

V Ежегодный Конгресс Российского общества онкопатологов  
24 апреля 2021

**Особенности подготовки биопсийного и  
операционного материала при  
немелкоклеточном раке легкого ранних  
стадий - что изменилось в 2021 году**

Владимир Андреевич Кушнарёв

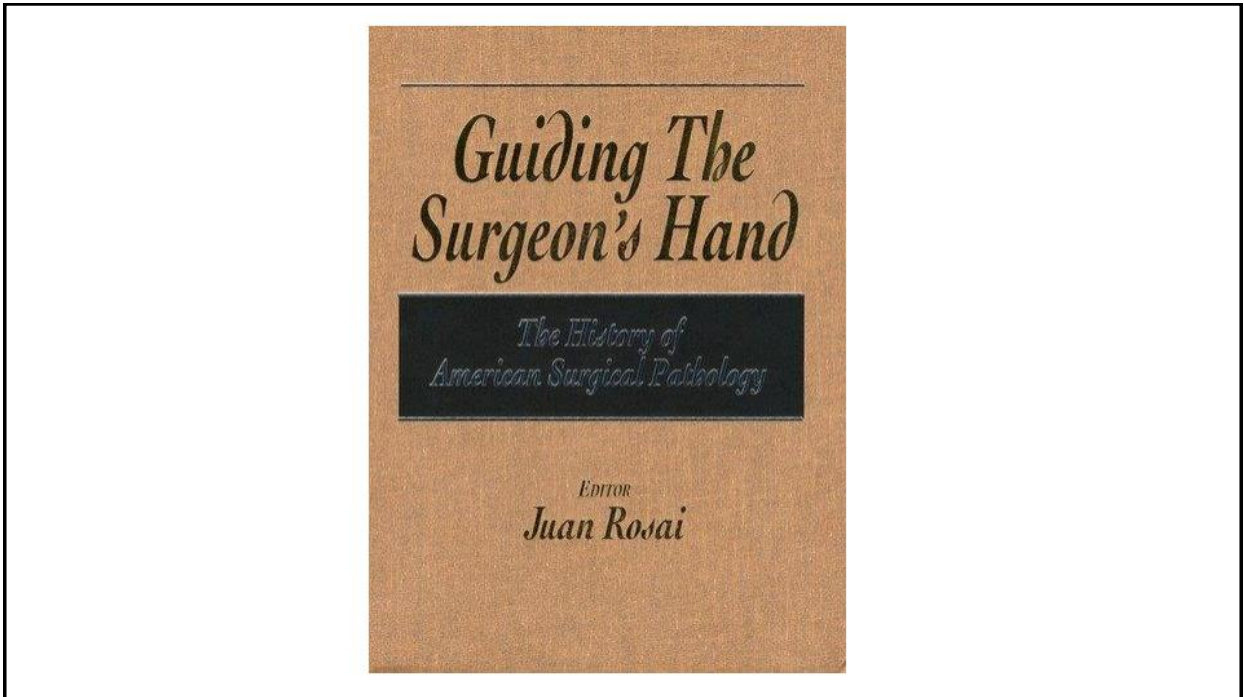
врач-патологоанатом  
ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России  
Санкт - Петербург

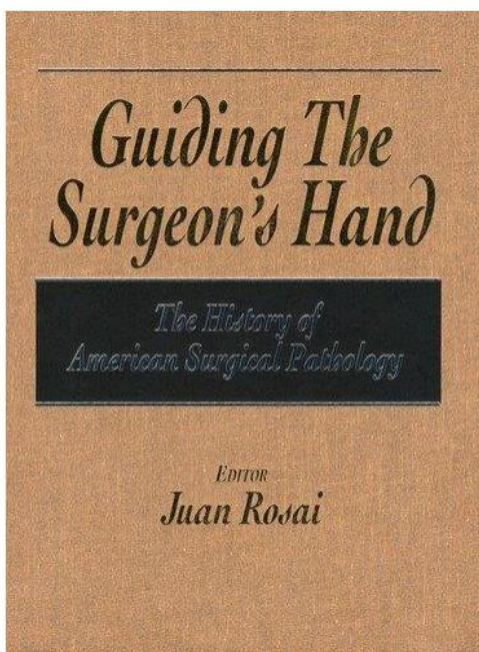
Лекция при поддержке компании «АстраЗенека»  
Представлена только информация в рамках зарегистрированных в РФ показаний  
Мнение лектора не всегда может совпадать с точкой зрения компании «АстраЗенека»

## Роль патолога

Кроме диагноза:

- предоставить клинически значимую информацию морфологических изменений
- интегрировать данные морфологических и молекулярно-генетических изменений
- сократить время до выбора тактики и начала лечения





## Хранители ткани

КР  
МЗ

### Клинические рекомендации «Злокачественное новообразование бронхов и легкого», ID:30, год утверждения: 2021

При выявлении неплоскоклеточного (в том числе диморфного) рака рекомендуется проведение молекулярно-генетического исследования мутаций в гене **EGFR** (18-21-й экзоны), **BRAF** V600E в биопсийном (операционном) материале (в том числе цитологическое); молекулярно-генетического исследования транслокации генов **ALK** и **ROS1**.

