

ГЕНЕТИЧЕСКОЕ СЕКВЕНИРОВАНИЕ И ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКОЕ ОКРАШИВАНИЕ ПРИ МЕТАСТАТИЧЕСКОМ НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНОМ РАКЕ ЛЕГКОГО

Н. Пелед, доктор медицинских наук, доктор философии,
Г. Палмер, доктор медицинских наук,
Р. Хирш, доктор медицинских наук,
М. Уайнс, кандидат медицинских наук,
М. Иллуиз, кандидат медицинских наук,
М. Варей-Гарсия, доктор философии,
Л. Суссан-Гутман, кандидат медицинских наук,
Д. Отто, доктор философии,
Ф. Стивенс, доктор философии,
Д. Росс, доктор медицинских наук,
М. Кронин, кандидат медицинских наук,
Д. Липсон, кандидат наук,
В. Миллер, доктор медицинских наук
E-mail: yuta@hmc-israel.org.il

Слияние генов *EML4-ALK* обнаруживается в 2–7% случаев немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ) и, как правило, поддается идентификации в рамках флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH). Указанные опухоли чувствительны к терапии кризотинибом. При генетическом секвенировании и иммуногистохимическом окрашивании выявлена кризотиниб-чувствительная *ALK*-транслокация у пациента с метастатическим НМРЛ.

Ключевые слова: транслокация *ALK*, метастатический немелкоклеточный рак легкого, кризотиниб.

Приводим клиническое наблюдение.

У пациента М., 43 лет (некурящий и не курил в прошлом) диагностирована тампонада перикарда. В ходе перикардиоцентеза/торакоцентеза получено 2,5 л жидкости. При микроскопии установлено наличие аденокарциномы легкого. Мутаций в гене *EFGR* и слияния *EML4-ALK* не обнаружено. После выполнения плевродеза тальком пациенту была назначена цитостатическая терапия (цисплатин/неметрексед); пациент завершил 4 курса, однако болезнь прогрессировала.

Образец опухолевой ткани исследован с применением секвенирования нового поколения. В ходе исследования была идентифицирована комплексная *ALK*-транслокация. Углубленное изучение данной генетической аномалии проводилось в несколько этапов. В ходе идентификации в рамках флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) получен отрицательный результат (рис. 1).

Секвенирование нового поколения выявило комплексные альтерации в гене *ALK*, в частности разрывы в 5 различных локусах гена. Один из разрывов локализовался в интроне 19 – типичном месте разрыва при

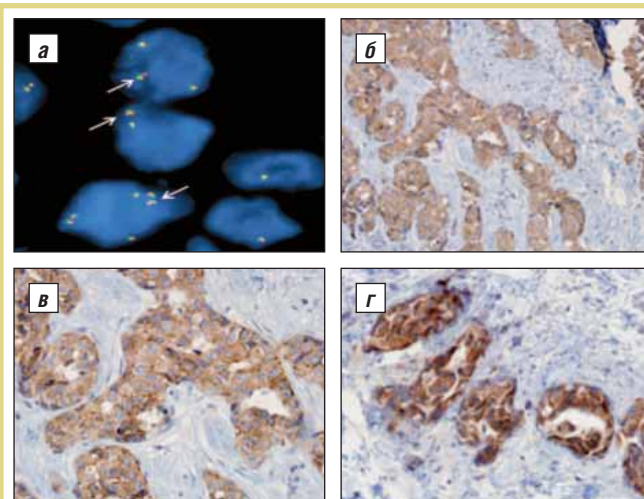


Рис. 1. С использованием ручной FISH (а) парафиновые срезы были гибридизованы флуоресцентной пробой *ALK Break-Apart* (Abbott Molecular, Дес-Плейнс, США). В образце отмечалась атипичная картина двойных сигналов 3'ALK (красный), слитых с сигналом 5'ALK (зеленый), что было классифицировано как отрицательный результат анализа на наличие транслокации *ALK*. ИГХ-исследование *ALK* проведено (панели б–г) с использованием первичного антитела (клон D5F3, Cell Signaling Technology, Inc, Danvers, MA). Все срезы тканей в парафине были окрашены с *ALK* и рассмотрены 2 патологами. До 50% опухолевых клеток имели преимущественно сильное окрашивание +++ (г), остальные (в) – в пределах ++ (30%) и 1+ (20%), что обусловило гистологическую оценку 230 по шкале 0–300; б: ×200; в, г: ×400

