



ПРОГРАММА RUSSCO «СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ»

EGFR

ALK

RAS

BRAF

ROS

BRCA

практическое руководство для врачей

www.cancergenome.ru

Программа реализуется при поддержке

MERCK



NOVARTIS



AMGEN®

Roche

Уважаемые коллеги!

Несомненный прогресс в области молекулярно-биологических исследований злокачественных новообразований привёл к открытию присущих опухолевой клетке свойств и пониманию многих процессов канцерогенеза. Более того, удалось идентифицировать молекулярные мишени, воздействуя на которые можно остановить пролиферацию клеток, а следовательно, и прогрессию опухолевого заболевания. Всё это привело к кардинальному изменению подхода к созданию современных противоопухолевых препаратов – препарат направлен на мишень, роль которой в клетке хорошо изучена.

Новым этапом развития лекарственного лечения злокачественных новообразований должно стать внедрение в клиническую практику методов молекулярно-генетической диагностики. Определение в опухоли конкретной мишени будет служить показанием к назначению таргетного препарата. Классическим примером является определение в опухоли эстрогеновых и прогестероновых рецепторов, при наличии которых назначают антиэстрогенную терапию большим раком молочной железы.

Следуя логике развития лекарственной терапии опухолей, Общероссийская общественная организация «Российское общество клинической онкологии» с 2011 года реализует программу «Совершенствование молекулярно-генетической диагностики в Российской Федерации с целью повышения эффективности противоопухолевого лечения». Основной задачей Программы является создание сети специализированных Центров молекулярной диагностики, в которых будут осуществляться высокотехнологичные диагностические процедуры и которые дадут толчок развитию молекулярно-генетической диагностики в Российской Федерации.

В настоящее время в программе участвуют 25 лабораторий различных онкологических учреждений, выполняющих определение мутации гена EGFR в опухолевой ткани, в цитологическом материале и плазме крови, транслокации в генах ALK и ROS1, мутацию генов KRAS, NRAS, BRAF, BRCA1/2. С момента реализации программы в ней участвуют онкологические учреждения из 82 регионов нашей страны, в базе данных зарегистрировано более 1972 онкологов, которые направляли на исследование биологический материал своих пациентов. Было выполнено более 60000 тестов у более чем 50000 больных с различными злокачественными опухолями. Это позволило нашим больным с различными злокачественными опухолями целенаправленно получать современное и высокоэффективное лечение.

Тюлядин Сергей Алексеевич

Заместитель директора,
заведующий отделением клинической фармакологии
ФГБУ РОНЦ им. Н. Н. Блохина Минздрава России,
доктор медицинских наук, профессор

Российское общество клинической онкологии является одним из ведущих профессиональных объединений, включающих специалистов в области лекарственного лечения, радиологов, патоморфологов, специалистов диагностических служб, исследователей в области изучения биологических свойств новообразований с целью разработки, развития и внедрения в клиническую практику мультидисциплинарных подходов и улучшения качества медицинской помощи онкологическим больным.

Именно поэтому Российское общество клинической онкологии в 2011 году начало реализацию инновационной программы «Совершенствование молекулярно-генетической диагностики в Российской Федерации», в которой принять участие может каждый врач. Данная программа позволит пересмотреть подходы к лечению онкологических пациентов в России.

В настоящее время назначение многих диагностических и лечебных мероприятий в онкологии основывается на статистической вероятности получения эффекта, зачастую без учёта каких-либо индивидуальных характеристик пациента. Подобный эмпирический подход имеет существенные клинические и экономические недостатки. Например, частота ответа новообразований на большинство противоопухолевых препаратов находится в пределах 20-80%; таким образом, многие онкологические больные могут получать дорогостоящие лекарственные схемы без заметного результата, при этом страдая от значительных побочных воздействий цитостатиков. Поиск методов, позволяющих прогнозировать эффективность того или иного лечения, представляется исключительно важной задачей. Наиболее перспективным направлением в данной области является

идентификация молекулярных характеристик новообразований, ассоциированных со специфическим спектром чувствительности и резистентности трансформированных клеток к лекарственным препаратам.

Несколько соответствующих молекулярных тестов уже внедрены в мировую онкологическую практику. Их использование позволило увеличить клиническую эффективность применяемой терапии, а также снизить себестоимость лечения за счёт сознательного отказа от заведомо неэффективных вмешательств. В частности, при лечении рака толстой кишки использование антител к рецептору эпидермального фактора роста (epidermal growth factor receptor, EGFR) – цетуксимаба и панитумумаба – допускается только в том случае, если в опухоли отсутствует мутация в онкогене (K)RAS. Низкомолекулярные ингибиторы EGFR (гефитиниб и эрлотиниб), применяемые для терапии рака лёгкого, рекомендуются в первую очередь назначать тем больным, у которых обнаружена активирующая мутация данного рецептора. Другим примером молекулярно направленной терапии является новый ингибитор тирозинкиназы ALK-кризотиниб, который назначается только при выявлении транслокации гена ALK методом FISH у пациентов с НМРЛ. Использование иммуногистохимических и/или цитогенетических методов позволило разработать эффективные подходы для отбора больных на лечение антагонистами эстрогенов, ритуксимабом, трастузумабом, иматинибом и т.д.

За последние годы достигнуты значительные успехи в изучении патогенетических основ развития меланомы и сделан огромный шаг к выявлению новых потенциальных молекулярных мишеней. В частности, применение экспериментального ингибитора протеинкиназы BRAF для лечения меланомы оказа-

До недавнего времени в клинической онкологии были утверждены к применению два молекулярно-генетических теста: на мутации в генах EGFR и (K)RAS. Новым методом, внедренным в диагностическую практику, стал FISH-test, позволяющий выявить транслокацию гена ALK при НМРЛ.

В настоящее время применяются также тесты на выявление мутаций гена BRAF и тесты для выявления статуса мутаций в генах BRCA1 и BRCA2.

Молекулярно-генетические исследования, реализуемые в рамках Программы

Название теста	Цель тестирования	Пациенты, которым показан тест	Пригодные для теста материалы
Тест на мутации гена EGFR	Отбор пациентов на терапию низкомолекулярными ингибиторами EGFR	Пациенты с метастатическим или местнораспространенным немелкоклеточным раком легкого (НМРЛ)	Гистологический блок, цитологический материал, плазма крови (см. правила выбора материала для EGFR-тестирования)
Тест на транслокацию гена ALK	Отбор пациентов на терапию ингибитором ALK	Пациенты с метастатическим или местнораспространенным немелкоклеточным непилоскоклеточным раком легкого с отсутствием мутации гена EGFR	Гистологический блок
Тест на транслокацию ROS1	Отбор пациентов на терапию кризотинибом	Пациенты с метастатическим или местнораспространенным немелкоклеточным непилоскоклеточным раком легкого с отсутствием мутации гена EGFR и транслокации ALK	Гистологический блок
Тесты на мутации генов семейства RAS	Отбор пациентов на терапию моноклональными антителами к EGFR	Пациенты с метастатическим колоректальным раком, которым планируется проведение химиотерапевтического лечения в комбинации с моноклональными антителами	Гистологический блок
Тест на мутацию гена BRAF	Отбор пациентов на терапию низкомолекулярными ингибиторами мутированного фермента BRAF	Пациенты с метастатической меланомой (IIIС-IV стадии)	Гистологический блок
		Пациенты с распространенным немелкоклеточным раком легкого при отсутствии мутации гена EGFR	Гистологический блок
Тест на мутации генов BRCA1 и BRCA2	Отбор пациентов на терапию PARP-ингибиторами	Пациентки с платиночувствительным рецидивом рака яичника	Гистологический блок с опухолевой тканью, блок с нормальной тканью, цельная кровь в пробирке с ЭДТА (см. правила выбора материала для BRCA-тестирования)
Тест на мутацию T790M в гене EGFR	Отбор пациентов на терапию осимертинибом	Пациенты с прогрессией (симптомной или бессимптомной), получавшие или получающие ингибиторы тирозинкиназы EGFR	Гистологический блок, цитологический материал, плазма

Молекулярно-генетические тесты, реализуемые в программе

Для удобства врачей разработано два способа работы в базе данных Программы:

- через электронную базу данных (для врачей, имеющих доступ в Интернет);
- через горячую телефонную линию (для врачей, у которых нет доступа в Интернет).



Если у врача есть доступ в Интернет:

Регистрация в Программе:
Зайти на сайт www.cancergenome.ru , заполнить анкету, получить логин и пароль по электронной почте
Отправка материала на тестирование:
Зайти в базу данных www.cancergenome.ru под своим логином и паролем, заполнить данные пациента и выбрать желаемый профиль тестирования
Документы, которые необходимо передать в лабораторию с отправляемым биологическим материалом:
<ul style="list-style-type: none">• Письменное согласие пациента на обработку персональных данных и передачу биологического материала (2 экз.; скачать и распечатать из базы данных: раздел Инструкции/Документы → Согласие пациента)• Направление на анализ (скачать и распечатать из базы данных)
Способы доставки биоматериала и документов:
Врач может выбрать один из способов доставки: <ul style="list-style-type: none">• Курьерская доставка (курьер отвозит материал и документы в лабораторию)• Самостоятельная доставка (врач или пациент самостоятельно доставляют материал и документы в лабораторию)
Курьерская доставка:
В течение 2-х рабочих дней с момента забора материала курьером
Способ получения результата исследования:
Заключение с результатом исследования можно просмотреть в электронной базе (кнопка Выполнить отчёт → Заключение)



Если у врача нет доступа в Интернет:

Регистрация в Программе:
Позвонить на горячую линию 8-800-600-36-70
Отправка материала на тестирование:
Позвонить на горячую линию 8-800-600-36-70, продиктовать оператору данные пациента и указать желаемый профиль тестирования
Документы, которые необходимо передать в лабораторию с отправляемыми биологическими материалами:
<ul style="list-style-type: none">• Письменное согласие пациента на обработку персональных данных и передачу биологического материала (2 экз.; согласовать с оператором горячей линии способ получения бланка согласия)• Направление на анализ (напечатать в произвольной форме, ФИО пациента, ФИО врача, назначенный анализ)
Способы доставки биоматериала и документов:
Врач может выбрать один из способов доставки в лабораторию, участвующую в Программе: <ul style="list-style-type: none">• Курьерская доставка (курьер отвозит материал и документы в лабораторию)• Самостоятельная доставка (врач или пациент самостоятельно доставляют материал и документы в лабораторию)
Срок доставки биоматериала и документов:
В течение 2-х рабочих дней с момента забора материала курьером
Способ получения результата исследования:
Заключение с результатом тестирования врач может самостоятельно скачать из базы данных, либо получить на e-mail, указанный в базе данных при регистрации.



Требования к отправляемому материалу

ОБЩИЕ ТРЕБОВАНИЯ

- Образцы биологического материала должны быть промаркированы врачом. Маркировка должна быть водостойкой и стойкой к истиранию. Номер гистологического блока должен совпадать с номером на полученном с этого блока стекле-отпечатке (отправляется с блоком) и номером гистологического заключения, указанным в направлении на анализ.
- Чтобы соблюсти условия транспортировки, необходимые для получения достоверного результата исследования, важно при заказе курьера верно указывать тип отправляемого материала.

ГИСТОЛОГИЧЕСКИЙ МАТЕРИАЛ

- Материал должен представлять собой парафиновый гистологический блок (фиксированный в формалине и залитый в парафин фрагмент ткани).
- Пригодны как парафиновые блоки старого образца (размером 2х2 см, иногда закрепленные на дощечке), так и блоки нового образца (3х4 см, залитые в пластиковой кассете).
- Непригодны образцы ткани, залитые в целлоидин.
- Температура плавления парафина, применяемого для изготовления блока, не должна превышать 60°C.
- Материал должен фиксироваться в 10%-ном нейтральном (забуференном формалине).
- Допускается, но нежелательна, фиксация в этаноле, ацетоне.
- Недопустимо использовать для фиксации фиксаторы Кларка и Замбони, Ценкера, Карнуа, Буэна, кислые растворы (в т.ч. незабуференный формалин).
- Фиксация материала должна быть начата не более чем через 1 час после взятия ткани.
- Время фиксации должно определяться типом и размером фиксируемой ткани и не должно превышать:
 - 12-24 ч. для операционного материала;
 - 6-8 ч. для биоптатов.
- Пригоден, как биопсийный, так и операционный материал.
- Материал может быть получен как из первичной опухоли, так и из метастазов.
- Допускается отправка блоков, изготовленных несколько лет назад и хранящихся в патологоанатомическом архиве.
- Содержание опухолевых клеток в препарате должно быть не менее 20%.
- К парафиновому блоку необходимо прикладывать окрашенный гистологический препарат, полученный непосредственно из этого блока («стекло-отпечаток»).
- Номер блока и номер на «стекле-отпечатке» должны совпадать.
- «Стекло-отпечаток» рекомендуется завернуть в плотную бумагу, чтобы избежать боя при транспортировке.
- Для исследования желательно направлять два (не более) блока с опухолевым

материалом с целью передачи одного из них в Биобанк или «стружку» с гистологического блока в пробирке типа «Эппендорф».

ЦИТОЛОГИЧЕСКИЙ МАТЕРИАЛ

- Материал может быть представлен:
 - окрашенными гистологическими стеклами (только предметные стекла, без покровных)
 - цитологическими блоками (цитоблоками)
 - цитоспинами
- Не принимаются на анализ БАЛ, смывы, мокрота в необработанном (жидком) виде.
- Материал должен отправляться только после подтверждения диагноза НМРЛ опытным цитологом.
- Материал на стеклах должен содержать не менее 200 опухолевых клеток; доля опухолевых клеток среди всех клеток образца – не менее 30%. Если эти условия не удается соблюсти в препарате на одном цитологическом стекле, то рекомендуется направить на анализ 2 и более стёкол данного пациента.
- К препарату должны быть приложены комментарии цитолога о количестве и % опухолевых клеток на стекле.
- Область наибольшего скопления опухолевых клеток должна быть обведена маркером или карандашом.
- Фиксация и окраска препарата не препятствуют осуществлению теста, когда они проведены согласно установленным технологиям и выполнены без нарушений, ведущих к деградации генетического материала.
- Цитологические препараты должны иметь маркировку. Номер цитологического препарата должен совпадать с номером, указанным в направлении на анализ.
- Упаковка материала должна обеспечить его сохранность и исключить повреждение при транспортировке. Предпочтительна упаковка из плотного материала (картона) с наполнителем, предотвращающим свободное перемещение препаратов в упаковке.
- Условия транспортировки при самостоятельной доставке материала в лабораторию должны обеспечивать сохранность клеток на стекле.

