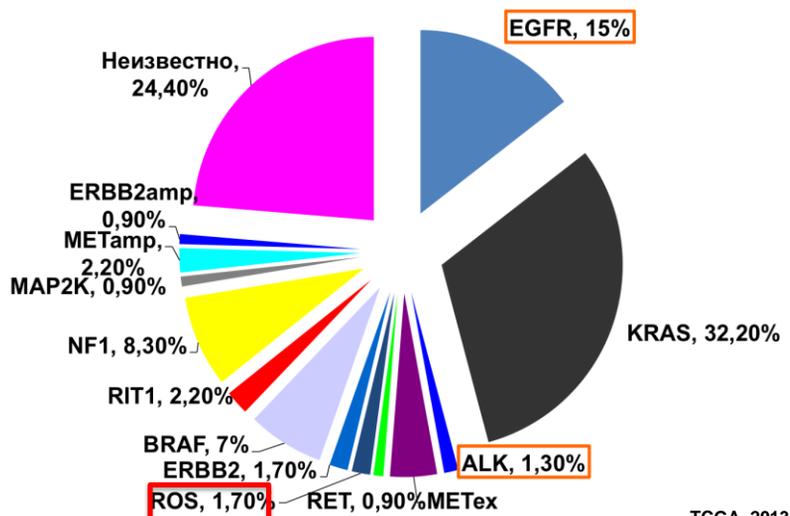


Практические аспекты тестирования ALK и ROS1 при НМРЛ

Демидова И.А., лаборатория
молекулярной диагностики МГОБ 62

Потенциальные цели для таргетной терапии при аденокарциноме

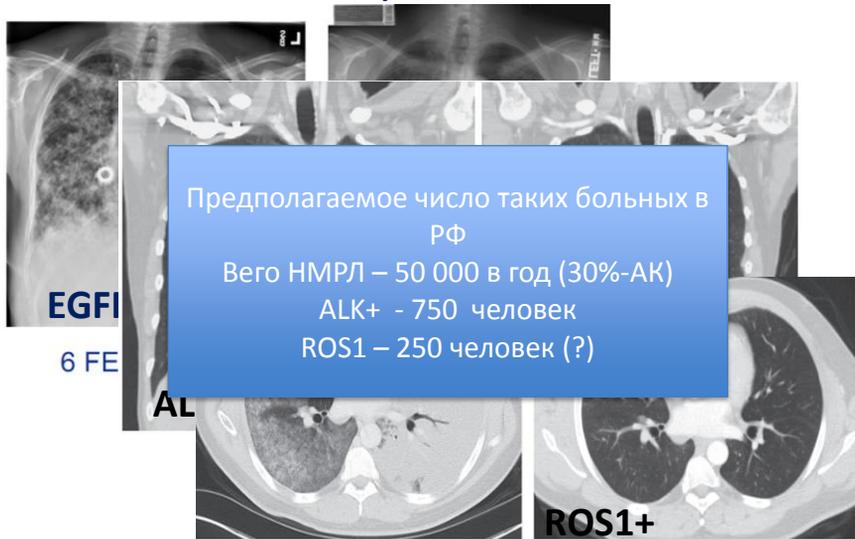


Генетическое тестирование пациентов с аденокарциномой легкого (лаборатория МГОБ 62)



