

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНОГО РАКА ЛЕГКОГО С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДА МУЛЬТИТАРГЕТНОЙ ОДНОНУКЛЕОТИДНОЙ ЭЛОНГАЦИИ И ФРАГМЕНТНОГО АНАЛИЗА

А.А. Мусаелян, В.Д. Назаров, кандидат медицинских наук, С.В. Лапин, кандидат медицинских наук, И.В. Чистяков, кандидат медицинских наук, И.В. Комаров, кандидат медицинских наук, О.Ю. Ткаченко, М.В. Согоян, Е.В. Бердник, А.В. Мазинг, кандидат медицинских наук, В.Л. Эмануэль, доктор медицинских наук, профессор, А.Л. Акопов, доктор медицинских наук, профессор, С.В. Орлов, член-корреспондент РАН, профессор, С.Ф. Багненко, академик РАН, профессор
ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Российская Федерация, 197022, Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, д. 6–8
E-mail: a.musaelyan8@gmail.com

Введение. Рак легкого – наиболее частая причина смертности при злокачественных новообразованиях. Преобладающим типом является немелкоклеточный рак легкого (НМКРЛ), при лечении которого активно применяется таргетная терапия тирозинкиназными ингибиторами (ТКИ) EGFR, а также комбинация BRAF/MEK ингибиторов. Показанием для данной терапии является генотипирование опухолевого материала для обнаружения предиктивных маркеров, таких как мутации в генах EGFR, KRAS, BRAF и HER2. Одним из подходов к быстрому и комплексному выявлению aberrаций в генах интереса является использование методов мультитаргетной однонуклеотидной элонгации (МОЭ) и фрагментного анализа (ФА), обладающих высокой чувствительностью.

Цель. Определение клинико-морфологических характеристик у пациентов с НМКРЛ с наличием драйверных мутаций в генах EGFR, KRAS, BRAF и HER2.

Материал и методы. На базе ПСПбГМУ им. И.П. Павлова был организован криобанк биологических материалов, взятых у пациентов с НМКРЛ. Для генотипирования центральных участков опухолевых образцов у 60 пациентов с НМКРЛ использовались методы МОЭ и ФА.

Результаты. Мутации в гене EGFR обнаружены исключительно у пациентов с аденокарциномой легкого ($p=0,0008$) с частотой 31%. Данные aberrации статистически значимо ассоциированы с женским полом ($p=0,0002$) и отсутствием статуса курения ($p=0,0007$). Соотношение делеции в 19 экзоне к точечной мутации L858R составило 2,5:1. Распространенность минорных мутаций у EGFR-положительных пациентов достигала 22,2%. При этом у одного пациента было выявлено сосуществование минорных мутаций G719S и S768I. Причиной приобретенной резистентности к ТКИ EGFR 1-го поколения у пациента являлась делеция в 19 экзоне-T790M в гене EGFR, возникшая на фоне лечения. Aberrации в гене KRAS обнаружены у 10% пациентов мужского пола с НМКРЛ, ранее куривших или продолжающие курить. Мутация V600E в гене BRAF и инсерции в гене HER2 не обнаружены.

Заключение. Применение комплексного методического подхода позволяет с высокой точностью определять клинически значимые aberrации в генах EGFR, KRAS, BRAF и HER2 у пациентов с НМКРЛ в соответствии с клиническими рекомендациями.

Ключевые слова: таргетная терапия, немелкоклеточный рак легкого, EGFR, T790M, KRAS, BRAF, HER2

MOLECULAR GENETIC CHARACTERISTICS OF NON-SMALL CELL LUNG CANCER USING MULTI-TARGET SINGLE-BASE ELONGATION AND FRAGMENT ANALYSIS

A.A. Musaelyan, V.D. Nazarov, S.V. Lapin, I.V. Chistyakov, I.V. Komarov, O.U. Tkachenko, M.V. Sogoyan, E.W. Berdник, A.V. Mazing, W.L. Emanuel, A.L. Akopov, S.V. Orlov, S.F. Bagnenko
Pavlov First Saint-Petersburg State Medical University, L'va Tolstogo str. 6–8, Saint Petersburg, 197022, Russian Federation
E-mail: a.musaelyan8@gmail.com

Background. Lung cancer is the most frequent cause of cancer mortality. The prevailing type is non-small cell lung cancer (NSCLC), in the treatment of which EGFR tyrosine kinase inhibitors are actively used, as well as a combination of BRAF and MEK inhibitors. The indication for the targeted therapy is the genotyping of tumor samples for the detection of predictive markers, such as mutations in the EGFR,

KRAS, BRAF and HER2 genes. One approach to the rapid and complex identification of aberrations in the genes of interest is the use of methods with high sensitivity: multi-target single-base elongation (MSE) and fragment analysis (FA).

Objective. Determination of clinicopathological characteristics of patients with NSCLC with the presence of driver mutations in the *EGFR, KRAS, BRAF and HER2* genes.