При отрицательных или неизвестных данных о наличии мутаций гена EGFR или транслокаций гена ALK следует проводить тестирование для определения экспрессии белка **PDL1** иммуногистохимическим методом (показано для неплоскоклеточного и плоскоклеточного немелкоклеточного рака (НМКР) и только на гистологическом материале). Исследования требуются для прогноза и определения тактики лечения болезни.

КР  
МЗ

## Клинические рекомендации «Злокачественное новообразование бронхов и легкого», ID:30, год утверждения: 2021

Комментарии: выделено несколько биомаркеров, которые помогают обозначают подгруппу пациентов со значимым ответом на таргетную/иммунотерапию. Данные биомаркеры включают: ALK, ROS1 транслокацию генов, EGFR (18–21-й экзоны), BRAF V600E активирующие мутации и PD-L1 экспрессию. Молекулярно-генетическое тестирование **может быть оправдано и в случае плоскоклеточного рака или при затруднении** (при малом количестве материала) в определении гистологического подтипа у некурящих молодых пациентов.

Клинические рекомендации «Злокачественное новообразование бронхов и легкого», ID:30, год утверждения: 2021. [Электронный ресурс] доступ 10.03.2021. URL: [http://cr.rosminzdrav.ru/recommend/30\\_3](http://cr.rosminzdrav.ru/recommend/30_3)

КР  
МЗ

## Клинические рекомендации «Злокачественное новообразование бронхов и легкого», ID:30, год утверждения: 2021

Молекулярно-генетическое исследование неплоскоклеточного (в том числе, диморфного) рака может быть рекомендовано в целях определения **амплификаций** гена **MET**, мутаций **пропуска 14-го экзона гена MET**, мутаций гена **ERBB2**, перестройки **RET**, а также анализа **мутационной нагрузки** для назначения экспериментальной терапии в рамках клинических исследований.

Клинические рекомендации «Злокачественное новообразование бронхов и легкого», ID:30, год утверждения: 2021. [Электронный ресурс] доступ 10.03.2021. URL: [http://cr.rosminzdrav.ru/recommend/30\\_3](http://cr.rosminzdrav.ru/recommend/30_3)

## Материал для исследований: источники

- Клетки из мокроты
- Смывы из бронхиального дерева
- Биопсия бронха
- Биопсия плевры
- Медиастиноскопия
- Эксцизия лимфоузла
- Трансторакальная эксцизия
- Операционный материал

Совершенствование и прогресс  
техники визуализации и забора  
материала

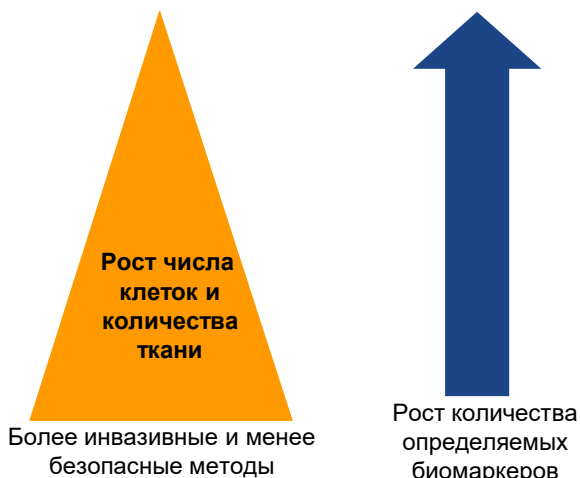


Кушнарев В.А, НМИЦ онкологии им.Н.Н Петрова, 2021

## Материал для исследований: источники

- Клетки из мокроты
- Смывы из бронхиального дерева
- Биопсия бронха
- Биопсия плевры
- Медиастиноскопия
- Эксцизия лимфоузла
- Трансторакальная эксцизия
- Операционный материал

Совершенствование и прогресс  
техники визуализации и забора  
материала



Кушнарев В.А, НМИЦ онкологии им.Н.Н Петрова, 2021

# Значение стадии для лечения

Стадия IA    Стадия IB    Стадия IIA    Стадия IIB    Стадия IIIA

N+

Лимфоваскулярная инвазия  
G3

Хирургическое лечение

Адьювантная химиотерапия

1.Systemic therapy in resectable non-small cell lung cancer.Nasser Hanna, MD, Rogerio C Lilienbaum, MD, FACP, Sadhna R Vora, MD. <https://www.upToDate.com/contents/systemic-therapy-in-resectable-non-small-cell-lung-cancer>. Март 2021.

