

## Жидкостные биопсии как новый подход к исследованию мутационного статуса опухоли

Молекулярно-диагностическая лаборатория ГАУЗ «РКОД» МЗ РТ  
Гордиев М.Г.

## Активация EGFR – основной пусковой механизм злокачественности

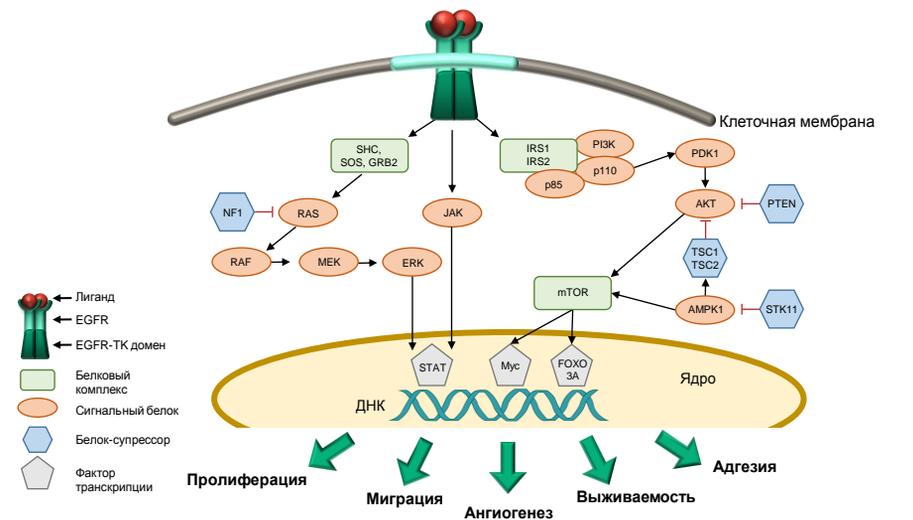
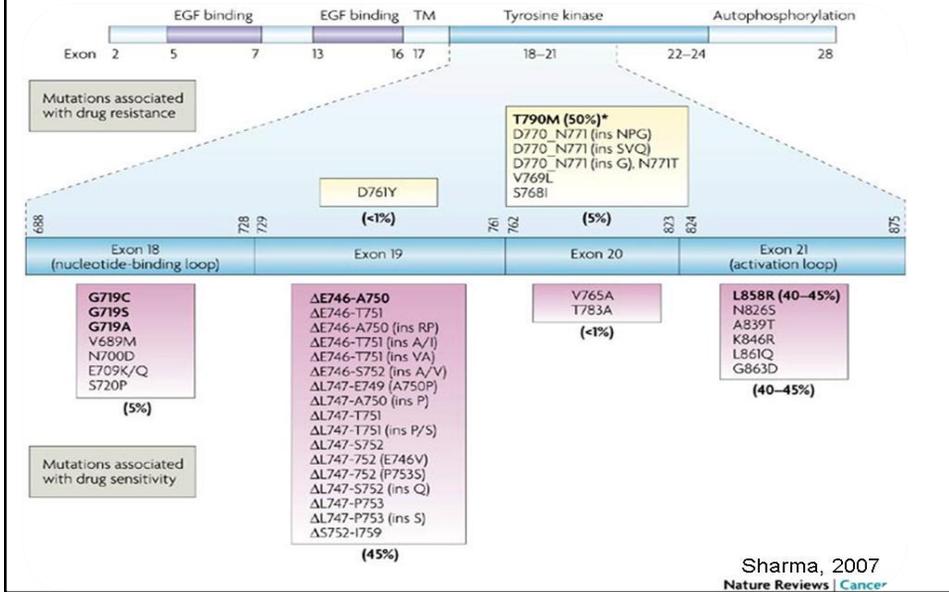


Figure adapted from Harris & McCormick. Nat Rev Clin Oncol 2010;7:251–265; Seshacharyulu, et al. Expert Opin Ther Targets 2012;16:15–31; Yarden, et al. Nat Rev Mol Cell Biol 2001;2:127–137; Baselga, et al. Hematol Oncol Clin North Am 2002;16:1041–1063; Herbst, et al. Expert Opin Invest Drugs 2002;11:837–849; Harris & McCormick. Nat Rev Clin Oncol 2010;7:251–265

По материалам конференции RUSSCO по РЛ 2016, презентация Сакаевой Д.Д.