Materials and methods. A cryobank of biological specimens taken from patients with NSCLC was organized at Pavlov First Saint Petersburg State Medical University. For genotyping of the central sites of tumor samples from 60 patients with NSCLC were used multi-target single-base elongation and fragment analysis.

Results. *EGFR* mutations were found exclusively in patients with lung adenocarcinoma ($p=0,0008$) with a frequency of 31%. These aberrations are significantly associated with female gender ($p=0,0002$) and the absence of smoking status ($p=0,0007$). The ratio of exon 19 deletion to L858R was 2,5:1. The prevalence of minor mutations in *EGFR*-positive patients was 22,2%. Thus, the coexistence of minor mutations G719S and S768I was revealed in one tumor sample. The cause of acquired resistance to the first-generation *EGFR* TKI in a patient with exon 19 deletion was determined – T790M in the *EGFR* gene. *KRAS* mutations were found in 10% of male patients with NSCLC who was a current or former smoker. V600E in the *BRAF* gene and insertions in the *HER2* gene were not detected.

Conclusion. An integrated methodological approach allows to accurately determine clinically significant aberrations in the *EGFR, KRAS, BRAF and HER2* genes in NSCLC patients according to the recommendations.

Key words: targeted therapy, NSCLC, *EGFR, T790M, KRAS, BRAF, HER2*

ВВЕДЕНИЕ

Рак легкого — самое распространенное среди злокачественных новообразований с точки зрения как заболеваемости, так и смертности [1]. При этом 85% всех случаев составляет немелкоклеточный рак легкого (НМКРЛ) [2]. Открытие драйверных мутаций в ключевых генах, участвующих в выживании и пролиферации клеток, и разработка тирозинкиназных ингибиторов (ТКИ), мишенью которых служат патогенные продукты aberrантных генов, привели к разработке новых методов лечения пациентов с метастатическим НМКРЛ [3]. Так называемая «таргетная терапия» позволила значительно увеличить выживаемость без прогрессирования, частоту объективного ответа, а также повысить качество жизни пациента [4]. Согласно практическим рекомендациям RUSSCO, определение сенситивных мутаций в гене *EGFR*, V600E в гене *BRAF*, а также транслокаций в генах *ALK* и *ROS1* у пациентов с метастатическим НМКРЛ является обязательным и служит показанием для назначения ТКИ, селективных по отношению к данным aberrациям [5].

Первой точкой приложения для таргетной терапии при НМКРЛ послужил рецептор эпидермального фактора роста (*EGFR*). Активирующие и чувствительные мутации в экзонах 18–21 гена *EGFR*, кодирующих киназный домен данного рецептора, являются предикторами ответа на ТКИ *EGFR* [6]. Ведущими чувствительными к терапии aberrациями являются точечная мутация L858R и делеции в 19 экзоне, которые составляют соответственно 40 и 45% случаев мутаций в гене *EGFR* [7]. При этом последние в наибольшей степени ассоциированы с высокой частотой объективного ответа и выживаемости без прогрессирования. Менее распространенные, минорные, мутации (около 10%), такие как L861Q, G719X, S768I и инсерции в 19 экзоне гена *EGFR*, также ассоциированы с чувствительностью к ТКИ [8]. Несмотря на высокую частоту объективных ответов при терапии ТКИ, опухоль часто становится резистентной к терапии. Ключевым механизмом приобретенной резистентности к ТКИ *EGFR* 1-го и 2-го поколения является точечная мутация T790M в том же гене, которая составляет приблизительно половину случаев [9]. Осимертиниб, препарат 3-го поколения, позволяет преодолеть возникающее прогрессирование заболевания.

Для подбора ТКИ *EGFR* необходимо также выявление мутаций, ассоциированных с первичной резистентностью к терапии. Активирующие aberrации в гене *KRAS* являются наиболее частыми находками при НМКРЛ и могут служить предикторами отсутствия терапевтического эффекта при назначении ТКИ *EGFR* [10]. Также показана резистентность к терапии ТКИ *ALK* у *ALK*-положительных пациентов с *KRAS*-положительным статусом [11]. Однако наличие мутаций гена *KRAS* не влияет на эффективность проводимой химиотерапии [7]. С другой стороны, наличие aberrаций гена *KRAS* ассоциировано с ответом на терапию препаратами из группы ингибиторов контрольных точек иммунитета [12].

Для подбора ТКИ *EGFR* необходимо также выявление мутаций, ассоциированных с первичной резистентностью к терапии. Активирующие aberrации в гене *KRAS* являются наиболее частыми находками при НМКРЛ и могут служить предикторами отсутствия терапевтического эффекта при назначении ТКИ *EGFR* [10]. Также показана резистентность к терапии ТКИ *ALK* у *ALK*-положительных пациентов с *KRAS*-положительным статусом [11]. Однако наличие мутаций гена *KRAS* не влияет на эффективность проводимой химиотерапии [7]. С другой стороны, наличие aberrаций гена *KRAS* ассоциировано с ответом на терапию препаратами из группы ингибиторов контрольных точек иммунитета [12].