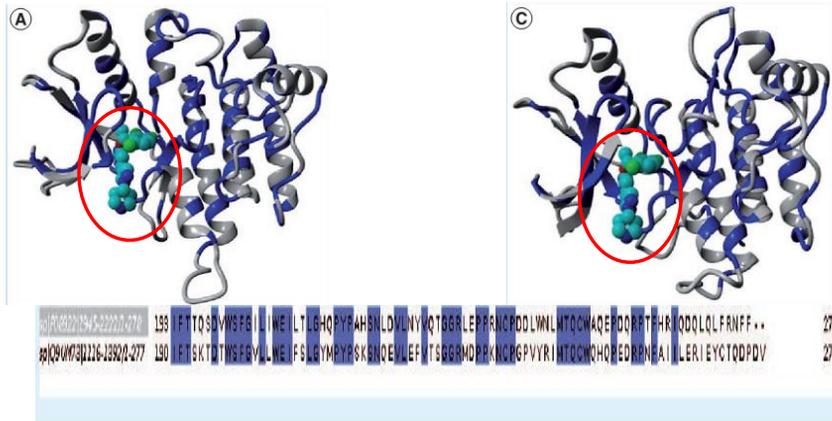
Собственные данные лаборатории МГОБ 62

Почему нам интересны редкие нарушения? Идентичность клинического эффекта таргетной терапии



Miller V, 2011; Kwak et al, NEJM 2010; Bergeton K, JCO 2012

Гомология между протеинами ALK и ROS1



Гомология между протеинами = 48,92%, в связывании кризотиниба участвуют 22 аминокислоты ALK и 18 аминокислот ROS1

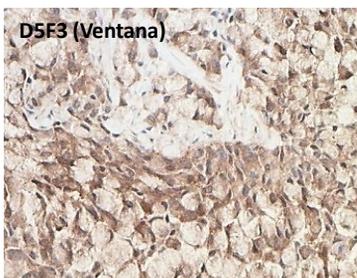
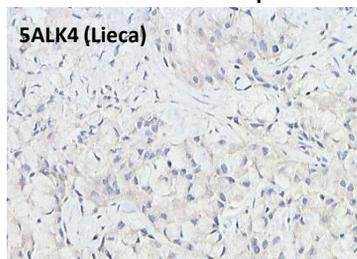
Ou et al, Expert Rev. Anticancer Ther. 2012

Перестройки гена *ALK* при злокачественных опухолях

Нозология	Гены-партнеры	Частота встречаемости
Анапластическая Т-клеточная лимфома	9 партнеров, самый частый - <i>NPM</i>	Около 30% у взрослых, от 50 до 90% у детей
Воспалительная миофибробластическая опухоль	7 партнеров, самый частый - <i>TPM3</i>	36- 50% случаев
НМРЛ	Более 10 партнеров, самый частый - <i>EML4</i>	2-5% случаев
ДБККЛ	<i>NPM, CLTC1, SQSTM1, SEC31A</i>	Не установлена
РМЖ	<i>EML4</i>	<5% (?)
Колоректальный рак	<i>EML4, C2orf44</i>	<5%
Плоскоклеточный рак пищевода	<i>TPM4</i>	Не установлена (<1%)
Рак почки	<i>VCL, EML4, TPM3</i>	Не установлена (<1%)

Palmer RH, Vernersson E. et al. B. Biochem J. 2009; Roskoski R, Pharm Research 2013

Современный подход -использование ИГХ как скринингового метода для выявления химерных протеинов ALK при НМРЛ



- Используются коммерчески доступные антитела (5A4 Leica, ALK Ventana), причем реагентика компании Ventana обладает более высокой чувствительностью и специфичностью, что позволило FDA зарегистрировать в 2015 году этот тест как диагностический
- Однако, в связи с высокочастотой артефактов при нарушениях преаналитики рекомендовано подтверждение FISH всех сложных и позитивных случаев

Mino-Kenudson et al Clin Cancer Res 2010, собственные данные лаборатории МГОб 62



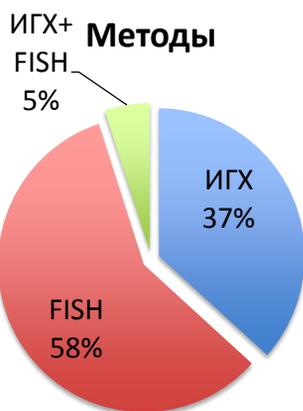
Результаты тестирования в проекте cancergenome.ru (01.2014-12.2015)

Статус мутации	Кол-во анализов ALK	
	абс.	%
Всего	4002	100,00%
Да - мутация выявлена	260	6,5%
Нет - мутация отсутствует	3299	82,4%
Не определен	443	11,1%