ПЛАЗМА КРОВИ (ИСПОЛЬЗУЕТСЯ ДЛЯ EGFR-ТЕСТИРОВАНИЯ И ТЕСТИРОВАНИЯ НА МУТАЦИЮ T790M В ГЕНЕ EGFR)

При получении, хранении и отправке плазмы строго следуйте пошаговой инструкции:

1. Получите венозную кровь пациента (не менее 10 мл) в вакуумные пробирки со стабилизатором ЭДТА (фиолетовая крышка).
Используйте иглу максимального возможного диаметра.
Можно использовать несколько пробирок на одного пациента.
Не позднее, чем через 1 час после получения крови отделите плазму.
2. Центрифугируйте пробирки с кровью 10 мин. при 1.000-2.000 g.
3. Не задевая осадок, отберите пипеткой из всех пробирок с кровью, полученной у пациента, верхнюю прозрачную фракцию (плазму) и перенесите её в чистую пробирку, пригодную для дальнейшего центрифугирования.

Если исходно использовались несколько пробирок на одного пациента, то полученную из них плазму можно объединить в одной новой пробирке. Первичную пробирку с осадком форменных элементов утилизируйте.

4. Центрифугируйте пробирку с плазмой 10 мин. при 2.000-16.000 g. Если такой режим центрифугирования недоступен, центрифугируйте плазму 10 мин. при 1.000-2.000 g.
5. Не задевая осадок на дне пробирки, отберите пипеткой верхнюю прозрачную фракцию и перенесите её в чистую пробирку, пригодную для замораживания (с завинчивающейся крышкой).
6. Убедитесь, что в пробирке с плазмой нет осадка. При наличии осадка повторите центрифугирование и перенесите надосадочную жидкость в новую чистую пробирку для замораживания.
7. Промаркируйте пробирку с плазмой инициалами пациента и датой забора крови. Убедитесь, что для маркировки используется водостойкий маркер.
8. Немедленно передайте пробирку в молекулярно-генетическую лабораторию или поместите ее в морозильник с температурой -70°C или (при его отсутствии) – в морозильник с температурой $\leq -20^{\circ}\text{C}$.

Если Вы отправляете плазму курьерской службой, то не доставайте пробирку из морозильника до прибытия курьера. По прибытии курьера убедитесь, что при нём есть контейнер с сухим льдом. При отсутствии сухого льда позвоните на горячую линию 8-800-600-36-70.

ЦЕЛЬНАЯ КРОВЬ (ИСПОЛЬЗУЕТСЯ ТОЛЬКО ДЛЯ ВРСА-ТЕСТИРОВАНИЯ):

- Кровь необходимо собрать в пробирки с консервантом ЭДТА (с фиолетовой крышкой)
- До прибытия курьера кровь может храниться в холодильнике (при $2-8^{\circ}\text{C}$) до 3-х дней или в морозильнике (при $\leq -18^{\circ}\text{C}$) – длительно.
- Кровь можно транспортировать в лабораторию при комнатной температуре до 3-х дней.

Участники проекта



Врачи

Любые врачи, работающие в области онкологии (врач-онколог, химиотерапевт, патоморфолог, цитолог, врач паллиативной медицины), желающие выполнить тест.

Лаборатории



Федеральное государственное бюджетное учреждение

«Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Петрова»

Министерства здравоохранения Российской Федерации

Отдел биологии опухолевого роста

г. Санкт-Петербург

Руководитель проекта в лаборатории:

Имянитов Евгений Наумович, руководитель отдела биологии опухолевого роста; Санкт-Петербургская Государственная педиатрическая медицинская академия, заведующий кафедрой медицинской генетики ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России; Санкт-Петербургская медицинская академия последипломного образования, профессор кафедры онкологии, доктор медицинских наук.

Основные направления исследований:

- молекулярный патогенез опухолей у человека;
- молекулярные основы онкологической предрасположенности;
- молекулярные механизмы канцерогенеза;
- разработка методов молекулярной диагностики в онкологии;
- прикладные аспекты молекулярной медицины.



Государственное бюджетное учреждение здравоохранения города Москвы

«Московская городская онкологическая больница №62

Департамента здравоохранения города Москвы»

Лаборатория молекулярной биологии

г. Москва

Руководитель проекта в лаборатории:

Демидова Ирина Анатольевна, заведующая лабораторией молекулярной биологии, кандидат медицинских наук

Основные направления исследований:

- определение генетических нарушений при немелкоклеточном раке легких (EGFR, KRAS, BRAF, EML4/ALK, cMET);
- мутационный статус при колоректальном раке, меланоме, наследственных раках молочной железы и яичников;

- исследование структуры генов антибактериальной резистентности микроорганизмов семейства Enterobacteriaceae.



**Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Национальный медицинский исследовательский
центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России**
Лаборатория онкогеномики
Лаборатория клинической онкогенетики
г. Москва

Руководитель проекта в лаборатории:

Наталья Николаевна Мазуренко, заведующая лабораторией, доктор биологических наук, профессор.

Руководитель проекта в лаборатории:

Любченко Людмила Николаевна, заведующая лабораторией, доктор биологических наук, профессор.

Основные направления исследований:

- изучение молекулярно-генетических маркеров опухолей;
- определение мутаций в генах EGFR, ALK, KRAS при раке легкого и колоректальном раке, KIT и PDGFR при стромальных опухолях желудочно-кишечного тракта, BRAF при меланомах, GNAQ при увеальных меланомах и др.



**Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Медико-генетический научный центр»**
Лаборатория эпигенетики

Руководитель проекта в лаборатории:

Кекеева Татьяна Владимировна, ведущий научный сотрудник, кандидат медицинских наук.

Основные направления исследований:

- молекулярно-генетические нарушения при различных видах опухолей, в частности рака предстательной железы, рака легкого, опухолей мягких тканей;
- дифференциальная диагностика сарком;
- определение чувствительности опухолей к таргетным химиотерапевтическим препаратам.



**Государственное бюджетное учреждение здравоохранения
«Клинический онкологический диспансер №1»
Министерства здравоохранения Краснодарского края**
Лаборатория молекулярной генетики
г. Краснодар

Руководитель проекта в лаборатории:

Моляка Юрий Константинович, заведующая лабораторией, кандидат медицинских наук.

Основные направления исследований:

- диагностика наследственной предрасположенности к раку молочной железы и/или яичника;
- молекулярно-генетические исследования в онкогематологии;
- молекулярно-генетическая диагностика мутаций и полиморфных вариантов.



**Научно-исследовательский институт онкологии
Федерального государственного бюджетного научного учреждения
«Томский национальный исследовательский
медицинский центр Российской академии наук»
г. Томск**

Руководитель проекта в лаборатории иммунологии с группой молекулярной онкологии:

Чердынцева Надежда Викторовна, заведующая лабораторией; заместитель директора по науке НИИ онкологии СО РАМН, доктор биологических наук, профессор.

Основные направления исследований:

- изучение молекулярно-генетических маркеров опухолей;
- тестирование полиморфизмов, генной экспрессии, мутаций;
- фармакогенетика;
- определение мутаций в генах EGFR и KRAS при раке легкого, BRCA при раке молочной железы и яичников.

Руководитель проекта в лаборатории патологической анатомии с группой иммуногистохимии:

Перельмутер Владимир Михайлович, заведующий лабораторией, доктор медицинских наук, профессор.

Основные направления исследований:

- иммуногистохимия (более 150 моноклонов), в том числе HER2-neu, EGFR и др.;
- гибридизация (FISH, CISH);
- лазерная микродиссекция.



**Государственное бюджетное учреждение здравоохранения
«Республиканский клинический онкологический диспансер»
Министерства здравоохранения Республики Татарстан
Молекулярно-диагностическая лаборатория
г. Казань**

Руководитель проекта в лаборатории:

Гордиев Марат Гордиевич, зав. молекулярно-диагностической лабораторией.

Основные направления исследований:

- определение мутаций EGFR (del746-750 в 19 экзоне и Leu858Arg в 21 экзоне) в немелкоклеточном раке легкого. Чувствительность к препаратам ингибиторам EGFR;
- определение мутаций в гене (K)RAS – шесть мутаций 12-13 кодоне (gly12ala, gly12asp, gly12arg, gly12cys, gly12ser, gly12val) и одна мутация 13 кодона (K)RAS (gly13asp);
- чувствительность к препаратам анти-EGFR антителам;
- ПЦР диагностика клональных перестроек генов тяжёлых и лёгких цепей иммуноглобулинов и Т-клеточных рецепторов.

Научная работа лаборатории:

- участие в совместной программе между Fox Chase Cancer Center, National Cancer Institute и Республиканским Онкологическим диспансером по изучению полиморфизма генов никотиновой зависимости у онкологических больных.



Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова Дальневосточного отделения Российской академии наук
Отделение молекулярно-генетических экспертиз Государственного казенного учреждения здравоохранения «Приморское краевое бюро судебно-медицинской экспертизы» (ГКУЗ «ПК БЮРО СМЭ»)
г. Владивосток

Руководитель проекта в лаборатории:

Кожемяко Валерий Борисович, заведующий лабораторией, кандидат биологических наук, доцент РАН.

Основные направления исследований:

- поиск мРНК, секвенирование и создание систем экспрессии генов морских организмов;
- применение рекомбинантных белков и ферментов морских организмов в качестве инструментов молекулярной биологии;
- изучение экспрессии генов человека под воздействием некоторых факторов;
- популяционные генетические исследования.



Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук
Лаборатория фармакогеномики
г. Новосибирск

Руководитель проекта в лаборатории:

Филипенко Максим Леонидович, кандидат биологических наук.

Основные направления исследований:

- разработка методов выявления структурного полиморфизма геномов;
- молекулярно-генетическая диагностика наследственных и мультифакториальных заболеваний человека, фармакогенетические исследования – выявление соматических мутаций в опухолях и внеклеточных;
- дизайн, клонирование и экспрессия рекомбинантных белков;
- системная биология и анализ геномных и транскриптомных данных;
- исследование молекулярных механизмов возникновения заболеваний человека и действия лекарственных препаратов - системная биология и биоинформатика микроорганизмов.



Государственное бюджетное учреждение здравоохранения Свердловской области «Свердловский Областной онкологический Диспансер»
Лаборатория молекулярной биологии на базе отделения клинической лабораторной диагностики
г. Екатеринбург

Руководитель проекта в лаборатории:

Сергеева Любовь Анатольевна, заведующая отделением клинической лабораторной диагностики.

Основные направления исследований:

- определение соматических мутаций у онкологических больных.



**Государственное бюджетное учреждение здравоохранения
«Республиканский клинический онкологический диспансер
Министерства здравоохранения Республики Башкортостан»
Лаборатория клинико-диагностическая
г. Уфа**

Руководитель проекта в лаборатории:

Фаттахова Динара Узбековна, кандидат биологических наук.

Основные направления исследований:

- клинические (биохимические гематологические общеклинические иммунологические бактериологические исследования системы гемостаза), включая молекулярно-генетические.



**Краевое государственное бюджетное учреждение здравоохранения
«Алтайский краевой онкологический диспансер»
Лаборатория молекулярной диагностики
Патологоанатомическое отделение
г. Барнаул**

Руководитель проекта в лаборатории:

Пупкова Елена Эмильевна, заведующая лабораторией.

Руководитель проекта в лаборатории:

Авдалян Ашот Меружанович, заведующий лабораторией, доктор медицинских наук.

Основные направления исследований:

- диагностика наследственной предрасположенности к раку молочной железы и/или яичника, раку предстательной и поджелудочной железы, толстой кишки, желудка и др. (BRCA 1/2, CHEK 2);
- определение молекулярно-генетических нарушений при немелкоклеточном раке легких, колоректальном раке, меланоме (EGFR, KRAS, BRAF, NRAS);
- дифференциальная диагностика опухолей;
- иммуногистохимические исследования;
- гибридизация (FISH, CISH);
- определение чувствительности к лекарственному лечению.



**Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Ростовский научно-исследовательский онкологический институт»
Министерства здравоохранения Российской Федерации
(ФГБУ «РНИОИ» Минздрава России)
г. Ростов-на-Дону**

Руководитель проекта в лаборатории:

Водолажский Дмитрий Игоревич, заведующий лабораторией, кандидат биологических наук.

Основные направления исследований:

- исследование молекулярно-генетических нарушений как генетических маркеров чувствительности/устойчивости к таргетным противоопухолевым препаратам при немелкоклеточном раке легких, колоректальном раке, меланоме (EGFR, KRAS, BRAF, NRAS);
- молекулярно-генетические маркеры таргетной терапии: SNP-маркеры, делеции, инсерции;
- исследование эпигенетических маркеров малигнизации тканей: изменение паттернов экспрессии генов, изменение метилирования генетических локусов;

- маркеры микросателлитной нестабильности при малигнизации тканей;
- основные методы – молекулярно-генетические методы исследования:
 - qReal-Time PCR;
 - прямое секвенирование по Сэнгеру;
 - (RT)2-PCR;
 - протеомные микрочипы.



**Государственное бюджетное учреждение здравоохранения
«Областной онкологический диспансер»
Клинико-диагностическая лаборатория
г. Иркутск**

Руководитель проекта в лаборатории:

Бондырева Галина Владимировна, заведующая лабораторией.

Основные направления исследований:

- гематологические исследования;
- общеклинические исследования;
- иммуноферментные исследования;
- биохимические исследования;
- гемостазиологические исследования.



