

В.И. Тюрин<sup>1</sup>, С.Н. Алексахина<sup>1</sup>, А.А. Анускина<sup>1,2</sup>, А.Г. Иевлева<sup>1,2</sup>, Н.В. Митюшкина<sup>1</sup>,  
Е.В. Преображенская<sup>1</sup>, А.А. Романько<sup>1,2</sup>, А.П. Соколенко<sup>1,2</sup>, Е.Д. Харитонов<sup>4</sup>, А.В. Того<sup>1</sup>,  
Е.Ш. Кулигина<sup>1</sup>, Е.Н. Имянитов<sup>1,2,3</sup>

## Использование комбинированного подхода на основе полимеразной цепной реакции для выявления транслокаций генов *ALK*, *ROS1*, *RET* в опухолях лёгкого

<sup>1</sup> ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России, Санкт-Петербург

<sup>2</sup> ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Минздрава России

<sup>3</sup> ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова» Минздрава России, Санкт-Петербург

<sup>4</sup> Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова МО РФ, Санкт-Петербург

Открытие повторяющихся мутаций *EGFR* и перестроек генов *ALK*, *ROS1* вместе с разработкой эффективных таргетных препаратов стало настоящим прорывом в терапии опухолей лёгкого. Молекулярная диагностика повреждений этих генов уже стала неотъемлемой частью обследования пациентов с немелкоклеточным раком легкого.

В работе представлен комбинированный диагностический подход, который позволяет не только выявлять известные химерные транскрипты, но и также идентифицировать новые варианты транслокаций. С помощью этой методики было выявлено восемь транслокаций, не описанных ранее в научной литературе.

Проанализирован спектр транслокаций рецепторных тирозинкиназ *ALK*, *ROS1*, *RET* в российской популяции, что представляется актуальным в связи с известной этнической и географической гетерогенностью рака лёгкого.

**Ключевые слова:** молекулярная диагностика, рак лёгкого, транслокации, *ALK*, *ROS1*, *RET*

### Введение

Рак лёгкого (РЛ) является одним из самых распространённых злокачественных новообразований (1 место у РМЖ) и занимает первое место в структуре онкологической смертности у мужчин. В мире ежегодно регистрируют 2,1 млн. новых случаев РЛ; 1,8 млн. человек погибает от этого заболевания [1]. В Российской Федерации ежегодно выявляется ~60 тыс. новых случаев РЛ; смертность составляет ~50 тыс. [2].

В клинической практике и научных исследованиях РЛ делят на немелкоклеточный (НМРЛ) (80–85% случаев) и мелкоклеточный (МРЛ)

(10–15% случаев) типы. МРЛ характеризуется быстрым ростом первичного очага и ранним метастазированием, что практически исключает возможность использования хирургических методов лечения.

В последние годы некоторого повышения эффективности лечения в лекарственной терапии МРЛ удалось добиться использованием иммунотерапии с блокаторами PD-L1 (атезолизумаб, дурвалумаб) [3, 4].

При НМРЛ опухолевый процесс также характеризуется весьма агрессивным течением, однако в отношении этой разновидности опухолей лёгкого существует большее разнообразие терапевтических подходов.

Появление в 2003 г. первых таргетных анти-EGFR препаратов (гефитиниба и эрлотиниба) кардинально изменило подход к системной терапии распространённого НМРЛ. На сегодня таргетная терапия одобрена Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (Food and Drug Administration – FDA) для опухолей лёгкого, несущих генетические изменения в следующих онкогенах: *EGFR*, *ALK*, *ROS1*, *RET*, *BRAF*, *KRAS*, *NTRK1,2,3*. Препараты для остальных потенциальных мишеней (*MET*, *HER2*) находятся в активной фазе клинических исследований [5]. В нашей стране согласно клиническим рекомендациям на 2021 г. от Ассоциации онкологов России и Российского общества клинической онкологии одобрены следующие таргетные препараты для лечения НМРЛ: анти-EGFR (гефитиниб, эрлотиниб, афатиниб, осимертиниб), анти-ALK (кризотиниб, церитиниб, алектиниб), анти-ROS1 (кризотиниб), анти-BRAF/MEK (дабрафениб и траметиниб).

Характерной чертой опухолей лёгкого, ассоциированных с транслокациями рецепторных тирозинкиназ (*ALK*, *ROS1*, *RET*), является их

преимущественное развитие у некурящих пациентов молодого возраста [6].

Встречаемость транслокаций гена *ALK*, по обобщённым данным, составляет около 5% среди НМРЛ [5], однако разброс значений в разных исследованиях варьирует от 3 до 13%, что связано с особенностями анализируемых выборок и популяционными различиями [7, 8]. Перестройки *ROS1*, *RET* встречаются ещё реже: в европейской популяции около 1–2%, а в азиатских странах до 2–3% [6, 7, 9].

Особенностью транслокаций, ассоциированных с РЛ, является наличие большого количества вариантов, что значительно усложняет скрининговую диагностику такими методами, как ПЦР. Несмотря на разнообразие существующих подходов к детекции транслокаций: [флуоресцентная гибридизация *in situ* (FISH), иммуногистохимические исследования (ИГХ), полимеразная цепная реакция (ПЦР), секвенирование нового поколения (NGS)] – ни один из методов не является оптимальным по сочетанию чувствительности, простоты исполнения и стоимости.

В настоящей работе представлен комбинированный подход для молекулярной диагностики химерных транскриптов, ассоциированных с НМРЛ. Данная методика была использована для анализа спектра транслокаций рецепторных тирозинкиназ *ALK*, *ROS1*, *RET* в российской популяции.

