитивные образцы отчётливо кластеризуются в области несбалансированной экспрессии при $\Delta Ct \geq 3,7$. Чувствительность и специфичность при грубых подсчётах составляют 100% (11 из 11) и 98,2% (971 из 989) соответственно.

Ввиду того, что исследуемые образцы систематически не тестировались на наличие определённых вариантов перестройки RET, то надёжно определить частоту встречаемости вряд ли представляется возможным. Однако если считать, что были обнаружены все присутствующие перестройки RET, то частота будет составлять 1,1% (11 из 1000), что согласуется с общемировыми показателями 1–2% [172]. Спектр обнаруженных перестроек был представлен всего двумя вариантами KIF5Bex15/RETex12 (91%) и CCDC6ex1/RETex12 (9%).

При анализе клинических данных 11 подтверждённых RET-позитивных случаев и группы предположительно негативных 989 образцов была обнаружена статистически достоверная корреляция между женским полом и присутствием RET-транслокации в опухоли ($p = 0,008614$, точный критерий Фишера). Ассоциации с возрастом ($p = 0,3931$, U-критерий Манна-Уитни) и статусом курения ($p = 0,6257$ точный критерий Фишера) оказались недостоверными.

Поскольку на сегодняшний день в России не зарегистрирован первый в мире одобренный RET-ингибитор – селперкатиниб, то предложенный нами диагностический подход может эффективно использоваться для скринингового тестирования пациентов, с целью выявления кандидатов для возможных последующих регистрационных клинических исследований в нашей стране.

Клиническая характеристика позитивных случаев

Большинство крупных исследований говорят о том, что РЛ-ассоциированные перестройки ALK, ROS1 чаще встречаются у молодых, некурящих и преимущественно у женщин, что по большей части согласуется с нашими данными, за исключением различия между курящими и некурящими для ROS1 транслокации. В нашем исследовании оно оказалось статистически недостоверным ($p = 0,1206$, точный критерий Фишера), что, вероятно, связано с отсутствием информации о статусе курения для более чем трети образцов. Единственной обнаруженной статистически значимой ($p = 0,008614$) взаимосвязью для RET-транслокаций была ассоциация с женским полом.

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. 21).

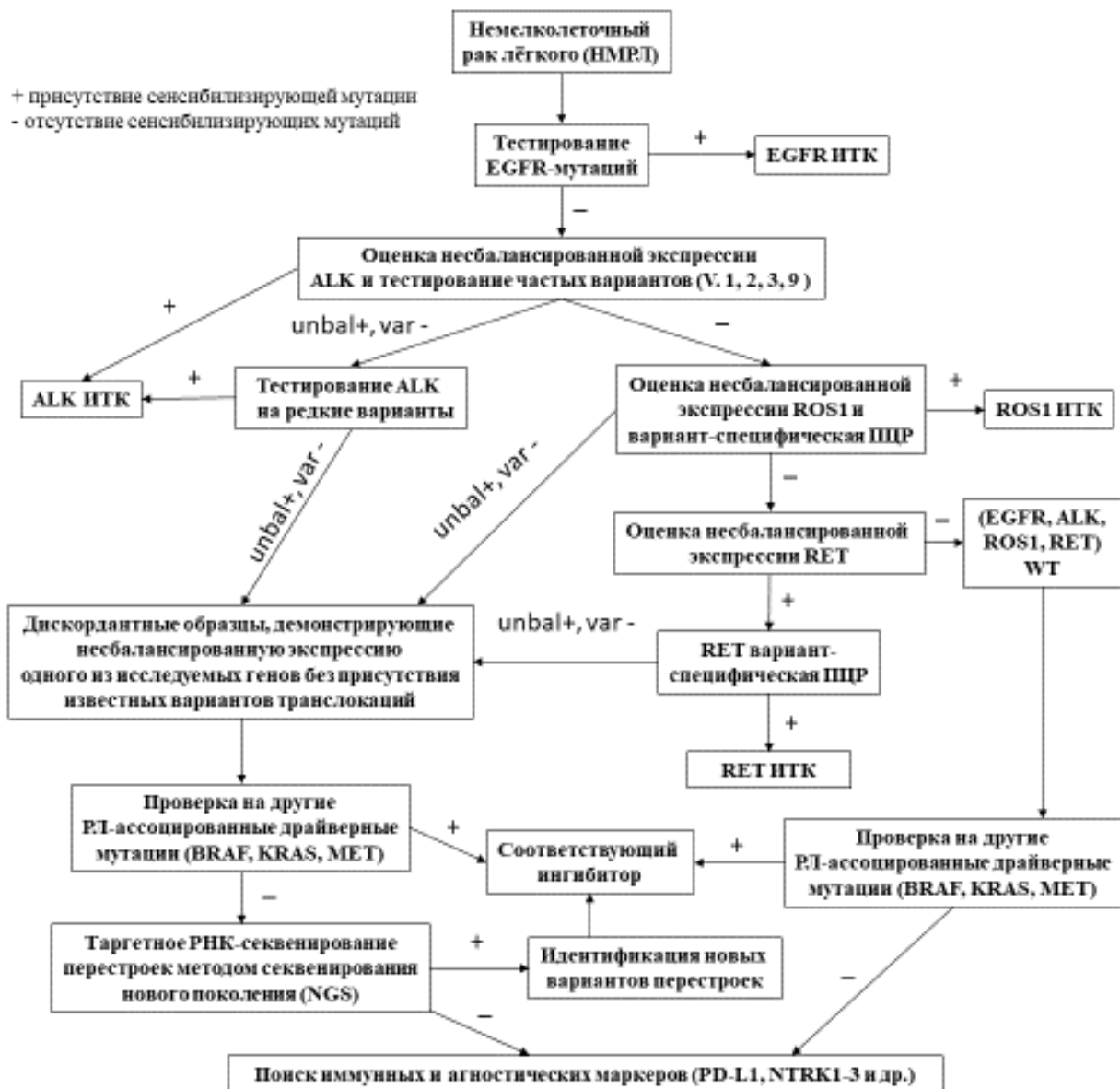


Рисунок 21 – Алгоритм молекулярно-генетического тестирования пациентов с НМРЛ.

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 драйверные мутации находятся между собой в реципрокном взаимоотношении [6].

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 KIF5Vex15/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 СОКРАЩЕНИЙ

- АЛ – аденокарцинома лёгкого
- ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения
- ГДФ – гуанозиндифосфат
- ГТФ – гуанозинтрифосфат
- ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
- ИГХ – иммуногистохимия
- ИТК – ингибитор тирозинкиназ
- КРЛ – крупноклеточный рак лёгкого
- Мб – мегабаза (млн п.о.)
- МЕ – международная единица активности фермента
- МРЛ – мелкоклеточный рак лёгкого
- НМРЛ – немелкоклеточный рак лёгкого
- ОТ-ПЦР – ПЦР с обратной транскрипцией
- ПАУ – полициклические ароматические углеводороды
- ПРЛ – плоскоклеточный рак лёгкого
- ПЦР – полимеразная цепная реакция
- п.о. – пар оснований
- РЛ – рак лёгкого
- РКБТ – Рамочная конвенция по борьбе против табака
- РТК – рецепторная тирозинкиназа
- РНК – рибонуклеиновая кислота
- АСТВ (ACTin Beta) – ген бета-актина
- ALK (Anaplastic Lymphoma Kinase) – ген рецепторной тирозинкиназы ALK
- СК5/6 (CytoKeratine 5/6) - цитокератин 5/6
- Clinical Lung Cancer Genome Project (CLCGP) – Проект клинического генома рака лёгкого
- Сt (Cycle threshold) – пороговый цикл
- BRAF (B-Raf proto-oncogene) - BRAF протоонкоген

dNTP (DeoxyNucleotide TriPhosphates) – смесь (А, Т, С, G) дезоксинуклеотидтрифосфатов

EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) – ген рецептора эпидермального фактора роста

ESMO (European Society for Medical Oncology) - Европейское общество медицинской онкологии

EZR (EZRin) – ген езрина

FDA (U.S. Food and Drug Administration) – Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США