**Краевое государственное бюджетное учреждение здравоохранения
«Красноярский краевой клинический онкологический диспансер им. А.И. Крыжановского»
Отдел прогностических и молекулярных методов
г. Красноярск**

Руководитель проекта в лаборатории:

Слепов Евгений Владимирович, заведующий лабораторией, кандидат биологических наук.

Основные направления исследований:

- генетическое типирование опухоли, ПЦР-исследования, секвенирование;
- поиск маркеров раннего обнаружения опухолей различной локализации;
- разработка моделей прогноза исхода лечения;
- научно-исследовательские работы.



**Государственное бюджетное учреждение
«Челябинский областной клинический онкологический диспансер»
Молекулярно-генетическая лаборатория
г. Челябинск**

Руководитель проекта в лаборатории

Семенова Анна Борисовна, заведующая лабораторией.

Основные направления исследований:

- молекулярно-генетические исследования при колоректальном раке, раке легкого, молочной железы, яичников;
- гибридизация in situ при раке молочной железы, лимфопролиферативных заболеваниях; иммуногистохимические исследования при онкологических заболеваниях.



Бюджетное учреждение здравоохранения Омской области
«Клинический онкологический диспансер»
Патологоанатомическое отделение
г. Омск

Руководитель проекта в лаборатории:

Глатко Сергей Борисович, заведующий отделением.

Основные направления исследований:

- исследования операционного и биопсийного материала;
- аутопсии;
- цитологические диагностические исследования;
- цитологические исследования при проведении профилактических осмотров;
- иммунофенотипирование лимфопролиферативных процессов;
- определение маркеров ER, PR, HER2;
- определение гистогенеза и степени злокачественности (grade) опухолей ЦНС;
- определение гистогенеза мезенхимальных опухолей;
- определение гистогенеза и органопринадлежности по метастазам недифференцированных карцином;
- ИГХ-исследования рака предстательной железы;
- ИГХ-диагностика нейроэндокринных опухолей и GIST.



Краевое Государственное бюджетное учреждение здравоохранения
«Краевой клинический центр онкологии»
Клинико-диагностическая лаборатория
г. Хабаровск

Руководитель проекта в лаборатории:

Бекова Ольга Ивановна, заведующая лабораторией.

Основные направления исследований:

- гематологические исследования;
- гемостазиологические исследования;
- биохимические исследования;
- общеклинические исследования;
- иммунодиагностические исследования (онкомаркеры, гормоны);
- ПЦР (определение мутаций в гене EGFR).



Государственное бюджетное учреждение здравоохранения
«Самарский областной клинический онкологический диспансер»
Лаборатория цитологии и молекулярной генетики опухолей
г. Самара

Руководитель проекта в лаборатории:

Торопова Надежда Ефимовна, заведующая лабораторией, доктор биологических наук.

Основные направления исследований:

- диагностика наследственной предрасположенности к раку молочной железы и/или яичника, раку предстательной и поджелудочной железы, толстой кишки, желудка и др. (BRCA 1/2, CHEK 2);

- исследование молекулярно-генетических нарушений как генетических маркеров чувствительности/устойчивости к таргетным противоопухолевым препаратам при немелкоклеточном раке легких, колоректальном раке, меланоме (EGFR, KRAS, BRAF, NRAS);
- определение степени риска возникновения тяжелых токсических реакций у пациентов с мутацией G735A в гене DPYD при применении таких препаратов как 5-фторурацил и кселода;
- обнаружение и количественное определение ДНК вируса папилломы человека типов высокого онкогенного риска (ВПЧ) (14 типов) методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени.



**Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Государственный научный центр колопроктологии имени А. Н. Рыжих»
Министерства здравоохранения Российской Федерации
Отдел и кабинет лабораторной генетики
г. Москва**

Руководитель проекта в лаборатории:

Поспехова Наталья Ивановна, доктор биологических наук.

Основные направления исследований:

- молекулярно-генетическая диагностика наследственных заболеваний (семейный аденоматоз толстой кишки, семейный аденоматозный полипоз – САП, синдром Линча (наследственный не полипозный рак толстой кишки), синдром Пейтса-Егерса);
- разработаны и внедрены протоколы ДНК-диагностики генов предрасположенности к этим синдромам: гены APC, MYH, MLH1, MSH2, MSH6, STK11.



**Государственное бюджетное учреждение здравоохранения
Московской области «Московский областной научно-исследовательский
клинический институт им. М. Ф. Владимирского»
Патологоанатомическое отделение с группой иммуногистохимии
г. Москва**

Руководитель проекта в лаборатории:

Казанцева Ирина Александровна, доктор медицинских наук, профессор.

Основные направления исследований:

- дифференциальная диагностика опухолей;
- иммуногистохимические исследования;
- гибридизация (FISH, CISH);
- определение мутаций в генах EGFR.



**Государственное бюджетное учреждение здравоохранения
«Санкт-Петербургский клинический научно-практический центр
специализированных видов медицинской помощи (онкологический)»
Клинико-диагностическая лаборатория (отдел молекулярно-генетической диагностики)
г. Санкт-Петербург**

Руководитель проекта в лаборатории:

Крылова Дарья Дмитриевна.

Основные направления исследований:

- исследование наследственных и соматических мутаций при онкологических заболеваниях.



Государственное бюджетное учреждение здравоохранения
Нижегородской области «Нижегородский областной клинический
онкологический диспансер»
Централизованная цитологическая лаборатория
г. Нижний Новгород

Руководитель проекта в лаборатории:

Сметанина Светлана Валерьевна

- ПЦР (определение мутаций в гене EGFR).

Технический исполнитель



Некоммерческое партнерство по содействию в реализации социальных
программ в сфере медицины и здравоохранения «Здоровое будущее»
г. Москва

Директор

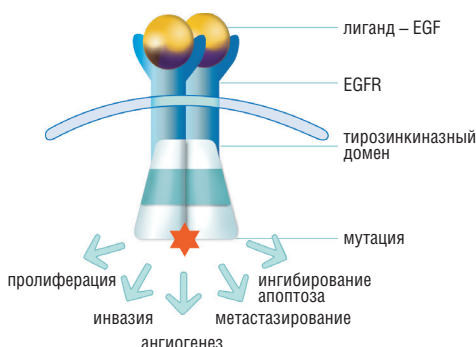
Черникова Марина Константиновна

Мутации в гене EGFR

Роль рецептора EGFR и мутаций гена EGFR в патогенезе немелкоклеточного рака легкого

Многочисленные биологические исследования выявили повышенную активность рецептора EGFR и каскада, запускающегося при активации этого рецептора, у больных немелкоклеточным раком легкого.

Что такое EGFR?



- EGFR – трансмембранный рецептор, активирующийся при связывании с эпидермальным фактором роста, трансформирующим фактором роста- α , амфирегулином.
- При активации EGFR внутри клетки запускается каскад биохимических реакций, приводящих к повышению пролиферации малигнизированных (опухолевых) клеток, росту опухоли, стимуляции процессов инвазии, патологического ангиогенеза и метастазирования.
- Рецептор EGFR кодируется геном EGFR.

В ряде опухолей обнаруживаются аномальные рецепторы эпидермального фактора роста, что обусловлено наличием мутации в соответствующем гене. В клетках с мутацией происходит активация сигнального пути EGFR, что, в свою очередь, инициирует процессы злокачественной трансформации в большинстве опухолей. Сигнальные пути контролируют процессы пролиферации, апоптоза – одного из механизмов клеточной гибели, утраты способности клеток к дифференцировке, процессы ангиогенеза и метастазирования.

Зачем определять статус мутации гена EGFR?

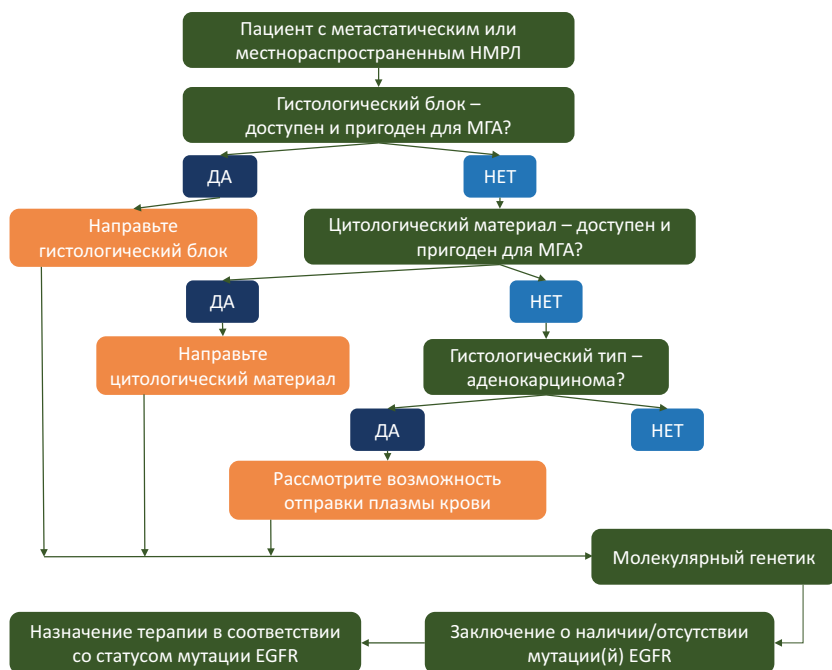
Тест на мутацию гена EGFR предназначен для отбора больных местно-распространенным или метастатическим немелкоклеточным раком легкого на терапию низкомолекулярными ингибиторами EGFR (ингибиторами тирозинкиназы).

Наличие мутаций гена EGFR позволяет выделить группу пациентов с наибольшей вероятностью выраженного ответа на терапию ингибиторами тирозинкиназы (гефитиниб).

Известны активирующие мутации гена EGFR, связанные с чувствительностью либо устойчивостью к ингибиторам тирозинкиназы. Подавляющее большинство мутаций, связанных с чувствительностью (~90%) — это делеции в 19 экзоне (Del19) или замена L858R в 21 экзоне. Опухоли с мутациями Del19 или L858R наиболее чувствительны к терапии ингибиторами тирозинкиназы EGFR. Прочие мутации, связанные с чувствительностью (G719X, L861Q, S768I и некоторые другие), составляют в сумме ~5% мутантных случаев.

Инсерции 20 экзона связаны с устойчивостью к ингибиторам тирозинкиназы и составляют ~3% опухолей с мутациями. Еще одна мутация, связанная с устойчивостью, – T790M. Частота выявления этой мутации после проведения химиотерапии ингибиторами тирозинкиназы составляет примерно 50%, однако в 1-3% случаев мутация может возникать de novo. Мутация T790M в гене EGFR является наиболее частой причиной возникновения резистентности к проводимой таргетной терапии. Своевременное выявление этой мутации позволяет выяснить причину резистентности и принять решение о смене терапии у пациента. Поэтому для назначения эффективной таргетной терапии всем больным немелкоклеточным раком легкого необходим анализ как на наличие мутаций чувствительности, так и на наличие/отсутствие мутаций устойчивости к ингибиторам тирозинкиназы.

Определение статуса мутации гена EGFR и персонализированный подход к выбору терапии, основанный на результатах молекулярно-генетического тестирования, позволят сделать лечение немелкоклеточного рака легкого более эффективным и приблизиться к международным тенденциям клинической практики.



О Программе тестирования мутаций гена EGFR у пациентов с немелкоклеточным раком легкого

- Тестирование в рамках Программы проводится на всей территории страны.
- Отправка материала и тестирование проводится бесплатно для врачей и пациентов.

КАКИМ ПАЦИЕНТАМ НЕОБХОДИМО молекулярно-генетическое тестирование на наличие мутации гена EGFR?

Пациентам с распространенным (местно-распространенным или метастатическим) немелкоклеточным раком лёгкого (в частности: аденокарцинома легкого, крупноклеточный рак, плоскоклеточный и аденоплоскоклеточный рак и др.)

Список литературы:

1. Reck M, ClintL. Lung Cancer. 2009 Jan; 63 (1):1-9;
2. Lynch T, Bell DW, Sordella Retal., N Engl J Med. 2004 May 20; 350 (21): 2129-39;
3. Herbst RS, Hyemach JV, Lippman SM. N Engl J Med. 2008 Sep 25; 359(13): 1367-80;
4. Gazdar AF, Shigematsu H, Herz J, Minna JD, Trends Mol Med. 2004 Oct; 10(10): 481-6;
5. Mok T et al. N Engl J Med 2009;361:947–957;
6. Han J, et al. J Clin Oncol 2012;30:1122– 1228;
7. Maemondo M et al. N Engl J Med 2010;362:2380–2388;
8. Mitsudomi T, et al. Lancet Oncol 2010;11:121–128;
9. Zhou C et al. Lancet Oncol 2011;12:735–742;
10. Rosell R et al. Lancet Oncol 2012;13:239– 246;
11. Gridelli C et al. J Clinical Oncol 2012;30:3002–3011;
12. Wu Y et al. Lancet Oncol 2014;15:213–222;
13. Sequist L, et al. J Clin Oncol 2013;31:3327–3334;
14. Haratani K., Hayashi H., Tanaka T. et al., Ann Oncol 2017; 28 (7): 1532-1539;

Мутация T790M в гене EGFR

При применении ИТК EGFR 1-го и 2-го поколений (гефитиниб, эрлотиниб, афатиниб) в терапии местно-распространенного или метастатического НМРЛ с выявленной мутацией в гене EGFR обычно через 8-12 месяцев развивается резистентность к терапии ИТК EGFR, которая в большинстве случаев (до 60%) обусловлена появлением мутации T790M в гене EGFR^{1,2}. У небольшого числа пациентов (1-2%) мутация T790M может быть выявлена при первичном молекулярно-генетическом анализе, выполненном после постановки диагноза «местнораспространенный или метастатический немелкоклеточный рак легкого»; в этом случае мутация обуславливает первичную резистентность к ИТК EGFR 1-го и 2-го поколений.

Мутация T790M (замена аминокислотного остатка треонина на метионин в 790 положении) приводит к неэффективности ИТК EGFR 1-го и 2-го поколений^{3,4}.