## Материалы и методы

В исследование было включено 1000 последовательных случаев НМРЛ (преимущественно аденокарцином), для которых были получены образцы комплементарной ДНК (кДНК) удовлетворительного качества. Основные клинико-анамнестические характеристики изучаемой группы отражены в табл. 1.

Таблица 1. Клиническая характеристика больных НМРЛ

	Число пациентов (доля)
Возраст:	
Медиана (диапазон)	63 (20–86)
≤40	31 (31,0%)
41–50	102 (10,2%)
51–60	277 (27,7%)
61–70	429 (42,9%)
>70	134 (13,4%)
Неизвестно	27 (2,7%)
Пол:	
Мужчины	666 (66,6%)
Женщины	334 (33,4%)
Статус курения:	
Курящие	304 (30,4%)
Некурящие	336 (33,6%)
Неизвестно	360 (36,0%)
Всего:	1000 (100%)

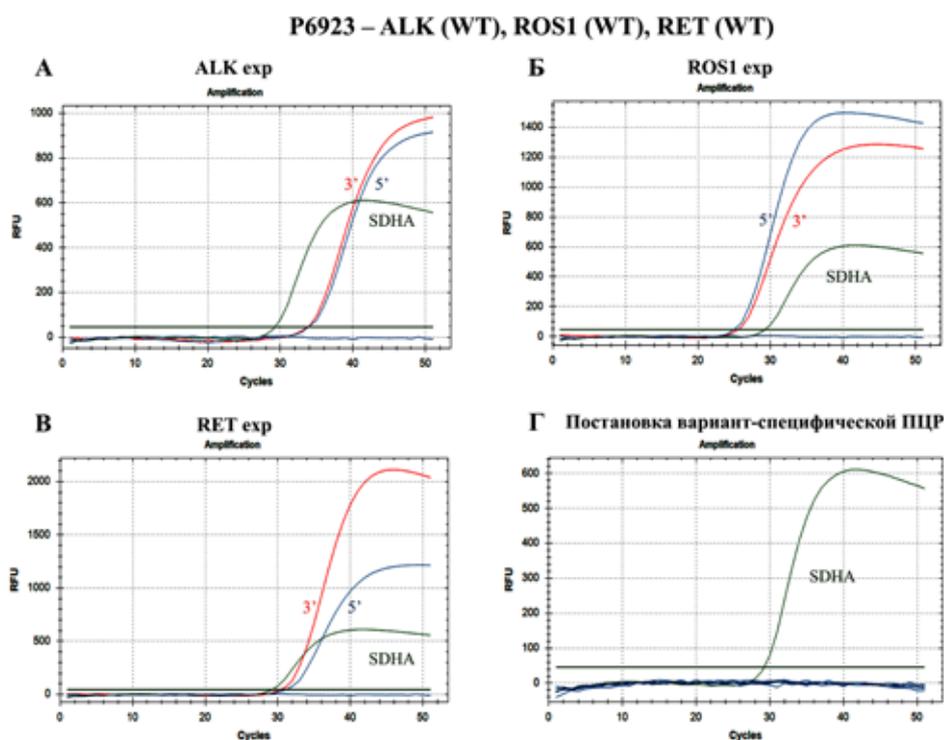


Рис. 1. Пример образца, негативного в отношении транслокаций *ALK*, *ROS1*, *RET*.

А – кривые амплификации фрагментов 5'- и 3'-концевых участков гена *ALK* одновременно достигают порогового уровня: нет несбалансированной экспрессии; Б – кривые амплификации фрагментов 5'- и 3'-концевых участков гена *ROS1* одновременно достигают порогового уровня: нет несбалансированной экспрессии; В – кривые амплификации фрагментов 5'- и 3'-концевых участков гена *RET* одновременно достигают порогового уровня: нет несбалансированной экспрессии; Г – отсутствие кривых амплификации фрагментов, специфичных для известных вариантов транслокаций. *SDHA* – ген-рефери

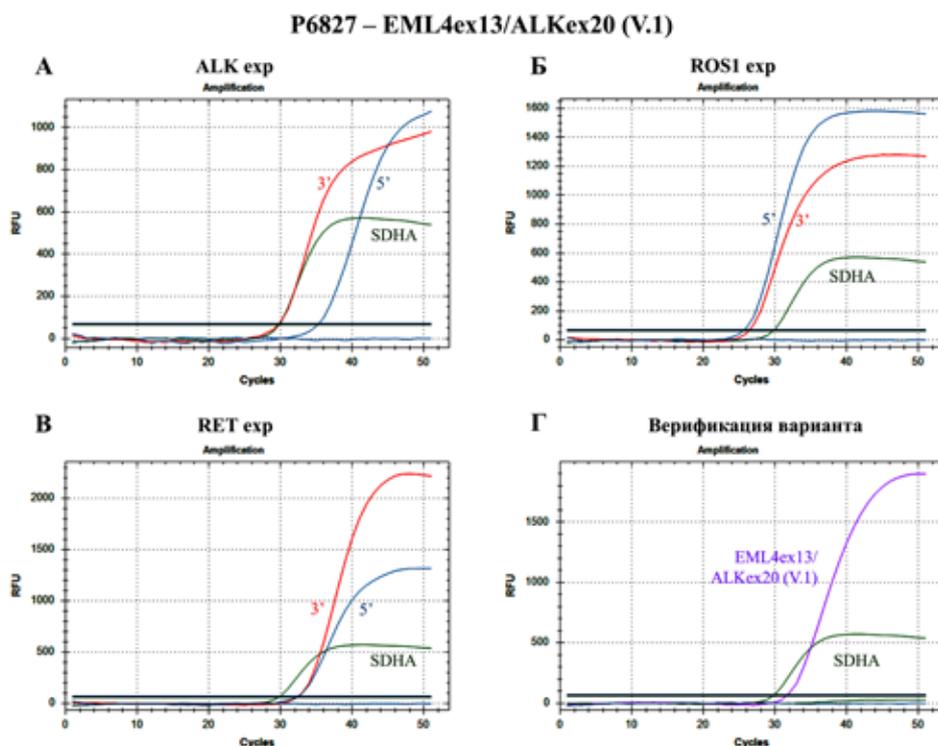


Рис. 2. Пример образца с транслокацией ALK.

