

Тестирование биомаркеров при раке легкого методом ПЦР: возможности и ограничения

Гордиев М.Г.
Национальный Биосервис
КГМА Казань

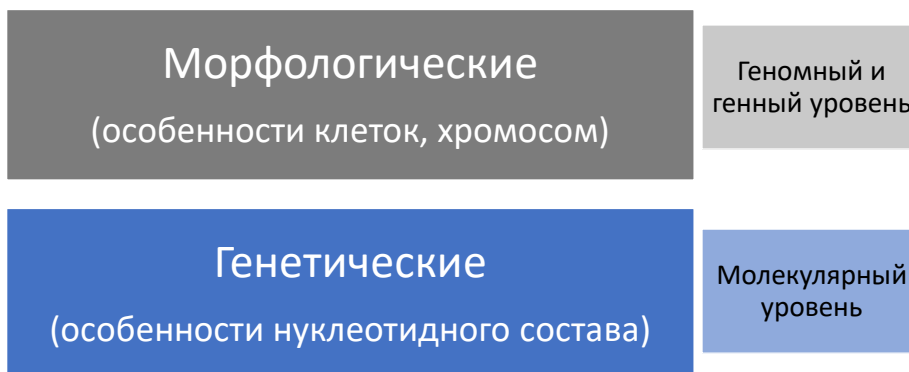
Цели молекулярно-генетического тестирования в онкологии

Диагностика наследственных синдромов
Поиск клинически значимых мутаций
(соматических)

Задачи молекулярно-генетического тестирования

- Выявление мутаций/полиморфизмов, в том числе являющихся наследственным фактором моногенных и многофакторных заболеваний
- Интерпретация результатов непосредственного исследования ДНК

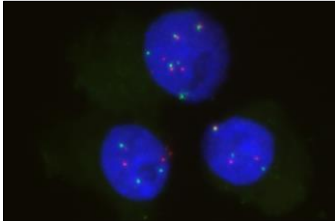
Подходы и методы



«Морфологические» методы

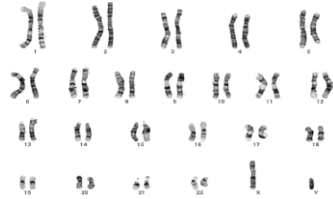
FISH

- Один из первых методов молекулярно-генетического тестирования в клинической практике;
- Применение в онкологии ALK, HER2
- Чувствительность и специфичность метода близки к 100%.



Кариотипирование

- Анализ всего кариотипа
- Выявление ряда хромосомных синдромов (анеуплоидий)
- Главное условие – возможность получения делящихся клеток
- Онкология – «филадельфийская хромосома» при)



