

# ОПТИМИЗАЦИЯ МЕТОДОВ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ ПАЦИЕНТОВ С РАСПРОСТРАНЕННЫМ НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНЫМ РАКОМ ЛЕГКОГО ПУТЕМ ВНЕДРЕНИЯ ТЕСТИРОВАНИЯ ROS1 В РЕСПУБЛИКЕ КАЗАХСТАН

О.В. ШАТКОВСКАЯ<sup>1</sup>, Д.Р. КАЙДАРОВА<sup>1</sup>, М.Г. ОРАЗГАЛИЕВА<sup>1</sup>,  
Э.Б. САТБАЕВА<sup>1,2</sup>, С.О. ОСИКБАЕВА<sup>1</sup>, А.Б. КОЙШЫБАЕВА<sup>1</sup>

<sup>1</sup>АО «Казакский научно-исследовательский институт онкологии и радиологии», Алматы, Республика Казахстан;

<sup>2</sup>КГП на ПХВ «Алматинский Онкологический Центр», Алматы, Республика Казахстан

## АННОТАЦИЯ

**Актуальность:** В настоящее время молекулярная диагностика немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ) в Казахстане включает определение статуса драйверных мутаций EGFR, ALK и статуса PD-L1. Жизненно важная терапия для пациентов с положительным результатом на эту драйверную мутацию в настоящее время затруднена.

**Цель исследования** – оптимизация методов молекулярно-генетической диагностики пациентов с НМРЛ путем внедрения тестирования ROS1 в Республике Казахстан.

**Методы:** Исследовался биопсийный и операционный материал пациентов с НМРЛ, фиксированный в 10%-ном забуференном формалине. После первоначальной морфологической диагностики аденокарциномы, определения статуса мутаций EGFR и ALK образцы опухоли с отрицательным статусом EGFR и ALK отбирались для дальнейшего выявления статуса мутации ROS1. Определение статуса мутации ROS1 проводилось двумя методами: первый метод – иммуногистохимический анализ (ИГХ) на платформе Ventana BenchMark Ultra с использованием антитела ROS1 (SP283) и системы визуализации OptiView DAB Detection Kit. По результатам ИГХ образцы с положительными и сомнительными результатами направлялись на полимеразную цепную реакцию с обратной транскриптазой (ОТ-ПЦР), чтобы подтвердить статус мутации ROS1 – второй метод.

**Результаты:** С 01.01.2022 по 30.09.2022 гг. всего методом ИГХ исследовано 99 образцов опухолей пациентов с EGFR-отрицательной и ALK-отрицательной аденокарциномой легкого. Результаты ИГХ-окрашивания расценивали как: 0 (отрицательно) – 59 образцов, 1+ (отрицательно) – 25 образцов, 2+ (сомнительно) – 12 образцов, 3+ (положительно) – 3 образца. Случаи с  $\geq 70\%$  иммуноокрашивания считались положительными. Образцы с оценкой окрашивания ИГХ 2+ (сомнительно), 3+ (положительно) и несколько образцов 1+ были отправлены на подтверждение ПЦР-тестированием.

Всего с помощью ОТ-ПЦР было протестировано 22 образца; результаты расценены следующим образом: 1 (4%) – положительный, 13 (59%) – отрицательный, 8 (37%) – невалидный.

**Заключение:** При определении статуса мутации ROS1 с помощью ИГХ было получено большое количество положительных и сомнительных результатов, а при последующем тестировании ОТ-ПЦР – большая доля невалидных результатов. В дальнейшем при выборе методики обнаружения ROS1 для проведения анализов на страновом уровне необходимо оценить экономическую затратную составляющую внедряемых методов, а также сравнить со стандартной валидированной методикой FISH.

**Ключевые слова:** молекулярно-генетическая диагностика ROS1, рак легкого (РЛ), немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ), иммуногистохимия (ИГХ), полимеразная цепная реакция с обратной транскриптазой (ОТ-ПЦР), флуоресцентная гибридизация in situ (FISH).

**Введение:** Рак легкого (РЛ) занимает 2-е место по заболеваемости после рака молочной железы и первое место по смертности от злокачественных новообразований обоих полов в Республике Казахстан (РК) в течение последних десятилетий. При этом заболеваемость РЛ у мужчин с долей 20% от всех случаев рака значительно выше, чем у женщин. В 2021 г. выявлено 3615 новых случаев рака трахеи, бронхов и легкого, при этом доля случаев, диагностированных на I-II стадии, составляла всего 28%, доля запущенных форм (IV стадия) при раке трахеи, бронхов и легкого – 27,1%. Выживаемость при РЛ зависит от стадии заболевания и остается отно-

сительно низкой. В 2021 г. одногодичная летальность от РЛ в РК составила 43,3%. Всего в Казахстане в 2021 г. от РЛ умерли 2086 мужчин и женщин, что больше, чем от рака молочной железы, прямой кишки и предстательной железы, вместе взятых [1]. Согласно оценочным данным Globocan, в 2020 г. в Республике Казахстан первичная заболеваемость РЛ составляла 21,8 на 100000 населения (4642 новых случая) и смертность 16,7 на 100000 населения, что соответствует 17% всех смертей от онкологических заболеваний [2]. В соответствии с литературными данными, немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ) составляет 80-90% от всех случаев РЛ, тогда как заболе-

ваемость мелкоклеточным раком легкого (МРЛ) снижается в течение последних двух десятилетий во многих странах [3]. В зависимости от гистологической структуры НМРЛ подразделяется на аденокарциному (наиболее распространенный подтип, 40-50% НМРЛ), плоско-

клеточный рак (25-40% НМРЛ), крупноклеточный рак (3-5% НМРЛ), аденосквамозную (2-3% НМРЛ) и саркома-тоидную (2-3% НМРЛ) карциномы [4, 5].

Алгоритм тестирования пациентов с распространенным НМРЛ в Казахстане представлен на рисунке 1 [6].