А – отличие в динамике амплификации фрагментов 5'- и 3'-концевых участков гена ALK: наблюдается гиперэкспрессия 3'-концевого участка; Б – кривые амплификации фрагментов 5'- и 3'-концевых участков гена ROS1 одновременно достигают порогового уровня: нет несбалансированной экспрессии; В – кривые амплификации фрагментов 5'- и 3'-концевых участков гена RET одновременно достигают порогового уровня: нет несбалансированной экспрессии; Г – специфическая амплификация фрагмента, соответствующего одному из вариантов перестройки ALK. SDHA – ген-рефери

Архивные образцы опухолевых тканей подвергались ручной микродиссекции и стандартной процедуре экстракции нуклеиновых кислот [10]. РНК использовалась в реакции обратной транскрипции с использованием случайных декамеров и ген-специфических праймеров для получения кДНК.

**Комбинированный подход к детекции перестроек.** Предлагаемый подход к тестированию транслокаций заключается в последовательном использовании двух методик, основанных на полимеразной цепной реакции (ПЦР):

1) оценки несбалансированной экспрессии концевых 5'- и 3'-концевых фрагментов соответствующего гена тирозинкиназы ( $\Delta Ct$ ), позволяющей выявить подозрительные на присутствие перестройки образцы;

2) постановки вариант-специфической ПЦР с целью идентификации известных вариантов транслокаций.

Оценка уровня несбалансированности экспрессии концевых фрагментов гена ( $\Delta Ct$ ) определялась по формуле:  $\Delta Ct = Ct_{5'} - Ct_{3'}$ , где  $Ct_{5'}$  – величина порогового цикла 5'-фрагмента исследуемого гена,  $Ct_{3'}$  – величина порогового цикла 3'-фрагмента исследуемого гена.

Если экспрессия киназной 3'-порции гена намного превышает экспрессию 5'-участка, то можно предполагать наличие транслокации. Образцы считались подозрительными на наличие транслокации, если разница в экспрессии ( $\Delta Ct$ ) преодолевали пороговое значение, а 3'-фрагмент исследуемого гена экспрессировался, как правило, раньше или на уровне гена-рефери SDHA. К негативным случаям относились образцы, у которых не наблюдалась несбалансированная экспрессия 3'-фрагмента или вообще отсутствовала экспрессия концевых фрагментов исследуемого гена.

На рис. 1–2 представлены примеры образцов со сбалансированной и несбалансированной экспрессией. Образцы с несбалансированной экспрессией далее подвергались вариант-специфической ПЦР, как описано Iyevleva AG и соавт. [11], и/или таргетному РНК-секвенированию.

**Таргетное РНК-секвенирование.** Образцы, продемонстрировавшие выраженную несбалансированную экспрессию и не содержащие известные химерные транскрипты, были подвергнуты высокопроизводительному анализу методом NGS с использованием панели для таргетного РНК-секвенирования «TruSight RNA Fusion Panel» (Illumina). Панель позволяет идентифицировать перестройки с вовлечением 16 генов, кодирующих тирозинкиназы (ALK, EGFR, ERBB3, CSF1R, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4, FLT3, NTRK1, NTRK2, NTRK3, PDGFRA, PDGFRB, RET, ROS1). Для биоинформатического анализа использовано программное обеспечение Illumina RNA-Sequencing Alignment software (V.2.0.0) и STAR-Fusion pipeline (V.1.4.0). Все обнаруженные транслокации также верифицировались секвенированием по Сэнгеру.

**Статистический анализ.** Статистическая обработка данных проводилась с использованием свободной среды RStudio для работы с языком программирования R. Для анализа применялись следующие статистические критерии: критерий Шапиро–Уилка для проверки исследуемых распределений на нормальность, критерий Манна–Уитни для анализа различий в распределении групп пациентов по возрасту U, точный критерий Фишера для сравнения статуса курения между группами пациентов, а также для оценки распределения пациентов по полу. Везде, где это представлялось возможным, был использован двухсторонний вариант критерия.

## Результаты

Коллекция из 1000 образцов НМРЛ была протестирована на предмет присутствия несбалансированной экспрессии 5' и 3'- концевых фрагментов для всех трёх генов (ALK, ROS1, RET).

Далее, все образцы были проанализированы на наличие основных вариантов *ALK*-транслокации (с помощью вариант-специфической ПЦР). Известные варианты перестроек *ROS1* проанализированы в 440 образцах, а варианты транслокаций *RET* – в 37 образцах. Результаты молекулярного анализа отражены в табл. 2–4.

