

УДК 575:599.9

©Коллектив авторов

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОМАТИЧЕСКИХ МУТАЦИЙ В ГЕНЕ *EGFR* В ТКАНЯХ И ПЛАЗМЕ БОЛЬНЫХ НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНЫМ РАКОМ ЛЁГКОГО

О.И. Бровкина^{1*}, М.Г. Гордиев², А.Н. Тороповский³, Д.С. Ходырев¹, Р.Ф. Еникеев²,
О.А. Гусев^{4,5}, Л.Х. Шигапова⁴, А.Г. Никитин¹

¹Федеральный научно-клинический центр специализированных видов
медицинской помощи и медицинских технологий,
115682, Москва, Ореховый бульвар, 28; тел.: (499)725-26-91; эл. почта: brov.olia@gmail.com

²Республиканский клинический онкологический диспансер, Казань

³ООО "ТестГен", Ульяновск

⁴Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань

⁵RIKEN, Йокогама, Япония

Мутации в гене *EGFR* влияют на пролиферацию клеток, ангиогенез и способность немелкоклеточного рака лёгких (НМРЛ) к метастазированию, а также на выбор лекарственной терапии. Для таргетной терапии, проводимой с использованием ингибиторов тирозинкиназы, необходимо предварительное генетическое тестирование больных НМРЛ. Цель данной работы состояла в разработке диагностической тест-системы для быстрого и экономичного анализа мутаций в гене *EGFR* на основе метода ПЦР в реальном времени с использованием парафиновых блоков и плазмы крови. Проведена сравнительная оценка диагностических характеристик ПЦР в реальном времени с блокированием нуклеотидной последовательности дикого типа и цифровой ПЦР. В исследование включены 156 пациентов с аденокарциномой лёгкого различной степени дифференцировки. Разработан простой и производительный метод выявления с помощью ПЦР в реальном времени активирующей мутации L858R и делеций del19 гена *EGFR* в ДНК, выделенной из парафиновых блоков или плазмы крови. Тест-система валидирована на 411 образцах парафиновых блоков. Предложенная система показала высокую эффективность анализа ДНК из парафиновых блоков: конкордантность с результатами анализа, проведённого с помощью набора Therascreen® *EGFR* RGQ PCR Kit ("Qiagen", Германия), составила 100%. Показана возможность использования данной тест-системы для выявления мутаций в плазме крови.

Ключевые слова: ген *EGFR*, активирующие мутации, ПЦР в реальном времени, немелкоклеточный рак лёгкого, плазма крови

DOI 10.18097/PBMC20166206638

ВВЕДЕНИЕ

Ген *EGFR* кодирует рецептор эпидермального фактора роста (EGF) – трансмембранный гликопротеин, входящий в семейство рецепторных тирозинкиназ. *EGFR* влияет на ангиогенез, пролиферацию и увеличение метастатической активности клеток [1, 2]. Наличие ряда мутаций в гене *EGFR* приводит к димеризации рецептора, автофосфорилированию его внутриклеточного тирозинкиназного домена и активации сигнальных путей протеинкиназ MAPK и PI3K/Akt [3]. Фосфорилированные белки, в свою очередь, активируют факторы транскрипции, регулирующие синтез мРНК и белков [4]. Большинство соматических мутаций гена *EGFR*, обнаруживаемых у больных немелкоклеточным раком лёгкого (НМРЛ), локализованы в экзонах 18-21, кодирующих тирозинкиназный домен [5, 6]. Наибольший интерес вызывают мутации, связанные с чувствительностью к ингибиторам тирозинкиназы (ИТК): делеции в экзоне 19 (del19), которые могут иметь различный размер [3], и замена L858R в экзоне 21 [7, 8], а также мутации, связанные с устойчивостью к ИТК, например, мутация T790M в экзоне 20 [7-9].