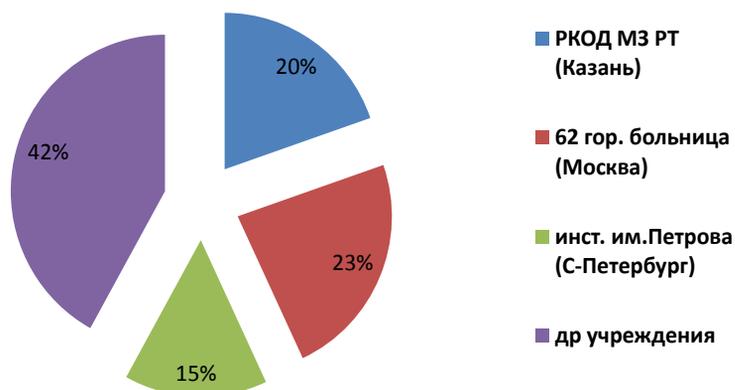
## Ингибиторы EGFR- эффективны ТОЛЬКО при мутациях в гене EGFR:



## Лаборатории- участники программы совершенствования молекулярно-генетической диагностики в РФ



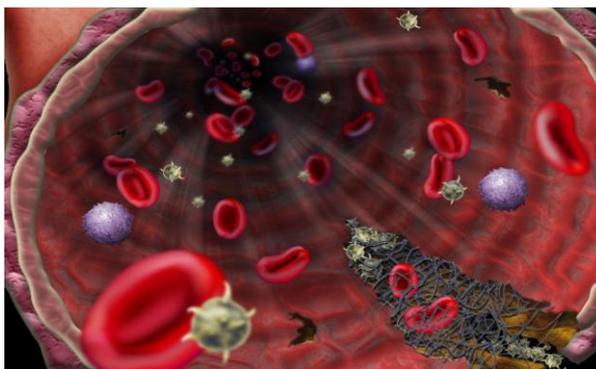
## Доля лабораторий в общем количестве проведенных исследований EGFR мутаций в РФ за 2011-2015 гг.



Информационный портал молекулярно-генетической диагностики онкологических заболеваний [ Электронный ресурс ], 2012 год, URL: <http://www.cancergenome.ru/page40>

## Новые подходы!

В последнее время стали появляться технические возможности для анализа циркулирующих НК, в том числе опухолевых ДНК (мут. EGFR) и цитологии.



ГАУЗ КРОД МЗ РТ, молекулярно-диагностическая лаборатория, Гордиев М.Г., мнение автора, 2016г.

Nicole Rager-Fuller, NSF

## Недостатки работы с гистологическим материалом (операционный, биопсийный материал)

- 5-10 дней до результата! (без учета работы с архивами)
- Зачастую отсутствие возможности получения материала повторно (сложность повторных биопсий в связи с тяжестью состояния)
- Фиксация, хранение гистологического материала не по стандартам



ГАУЗ КРОД МЗ РТ, молекулярно-диагностическая лаборатория, Гордиев М.Г., мнение автора, 2016г.

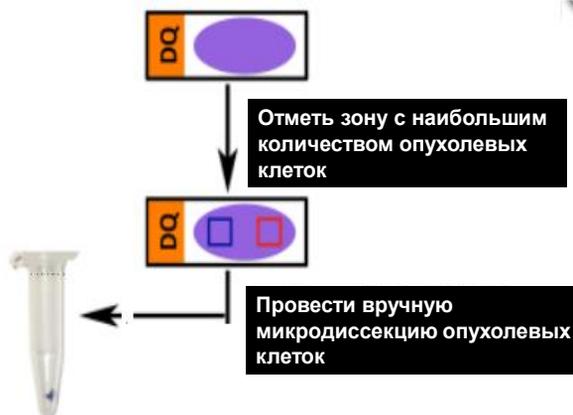
## Выделение ДНК/РНК из цитологического и гистологического материала – число успешных случаев

ДНК/РНК	Цитологические образцы	Гистологические образцы	Число информативных пар образцов
Выделение ДНК (n=75)	73 (97%)	74 (99%)	72 (96%)
Выделение РНК (n=44)	42 (95%)	38 (86%)	36 (82%)

### Число совпадений результатов тестирования между образцами

Тестирование	Мутации EGFR (n=72)	Транслокации EML4-ALK (n=36)
<b>Конкордантные пары</b>		
Дикий тип/дикий тип	54 (75%)	32 (89%)
Мутация/мутация	14 (19%)	4 (11%)
<b>Итого</b>	<b>68/72 (94%)</b>	<b>36 (100%)</b>
<b>Дискордантные пары</b>		
Цитология: мутация/ гистология: дикий тип	3 (4%)	0
Цитология: дикий тип/ гистология: мутация	1 (1%)	0
<b>Итого</b>	<b>4 (6%)</b>	<b>0</b>

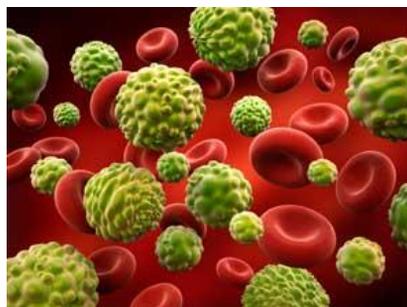
## Как?