Генетические методы

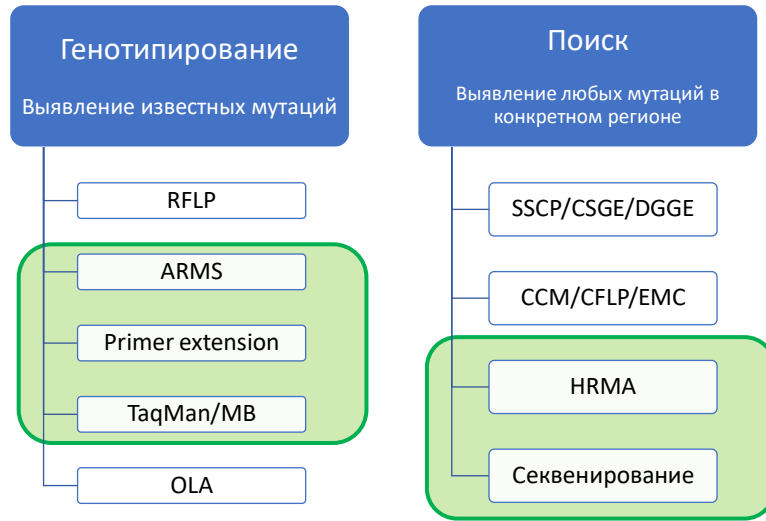
ПЦР-методы

Секвенирование
по Сэнгеру

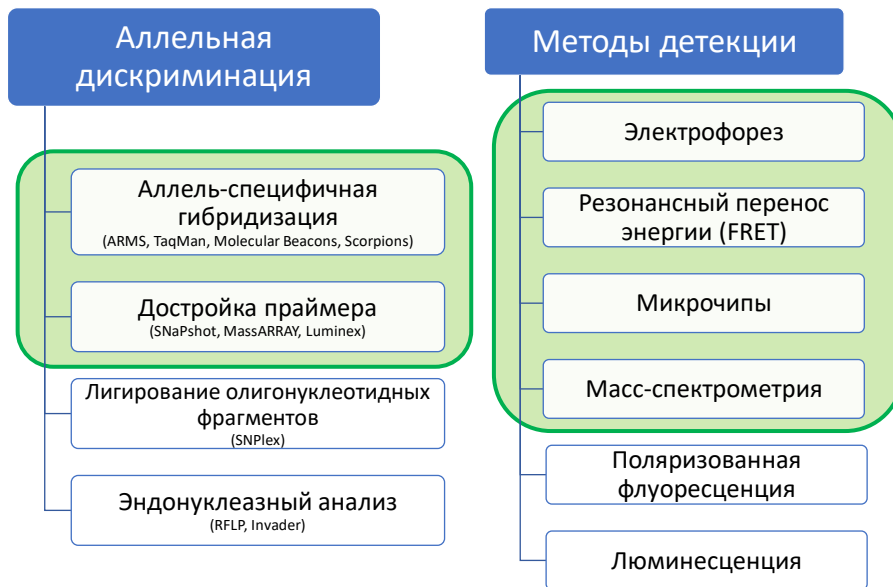
Микрочиповые
технологии

Секвенирование
нового
поколения (NGS)

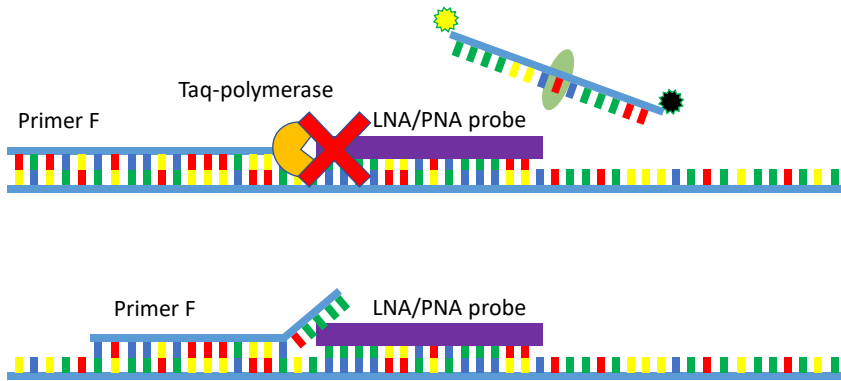
Выявление мутаций/полиморфизмов



Генотипирование мутаций

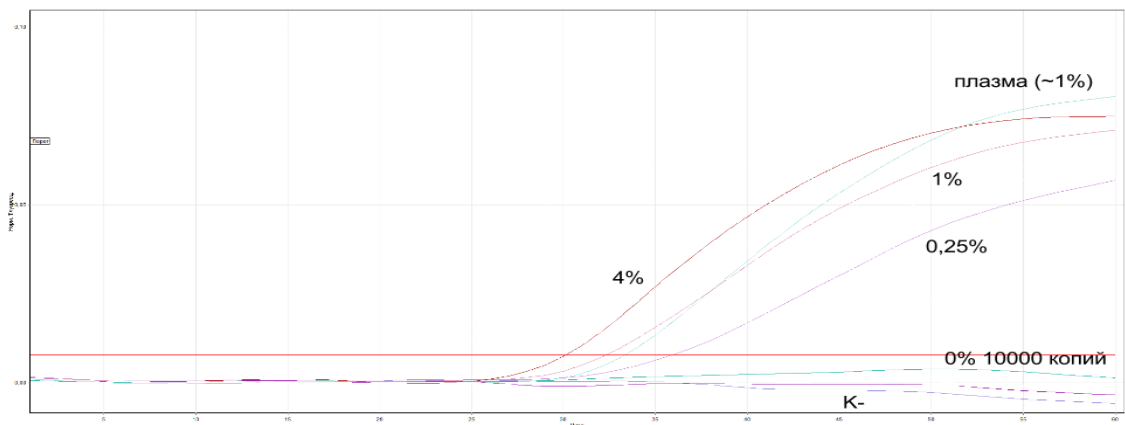


PNA/LNA-clamp PCR



- **Достоинства:**
 - Высокая эффективность
 - Высокая чувствительность и специфичность
- **Недостатки:**
 - Сложная «химия»
 - Частые ошибки в дизайне