Мутации в гене *HER2*, в частности инсерции в 20 экзоне, и в гене *BRAF* ассоциированы с устойчивостью к ТКИ *EGFR* [13]. Однако точечная aberrация V600E в гене *BRAF* указывает на хороший терапевтический ответ при применении комбинации *BRAF*/*MEK* ингибиторов [5]. Опухоли с мутациями в генах *HER2* и *BRAF* чувствительны к стандартной химиотерапии [14].

Основной клинической проблемой является определение статуса нескольких клинически значимых генов в различных типах материала НМКРЛ, который обладает высокой генетической гетерогенностью. Таким образом, необходимо использование чувствительных молекулярно-генетических методов, которые могут одновременно выявлять различные типы мутаций.

Нами разработан метод мультитаргетной одноклеточной элонгации (МОЭ), который по-

зволяет детектировать до 10 целевых aberrаций в одной пробе и одновременно обладает высокой чувствительностью выявления мутантной ДНК. Особенностью метода является возможность создания панелей для определения точечных мутаций, связанных с ответом на терапию и прогнозом заболевания. Однако данный метод не оптимален для обнаружения большого числа делеций и инсерций в целевых генах, в частности в гене *EGFR*. Для детекции данного типа aberrаций возможно применение фрагментного анализа, также обладающего высокой чувствительностью. Таким образом, необходим комплексный методический подход при детекции различных мутаций при НМКРЛ.

Целью исследования было определение клинико-морфологических особенностей у пациентов с НМКРЛ с наличием активирующих мутаций в генах *EGFR*, *KRAS*, *BRAF* и *HER2* с помощью методов МОЭ и ФА.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

1. Сбор материала и создание биобанка.

Для выполнения поставленной цели на базе ПСПБГМУ им. И.П. Павлова был организован биобанк в соответствии с моделью биобанкирования Медицинского университета Белостока (Польша), стандартами компании Indivumed и международного консорциума биобанкирования (Wordwild biobank consortium).

Этапы биобанкирования:

1) Сбор данных пациента

Была разработана форма «Сбор данных пациента», предназначенная для пациентов с НМКРЛ. Целью анкеты являлся сбор исчерпывающих данных о здоровье пациента, статусе курения, семейном анамнезе, методах предоперационной диагностики, интраоперационных данных и отчетов патоморфологов.

2) Сбор образцов тканей

Образцы тканей после резекции опухоли обрабатывали в соответствии со стандартизированной процедурой, которая обеспечивает высокое качество биологического материала (рис. 1). Сразу после резекции опухоли образцы подвергали предварительной подготовке патоморфологами. Образцы помещали в криопробирки (жидкий азот) и пробирки с 4% забуференным формалином: центр опухоли (Tc), край опухоли (Tr) и окружающая неизменная ткань (Tp). Каждый этап сбора образцов документи-

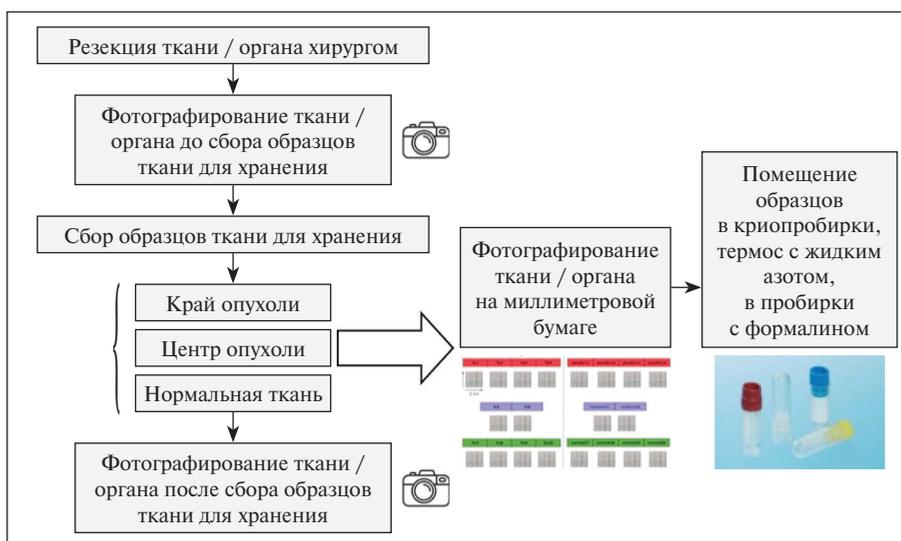


Рис. 1. Рабочий процесс обработки образцов ткани

Fig. 1. Workflow of processing tissue samples

ровали фотографически до и после помещения образцов в жидкий азот и формалин и вносили в отчет «Сбор данных пациента». Образцы тканей, фиксированные в формалине, подвергали последующей подготовке с целью помещения их в парафиновые блоки. Каждый образец, взятый из опухоли, был подвергнут патоморфологическому исследованию.