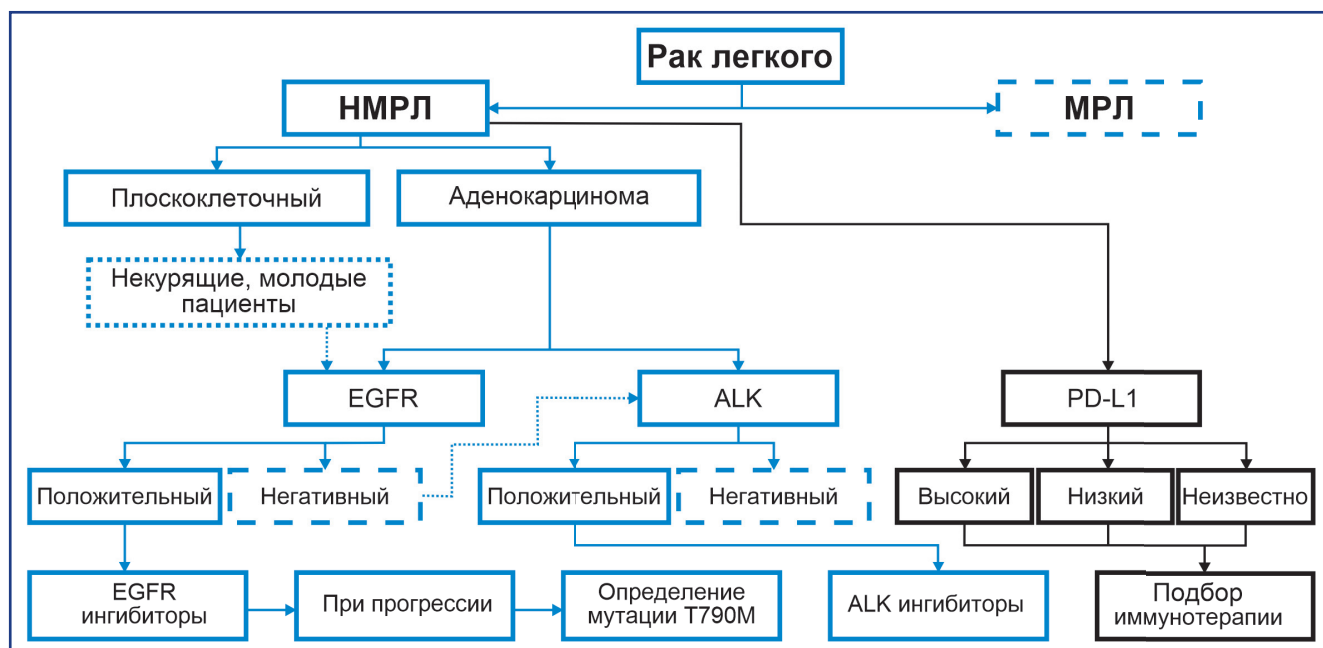


Рисунок 1 – Алгоритм тестирования пациентов с распространенным НМРЛ в Республике Казахстан

После морфологической диагностики следующим шагом является тестирование биомаркеров. Выявление подтипа рака на основе тестирования биомаркеров позволяет подобрать индивидуальное лечение для пациентов, в конечном итоге выявляя как пациентов с высокой вероятностью ответа на терапию, так и пациентов с меньшей вероятностью ответа [7, 8]. Сегодня в США и большинстве стран ЕС считается обязательным тестирование на мутации EGFR, ALK и ROS1 транслокации, включая тестирование мутации EGFR T790M при рецидиве заболевания [9, 10]. Тестирование ROS1 включено в обновленный протокол диагностики и лечения «Рак легкого» в Республике Казахстан [6]. Согласно Комплексному плану борьбы с онкологическими заболеваниями на 2023-2025 гг. в настоящее время в РК проводится следующая молекулярно-генетическая диагностика НМРЛ: выявление мутаций EGFR, ALK и статуса PD-L1 [11]. В рамках проекта проводится определение T790M при прогрессировании EGFR-положительного НМРЛ (жидкая биопсия). К сожалению, тестирование на мутации ROS1 не было включено в текущий и предыдущий Комплексные планы по борьбе с онкологическими заболеваниями [11, 12]. По данным Центра морфологических исследований АО «Казахский научно-исследовательский институт онкологии и радиологии» (АО «КазНИИОиР»), в 2020 г. из 3240 пациентов с впервые выявленным РЛ у 1658 был диагностирован НМРЛ (аденокарцинома), у 1161 был взят материал для исследований. В общей сложности 932 пациента были направлены на тестирование мутации EGFR (167 (17,9%) были признаны положительными); 753

человека были направлены на ALK-тестирование (38 (5%) оказались положительными); 825 человек были направлены на тестирование PD-L1 (320 (39%) выявлены как положительные).

ROS1 (ROS Proto-Oncogene 1, Receptor Tyrosine Kinase) представляет собой рецептор тирозинкиназы. При НМРЛ транслокация гена ROS1 приводит к образованию нескольких онкогенных слитых белков ROS1 с конститутивной киназной активностью, наиболее распространенным из которых является CD74-ROS1. Транслокации ROS1 редко встречаются одновременно с другими онкогенными драйверными мутациями, включая транслокации ALK и активирующие мутации EGFR при НМРЛ [13, 14]. Зарегистрированная распространенность ROS1-позитивного НМРЛ в Северной Америке составляет 1,6%, в Европе – около 2% и в Азии – 2,3% [15]. Данных о распространенности мутации ROS1 в Казахстане в настоящее время нет.

В соответствии с международными рекомендациями тестирование на наличие мутации ROS1 рекомендовано проводить у всех пациентов с аденокарциномой легкого на поздних стадиях независимо от клинических характеристик [9, 10, 16]. Транслокации ROS1 можно обнаружить с помощью нескольких методов: флуоресцентная гибридизация in situ (FISH), секвенирование следующего поколения на основе ПНК (NGS) или полимеразная цепная реакция с обратной транскриптазой (ОТ-ПЦР) [16].

FISH – это подтвержденный исследованиями метод обнаружения транслокаций гена ROS1 [9, 10, 16]. В связи с относительно редкой частотой встречаемости

транслокации ROS1 при НМРЛ их скрининг с помощью метода иммуногистохимии (ИГХ) может быть предпочтительнее, чем FISH или молекулярная диагностика при некоторых условиях. Однако интерпретация ИГХ ROS1 является сложной задачей, поскольку экспрессия может наблюдаться в виде пятнистого окрашивания, как правило, со слабой интенсивностью, примерно в трети опухолей, которые не имеют лежащей в основе мутации ROS1 [16].