Bryan L. et al, Cancer Cytopathology [Volume 121, Issue 9](#), pages 489–499, September 2013

## Один из альтернативных путей диагностики

Определение мутации EGFR в циркулирующей опухолевой ДНК которая доступна для выявления в плазме крови.

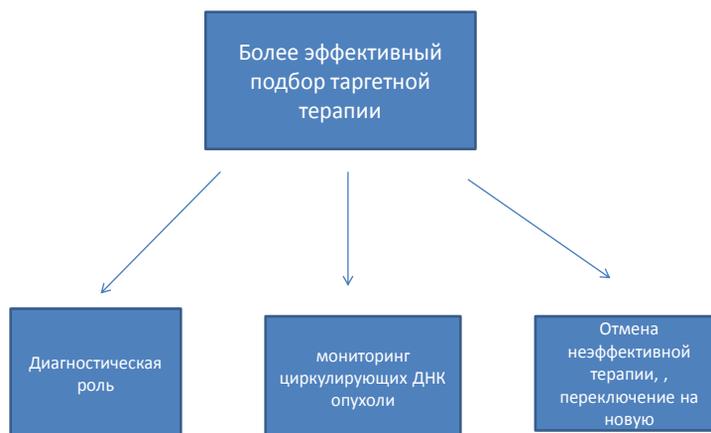


- Обеспечивает возможность захватить циркулирующую ДНК разных пулов клеток гетерогенной опухоли
- Забор крови/плазмы является несложной манипуляцией
- Позволяет проводить серийный мониторинг циркулирующих ДНК опухоли (цДНК), в случае возникновения резистентности
- Биопсия часто предоставляет неадекватное / недостаточное количество материала для молекулярного –генетического анализа

C.Betgeowda et al. ctDNA Is a Specific and Sensitive Biomarker in Multiple Human Cancers, Cancer Discovery, April 2014, 4; OF8



## Потенциальные задачи жидкой биопсии (плазмы)



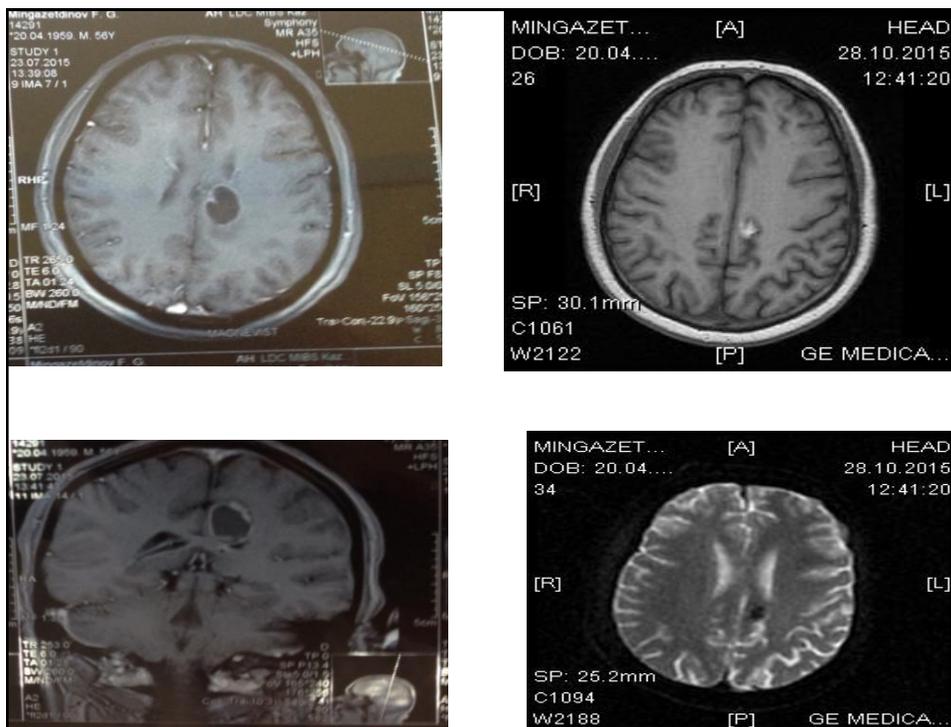
*ГАУЗ КРОД МЗ РТ, молекулярно-диагностическая лаборатория, Гордиев М.Г., мнение автора, 2016г.*