Зачем определять статус мутации T790M в гене EGFR?

Анализ на выявление мутации T790M в гене EGFR показан всем пациентам с местно-распространенным или метастатическим немелкоклеточным раком легкого с признаками прогрессирования заболевания (как симптомного, так и бессимптомного) на фоне терапии ингибиторами тирозинкиназы EGFR (ИТК EGFR: гефитиниб, афатиниб, эрлотиниб).

Наличие мутации T790M в гене EGFR позволяет выделить группу пациентов с наибольшей вероятностью выраженного ответа на терапию препаратом осимертиниб⁵.

Какие биоматериалы могут быть отправлены на молекулярно-генетическое тестирование с целью выявления мутации T790M в гене EGFR?

Анализ можно выполнить с использованием любого биологического материала, пригодного для обычного EGFR-тестирования: гистологического, цитологического или образца плазмы. Материал должен быть получен после прогрессирования заболевания на фоне терапии ИТК EGFR; биоматериалы, полученные до назначения терапии ИТК EGFR, не подходят для исследования на мутацию T790M.



При первых признаках прогрессирования НМРЛ у пациента на терапии ИТК EGFR рекомендуется получить образец плазмы и отправить его на молекулярно-генетическое тестирование для исследования на мутацию T790M в гене EGFR. Если мутация будет обнаружена в образце плазмы («мутация T790M обнаружена»), подтверждение результата не требуется. Если же в образце плазмы мутация T790M не будет обнаружена, следует рассмотреть возможность получения гистологического или цитологического образца опухоли и отправить его на молекулярно-генетический анализ.

В рамках Программы на определение статуса мутации T790M можно отправить до трёх видов биоматериала одновременно. Поскольку и опухолевый материал, и плазма, полученные у пациентов с прогрессированием заболевания, обладают определенными преимуществами и недостатками (см. табл. 1), целесообразно отправить оба этих материала, если есть такая возможность.

Табл. 1. Сравнение плазмы и опухолевого материала как источников опухолевой ДНК для проведения анализа на наличие мутации T790M гена EGFR

	Плазма	Опухолевый материал (цитологический, гистологический)
Преимущества	<ul style="list-style-type: none"> • малоинвазивное получение материала, которое возможно у большинства пациентов, в т.ч. в тяжелом соматическом состоянии • для получения материала используются широко доступные материалы и процедуры • отсутствие проблемы гетерогенности получаемого образца 	<ul style="list-style-type: none"> • простота транспортировки в лабораторию (без температурного контроля) • возможность применения для проведения молекулярно-генетического анализа базовых реагентов, применяемых и для обычного EGFR-тестирования
Недостатки	<ul style="list-style-type: none"> • необходимость быстрой доставки образца в лабораторию и температурного контроля при пересылке образца • требуется применение высокочувствительных методов анализа, доступных в небольшом числе лабораторий • риск ложно-отрицательного результата вследствие ограничений по чувствительности метода 	<ul style="list-style-type: none"> • инвазивная процедура получения биоматериала • риск ложно-отрицательного результата вследствие анализа опухолевого материала из участка, не содержащего достаточного количества клеток с мутацией T790M (вследствие гетерогенности опухоли и ее метастазов)

Нужно ли повторно отправлять образец после получения результата об отсутствии мутации T790M?

Если при анализе образца плазмы не была выявлена ни первичная активирующая мутация гена EGFR, ни мутация T790M, то целесообразно перепроверить правильность получения и транспортировки плазмы. Если будет установлено, что плазма обрабатывалась корректно, то повторной отправки не требуется, а если будут выявлены нарушения, то рекомендуется их

устранить и отправить повторный образец плазмы. Также в этом случае целесообразно приложить усилия для получения и отправки опухолевого материала, полученного после прогрессирования заболевания.

Когда при анализе плазмы первичная активирующая мутация выявлена, но не выявлена мутация Т790М, целесообразно приложить усилия для получения и отправки опухолевого гистологического или цитологического образца опухолевой ткани. Повторная отправка плазмы в этом случае нецелесообразна.

Для пациентов, у которых мутация Т790М не была выявлена на фоне бессимптомного прогрессирования на терапии ИТК EGFR, рекомендуется провести повторное исследование на наличие мутации Т790М в момент появления клинических симптомов прогрессирования заболевания.

Нужно ли подтверждать положительный результат анализа на мутацию Т790М, полученный при исследовании плазмы, дополнительным тестированием с использованием гистологического или цитологического образца опухолевой ткани?

Нет, не нужно. Обнаружение мутации Т790М по циркулирующей опухолевой ДНК плазмы не требует подтверждения другими методами⁶.

Список литературы:

1. Yu HA, Arcila ME, Rekhtman N, et al. Clin Cancer Res. 2013;19:2240-2247.
2. Langer CJ. J Clin Oncol. 2013;31:3303-3306.
3. Kobayashi S et al. N Engl J Med 2005;352:786-792.
4. Cross D et al. Cancer Discov 2014; 4:1046-1061.
5. AstraZeneca Pharmaceuticals. TAGRISSO™ (osimertinib). Summary of Product Characteristics, 2016.
6. Mok TS et al. N Engl J Med.2017; 376:629-640.

Мутации гена BRAF у пациентов с немелкоклеточным раком легкого

При отсутствии активирующих мутаций EGFR следующим этапом целесообразно тестирование на определение мутации гена BRAF V600.

Среди пациентов с НМРЛ примерно у 30% наблюдаются мутации, в отношении которых может быть применена различная таргетная терапия (1-4). Ежегодно примерно у 36 тысяч человек во всем мире, или у 1–3% пациентов с диагнозом рак легкого, в основном – при аденокарциноме, выявляется BRAF V600-положительный НМРЛ (5,6). Пациентам с раком легкого рекомендуется проводить тестирование на биомаркеры, чтобы подобрать подходящую таргетную терапию (7). Гистологические характеристики НМРЛ при мутации BRAF V600E позволяют предполагать высокую агрессивность опухоли (8). При BRAF V600E-мутантном НМРЛ результаты химиотерапии на основе препаратов платины менее благоприятны (8,9).

Сигнальный путь RAS/RAF/MEK/ERK вовлечен в развитие немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ) и меланомы, а также в другие виды злокачественных новообразований. Мутации BRAF вызывают конститутивную активацию данного сигнального пути (10).

Список литературы:

1. Riess JW, Wakelee, HA. Metastatic Non-Small Cell Lung Cancer Management: Novel Targets and Recent Clinical Advances. *Clinical Advances in Hematology & Oncology*. 2012; 10: 226-224.
2. Pao W, Girard N. New driver mutations in non-small-cell lung cancer. *Lancet Oncol*. 2011; 12:175-180.
3. Paik PK, Arcila ME, Fara M, et al. Clinical Characteristics of Patients with Lung Adenocarcinomas Harboring BRAF Mutations. *J Clin Oncol*. 2011;29:2046-2051.
4. Takeuchi, K, Soda M, Togashi Y, et al. RET, ROS1 and ALK fusions in lung cancer. *Nature*. 2012; 378-381.
5. World Health Organization. International Agency for Research on Cancer. GLOBOCAN 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. Lung Cancer. Доступно на сайте http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx?cancer=lung. Последний доступ: 2 февраля 2017 г.
6. Pao W, Girard N. New driver mutations in non-small-cell lung cancer. 2011. *Lancet Oncol*. 12: 175–180.
7. Lindeman, N.I., et al. Molecular Testing Guideline for Selection of Lung Cancer Patients for EGFR and ALK Tyrosine Kinase Inhibitors. *Arch Pathol Lab Med*. 2013; 137: 828-1174.
8. Barlesi F, et al. *Lancet*. 2016;387:1415-1426;
9. Kris MG, Johnson BE, et al. *JAMA*. 2014;311(19):1998-2006;
10. Marchetti A, et al. *J Clin Oncol*. 2011;29:3574-3579;
11. Cardarella S, et al. *Clin Cancer Res*. 19(16):4532-4540;
12. Vultur A, et al. *Clin Cancer Res* 2011;17:1658–63.



Мутации генов семейства RAS

Сигнальный путь EGFR и мутации генов семейства RAS при колоректальном раке

Постоянная активация сигнального каскада рецептора эпидермального фактора роста (EGFR) является одной из ведущих причин опухолевой трансформации и прогрессии.

Причинами подобной активации могут быть:

1. Увеличение количества молекул рецептора на мембране клеток.
2. Мутации в структуре рецептора, позволяющие ему генерировать сигнал без участия лиганда.
3. Мутации других генов-участников каскада, способных активировать его вне зависимости от статуса EGFR.

Для колоректального рака характерны 1 и 3 пути активации.

Блокада сигнального каскада EGFR с помощью моноклональных антител, связывающихся с рецептором, показала высокую клиническую эффективность при целом ряде опухолей, в том числе при колоректальном раке. Однако использование этих препаратов в неселективной группе больных приводило к ответу на лечение лишь у 25% пациентов.

Первоначальный молекулярный анализ образцов пациентов, участвовавших в исследованиях OPUS и CRYSTAL, показал, что существенную роль в резистентности опухоли к терапии моноклональными антителами играют мутации гена KRAS, одного из участников внутриклеточной части сигнального каскада EGFR.

Однако дальнейшие исследования показали, что не меньшее значение в определении полноты противоопухолевого ответа играют и другие участники сигнального пути, начинающегося с рецептора EGFR: гены RAS-RAF-MEK-ERK-MAPK

Сигнальный путь RAS

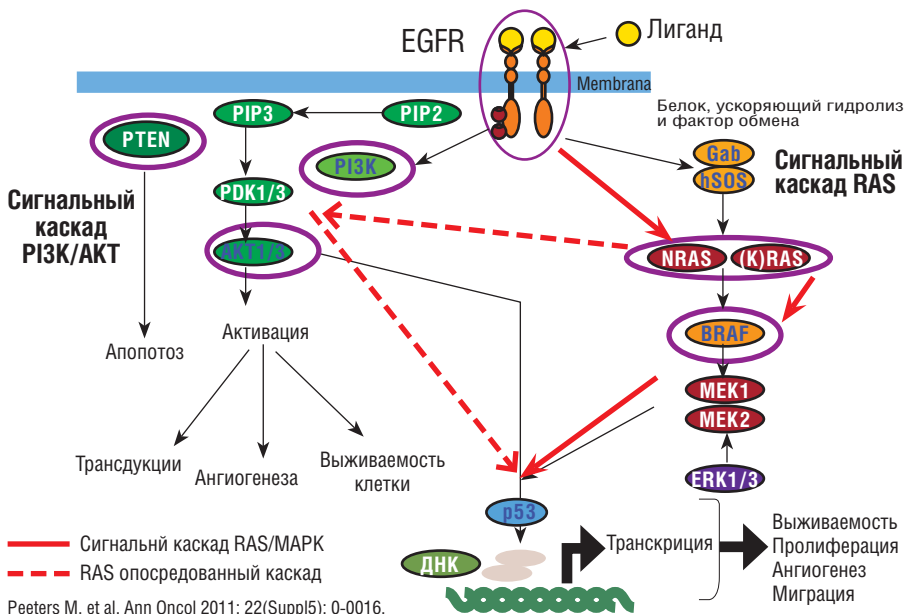
В RAS-зависимом сигнальном пути ключевую роль играют белки семейства RAS. Фиксированные на внутренней стороне клеточной мембраны, белки RAS являются первыми членами каскада киназ, которые приводят к активации сигнальных путей и транскрипции генов, регулирующих дифференцировку и пролиферацию клетки.

Роль белка RAS в сигнальном пути EGFR

Семейство генов RAS (Retrovirus Associated DNA Sequences) включает 3 гена: KRAS, HRAS, NRAS. Первые два гена получили название от своих гомологов, выделенных из линий вирусов мышинной саркомы Kirsten и Harvey, последний был идентифицирован в клеточной линии нейробластомы. Три гена кодируют четыре варианта протеинов – два типа KRAS, A и B (наиболее часто распространенный), и по одному типу HRAS и NRAS.⁴ Все они относятся к белкам, связывающим энергетическую молекулу ГТФ. RAS-белки могут существовать в двух формах: неактивной, GDP- и активной, GTP-связанной. Благодаря собственной GTP-азной активности, а также под действием факторов обмена (Sos и др.), белок RAS

циклически переходит из GTP-связанной активной формы в GDP-связанную неактивную и обратно.

Нормальный RAS находится преимущественно в неактивной, GDP-связанной форме. Активация RAS регулируется рецепторной тирозинкиназой EGFR. После связывания рецепторной внеклеточной части тирозинкиназы с фактором роста и ее димеризации происходит взаимное фосфорилирование ее внутриклеточных доменов. Фосфорилирование создает активную конформацию киназы. Образование активного комплекса RAS-GTP происходит в присутствии активирующего GTP-азу белка GAP, в сотни раз ускоряющего гидролиз. После гидролитического превращения GTP в GDP Ras снова инактивируется. Сигнал прерывается. Чтобы воспринять новый сигнал, если он еще существует вне клетки, цикл реактивации должен быть повторен. Таким образом, каскадная последовательность реакций сигнального пути RAS действует как выключатель, определяющий регуляцию генной экспрессии, требующейся для реализации деления или дифференцировки клетки.



Нарушение систем передачи сигнала и канцерогенез

RAS-белки часто упоминают как протоонкогенные продукты: их постоянная активация ведет к злокачественному перерождению клеток. Характерный механизм перерождения RAS – точечные мутации в соответствующих генах. Наиболее частыми онкогенными мутациями генов всего семейства RAS являются мутации в 12 и 61 кодонах.