Иммуногистохимия может быть использована для предварительного скрининга пациентов; для подтверждения диагноза требуется FISH или полимеразная цепная реакция (ПЦР) [10, 16]. NGS становится альтернативным молекулярным тестом для скрининга или подтверждения наличия слияния генов [16]. Однако на данный момент в большинстве стран NGS не полностью совместимо с клинической практикой из-за высокой стоимости данного исследования, необходимости накапливать несколько образцов за один цикл, а также наличия сложного диагностического оборудования и хорошо обученного персонала [17].

В связи с отсутствием возможности проведения FISH-диагностики ROS1 в АО «КазНИИОиР» на момент реализации проекта для определения статуса ROS1 у пациентов с аденокарциномой, у которых был получен отрицательный результат при исследовании на EGFR, ALK-мутации, была выбрана альтернативная методика диагностики ROS1 – проведение ИГХ исследования с последующим ОТ-ПЦР.

**Цель исследования** – оптимизация методов молекулярно-генетической диагностики пациентов с НМРЛ путем внедрения тестирования ROS1 в Республике Казахстан.

**Материалы и методы:** Исследовался биопсийный и операционный материал пациентов с НМРЛ, фиксированный в 10%-ном забуференном формалине. Кусочки ткани подвергались стандартной проводке в тканевом процессоре и заливались в парафин (FFPE блоки). После первоначальной морфологической диагностики аденокарциномы, определения статуса мутаций EGFR и ALK образцы опухоли с отрицательным статусом EGFR и ALK отправлялись для дальнейшего определения статуса мутации ROS1. Осуществлялась подготовка парафиновых срезов толщиной 3-4 мкм на адгезивных стеклах. Сначала проводился ИГХ анализ на платформе Ventana BenchMark Ultra с использованием антитела ROS1 (SP283) и системы визуализации OptiView DAB Detection Kit. Далее образцы с положительными и сомнительными результатами после исследований ИГХ направлялись на ОТ-ПЦР для подтверждения статуса мутации ROS1. ОТ-ПЦР проводили набором для обнаружения слияний генов AmoyDx ROS1 (в соответствии с инструкцией производителя).

Онкоген ROS1 кодирует тирозинкиназу орфанного рецептора, связанную с киназой анапластической лимфомы (ALK), наряду с членами семейства рецепторов инсулина. ALK и ROS1 ответственны за синтез родственных тирозинкиназ, АТФ-связывающие домены которых на 77% идентичны по аминокислотному составу [18]. Транслокация приводит к слиянию части ROS1, включающей весь тирозинкиназный домен, с 1 из 12 различных белков-партнеров [19].

Иммуногистохимия выявляет известные онкогенные мутации с помощью специфических для мутации антител в образце ткани. Антитела связываются с ферментом или флуоресцентным красителем, что позволяет идентифицировать мутационно-положительные образцы с помощью микроскопа [19].

Для диагностики транслокации ROS1 нами были использованы: VENTANA ROS1 (SP384) Rabbit Monoclonal Primary Antibody, как рекомендовано в литературе [19]. Иммуногистохимические диагностические анализы для обнаружения ROS1 проводились с использованием платформы BenchMark Ultra (Ventana) с моноклональным антителом к ROS1 (SP284, Ventana) и методом обнаружения OptiView DAB Detection Kit. Оценка проведенных исследований проводилась на световом микроскопе Leica DM1000. Внутренним позитивным контролем считалось цитоплазматическое окрашивание неопухолевых пневмоцитов II типа. Оценивалась интенсивность цитоплазматического окрашивания опухолевых клеток на увеличении 4 (x4): 0 (отрицательно), 1+ (отрицательно), 2+ (сомнительно), 3+ (положительно). Положительным считался случай, если имело место интенсивное окрашивание не менее 70% опухолевых клеток.

ОТ-ПЦР выполнялась в качестве подтверждающего метода при положительных или сомнительных результатах ИГХ исследований на ROS1. Этим высокоспецифичным методом обнаруживается слияние генов из опухолевой РНК и не обнаруживаются альтернативные партнеры по слиянию [19].

Исследование проводилось на амплификаторе «Tanlong Real – time PCR System» с использованием следующих реактивов: выделение РНК/ДНК – с применением Invitrogen, DNase I и PureLinktm FEPE (Thermo Fisher Scientific, США), проверка концентрации РНК/кДНК – с применением методов спектрофотометрии с помощью NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, США), амплификация и детекция результатов – с применением наборов ROS1 Gene Fusions Detection Kit (AmoyDx, Китай) в соответствии с инструкцией производителя.

Интерпретация результата ПЦР анализа производилась согласно инструкции производителя по каналам детекции FAM и HEX/VIC:

1) Для NTC: значения Ct FAM для реакционной смеси 1-4 и значения Ct HEX/VIC реакционной смеси 4 должны быть  $\geq 31$ . Если нет, то результаты считались невалидными. По рекомендации производителя образец следовало протестировать повторно.

2) Для положительного контроля: значения Ct FAM реакционных смесей 1-4 и значения Ct HEX/VIC реакционной смеси 4 должны быть  $< 24$ . Если нет, результат – невалидный. По рекомендации производителя образец следовало протестировать повторно.

3) Анализ для референсного гена (сигнал HEX/VIC) в реакционной смеси 4 для каждого образца:

а) HEX / VIC значение Ct должно быть  $\leq 20$ .

б) Если HEX/VIC значение Ct  $> 20$ , это указывает на деградацию РНК или прецизионную реакцию ингибиторов ПЦР. По рекомендации производителя образец следовало протестировать повторно или заново экстрагировать РНК, так как могли быть ложноотрицательные результаты.

4) Анализ для каждого образца: записывалось значение Ct FAM реакционных смесей 1-4 для каждого образца:

а) Если значение Ct FAM реакционной смеси 1-4  $\geq 30$ , образец определялся как отрицательный (слияние ROS1 не обнаружено) или LOD (предел обнаружения) набора ниже.

б) Если какое-либо значение Ct FAM реакционной смеси 1-4  $< 30$ , образец определялся как положительный (ген слияние ROS1 обнаружен).

На рисунке 2 представлен схематично алгоритм тестирования пациентов с аденокарциномой НМРЛ в рамках исследования.