## Диагностическая роль жидкой биопсии

### Клинический случай №1

- Больной М. 1959 г.
- Диагноз: Периферический Са верхней доли левого легкого. T4N2M1.
- **Цитология плевральной жидкости:** Комплексы клеток плоскоклеточного Са.
- **КТ ОГК от 22.07.2015** **Заключение:** Мтс в кости. Мтс в 2-х сторонние шейные, средостенные, забрюшинные л/у. Мтс в легкие. Центральный Са левого легкого.
- Выполнена пункция лимфатического узла надключичного справа. **Цитология:** Мтс низкодифференцированного Са.
- **МРТ головного мозга от 07.2015.** Мтс очаги №2 мах 2,5x1,6x2,5 см
- **Генетические исследования**  
- плазма - делеция в 19 экзоне.

- Консилиум, учитывая распространенность процесса, соматическое состояние больного ECOG 2 и наличие EGFR мутации решено начать таргетную терапию гефитинибом. Начало приема- 08.2015 г.
- Контрольное обследования через 3 месяца таргетной терапии ИТК
- **МРТ головного мозга** положительная динамика уменьшение очагов на 50%.
- **КТ ОГК** так же отмечена положительная динамика образования в легком 16x10 мм(07.2015г. 58x35 мм).
- **При контрольном обследовании 03.2016** по данным МРТ головного мозга стабилизация. КТ ОГК положительная динамика.
- **Принимает гефитиниб 9 мес**



### Клинический случай №2

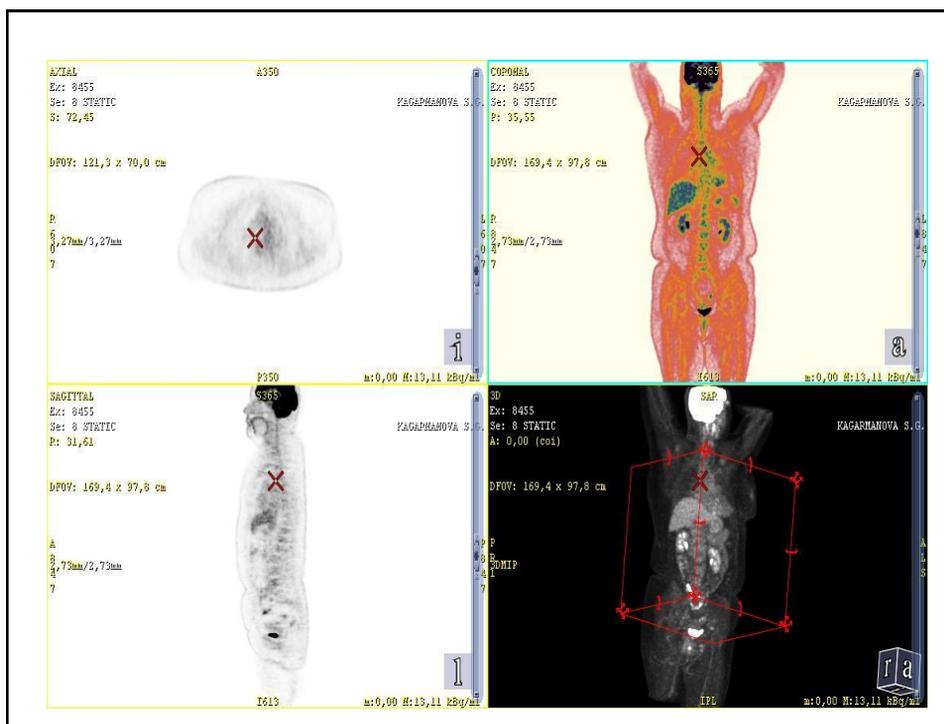
- Больная К. 1949 г.
- Диагноз: Са левого легкого. T4NxM1.

**КТ ОГК 26.06.2015:** В левом легком опухоль 32x28 мм, слева.  
Увеличенные внутригрудные л/у

**УЗИ л/у шеи:** В н/3 справа мтс пораженные л/у до 24x12 мм, слева до 14x10 мм. Выполнена пункция.

**Цитология пунктата из лимфатического узла шеи.**  
Метастаз низкокодифференцированного злокачественного процесса (метастаз низкокодифференцированного крупноклеточного Са или метастаз беспигментной меланомы).