FFPE (Formalin-Fixed Paraffin-Embedded) – фиксированный в формалине парафизированный образец

FGFR (Fibroblast Growth Factor Receptor) – рецептор фактора роста фибробластов

FISH (Fluorescence In Situ Hybridization) – флуоресцентная гибридизация in situ

GATS (Global Adult Tobacco Survey) – глобальный опрос взрослого населения о потреблении табака

GOLGA3 (Golgin A3, Golgin Subfamily A 3) ген белка аппарата Гольджи подсемейства А 3

Hallmarks of Cancer – ключевые признаки рака

HGF (Hepatocyte Growth fFactor) – фактор роста гепатоцитов

IASLC (The International Association for the Study of Lung Cancer) - Международная ассоциация по изучению рака лёгкого

IGF1R (Insulin Growth Factor 1 Receptor) – рецептор к инсулиноподобному фактору роста 1

KRAS (Kirsten RAt Sarcoma) – протоонкоген KRAS

MET (Mesenchymal Epithelial Transition) – протоонкоген MET

MSI (MicroSatellite Instability) – микросателлитная нестабильность

NCI (National Cancer Institute) – Национальный институт изучения рака, США

NTC (No Template Control) – контроль без добавления матрицы для амплификации

NTRK1–3 (Neurotrophic Receptor Tyrosine Kinase 1–3) – гены семейства NTRK
ROS1 (ROS proto-oncogene 1) – протоонкоген ROS1
RET (RET proto-oncogene) – протоонкоген RET
SDC4 (SynDeCan 4) – гена синдекана 4
SDHA (Succinate DeHydrogenase complex, subunit A) – сукцинатдегидрогеназа, субъединица A
TMB (Tumor Mutational Burden) — уровень мутационной нагрузки опухоли
TPM3 (TroPoMyosin 3) – ген тропомиозина 3
TTF-1 (Thyroid Transcription Factor 1) - тиреоидный фактор транскрипции-1
UBC (UBiquitin-C) – ген убиквитина C
WT (Wild Type) – аллель «дикого типа», без мутаций

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бычков М.Б. Мелкоклеточный рак легкого / М.Б. Бычков, Э.Н. Дгебуадзе, С.А. Большакова // Практическая онкология. – 2005. – Т. 6. – № 4. – С. 213-219.
2. Заболеваемость и смертность населения от рака легкого, достоверность учета / В.М. Мерабишвили [и др.] // Сибирский онкологический журнал. – 2018. – Т. 17. – № 6. – С. 15-26.
3. Заридзе Д.Г. Канцерогенез / Д.Г. Заридзе. – Москва: Медицина, 2004. – 576 с.
4. Злокачественные новообразования в России в 2016 году (заболеваемость и смертность) / ред. А.Д. Каприн, В.В. Старинский, Г.В. Петрова. – Москва: МНИОИ им. П.А. Герцена - филиал «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2018. – 250 с.
5. Зубец А.Н. Количественные оценки в истории (инструменты для клиометрии) / А.Н. Зубец. – Финансовый университет при правительстве РФ, 2014.
6. Имянитов Е.Н. Современные представления о молекулярных мишенях в опухолях лёгкого / Е.Н. Имянитов // Практическая онкология. – 2018. – Т. 19. – № 2. – С. 93-105.
7. Имянитов Е.Н. Молекулярная онкология: клинические аспекты / Е.Н. Имянитов, К.П. Хансон. – Санкт-Петербург: Издательский дом СПбМАПО, 2007. – 213 с.
8. История курения [Электронный ресурс]. – URL: <http://www.istorya.ru/articles/tabak.php> (дата обращения: 08.05.2018).
9. Каширская Е.Н. Ломоносов и медицина (Газета «Московский университет», №26) [Электронный ресурс]. – URL: <https://www.msu.ru/lomonosov/science/med.html> (дата обращения: 08.05.2018).
10. Косарев В.В. Профессиональные болезни / В.В. Косарев, Бабанов С.А. – Москва: ИНФРА-М, 2011. – 252 с.
11. Моисеенко Ф.В. Молекулярно-генетические особенности немелкоклеточного рака легкого и их значение для определения эффективной лекарственной терапии : дис. канд. мед. наук: 14.00.14, 03.00.04 / Ф.В. Моисеенко. – Санкт-Петербург: ГОУ ДПО СПбМАПО, 2009. – 106 с.
12. О присоединении Российской Федерации к Рамочной конвенции ВОЗ по борьбе против табака : Федеральный закон от 24 апреля 2008 года № 51-ФЗ // Российская газета. – 2008.

13. Рамочная конвенция ВОЗ по борьбе против табака : офиц. текст. – ВОЗ, Женева, Швейцария, 2003.
14. Статистические закономерности заболеваемости раком легкого в Омской области / В.К. Косенок [и др.] // Сибирский онкологический журнал. – 2016. – Т. 15. – № 4. – С. 21-25.
15. Стекло: урановое [Электронный ресурс]. – URL: <http://www.antikforum.ru/forum/showthread.php?t=18361> (дата обращения: 08.05.2018).
16. Харченко В.П. Рак легкого. Фундаментальные проблемы и клинические перспективы. Руководство для врачей / В.П. Харченко, И.В. Кузьмина. – Москва: Медицина. – 1994. – 479 с.
17. Чиссов А.Д. Злокачественные новообразования в России в 2000 году (заболеваемость и смертность) / А.Д. Чиссов, В.В. Старинский, Г.В. Петрова. – 2002. – С. 264.
18. Опрос GATS: Глобальный опрос взрослого населения о потреблении табака: Российская Федерация. Краткий обзор, 2016 г. [Электронный ресурс]. – URL: <http://www.euro.who.int/ru/health-topics/disease-prevention/tobacco/publications/2017/global-adult-tobacco-survey-russian-federation.-executive-summary-2016-2017> (дата обращения: 04.01.2020).
19. 1 to 10 mutations are needed to drive cancer, scientists find [Электронный ресурс]. – URL: <https://www.sanger.ac.uk/news/view/1-10-mutations-are-needed-drive-cancer-scientists-find> (дата обращения: 13.03.2020).
20. A Genomics-Based Classification of Human Lung Tumors // Science translational medicine. – 2013. – Vol. 5. – № 209. – P. 1-28.
21. A novel KIF5B-ALK variant in nonsmall cell lung cancer / D.W.-S. Wong [et al.] // Cancer. – 2011. – Vol. 117. – № 12. – P. 2709-2718.
22. A phase II study of nintedanib in patients with relapsed small cell lung cancer / J.-Y. Han [et al.] // Lung Cancer. – 2016. – Vol. 96. – P. 108-112.
23. A phase II trial of Salirasib in patients with lung adenocarcinomas with KRAS mutations / G.J. Riely [et al.] // Journal of Thoracic Oncology. – 2011. – Vol. 6. – № 8. – P. 1435-1437.
24. A Prospective PCR-Based Screening for the EML4-ALK Oncogene in Non-Small Cell Lung Cancer / M. Soda [et al.] // Clinical Cancer Research. – 2012. – Vol. 18. – № 20. – P. 5682-5689.
25. A Randomized Phase II Study of Linsitinib (OSI-906) Versus Topotecan in Patients With Relapsed Small-Cell Lung Cancer / A.A. Chiappori [et al.] // The Oncologist. – 2016. – Vol. 21. – № 10. – P. 1163-1164e.