PNA/LNA-modification



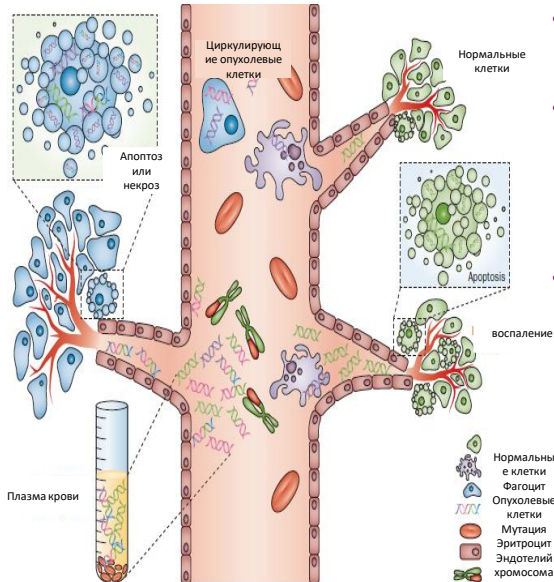
Достоинства ПЦР

- Относительная простота «химии»
- Легкость в интерпретации!
- Скорость (выделение ДНК, ПЦР, выдача результата)
- Цена оборудования.

Гистологические блоки – 2-3 недели до результата! (На примере EGFR мутаций)



Свободно циркулирующая опухолевая ДНК (сцодНК)



- сцодНК- одна из составных частей цДНК

- Попадает в кровотоки в результате некроза, апоптоза и лизиса опухолевых клеток

- У онкологических больных уровень свободно циркулирующей ДНК намного выше, чем у здоровых лиц.

В сцодНК можно проводить анализ различных генетических изменений, в т.ч. точечные мутации такие как мутация гена EGFR, RAS и т.д.

Note: "ctDNA" and "cfDNA" are assumed to be the same thing
Adapted from Crowley et al. Nat Rev Clin Oncol 2013;10:472-484

Плазма – 2-4 дня!

Химиотерапевт/
лечащий врач - онколог

Молекулярный генетик

Клинический случай №1

Больной М. 1959 г.р.

Периферический рак верхней доли левого легкого. T4N2M1.

Обследование

- **КТ ОГК июль 2015г. Са левого легкого** Мтс в кости. Мтс в 2-х сторонние шейные, средостенные, забрюшинные л/у. Мтс в легкие.
- **МРТ головного мозга июль 2015г.** 2 метастатических очага

- **Цитология:**

плевральная жидкость- *Комплексы клеток плоскоклеточного рака*

пунктат надключичного лимфоузла- *Мтс низкодифференцированного рака*

(недостаточно материала для генетического исследования!!!)

- **Генетические исследования:**

плазма - *делеция в 19 экзоне.*

Гордиев М.Г., молекулярно-диагностическая лаборатория ГАУЗ РКОД МЗ РТ, 2017г.из личного архива

- **Консилиум:** учитывая распространенность процесса, ECOG 2 и наличие EGFR мутации решено начать таргетную терапию гефитинибом. Начало приема- август 2015 г.



Контроль через 4 месяца таргетной терапии ИТК (ноябрь 2015г.)

- **МРТ головного мозга и КТ ОГК** положительная динамика



Контрольное обследование (ноябрь 2017г.)

- **МРТ головного мозга** стабилизация.
- **КТ ОГК** . прогрессирование. процесса



Прием гефитиниба 48 месяцев.