Образцы опухолей молодых некурящих пациентов, в которых не были выявлены известные повторяющиеся транслокации, но с выраженной несбалансированной экспрессией концевых фрагментов или гиперэкспрессией исследуемого гена относительно гена-рефери, были подвергнуты таргетному РНК-секвенированию. В 15 отобранных случаях было выявлено 6 новых перестроек, ранее не описанных в научной литературе: *EML4ex21/ALKex20*; *EML4ex13/ALKex3-*

*ALKex20*; *UBCex1/ALKex18*; *CD74ex6/ROS1ex35*; *ACTBex6/ROS1ex35*; *EML4ex15/GOLGA3ex9*.

Ещё 2 случая с ранее не описанными вариантами перестройки *ALK* (*EML4ex6/ALKex19* и *EML4ex19/ALKex20*) были выявлены в результате секвенирования по Сэнгеру образцов, которые продемонстрировали промежуточный результат в вариант-специфической ПЦР.

*Спектр транслокаций ALK и клинические ассоциации.* В проанализированной коллекции был обнаружен 61 случай (6,1%) транслокаций. Спектр выявленных вариантов перестройки *ALK* и их соотношение представлены на рис. 3. Наиболее встречаемыми оказались варианты *EML4ex13/ALKex20* (V.1), *EML4ex6/ALKex20* (V.3), *EML4ex20/ALKex20* (V.2), *EML4ex18/ALKex20* (V.9) – на них пришлось 92% всех

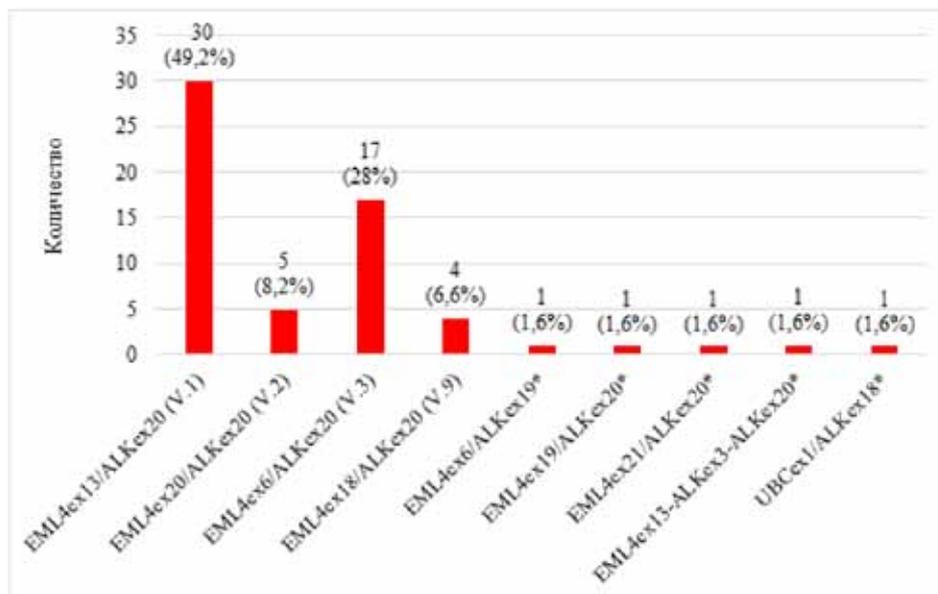


Рис. 3. Спектр выявленных вариантов *ALK*-транслокаций; звездочки – ранее не описанные варианты

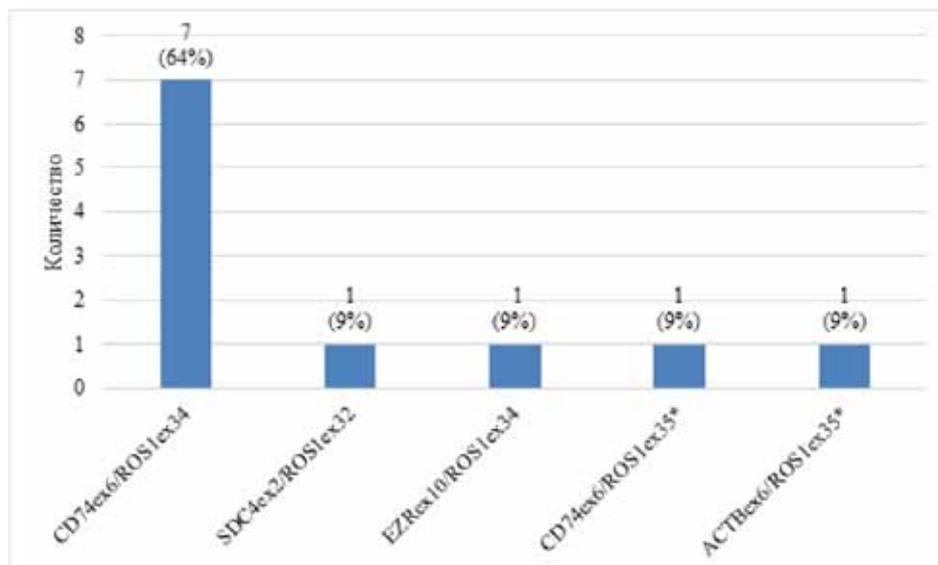


Рис.4. Спектр выявленных вариантов *ROS1*-транслокаций; звездочки – ранее не описанные варианты

случаев. Сопоставление клинических характеристик у пациентов, в опухолях которых были обнаружены химерные транскрипты *ALK*, представлены в табл. 2. Так, медиана возраста пациентов с транслокациями достоверно отличалась от таковой у больных без перестроек (58 лет vs. 63 года,  $p=0,007$ ; U-критерий Манна–Уитни). Транслокации достоверно чаще обнаруживались у женщин (38/334 [11,4%] у женщин vs. 23/666 [3,5%] у мужчин,  $p=0,000002$ , точный критерий Фишера).