26. A Single-Tube Multiplexed Assay for Detecting ALK, ROS1, and RET Fusions in Lung Cancer / M.E. Lira [et al.] // The Journal of Molecular Diagnostics. – 2014. – Vol. 16. – № 2. – P. 229-243.
27. A Study Of Oral PF-02341066, A C-Met/Нepatocyte Growth Factor Tyrosine Kinase Inhibitor, In Patients With Advanced Cancer - Full Text View - ClinicalTrials.gov [Электронный ресурс]. – URL: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00585195> (дата обращения: 13.03.2020).
28. A transforming KIF5B and RET gene fusion in lung adenocarcinoma revealed from whole-genome and transcriptome sequencing / Y.S. Ju [et al.] // Genome Research. – 2012. – Vol. 22. – № 3. – P. 436-445.
29. Acquaviva J. The multifaceted roles of the receptor tyrosine kinase ROS in development and cancer. - PubMed - NCBI / J. Acquaviva, W. Ricky, A. Charest // Biochimica et Biophysica Acta. – 2008. – Vol. 1795. – P. 37-51.
30. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib / T.J. Lynch [et al.] // The New England Journal of Medicine. – 2004. – Vol. 350. – № 21. – P. 2129-2139.
31. Analysis of tumor specimens at the time of acquired resistance to EGFR-TKI therapy in 155 patients with EGFR-mutant lung cancers / H.A. Yu [et al.] // Clinical Cancer Research. – 2013. – Vol. 19. – № 8. – P. 2240-2247.
32. Anaplastic lymphoma kinase: signalling in development and disease / R.H. Palmer [et al.] // The Biochemical Journal. – 2009. – Vol. 420. – Anaplastic lymphoma kinase. – № 3. – P. 345-361.
33. Anchored multiplex PCR for targeted next-generation sequencing / Z. Zheng [et al.] // Nature Medicine. – 2014. – Vol. 20. – № 12. – P. 1479-1484.
34. Archived Formalin-Fixed Paraffin-Embedded (FFPE) Blocks: A Valuable Underexploited Resource for Extraction of DNA, RNA, and Protein / T.J. Kokkat [et al.] // Biopreservation and Biobanking. – 2013. – Vol. 11. – № 2. – P. 101-106.
35. Basumallik N. Cancer, Lung Small Cell (Oat Cell) In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing [Электронный ресурс]. – URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482458/> (дата обращения: 25.02.2020).
36. Belani C.P. Paclitaxel/carboplatin in the treatment of non-small-cell lung cancer / C.P. Belani // Oncology (Williston Park, N.Y.). – 1998. – Vol. 12. – № 1 Suppl 2. – P. 74-79.
37. Bertram J.S. The molecular biology of cancer / J.S. Bertram // Molecular Aspects of Medicine. – 2000. – Vol. 21. – № 6. – P. 167-223.

38. Beyond ALK-RET, ROS1 and other oncogene fusions in lung cancer / T. Kohno [et al.] // *Translational Lung Cancer Research*. – 2015. – Vol. 4. – № 2. – P. 156-164.
39. Borzelleca J.F. Paracelsus: Herald of Modern Toxicology / J.F. Borzelleca // *Toxicological Sciences*. – 2000. – Vol. 53. – № 1. – P. 2-4.
40. Brandt A.M. Recruiting Women Smokers: The Engineering of Consent / A.M. Brandt. – 1996. – P. 63-66.
41. Brewer L.A. Historical notes on lung cancer before and after Graham's successful pneumonectomy in 1933 / L.A. Brewer // *The American Journal of Surgery*. – 1982. – Vol. 143. – № 6. – P. 650-659.
42. Cabozantinib in patients with advanced RET-rearranged non-small-cell lung cancer: an open-label, single-centre, phase 2, single-arm trial / A. Drilon [et al.] // *The Lancet. Oncology*. – 2016. – Vol. 17. – № 12. – P. 1653-1660.
43. Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive genomic characterization of squamous cell lung cancers / Cancer Genome Atlas Research Network // *Nature*. – 2012. – Vol. 489. – № 7417. – P. 519-525.
44. Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma / Cancer Genome Atlas Research Network // *Nature*. – 2014. – Vol. 511. – № 7511. – P. 543-550.
45. Characterization of an activated human *ros* gene / C. Birchmeier [et al.] // *Molecular and Cellular Biology*. – 1986. – Vol. 6. – № 9. – P. 3109-3116.
46. Characterization of ROS1 cDNA from a human glioblastoma cell line. / C. Birchmeier [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1990. – Vol. 87. – № 12. – P. 4799-4803.
47. Clinical characteristics of patients with lung adenocarcinomas harboring BRAF mutations / P.K. Paik [et al.] // *Journal of Clinical Oncology*. – 2011. – Vol. 29. – № 15. – P. 2046-2051.
48. Clinicopathologic characteristics of patients with ROS1 fusion gene in non-small cell lung cancer: a meta-analysis / Q. Zhu [et al.] // *Translational Lung Cancer Research*. – 2015. – Vol. 4. – № 3. – P. 300-309.
49. Comparison of Four Chemotherapy Regimens for Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer | *NEJM* / J.H. Shiller [et al.] // *New England Journal of Medicine*. – 2002. – P. 92-98.
50. Comparison of four next generation sequencing platforms for fusion detection: OncoPrint by ThermoFisher, AmpliSeq by illumina, FusionPlex by

ArcherDX, and QIAseq by QIAGEN / X. Qu [et al.] // *Cancer Genetics*. – 2020. – Vol. 243. – P. 11-18.

51. Coordinate direct input of both KRAS and IGF1 receptor to activation of PI3 kinase in KRAS-mutant lung cancer / M. Molina-Arcas [et al.] // *Cancer Discovery*. – 2013. – Vol. 3. – № 5. – P. 548-563.

52. CYP1A1 and GSTM1 genetic polymorphisms and lung cancer risk in Caucasian non-smokers: a pooled analysis / R.J. Hung [et al.] // *Carcinogenesis*. – 2003. – Vol. 24. – № 5. – P. 875-882.

53. Dagogo-Jack I. Crizotinib resistance: implications for therapeutic strategies / I. Dagogo-Jack, A.T. Shaw // *Annals of Oncology*. – 2016. – Vol. 27 Suppl 3. – P. iii42-iii50.

54. David A.R. Cancer: an old disease, a new disease or something in between? / A.R. David, M.R. Zimmerman // *Nature Reviews. Cancer*. – 2010. – Vol. 10. – Cancer. – № 10. – P. 728-733.

55. Dela Cruz C.S. Lung cancer: epidemiology, etiology, and prevention / C.S. Dela Cruz, L.T. Tanoue, R.A. Matthay // *Clinics in Chest Medicine*. – 2011. – Vol. 32. – № 4. – P. 605-644.

56. Detection of EGFR mutations and EML4-ALK rearrangements in lung adenocarcinomas using archived cytological slides / N.V. Mitiushkina [et al.] // *Cancer Cytopathology*. – 2013. – Vol. 121. – № 7. – P. 370-376.

57. Differential Crizotinib Response Duration Among ALK Fusion Variants in ALK-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer / T. Yoshida [et al.] // *Journal of Clinical Oncology*. – 2016. – Vol. 34. – № 28. – P. 3383-3389.

58. Differential protein stability and clinical responses of EML4-ALK fusion variants to various ALK inhibitors in advanced ALK -rearranged non-small cell lung cancer / C.G. Woo [et al.] // *Annals of Oncology*. – 2017. – Vol. 28. – P. 791-797.

59. Differential subcellular localization regulates oncogenic signaling by ROS1 kinase fusion proteins / D.S. Neel [et al.] // *Cancer Research*. – 2018. – P. 1-9.

60. Discovery and prioritization of somatic mutations in diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) by whole-exome sequencing / J.G. Lohr [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2012. – Vol. 109. – № 10. – P. 3879-3884.

61. Doll R. Smoking and carcinoma of the lung. Preliminary report. 1950. / R. Doll, A.B. Hill // *Bulletin of the World Health Organization*. – 1999. – Vol. 77. – № 1. – P. 84-93.