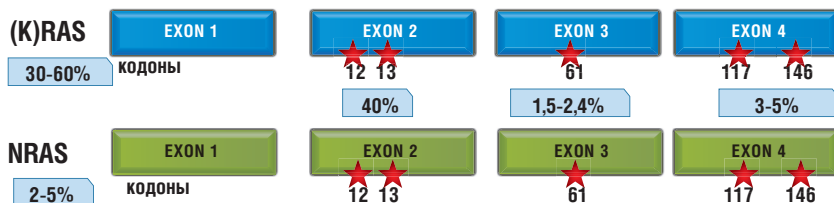
Мутации в гене KRAS в опухолях толстой кишки встречаются в 30-60% случаев. Наиболее часто мутации KRAS определяются в экзоне 2, кодонах 12 и 13. Однако описаны мутации в экзоне

3, кодоне 61, и в экзоне 4, кодонах 117 и 146. Мутации в гене NRAS (в идентичных экзонах и кодонах) при КРР составляют до 5%. Мутации в гене HRAS при аденокарциноме толстой кишки не описаны.

Мутации генов семейства RAS при злокачественных опухолях (по базе данных COSMIC)

Орган	Тип опухоли	Мутации (%)		
		HRAS	KRAS	NRAS
Колоректальный рак	Аденокарцинома	0	42	5
Желчные пути	Аденокарцинома	0	35	2
Мочевой пузырь	Уротелиальная карцинома	12	4	2
Печень	Гепатоцеллюлярный рак	0	4	4
Легкое	Крупноклеточный рак	4	21	4
	Аденокарцинома	0	16	1
Пожелудочная железа	Протоковая аденокарцинома	0	69	1
	Эндокринные опухоли	0	1	75
Кожа	Меланома	1	2	20

Точечные мутации онкогенов RAS при мКРР



Значение различных мутаций RAS

Как уже говорилось выше, при колоректальном раке почти 90% всех нарушений представляют собой точечные замены одного нуклеотида на другой во втором экзоне генов KRAS и NRAS, в последовательностях, кодирующих 12 и 13 аминокислоты. В норме в обеих позициях располагается глицин, единственная аминокислота, не имеющая боковой цепи. Любое изменение этой последовательности приводит к замене глицина на разветвленные аминокислоты, что ведет к нарушению пространственной конформации протеина. В результате этого блокируется способность специальных белков инaktivировать комплекс RAS с ГТФ путем гидролиза энергетической молекулы. Сигнал начинает передаваться от активированного RAS к другим участникам каскада независимо от статуса EGFR.

Около 10% мутаций этого гена в колоректальных опухолях происходят в 3 и 4 экзонах, с одинаковой частотой в 61 и 146 кодонах и крайне редко – в 117 кодоне. Мутации, затрагивающие 61 кодон, нарушают водородные связи между RAS и белками-инактиваторами, приводя к тому же эффекту, что и при нарушениях в 12 и 13 кодонах гена. Мутации 146 кодона не сопровождаются существенными изменениями активности протеина.

Тем не менее, эти мутации оказывают свое негативное воздействие в результате накопления дефектного белка на фоне аллельного дисбаланса - увеличения копийности мутантного гена или перехода его в гомозиготное состояние, что весьма характерно для опухолей с мутациями генов семейства RAS.

Возрастающая роль сигнального пути RAS в индивидуализированной терапии мКРР

Самым известным биомаркером в таргетной анти-EGFR терапии пациентов с мКРР является статус мутаций кодонов 12 и 13 гена KRAS. Доказано, что активация KRAS за счет мутации сводит на нет эффект ингибирования EGFR моноклональными антителами. Таким образом, наличие мутантных аллелей гена KRAS является независимым предсказательным маркером эффективности терапии ингибиторами EGFR. Поэтому панитумумаб и цетуксимаб назначают только больным мКРР с диким типом гена KRAS. Влияние дополнительных мутаций гена KRAS и новых мутаций гена NRAS, а также мутаций гена BRAF на эффективность таргетной терапии ингибиторами EGFR изучалось в исследованиях с панитумумабом и цетуксимабом пациентов мКРР:

- Анализ мутаций генов KRAS/NRAS и мутации гена BRAF в исследовании 3 фазы PRIME: комбинации панитумумаб+FOLFOX4 в сравнении с FOLFOX4 в 1-й линии терапии мета-статического колоректального рака
Oliner K, Douillard JY, Siena S, et al. Analysis of KRAS/NRAS and BRAF mutations in the phase III PRIME study of panitumumab (pmab) plus FOLFOX versus FOLFOX as first-line treatment (tx) for metastatic colorectal cancer (mCRC). ASCO 2013 (poster discussion):3511
- Анализ мутаций генов RAS/RAF в исследовании 2 фазы PEAK: комбинации панитумумаба с mFOLFOX6 в сравнении с бевацизумабом в комбинации с mFOLFOX6 в 1-ой линии терапии пациентов с метастатическим колоректальным раком с WTKRAS
- Schwartzberg LS, Rivera F, Karthaus M, et al. PEAK (study 20070509): A randomized phase II study of mFOLFOX6 with either panitumumab (pmab) or bevacizumab (bev) as first-line (tx) in patients (pts) with unresectable wild type (WT) KRAS metastatic colorectal cancer (mCRC). J Clin Oncol 2013;30(Suppl 34):446
- Анализ влияния мутаций генов семейства RAS (2 экзона KRAS и других RAS-мутаций) в исследовании CRYSTAL: комбинации цетуксимаба с FOLFIRI в сравнении с FOLFIRI в 1-й линии терапии пациентов с метастатическим колоректальным раком на выживаемость пациентов без прогрессии и общую выживаемость

Fluorouracil, leucovorin, and irinotecan plus cetuximab treatment and RAS mutations in colorectal cancer. Van Cutsem et al, J Clin Oncol. 2015 Mar 1;33(7):692-700

Все исследования показали, что, несмотря на то, что индивидуализация терапии антителами по статусу генов семейства RAS предусматривает сужение круга пациентов (примерно 50/50 вместо 60/40 при отборе только лишь по статусу 2 экзона гена KRAS), пациенты с диким типом генов KRAS и NRAS в опухоли получают максимальную пользу от терапии антителами в комби-

нации со стандартной химиотерапией, по сравнению с пациентами, без мутаций гена KRAS во 2 экзоне. Пока нет достаточных доказательств негативного влияния мутаций генов BRAF, PI3K, PTEN и других участников сигнального пути RAS-RAF-МЕК-ERK-МАРК по результатам крупных проспективных рандомизированных исследований, однако, не исключено, что появление таких исследований вновь существенно изменит наши представления о группе пациентов, для которых применение анти-EGFR антител окажется наиболее выгодным.

В связи с этим целью программы является максимально широкое внедрение генетического тестирования при колоректальном раке в ежедневную практику онкологов, как одного из важнейших условий проведения современной эффективной терапии у целевой группы пациентов.

Список литературы:

1. Heldin CH, "Dimerization of cell surface receptors in signal transduction" Cell 1995, vol. 80, no. 2, pp. 213–223.
2. Carpenterand G, Cohen S "Epidermal growth factor" J Biol Chem1 1990, vol. 265, no. 14, pp. 7709–7712.
3. Citri A, Yarden Y, "EGF-ERBB signalling: towards the systems level" Nature Rev Molecular Cell Biol 2006,vol.7,no. 7, pp. 505–516.
4. Boguski MS, McCormick F. Proteins regulating Ras and its relatives. Nature 1993; 366: 643–654.
5. Vakiani E, Solit DB. KRAS and BRAF: drug targets and predictive biomarkers. J Pathol 2011; 223: 219–229.
6. Edkins S, O'Meara S, Parker A, et al. Recurrent KRAS codon 146 mutations in human colorectal cancer. Cancer Biol Ther 2006; 5: 928–932.
7. Janakiraman M, Vakiani E, Zeng Z, et al. Genomic and biological characterization of exon 4 KRAS mutations in human cancer.Cancer Res 2010; 70: 5901–5911.
8. Soh J, Okumura N, Lockwood WW et al Oncogene mutations, copy number gains and mutant allele specific imbalance (MASI) frequently occur together in tumor cells.// PLoS One. – 2009 – 14, N4(10) – P.7464.

Транслокации с участием генов ALK и ROS1

Тест на наличие транслокации гена ALK показан большим распространенным немелкоклеточным раком легкого с отрицательным статусом EGFR мутации для отбора пациентов на терапию кризотинибом

Транслокация гена ALK – это внутривнутрихромосомная перестройка (парацентрическая инверсия) короткого плеча 2-й хромосомы, ведущая к образованию химерного онкогена EML4/ ALK примерно в 95% случаев. Еще в 5% случаев транслокация возникает с участием других генов, представляя из себя, как правило, истинную реципрокную транслокацию. Иногда образование типичного химерного онкогена сопровождается частичной делецией 3' части гена ALK, биологическое значение этого феномена пока до конца не изучено.

Понимание роли транслокации гена ALK в развитии немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ) стало одним из важнейших шагов в дальнейшей расшифровке генома этого заболевания и расширении возможностей персонализации его лечения.

Функции ALK в норме и при развитии злокачественных опухолей

ALK является рецепторной тирозинкиназой из семейства инсулинзависимых рецепторов. В норме протеин ALK активно экспрессируется в нервной ткани только во время эмбриогенеза, регулируя пролиферацию нейронов.

Как и у любой тирозинкиназы, основной функцией этого рецептора является передача сигнала. Основными сигнальными путями, задействованными в передаче, являются пути PI3K/ERK и RAS/MAPK, то есть те же, что участвуют в передаче сигнала EGFR.

Активация ALK при образовании химерного гена EML4-ALK (рис.1).

Транслокация EML4-ALK ведёт к активации киназ

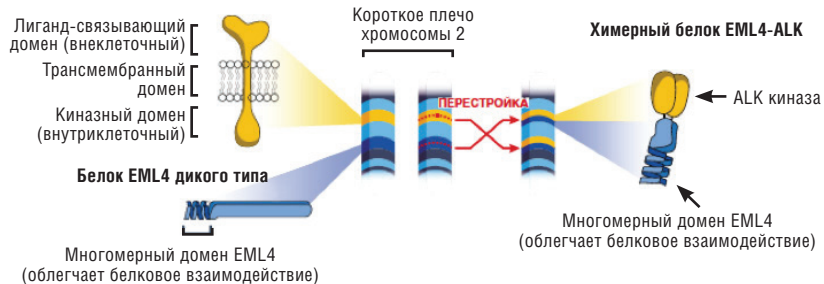


Рисунок 1. Формирование транслокации EML4-ALK.

Таким образом, ALK попадает под влияние регулирующих последовательностей EML4 и переходит в активное состояние, становится независимым от своих лигандов и передает сигнал, постоянно нарушая нормальную дифференцировку и апоптоз клетки.

Зачем определять статус транслокации ALK?

Обнаружение транслокации EML4-ALK при немелкоклеточном раке легкого принципиально для проведения терапии таргетным препаратом кризотиниб, являющимся единственным зарегистрированным ингибитором тирозинкиназы ALK в первой линии.

Кому нужно проводить тестирование?

Частота встречаемости транслокаций с участием ALK при немелкоклеточном раке легких, по данным разных авторов, колеблется от 3 до 13% в зависимости от особенностей выборки.

Прослеживается четкая ассоциация транслокации EML4-ALK со следующими характеристиками опухоли и больного.

1. Гистологически – аденокарцинома, более 94%.
2. Отсутствие конкурирующих мутаций (EGFR, KRAS, BRAF, PIK3CA).
3. Некурящие, более 67%.

Тем не менее, следует помнить, что все клинические рекомендации (включая рекомендации RUSSCO) рекомендуют направлять на исследование всех пациентов с распространенным неплоскоклеточным НМРЛ, вне зависимости от пола, национальности и статуса курения. Ограничение по этим параметрам может привести к потере до 50% пациентов с транслокацией.

Методы диагностики

Первым методом, использованным во всех регистрационных исследованиях, стал метод флюоресцентной гибридизации *in situ* (FISH), в настоящее время остающийся «золотым стандартом» прямого определения транслокаций с участием гена ALK. Наиболее широко используется рекомендованная FDA методика с использованием пробы LSI ALK Break Apart Rearrangement Probe (Abbott Molecular, США).

Проба представляет собой два флюоресцентных зонда, конъюгированных с красителями разного цвета (оранжевым и зеленым) и комплементарных расположенным рядом последовательностям гена ALK. В норме обе пробы гибридизуются рядом и при просмотре в флюоресцентный микроскоп формируют сигнал желтого цвета или видны как расположенные вплотную два сигнала красного и зеленого цвета. При перестройке гена и перемещении одной из его последовательностей, сигналы расходятся и видны как лежащие раздельно (рис. 2).

Использование этого набора обладает высокой чувствительностью и специфичностью (до 98-100%) и позволяет правильно определить ALK-статус опухоли более, чем в 90% случаев.

В настоящее время именно ИГХ-метод широко используется для первичного скрининга образцов НМРЛ. Однако наличие артефактов и 5-10% сомнительных случаев требует использования альтернативных методов (как правило, FISH) для точной детекции транслокации (рис. 3).

Другим, также теоретически универсальным методом является иммуногистохимическое ис-

следование (ИГХ), позволяющее выявить высокую экспрессию химерного протеина в цитоплазме опухолевых клеток.

На текущий момент зарегистрированы и одобрены FDA 2 коммерчески доступных антитела, все более широко использующиеся для определения продукта перестроек гена ALK при НМРЛ. Из них общепризнанный приоритет имеет антитело D3F4, используемое с системой детекции и амплификации VENTANA (Roche Diagnostic) и адаптированного для приборов VENTANA.

Третьим методом, используемым в диагностике реаранжировок ALK, является обратнотранскриптазная полимеразная цепная реакция (ОТ-ПЦР). Метод обладает высочайшей чувствительностью, позволяет работать с образцами, содержащими крайне низкое количество опухолевых клеток, способен сразу идентифицировать тип перестройки.

Тем не менее, ОТ-ПЦР обладает несколькими весьма существенными недостатками. Во-первых, метод очень требователен к качеству РНК, выделенной из образца, в особенности – из фиксированного в формалине и залитого в парафин. Во-вторых, с помощью ОТ-ПЦР возможно выявить только те типы перестройки гена ALK, к которым подобраны специфические праймеры, что требует мультиплицирования исследования и существенных временных затрат. Очень интересным подходом является метод сравнительной экзонной экспрессии, позволяющий увидеть транслокации с помощью изучения разности экспрессии 3' и 5' концов гена ALK.