Статус курения был известен для 640 образцов. Среди них у курильщиков было обнаружено 12 (3,9%) *ALK*-позитивных случаев, в то время как у некурящих пациентов – 30 (8,9%) ( $p=0,0226$ , точный критерий Фишера).

Таким образом, эти результаты подтверждают известные ассоциации перестроек гена *ALK*

с молодым возрастом, женским полом и некурящим статусом.

*Спектр транслокаций ROS1 и клинические ассоциации.* Транслокации гена *ROS1* были обнаружены в 11 из 440 (2,5%) образцов, протестированных на известные варианты перестроек. Спектр обнаруженных химерных транскриптов *ROS1* представлен на рис. 4. Самым частым вариантом был *CD74ex6/ROS1ex34* – на него пришлось 64% всех позитивных случаев. Другие 4 варианта, в том числе 2 ранее не описанных, встретились единожды.

В табл. 3 представлены клинические характеристики *ROS1*-позитивных и негативных случаев. Пациенты с *ROS1*-транслокациями были достоверно моложе (медиана – 48 лет), чем пациенты без транслокаций (медиана – 63 года) ( $p=0,0225$ , U-критерий Манна–Уитни).

**Таблица 2. Клиническая характеристика *ALK*-позитивных и негативных случаев**

	ALK-транслокация		p-уровень значимости
	Присутствует	Отсутствует	
Возраст:			
Медиана (диапазон)	58 (35–77)	63 (20–86)	
≤40	6 (19,4%)	25 (80,6%)	p=0,007, U-критерий Манна–Уитни
41–50	9 (8,8%)	93 (91,2%)	
51–60	22 (7,9%)	255 (92,1%)	
61–70	15 (3,5%)	414 (96,5%)	
>70	7 (5,2%)	127 (94,8%)	
Неизвестно	2 (7,4%)	25 (92,6%)	
Пол:			
Мужчины	23 (3,5%)	643 (96,5%)	p=0,000002 точный критерий Фишера
Женщины	38 (11,4%)	296 (88,6%)	
Статус курения:			
Курящие	12 (3,9%)	292 (96,1%)	p=0,0226, точный критерий Фишера
Некурящие	30 (8,9%)	306 (91,1%)	
Неизвестно	19 (5,3%)	341 (94,7%)	
Всего:	61 (6,1%)	939 (93,9%)	

**Таблица 3. Клиническая характеристика *ROS1*-позитивных и негативных случаев**

	ROS1-транслокация		p-уровень значимости
	Присутствует	Отсутствует	
Возраст:			
Медиана (диапазон)	48 (28–71)	63 (20–82)	
≤40	2 (14,3%)	12 (85,7%)	p=0,0225, U-критерий Манна–Уитни
41–50	4 (8,9%)	41 (91,1%)	
51–60	0 (0%)	112 (100%)	
61–70	2 (1%)	198 (99%)	
>70	1 (2,2%)	45 (97,8%)	
Неизвестно	2 (8,7%)	21 (91,3%)	
Пол:			
Мужчины	2 (0,7%)	302 (99,3%)	p=0,0006, точный критерий Фишера
Женщины	9 (6,6%)	127 (93,4%)	
Статус курения:			
Курящие	1 (0,8%)	126 (99,2%)	p=0,12, точный критерий Фишера
Некурящие	6 (4,5%)	127 (95,5%)	
Неизвестно	4 (2,2%)	176 (97,8%)	
Всего:	11 (2,5%)	438 (97,5%)	

Таблица 4. Клиническая характеристика *RET*-положительных и отрицательных случаев

	RET-транслокация		p-уровень значимости
	Присутствует	Отсутствует	
Возраст:			
Медиана (диапазон)	64 (41–76)	62,5 (20–86)	
≤40	0 (0%)	31 (100%)	p=0,4, U-критерий Манна–Уитни
41–50	1 (0,98%)	101 (99,02%)	
51–60	2 (0,7%)	275 (99,3%)	
61–70	6 (1,4%)	423 (98,6%)	
>70	2 (1,5%)	132 (98,5%)	
Неизвестно	0 (0%)	27 (100%)	
Пол:			
Мужчины	3 (0,5%)	663 (99,5%)	p=0,009, точный критерий Фишера
Женщины	8 (2,4%)	326 (97,6%)	
Статус курения:			
Курящие	1 (0,3%)	303 (99,7%)	p=0,6 точный критерий Фишера
Некурящие	3 (0,9%)	333 (99,1%)	
Неизвестно	7 (1,9%)	353 (98,1%)	
Всего:	11 (1,1%)	989 (98,9%)	

Наибольшая доля *ROS1*-положительных случаев приходилась на женщин — 81,8% (9 из 11). Частота перестройки *ROS1* у женщин (6,6%) была практически в 10 раз выше, чем у мужчин (0,7%) (p=0,0006, точный критерий Фишера).

Среди исследованных образцов с известным статусом курения, только у 7 была обнаружена *ROS1*-транслокация: 6 случаев приходилось на некурящих и 1 случай — на курящего пациента (p=0,1206, точный критерий Фишера).

*Спектр транслокаций RET и клинические ассоциации.* Среди проанализированных образцов было выявлено 11 *RET*-положительных случаев (1,1%). 10 из них были представлены единственным вариантом *KIF5Bex15/RETex12* (91%), один — *CCDC6ex1/RETex12* (9%).

Различие в возрасте между пациентами с транслокациями и без оказалось статистически недостоверным (p=0,4, U-критерий Манна–Уитни, табл. 4). Частота перестроек у женщин была достоверно выше, чем у пациентов мужского пола (p=0,009, точный критерий Фишера).