62. Druggable Oncogene Fusions in Invasive Mucinous Lung Adenocarcinoma / T. Nakaoku [et al.] // *Clinical Cancer Research*. – 2014. – P. 1-15.
63. Dual IHC and FISH testing for ALK gene rearrangement in lung adenocarcinomas in a routine practice: a French study / A. McLeer-Florin [et al.] // *Journal of Thoracic Oncology*. – 2012. – Vol. 7. – № 2. – P. 348-354.
64. EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from “never smokers” and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib / W. Pao [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2004. – Vol. 101. – № 36. – P. 13306-13311.
65. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy / J.G. Paez [et al.] // *Science*. – 2004. – Vol. 304. – № 5676. – P. 1497-1500.
66. EML4-ALK lung cancers are characterized by rare other mutations, a TTF-1 cell lineage, an acinar histology, and young onset / K. Inamura [et al.] // *Modern Pathology*. – 2009. – Vol. 22. – № 4. – P. 508-515.
67. EML4-ALK Variants: Biological and Molecular Properties, and the Implications for Patients / S.R. Sabir [et al.] // *Cancers*. – 2017. – Vol. 9. – № 9. – P. 1-9.
68. European Consensus Statement on Lung Cancer: Risk factors and prevention. Lung Cancer Panel / H.K. Biesalski [et al.] // *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. – 1998. – Vol. 48. – № 3. – P. 167-176.
69. FAM150A and FAM150B are activating ligands for anaplastic lymphoma kinase / J. Guan [et al.] // *eLife*. – 2015. – Vol. 4. – P. 1-16.
70. FDA Approves First Targeted Therapy for Lung Cancer Mutation Previously Considered Resistant to Drug Therapy [Электронный ресурс]. – URL: <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-first-targeted-therapy-lung-cancer-mutation-previously-considered-resistant-drug> (дата обращения: 17.08.2021).
71. FDA approves selpercatinib for lung and thyroid cancers with RET gene mutations or fusions [Электронный ресурс]. – URL: <https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/fda-approves-selpercatinib-lung-and-thyroid-cancers-ret-gene-mutations-or-fusions> (дата обращения: 17.08.2021).
72. First-Line Atezolizumab plus Chemotherapy in Extensive-Stage Small-Cell Lung Cancer / L. Horn [et al.] // *The New England Journal of Medicine*. – 2018. – Vol. 379. – № 23. – P. 2220-2229.
73. Fornaciari G. Histology of ancient soft tissue tumors: A review / G. Fornaciari // *International Journal of Paleopathology*. – 2017. – P. 64-76.

74. FRMD4A/RET: A Novel RET Oncogenic Fusion Variant in Non-Small Cell Lung Carcinoma / V. Velcheti [et al.] // *Journal of Thoracic Oncology*. – 2017. – Vol. 12. – № 2. – P. e15-e16.
75. Fusion of a kinase gene, ALK, to a nucleolar protein gene, NPM, in non-Hodgkin's lymphoma / S.W. Morris [et al.] // *Science*. – 1994. – Vol. 263. – № 5151. – P. 1281-1284.
76. Fusion of FIG to the receptor tyrosine kinase ROS in a glioblastoma with an interstitial del(6)(q21q21) / A. Charest [et al.] // *Genes, Chromosomes and Cancer*. – 2003. – Vol. 37. – № 1. – P. 58-71.
77. Gaeta R. Cancer in the Renaissance court of Naples / R. Gaeta, V. Giuffra, G. Fornaciari // *The Lancet Oncology*. – 2017. – Vol. 18. – № 8. – P. e432.
78. Gene rearrangements in consecutive series of pediatric inflammatory myofibroblastic tumors / E.V. Preobrazhenskaya [et al.] // *Pediatric Blood & Cancer*. – 2020. – Vol. 67. – № 5. – P. e28220.
79. Genomic landscape of non-small cell lung cancer in smokers and never smokers / R. Govindan [et al.] // *Cell*. – 2012. – Vol. 150. – № 6. – P. 1121-1134.
80. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries / F. Bray [et al.] // *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. – 2018. – Vol. 68. – № 6. – P. 394-424.
81. Global surveillance of trends in cancer survival: analysis of individual records for 37,513,025 patients diagnosed with one of 18 cancers during 2000–2014 from 322 population-based registries in 71 countries (CONCORD-3) / C. Allemani [et al.] // *Lancet*. – 2018. – Vol. 391. – № 10125. – P. 1023-1075.
82. Greenberg M. Lung cancer in the Schneeberg mines: a reappraisal of the data reported by Harting and Hesse in 1879 / M. Greenberg, I.J. Selikoff // *The Annals of Occupational Hygiene*. – 1993. – Vol. 37. – № 1. – P. 5-14.
83. Hallberg B. Mechanistic insight into ALK receptor tyrosine kinase in human cancer biology / B. Hallberg, R.H. Palmer // *Nature Reviews. Cancer*. – 2013. – Vol. 13. – № 10. – P. 685-700.
84. Hanahan D. Hallmarks of Cancer: The Next Generation / D. Hanahan, R.A. Weinberg // *Cell*. – 2011. – Vol. 144. – № 5. – P. 646-674.
85. Hanahan D. The Hallmarks of Cancer / D. Hanahan, R.A. Weinberg // *Cell*. – 2000. – Vol. 100. – № 1. – P. 57-70.
86. Herbst R.S. Lung cancer / R.S. Herbst, J.V. Heymach, S.M. Lippman // *The New England Journal of Medicine*. – 2008. – Vol. 359. – № 13. – P. 1367-1380.

87. Higher random oligo concentration improves reverse transcription yield of cDNA from bioptic tissues and quantitative RT-PCR reliability / E. Nardon [et al.] // *Experimental and Molecular Pathology*. – 2009. – Vol. 87. – № 2. – P. 146-151.
88. HIP1–ALK, A Novel ALK Fusion Variant that Responds to Crizotinib / D.D. Fang [et al.] // *Journal of Thoracic Oncology*. – 2014. – Vol. 9. – № 3. – P. 285-294.
89. HIP1–ALK, a Novel Fusion Protein Identified in Lung Adenocarcinoma / M. Hong [et al.] // *Journal of Thoracic Oncology*. – 2014. – Vol. 9. – № 3. – P. 419-422.
90. Human ret proto-oncogene mapped to chromosome 10q11.2 / Y. Ishizaka [et al.] // *Oncogene*. – 1989. – Vol. 4. – № 12. – P. 1519-1521.
91. IASLC atlas of ALK and ROS1 testing in lung cancer / M.S. Tsao [et al.]. – Aurora (Colorado): International Association for the Study of Lung Cancer, 2016. – 128 p.
92. Identification of a novel HIP1-ALK fusion variant in Non-Small-Cell Lung Cancer (NSCLC) and discovery of ALK I1171 (I1171N/S) mutations in two ALK-rearranged NSCLC patients with resistance to Alectinib / S.-H.I. Ou [et al.] // *Journal of Thoracic Oncology*. – 2014. – Vol. 9. – № 12. – P. 1821-1825.
93. Identification of a novel KIF13A-RET fusion in lung adenocarcinoma by next-generation sequencing / X. Zhang [et al.] // *Lung Cancer*. – 2018. – Vol. 118. – P. 27-29.
94. Identification of new ALK and RET gene fusions from colorectal and lung cancer biopsies / D. Lipson [et al.] // *Nature Medicine*. – 2012. – Vol. 18. – № 3. – P. 382-384.
95. Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer / M. Soda [et al.] // *Nature*. – 2007. – Vol. 448. – № 7153. – P. 561-566.
96. Imyanitov E. Polymorphic variations in apoptotic genes and cancer predisposition / E. Imyanitov, K. Hanson, B. Zhivotovsky // *Cell Death and Differentiation*. – 2005. – Vol. 12. – № 8. – P. 1004-1007.
97. Imyanitov E.N. Preface (Chapter) / E.N. Imyanitov // *Key Leaders' Opinion on Lung Cancer*. – AME Publishing Company, 2018. – P. X-XIV.
98. Imyanitov E.N. Searching for cancer-associated gene polymorphisms: promises and obstacles / E.N. Imyanitov, A.V. Togo, K.P. Hanson // *Cancer Letters*. – 2004. – Vol. 204. – № 1. – P. 3-14.
99. Inamura K. Lung Cancer: Understanding Its Molecular Pathology and the 2015 WHO Classification / K. Inamura // *Frontiers in Oncology*. – 2017. – Vol. 7. – Lung Cancer. – P. 1-7.