Но и этот метод требует высочайшей квалификации специалистов и может выполняться далеко не в любой лаборатории. Пока все методы детекции транслокаций ALK на основе ПЦР не зарегистрированы в РФ.

Тест на наличие транслокации гена ROS1 показан большим распространенным немелкоклеточ-



Рисунок 2. Перестройка гена при немелкоклеточном раке легкого (аденокарцинома). Данные ГБ 62 г. Москва.

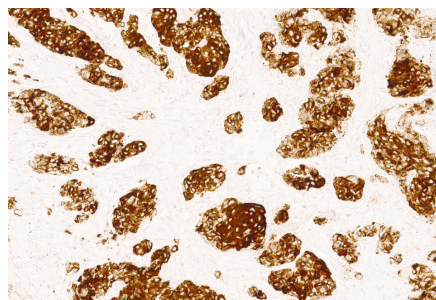


Рисунок 3. ИГХ-позитивное окрашивание образца НМРЛ.

ным раком легкого с отрицательным статусом мутаций EGFR и ALK для отбора пациентов на терапию кризотинибом.

Онкоген ROS1 кодирует рецепторную тирозинкиназу, родственную киназе анапластической лимфомы (ALK)16, а также ряду членов семейства инсулиновых рецепторов. ALK и ROS1 отвечают за синтез взаимосвязанных тирозинкиназ, АТФ-связывающие домены которых на 77% идентичны по аминокислотному составу (рис. 4).

Рearranжировка приводит к слиянию части ROS1, которая включает полный домен тирозинкиназы, с 1 из 12 различных белков-партнеров.

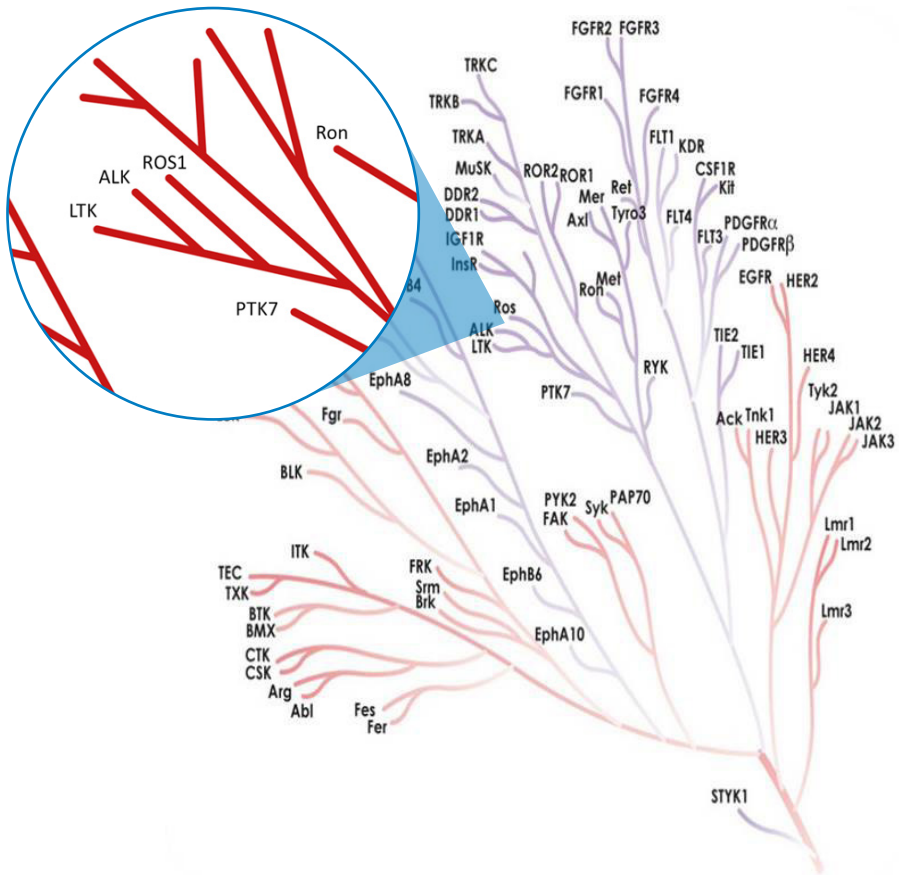


Рисунок 4. Родственные киназы ALK и ROS1.

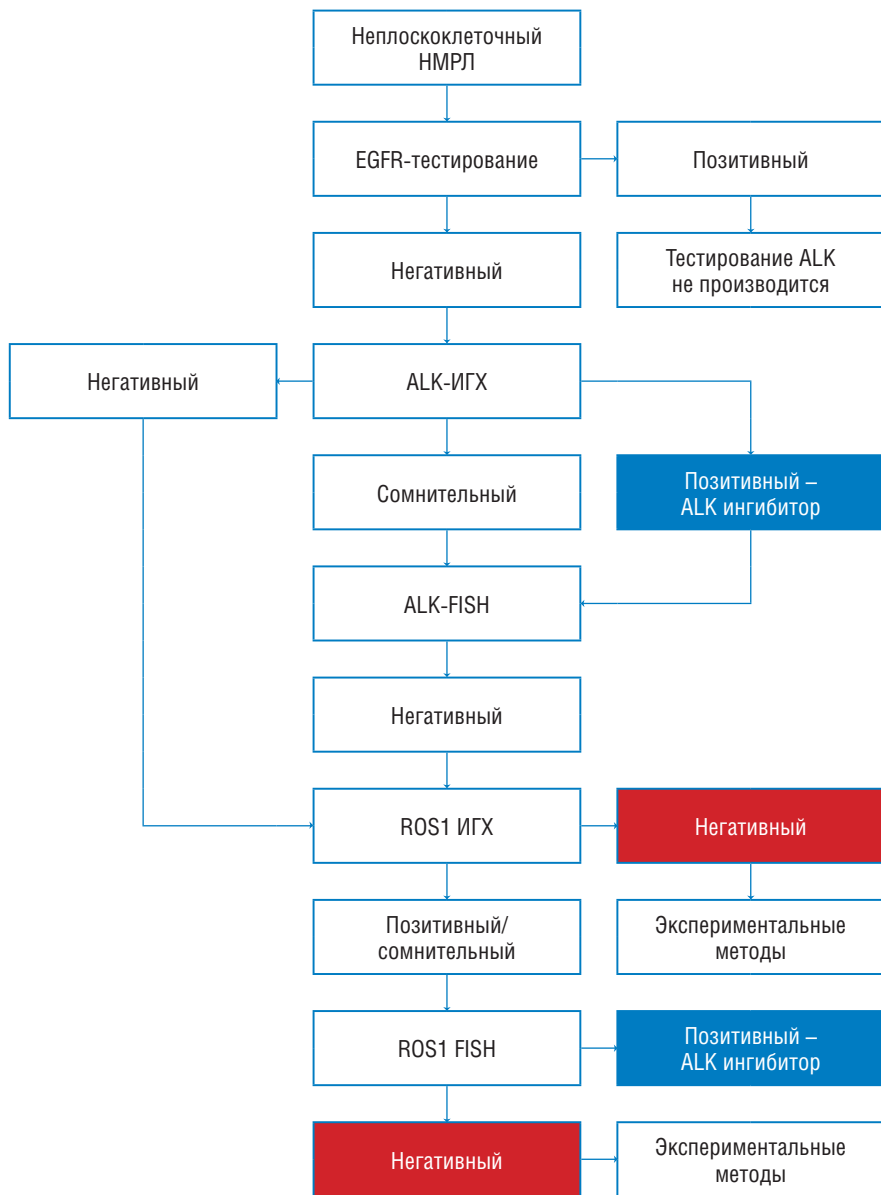


Рисунок 5. Алгоритм тестирования.

Полученная в результате слияния тирозинкиназа ROS1 активируется конститутивно и обуславливает клеточную трансформацию.

Зачем определять статус транслокации ROS1?

Обнаружение транслокации ROS1 при немелкоклеточном раке легкого принципиально для проведения терапии таргетным препаратом кризотиниб, являющимся единственным зарегистрированным ингибитором тирозинкиназы ROS1.

Кому нужно проводить тестирование?

Рearанжировки ROS1 развиваются примерно у 1-2% пациентов с НМРЛ. Как и реаранжировки ALK, реаранжировки ROS1 чаще выявляются у пациентов, которые никогда не курили или у которых в анамнезе имеется курение в небольших количествах, и отмечаются гистологические признаки аденокарциномы.

Методы диагностики

Методика диагностики реаранжировки ROS1 полностью соответствует алгоритму выявления реаранжировки ALK и на сегодняшний день производится с использованием метода FISH, ИГХ и ОТ-ПЦР. Важно помнить, что на генетическом уровне, реаранжировки ALK и ROS1 редко развиваются в одной и той же опухоли, и каждая из них определяет уникальную подгруппу НМРЛ.21.

В рамках Программы алгоритм диагностики по выявлению транслокации ALK и ROS1 у пациентов с немелкоклеточным раком легкого представлен на рис. 5.

Список литературы:

1. Soda M, Choi YL, Enomoto M, et al. Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature*. 2007; 448(7153): 561–566.
2. Iwahara, T., Fujimoto, J., Wen, D et al. (1997) Molecular characterization of ALK, a receptor tyrosine kinase expressed specifically in the nervous system. *Oncogene* 14, 439–449.
3. Stoica, G. E., Kuo, A., Aigner, A., et al. Identification of anaplastic lymphoma kinase as a receptor for the growth factor pleiotrophin. *J. Biol. Chem.*2001; 276:16772–16779
4. Bai, R. Y., Ouyang, T., Miething, C et al. Nucleophosmin-anaplastic lymphoma kinase associated with anaplastic large-cell lymphoma activates the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt antiapoptotic signaling pathway. *Blood* 2000 96:4319–4327.
5. Marzec, M., Kasprzycka, M., Liu, X. et al. Oncogenic tyrosine kinase NPM/ALK induces activation of the rapamycin-sensitive mTOR signaling pathway. *Oncogene* 2007; 26:5606–5614.
6. Medves S, Demoulin JB. Tyrosine kinase gene fusions in cancer: translating mechanisms into targeted therapies. *J. Cell. Mol. Med.* 2012; 16 (2): 237-248.
7. Crystal AS, Show AT. Variants on a Theme: A Biomarker of Crizotinib Response in ALK-Positive Non-Small Cell Lung Cancer. *Clin Cancer Res* 2012; 18(17): 4479-81.
8. Horn L, Pao W. EML4-ALK: Honing In on a New Target in Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol* 2009, 27(26): 4232-4235.

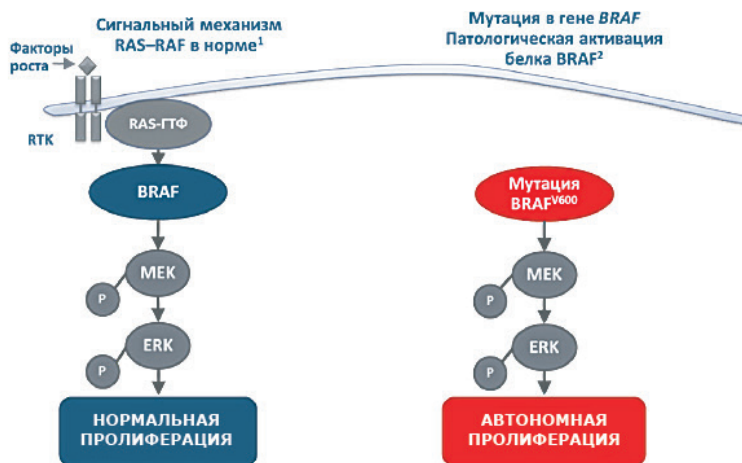
9. Camidge DR et al., Activity and safety of crizotinib in patients with ALK-positive non-small-cell lung cancer: updated results from a phase 1 study. *Lancet Oncol* 2012; 13:1011-1019.
10. Kim et al., Updated Results of a Global Phase II Study with Crizotinib in Advanced ALK-positive Non-small Cell Lung Cancer. *ESMO* 2012; Abstract 1230PD.
11. Food and Drug Administration (2011) Summary review (application number: 202570Orig1s000). Food and Drug Administration, Silver Spring.
12. Camidge DR, Hirsch FR, Varella-Garcia M, Franklin WA. Finding ALK- positive lung cancer: what are we really looking for?// *J Thorac Oncol.*- 2011 - 6(3) - P411-3.
13. Meno-Kenudson M, Chirieac LR, Law K, et al. A novel, highly sensitive antibody allows for the routine detection of ALK-rearranged lung adenocarcinomas by standard immunohistochemistry.// *Clin Cancer Res.* – 2010 – Vol.1, N16(5) – P.1561-71.
14. Sanders HR, Li HR, Bruey JM.et al. Exon scanning by reverse transcriptase-polymerase chain reaction for detection of known and novel EML4-ALK fusion variants in non-small cell lung cancer.// *Cancer Genet.* – 2011 – Vol.204 N1 – P.45-52.
15. Lindeman NI, Cagle PT, Beasley MB, Chitale DA, Dacic S, Giaccone G, Jenkins RB, Kwiatkowski DJ, Saldivar JS, Squire J, Thunnissen E, Ladanyi M Molecular Testing Guideline for Selection of Lung CancerPatients for EGFR and ALK Tyrosine Kinase Inhibitors.Guideline from the College of American Pathologists, International Association for the Study of Lung Cancer, and Association for Molecular Pathology *J Mol Diagn.* 2013 Jul;15(4):415-53. doi: 10.1016/ j.jmoldx. 2013.03.001. Epub 2013 Apr 4. – P. 21-24.
16. Acquaviva J, Wong R, Charest A. The multifaceted roles of the receptor tyrosine kinase ROS in development and cancer. *Biochim Biophys Acta* 2009;1795:37-52.
17. Charest A, Lane K, McMahon K, et al. Fusion of FIG to the receptor tyrosine kinase ROS in a glioblastoma with an interstitial del(6)(q21q21). *Genes Chromosomes Cancer* 2003;37:58-71.
18. Rikova K, Guo A, Zeng Q, et al. Global survey of phosphotyrosine signaling identifies oncogenic kinases in lung cancer. *Cell* 2007;131:1190-203
19. Gu TL, Deng X, Huang F, et al. Survey of tyrosine kinase signaling reveals ROS kinase fusions in human cholangiocarcinoma. *PLoS One* 2011;6(1):e15640
20. Davies KD, Doebele RC. Molecular pathways: ROS1 fusion proteins in cancer. *Clin Cancer Res* 2013;19:4040-5.
21. Gainor JF, Shaw AT. Novel targets in non-small cell lung cancer: ROS1 and RET fusions. *Oncologist* 2013;18:865-75.