Таблица 1

Клинико-эпидемиологические данные пациентов, включенных в исследование

Table 1

Clinico-epidemiological features of the patients included in the study

Характеристика	Число пациентов, n (%)
Пол:	
мужской	39(65)
женский	21 (35)
Возраст, годы:	
<60	25(42)
>60	35 (58)
Статус курения:	
раньше курил/курит	37(62)
никогда не курил	23 (38)
Гистологический тип НМРЛ:	
аденокарцинома	29(48)
плоскоклеточная карцинома	30 (50)
крупноклеточная карцинома	1 (2)
Стадия по системе TNM (7-я редакция):	
IA	6
IB	9
IIA	6
IIB	3
IIIA	12
IIIB	10
IV	14

Каждой пробе был присвоен уникальный штрих-код, все образцы пациента сканировали перед помещением в криохранилище. Расположение проб в криохранилище, а также индивидуальные формы пациентов были занесены в электронную базу данных Freezer Pro.

2. Генетическое исследование опухоли

По описанному протоколу были собраны материалы 60 пациентов с НМКРЛ. Генетическому обследованию подвергалась центральная часть опухоли (Тс). Все пациенты, включенные в работу, подписали добровольное информированное согласие. Клинико-эпидемиологические данные пациентов представлены в табл. 1. Всем пациентам, включенным в исследование, проведено генотипирование опухолевого материала на наличие мутаций в генах *EGFR*, *KRAS*, *BRAF* и *HER2*.

Выделение нуклеиновых кислот проводили с помощью коммерческой системы QIAamp® DNA Mini Kit (Qiagen, Германия) в соответствии со спецификациями производителя. Качество и количество ДНК оценивали с помощью спектрофотометра BioDrop UV/VIS (SERVA, Германия).

Мультицелевая однонуклеотидная элонгация (МОЭ). Данный метод применен для определения 24 соматических точечных мутаций, включенных в практические рекомендации NCCN Guidelines® по ведению пациентов с НМКРЛ. С этой целью были созданы 3 генетические панели, охватывающие клинически значимые мутации в 18, 20 и 21 экзонах гена *EGFR*; в 12, 13 кодонах 2 экзона и в 61 кодоне 3 экзона гена *KRAS*; в 15 экзоне гена *BRAF* (табл. 2).

Описание метода, условий реакции и используемых праймеров для определения мутаций в генах *EGFR* и *KRAS* подробно изложены в предыдущей работе [15]. Праймеры для этапа ступенчатой поли-

меразной цепной реакции (ПЦР) и однонуклеотидной элонгации немаркированного праймера с целью детекции точечных aberrаций S768I в гене *EGFR* и V600E в гене *BRAF* были разработаны с использованием онлайн-программы «primer-BLAST» (National Center for Biotechnology Information).

Фрагментный анализ (ФА). Метод использован для обнаружения чувствительных к ТКИ *EGFR* делеций и инсерций в 19 экзоне, а также резистентных к данным ингибиторам инсерций в 20 экзоне генов *EGFR* и *HER2*. Так как данный метод позволяет детектировать только размер делеций и инсерций, для определения измененной последовательности мутантной аллели использовано секвенирование по Сэнгеру.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Высокая генетическая гетерогенность НМКРЛ создает трудности не только в подходах к лечению пациентов, но и в способах детекции aberrаций. Поиск новых aberrантных генов, вовлеченных в патогенез заболевания, и разработка препаратов, направленных на продукт данных генов, бросает вызов лабораторным методам генотипирования. Они должны быть не только чувствительны и специфичны, но также могут быть адаптированы для включения в панели для диагностики новых мутаций. Так, за последние 2 года в практические рекомендации NCCN Guidelines® по НМКРЛ были добавлены минорные мутации гена *EGFR*, ассоциированные с ответом на терапию ТКИ *EGFR*, а также мутация V600E гена *BRAF*. В проведенной ранее работе нашей исследовательской группой было показано, что МОЭ не уступает по чувствительности и специфичности ПЦР в реальном времени, однако обладает очень важным плюсом: открытостью и возможностью быстро добавлять новые aberrации в диагностические панели.

Таблица 2

Для изучения клинико-морфологических особенностей у пациентов с НМКРЛ, несущих ключевые драйверные aberrации, на базе ПСПБГМУ им. И.П. Павлова был сформирован криобанк биологических материалов.