# Преаналитический этап

Операционная



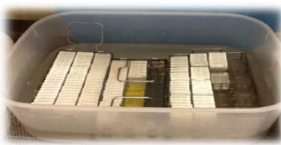
Транспорт



Макроисследование



Фиксация



Шаг 1

Шаг 2

Тепловая ишемия

Время холодной ишемии до 1 часа

10% забуференный формалин

1. Archive Pathology Lab. Med. 2019 Nov;143(11):1346-1363. doi: 10.5858/arpa.2019-0009-SA.

## Преаналитические факторы, влияющие на качество ДНК, РНК, белка и морфологии

Известные факторы, влияющие на качество исследования	Частично изученные	Неизвестные
Холодовая ишемия Декальцинация Продолжительность фиксации Длительность хранения парафинового блока	Тепловая ишемия Размер образца Вырезка Качество формалина Соотношение фиксатора и ткани Температура фиксации Реактивы для проводки ткани Качество парафина Хранение микропрепарата	Краска для макропрепарата Использование переработанного формалина Фиксация совместно с другими тканями Воздействие УФ при фиксации

1.Адаптировано с Preanalytical Factors Affecting FFPE Tissue—Bass et al. Arch Pathol Lab Med—Vol 138, November 2014

## Преаналитические факторы, влияющие на качество ДНК, РНК, белка и морфологии

Фактор	ДНК	РНК	Белок
Холодовая ишемия	Менее 24 часов для ПЦР, менее 1 часа для FISH	Менее 12 часов	Менее 4 часов
Размер образца	3-10 мм <sup>3</sup>	Нет данных	1,2-3,5 мм <sup>3</sup>
Фиксатор	10% формалин	10% формалин	10% формалин
Время фиксации	Менее 72 часов	8-48 часов	6-24 часа
Среда	Парафин		
Хранение парафинового блока	5-10 лет	Менее 1 года	Менее 25 лет
Декальцинация	ЭДТА		

1.Адаптировано с Preanalytical Factors Affecting FFPE Tissue—Bass et al. Arch Pathol Lab Med—Vol 138, November 2014

# Аналитический этап



Шаг 3

Подготовка блока и микропрепарата



Шаг 4

Диагноз  
Диагностическое ИГХ исследование



Персонализированная системная терапия при метастатическом процессе

Кушнарев В.А, НМИЦ онкологии им.Н.Н Петрова, 2021, личный архив

# Аналитический этап



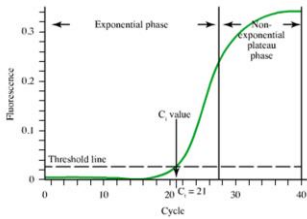
Шаг 3

Подготовка блока и микропрепарата



Шаг 4

Диагноз  
ИГХ исследование



Шаг 5

EGFR, ALK, ROS1, MET, KRAS...



Шаг 6

Лечение

Персонализированная системная терапия при рецидиве, метастатическом процессе

Кушнарев В.А, НМИЦ онкологии им.Н.Н Петрова, 2021, личный архив



## Тестирование EGFR в операционном материале НМРЛ IB, II и IIIA стадий

Clinical Trial > [Lancet Respir Med](#). 2018 Nov;6(11):863-873.  
doi: 10.1016/S2213-2600(18)30277-7. Epub 2018 Aug 24.

**Erlotinib versus vinorelbine plus cisplatin as adjuvant therapy in Chinese patients with stage IIIA EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (EVAN): a randomised, open-label, phase 2 trial**

[J Clin Oncol](#). 2019 Jan 10; 37(2): 97–104.

Published online 2018 Nov 16. doi: [10.1200/JCO.18.00131](#)

PMCID: PMC6524649

NIHMSID: [NIHMS1013894](#)

PMID: [30444685](#)

**SELECT: A Phase II Trial of Adjuvant Erlotinib in Patients With Resected Epidermal Growth Factor Receptor-Mutant Non-Small-Cell Lung Cancer**

Clinical Trial > [N Engl J Med](#). 2020 Oct 29;383(18):1711-1723. doi: 10.1056/NEJMoa2027071.  
Epub 2020 Sep 19.

**Osimertinib in Resected EGFR-Mutated Non-Small-Cell Lung Cancer**

[Journal of Clinical Oncology](#) > [List of Issues](#) > [Volume 39, Issue 7](#) >

ORIGINAL REPORTS | Thoracic Oncology

**Gefitinib Versus Vinorelbine Plus Cisplatin as Adjuvant Treatment for Stage II-IIIa (N1-N2) EGFR-Mutant NSCLC: Final Overall Survival Analysis of CTONG1104 Phase III Trial**

[Journal of Clinical Oncology](#) > [List of Issues](#) > [Volume 38, Issue 15, suppl](#) >

LUNG CANCER—NON-SMALL CELL LOCAL-REGIONAL/SMALL CELL/OTHER THORACIC CANCERS

**ALCHEMIST: Adjuvant targeted therapy or immunotherapy for high-risk resected NSCLC.**

## Исследование операционного материала IB, II и IIIA стадий

В двойном слепом исследовании III фазы ADAURA по сравнению с плацебо улучшили двухлетние показатели ВБП по сравнению с плацебо (89 против 52 процентов; HR = 0,20, 99% ДИ 0,14-0,30)\*