Не удалось установить статистически достоверной связи между статусом курения пациента и присутствием перестройки *RET* (p=0,6, точный критерий Фишера), что, вероятно, связано с отсутствием информации о статусе курения для значительной части образцов.

Подробная клиническая характеристика *RET*-положительных и отрицательных случаев представлена в табл. 4.

### Обсуждение

В работе представлен комбинированный подход, основанный на последовательном исполь-

зовании двух методик – оценки несбалансированной экспрессии концевых фрагментов гена, вовлеченного в перестройку, и вариант-специфической ПЦР, который позволяет выполнять эффективную диагностику РЛ-ассоциированных *ALK*- и *RET*-транслокаций. Отметим, что для выявления перестроек *ROS1* метод оценки несбалансированной экспрессии может оказаться недостаточно информативным из-за высокого уровня эндогенной экспрессии этого гена в ткани лёгкого; для диагностики *ROS1*-транслокаций в опухолях лёгкого предпочтительнее использовать вариант-специфическую ПЦР.

Для идентификации ранее неизвестных вариантов транслокаций мы использовали сочетание анализа несбалансированной экспрессии концевых фрагментов перестраиваемого гена с последующим высокопроизводительным секвенированием (NGS) или секвенированием по Сэнгеру. В данном исследовании мы обнаружили 8 новых вариантов перестроек, проанализировав 15 образцов с несбалансированной экспрессией и отсутствием частых вариантов: *EML4ex6/ALKex19*; *EML4ex19/ALKex20*; *EML4ex21/ALKex20*; *EML4ex13/ALKex3-ALKex20*; *UBCex1/ALKex18*; *CD74ex6/ROS1ex35*; *ACTBex6/ROS1ex35*; *EML4ex15/GOLGA3ex9*.

Частота транслокаций с участием генов *ALK*, *ROS1* и *RET* при аденокарциномах лёгкого составила 6,1%, 2,5% и 1,1% соответственно, что соответствует литературным данным относительно встречаемости этих повреждений в НМРЛ [12].

Используя предложенный подход для молекулярно-генетической диагностики перестроек генов *ALK*, *ROS1*, *RET*, мы изучили их спектр в опухолях лёгких российских пациентов. Более

90% всех перестроек *ALK* может быть выявлено с помощью вариант-специфической ПЦР на четыре наиболее часто встречающихся варианта: *EML4ex13/ALKex20 (V.1)*: 49,2%; *EML4ex6/ALKex20 (V.3)*: 28,0%; *EML4ex20/ALKex20 (V.2)*: 8,2%; *EML4ex18/ALKex20 (V.9)*: 6,6%. Еще пять повторяющихся вариантов обнаруживались с частотой 1,6% (*EML4ex6/ALKex19*; *EML4ex19/ALKex20*; *EML4ex2/ALKex20*; *EML4ex13/ALKex3-ALKex20*; *UBCex1/ALKex18*), составляя суммарно 8% *ALK*-позитивных случаев. Вариант *CD74ex6/ROS1ex34* составляет 64% перестроек гена *ROS1*; ещё по 9% транслокаций гена *ROS1* приходится на варианты *SDC4ex2/ROS1ex32*; *EZRex10/ROS1ex34*; *CD74ex6/ROS1ex35* и *ACT-Bex6/ROS1ex35*. Спектр выявленных вариантов *RET*-транслокаций ограничился двумя транскриптами: 91% случаев представлено вариантом *KIF5Bex15/RETex12*, а 9% транслокаций приходится на *CCDC6ex1/RETex12*.

У российских пациенток с РЛ мы подтвердили известные ассоциации наличия перестроек *ALK*, *ROS1*, *RET* с женским полом, *ALK*, *ROS1* – молодым возрастом, *ALK* – отрицательным статусом курения [13].

Таким образом, последовательное сочетание методов оценки несбалансированной экспрессии 5'- и 3'-концевых участков генов *ALK*, *ROS1*, *RET* с последующей вариант-специфической ПЦР и/или таргетным секвенированием РНК позволяет эффективно осуществлять молекулярно-генетическую диагностику повреждений этих генов.

#### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии в статье конфликта интересов.

#### Финансирование

Исследование поддержано грантом Российского научного фонда № 18-75-10070.