Для детекции клинически значимых мутаций в гене *EGFR* (экзоны 18, 20 и 21), во 2 и 3 экзонах гена *KRAS*, V600E в гене *BRAF* были созданы 3 панели с помощью МОЭ. Особенностью МОЭ является возможность модификации панелей путем добавления новых предиктивных aberrаций в «горячих точках», которые включены в практические рекомендации. Для обнаружения сенситивных к таргетной терапии делеций и инсерций в 19 экзоне

Генетические панели для детекции клинически значимых aberrаций в генах *EGFR*, *KRAS* и *BRAF*

Genetic panel testing for detection clinically significant *EGFR*, *BRAF* and *KRAS* mutations

Панель 1		Панель 2		Панель 3	
Ген <i>EGFR</i>					
18 экзон	c.2155G>T (G719C) c.2155G>A (G719S) c.2156G>C (G719A)	c.34G>T (G12C) c.34G>A (G12S) c.34G>C (G12R) c.35G>C (G12A) c.35G>A (G12D)	Ген <i>BRAF</i>	c.1799T>A (V600E)	
20 экзон	C.23690T (T790M)	2 экзон гена <i>KRAS</i> c.35G>T (G12V) c.37G>T (G13C) c.37G>A (G13S) c.37G>C (G13R) c.38G>C (G13A) c.38G>A (G13D)	3 экзон гена <i>KRAS</i> C.1810A (Q61K) C.182A>T (Q61L) C.182A>G (Q61R) c.183A>C (Q61H) c.183A>T (Q61H)		
21 экзон	c.2573T>G (L858R) c.2582T>A (L861Q)		20 экзон гена <i>EGFR</i>	c.2303G>T (S768I)	

Table 2

гена *EGFR*, а также резистентных инсерций в 20 экзоне генов *EGFR* и *HER2* был использован ФА. Чувствительность 2 методов, по литературным и полученным нами в предыдущем исследовании данным, составила 1–2% мутантной ДНК в опухолевом материале [15–17]. Также нами продемонстрировано, что метод МОЭ позволяет определять до 48 копий/мкл мутантной ДНК.

В ходе исследования аберрации в гене *EGFR* были выявлены у 9 (15%) обследованных. Методом МОЭ выявлены следующие мутации в гене *EGFR*: в 18 экзоне – G719S (18% случаев мутаций в гене *EGFR*), в 20 экзоне – T790M и S768I (по 9%), и 2 точечные аберрации в 21 экзоне – L858R (18%). С помощью ФА в 19 экзоне гена *EGFR* были детектированы 5 идентичных делеций 15 нуклеотидов (46%). С использованием секвенирования по Сэнгеру определена последовательность делецированного участка экзона в мутантной аллели: с.2235_2249del15 (р.Е746_А750delELREA). Было показано преобладание делеций в 19 экзоне среди мажорных аберраций в данном гене: соотношение делеции в 19 экзоне и L858R составило 2,5:1. Схожие данные продемонстрированы Е.Н. Имянитовым и соавт. [18]. При этом делеции в 19 экзоне представляли собой исключительно последовательность с.2235_2249del15 (р.Е746_А750delELREA), что является наиболее распространенной аберрацией [17]. При этом, минорные мутации в гене *EGFR*, которые включены в практические рекомендации по ведению пациентов с НМКРЛ, были обнаружены в 22,2% случаев. Высокая распространенность данных аберраций выявлена нами впервые, что ставит вопрос о причинах столь частой встречаемости минорных мутаций. Однако эта проблема исследована недостаточно и требует дальнейшего изучения.

Дополнительно пациенты с НМКРЛ были разделены на 2 подгруппы в зависимости от статуса *EGFR* (группы *EGFR*⁺ и *EGFR*⁻), в которых сравнивали следующие клинично-эпидемиологические показатели: пол, возраст, статус курения больных, гистологический тип опухоли, стадия по TNM (табл. 3).

В исследуемой выборке у всех *EGFR*⁺-пациентов была гистологически верифицированная аденокарцинома легкого (р=0,0008). V. Boolell и соавт. [3] показали, что мутации в данном гене характерны преимущественно для аденокарциномы. Больные с мутацией в гене *EGFR* составили 31% всех больных аденокарциномой легкого, что несколько больше, чем по данным других отечественных исследовательских центров (20,2%) [19]. Это обусловлено прежде всего возможностью детектировать минорные аберрации в гене *EGFR*.

Аберрации в гене *EGFR* достоверно чаще встречались у женщин (р=0,0002) и у некурящих пациентов (р=0,0007), что также соответствует опубликованным данным [4]. Наиболее распространенные, по данным литературы, аберрации L858R и делеции в 19 экзоне наблюдались исключительно в

группе никогда не куривших пациенток. При этом нами не показано ассоциации мутаций в гене *EGFR* с возрастом пациента и наличием метастатической стадии.