100. Increasing frequency of non-smoking lung cancer: Presentation of patients with early disease to a tertiary institution in the UK / M.E. Cufari [et al.] // *European Journal of Cancer* (Oxford, England: 1990). – 2017. – Vol. 84. – P. 55-59.
101. Integrative genome analyses identify key somatic driver mutations of small cell lung cancer / M. Peifer [et al.] // *Nature genetics*. – 2012. – Vol. 44. – № 10. – P. 1104-1110.
102. International association for the study of lung cancer/american thoracic society/european respiratory society international multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma / W.D. Travis [et al.] // *Journal of Thoracic Oncology*. – 2011. – Vol. 6. – № 2. – P. 244-285.
103. Khunger A. Dabrafenib in combination with trametinib in the treatment of patients with BRAF V600-positive advanced or metastatic non-small cell lung cancer: clinical evidence and experience / A. Khunger, M. Khunger, V. Velcheti // *Therapeutic Advances in Respiratory Disease*. – 2018. – Vol. 12. – P. 1-9.
104. KIF5B-RET fusions in Chinese patients with non-small cell lung cancer / W. Cai [et al.] // *Cancer*. – 2013. – Vol. 119. – № 8. – P. 1486-1494.
105. KIF5B-RET fusions in lung adenocarcinoma / T. Kohno [et al.] // *Nature Medicine*. – 2012. – Vol. 18. – № 3. – P. 375-377.
106. Kim C.H. Druggable Targets of Squamous Cell Lung Cancer / C.H. Kim // *Tuberculosis and Respiratory Diseases*. – 2013. – Vol. 75. – № 6. – P. 231-235.
107. KLC1-ALK: a novel fusion in lung cancer identified using a formalin-fixed paraffin-embedded tissue only / Y. Togashi [et al.] // *PloS One*. – 2012. – Vol. 7. – № 2. – P. e31323.
108. Kondo T. Pathogenetic mechanisms in thyroid follicular-cell neoplasia / T. Kondo, S. Ezzat, S.L. Asa // *Nature Reviews Cancer*. – 2006. – Vol. 6. – № 4. – P. 292-306.
109. KRAS mutations and resistance to EGFR-TKIs treatment in patients with non-small cell lung cancer: a meta-analysis of 22 studies / C. Mao [et al.] // *Lung Cancer* (Amsterdam, Netherlands). – 2010. – Vol. 69. – № 3. – P. 272-278.
110. Lemmon M.A. Cell signaling by receptor tyrosine kinases / M.A. Lemmon, J. Schlessinger // *Cell*. – 2010. – Vol. 141. – № 7. – P. 1117-1134.
111. Lengauer C. Genetic instabilities in human cancers / C. Lengauer, K.W. Kinzler, B. Vogelstein // *Nature*. – 1998. – Vol. 396. – № 6712. – P. 643-649.
112. Lerman C. Elucidating the role of genetic factors in smoking behavior and nicotine dependence / C. Lerman, W. Berrettini // *American Journal of Medical*

- Genetics. Part B, Neuropsychiatric Genetics. – 2003. – Vol. 118B. – № 1. – P. 48-54.
113. Lovly C.M. Escaping ALK inhibition: mechanisms of and strategies to overcome resistance / C.M. Lovly, W. Pao // *Science Translational Medicine*. – 2012. – Vol. 4. – Escaping ALK inhibition. – № 120. – P. 120ps2.
114. Mackay J.L. The tobacco atlas / Mackay J.L., Eriksen M.P. – 2002.
115. Mapping the hallmarks of lung adenocarcinoma with massively parallel sequencing / M. Imielinski [et al.] // *Cell*. – 2012. – Vol. 150. – № 6. – P. 1107-1120.
116. Matsushime H. Human c-ros-1 gene homologous to the v-ros sequence of UR2 sarcoma virus encodes for a transmembrane receptorlike molecule / H. Matsushime, L.H. Wang, M. Shibuya // *Molecular and Cellular Biology*. – 1986. – Vol. 6. – № 8. – P. 3000-3004.
117. Mechanisms of lung cancer / E.N. Imyanitov [et al.] // *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms*. – 2005. – Vol. 2. – № 2. – P. 213-223.
118. MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling / J.A. Engelman [et al.] // *Science (New York, N.Y.)*. – 2007. – Vol. 316. – № 5827. – P. 1039-1043.
119. Molecular pathways and therapeutic targets in lung cancer / E. Shtivelman [et al.] // *Oncotarget*. – 2014. – Vol. 5. – № 6. – P. 1392-1433.
120. Müller F.H. Tabakmißbrauch und Lungencarcinom / F.H. Müller // *Zeitschrift für Krebsforschung*. – 1940. – T. 49. – № 1. – C. 57-85.
121. Multi-institutional Oncogenic Driver Mutation Analysis in Lung Adenocarcinoma: The Lung Cancer Mutation Consortium Experience / L.M. Sholl [et al.] // *Journal of Thoracic Oncology*. – 2015. – Vol. 10. – № 5. – P. 768-777.
122. Myers D.J. Cancer, Lung Adenocarcinoma In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing [Электронный ресурс]. – URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK519578/> (дата обращения: 25.02.2020).
123. Nakamura H. Worldwide trend of increasing primary adenocarcinoma of the lung / H. Nakamura, H. Saji // *Surgery Today*. – 2014. – Vol. 44. – № 6. – P. 1004-1012.
124. Noble E.P. The DRD2 gene, smoking, and lung cancer / E.P. Noble // *Journal of the National Cancer Institute*. – 1998. – Vol. 90. – № 5. – P. 343-345.
125. Non-small Cell Lung Cancer Collaborative Group. Chemotherapy in non-small cell lung cancer: a meta-analysis using updated data on individual patients from 52 randomised clinical trials. / Non-small Cell Lung Cancer Collaborative

- Group. // *BMJ : British Medical Journal*. – 1995. – Vol. 311. – № 7010. – P. 899-909.
126. Novel ALK fusion partners in lung cancer / A.G. Iyevleva [et al.] // *Cancer Letters*. – 2015. – Vol. 362. – № 1. – P. 116-121.
127. Optimizing the detection of lung cancer patients harboring anaplastic lymphoma kinase (ALK) gene rearrangements potentially suitable for ALK inhibitor treatment / D.R. Camidge [et al.] // *Clinical Cancer Research*. – 2010. – Vol. 16. – № 22. – P. 5581-5590.
128. PTC is a novel rearranged form of the ret proto-oncogene and is frequently detected in vivo in human thyroid papillary carcinomas / M. Grieco [et al.] // *Cell*. – 1990. – Vol. 60. – № 4. – P. 557-563.
129. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria / R Core Team. – 2016. – 3503 p.
130. Resistance mechanisms after tyrosine kinase inhibitors afatinib and crizotinib in non-small cell lung cancer, a review of the literature / A.J. van der Wekken [et al.] // *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. – 2016. – Vol. 100. – P. 107-116.
131. Response to crizotinib in advanced ALK-rearranged non-small cell lung cancers with different ALK-fusion variants / Y. Li [et al.] // *Lung Cancer*. – 2018. – Vol. 118. – P. 128-133.
132. RET fusion in advanced non-small-cell lung cancer and response to cabozantinib: A case report / Y. Wang [et al.] // *Medicine*. – 2019. – Vol. 98. – № 3. – P. 1-4.
133. RET fusions define a unique molecular and clinicopathologic subtype of non-small-cell lung cancer / R. Wang [et al.] // *Journal of Clinical Oncology*. – 2012. – Vol. 30. – № 35. – P. 4352-4359.
134. RET fusions in solid tumors / A.Y. Li [et al.] // *Cancer Treatment Reviews*. – 2019. – Vol. 81. – P. 101911.
135. RET, ROS1 and ALK fusions in lung cancer / K. Takeuchi [et al.] // *Nature Medicine*. – 2012. – Vol. 18. – № 3. – P. 378-381.
136. Rodriguez-Canales J. Diagnosis and Molecular Classification of Lung Cancer / J. Rodriguez-Canales, E. Parra-Cuentas, I.I. Wistuba // *Cancer Treatment and Research*. – 2016. – Vol. 170. – P. 25-46.
137. ROS1 Rearrangements Define a Unique Molecular Class of Lung Cancers / K. Bergethon [et al.] // *Journal of Clinical Oncology*. – 2012. – Vol. 30. – № 8. – P. 863-870.