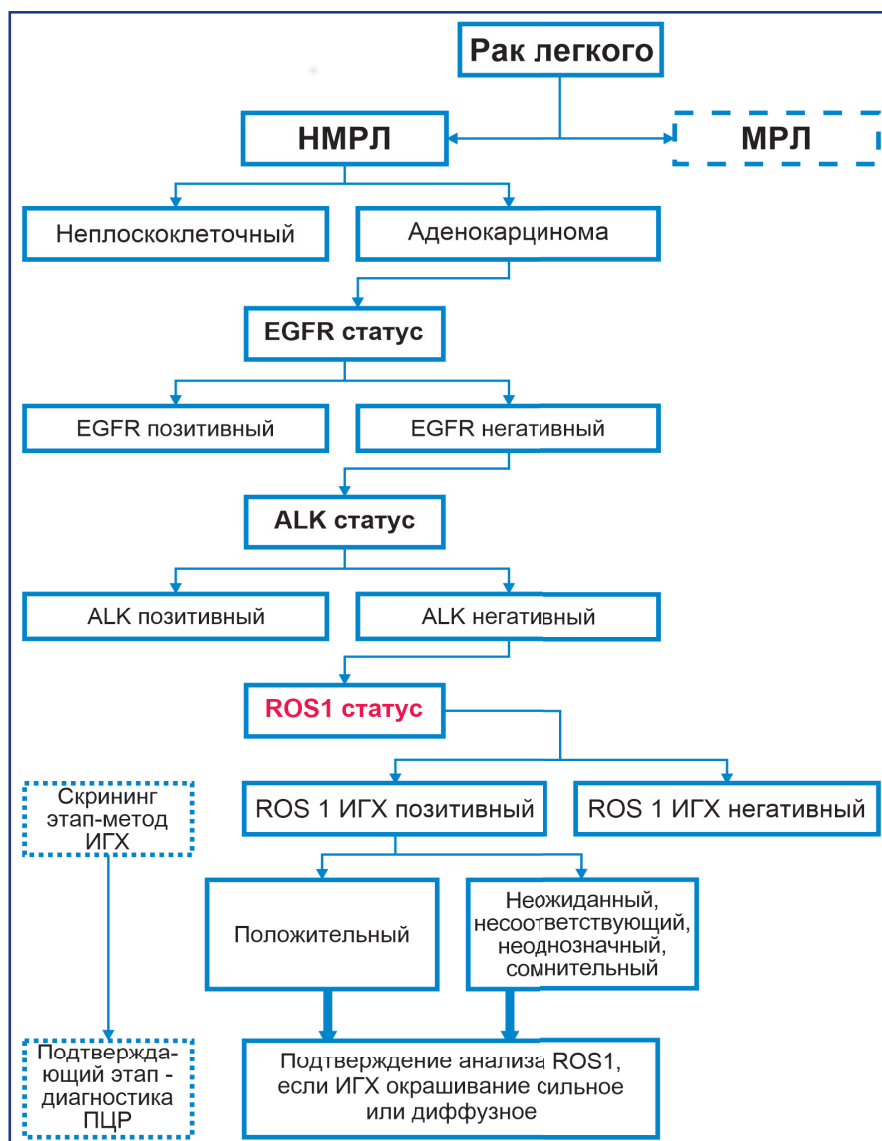


Рисунок 2 – Алгоритм тестирования пациентов с аденокарциномой НМРЛ

**Результаты:** С 01.01.2022 по 30.09.2022 гг. всего методом ИГХ исследовано 99 образцов опухолей пациентов с EGFR-отрицательной и ALK-отрицательной аденокарциномой легкого. Результаты ИГХ-окрашивания расценивали как: 0 (отрицательно) – 59 образцов, 1+ (отрицательно) – 25 образцов, 2+ (сомнительно) – 12 образцов, 3+ (положительно) – 3 образца. Случаи с  $\geq 70\%$  иммуноокрашивания считались положительными. Образцы с оценкой окрашивания ИГХ 2+ (сомнительно), 3+ (положительно) и несколько образцов 1+ были отправлены на подтверждение ПЦР-тестированием.

В Центре молекулярно-генетических исследований АО «КазНИИОиР» методом ОТ-ПЦР было протестировано 22 образца. Результаты расценены следующим образом: 1 (4%) – положительный, 13 (59%) – отрицательный, 8 (37%) – невалидный.

**Обсуждение:** При ИГХ большая доля образцов – 15 из 99 образцов (15%) – оказались положительными и сомнительными. В процессе проведения ИГХ-исследований и их оценки возникли трудности с интерпретацией результатов в связи с большим количеством позитивных и сомнительных результатов. По этой причине были проведены дополнительные консультации для интерпретации полученных данных. Имелись случаи с гетерогенным окрашиванием образцов, что требовало проведения FISH-исследования с оценкой в участках опухоли с ярким и умеренным окрашиванием. Это позволило выявить истинную гетерогенность опухоли или найти объяснение в предварительной подготовке материала.

При ОТ-ПЦР получено: 1 (4%) – положительный, 13 (59%) – отрицательных, 8 (37%) – невалидных.



ных результатов из 22. К сожалению, судя по большому количеству не прошедших реакцию образцов (невалидные – 37%), возможно, выделенная из FFPE блоков РНК была невысокого качества, и такие образцы не подходили для ПЦР. Учитывая полученные результаты, для получения точных выводов требуются дальнейшие исследования.

По данным N.I. Lindeman с соавт., чувствительность ИГХ составляет 96% (95% ДИ, 71–99%) и специфичность 94% (95% ДИ, 89–96%) по сравнению с FISH при использовании антител D4D6 с интенсивностью окрашивания не менее 2+ (как определено в исследованиях). В связи с несовершенной специфичностью ИГХ (нет единой оценки результатов ИГХ, и каждая лаборатория подбирает свою границу интенсивности окрашивания), авторы также подчеркивают сложности интерпретации интенсивности окрашивания. Однако, учитывая высокую чувствительность ИГХ, образцы опухоли, в которых явно отсутствует окрашивание ROS1, могут быть интерпретированы как отрицательные по наличию транслокаций ROS1 [16].