Данные Российского общества клинической онкологии RUSSCO; www.rosoncweb.ru www.cancergenome.ru



Использование методов ИГХ и FISH



- Только метод FISH использовался до сентября 2014 (2334 случая)
- Методы ИГХ и FISH – с сентября 2014 по декабрь 2015 (1668 случаев)
- Отдельно методом FISH исследовались окрашенные цитологические препараты – 164 случая

Данные Российского общества клинической онкологии RUSSCO; www.rosoncweb.ru www.cancergenome.ru



Результаты 1 этапа – тестирование методом FISH



- Исследовано 2334 случая
- Самая серьезная проблема – 15% случаев, где проведение анализа оказалось невозможным
- Причины – отсутствие достаточного количества опухолевых клеток - 5%, низкое качество образцов – 10%

Данные Российского общества клинической онкологии RUSSCO; www.rosoncweb.ru www.cancergenome.ru

Результаты одновременного тестирования (2 этап)

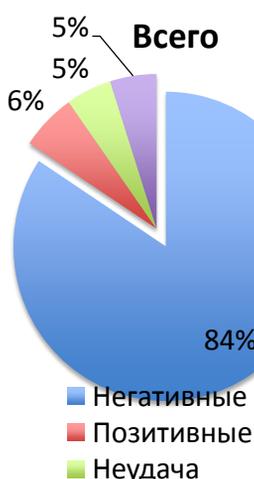
- Сходимость результатов составила 99%
- Воспроизводимость метода FISH – 81%
- Воспроизводимость метода ИГХ – 95%

	Sensitivity	Specificity	PPV	NPV
	95% CI	95% CI	95% CI	95% CI
IHC	1.00 (0.52 - 1.00)	0.99 (0.94 - 1.00)	0.89 (0.52 - 1.00)	1.00 (0.94 - 1.00)

Данные Российского общества клинической онкологии RUSSCO; www.rosoncweb.ru www.cancergenome.ru



3 этап – скрининг методом ИГХ, подтверждение позитивных и сомнительных случаев FISH (1546 случаев)



- 40 случаев, позитивных по результатам ИГХ
Из них методом FISH :
Выполнить не удалось 2 случая (7,5%)
Позитивные (из 38 выполненных) 32 случая (84,2%)
Негативные – 6 случаев (16,8%)
- Неопределенные - направлено 38 случаев
Из них методом FISH
Выполнить не удалось – 3 случая (7,9%)
Позитивные (из 35 выполненных) - 7 случаев (20%)
Негативные – 28 случаев (80%)

Данные Российского общества клинической онкологии RUSSCO; www.rosoncweb.ru www.cancergenome.ru



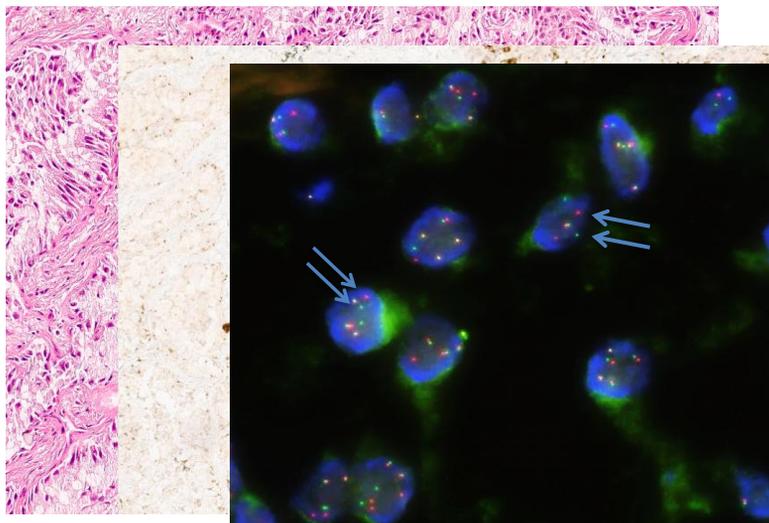
Дискордантные случаи

- Всего – 7 случаев
- Результаты ИГХ и FISH были еще раз пересмотрены
- 3 случая были расценены как сомнительные по результатам ИГХ
- 1 случай был расценен как пограничный по результатам FISH,
- 3 случая остались дискордантными