Стадия IA    Стадия IB    Стадия IIA    Стадия IIB

Лимфоваскулярная инвазия  
G3

N+

Хирургическое лечение

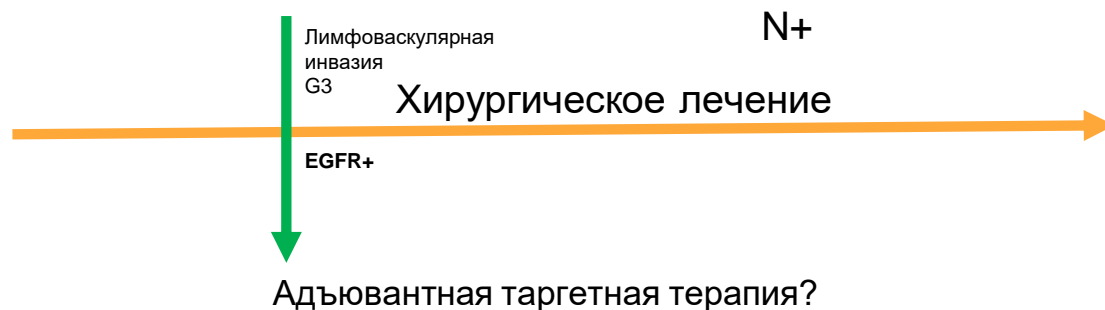
Адьювантная химиотерапия

1.Wu YL, Tsuboi M, He J, et al. Osimertinib in Resected EGFR-Mutated Non-Small-Cell Lung Cancer. [N Engl J Med](#) 2020; 383:1711.

## Исследование операционного материала IB, II и IIIA стадий

В двойном слепом исследовании III фазы ADAURA по сравнению с плацебо улучшили двухлетние показатели ВБП по сравнению с плацебо (89 против 52 процентов; HR = 0,20, 99% ДИ 0,14-0,30)\*

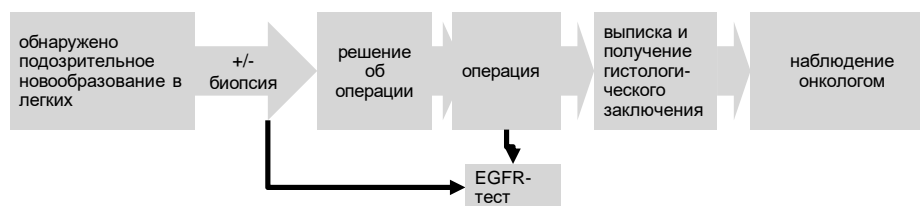
Стадия IA    Стадия IB    Стадия IIA    Стадия IIB



1.Wu YL, Tsuboi M, He J, et al. Osimertinib in Resected EGFR-Mutated Non-Small-Cell Lung Cancer. N Engl J Med 2020; 383:1711.

## Путь пациента с резектабельным НМРЛ с EGFR-мутацией

До применения ИТК EGFR в адьювантном режиме:



1.Wu YL, Tsuboi M, He J, John T, Grohe C, Majem M, Goldman JW, Laktionov K, Kim SW, Kato T, Vu HV, Lu S, Lee KY, Akewanlop C, Yu CJ, de Marinis F, Bonanno L, Domine M, Shepherd FA, Zeng L, Hodge R, Atasoy A, Rukazenzov Y, Herbst RS; ADAURA Investigators. Osimertinib in Resected EGFR-Mutated Non-Small-Cell Lung Cancer. N Engl J Med. 2020 Oct 29;383(18):1711-1723. doi: 10.1056/NEJMoa2027071. Epub 2020 Sep 19. PMID: 32955177.

## Путь пациента с резектабельным НМРЛ с EGFR-мутацией

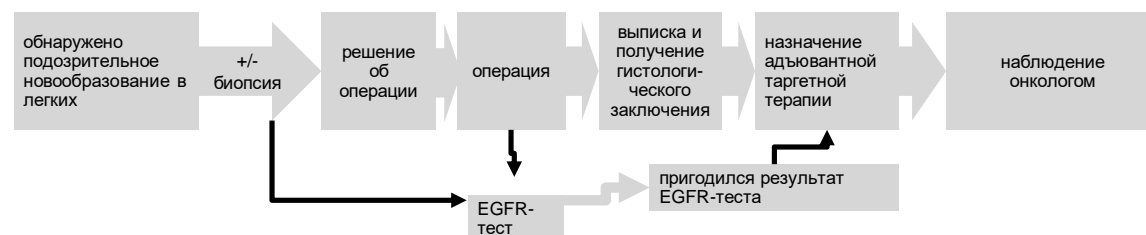
До применения ИТК EGFR в адьювантном режиме:



1.Wu YL, Tsuboi M, He J, John T, Grohe C, Majem M, Goldman JW, Laktionov K, Kim SW, Kato T, Vu HV, Lu S, Lee KY, Akewanlop C, Yu CJ, de Marinis F, Bonanno L, Domine M, Shepherd FA, Zeng L, Hodge R, Atasoy A, Rukazenzov Y, Herbst RS; ADAURA Investigators. Osimertinib in Resected EGFR-Mutated Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med.* 2020 Oct 29;383(18):1711-1723. doi: 10.1056/NEJMoa2027071. Epub 2020 Sep 19. PMID: 32955177.