Гордиев М.Г., молекулярно-диагностическая лаборатория ГАУЗ РКОД МЗ РТ, 2017г.из личного архива

Клинический случай №2

- Пациентка С. 1951 г.р.
- *12.08.2017 ПЭТ КТ Признаки патологического процесса с низкой метаболической активностью с поражением костей, признаки сдавления спинного мозга. Миеломная болезнь?*
- Биопсия опухоли левой подвздошной кости.
- **Гистология № метастаз протоковой аденокарциномы?**
- Проведен ДЛТ на Th 7-9, паравертебральных отрезков 7-9 ребер с обеих сторон СОД 30 Гр на фоне бисфосфанатов.
- **Анализ на EGFR мутацию. Мало материала – del19ex?**
Плазма - del19ex!
- ВК учитывая распространенность процесса, соматическое состояние пациента ECOG начата терапия 02.2017 ингибиторами тирозинкиназы 1-го поколения гефитиниб.
- Прием гефитиниба по настоящее время (46 месяцев)

Резистентность к ТКИ!

Клинический случай №4

Больная С. 54 г. 10.03.2015.

Рак левого легкого, T4NxM1, мтс в л/у средостения, забрюшинные, кости .

- **Цитология:** немелкоклеточный рак?



- **Генетическое исследование:**
 - плазма - делеция в 19 экзоне.



Начата таргетная терапия гефитинибом.



- Через 2 месяца после начала таргетной терапии у больной отмечено улучшение самочувствия.
- При анализе плазмы **делеция 19 экзона не обнаружена.**

Гордиев М.Г., молекулярно-диагностическая лаборатория ГАУЗ РКОД МЗ РТ, 2017г. из личного архива

Клинический случай №2

- Больная получала 20 курсов таргетной терапии гефитинибом.



- 10.2016 при плановом анализе плазмы на EGFR мутацию выявлена **T790M,**



- Через 2 недели **проведено КТ ОГК+ОБП** отмечено прогрессирование процесса, рост очагов , появление новых.



- Перевод на х/т.

Гордиев М.Г., молекулярно-диагностическая лаборатория ГАУЗ РКОД МЗ РТ, 2017г. из личного архива

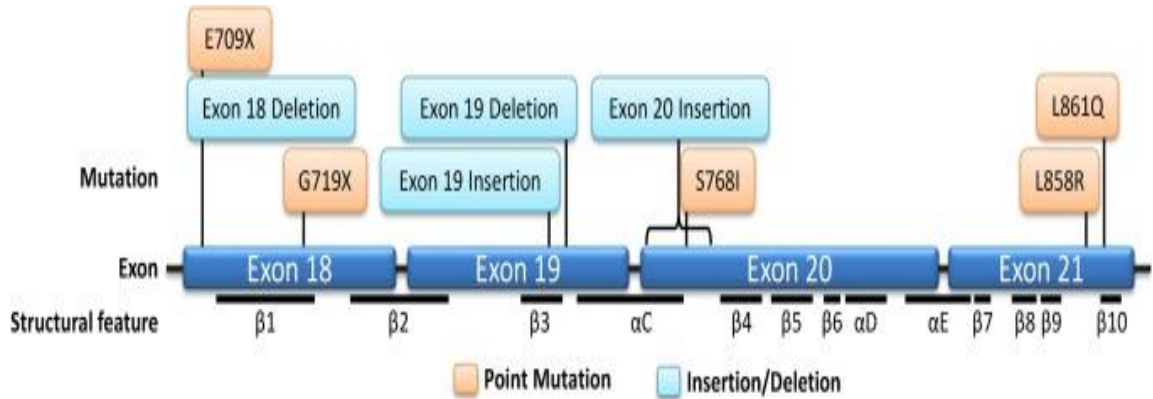
Достоинства ПЦР

- - Относительная простота «химии»
- Легкость в интерпретации
- Скорость (выделение ДНК, ПЦР, выдача результата)