Мутация гена BRAF

Тест на наличие мутации гена BRAF показан больным с метастатической меланомой и распространенным раком легкого для отбора пациентов на терапию низкомолекулярными ингибиторами мутированного белка BRAF

Сигнальный путь MAPK

В физиологических условиях сигнальный путь MAPK (mitogen-activated protein kinase) связывает внеклеточные сигналы (факторы роста, гормоны и др.) с ядром клеток – это приводит к активации генов, ответственных за клеточную пролиферацию, дифференцировку и апоптоз. Каскад MAPK включает белки RAS, RAF, MEK и ERK; RAS расположен ближе к внутренней поверхности клеточной мембраны, а RAF, MEK и ERK являются цитозольными белками. Активация данного сигнального пути в норме происходит за счет стимуляции мембранных рецепторов внеклеточными сигналами. В опухолях аномальная активация процессов пролиферации может происходить вследствие мутаций, в частности, в белках KRAS, NRAS и BRAF. Для меланомы кожи наиболее характерны мутации BRAF.



Частота и виды мутаций в гене BRAF

Частота мутаций в гене BRAF при меланоме кожи, по данным разных исследователей, варьирует от 30—40 до 70%. Наиболее распространенной (69—94% случаев) разновидностью BRAF-мутаций является V600E — замена валина на глутамин в 600-м кодоне. Эта мутация представляется доминирующей, но далеко не единственной разновидностью нарушений BRAF [14, 15]. Второй по частоте является мутация V600K — ее частота может достигать 5-10%. Мутации V600D и V600R встречаются значительно реже.

	598	599	600			601	602	AK в 600		
			1798	1799	1800					
WT	...	GCT	ACA	G	T	G	AAA	TCT	...	V - валин
V600E				G	A	G				E - глут. к-та
V600K				A	A	G				K - лизин
V600R				A	G	G				R - аргинин
V600E2				G	A	A				E - глут. к-та
V600M				A	T	G				M - метионин
V600D				G	A	T				D - аспар. к-та

Требования к качеству отправляемого материала для определения статуса гена BRAF

- 1) Случаи с неоперабельной или метастатической меланомой (стадии IIIС-IV) и распространённым мелкоклеточным раком лёгкого.
- 2) Образцы опухолевой ткани должны быть зафиксированы в нейтральном забуференном формалине и залиты в парафин.
- 3) Для анализа на наличие мутации необходимо предоставить один парафиновый блок (обязательно!) и соответствующее именно этому блоку диагностическое стекло (желательно!) с окраской гематоксилином-эозином.
- 4) Предпочтителен биологический материал с содержанием опухолевых клеток не менее 50% в срезе.

Методы определения BRAF мутации

Основными методами проведения молекулярно-генетических исследований являются методы, основанные на проведении полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Наиболее распространенным является секвенирование по методу Сенгера, преимуществом которого является определение всех мутаций в исследуемом экзоне. К недостаткам метода относится возможность получения ложно-негативных результатов в 2-10% случаях из-за примеси нормальных тканей.

Также используется метод аллель-специфической ПЦР в режиме реального времени, преимуществами которого является простота, допустимость присутствия нормальных тканей, возможность выявить мутацию, даже если в образце присутствует до 1% опухолевых клеток. Недостатком является выявление мутаций, предусмотренных только тест системой.

Статус мутации гена BRAF и выбор тактики лечения

За последние годы достигнуты значительные успехи в изучении патогенетических основ развития меланомы и сделан огромный шаг к выявлению новых потенциальных молекулярных мишеней. Открытие молекулярной мишени BRAF и понимание ее роли в патогенезе меланомы

легли в основу разработки нового класса препаратов – низкомолекулярных ингибиторов мутированного фермента BRAF. Использование этих препаратов позволяет блокировать патологически активированный сигнальный каскад, который запускается мутацией BRAFV600, и, таким образом, тормозит развитие опухоли. Следует особо отметить, что воздействие данной группы препаратов на опухолевые клетки с нормальной последовательностью BRAF, напротив, может сопровождаться патологической активацией каскада RAS-RAF-MEK-ERK и провоцировать рост меланомы. Этот феномен свидетельствует об исключительной важности достоверной диагностики статуса гена BRAF. **BRAF ингибиторы не должны использоваться в тех случаях, когда статус мутации BRAF не определен или мутация не обнаружена!**

Следует подчеркнуть, что ингибиторы BRAF и MEK зарегистрированы к применению только для терапии метастатической формы меланомы. В настоящее время отсутствуют данные по использованию ингибиторов BRAF и MEK в адьювантном режиме, поэтому они не могут быть рекомендованы пациентам, перенесшим (условно-)радикальное удаление первичной меланомы и метастатических очагов.

В рандомизированных клинических исследованиях ингибиторы BRAF – вемурафениб и дабрафениб - продемонстрировали значительное преимущество по сравнению со стандартной химиотерапией в отношении частоты объективных ответов, продолжительности жизни без прогрессирования и общей продолжительности жизни у пациентов с метастатической меланомой и подтвержденной мутацией гена BRAF, ранее не получавших системного лечения (см. рис. 2). Полученные результаты привели к пересмотру международных клинических рекомендаций, которые включили эти препараты в современные стандарты лечения метастатической меланомы кожи с BRAF мутацией.

Результаты последних исследований показали, что двойное ингибирование сигнального пути MAPK, которое достигается при одновременном использовании ингибиторов BRAF и MEK, обладает более высокой эффективностью по сравнению с ингибитором BRAF в монорежиме. Важно отметить, что, помимо более высокой эффективности, комбинация препаратов снижает вероятность развития резистентности к проводимой терапии и отдельных нежелательных явлений, в том числе плоскоклеточного рака кожи. В рамках клинического исследования соBRIM было подтверждено, что комбинированная терапия с использованием препаратов вемурафениб и кобиметиниб в 90% случаев позволяет достичь ответа на терапию у больных BRAF+ метастатической меланомой. У каждого второго пациента более года отсутствовали признаки прогрессирования заболевания, а общая выживаемость приближалась к 2 годам (рис. 3).

Сходные результаты были продемонстрированы в исследованиях дабрафениба и траметиниба. В частности, исследование COMBI-V (дабрафениб+траметиниб vs монотерапия вемурафенибом) продемонстрировало значимое увеличение общей продолжительности жизни у пациентов, получавших комбинированную терапию, по сравнению с применением вемурафениба без ингибитора MEK (25.6 мес. vs 18 мес.; рис. 4, табл. 1). В клиническом испытании COMBI-D сравнивалась эффективность комбинации дабрафениб+траметиниб по отношению к монотерапии дабрафенибом в сочетании с плацебо. Примечательно, что в этом исследовании были

Рис. 4. Результаты клинического исследования COMBI-V: (дабрафениб+траметиниб vs монотерапия вемурафенибом).

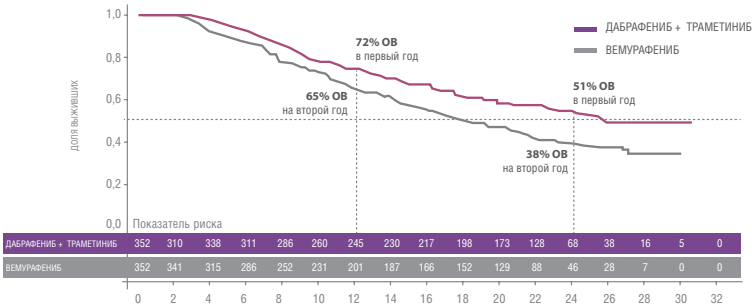
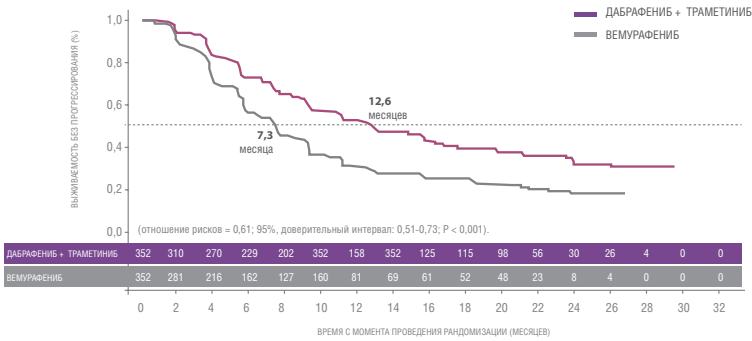
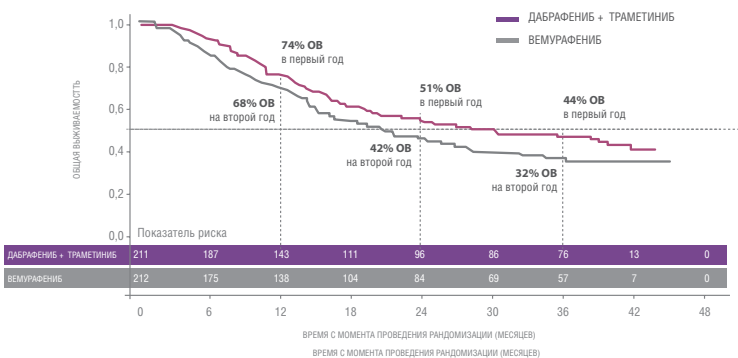


Рис. 5. Результаты клинического испытания COMBI-D: эффективность комбинации дабрафениб+траметиниб по отношению к монотерапии дабрафенибом в сочетании с плацебо.



Сводные данные по всем исследованиям представлены в таблице 1.

Исследование	COMBI-d		COMBI-v	
	Д + Т	Д + пла	Д + Т	В
Препарат(ы)				
Кол-во пациентов, n	211	212	352	352
Медиана ВБП, мес.	11.0	8.8	12.6	7.3
Медиана ОВ, мес.	25.1	18.7	25.6	18.0
Медиана ОВ, ЛДГ ≤ ВГН	Нет анализа		НД	21.5
Медиана ОВ, ЛДГ > ВГН			10.8	8.9

Сокращения: В – вемурафениб, К – кобиметиниб, Д – дабрафениб, Т- траметиниб, пла – плацебо, НД – не достигнута, ВГН – верхняя граница нормы.

Таким образом, использование BRAF/МЕК ингибиторов у пациентов с мМК, имеющей BRAF мутацию, представляет первый успешный пример персонализированной терапии, изменившей представление о мМК как об опухоли, рефрактерной к лекарственному лечению. Эти препараты пришли на смену химиотерапии и стали новым стандартом лечения меланомы с BRAF мутацией, что подтверждает ранее сформулированный постулат о необходимости разработки различных подходов к лечению для различных молекулярно-генетических подтипов меланомы. Появляются результаты исследований таргетных препаратов и при других типах меланомы, имеющих альтернативные мутации (NRAS, cKIT). Можно ожидать, что определение молекулярно-генетического портрета опухоли уже в ближайшее время станет неотъемлемой частью разработки стратегии лечения каждого пациента, имеющего диагноз «меланома».

На сегодняшний день все существующие BRAF и МЕК ингибиторы зарегистрированы на территории Российской Федерации и, при соответствующем лекарственном обеспечении, с успехом могут быть использованы для терапии мМК. Профиль безопасности этих препаратов позволяет использовать их в амбулаторных условиях.

Статьи

1. Г.Ю. Харкевич. Вемурафениб в лечении метастазов меланомы в головной мозг. Онкология. Журнал им.П.А.Герцена, 6, 2014.
2. Г.А. Франк et al, Первое Всероссийское молекулярно-эпидемиологическое исследование меланомы: результаты анализа мутаций в гене BRAF. Архив Патологии, 3, 2014.
3. С.А. Проценко et al, Современные возможности персонализированной терапии метастатической меланомы кожи. Современная онкология №3, том 16, 2014.
4. Larkin J et al. Update of progression-free survival and correlative biomarker analysis from coBRIM: Phase 3 study of cobimetinib plus vemurafenib in advanced-BRAF-mutated melanoma; Poster presentation at ASCO 2015
5. Robert C, et al. Ann Oncol. 2015;26 (suppl 6) [abstract 3301].
6. Flaherty K, et al. J Clin Oncol. 2016;34 (suppl; abstr 9502).

7. Hauschild A, et al. Poster presented at ESMO 2014, Abstract 1092PD
8. Robert, C. LBA4 Oral presentation at ESMO 2015

Эффективность BRAF/MEK ингибиторов для лечения взрослых пациентов с распространенным немелкоклеточным раком легкого (НМРЛ) с мутацией гена BRAF V600.

Пациентам с раком легкого рекомендуется проводить тестирование на биомаркеры, чтобы подобрать подходящую таргетную терапию.

Дабрафениб и траметиниб являются таргетными препаратами, подавляющими активность различных представителей семейства серин-треониновых киназ, а именно BRAF и MEK1/2 в сигнальном пути RAS/RAF/MEK/ERK. Данный сигнальный путь вовлечен в развитие немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ) и меланомы, а также в другие виды злокачественных новообразований. Комбинация препаратов дабрафениб и траметиниб сильнее замедляет рост опухоли, чем монотерапия.