## Путь пациента с резектабельным НМРЛ с EGFR-мутацией

С применением ИТК EGFR в адьювантном режиме:



Гистологическое заключение и результат EGFR-теста нужны быстрее, чем прежде

1.Wu YL, Tsuboi M, He J, John T, Grohe C, Majem M, Goldman JW, Laktionov K, Kim SW, Kato T, Vu HV, Lu S, Lee KY, Akewanlop C, Yu CJ, de Marinis F, Bonanno L, Domine M, Shepherd FA, Zeng L, Hodge R, Atasoy A, Rukazenzov Y, Herbst RS; ADAURA Investigators. Osimertinib in Resected EGFR-Mutated Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med.* 2020 Oct 29;383(18):1711-1723. doi: 10.1056/NEJMoa2027071. Epub 2020 Sep 19. PMID: 32955177.

Применение ИТК EGFR при резектабельном НМРЛ меняет целеполагание EGFR-тестирования в ранних стадиях → повышаются требования к срокам готовности гистологического заключения по операционному материалу НМРЛ

### БЫЛО:

EGFR-тестирование выполняется пациентам с резектабельным неплоскоклеточным НМРЛ, т.к. **высок риск рецидива** после успешной резекции (45% в течение 5 лет)



### СТАЛО:

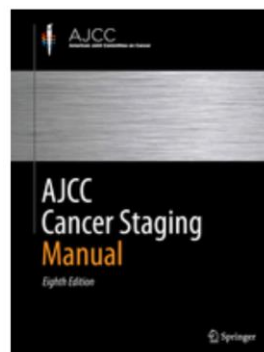
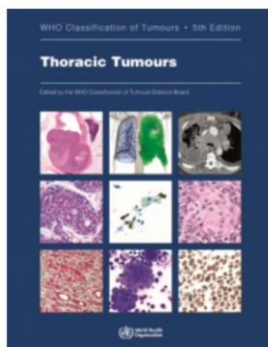
EGFR-тестирование выполняется пациентам с резектабельным неплоскоклеточным НМРЛ, т.к. **пациентам с EGFR-мутацией показана таргетная адъювантная терапия**

1.Wu YL, Tsuboi M, He J, John T, Grohe C, Majem M, Goldman JW, Laktionov K, Kim SW, Kato T, Vu HV, Lu S, Lee KY, Akewanlop C, Yu C.J, de Marinis F, Bonanno L, Domine M, Shepherd FA, Zeng L, Hodge R, Atasoy A, Rukazenkov Y, Herbst RS; ADAURA Investigators. Osimertinib in Resected *EGFR*-Mutated Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*. 2020 Oct 29;383(18):1711-1723. doi: 10.1056/NEJMoa2027071. Epub 2020 Sep 19. PMID: 32955177.  
2.Клинические рекомендации «Злокачественное новообразование бронхов и легкого», ID:30, год утверждения: 2021. [Электронный ресурс] доступ 10.03.2021. URL: [http://cr.rosminzdrav.ru/recommend/30\\_3](http://cr.rosminzdrav.ru/recommend/30_3)

## Исследование операционного материала опухолей легкого

Микроскопическое исследование:

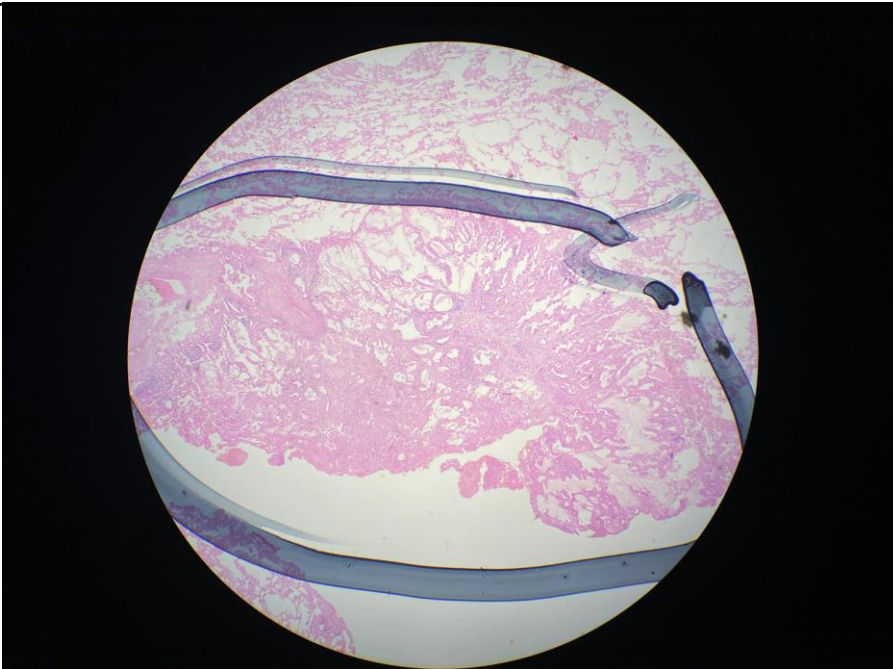
1. Локализация
2. Гистологический тип
3. Паттерн роста, %
4. Инвазия в плевру
5. Края резекции
6. Инвазия в прилежащие структуры
7. Статус лимфоузлов согласно группам
8. Фоновые патологические процессы
9. Стадирование