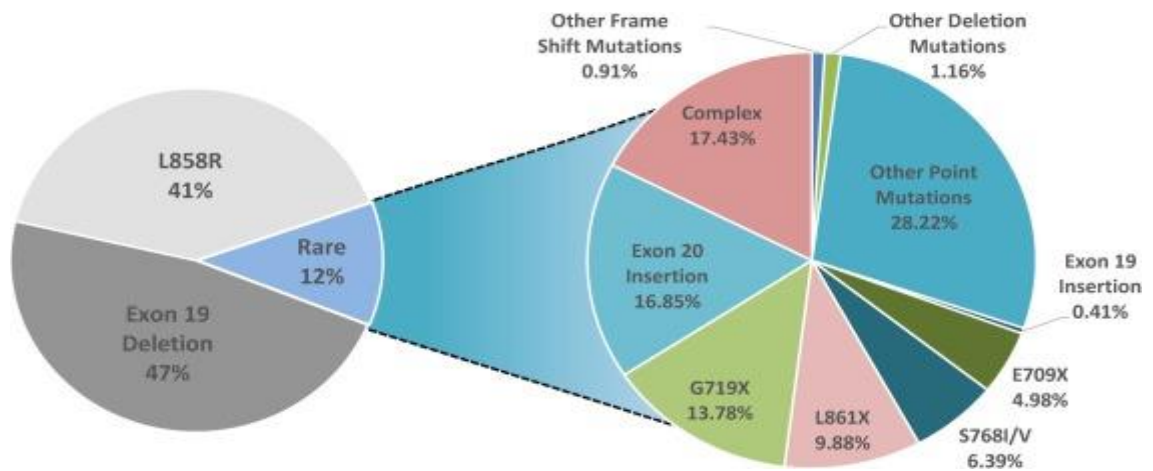


Новые тренды!

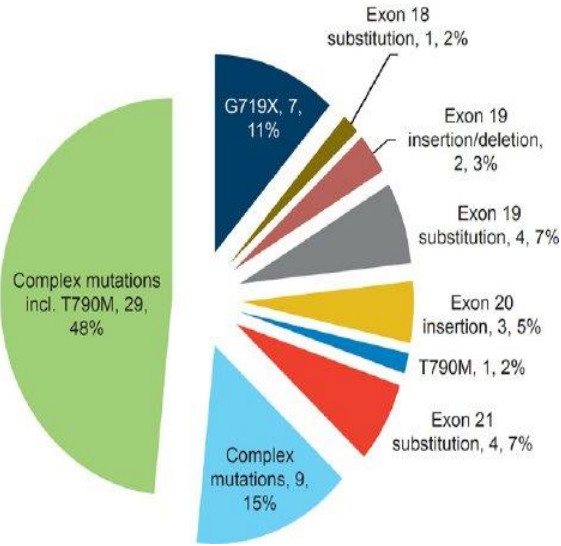
Тирозин киназный домен EGFR– основная мишень всех ингибиторов TKI



Тирозин киназный домен EGFR– основная мишень всех ингибиторов TKI



В тирозинкиназной области гена EGFR присутствуют и другие активирующие мутации - 6-10%

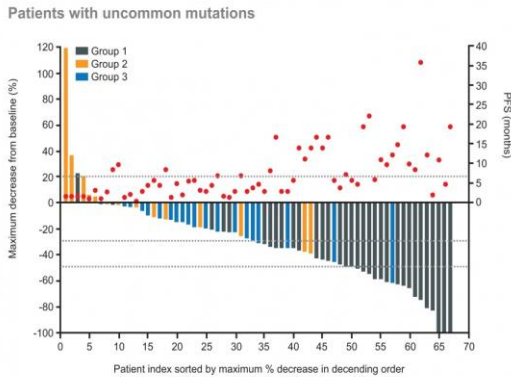


- G719A/C/D/S/X
- L861Q
- S7681
- Инсерции 20 экзона
- Комбинации мутаций

This figure was uploaded by [David Felix Heigener](#).

TKI второго и третьего поколения!

(LUX-LUNG 6)



KCSG-LU15-09: Osimertinib for Patients with NSCLC with Uncommon EGFR Mutations

	Osimertinib in patients with uncommon EGFR mutations		
	G719A/C/D/S/X	L861Q	S7681
ORR, n (%)	10/19 (52.6%)	7/9 (77.8%)	3/8 (37.5%)

- Median progression-free survival = 8.2 mo
- Median duration of response = 9.8 mo

Cho JH et al. Proc WCLC 2018: Abstract OA10.05.