138. Roskoski R. ROS1 protein-tyrosine kinase inhibitors in the treatment of ROS1 fusion protein-driven non-small cell lung cancers / R. Roskoski // *Pharmacological Research*. – 2017. – Vol. 121. – P. 202-212.
139. Screening for the FIG-ROS1 fusion in biliary tract carcinomas by nested PCR / C.P. Neia [et al.] // *Genes, Chromosomes and Cancer*. – 2014. – Vol. 53. – № 12. – P. 1033-1040.
140. SEER Cancer Statistics Review (CSR), 1975-2016 // Lung and Bronchus [Электронный ресурс]. – URL: https://seer.cancer.gov/csr/1975_2016/results_merged/sect_15_lung_bronchus.pdf (дата обращения: 17.02.2020).
141. Sellers E.M. Decreasing smoking behaviour and risk through CYP2A6 inhibition / E.M. Sellers, R.F. Tyndale, L.C. Fernandes // *Drug Discovery Today*. – 2003. – Vol. 8. – № 11. – P. 487-493.
142. Shi D. Ubiquitin becomes ubiquitous in cancer / D. Shi, S.R. Grossman // *Cancer Biology & Therapy*. – 2010. – Vol. 10. – № 8. – P. 737-747.
143. Small Cell Lung Carcinoma: Staging, Imaging, and Treatment Considerations / B.W. Carter [et al.] // *RadioGraphics*. – 2014. – Vol. 34. – № 6. – P. 1707-1721.
144. Smoking prevalence and attributable disease burden in 195 countries and territories, 1990–2015: a systematic analysis from the Global Burden of Disease Study 2015 / M.B. Reitsma [et al.] // *The Lancet*. – 2017. – Vol. 389. – № 10082. – P. 1885-1906.
145. Sokolenko A.P. Molecular Diagnostics in Clinical Oncology / A.P. Sokolenko, E.N. Imyanitov // *Frontiers in Molecular Biosciences*. – 2018. – Vol. 5. – P. 76.
146. Song Z. Clinicopathological characteristics and survival of ALK, ROS1 and RET rearrangements in non-adenocarcinoma non-small cell lung cancer patients / Z. Song, X. Yu, Y. Zhang // *Cancer Biology & Therapy*. – 2017. – Vol. 18. – № 11. – P. 883-887.
147. Stangegaard M. Reverse transcription using random pentadecamer primers increases yield and quality of resulting cDNA / M. Stangegaard, I.H. Dufva, M. Dufva // *BioTechniques*. – 2006. – Vol. 40. – № 5. – P. 649-657.
148. Stinchcombe T.E. Current Treatments for Advanced Stage Non–Small Cell Lung Cancer / T.E. Stinchcombe, M.A. Socinski // *Proceedings of the American Thoracic Society*. – 2009. – Vol. 6. – № 2. – P. 233-241.
149. Swanton C. Clinical Implications of Genomic Discoveries in Lung Cancer / C. Swanton, R. Govindan // *New England Journal of Medicine*. – 2016. – Vol. 374. – № 19. – P. 1864-1873.

150. Takahashi M. Activation of a novel human transforming gene, *ret*, by DNA rearrangement / M. Takahashi, J. Ritz, G.M. Cooper // *Cell*. – 1985. – Vol. 42. – № 2. – P. 581-588.
151. Takeuchi K. Discovery Stories of RET Fusions in Lung Cancer: A Mini-Review / K. Takeuchi // *Frontiers in Physiology*. – 2019. – Vol. 10. – P. 1-8.
152. Targeted Resequencing Reveals ALK Fusions in Non-Small Cell Lung Carcinomas Detected by FISH, Immunohistochemistry, and Real-Time RT-PCR: A Comparison of Four Methods / K. Tuononen [et al.] // *BioMed Research International*. – 2013. – P. 1-9.
153. Targeted Therapy For RET-Rearranged Non-Small Cell Lung Cancer: Clinical Development And Future Directions / C.J. Ackermann [et al.] // *OncoTargets and Therapy*. – 2019. – P. 7857-7864.
154. Targeting KRAS Mutant Cancers with a Covalent G12C-Specific Inhibitor / M.R. Janes [et al.] // *Cell*. – 2018. – Vol. 172. – № 3. – P. 578-589.e17.
155. Targeting RET in Patients With RET-Rearranged Lung Cancers: Results From the Global, Multicenter RET Registry / O. Gautschi [et al.] // *Journal of Clinical Oncology*. – 2017. – Vol. 35. – № 13. – P. 1403-1410.
156. Thatcher N. First- and second-line treatment of advanced metastatic non-small-cell lung cancer: a global view / N. Thatcher // *BMC Proceedings*. – 2008. – Vol. 2. – № (Suppl 2):S3. – P. S3.
157. The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors: Impact of Genetic, Clinical and Radiologic Advances Since the 2004 Classification / W.D. Travis [et al.] // *Journal of Thoracic Oncology*. – 2015. – Vol. 10. – № 9. – P. 1243-1260.
158. The BATTLE-2 Study: A Biomarker-Integrated Targeted Therapy Study in Previously Treated Patients With Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer / V. Papadimitrakopoulou [et al.] // *Journal of Clinical Oncology*. – 2016. – Vol. 34. – № 30. – P. 3638-3647.
159. The GATS Atlas / S. Asma [et al.]. – Atlanta, GA: CDC Foundation, 2015. – 65 p.
160. Therapeutically targetable ALK mutations in leukemia / J.E. Maxson [et al.] // *Cancer research*. – 2015. – Vol. 75. – № 11. – P. 2146-2150.
161. Tobacco use in 3 billion individuals from 16 countries: an analysis of nationally representative cross-sectional household surveys / G.A. Giovino [et al.] // *Lancet (London, England)*. – 2012. – Vol. 380. – № 9842. – P. 668-679.

162. Toh C.-K. The changing epidemiology of lung cancer / C.-K. Toh // *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.). – 2009. – Vol. 472. – P. 397-411.
163. Travis W.D. New pathologic classification of lung cancer: relevance for clinical practice and clinical trials / W.D. Travis, E. Brambilla, G.J. Riely // *Journal of Clinical Oncology*. – 2013. – Vol. 31. – № 8. – P. 992-1001.
164. Trends in the incidence, treatment, and survival of patients with lung cancer in the last four decades / T. Lu [et al.] // *Cancer Management and Research*. – 2019. – Vol. 11. – P. 943-953.
165. Uguen A. ROS1 fusions in cancer: a review / A. Uguen, M. De Braekeleer // *Future Oncology*. – 2016. – Vol. 12. – № 16. – P. 1911-1928.
166. Utility of five commonly used immunohistochemical markers TTF-1, Napsin A, CK7, CK5/6 and P63 in primary and metastatic adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the lung: a retrospective study of 246 fine needle aspiration cases / G.T. Gurda [et al.] // *Clinical and Translational Medicine*. – 2015. – Vol. 4. – P. 1-13.
167. Vandetanib in pretreated patients with advanced non-small cell lung cancer-harboring RET rearrangement: a phase II clinical trial / S.-H. Lee [et al.] // *Annals of Oncology*. – 2017. – Vol. 28. – № 2. – P. 292-297.
168. WAC/RET: A Novel RET Oncogenic Fusion Variant in Non-Small Cell Lung Carcinoma / V. Velcheti [et al.] // *Journal of Thoracic Oncology*. – 2018. – Vol. 13. – WAC/RET. – № 7. – P. e122-e123.
169. Weber L.W. Georgius Agricola (1494–1555): Scholar, Physician, Scientist, Entrepreneur, Diplomat / L.W. Weber // *Toxicological Sciences*. – 2002. – Vol. 69. – № 2. – P. 292-294.
170. Witschi H. A Short History of Lung Cancer / H. Witschi // *Toxicological Sciences*. – 2001. – Vol. 64. – № 1. – P. 4-6.
171. Wynder E.L. Smoking and Lung Cancer: Scientific Challenges and Opportunities / E.L. Wynder, D. Hoffmann // *Cancer Research*. – 1994. – Vol. 54. – № 20. – P. 5284-5295.
172. Yoda S. Targeting oncogenic drivers in lung cancer: Recent progress, current challenges and future opportunities / S. Yoda, I. Dagogo-Jack, A.N. Hata // *Pharmacology & Therapeutics*. – 2019. – Vol. 193. – P. 20-30.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