Среди пациентов с НМКРЛ, включенных в исследование, мутации в гене *KRAS* обнаружены в 10% случаев, что значительно меньше, чем в других работах [10], где они составили 25%. При этом все альтерации были расположены в 12 кодоне гена *KRAS*: у 5 пациентов детектирована наиболее частая мутация G12C (83%), а у 1 – редкая по данным литературы – G12S (17%) (рис. 2) [10]. Аберрации в данном гене были обнаружены исключительно в группе пациентов мужского пола, курящих или куривших ранее, что также показано М. Del Re и соавт. [11]. В гистологическом опухолевом материале *KRAS*-положительных паци-

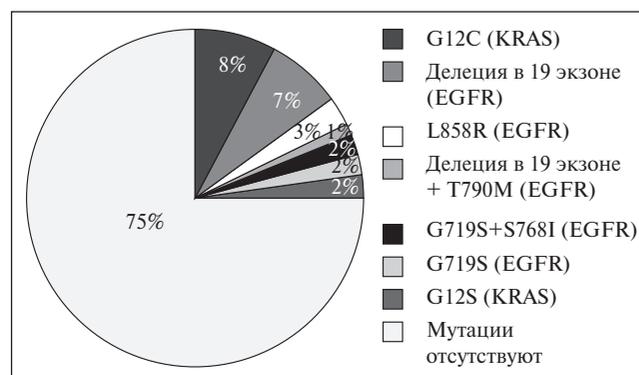
Таблица 3

Клинично-морфологическая характеристика *EGFR*-положительных и *EGFR*-отрицательных пациентов

Table 3

Clinicopathological features of the *EGFR*-positive and *EGFR*-negative patients

Характеристики	Подгруппа пациентов, n (%)		χ^2
	<i>EGFR</i> ⁺	<i>EGFR</i> ⁻	
Пол:			
женский (n=21)	8 (88,9)	13 (25,5)	0,0002
мужской (n=39)	1 (11,1)	38 (74,5)	
Возраст, годы			
<60 (n=25)	2 (22,2)	23 (45,1)	0,1994
>60 (n=35)	7 (77,8)	28 (54,9)	
Статус курения			
раньше курил/курит (n=37)	1(11,1)	36 (70,6)	0,0007
никогда не курил (n=23)	8 (88,9)	15 (29,4)	
Гистологический тип НМРЛ			
аденокарцинома (n=29)	9 (100,0)	20 (39,2)	0,0008
другое (n=31)	0(0,0)	31 (60,8)	
Стадия			
IA-IIIb (n=46)	6 (66,7)	40 (78,4)	0,4417
IV (n=14)	3 (33,3)	11 (21,6)	

Рис. 2. Мутации в генах *EGFR* и *KRAS*, выявленные у пациентов с НМКРЛFig. 2. *EGFR* and *KRAS* mutations in NSCLC patients

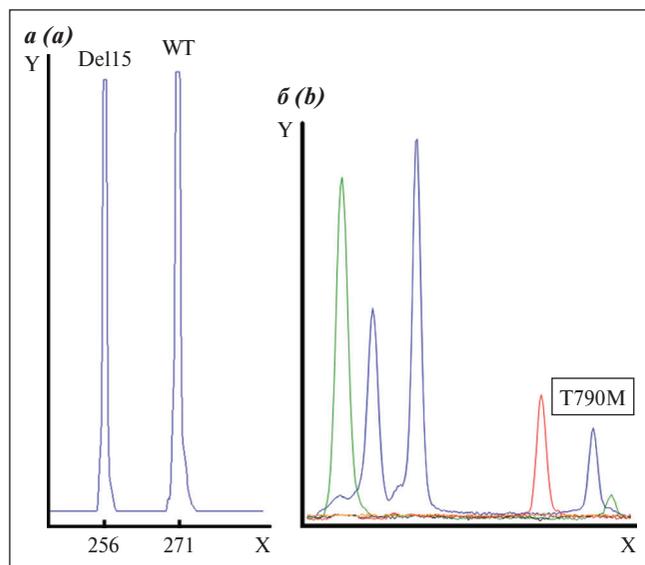


Рис. 3. Пациентка с приобретенной резистентностью к gefитинибу. С помощью ФА определена 1-я мутация — делеция 15 нуклеотидов в 19-й экзоне гена *EGFR* (а), а с помощью МОЭ — причина появления устойчивости к таргетной терапии — Т790М в гене *EGFR* (б)

Примечание: Del15 — делеция 15 нуклеотидов; WT — аллель дикого типа; по оси x — размер фрагмента; по оси y — интенсивность флуоресценции

Fig. 3. The patient with acquired resistance to Gefitinib. The first mutation, a 15-bp deletion in exon 19 of the *EGFR* gene, was detected by fragment analysis (a), and the cause of the emergence of resistance to targeted therapy, T790M in the *EGFR* gene, was determined by the multi-target single-base elongation (b)

Note: Del15 — deletion of 15 nucleotides; WT — wild-type allele; on the x — axis—the size of the fragment; on the y-axis—the intensity of fluorescence.

ентов аденокарцинома и плоскоклеточный рак были представлены в равной степени.