Данные Российского общества клинической онкологии RUSSCO; www.rosoncweb.ru www.cancergenome.ru



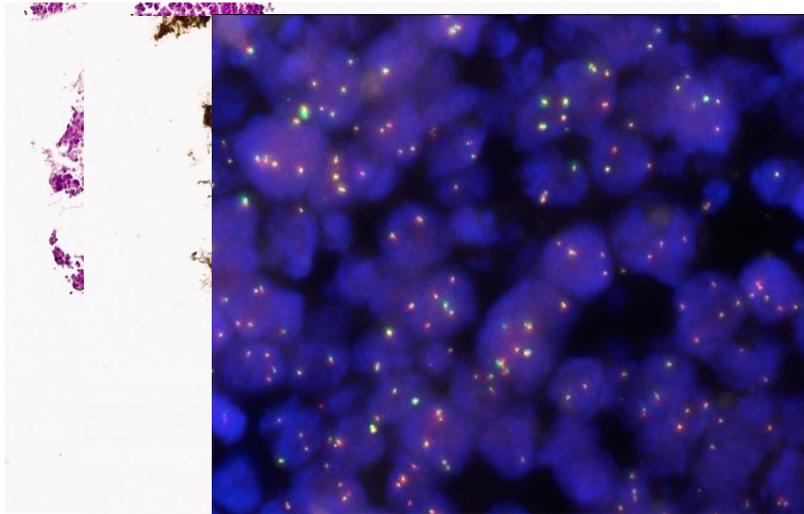
Случай 1 (больной Б.)



Данные Российского общества клинической онкологии RUSSCO; www.rosoncweb.ru www.cancergenome.ru



Случай 2 – больной К.

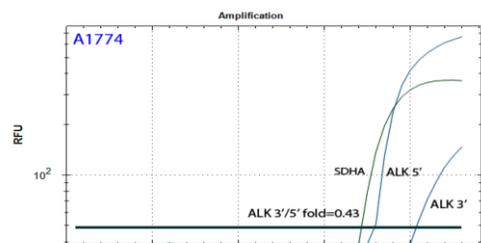
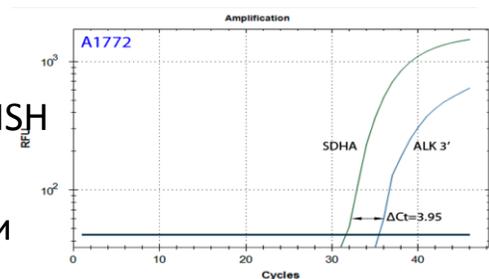


Данные Российского общества клинической онкологии RUSSCO; www.rosoncweb.ru www.cancergenome.ru



Выбор дополнительных методов исследования

- Исследовались 4 случая – 3 дискордантных + 1 пограничный по FISH
- Метод оценки на уровне РНК – сравнительная экзонная экспрессия и определение специфического транскрипта
- Все случаи были квалифицированы окончательно



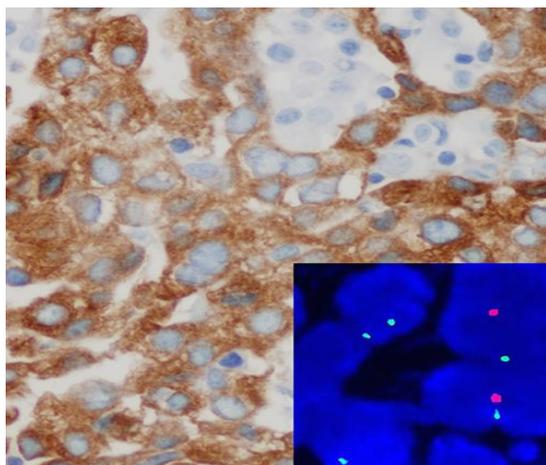
Данные Российского общества клинической онкологии RUSSCO; www.rosoncweb.ru www.cancergenome.ru