#### ЛИТЕРАТУРА

- Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries // *CA Cancer J Clin*. 2018;68(6):394–424. doi:10.3322/caac.21492
- Мерабишвили В.М., Арсеньев А.И., Тарков С.А. и др. Заболеваемость и смертность населения от рака легкого, достоверность учета // *Сибирский онкологический журнал*. 2018;17 (6):15–26. doi:10.21294/1814-4861-2018-17-6-15-26 [Merabishvili VM, Arseniev AI, Tarkov SA et al. Lung cancer morbidity and mortality // *Siberian Journal of Oncology*. 2018;17(6):15–26 (In Russ.)]. doi:10.21294/1814-4861-2018-17-6-15-26
- Carter BW, Glisson BS, Truong MT et al. Small cell lung carcinoma: staging, imaging, and treatment considerations // *Radiographics*. 2014;34(6):1707–1721. doi:10.1148/rg.346140178
- Horn L, Mansfield AS, Szczesna A et al. First-Line Atezolizumab plus Chemotherapy in Extensive-Stage Small-Cell Lung Cancer // *N Engl J Med*. 2018;379(23):2220–2229. doi:10.1056/NEJMoa1809064
- Yoda S, Dagogo-Jack I, Hata AN. Targeting oncogenic drivers in lung cancer: Recent progress, current challenges and future opportunities // *Pharmacol Ther*. 2019;193:20–30. doi:10.1016/j.pharmthera.2018.08.007
- Takeuchi K, Soda M, Togashi Y et al. RET, ROS1 and ALK fusions in lung cancer // *Nat Med*. 2012;18(3):378–381. doi:10.1038/nm.2658
- Kohno T, Nakaoku T, Tsuta K et al. Beyond ALK-RET, ROS1 and other oncogene fusions in lung cancer // *Transl Lung Cancer Res*. 2015;4(2):156–64. doi:10.3978/j.issn.2218-6751.2014.11.11
- Woo CG, Seo S, Kim SW et al. Differential protein stability and clinical responses of EML4-ALK fusion variants to various ALK inhibitors in advanced ALK-rearranged non-small cell lung cancer // *Ann Oncol*. 2017;28(4):791–797. doi:10.1093/annonc/mdw693
- Pao W, Miller V, Zakowski M et al. EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from «never smokers» and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib // *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004;101(36):13306–11. doi:10.1073/pnas.0405220101
- Chomczynski P, Sacchi N. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on // *Nat Protoc*. 2006;1(2):581–585. doi:10.1038/nprot.2006.83
- Iyevleva AG, Raskin GA, Tiurin VI et al. Novel ALK fusion partners in lung cancer // *Cancer Lett*. 2015;362(1):116–121. doi:10.1016/j.canlet.2015.03.028
- Devarakonda S, Morgensztern D, Govindan R. Genomic alterations in lung adenocarcinoma // *Lancet Oncol*. 2015;16:E342–51. doi:10.1016/S1470-2045(15)00077-7
- Demidova I, Grinevich V, Avdalian A et al. Detection of ALK rearrangements in 4002 Russian patients: The utility of different diagnostic approaches // *Lung Cancer*. 2017;103:17–23. doi:10.1016/j.lungcan.2016.11.001

Поступила в редакцию 27.04.2022 г.

V.I. Tiurin<sup>1</sup>, S.N. Aleksakhina<sup>1,2</sup>, A.A. Anuskina<sup>1</sup>,  
A.G. Iyevleva<sup>1,2</sup>, N.V. Mitiushkina<sup>1</sup>,  
E.V. Preobrazhenskaya<sup>1</sup>, A.A. Romanko<sup>1,2</sup>,  
A.P. Sokolenko<sup>1,2</sup>, E.D. Kharitonova<sup>4</sup>, A.V. Togo<sup>1</sup>,  
E.S. Kuligina<sup>1,2</sup>, E.N. Imyanitov<sup>1,2,3</sup>

#### Combined PCR-based approach for analysis of *ALK*, *ROS1*, *RET* translocations in lung cancers

<sup>1</sup> NMRC of Oncology named after N.N. Petrov, Saint Petersburg, Russia

<sup>2</sup> St. Petersburg State Pediatric Medical University, Russia

<sup>3</sup> North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, Saint Petersburg, Russia

<sup>4</sup> S.M. Kirov Military Medical Academy, Saint Petersburg, Russia

The discovery of recurrent *EGFR* mutations, *ALK* and *ROS1* translocations, together with the development of effective targeted drugs, has become a real breakthrough in the

treatment of lung cancer. Molecular diagnosis of alteration in these genes has already become a mandatory part of evaluating patients with non-small cell lung cancer.

The paper presents a combined diagnostic approach, which allows the identification of known chimeric transcripts and new variants of translocations. Using this technique, we identified eight fusions that had not been previously described in the literature.

Here, we analyze the spectrum of translocations of receptor tyrosine kinases *ALK*, *ROS1*, *RET* in the Russian population, which seems relevant in connection with the known ethnic and geographic heterogeneity of lung cancer.

**Key words:** molecular diagnostics, lung cancer, translocation, *ALK*, *RET*, *ROS1*

### Сведения об авторах

*Тюрин Владислав Ильич*, канд. мед. наук, врач лабораторный генетик, лаборатория молекулярно-генетической диагностики, ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России, 197758, Санкт-Петербург, п. Песочный, ул. Ленинградская, 68, tyurinvladislav@gmail.com.

*Алексахина Светлана Николаевна*, канд. биол. наук, научный сотрудник, научная лаборатория молекулярной онкологии, ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России, 197758, Санкт-Петербург, п. Песочный, ул. Ленинградская, 68, abyshevasv@gmail.com

*Анускина Александра Алексеевна*, лаборант, лаборатория молекулярно-генетической диагностики, ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России, 197758, Санкт-Петербург, п. Песочный, ул. Ленинградская, 68, asokolova98@gmail.com

*Иевлева Аглая Геннадьевна*, канд. мед. наук, старший научный сотрудник, научная лаборатория молекулярной онкологии, ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России, 197758, Санкт-Петербург, п. Песочный, ул. Ленинградская, 68, ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Минздрава России, 194100, Санкт-Петербург, ул. Литовская, 2, aglayai@inbox.ru

*Митюшкина Наталья Владимировна*, канд. биол. наук, научный сотрудник, научная лаборатория молекулярной онкологии, ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России, 197758, Санкт-Петербург, п. Песочный, ул. Ленинградская, 68, nmmail@inbox.ru

*Преображенская Елена Васильевна*, научный сотрудник, научная лаборатория молекулярной онкологии, ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России, 197758, Санкт-Петербург, п. Песочный, ул. Ленинградская, 68, chekmarevaev@mail.ru