По литературным данным, мутации в гене *HER2*, в частности инсерции в 20 экзоне, и в гене *BRAF* встречаются при НМКРЛ с частотой соответственно 1–5 и около 2%. Причем aberrации в гене *HER2* чаще наблюдаются у молодых некурящих пациенток с аденокарциномой легкого [14]. У 3 таких пациентов, включенных в исследование, инсерции также не удалось обнаружить. Точечная мутация V600E в гене *BRAF* встречается преимущественно у курящих или

раньше куривших пациентов с аденокарциномой легкого [7]. Несмотря на большое число курильщиков в нашем исследовании aberrация V600E в гене *BRAF* не была обнаружена.

Генотипирование опухолевого материала имеет большое значение при планировании терапии у пациентов с НМКРЛ. Так, у не курившей пациентки с делецией в 19 экзоне гена *EGFR* в ходе проводимой терапии gefитинибом отмечено прогрессирование заболевания. Больной была выполнена лобэктомия, а при генотипировании биоптата, взятого из нового очага, обнаружена точечная мутация Т790М в 20 экзоне гена *EGFR*, которая является наиболее частой причиной резистентности к ТКИ (рис. 3). Опухолевый клон с наличием лекарственно-устойчивой мутации Т790М может быть преобладающим в ТКИ-наивных опухолях, но часто формируется в ходе воздействия таргетной терапии [20]. В связи с результатами обследования пациентке планируется проведение терапии препаратом 3-го поколения (осимертиниб), позволяющим преодолеть устойчивость опухоли.

У другого больного, в прошлом курившего, в опухолевом материале с помощью МОЭ были детектированы 2 сосуществующие точечные мутации: G719S в 18 экзоне и S768I в 20 экзоне гена *EGFR*. Данные aberrации чаще встречаются в составе сосуществующих мутаций [8]. В С. Chiu и соавт. [19], показано, что данный тип мутаций ассоциирован с более высокой частотой объективных ответов и выживаемостью без прогрессирования по сравнению с одиночными мутациями G719X и S768I.

Комплексный методологический подход детекции мутаций включающий МОЭ и ФА, позволил обнаруживать разнообразные типы aberrаций в генах *EGFR* и *KRAS* у 25% пациентов с НМКРЛ. Расширенная панель генотипирования биоптатов НМКРЛ позволила детектировать минорные мутации в гене *EGFR*.

* * *

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Bray F., Jacques Ferlay, Isabelle Soerjomataram, Siegel R.L., Torre L.A., Jemal A. Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J. Clin.* 2018. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>.
2. Arora R., Krishnan V. Selective Targeting of the L858R Mutation (EGFR) in Non-Small Cell Lung Cancer: A Mechanism for Advancing Targeted Chemotherapy. *Front Oncol.* 2017; 7. <https://doi.org/10.3389/onc.2017.00104>.
3. Sokolenko A.P., Imyanitov E.N. Molecular Diagnostics in Clinical Oncology. *Front Mol. Biosci.* 2018; 5: 76. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2018.00076>.
4. Yang Y., Shen X., Li R., Shen J., Zhang H., Yu L. et al. The detection and significance of EGFR and BRAF in cell-free DNA of peripheral blood in NSCLC. *Oncotarget.* 2017. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.17937>.
5. Лактионов К. К., Артамонова Е. В., Бредер В. В., Горбунова В. А., Моисеенко Ф. В., Реутова Е. В. и соавт. Практические рекомендации по лекарственному лечению немелкоклеточного рака легкого. Злокачественные опухоли: Практические рекомендации RUSSCO #3s2. 2018; 8: 30–46. (Laktionov K.K., Artamonova E.V., Breder V.V., Gorbunova V.A., Moiseenko F.V., Reutova E.V. et al. Practical guidelines for drug treatment of non-small cell lung cancer. *Malignant tumors: Practical guidelines RUSSCO #3s2.* 2018; 8: 30–46 (in Russian))