На сегодня актуально определять не только del19ex и L858R

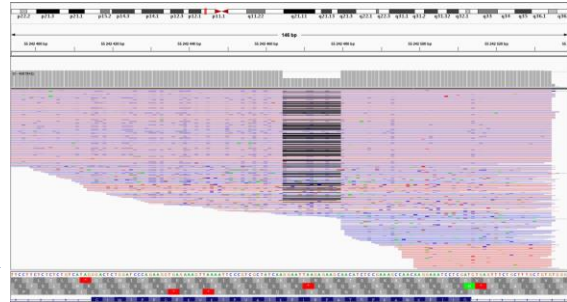
- Выявление всех активирующих мутаций в гене EGFR (18-21 экзоны) – «частых» и «редких» (подбор TKI 2-3 поколения)
- Одновременно – смотреть всю последовательность 18-21 экзона гена (экономия времени для выбора терапии I линии)
- Быстро (экономия времени для выбора терапии I линии) – плазма при «нехватки» морфологического материала?
- Определение маркеров резистентности (EGFR зависимый путь)



Результаты NGS плазмы крови пациентки при прогрессии на фоне терапии осимертинибом

Потеря T790M

Del19ex 2,68%



Пациент №3 (СПБГБУЗ "ГКОД")

- Периферическая аденоСа, T2N2M0. Del 19ex+



- Афатиниб с 31.03.17- 12.18 - T790M + (плазма ПЦР)



- Осимертиниб с 25.01.2019 – положительная динамика. - T790M - (плазма ПЦР)

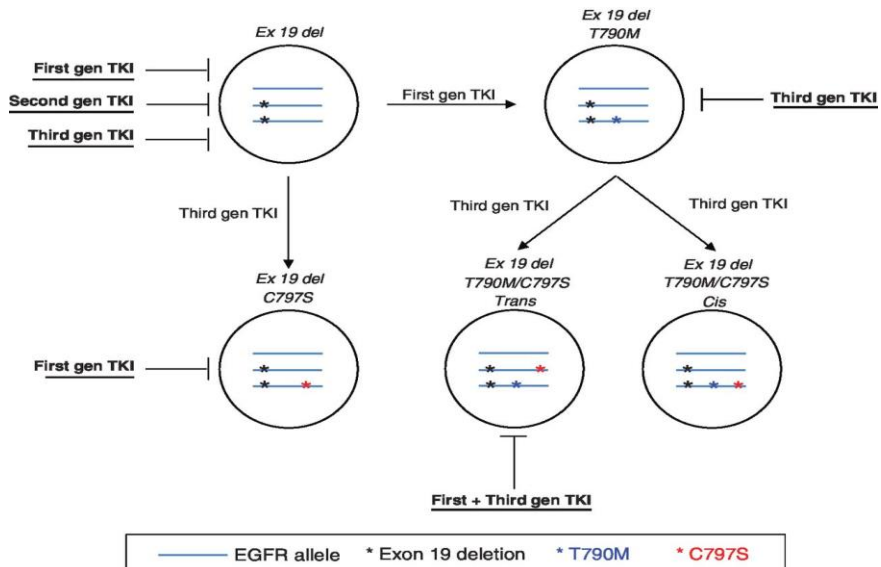
Пациент №3 (СПБГБУЗ "ГКОД")

С 11.2019 – появление очага в печени.



NGS плазмы – del19ex+, T790M+, C797S+ в cis положении

Schematic representation of EGFR resistance mutations in response to TKI treatment and sensitivity to subsequent therapies.

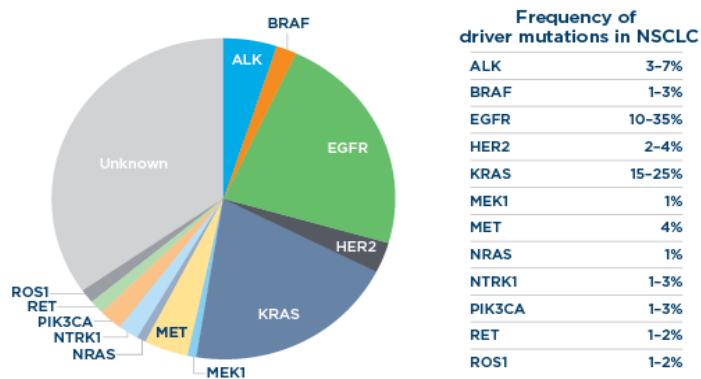


ПЦР – «да» или «нет»!

-
- **Недостатки:**
 - Малое количество определяемых маркеров!
 - Цена для этих маркеров методом ПЦР!
- **Достоинства!**
 - Скорость!
 - Доступность методики

Большое количество текущих и потенциальных маркеров – преимущества теряются

Biomarker Profile of Adenocarcinoma



© LUNGeVity Foundation

Спасибо за внимание!

