

Определение генетических нарушений при немелкоклеточном раке легкого с помощью высокопроизводительного секвенирования



И. А. Демидова, Н. А. Савелов, А. А. Аязова, М. А. Махина, Д. Д. Сехниаидзе, М. И. Попов, Д. Л. Строяковский, А. А. Данилова, Д. О. Воронов



Московская городская онкологическая больница № 62



Фото: НИИОЗММ



Фото: НИИОЗММ

Технология

Определение генетических нарушений при немелкоклеточном раке легкого с помощью высокопроизводительного секвенирования:

- новые аспекты канцерогенеза;
- смена парадигмы комплексного лечения;
- пересмотр концепции хирургического лечения.

Актуальность

Современный подход к лечению злокачественных опухолей все чаще основывается на персонализированной терапии, учитывающей как биологические характеристики опухоли, так и индивидуальные особенности организма больного.

Бурный рост количества таргетных препаратов, направленных на блокирование уникальных белковых структур конкретной опухоли, вызванных генетическими aberrациями, существенно изменил современную терапию.

Немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ) является одним из самых ярких примеров того, как генетические исследования меняют жизнь ранее малокурабельных пациентов.

Ежегодно в России заболевают НМРЛ около 50 000 человек, причем 44 % из них погибает на первом году после установления диагноза, так как более чем в 70 % случаев больные обращаются к врачу с запущенными стадиями заболевания. Поиск новых подходов к лечению является буквально вопросом жизни и смерти.

Принципиально новая эпоха началась с внедрения в практику препаратов-ингибиторов тирозинкиназ и открытия в 2004 году активирующих мутаций гена EGFR. Многочисленные клинические исследования показали, что некоторые пациенты с мутациями этого гена при своевременном назначении таргетной терапии могут жить годами без признаков прогрессии, а теперь, >>>

при внедрении препаратов 2-го и 3-го поколений, количество таких больных существенно увеличилось.

Открытие мутаций гена EGFR простимулировало интенсивный поиск других генетических нарушений, которые также могли бы стать мишенью для таргетной терапии при НМРЛ, и такие мутации были найдены. При выполнении расширенного генетического исследования около 40 % больных с распространенными и метастатическими формами аденокарциномы легкого могут получать современную эффективную таргетную терапию и жить существенно дольше, не теряя при этом качества жизни.

Однако при поэтапном проведении расширенного тестирования существует значительный риск полного израсходования образца опухоли на первых этапах генетических исследований, особенно учитывая существенный сдвиг в сторону малого диагностического материала – мелких биопсий, цитологических препаратов, образцов циркулирующей опухолевой ДНК, полученных из плазмы. В связи с этим большинство клинических рекомендаций, как международных, так и отечественных,

предлагают использовать современный метод высокопроизводительного (или массового параллельного) секвенирования в составе основных диагностических алгоритмов при обследовании пациента с НМРЛ.

Мы суммировали результаты исследований методом высокопроизводительного секвенирования 424 образцов пациентов с продвинутыми стадиями НМРЛ, провели анализ преимуществ и ограничений данного метода и оценили возможности их влияния на современную лечебную тактику.

Однако большинство пациентов не могут получать таргетную терапию, и современным стандартом их лечения является химиоиммунотерапия, причем для местнораспространенных форм заболевания (IIIA–IIIB стадиями) возможно комбинирование данного вида лечения с оперативными вмешательствами. Как правило, эти виды хирургического лечения включают пневмонэктомию или расширенные комбинированные операции, часто сопровождающиеся серьезными осложнениями, ухудшающими качество жизни пациентов. Опыт, накопленный в малоинвазивных вмешательствах за последние годы, постоянное совершенствование



Фото: НИИОЗММ



Фото: НИИОЗММ

хирургического инструментария и технических приемов, появление видеосистем высокого разрешения и 3D-оборудования – все это позволило расширить показания к выполнению самых сложных объемов бронхопластических и ангиобронхопластических вмешательств малоинвазивным доступом.

В нашей клинике была внедрена техника однопортового малоинвазивного оперативного вмешательства после неоадъювантной химиоиммунотерапии, позволившая существенно снизить число угрожающих жизни осложнений без потери онкологической радикальности.

Помимо мастерства и опыта хирурга, большое значение имеет техническое обеспечение этих операций. Современные 3D- и 4K-видеосистемы обеспечивают превосходную визуализацию операционного поля в высоком разрешении на любом приближении, позволяют менять угол зрения, давая хирургу возможность действовать с постоянным визуальным контролем.