*Романько Александр Андреевич*, лаборант-исследователь, научная лаборатория молекулярной онкологии, ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России, 197758, Санкт-Петербург, п. Песочный, ул. Ленинградская, 68, ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Минздрава России, 194100, Санкт-Петербург, ул. Литовская, 2, romancko.aleksandr.a@gmail.com

*Соколенко Анна Петровна*, канд. мед. наук, старший научный сотрудник, научная лаборатория молекулярной онкологии, ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России, 197758, Санкт-Петербург, п. Песочный, ул. Ленинградская, 68, ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Минздрава России, 194100, Санкт-Петербург, ул. Литовская, 2, annasokolenko@mail.ru

*Харитоновна Елена Дмитриевна*, ординатор, Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова МО РФ, 194044, Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, 6, e.d.kharitonova@gmail.com

*Того Александр Викторович*, канд. биол. наук, ведущий научный сотрудник, научная лаборатория молекулярной онкологии, ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России, 197758, Санкт-Петербург, п. Песочный, ул. Ленинградская, 68, a\_togo@mail.ru

*Кулигина Екатерина Шотовна*, канд. биол. наук, старший научный сотрудник, научная лаборатория молекулярной онкологии, ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России, 197758, Санкт-Петербург, п. Песочный, ул. Ленинградская, 68, kate.kuligina@gmail.com

*Имянитов Евгений Наумович*, доктор мед. наук, чл.-корр. РАН, профессор, заведующий отделом биологии опухолевого роста, ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России, 197758, Санкт-Петербург, п. Песочный, ул. Ленинградская, 68, ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Минздрава России, 194100, Санкт-Петербург, ул. Литовская, 2, ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова» Минздрава России, 195067, Санкт-Петербург, Пискаревский пр., 47, evgeny@imyunitov.spb.ru

*Tiurin Vladislav*, Ph.D. in medical science, doctor of laboratory diagnostics, Laboratory of Molecular-Genetic Diagnostics, N.N. Petrov National Medicine Research Center of Oncology, 68 Leningradskaya str., Saint Petersburg, 197758, Russia, tyurinvladislav@gmail.com

*Aleksakhina Svetlana*, Ph.D. in biology, stuff researcher, Laboratory of Molecular Oncology, N.N. Petrov National Medicine Research Center of Oncology, 68 Leningradskaya str., Saint Petersburg, 197758, Russia, abyshevasv@gmail.com

*Anuskina Alexandra*, laboratory assistant, Laboratory of Molecular Oncology, N.N. Petrov National Medicine Research Center of Oncology, 68 Leningradskaya str., Saint Petersburg, 197758, Russia, asokolova98@gmail.com

*Iyevleva Aglaya*, Ph.D. in medical science, senior stuff researcher, Laboratory of Molecular Oncology, N.N. Petrov National Medicine Research Center of Oncology, 68 Leningradskaya str., Saint Petersburg, 197758, Russia, Saint Petersburg State Pediatric Medical University, 2 Litovskaya str., Saint Petersburg, 194100, Russia, aglayai@inbox.ru

*Mitiushkina Natalia*, Ph.D. in biology, stuff researcher, Laboratory of Molecular Oncology, N.N. Petrov National Medicine Research Center of oncology, 68 Leningradskaya str., Saint Petersburg, 197758, Russia, nmmail@inbox.ru

*Preobrazhenskaya Elena*, stuff researcher, Laboratory of Molecular Oncology, N.N. Petrov National Medicine Research Center of Oncology, 68 Leningradskaya str., Saint Petersburg, 197758, Russia, chekmarevaev@mail.ru

*Romanko Alexandr*, laboratory assistant, Laboratory of Molecular Oncology, N.N. Petrov National Medicine Research Center of Oncology, 68 Leningradskaya str., Saint Petersburg, 197758, Russia, Saint Petersburg State Pediatric Medical University, 2 Litovskaya str., Saint Petersburg, 194100, Russia, romanko.aleksandr.a@gmail.com

*Sokolenko Anna*, Ph.D. in medical science, senior stuff researcher, Laboratory of Molecular Oncology, N.N. Petrov National Medicine Research Center of Oncology, 68 Leningradskaya str., Saint Petersburg, 197758, Russia, Saint Petersburg State Pediatric Medical University, 2 Litovskaya str., Saint Petersburg, 194100, Russia, annasokolenko@mail.ru

*Kharitonova Elena*, intern at the S.M. Kirov Military Medical Academy, 6 Akademika Lebedeva str., Saint Petersburg, 194044, Russia, e.d.kharitonova@gmail.com

*Togo Alexandr*, Ph.D. in biology, leading researcher, Laboratory of Molecular Oncology, N.N. Petrov National Medicine Research Center of Oncology, 68 Leningradskaya str., Saint Petersburg, 197758, Russia, a\_togo@mail.ru

*Kuligina Ekaterina*, Ph.D. in biology, senior stuff researcher, Laboratory of Molecular Oncology, N.N. Petrov National Medicine Research Center of Oncology. 197758, Russia, Saint Petersburg, Leningradskaya Ulitsa, 68. kate.kuligina@gmail.com

*Imyanitov Evgeny*, Ph.D. in medical science, Professor, Head of the Department of the Tumor Growth. N.N. Petrov National Medicine Research Center of Oncology, 68 Leningradskaya str., Saint Petersburg, 197758, Russia, Saint Petersburg State Pediatric Medical University, 2 Litovskaya str., Saint Petersburg, 194100, Russia, The North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, 47 Piskarovskiy Ave, Saint Petersburg, 195067, Russia, evgeny@imyanitov.spb.ru