Перестройки гена *ROS1* при злокачественных опухолях

Нозология	Гены-партнеры	Частота встречаемости
Глиобластома	<i>FIG, CEP85L</i>	Около 3%
Воспалительная миофибробластическая опухоль	<i>TFG, YWHAЕ</i>	Около 10% случаев (у детей)
НМРЛ	<i>SLC34A2, CD74, EZR, TPM3, SDC4, FIG, CCDC6 etc</i>	Около 2% случаев
Холангиокарцинома	<i>FIG</i>	9-16% (?)
Серозный рак яичников	<i>FIG</i>	Не установлена
Колоректальный рак	<i>SLC34A2</i>	Не установлена
Рак желудка	<i>SLC34A2</i>	Не установлена
Ангиосаркома	<i>CEP85L</i>	Не установлена

Davis et Doebele Clin Cancer Res 2013, Dorta et al JCO 2014, Antonescu Am J Surg Pat 2015, Al-Sanea et al Curr Med Chem 2016

Метод ИГХ как первый этап детекции перестроек *ROS1*?



- Разработано антитело (D4D6), по данным последних исследований обладает высокой чувствительностью (100%), специфичность варьируется в зависимости от оценки (72,6%-93,6%), положительные и сомнительные случаи требуют дополнительного исследования методом FISH или другими методами .
- В обозримом будущем – исследование на мутации *ROS1* также будет проводиться на первом этапе гистологической диагностики

Shan et al, PLOS ONE, 2015; Boyle et al Clin Lung Cancer 2015

Какой же метод является «золотым стандартом» в настоящее время?

- FISH? – **НЕТ** (требователен к материалу, не всегда информативен, имеет существенные недостатки в современной системе оценки)
- ИГХ? – **НЕТ** (не всегда информативен, требует высокой квалификации патолога, пока не рекомендован ни одними клиническими рекомендациями)
- Методы основанные на исследовании РНК? – **НЕТ** (не апробированы в крупных проспективных исследованиях, крайне требовательны к материалу)
- Секвенирование нового поколения – **ПОКА НЕТ** (не апробировано в крупных проспективных исследованиях, и, хоть уже перешло из разряда фантастики в реальность, цена исследования остается в области фантастики)

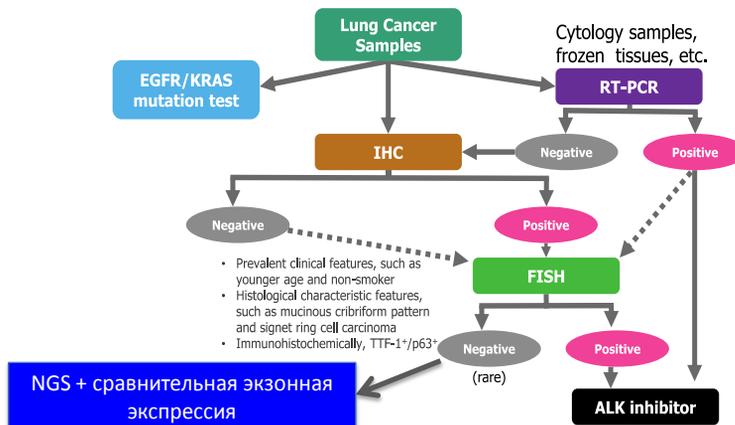
EDITORIAL

ALK FISH and IHC +ROS1 ?

You Cannot Have One without the Other

Yasushi Yatabe, MD, PhD

Journal of Thoracic Oncology® • Volume 10, Number 4, April 2015



Спасибо за внимание!