Список последовательностей праймеров и меток для исследования вариантов ALK-транслокации

EML4ex13/ALKex20 (V.1)		
EML4ex13F	TGGAGCAAAACTACTGTAGAG	101 п.о.
shALKex20P	[FAM]ATGGCTTGCAGCTCCTGGTGCT[BHQ1]	
shALKex20R	GGGCTCTGCAGCTCCATCT	
EML4ex20/ALKex20 (V.2)		
EML4ex20F	CTAACTCGGGAGACTATGAAAT	85 п.о.
shALKex20P	[FAM]ATGGCTTGCAGCTCCTGGTGCT[BHQ1]	
shALKex20R	GGGCTCTGCAGCTCCATCT	
EML4ex6/ALKex20 (V.3)		
EML4ex6F	CATAAAGATGTCATCATCAACCA	80 п.о.
shALKex20P	[FAM]ATGGCTTGCAGCTCCTGGTGCT[BHQ1]	
shALKex20R	GGGCTCTGCAGCTCCATCT	
EML4ex18/ALKex20 (V.9)		
EML4ex18F	ACACAGACGGGAATGAACAG	100 п.о.
shALKex20P	[FAM]ATGGCTTGCAGCTCCTGGTGCT[BHQ1]	
shALKex20R	GGGCTCTGCAGCTCCATCT	
EML4ex2/ALKex20 (V.5a)		
shEML4ex2F	CTGAAGATCATGTGGCCTCA	100 п.о.
shALKex20P	[FAM]ATGGCTTGCAGCTCCTGGTGCT[BHQ1]	
shALKex20R	GGGCTCTGCAGCTCCATCT	
KIF5Bex24/ALKex20 (V.10)		
KIF5Bex24F	CGCATAAAGGAAGCAGTCAG	116 п.о.
shALKex20P	[FAM]ATGGCTTGCAGCTCCTGGTGCT[BHQ1]	
shALKex20R	GGGCTCTGCAGCTCCATCT	
KIF5Bex17/ALKex20 (V.11)		
KIF5Bex17F	CGATGCCCTCAGTGAAGAAC	96 п.о.
shALKex20P	[FAM]ATGGCTTGCAGCTCCTGGTGCT[BHQ1]	

shALKex20R	GGGCTCTGCAGCTCCATCT	
KIF5Bex15/ALKex20 (V.12)		
shKIF5Bex15F	GCTGTGGGAAATAATGATGTAA	76 п.о.
shALKex20P	[FAM]ATGGCTTGCAGCTCCTGGTGCT[BHQ1]	
shALKex20R	GGGCTCTGCAGCTCCATCT	
TFGex3/ALKex20 (V.13)		
TFGex3F1	AGTAGGATACTGAAACTGACAT	83 п.о.
shALKex20P	[FAM]ATGGCTTGCAGCTCCTGGTGCT[BHQ1]	
shALKex20R	GGGCTCTGCAGCTCCATCT	
KLC1ex9/ALKex20 (V.14)		
KLC1ex9F	TCTCACTCGTGCACATGAAAG	96 п.о.
shALKex20P	[FAM]ATGGCTTGCAGCTCCTGGTGCT[BHQ1]	
shALKex20R	GGGCTCTGCAGCTCCATCT	
SQSTM1ex5/ALKex20		
SQSTM1ex5-1F	TGAAGAACGTTGGGGAGAGT	100 п.о.
shALKex20P	[FAM]ATGGCTTGCAGCTCCTGGTGCT[BHQ1]	
shALKex20R	GGGCTCTGCAGCTCCATCT	
DCTN1ex26/ALKex20		
DCTN1ex26F	CTGGTCTCTGGCATTGCTG	77 п.о.
shALKex20P	[FAM]ATGGCTTGCAGCTCCTGGTGCT[BHQ1]	
shALKex20R	GGGCTCTGCAGCTCCATCT	
TPRex15/ALKex20		
shTPRex15F	GAGTTGCCATTCCATTACAT	76 п.о.
shALKex20P	[FAM]ATGGCTTGCAGCTCCTGGTGCT[BHQ1]	
shALKex20R	GGGCTCTGCAGCTCCATCT	
SEC31Aex21/ALKex20		
SEC31Aex21F	TCATATGCACACCCAGGTAC	96 п.о.
shALKex20P	[FAM]ATGGCTTGCAGCTCCTGGTGCT[BHQ1]	
shALKex20R	GGGCTCTGCAGCTCCATCT	
HIP1ex21/ALKex20		
HIP1ex21F	TGCCTCAGAGCCCCACCT	86 п.о.

shALKex20P	[FAM]ATGGCTTGCAGCTCCTGGTGCT[BHQ1]	
shALKex20R	GGGCTCTGCAGCTCCATCT	
HIP1ex28/ALKex20		
HIP1ex28F	TCCGGCAAATCACAGATCGAA	83 п.о.
shALKex20P	[FAM]ATGGCTTGCAGCTCCTGGTGCT[BHQ1]	
shALKex20R	GGGCTCTGCAGCTCCATCT	
SOCS5ex2/ALKex20		
SOCS5ex2F	AACGAGAACCAGTCAAGGC	81 п.о.
shALKex20P	[FAM]ATGGCTTGCAGCTCCTGGTGCT[BHQ1]	
shALKex20R	GGGCTCTGCAGCTCCATCT	
EML4ex14/del12ALKex20 (V.7)		
shEML4ex14F	CTGTGGGATCATGATCTGAAT	82 п.о.
shALKex20P	[FAM]ATGGCTTGCAGCTCCTGGTGCT[BHQ1]	
shALKex20R	GGGCTCTGCAGCTCCATCT	
EML4ex14/del12ALKex20 (V.4/7)		
shEML4ex14F	CTGTGGGATCATGATCTGAAT	89 п.о. (V.4) 115 п.о. (V7)
ALKex20P	[FAM]GCCCTGAGTACAAGCTGAGCAAG[BHQ1]	
ALKex20R	GTCGAGGTGCGGAGCTTG	
EML4ex2/ALKex20 (V.5b)		
shEML4ex2F	CTGAAGATCATGTGGCCTCA	108 п.о.
ALKv5bP	[FAM]CAGTCTCAAGTAAAGGTTTCAGAGC[BHQ1]	
ALKint19v5bR	TACACAGGCCACTTCCTACA	
EML4ex13/ALKex20 (V.6)		
EML4ex13F	TGGAGCAAACTACTGTAGAG	76 п.о.
ALKex20v6P	[FAM]GGAAAGGACCTAAAGGAAGTGGC[BHQ1]	
ALKint19v6R	TGGCCCTTGAAGCACTACAC	
EML4ex15/ALKex20 (V.8)		
EML4ex15F	GTAGCAGAAGGAAAGGCAG	80 п.о.
ALKex20v8P	[FAM]ATTTTTAGTAGGCAAGCTCCGCAC[BHQ1]	
ALKex20v8R	TAGTTGGGGTTGTAGTCGGT	

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

Список последовательностей праймеров и меток для исследования вариантов ROS1-транслокации