# Подготовка к макродиссекции



Кушнарев В.А., личный архив

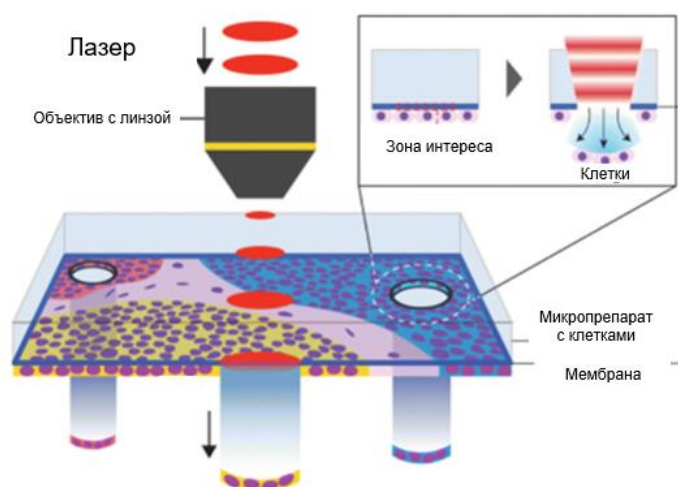


Кушнарев В.А., личный архив



Кушнарев В.А, личный архив

## Лазерная микродиссекция

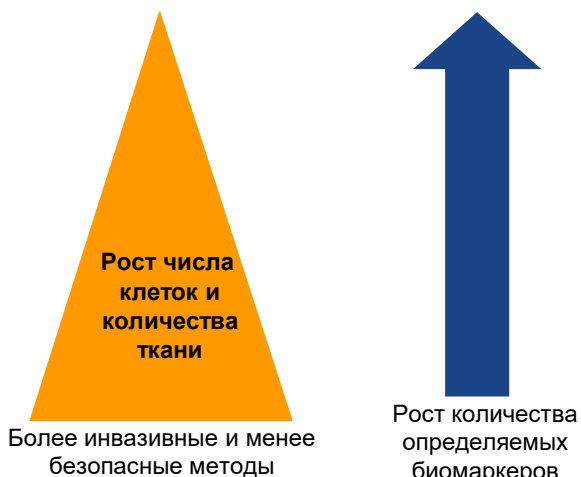


1. Изображение адаптировано из Kim, S., Lee, A.C., Lee, H.B. *et al.* PHLI-seq: constructing and visualizing cancer genomic maps in 3D by phenotype-based high-throughput laser-aided isolation and sequencing. *Genome Biol* 19, 158 (2018). <https://doi.org/10.1186/s13059-018-1543-9>

## Материал для исследований: источники

- Клетки из мокроты
- Смывы из бронхиального дерева
- Биопсия бронха
- Биопсия плевры
- Медиастиноскопия
- Эксцизия лимфоузла
- Трансторакальная эксцизия
- Операционный материал

Совершенствование и прогресс  
техники визуализации и забора  
материала

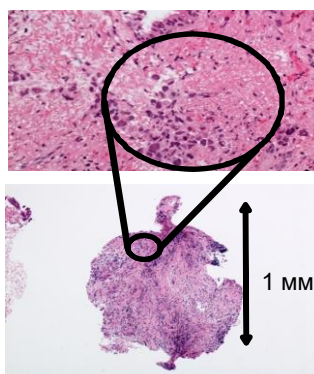


Кушнарев В.А, НМИЦ онкологии им.Н.Н Петрова, 2021

Клеточность биоптата = Общая ДНК - ?



2 фрагмента ткани  
<1 мм



Морфология

ИГХ

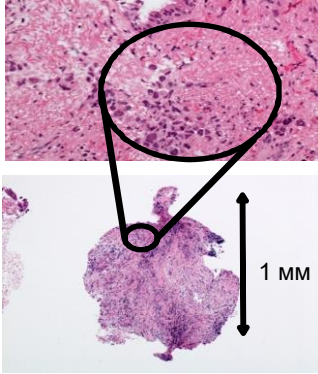
Молекулярный  
профиль

1 клетка – 7 пг ДНК

В среднем 10-25% ткани - опухоль!