В подобном исследовании при применении метода ИГХ 34 из 111 (30,6%) были иммунореактивными к ROS1, в последующем при FISH диагностике только 5 из 34 иммунореактивных к ROS1 опухолей оказались ROS1-позитивными [20]. В исследовании Shan L. с соавт. среди 60 случаев 16 (26,7%), 13 (21,7%), 20 (33,3%) случаев были ROS1 положительными, выявленными с помощью ИГХ, FISH и ОТ-ПЦР, соответственно [21].

В исследовании Voyle T. A. с соавт. оценивалось 33 образца на транслокации ROS1 с помощью ИГХ; в результате высокая экспрессия белка ROS1 с помощью ИГХ была обнаружена в 6 образцах. Из этих 6 образцов 5 также были положительными при FISH на наличие транслокации гена ROS1. 27 образцов биопсий РЛ, которые были отрицательными на транслокации ROS1 при генетическом тестировании, имели либо низкую экспрессию белка ROS1, либо не имели экспрессии белка ROS1. Авторы пришли к выводу, что ИГХ при ROS1 может быть практичным и экономически эффективным методом скрининга транслокаций гена ROS1 [22].

Хотя мутация ROS1 встречается относительно редко, составляя от 2% до 3% аденокарцином легкого [13-15], структурные транслокации с участием гена ROS1 приводят к появлению опухолей, которые можно успешно лечить таргетными препаратами. Одно клиническое исследование фазы I с участием 50 пациентов с НМРЛ продемонстрировало, что наличие транслокации ROS1, определенное с помощью FISH или ОТ-ПЦР, предсказывает ответ на направленное ингибирование с использованием кризотиниба с частотой ответа 72% и медианой выживаемости без прогрессирования 19,2 месяца [23]. Основываясь на результатах данного исследования, FDA расширило использование кризотиниба у пациентов с НМРЛ с транслокациями ROS1. В 2016 г. Европейское многоцентровое ретроспективное исследование 32 пациентов с НМРЛ с транслокацией ROS1, получавших кризотиниб, продемонстрировало ЧОО 80% и медиану безрецидивной выживаемости 9,1 месяца [24].

**Заключение:** При определении статуса мутации ROS1 с помощью ИГХ было получено большое количество положительных и сомнительных результатов (15 из 99), а при последующем тестировании ОТ-ПЦР – большая доля невалидных результатов. При выборе методики обнаружения ROS1 для реализации в масштабах всей страны необходимо оценить экономическую составляющую внедряемых методов, а также сравнить их со стандартной валидированной методикой FISH.

В Казахстане доступ пациентов с РЛ к жизненно важной молекулярной диагностике для определения мутаций ROS1 затруднен, поэтому необходимо внедрение тестирования ROS1 с использованием рекомендованной, одобренной и проверенной методики для предоставления персонализированной таргетной терапии.

#### Список использованных источников:

1. Кайдарова Д.Р., Шатковская О.В., Онгарбаев Б.Т., Сейсенбаева Г.Т., Азмагамбетова А.Е., Жылкайдарова А.Ж., Лаврентьева И.К., Саги М.С. Показатели онкологической службы РК, 2021 г. (Статистические и аналитические материалы) / под ред. Д.Р. Кайдаровой. – Алматы, 2022. – 384 с. [Kaidarova D.R., Shatkovskaja O.V., Ongarbaev B.T., Sejsenbaeva G.T., Azhmagambetova A.E., Zhylkaidarova A.Zh., Lavrent'eva I.K., Sagi M.S. Pokazateli onkologicheskoy sluzhby RK, 2021 g. (Statisticheskie i analiticheskie materialy) / pod red. D.R. Kaidarovoy. – Almaty, 2022. – 384 s. (in Russ.)]. <https://doi.org/10.52532/1-11-2021-1-384>
2. WHO, International Agency for Research on Cancer. Global Cancer Observatory in 2020. Kazakhstan fact sheets. – 2021. <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/398-kazakhstan-fact-sheets.pdf>. 29.05.2023.
3. Loo P.S., Thomas S.C., Nicolson M.C., Fyfe M.N., Kerr K.M. Subtyping of undifferentiated non-small cell carcinomas in bronchial biopsy specimens // J. Thor. Oncol. – 2010. – Т. 5. – №. 4. – P. 442-447. <https://doi.org/10.1097/JTO.0b013e3181d40fac>
4. National Cancer Institute. Seer Cancer Statistics Review 1975-2017. [https://seer.cancer.gov/archive/csr/1975\\_2017/results\\_merged/sect\\_15\\_lung\\_bronchus.pdf](https://seer.cancer.gov/archive/csr/1975_2017/results_merged/sect_15_lung_bronchus.pdf). 29.05.2023.
5. Lewis D.R., Check D.P., Caporaso N.E., Travis W.D., Devesa S.S. US lung cancer trends by histologic type // Cancer. – 2014. – Т. 120. – №. 18. – P. 2883-2892. <https://doi.org/10.1002/cncr.28749>
6. Клинический протокол диагностики и лечения «Рак легкого»: утв. протоколом Объединенной комиссии по качеству медицинских услуг Министерства здравоохранения Республики Казахстан 1 июля 2022 года, №164 [Klinicheskij protokol diagnostiki i lecheniya «Rak legkogo»: utv. protokolom Ob'edinennoj komissii po kachestvu medicinskih uslug Ministerstva zdavoohraneniya Respubliki Kazaxstan 1 ijulya 2019 goda, №164 (in Russ.)]. <https://diseases.medelement.com/disease/рак-легкого-кп-рк-2022/17273>
7. Stimson L., La Thangue N.B. Biomarkers for predicting clinical responses to HDAC inhibitors // Cancer Let. – 2009. – Т. 280. – №. 2. – P. 177-183. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2009.03.016>
8. Kris M.G., Johnson B.E., Berry L.D., Kwiatkowski D.J., Iafrate A.J., Wistuba I.I., Varella-Garcia M., Franklin W.A., Aronson S.L., Su P.S., Shyr Y., Camidge D.R., Sequist L.V., Glisson B.S., Khuri F.R., Garon E.B., Pao W., Rudin C., Schiller J., Haura E.B., Socinski M., Shirai K., Chen H., Giaccone G., Ladanyi M., Kugler K., Minna J.D., Bunn P.A. Using multiplexed assays of oncogenic drivers in lung cancers to select targeted drugs // JAMA. – 2014. – Vol. 311 (19). – P. 1998. <https://doi.org/10.1001/jama.2014.3741>
9. Planchard D., Popat S., Kerr K., Novello S., Smit E.F., Faivre-Finn C., Mok T.S., Reck M., Van Schil P.E., Hellmann M.D., Peters S. Metastatic non-small cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up // Ann. Oncol. – 2018. – Vol. 29. – P. iv192-iv237. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdy474>
10. National Comprehensive Cancer Network, Inc. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines®) for Non-Small Cell Lung Cancer. – V.3.2023. [https://www.nccn.org/professionals/physician\\_gls/pdf/nscl.pdf](https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/nscl.pdf). 29.05.2023
11. Об утверждении Комплексного плана по борьбе с онкологическими заболеваниями в Республике Казахстан на