- Иммуноцитохимическое** Заключение :  
иммуноцитохимическая картина характерна для аденокарциномы: ЦКР 5  
 - реакция негативная, ТТФ 1 - реакция негативная, ЭМА, РЭА , ЦКР 7  
 слабо (необходимо дообследование раpcreas и ovarii).
- Генетические исследования плазмы выявлена - мутация L858R.**
- Учитывая распространенность процесса, наличие EGFR мутации и  
 соматическое состояние больной ECOG 2 решено начать таргетную  
 терапию гефитинибом. 07.2016
- После 3-х месяцев приема проведено контрольное обследование.
- КТ ОГК от 08.10.2015:** положительная динамика уменьшение опухоли и  
 мтс л/у более 50%.
- КТ ОГК от 28.03.2016** стабилизация процесса.
- Принимает гефитиниб 9 месяц.



## Структура молекулярных нарушений при плоскоклеточном раке легкого и аденокарциноме.



Bryan A. Chan, Transl Lung Cancer Res 2015;4(1):36-54

мониторинг циркулирующих ДНК  
опухоли

### Клинический случай №3

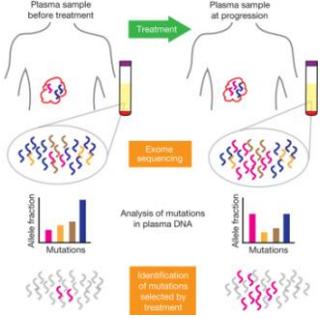
- Больная К. 1954 г.
- **Диагноз:** Са левого легкого. pT2N0M0.
- 15.05.14г Операция: Торакотомия слева. Атипическая резекция верхней доли.
- **Гистологическая картина** и фенотип инвазивной аденокарциномы легкого, с преобладанием ацинарного субтипа.
- **В августе 2014 г. КТ ОГК:** в переднем средостении мягкотканное образование 41x17 мм, врастающее в перикард и мягкие ткани.
- **Генетическое исследование плазмы** - выявлена делеции в 19 экзоне.
- 08.2014 начата таргетная терапия гефитинибом.
- На фоне назначения гефитиниба, через месяц, мутация в плазме исчезла

- При контрольном обследовании через 3 месяца положительная динамика.
- В марте 2015 проведен анализ плазмы на EGFR мутацию, выявлена делеция в 19 экзоне, после расспроса выяснено, что больная на протяжении 1,5 месяцев не принимала гефитиниб по причине токсических явлений.
- Проведено КТ ОГК:  
Без существенной динамики.
- Учитывая стабилизацию процесса и **наличие мутации** решено продолжить таргетную терапию гефитинибом.
- Больная приняла 18 курсов таргетной терапии гефитинибом по данным обследования от 03.2016 стабилизация процесса, EGFR мутации в крови не обнаружено



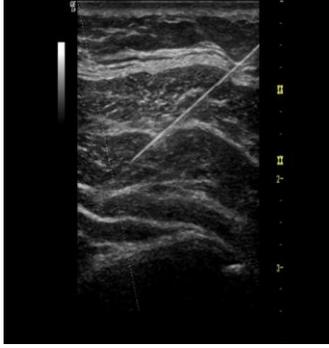
**Методы:**

**Жидкая биопсия?**



Clinical Microbiology and Infection [Volume 15, Issue 7](#), pages 625–633, July 2009

**Ребиопсия?**



GE Healthcare

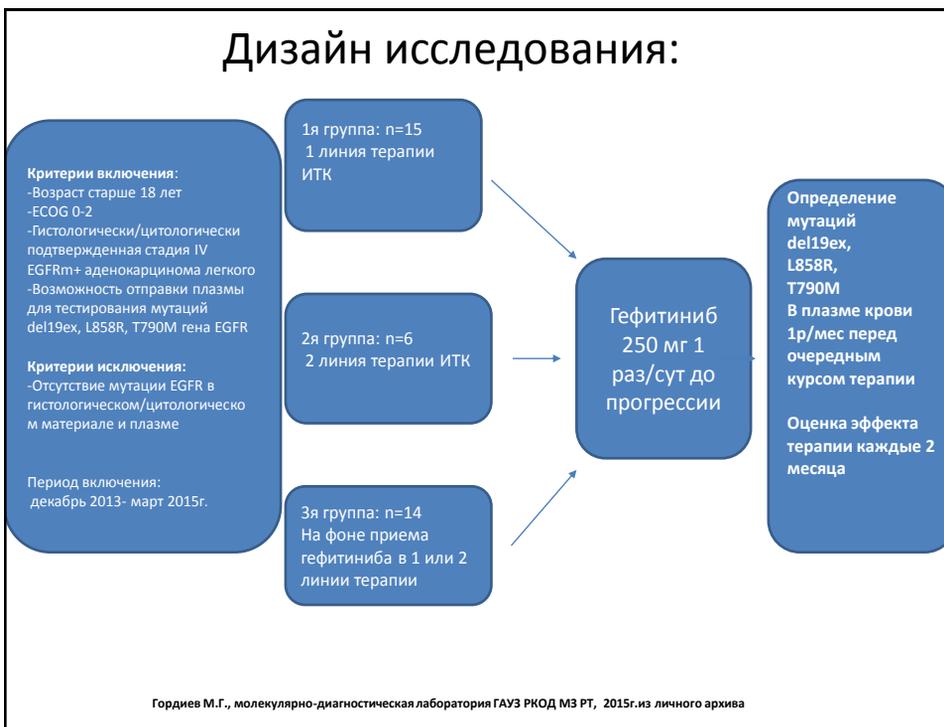
Гордиев М.Г., молекулярно-диагностическая лаборатория ГАУЗ РКОД МЗ РТ, 2015г. из личного архива