Около 40 % больных с распространенными и метастатическими формами аденокарциномы легкого, получив таргетную терапию, могут жить существенно дольше, не теряя при этом качества жизни.

Уникальность

Новизну и уникальность полученных результатов можно описать следующим образом.

- Оценена чувствительность и специфичность метода высокопроизводительного секвенирования в реальной клинической практике для поиска генетических вариантов, чувствительных к таргетной терапии, в сравнении со стандартными методами тестирования (полимеразной цепной реакцией (ПЦР), иммуногистохимическими исследованиями, флуоресцентной гибридизацией *in situ* (FISH)).
- Выбран оптимальный дизайн панели для секвенирования, учитывающий наиболее важные генетические нарушения.
- Разработан алгоритм технической и клинической биоинформатической оценки онкогенности и потенциальной чувствительности соматических вариантов к таргетной терапии.
- Выработаны минимальные требования к образцу опухолевой ткани (оптимальному количеству и необходимому качеству образца), определены возможные ограничения и разработан оптимальный диагностический алгоритм от получения материала до заключительного >>>



Фото: НИИОЗММ

патоморфологического и молекулярно-генетического исследования.

- Проведено исследование возможных механизмов первичной и вторичной резистентности к таргетной терапии, исследованы частоты неблагоприятных вариантов потенциально чувствительных генетических aberrаций, а также коммутаций и комплексных вариантов.
- Со специалистами клинических специальностей обсуждены особенности интерпретации обнаруживаемых редких генетических вариантов и возможности модификации терапии при обнаружении потенциальных маркеров резистентности.
- К пациентам с местнораспространенными стадиями НМРЛ без активирующих мутаций впервые применена схема лечения, включающая неоадьювантную химиоиммунотерапию с дальнейшим малоинвазивным оперативным вмешательством с использованием однопортового видеоторакоскопического доступа.
- Пациентам с местнораспространенным и распространенным НМРЛ с активирующими мутациями в процессе таргетной терапии с целью контроля первичной опухоли выполнялись малоинвазивные

вмешательства с использованием однопортового видеоторакоскопического доступа.

- Впервые выполнен ряд бронхопластических и ангиобронхопластических однопортовых видеоторакоскопических операций у пациентов после неоадьювантной химиоиммунотерапии и в процессе таргетной терапии.

Особенности использованного подхода.

- Проведение предварительной валидации секвенирования на большом количестве ранее протестированных образцов с целью определения чувствительности и специфичности метода, а также определения его преимуществ в выявлении дополнительных вариантов, не обнаруженных при тестировании стандартными методами.
- Проспективная оценка результатов исследования для оценки сложных, редких и компаундных вариантов, разработка подходов к их клинической аннотации.
- Постоянная работа в мультидисциплинарной команде позволила наиболее эффективно и быстро устранять возможные недостатки и сложности в проведении исследования и интерпретации результатов для использования в лечебном процессе.



- Разработка малоинвазивного метода хирургического лечения с использованием однопортового торакоскопического доступа позволила выделить целевую группу пациентов, которым показан данный подход, и оценить эффективность и безопасность метода.

Заслуживает внимания также техническая часть проведения секвенирования. Работа выполнена практически полностью с использованием реагентов и программного обеспечения российского производства.

С целью минимизации возможного человеческого фактора впервые проведена адаптация протоколов создания и нормализации библиотек для секвенирования к роботической системе, позволяющая автоматизировать и ускорить сложную обработку нескольких сотен образцов без потери точности и без риска контаминации.

Впервые проведена адаптация метода высокопроизводительного секвенирования образцов опухолевой ткани при НМРЛ к рутинной практике учреждения московского здравоохранения.

Показана возможность использования для секвенирования малого диагностического материала, в том числе цитологических препаратов, разработана схема взаимодействия между диагностическими подразделениями, позволяющая максимально быстро и качественно провести патоморфологическое и генетическое исследования.

Совместно с врачами клинических специальностей определен «портрет» пациента, нуждающегося в проведении данного исследования, установлены оптимальные сроки тестирования, проведена необходимая адаптация заключения по результатам исследования к нуждам практикующего врача-онколога.

Масштабирование опыта

По результатам проведенной работы был утвержден образовательный курс в рамках программы НМО по обучению специалистов клиничко-лабораторной диагностики, лабораторных генетиков и биологов в работе в новых условиях.