2023-2025 годы. Постановление Правительства РК от 29 июня 2018 года, № 395 [Ob utverzhenii kompleksnogo plana po bor'be s onkologicheskimi zabolevaniyami v Respublike Kazaxstan na 2018 – 2022 gody. Postanovlenie Pravitel'stva RK ot 29 iyunya 2018 goda, № 395 (in Russ.)]. <https://adilet.zan.kz/rus/docs/P1800000395>. 29.05.2023

12. Об утверждении комплексного плана по борьбе с онкологическими заболеваниями в Республике Казахстан на 2018 – 2022 годы. Утв. Постановлением Правительства РК от 29 июня 2018 года, № 395 [Ob utverzhenii kompleksnogo plana po bor'be s onkologicheskimi zabolevaniyami v Respublike Kazaxstan na 2018 – 2022 gody. Utv. Postanovleniem Pravitel'stva RK ot 29 iyunya 2018 goda, № 395 (in Russ.)]. <https://adilet.zan.kz/rus/docs/P1800000395>. 29.05.2023

13. Lin J. J., Shaw A. T. Recent advances in targeting ROS1 in lung cancer // J. Thor. Oncol. – 2017. – Vol. 12 (11). – P. 1611-1625. <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2017.08.002>

14. Chin L.P., Soo R.A., Soong R., Ou S.H.I. Targeting ROS1 with anaplastic lymphoma kinase inhibitors: a promising therapeutic strategy for a newly defined molecular subset of non-small-cell lung cancer // J. Thor. Oncol. – 2012. – Vol. 7 (11). – C. 1625-1630. <https://doi.org/10.1097/JTO.0b013e31826baf83>

15. Tsao M.S., Hirsch F.R., Yatabe Y. IASLC atlas of ALK and ROS1 testing in lung cancer. Aurora (Colorado). – Aurora, CO, USA: International Association for the Study of Lung Cancer, 2016. <https://www.iaslc.org/research-education/publications-resources-guidelines/iaslc-atlas-alk-and-ros1-testing-lung-cancer>

16. Lindeman N.I., Cagle P.T., Aisner D.L., Arcila M.E., Beasley M.B., Bernicker E.H., Colasacco C., Dacic S., Hirsch F.R., Kerr K., Kwiatkowski D.J., Ladanyi M., Nowak J.A., Sholl L., Temple-Smolkin R., Solomon B., Souter L.H., Thunnissen E., Tsao M.S., Ventura C. B., Wynes M.W., Yatabe Y. Updated molecular testing guideline for the selection of lung cancer patients for treatment with targeted tyrosine kinase inhibitors: guideline from the College of American Pathologists, the International Association for the Study of Lung Cancer, and the Association for Molecular Pathology // Arch. Pathol. Lab. Med. – 2018. – Vol. 142 (3). – P. 321-346. <https://doi.org/10.5858/arpa.2017-0388-CP>

17. Naidoo J., Drilon A. Molecular diagnostic testing in non-small cell lung cancer // Am. J. Hematol. Oncol. – 2014. – Vol. 10 (4). – P. 4-11. [https://gotoper.com.s3.amazonaws.com/\\_media/\\_pdf/AJHO14Sept\\_01\\_NSCLC.pdf](https://gotoper.com.s3.amazonaws.com/_media/_pdf/AJHO14Sept_01_NSCLC.pdf)

18. Программа RUSSCO «Совершенствование молекулярно-генетической диагностики в Российской Федерации». Практическое руководство для врачей. – 54 с. [Programma RUSSCO «Sovershenstvovanie molekulyarno-geneticheskoy diagnostiki v Rossijskoj Federacii». Prakticheskoe rukovodstvo dlya vrachej. – 54 s. (in Russ.)]. <http://cancergenome.ru/materials/guide.pdf>. 06.06.2023

19. Roche. Roche launches first in vitro diagnostic IHC test to detect ROS1 protein in cancers. <https://diagnostics.roche.com/nl/en/news-listing/2019/roche-launches-first-in-vitro-diagnostic-ihc-test-to-detect-ros1-protein-in-cancers.html>. 29.05.2023.

20. Cha Y.J., Lee J.S., Kim H.R., Lim S.M., Cho B.C., Lee C.Y., Shim H.S. Screening of ROS1 rearrangements in lung adenocarcinoma by immunohistochemistry and comparison with ALK rearrangements // PLoS One. – 2014. – Vol. 9 (7). – P. e103333. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103333>

21. Shan, L., Lian, F., Guo, L., Qiu, T., Ling, Y., Ying, J., Lin, D. Detection of ROS1 gene rearrangement in lung adenocarcinoma: comparison of IHC, FISH and real-time RT-PCR // PLoS One. – 2015. – T. 10. – №. 3. – P. e0120422. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120422>

22. Boyle, T. A., Masago, K., Ellison, K. E., Yatabe, Y., Hirsch, F. R. Ros1 immunohistochemistry among major genotypes of Non-Small-Cell lung cancer // Clin. Lung Cancer. – 2015. – T. 16. – №. 2. – P. 106-111. <https://doi.org/10.1016/j.clcc.2014.10.003>