## Динамика мутаций EGFR в плазме на фоне приема ингибиторов EGFR

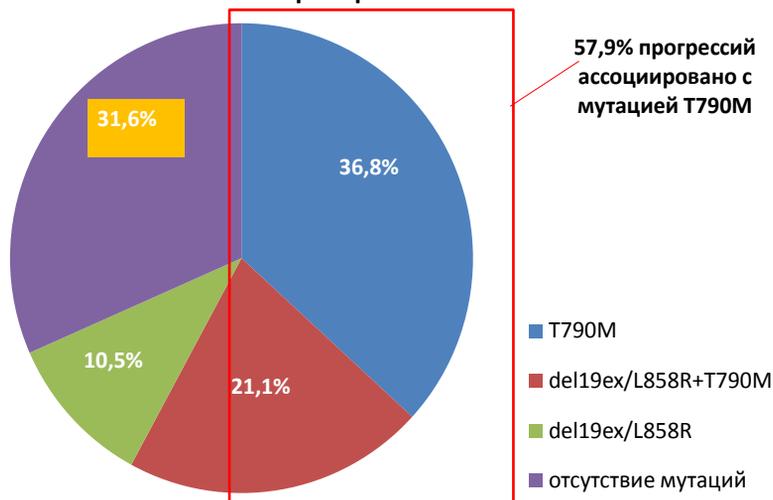
ГАУЗ РКОД МЗ РТ (Казань – Еникеев Р.Ф., Гордиев М.Г.)  
ГБУЗ РКОД МЗ РБ (Уфа Сакаева Д.Д.)

Гордиев М.Г., молекулярно-диагностическая лаборатория ГАУЗ РКОД МЗ РТ, 2015г. из личного архива

## Дизайн исследования:



## мутационный статус при прогрессии



Количество событий 19 из 35 (54%)

Гордиев М.Г., молекулярно-диагностическая лаборатория ГАУЗ РКОД МЗ РТ, 2015г.из личного архива

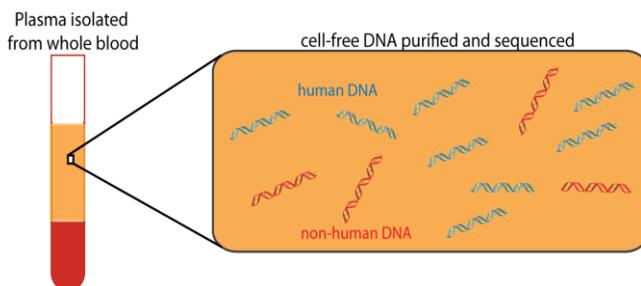
## Выводы:

- Объективный ответ на терапию гефитинибом коррелировал с исчезновением активирующих мутаций EGFR в плазме (может служить маркером эффективности терапии ИТК )
- Повторное появление в плазме активирующих мутаций EGFR и/или T790M может являться одним из предикторов прогрессии заболевания.