Высокая чувствительность и специфичность метода секвенирования, существенное увеличение количества выявленных нарушений, как потенциально чувствительных к таргетной терапии, так и определяющих резистентность, разработка эффективного алгоритма проведения необходимых исследований позволили значительно усовершенствовать и ускорить диагностический процесс. Использование новой методики малоинвазивного хирургического вмешательства с помощью однопортового торакоскопического доступа у пациентов после неоадьювантной химиоиммунотерапии показало возможность успешного внедрения данного подхода в ежедневную практику медицинских учреждений онкологического профиля.

Результаты внедрения

Проведенная работа позволила выработать новый алгоритм обследования и лечения пациентов с НМРЛ, повышающий доступность современных высокотехнологичных методов в учреждениях здравоохранения онкологического профиля.

Разработка и внедрение метода однопортового торакоскопического доступа >>>



Фото: НИИОЗММ



в целевой группе больных позволили снизить травматичность операции у пациентов с НМРЛ после неoadъювантной химиоиммунотерапии, уменьшить количество койко-дней, улучшить качество жизни пациентов, уменьшить кровопотерю и снизить процент осложнений.

Применение химиоиммунотерапии на первом этапе позволило модифицировать объем операции без потери онкологической радикальности.

Одним из очевидных преимуществ секвенирования нового поколения явилась возможность одновременного выявления редких вариантов, для которых имеется таргетная терапия, но определение которых затруднено из-за проблем с количеством материала или длительным временем поэтапного тестирования.

Разработанный в отделении патологической анатомии нашей больницы алгоритм, ориентированный на максимально рациональное применение дополнительных окрасок, позволил существенно сократить расход образца и сохранить достаточное количество опухолевой ткани для проведения секвенирования. Кроме того, решающую роль в обеспечении пригодности гистологического материала для исследования сыграла стандартизация протоколов преаналитической



обработки образцов в онкологических медицинских организациях Москвы. Строгое соблюдение правил фиксации материала позволило существенно снизить отбраковку.

Таким образом, проведение высокопроизводительного секвенирования подтвердило высокую чувствительность и специфичность метода и позволило дополнительно выявить мутации, потенциально чувствительные к таргетной терапии (в том числе редкие варианты) в 12 % случаев. При этом непригодными к проведению исследования из-за низкого качества или малого количества опухолевой ткани оказалось всего 8 % образцов (в сравнении с отбраковкой до 40 % образцов из некоторых регионов РФ).

Для осуществления безопасного хирургического вмешательства используется торакоскопическая видеокамера с высоким разрешением, что обеспечивает лучшую визуализацию в сравнении с открытой методикой. Кроме того, мы применяем хирургические инструменты с двойной артикуляцией, которые занимают минимальное пространство



Фото: НИИОЗММ

в однопортовом доступе и позволяют использовать несколько инструментов в одной операционной ране. Удаление препарата осуществляется также через однопортовый доступ. В мультипортовых методиках вся операция может быть осуществлена через 3–4 прокола по 10 мм, но в конце операции для удаления препарата осуществляется дополнительный разрез длиной 4–5 см. При выраженном постлекарственном фиброзе в корне легкого, который повышает риск травматизации сосудов, мы часто используем методики превентивного сосудистого контроля в виде выделения основного ствола легочной артерии и установки турникета.

Для пациентов, получивших на первом этапе лечения химиоиммунотерапию, последующая операция является обычно достаточно проблемной. У таких больных вмешательство гораздо сложнее с точки зрения хирургической техники, чем у пациентов без этого вида лечения в анамнезе. Структуры корня легкого после химиоиммунотерапии находятся в плотном

постлекарственном фиброзе, и выделить структуры во время операции довольно сложно, высок риск интраоперационного повреждения сосудов и бронхов. В связи с этим в мировой практике чаще всего применяется торакотомия для хирургического лечения этой когорты пациентов.

В мировой литературе описаны небольшие группы пациентов, получивших хирургическое лечение после неоадьювантной химиоиммунотерапии малоинвазивным доступом. Большая часть этих пациентов оперируется через торакотомию, которая более травматична, связана с большим процентом послеоперационных осложнений и оставляет обезображивающий рубец на коже грудной клетки. В нашей клинике однопортовая торакоскопическая методика применяется как для стандартных анатомических резекций легких, так и для резекций у пациентов после химиоиммунотерапии. Наш опыт по количеству проведенных операций превосходит уже отмеченный в мировых публикациях. 