23. Shaw A.T., Ou S.H.I., Bang Y.J., Camidge D.R., Solomon B.J., Salgia R., Riely G.J., Varela-Garcia M., Shapiro G.I., Costa D.B., Doebele R.C., Le L.P., Zheng Z., Tan W., Stephenson P., Shreeve S.M., Tye L.M., Christensen J.G., Wilner K.D., Clark J.W., Iafrate A.J. Crizotinib in ROS1-rearranged non-small-cell lung cancer // New Engl. J. Med. – 2014. – Vol. 371 (21). – P. 1963-1971. <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/nejmoa1406766>

24. Mazières J., Zalcmán G., Crinò L., Biondani P., Barlesi F., Filleron T., Dingemans A.C., Léna H., Monnet I., Rothschild S.I., Cappuzzo F., Besse B., Thiberville L., Rouvière D., Dziadziuszko R., Smit E.F., Wolf J., Spirig C., Pecuchet N., Leenders F., Heuckkann J.M., Diebold J., Milia J.D., Thomas R.K., Gautschi O. Crizotinib therapy for advanced lung adenocarcinoma and a ROS1 rearrangement: results from the EUROS1 cohort // J. Clin. Oncol. – 2015. – Vol. 3(9). <https://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.2014.58.3302>

## АНДАТПА

# ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫНДА ROS1 ТЕСТІЛЕУІН ЕНГІЗУ АРҚЫЛЫ ҰСАҚ ЖАСУШАЛЫ ЕМЕС ӨКПЕНІ ҚАТЕРЛІ ІСІГІ БАР НАУҚАСТАРДЫ МОЛЕКУЛАЛЫҚ-ГЕНЕТИКАЛЫҚ ДИАГНОСТИКАЛАУ ӘДІСТЕРІН ОҢТАЙЛАНДЫРУ

О.В. Шатковская<sup>1</sup>, Д.Р. Қайдарова<sup>1</sup>, М.Г. Оразғалиева<sup>1</sup>, Э.Б. Сатбаева<sup>1,2</sup>, С.О. Осикбаева<sup>1</sup>, А. Б. Койшыбаева<sup>1</sup>

<sup>1</sup>«Қазақ онкология және радиология ғылыми-зерттеу институты» АҚ, Алматы, Қазақстан Республикасы;

<sup>2</sup>«Алматы онкология орталығы» ШЖҚ КМК, Алматы, Қазақстан Республикасы

**Өзектілігі:** Қазіргі уақытта Қазақстанда ұсақ жасушалы емес өкпенің қатерлі ісігінің (ҰЖЕӨҚІ) молекулярлық диагностикасы EGFR, ALK-дағы драйверлік мутациялардың мәртебесін және PD-L1 мәртебесін, бірақ та ROS1 емес, анықтауды қамтиды, ол осы драйверлік мутацияға оң нәтиже берген пациенттердің өмірлік маңызды терапияны алу мүмкіндігін шектейді.

**Зерттеудің мақсаты** – Қазақстан Республикасында ROS1 тестілеуін енгізу арқылы ҰЖЕӨҚІ бар науқастардың молекулалық-генетикалық диагностикасының әдістерін оңтайландыру.

**Әдістері:** ҰЖЕӨҚІ бар науқастардың 10% буферленген формалинге салынған биопсиялық және операциялық материал зерттелді. Аденокарциноманың бастапқы патологиялық диагностикасынан кейін, EGFR және ALK мутациясының күйін анықтағаннан кейін, EGFR және ALK теріс мәртебесі бар ісік үлгілері ROS1 мутациясының мәртебесін әрі қарай анықтау үшін жіберілді. Определение статуса мутации ROS1 мутациясының мәртебесін анықтау екі әдіспен жүргізілді: Бірінші әдіс – Ventana BenchMark Ultra платформасында ROS1 антиденесін (SP283) және OptiView DAB Detection Kit визуализация жүйесін пайдалана отырып, иммуногистохимиялық талдау (ИГХ). ИГХ нәтижелері бойынша оң және күмәнді нәтижелері бар үлгілер ROS1 мутациясының мәртебесін растау сияқты екінші әдіс үшін кері транскриптазасы бар полимеразды тізбекті реакцияға (КТ-ПТР) жіберілді.

**Нәтижелері:** 01.01.2022 бастап 30.09.2022 дейін ИГХ әдісімен EGFR-теріс және ALK-теріс өкпе аденокарциномасы бар науқастардан алынған жалпы 99 ісік үлгілері зерттелді. ИГХ-бойынша нәтижелері былайша бағаланды: 0 (теріс) – 59 үлгі, 1+ (теріс) – 25 үлгі, 2+ (күмәнді) – 12 үлгі, 3+ (оң) – 3 үлгі. ≥70% иммундық бояуы бар жағдайлар оң деп саналды. 2+ (күмәнді), 3+ (оң) және 1+ бірнеше үлгілер ИГХ бояуын бағалауы бар үлгілер ПТР-тестілеумен растауға жіберілді.

КТ-ПТР бойынша барлығы 22 үлгі тексерілді, нәтижесі келесідей бағаланды: 1 (4%) – оң, 13 (59%) – теріс, 8 (37%) – сәйкес емес. **Қорытынды:** ИГХ арқылы ROS1 мутациясының мәртебесін анықтау көптеген оң және күмәнді нәтижелерге әкелді, ал кейінгі КТ-ПТР тестілеуі кезінде сәйкес емес нәтижелердің үлкен бөлігі орын алды. Әрі қарай елдік деңгейде талдау жүргізу үшін ROS1 анықтау әдісін таңдаған кезде, енгізлетін әдістердің экономикалық шығындық құрамын бағалау керек, сондай-ақ FISH стандартты валидацияланған әдістемен салыстыру қажет.

**Түйінді сөздер:** ROS1 молекулалық-генетикалық диагностикасы, өкпенің қатерлі ісігі, ұсақ жасушалы емес өкпенің қатерлі ісігі (ҰЖЕӨҚІ), иммуногистохимия (ИГХ), кері транскриптазасы бар полимеразды тізбекті реакция (КТ-ПТР), in situ флуоресцентті гибридизациясы (FISH).