При сравнении статуса мутаций EGFR в плазме и образцах опухоли конкордантность составила 88,7%, чувствительность- 83,3%,

Гордиев М.Г., молекулярно-диагностическая лаборатория ГАУЗ РКОД МЗ РТ, 2015г. из личного архива

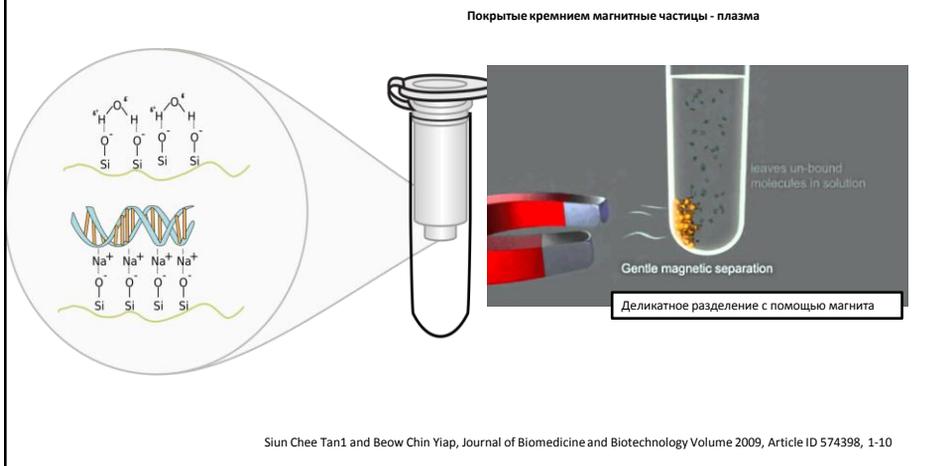
## Знаем для чего! -Как?



Nicole Rager-Fuller, NSF

## Выделение ДНК!

(изначально малое количество сцодНК – потери при выделении + более чувствительные методики)



## Новые возможности - Новые методы

- Основной материал – парафиновые блоки!  
(секвенирование по Сэнгеру, ПЦР, HRM)
- Дополнительный материал – плазма, цитологические стекла,  
(NGS\*, PNA/LNA-clamp PCR\*\*, digital PCR\*\*\*)

\*- секвенирование нового поколения

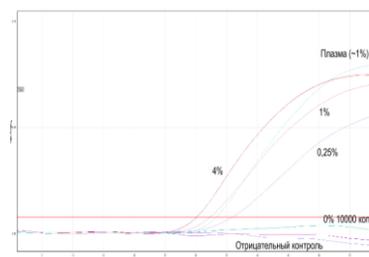
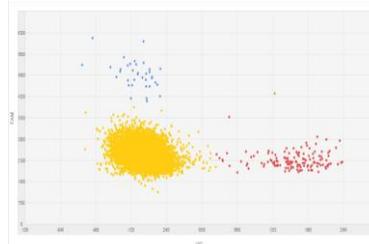
\*\*- ПЦР с применением блокирующих праймеров

\*\*\*- цифровая ПЦР

Гордиев М.Г., молекулярно-диагностическая лаборатория ГАУЗ РКОД МЗ РТ, мнение автора

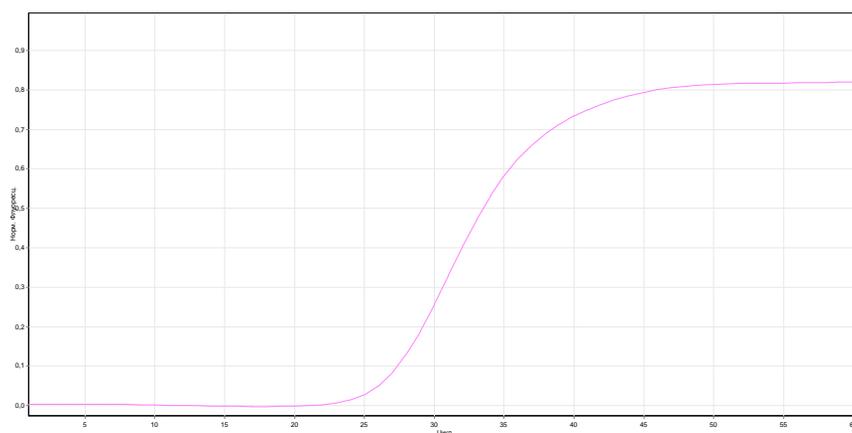
## Методы определения мутационного статуса:

1. материал: плазма
2. Методы детекции:
  - цифровая ПЦР с использованием системы QuantStudio® 3D Digital PCR System (Applied Biosystems)
  - ПЦР «в реальном времени» с модификациями LNA



Гордиев М.Г., молекулярно-диагностическая лаборатория ГАУЗ РКОД МЗ РТ, 2015г. из личного архива