Применение комбинации препаратов дабрафениб и траметиниб у пациентов с распространенным НМРЛ с мутацией в гене BRAF V600 основано на безопасности и эффективности дабрафениба в сочетании с траметинибом, согласно результатам многоцентрового нерандомизированного открытого исследования II фазы в трех когортах, в котором участвовали пациенты с НМРЛ IV стадии с мутацией BRAF V600 (36 пациентов, ранее не получавшие химиотерапию, и 57 пациентов, ранее получавшие химиотерапию). Согласно оценке частоты объективного ответа (ЧОО), первичной конечной точки исследования, у 36 пациентов, ранее не получавших химиотерапию и принимавших 150 мг дабрафениба 2 раза в сутки и 2 мг траметиниб 1 раз в сутки, ЧОО составила 61,1% (ДИ 95%: 43,5%, 76,9%) (1). У 68% пациентов в данной группе не наблюдалось прогрессирование заболевания спустя 9 месяцев. Медианы длительности ответа (ДО) и выживаемости без прогрессирования (ВБП) в группе пациентов, ранее не получавших химиотерапию, на момент одобрения еще не были достигнуты (1). В группе пациентов, ранее получавших химиотерапию и принимавших данные препараты в той же дозировке, ЧОО составила 66,7% (ДИ 95%: 52,9%, 78,6%)¹. Ответ характеризовался устойчивостью, медиана ДО составила 9,0 месяца (ДИ 95%: 6,9, 16,0), медиана ВБП – 9,7 месяца (ДИ 95%: 6,9, 19,6) (1).

К наиболее распространенным нежелательным явлениям (частота возникновения более 20%) относились лихорадка, тошнота, рвота, периферический отек, диарея, сухость кожи, потеря аппетита, астения, озноб, кашель, усталость, сыпь и диспноэ (1).

Список литературы:

1. Planchard D, et al. Lancet Oncol., 2016;17:642-650;
2. Planchard D, et al. Lancet Oncol., 2016;17:984-993.

Мутации генов BRCA1 и BRCA2

Тестирование мутаций в генах BRCA1 и BRCA2 в рамках программы «Совершенствование молекулярно-генетической диагностики в Российской Федерации» выполняется у пациенток с платиночувствительным рецидивом распространенного рака яичников.

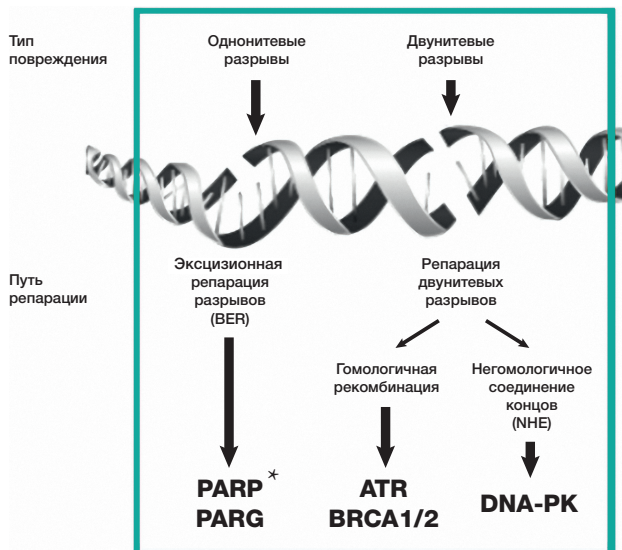
Эпидемиология мутаций в генах BRCA1 и BRCA2

Частота встречаемости BRCA мутаций в популяции – 1:800-1:1000, при этом она зависит от географической локализации и этнической группы. При раке яичников мутации генов BRCA 1/2 выявляются в 10-15% случаев.

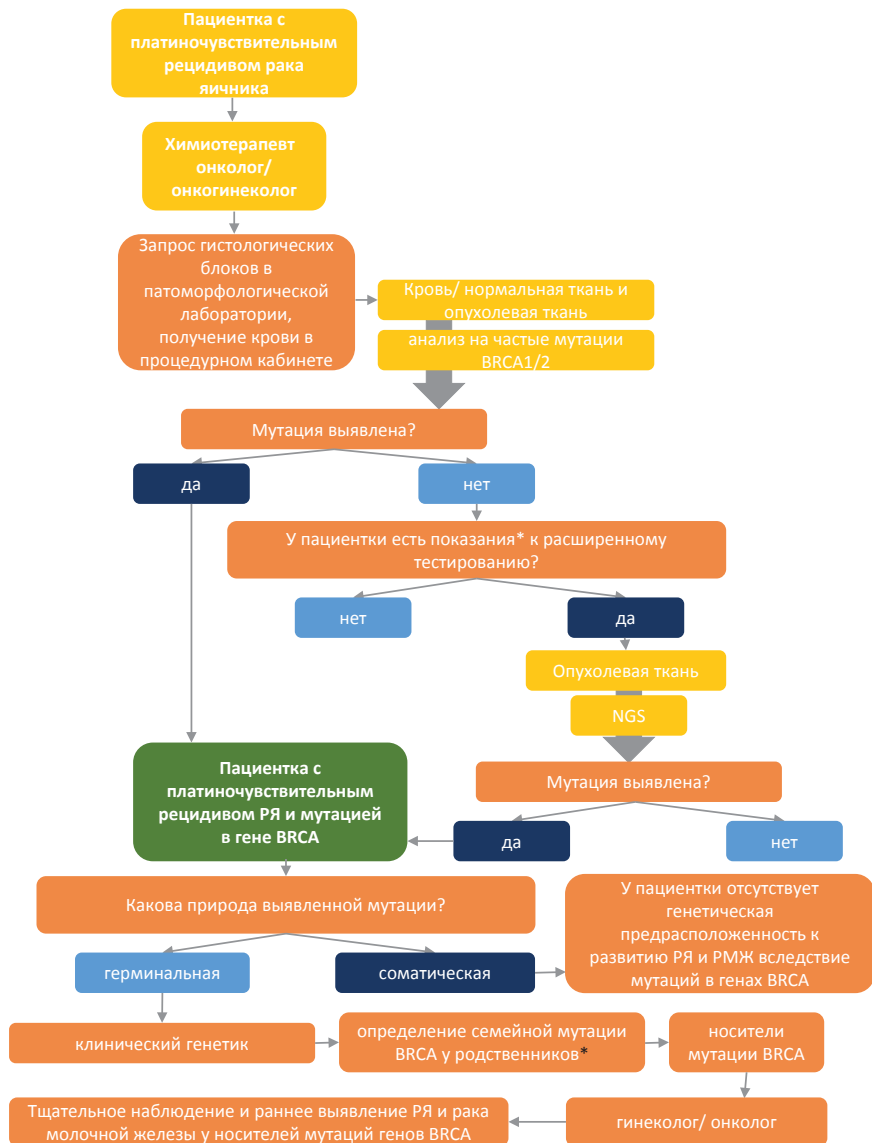
Роль мутаций в генах BRCA1 и BRCA2

Гены BRCA1/2 относятся к группе генов-супрессоров, вовлеченных в процесс гомологичной репарации двуниевых разрывов ДНК.

Наличие клинически значимых мутаций в генах BRCA1 или BRCA2 вызывает потерю функции белков, кодируемых этими генами, в результате чего нарушается основной механизм репарации двуниевых разрывов ДНК. Альтернативные пути репарации (BER, NHEJ) не способны полностью исключить накопление большого числа ошибок в первичной структуре ДНК (геномная нестабильность), следствием чего является повышенный риск возникновения некоторых злокачественных новообразований (рака молочной железы, рака яичников, рака простаты, рака поджелудочной железы) (рис.1).



Определение мутации генов BRCA1 и BRCA2



* не входит в Программу

При мутации BRCA1/2 эффективной стратегией лечения является применение PARP-ингибитора олапариба. В случаях, когда блокируется фермент PARP, клетки не могут эффективно восстанавливать однонитевые разрывы. Во время репликации ДНК эти однонитевые разрывы переходят в двунитевые. Накопление двунитевых разрывов при нарушении их восстановления в случае мутации BRCA1/2 ведет к селективной гибели опухолевых клеток.

Прогрессированием рака яичников считается наличие любого из нижеуказанных критериев:

- Рост СА-125, подтвержденный повторным анализом с интервалом не менее 1 недели (маркерный рецидив):
 - в два раза выше верхней границы нормы, если ранее он находился в пределах нормы;
 - в два раза выше своего наименьшего значения, зарегистрированного во время проводимого лечения, если нормализации СА-125 не зафиксировано.
- Клинически или радиологически подтвержденное прогрессирование.
- Рост клинически или радиологически подтвержденным прогрессированием.

Платиночувствительным считается рецидив при длительности бесплатинового интервала (интервала от последнего введения препарата платины) более 6 месяцев.

1. Персонализированный подход к выбору терапии, основанный на результатах молекулярно-генетического тестирования, позволит повысить эффективность лечения рака яичников:
 - Наличие клинически значимых мутаций BRCA1/2 позволяет определить пациенток, у которых наиболее эффективна терапия PARP-ингибиторами (олапариб);
 - Наличие мутаций BRCA1/2 дает возможность прогнозировать эффективность различных режимов химиотерапии.
2. Знание статуса BRCA позволит более точно определить прогноз заболевания.
3. Выявление мутаций BRCA1/2 у больных раком яичников определяет необходимость обследования их родственников для выявления здоровых носителей мутации BRCA1/2 и обеспечения диагностики злокачественных новообразований на ранних стадиях, когда лечение наиболее эффективно.

С учетом частоты встречаемости, при выборе панели мутаций для программы «Совершенство молекулярно-генетической диагностики в Российской Федерации» в российской популяции у больных раком яичников выбраны наиболее часто встречающиеся мутации (см. Таблица 1).

Отрицательный результат теста на частые мутации не гарантирует отсутствие других мутаций в этих генах. При наличии другого злокачественного образования в анамнезе у самой пациентки (рак молочной железы и др.), семейного анамнеза (рак молочной/грудной железы, рак яичников, рак предстательной железы, рак поджелудочной железы и др. у ближайших родственников), рекомендовано проведение консультации клинического генетика.

*PARP-поли(АДФ-рибоза)-полимераза PARP-поли(АДФ-рибоза)-гидролаза ATR-серин/треониновая протеинкиназа (атаксия-телеангиэктазия и Rad3-родственный белок) DNA-ПК-ДНК-зависимая протеинкиназа

Табл. №1 Наиболее часто встречающиеся мутации у пациенток с раком яичников

	Мутация	Частота встречаемости
BRCA1		
1.	5382insC	68,8%
2.	4153delA	12,5%
3.	300T>G	6,3%
4.	185delAG	1,6%
5.	2080delA	3,1%
6.	3819delGTAAA	3,1%
7.	3875delGTCT	1,6%
BRCA2		
8.	6174delT	4,8%

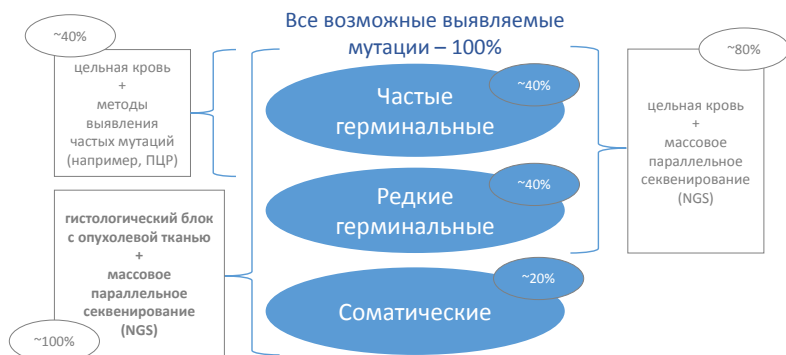
Для качественного оказания помощи больным раком яичников важно взаимодействие всех специалистов, вовлеченных в процесс выбора режима терапии.

В интересах пациенток в рамках Программы возможна отправка нескольких видов биологического материала: опухолевой ткани (гистологического блока) и/или здоровой ткани (крови или гистологического блока). Однако, только комбинация «опухолевая + здоровая ткань» позволяет выявлять весь спектр мутаций генов BRCA (когда показано) и определять их характер (наследственный или соматический), что имеет огромное значение для медико-генетического консультирования пациенток и их родственников.

Отправка на BRCA-тестирование только здоровой ткани (например, крови) позволяет выявить только герминальные мутации; отправка опухолевой и здоровой ткани позволяет выявить и герминальные и соматические мутации с определением их характера. Соматические мутации генов BRCA выявляются в 6-8% случаев серозного РЯ высокой степени злокачественности и составляют не менее 20% случаев BRCA-ассоциированного рака яичника. Соматические мутации также определяют характер и тактику лечения.

Рекомендуется направлять на BRCA-тестирование одновременно и опухолевый материал пациентки, и здоровую ткань (кровь). Такой подход позволяет с максимальной чувствительностью выявлять случаи BRCA-ассоциированного рака яичников, а также определять герминальный или соматический характер мутации, что может быть важно для дальнейшей диагностики родственников пациенток.

Диагностическая чувствительность BRCA-тестирования зависит от применяемых методов выявления мутаций и используемых для анализа материалов



BRCA-тестирование с использованием ДНК, выделенной из опухолевой ткани, позволяет достичь максимального выявления случаев BRCA-ассоциированного рака

Список литературы:

1. Balmana J, Diez O, Rubio IT, Cardoso F. Ann Oncol 2011;22 (Suppl 6):vi31 – vi34.
2. Е. Н. Имянитов. Практическая онкология. 2010; Т. 11, № 4: 258-266.
3. Любченко Л. Н., Батенева Е. И., Абрамов И. С., Емельянова М. А., Будик Ю. А., Тю-ляндина А. С., Крохина О. В., Воротников И. К., Соболевский В. А., Наседкина Т. В., Портной С. М. Наследственный рак молочной железы и яичников. Злокачественные опухоли. 2013; (2):53-61. DOI:10.18027/2224-5057-2013-2-53-61.
4. Jackson SP. Drug Discovery World, 2003; Fall:41-45.
5. Л. Н. Любченко, Е. И. Батенева. Медико-генетическое консультирование и ДНК- диагностика при наследственной предрасположенности к раку молочной железы и раку яичников. Пособие для врачей. М.: ИГ РОНЦ, 2014. 64 с.