**ABSTRACT**

## OPTIMIZATION OF MOLECULAR GENETIC DIAGNOSTICS OF PATIENTS WITH ADVANCED NON-SMALL CELL LUNG CANCER BY INTRODUCING ROS1 TESTING IN THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN

*O.V. Shatkovskaya<sup>1</sup>, D.R. Kaidarova<sup>1</sup>, M.G. Orazgaliyeva<sup>1</sup>, E.B. Satbayeva<sup>1,2</sup>, S.O. Ossikbayeva<sup>1</sup>, A.B. Koishibaeva<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>«Kazakh Institute of Oncology and Radiology» JSC, Almaty, the Republic of Kazakhstan;

<sup>2</sup>«Almaty oncological center» MSE on REM, Almaty, the Republic of Kazakhstan

**Relevance:** Currently, molecular diagnosis in NSCLC in Kazakhstan includes detection of EGFR, ALK driver mutations status, and PD-L1 status, but not ROS1, what limits the access of patients with this driver mutation to vital therapy.

**The study aimed to optimize the methods of molecular genetic diagnosis of patients with NSCLC by introducing ROS1 testing in the Republic of Kazakhstan.**

**Methods:** The biopsy and surgical material of non-small cell lung cancer (NSCLC) fixed in 10% buffered formalin was studied. After the initial morphological diagnosis of adenocarcinoma, EGFR, and ALK mutation status determination, EGFR, and ALK-negative tumor assays were sent for further determination of ROS1 mutation status. First, we performed immunohistochemistry (IHC) using the Ventana BenchMark Ultra platform using the ROS1 antibody (SP283) and the OptiView DAB Detection Kit imaging system. After that, samples with positive and doubtful IHC results were sent for RT-PCR (reverse transcriptase polymerase chain reaction) to confirm the ROS1 mutation status.

**Results:** A total of 99 tumor samples from patients with EGFR-negative and ALK-negative lung adenocarcinoma were studied by IHC from January 01 till September 30, 2022. The results of IHC staining were assessed as: 0 (negative) – 59 samples, 1+ (negative) – 25 samples, 2+ (doubtful) – 12 samples, 3+ (positive) – 3 samples. Cases with  $\geq 70\%$  immunostaining were considered positive. Samples with an IHC stain score of 2+ (doubtful), 3+ (positive), and a few samples of 1+ were sent for confirmation by PCR.

Overall, 22 samples were tested using RT-PCR, and results were considered as follows: 1 (4%) – positive, 13 (59%) – negative, 8 (37%) – invalid.

**Conclusion:** A large proportion of positive and questionable results were obtained when determining ROS1 mutation status using IHC, and a large proportion of invalid results during subsequent RT-PCR testing. Choosing methods for nationwide ROS1 implementation, one should evaluate the economics of the methods to be implemented and compare them with a standard validated FISH method.

**Keywords:** ROS1 molecular genetic diagnostics, lung cancer (LC), non-small cell lung cancer (NSCLC), immunohistochemistry (IHC), reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR), fluorescence in situ hybridization (FISH).

**Прозрачность исследования:** Авторы несут полную ответственность за содержание данной статьи.

**Конфликт интересов:** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Финансирование:** Данное исследование было проведено при поддержке медицинского гранта от компании Pfizer No. 68702093.

Спонсор не имел никакой роли в дизайне и исполнении исследования, сборе данных, управлении, анализе и интерпретации, создании научной статьи, рецензии и одобрении, решении подачи статьи на публикацию.

**Благодарность:** Авторы выражают благодарность за помощь в интерпретации результатов ИГХ д.м.н., профессору Завалишиной Л.Э. (РМАНПО, г. Москва) и к.м.н. Артемьевой А.С. (НИИО им. Петрова, Санкт-Петербурга).

**Вклад авторов:** вклад в концепцию – Кайдарова Д.Р.; научный дизайн – Сатбаева Э.Б., Оразгалиева М.Г.; исполнение заявленного научного исследования – Сатбаева Э.Б., Оразгалиева М.Г., Осикбаева С.О., Койшыбаева А.Б.; интерпретация заявленного научного исследования – Сатбаева Э.Б., Оразгалиева М.Г.; создание научной статьи – Шатковская О.В.

**Сведения об авторах:**

**Шатковская Оксана Владимировна (корреспондирующий автор)** – MD, MBA, Заместитель Председателя Правления по научно-стратегической работе АО «Казахский научно-исследовательский институт онкологии и радиологии», Алматы, Республика Казахстан, тел. +77014147124, e-mail: 1972arty@mail.ru, ORCID ID: 0000-0001-6085-2780;

**Кайдарова Дильяра Радиковна** – д.м.н., профессор, академик НАН РК, Председатель Правления АО «Казахский научно-исследовательский институт онкологии и радиологии», Алматы, Республика Казахстан, тел. +77017116593, e-mail: dilyara.kaidarova@gmail.com, ORCID ID: 0000-0002-0969-5983;

**Оразгалиева Мадина Гиниятовна** – к.б.н., руководитель Центра молекулярно-генетических исследований АО «Казахский научно-исследовательский институт онкологии и радиологии», Алматы, Республика Казахстан, тел. +77070375682, e-mail: madina259@mail.ru, ORCID ID: 0000-0001-8191-2068;

**Сатбаева Эльвира Болатовна** – к.м.н., заведующая лабораторией ИГХ и МГ диагностики КГП на ПХВ «Алматинский онкологический центр», Алматы, Республика Казахстан; врач патологоанатом Центра морфологических исследований АО «Казахский научно-исследовательский институт онкологии и радиологии», Алматы, Республика Казахстан, тел. +77078083810, e-mail: somaka@mail.ru, ORCID ID: 0000-0002-1420-7486;

**Осикбаева Саняа Омирхановна** – PhD, специалист Центра молекулярно-генетических исследований АО «Казахский научно-исследовательский институт онкологии и радиологии», Алматы, Республика Казахстан, тел. +77023367405, e-mail: omirhanovna86@gmail.com, ORCID ID: 0000-0003-1420-7486;

**Койшыбаева Аида Бескеновна** – старший лаборант Центра морфологических исследований АО «Казахский научно-исследовательский институт онкологии и радиологии», Алматы, Республика Казахстан, тел. +7717893477, e-mail: akoyshibaeva@mail.ru, ORCID ID: 0009-0005-0037-1850.

**Адрес для корреспонденции:** Шатковская О.В., АО «Казахский научно-исследовательский институт онкологии и радиологии», пр. Абая 91, г. Алматы 050000, Республика Казахстан.