6. Lewandowska M.A., Czubak K., Klonowska K., Jozwicki W., Kowalewski J., Kozlowski P. The use of a two-tiered testing strategy for the simultaneous detection of small EGFR mutations and EGFR amplification in lung cancer. *PLoS One*. 2015. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.01117983>.
7. Ettinger D.S., Aisner D.L., Wood D.E., Akerley W., Bauman J., Chang J.Y. et al. NCCN Guidelines Insights: Non-Small Cell Lung Cancer, Version 5.2018. *J. Natl Compr Cancer Netw*. 2018. <https://doi.org/10.6004/jnccn.2018.0062>.
8. O'Kane G.M., Bradbury P.A., Feld R., Leigh N.B., Liu G., Pisters K.M. et al. Uncommon EGFR mutations in advanced non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2017.04.016>.
9. Lavdovskaia E.D., Iyevleva A.G., Sokolenko A.P., Mitiushkina N.V., Preobrazhenskaya E.V., Tiurin V.I. et al. EGFR T790M Mutation in TKI-Naive Clinical Samples: Frequency, Tissue Mosaicism, Predictive Value and Awareness on Artifacts. *Oncol Res Treat*. 2018. <https://doi.org/10.1159/000491441>.
10. Maus M.K.H., Grimmering P.P., Mack P.C., Astrow S.H., Stephens C., Zeger G. et al. KRAS mutations in non-small-cell lung cancer and colorectal cancer: Implications for EGFR-targeted therapies. *Lung Cancer*. 2014; 83: 163–7. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2013.11.010>.
11. Del Re M., Rofi E., Restante G., Crucitta S., Arrigoni E., Fogli S. et al. Implications of KRAS mutations in acquired resistance to treatment in NSCLC. *Oncotarget*. 2018. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.23553>.
12. Román M., Baraibar I., López I., Nadal E., Roifo C., Vicent S. et al. KRAS oncogene in non-small cell lung cancer: Clinical perspectives on the treatment of an old target. *Mol Cancer* 2018. <https://doi.org/10.1186/s12943-018-0789-x>.
13. Planchard D., Popat S., Kerr K., Novello S., Smit E.F., Faivre-Finn C. et al. Metastatic non-small cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up†. *Ann Oncol*. 2018. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdy275>.
14. Mazères J., Barlesi F., Filleron T., Besse B., Monnet I., Beau-Faller M. et al. Lung cancer patients with HER2 mutations treated with chemotherapy and HER2-targeted drugs: Results from the European EUHER2 cohort. *Ann Oncol*. 2016. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdv573>.
15. Мусаелян А.А., Чистяков И.В., Назаров В.Д., Лапин С.В., Согоян М.В., Хальчицкий С.Е., Эмануэль В.А., Лобачевская Т.В., Акопов А.А. Оптимизация метода мультитаргетной однонуклеотидной элонгации для определения соматических мутаций при злокачественных новообразованиях. *Молекулярная медицина*. 2019; 17 (2): 44–9. <https://doi.org/10.29296/24999490-2019-02-06> (Musaelyan A.A., Chistyakov I.V., Nazarov V.D., Lapin S.V., Sogoyan M.V., Khalchitsky S.E., Emanuel W.L., Lobachevskaya T.W., Akopov A.L. Optimization of the method of the multi-target single-base elongation for the detection of somatic mutations in malignancies. *Molekulyarnaya meditsina*. 2019; 17 (2): 44–9 <https://doi.org/10.29296/24999490-2019-02-06> (in Russian))
16. Su Z., Dias-Santagata D., Duke M., Hutchinson K., Lin Y.L., Borger D.R. et al. A platform for rapid detection of multiple oncogenic mutations with relevance to targeted therapy in non-small-cell lung cancer. *J. Mol. Diagnostics*. 2011; 13: 74–84. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2010.11.010>.
17. Magnin S., Viel E., Baraquin A., Valmary-Degano S., Kantelip B., Pretet J.-L. et al. A multiplex SNApshot assay as a rapid method for detecting KRAS and BRAF mutations in advanced colorectal cancers. *J. Mol. Diagn*. 2011. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2011.05.010>.
18. Imyanitov N.E., Demidova A.I., Gordiev M., Filipenko M., Kekeyeva V.T., Moliaka K.Y. et al. Distribution of EGFR Mutations in 10,607 Russian Patients with Lung Cancer. 2016; 20. <https://doi.org/10.1007/s40291-016-0213-4>.
19. Chiu C.H., Yang C.T., Shih J.Y., Huang M.S., Su W.C., Lai R.S. et al. Epidermal growth factor receptor tyrosine Kinase inhibitor treatment response in advanced lung adenocarcinomas with G719X/L861Q/S768I mutations. *J. Thorac. Oncol*. 2015. <https://doi.org/10.1097/JTO.0000000000000504>.
20. Lim S.M., Syn N.L., Cho B.C., Soo R.A. Acquired resistance to EGFR targeted therapy in non-small cell lung cancer: Mechanisms and therapeutic strategies. *Cancer Treat Rev*. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2018.02.006>.

Поступила 20 октября 2019 г.

Для цитирования: Мусаелян А.А., Назаров В.Д., Лапин С.В., Чистяков И.В., Комаров И.В., Ткаченко О.Ю., Согоян М.В., Бердник Е.В., Мазинг А.В., Эмануэль В.А., Акопов А.А., Орлов С.В., Багненко С.Ф. Молекулярно-генетическая характеристика немелкоклеточного рака легкого с использованием метода мультитаргетной однонуклеотидной элонгации и фрагментного анализа. *Молекулярная медицина*. 2020; 18 (3): 49–55. <https://doi.org/10.29296/24999490-2020-03-06>

For citation: Musaelyan A.A., Nazarov V.D., Lapin S.V., Chistyakov I.V., Komarov I.V., Tkachenko O.U., Sogoyan M.V., Berdnik E.W., Mazing A.V., Emanuel W.L., Akopov A.L., Orlov S.V., Bagnenko S.F. Molecular genetic characteristics of non-small cell lung cancer using multi-target single-base elongation and fragment analysis. *Molekulyarnaya meditsina*. 2020; 18 (3): 49–55 (in Russian). <https://doi.org/10.29296/24999490-2020-03-06>