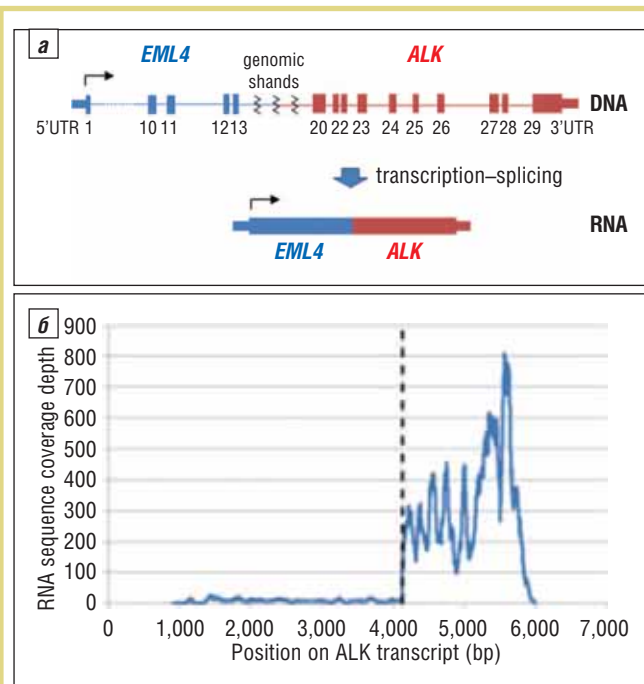


Рис. 2. Предположительная структура реорганизации в геномной ДНК (а, верху), сложная реорганизация, в результате которой *EML4*-экзоны 1–13 расположены перед *ALK*-экзонами 20–29 и разделены небольшими геномными «осколками»; РНК (нижняя) транскрипция и сплайсинг удаляют соединительной регион и создают каноническое слияние *EML4-ALK*; б – измеренная покрытием РНК-SEQ экспрессия *ALK*; пунктир – граница между экзонами 19 и 20

слиянии *EML4-ALK*. Было заподозрено наличие множественных продуктов транскрипции, ранее не подвергавшихся идентификации.

Затем при секвенировании ДНК (тот же образец) для определения уровня *ALK* и строения возможных продуктов слияния удалось обнаружить, что в результате комплексных перестановок сформировалось каноническое слияние *EML4-ALK* (*EML4*-экзоны 1–13, *ALK*-экзоны 20–29). Выдвинуто предположение о существовании в зоне слияния *EML4-ALK* генетических «осколков». По этой причине слияние *EML4-ALK* не было идентифицировано в рамках *FISH*. Промежуточные, «осколочные» участки, по-видимому, удаляются в процессе сплайсинга; в результате синтезируется функциональный транскрипт *EML4-ALK*. Далее мы продемонстрировали повышенную в 39 раз выраженность *ALK*-экзонов 20–29 по отношению к эксонам 1–19 (рис. 2).

Результат иммуногистохимического (ИГХ) исследования *ALK* был положительным (см. рис. 1). На этом основании начато лечение кризотинибом. После 2 нед терапии, по словам пациента, существенно снизилась интенсивность болевых ощущений в лонной области, улучшилась физическая выносливость. Улучшение в состоянии пациента подтверждено данными компьютерной (КТ) и позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ), выполненной через 1 и 4 мес от начала терапии. Результат ПЭТ был отрицательным. На КТ зафиксировано дальнейшее уменьшение размеров первичного очага (оценка эффективности проводимого лечения по классификации RECIST – 75%; рис. 3).

Наличием *ALK*-транслокаций характеризуется 3–7% злокачественных

опухолей легкого [1–6]. Чаще транслокации встречаются у некурящих (никогда не куривших) пациентов и у выкуривающих относительно небольшое количество сигарет (индекс пачко-лет <10) [1, 2, 4, 6, 7]. Наличие транслокаций также связывают с молодым возрастом пациента [2, 6, 7] и гистологическим типом опухоли (аденокарцинома ацинарного типа [6, 7] или перстневидноклеточный рак [2]). Данные современных научных исследований подтверждают наличие *EML4-ALK* у 2–7% пациентов с аденокарциномами легких [1, 2]. Опухоли данного типа восприимчивы к терапии кризотинибом.

Для немелкоклеточного рака легких (НМРЛ) характерно обилие мутаций в гене *ALK*. Большинство из них представляют собой слияние различных фрагментов *EML4* с последовательными участками *ALK*. Кроме того, обнаружены слияния, не содержащие *EML4*, в частности *KIF5B* и *TFG* [3].

В приведенном наблюдении отмечена идентификация генной альтерации нового типа, не поддающейся идентификации в рамках *FISH*. Секвенирование нового поколения позволило обнаружить множественные перестановки в комплексе *EML4-ALK*. Клинические показатели и данные ин-