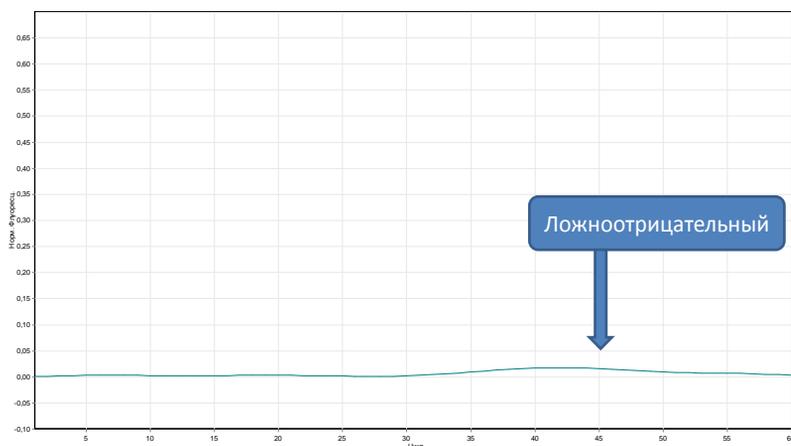
## Пример положительного по мутации L858R образца №1 (ткань) Пациент А



- Количество ~5000 копий/реакцию
- Содержание мутантной ДНК ~10%

Гордиев М.Г., молекулярно-диагностическая лаборатория ГАУЗ РКОД МЗ РТ, 2015г. из личного архива

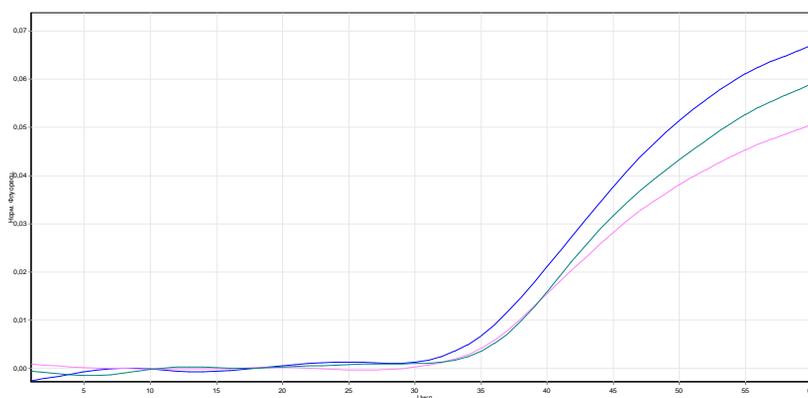
## Пример положительного по мутации L858R образца №2 (плазма) - Пациент А



- Количество ~500 копий/реакцию
- Содержание мутантной ДНК ~5%

Гордиев М.Г., молекулярно-диагностическая лаборатория ГАУЗ РКОД МЗ РТ, 2015г. из личного архива

## Пример положительного по мутации L858R образца №2 (плазма) - Пациент А



- Количество ~500 копий/реакцию
- Содержание мутантной ДНК ~5%, (Taqman-LNA)

Гордиев М.Г., молекулярно-диагностическая лаборатория ГАУЗ РКОД МЗ РТ, 2015г. из личного архива

## Новые методики NGS



### Онкопанели

- Изучение нарушений в сигнальных путях
- Обнаружение мутаций в плазме крови



### Целевое секвенирование

- Наследственные болезни
- Пренатальная диагностика



### Полногеномное секвенирование

- Редкие болезни

Гордиев М.Г., молекулярно-диагностическая лаборатория ГАУЗ РКОД МЗ РТ, 2015г.мнение автора

## Секвенирование следующего поколения в онкологии

- Одновременный анализ большого количества мишеней
- Возможность использования плазмы в качестве источника материала при отсутствии операционного или биопсийного материала
- Высокая себестоимость (от 20 тыс. руб.)
- Высокая стоимость для пациента.
- На данный момент возможности по анализу 100-200 мишеней не востребованы в российской практике (нет препаратов)
- Длительные сроки анализа, сложности с выполнением периодических анализов (например, раз в месяц - очень дорого)

Гордиев М.Г., молекулярно-диагностическая лаборатория ГАУЗ РКОД МЗ РТ, 2015г.мнение автора

## Итог - диагностические подходы

### Секвенирование нового поколения

- Наиболее перспективный метод

### Цифровая ПЦР+ ПЦР с модификациями

- Пригодна для выявления амплификации генов и работы с плазмой

### Классический ПЦР-анализ

- Из-за простоты и дешевизны еще долгое время будет оставаться основным методом анализа в РФ

Гордиев М.Г., молекулярно-диагностическая лаборатория ГАУЗ РКОД МЗ РТ, 2015г.мнение автора

Спасибо за внимание!