CD74ex6/ROS1ex32		
CD74ex6F1	CCACTGACGCTCCACCGAA	69 п.о.
ROS1ex32Pn	[FAM]ATGCCTGGTTTATTTGGGACTC[BHQ1]	
ROS1ex32Rn	TACTCCCTTCTAGTAATTTGG	
SDC4ex2/ROS1ex32		
SDC4ex2F	ACCAGACGATGAGGATGTAG	99 п.о.
ROS1ex32Pn	[FAM]ATGCCTGGTTTATTTGGGACTC[BHQ1]	
ROS1ex32Rn	TACTCCCTTCTAGTAATTTGG	
SDC4ex4/ROS1ex32		
SDC4ex2F	ACCAGACGATGAGGATGTAG	122 п.о.
ROS1ex32Pn	[FAM]ATGCCTGGTTTATTTGGGACTC[BHQ1]	
ROS1ex32Rn	TACTCCCTTCTAGTAATTTGG	
SLC34A2ex4/ROS1ex32		
SLC34A2ex4F	GGATTGGGAGATTGATTTTACT	138 п.о.
ROS1ex32Pn	[FAM]ATGCCTGGTTTATTTGGGACTC[BHQ1]	
ROS1ex32Rn	TACTCCCTTCTAGTAATTTGG	
SLC34A2ex13/ROS1ex32		
SLC34A2ex13F1	CATTAGCAGAGAGGCTCAG	115 п.о.
ROS1ex32Pn	[FAM]ATGCCTGGTTTATTTGGGACTC[BHQ1]	
ROS1ex32Rn	TACTCCCTTCTAGTAATTTGG	
EZReX10/ROS1ex32		
EZReX10F1	AGACAAAGAAGGCAGAGAGA	69 п.о.
ROS1ex32Pn	[FAM]ATGCCTGGTTTATTTGGGACTC[BHQ1]	
ROS1ex32Rn	TACTCCCTTCTAGTAATTTGG	
CD74ex6/ROS1ex34		
CD74ex6F1	CCACTGACGCTCCACCGAA	85 п.о.
ROS1ex34P1na	[FAM]CTTGTTTCTGGTATCCAA[LNA-A]AATCA[BHQ1]	

ROS1ex34Rlna	ACAACCAGAA[LNA-A]TATTCCAAC TA	
SDC4ex2/ROS1ex34		
SDC4ex2F	ACCAGACGATGAGGATGTAG	138 п.о.
ROS1ex34Plna	[FAM]CTTGTTTCTGGTATCCAA[LNA-A]AATCA[BHQ1]	
ROS1ex34Rlna	ACAACCAGAA[LNA-A]TATTCCAAC TA	
SDC4ex4/ROS1ex34		
SDC4ex4F	CCGTTGAAGAGAGTGAGGAT	157 п.о.
ROS1ex34Plna	[FAM]CTTGTTTCTGGTATCCAA[LNA-A]AATCA[BHQ1]	
ROS1ex34Rlna	ACAACCAGAA[LNA-A]TATTCCAAC TA	
SLC34A2ex4/ROS1ex34		
SLC34A2ex4F	GGATTGGGAGATTGATTTTACT	154 п.о.
ROS1ex34Plna	[FAM]CTTGTTTCTGGTATCCAA[LNA-A]AATCA[BHQ1]	
ROS1ex34Rlna	ACAACCAGAA[LNA-A]TATTCCAAC TA	
SLC34A2ex13/ROS1ex34		
SLC34A2ex13F1	CATTAGCAGAGAGGCTCAG	131 п.о.
ROS1ex34Plna	[FAM]CTTGTTTCTGGTATCCAA[LNA-A]AATCA[BHQ1]	
ROS1ex34Rlna	ACAACCAGAA[LNA-A]TATTCCAAC TA	
EZReX10/ROS1ex34		
EZReX10F1	AGACAAAGAAGGCAGAGAGA	85 п.о.
ROS1ex34Plna	[FAM]CTTGTTTCTGGTATCCAA[LNA-A]AATCA[BHQ1]	
ROS1ex34Rlna	ACAACCAGAA[LNA-A]TATTCCAAC TA	
FIGex7/ROS1ex35		
FIGex7F	GTTTGTACCTTGATGAGTTAGA	134 п.о.
ROS1ex35Plna	[FAM]TCTGGCATAGAAGATT[LNA-A]AAGAATC[BHQ1]	
ROS1ex35R	TGTCACCCCTTCCTTGGCA	
TPM3ex8/ROS1ex35		
TPM3ex8F1	GAAAAGACAATTGATGACCTG	75 п.о.
ROS1ex35Plna	[FAM]TCTGGCATAGAAGATT[LNA-A]AAGAATC[BHQ1]	
ROS1ex35R	TGTCACCCCTTCCTTGGCA	
LRIGex16/ROS1ex35		
LRIG3ex16F	GGATGGGTACGTGTCTTCAG	142 п.о.

ROS1ex35PIna	[FAM]TCTGGCATAGAAGATT[LNA-A]AAGAATC[BHQ1]	
ROS1ex35R	TGTCACCCCTTCCTGGCA	

ПРИЛОЖЕНИЕ В

Список последовательностей праймеров и меток для исследования вариантов RET-транслокации

KIF5Bex24/RETex7		
shKIF5Bex24-F	GTCAAAGAATATGGCCAGAAG	87 п.о.
RETex7Pn	[FAM]CAGTTTTCCACACAGACTTTCCC[BHQ1]	
RETex7Rn	TGATGCCACTGAATGCCTG	
KIF5Bex24/RETex8		
shKIF5Bex24-F	GTCAAAGAATATGGCCAGAAG	104 п.о.
shRETex8-P	[FAM]CCCCCTGCTCTGTGCAGTCAG[BHQ1]	
shRETex8-R	CACACTCCAGCCGTCTCTT	
KIF5Bex15/RETex11		
shKIF5Bex15-F	GCTGTGGGAAATAATGATGTAA	87 п.о.
shRETex11-P	[FAM]ATCACCGTGCGGCACAGCTCG[BHQ1]	
shRETex11-R	CGATGAAGGAGAAGAGACA	
KIF5Bex24/RETex11		
shKIF5Bex24-F	GTCAAAGAATATGGCCAGAAG	104 п.о.
shRETex11-P	[FAM]ATCACCGTGCGGCACAGCTCG[BHQ1]	
shRETex11-R	CGATGAAGGAGAAGAGACA	
KIF5Bex15/RETex12		
shKIF5Bex15-F	GCTGTGGGAAATAATGATGTAA	78 п.о.
shRETex12-P	[FAM]CTTCCGAGGGAATTCCCACTTTG[BHQ1]	
shRETex12-R	TAGAGTTTTTCCAAGAACCAAG	
KIF5Bex16/RETex12		
KIF5Bex16-F	AGGAGTTAGCAGCATGTCAG	89 п.о.
shRETex12-P	[FAM]CTTCCGAGGGAATTCCCACTTTG[BHQ1]	
shRETex12-R	TAGAGTTTTTCCAAGAACCAAG	
KIF5Bex22/RETex12		
shKIF5Bex22-F	CTTTGTTCAGGACCTGGCTA	88 п.о.
shRETex12-P	[FAM]CTTCCGAGGGAATTCCCACTTTG[BHQ1]	

shRETex12-R	TAGAGTTTTTCCAAGAACCAAG	
KIF5Bex23/RETex12		
shKIF5Bex23-F	ATAATCTTGAACAGCTCACTAAA	89 п.о.
shRETex12-P	[FAM]CTTCCGAGGGAATTCCCACCTTG[BHQ1]	
shRETex12-R	TAGAGTTTTTCCAAGAACCAAG	
KIF5Bex24/RETex12		
shKIF5Bex24-F	GTCAAAGAATATGGCCAGAAG	95 п.о.
shRETex12-P	[FAM]CTTCCGAGGGAATTCCCACCTTG[BHQ1]	
shRETex12-R	TAGAGTTTTTCCAAGAACCAAG	
CCDC6ex1/RETex12		
shCCDC6ex1-F	GCAAAGCCAGCGTGACCAT	74 п.о.
shRETex12-P	[FAM]CTTCCGAGGGAATTCCCACCTTG[BHQ1]	
shRETex12-R	TAGAGTTTTTCCAAGAACCAAG	
NCOA4ex7/RETex12		
shNCOA4ex7F	AGGCTGTATCTCCATGCCA	79 п.о.
shRETex12-P	[FAM]CTTCCGAGGGAATTCCCACCTTG[BHQ1]	
shRETex12-R	TAGAGTTTTTCCAAGAACCAAG	
NCOA4ex8/RETex12		
shNCOA4ex8-F	AGCAGACCTTGGAGAACAGT	77 п.о.
shRETex12-P	[FAM]CTTCCGAGGGAATTCCCACCTTG[BHQ1]	
shRETex12-R	TAGAGTTTTTCCAAGAACCAAG	