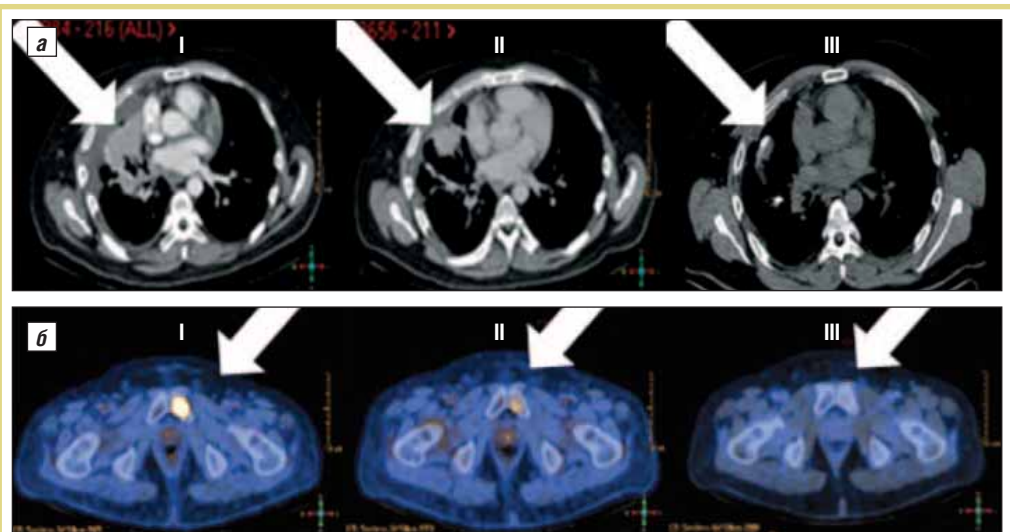


Рис. 3. ПЭТ: а – томограммы грудной клетки, б – таза до начала терапии кризотинибом (I), через 4 нед (II) и спустя 4 мес (III)

Ведущая израильская клиника "Герцлия Медикал Центр" предлагает сотрудничество клиникам и специалистам

- лучшие специалисты и профессора Израиля
- новейшая диагностическая аппаратура
- операционный комплекс, оснащенный по последнему слову техники
- бесплатные услуги профессионального медицинского координатора
- высокие стандарты качества и безопасности
- гибкая система комиссионных
- своевременные отчеты по реальным данным

HERZLIYA MEDICAL CENTER

www.hmc-israel.org.il | yuta@hmc-israel.org.il | +972 -(0)50-959-5371

струментальной диагностики засвидетельствовали быструю положительную реакцию на терапию кризотинибом. У пациентов с НМРЛ и высокой вероятностью мутаций в гене *ALK* целесообразно применять секвенирование нового поколения в ситуации, когда другие методики исследования не подтвердили наличие мутации.

Исследование опухоли на наличие мутаций с помощью мультиплексного генотипирования позволяет на базе одного биологического образца выполнить параллельное исследование нескольких локусов. Мультиплексное генотипирование является эффективной методикой скрининга пациентов с НМРЛ и может рассматриваться как практический инструмент при планировании дальнейшей терапии.

На сегодняшний день существуют таргетные препараты для различных видов мутаций НМРЛ, включая EGFR, транслокации *ALK* и *ROS1*, *HER2 (ERBB2)*, *BRAF* и др.

Литература

1. Kwak E., Bang Y., Camidge D. et al. Anaplastic lymphoma kinase inhibition in non-small-cell lung cancer // *N. Engl. J. Med.* – 2010; 363: 1693–703.
2. Shaw A., Yeap B., Mino-Kenudson M. et al. Clinical features and outcome of patients with non-small-cell lung cancer who harbor EML4–ALK // *J. Clin. Oncol.* – 2009; 27: 4247–53.
3. Rikova K., Guo A., Zeng Q. et al. Global survey of phosphotyrosine signaling identifies oncogenic kinases in lung cancer // *Cell.* – 2007; 131: 1190–203.
4. Soda M., Choi Y., Enomoto M. et al. Identification of the transforming EML4–ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer // *Nature.* – 2007; 448: 561–6.
5. Lipson D., Capelletti M., Yelensky R. et al. Identification of new ALK and RET gene fusions from colorectal and lung cancer biopsies // *Nat. Med.* – 2012; 18: 382–6.
6. Wong D., Leung E., So K. et al. The EML4–ALK fusion gene is involved in various histologic types of lung cancers from nonsmokers with wild-type EGFR and KRAS // *Cancer.* – 2009; 115: 1723–33.
7. Inamura K., Takeuchi K., Togashi Y. et al. EML4–ALK lung cancers are characterized by rare other mutations, a TTF-1 cell lineage, an acinar histology, and young onset // *Mod. Pathol.* – 2009; 22: 508–15.

GENETIC SEQUENCING AND IMMUNOHISTOCHEMICAL STAINING IN METASTATIC NON-SMALL CELL LUNG CANCER

N. Peled, MD, PhD; G. Palmer, MD; R. Hirsch, MD; M. Wines, MD; M. Illuis, MD; M. Varea-Garcia, PhD; L. Sussan-Gutman, MD; D. Otto, PhD; F. Stivens, PhD; D. Ross, MD; M. Kronin, MD; D. Lipson, MD; V. Miller, MD

EML4-ALK gene infusions are detectable in 2–7% of cases of non-small cell lung cancer (NSCLC) and generally identified by fluorescence in situ hybridization. The above tumors are susceptible to crizotinib therapy. Genetic sequencing and immunohistochemical staining revealed crizotinib-sensitive ALK translocation in a patient with metastatic NSCLC.

Key words: ALK translocation, metastatic non-small cell lung cancer, crizotinib.