Кушнарев В.А, НМИЦ онкологии им.Н.Н Петрова, 2021, личный архив

Клеточность биоптата = Аналитическая чувствительность платформы

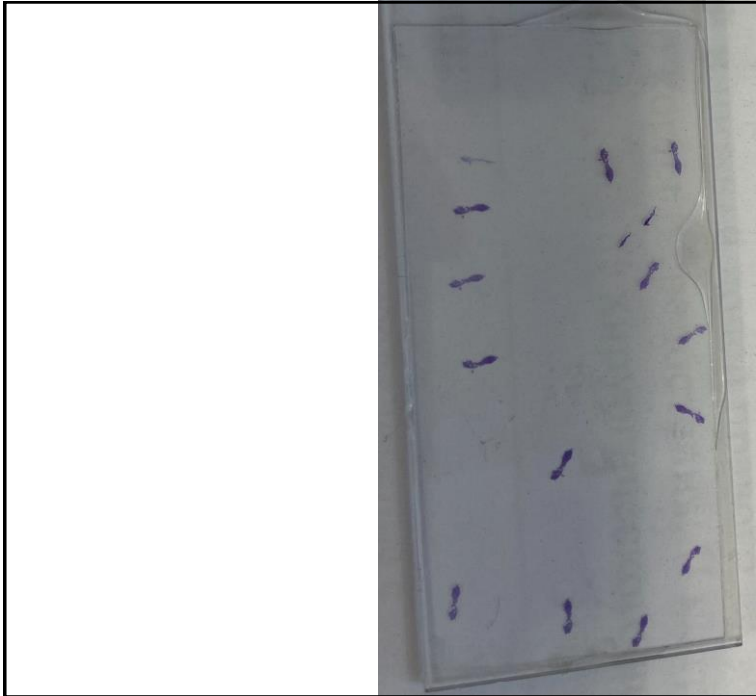


1 клетка – 7 пг ДНК  
1 нг ДНК – 143-166  
клеток  
NGS - 10 нг ДНК –  
1430-1660 клеток

2 фрагмента ткани  
<1 мм

В среднем 10-25% ткани - опухоль!

Кушнарев В.А, НМИЦ онкологии им.Н.Н Петрова, 2021, личный архив

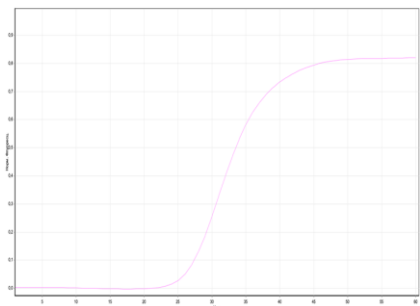


17 срезов!

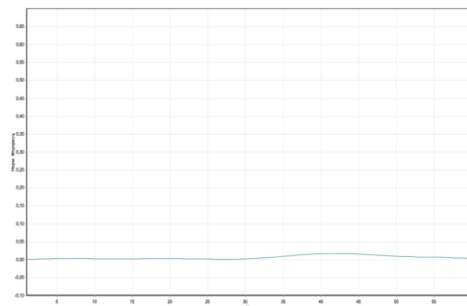
Кушнарев В.А, НМИЦ онкологии им.Н.Н Петрова, 2021, личный архив



## Достаточно ли материала?



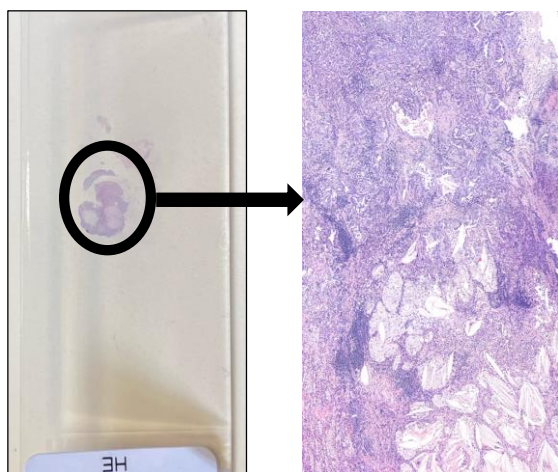
Пример положительного по мутации L858R образца №1 (ткань – 5%)



Пример отрицательного по мутации L858R образца №1 (ткань – 5%) – отсутствие опухолевых клеток?

Слайд предоставлен М.Г Гордиевым, из личного архива

## Микродиссекция для молекулярного тестирования



Клеточность?

Контаминация?

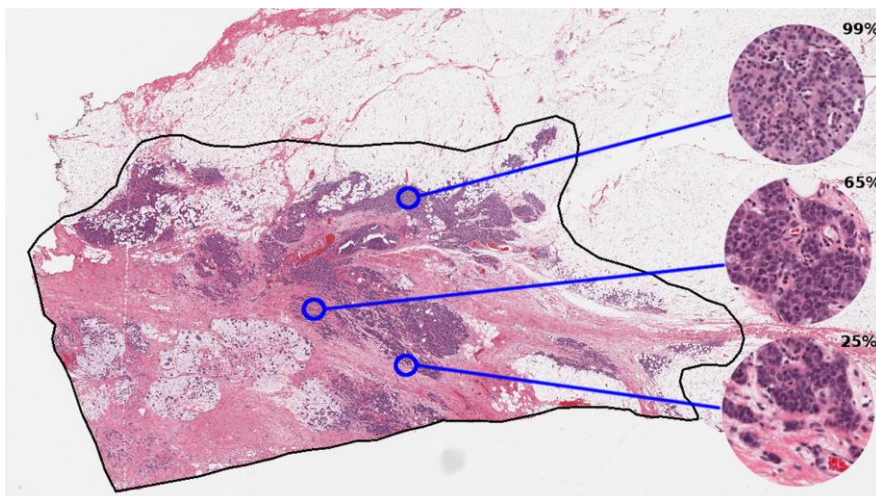
Некроз и фиброз снижают клеточность образца

В 23% случае ткань не подходит для МГИ\*

1. Sundaresan, T.K.; Sequist, L.V.; Heymach, J.V.; Riely, G.J.; Jänne, P.A.; Koch, W.H.; Sullivan, J.P.; Fox, D.B.; Maher, R.C.; Muzikansky, A.; et al. Detection of T790M, the Acquired Resistance EGFR Mutation, by Tumor Biopsy versus Noninvasive Blood-Based Analyses. Clin. Cancer Res. 2016, 22, 1103–1

\* МГИ – молекулярно-генетическое исследование

## Воспроизводимость оценки клеточности опухоли

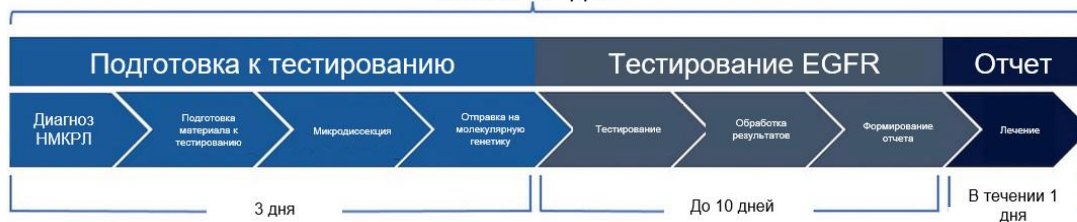


1. Akbar, S., Peikari, M., Salama, S. *et al.* Automated and Manual Quantification of Tumour Cellularity in Digital Slides for Tumour Burden Assessment. *Sci Rep* 9, 14099 (2019) <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50568-4>

## Время - ценный ресурс

- От 26 до 31 дня для тестирования EGFR\*
- Результаты тестирования на биомаркеры были доступны только у 21% пациентов на момент первой консультации\*\* с врачом-онкологом.
- Среднее время до начала лечения 16 дней у пациентов с результатом EGFR по сравнению с 29 днями для тех, у кого не было результатов на то время.
- У 19% пациентов с EGFR- или ALK-положительным статусом начали химиотерапию первой линии до получения результатов по биомаркеру

менее 21 дня



\*Cheema et al. *Current Oncology*, Vol. 27, No. 6, December 2020

\*\* Lim C et al. Biomarker testing and time to treatment decision in patients with advanced nonsmall-cell lung cancer. *Ann Oncol* 2015;26:1415-21.

# Стандарты подготовки материала к молекулярно-генетическому исследованию

## Пробоподготовка образцов перед молекулярно-генетическим тестированием

*Учебное пособие для обучающихся в системе высшего и дополнительного профессионального образования*

Санкт-Петербург  
2020

Фиксация 10% забуференный формалин

Маркировка образца с указанием в направлении блоков и стекол, отправленных на тестирование

Клеточность опухоли не менее 10%

1 парафиновый блок с тканью опухоли + 1 стекло с окраской гематоксилин-эозин

5-10 неокрашенных срезов ткани опухоли на непокрытых, незаряженных стёклах (в зависимости от объёма материала), 3-5 мкм толщиной + 1 стекло с окраской Г-Э

- 1.Иванцов А. О., Соколенко А. П., Рогачев М. В., Насыров Р. А., Имянитов Е. Н. Пробоподготовка образцов перед молекулярно-генетическим тестированием: учебное пособие для обучающихся в системе высшего и дополнительного профессионального образования. – СПб.: НМИЦ онкологии им.Н.Н.Петрова, 2020. – 64 с.
2. Gregory P. Kalemkerian at al. J Clin Oncol 36:911-919. © 2018 by American Society of Clinical Oncology