Одним из первых методов определения соматических мутаций в гене *EGFR* было секвенирование по Сэнгеру, которое предполагало анализ всей кодирующей области [10]. Однако этот метод имеет низкую чувствительность (около 20% содержания мутантной ДНК в образце), поэтому были разработаны более чувствительные способы, основанные на прямом анализе мутаций и делеций гена *EGFR* [11, 12]. Современные методы анализа соматических мутаций представляют собой либо таргетное секвенирование генов, либо полногеномное/полноэкзомное секвенирование [13, 14]. Однако это дорогостоящие методы, а существующие тест-системы российских производителей не адаптированы к рутинному использованию в клиничко-диагностических учреждениях.

Также следует отметить, что в молекулярно-генетических исследованиях используют преимущественно ДНК, выделенную непосредственно из опухолевой ткани. И если операционный материал обычно доступен для анализа (хотя детекция мутаций в парафинизированных образцах фиксированного в формалине биопсийного материала (FFPE-блоки) требует особых подходов [16]), то при распространённом процессе, прогрессирующем

заболевания или утрате блоков существуют серьезные трудности с получением биопсийного материала [10]. Поскольку опухоль часто является гетерогенной и имеет различные молекулярно-генетические профили [17, 18], проанализировать данные показатели в ткани не представляется возможным. Поэтому наиболее перспективным представляется определение содержания маркеров циркулирующей в плазме крови опухолевой ДНК (цДНК) [16, 19]. За счёт лизиса опухолевых клеток количество цДНК в плазме увеличивается, особенно существенно это происходит на поздних стадиях заболевания. На ранних стадиях количество клеток с мутациями не так велико, поэтому необходимо использовать достаточно чувствительные методы [20]. С этой целью можно использовать избирательное выявление мутантного аллеля методами цифровой ПЦР, либо подавление амплификации последовательностей дикого типа при проведении ПЦР в реальном времени [21].

Цель данной работы состояла в разработке диагностической тест-системы на основе метода ПЦР в реальном времени для проведения быстрого и экономичного анализа мутаций *EGFR*, валидации тест-системы на материале, полученном от пациентов сНМРЛ, а также в оценке диагностических возможностей ПЦР в реальном времени с блокированием нуклеотидной последовательности дикого типа и цифровой ПЦР для анализа мутаций в плазме крови.

МЕТОДИКА

Работа выполнена в соответствии с требованиями GCP (Good Clinical Practice) и Хельсинкской декларации по защите прав человека.

Анализировали образцы аденокарциномы лёгкого различной степени дифференцировки, полученные от 156 пациентов, проходивших обследование и лечение в Республиканском клиническом онкологическом диспансере Министерства здравоохранения Республики Татарстан в 2012-2015 г.г. и давших информированное согласие на использование их биологических образцов. У 36 из них были доступны не только парафиновые блоки, но и образцы плазмы.

ДНК выделяли с помощью QIAamp DNA FFPE Tissue Kit ("Qiagen", Германия) согласно инструкции компании-производителя (для парафиновых блоков использовали четыре среза толщиной 10 мкм) или с помощью набора реагентов QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit (использовали 1 мл плазмы).

В качестве положительного контроля использовали стандартные плазмиды, содержащие мутации. Искусственно синтезированные фрагменты ДНК размером 300 п.н., содержащие мутацию, встраивали в вектор pAL-TA. Плазмиды со вставкой произведены ЗАО "Евроген" (Россия). Концентрацию определяли с помощью метода стандартных разведений, используя геномную ДНК Jurkat Genomic DNA ("ThermoFisher", США) в качестве референсной. Итоговая концентрация положительных контролей

составляла 5000 копий/мкл. Содержание мутантной ДНК варьировало от 0 до 10%.

Анализ мутаций EGFR с помощью ПЦР в реальном времени.

Мы разрабатывали тест-систему с использованием технологии на основе разрушаемых олигонуклеотидных зондов, которая позволяет добиться высокой чувствительности и специфичности. В FFPE-блоках определяли активирующие мутации L858R и del19. Список определяемых делеций представлен в таблице 1.

ПЦР в реальном времени проводили с использованием термоциклера "StepOnePlus" или "ABI 7500" ("Applied Biosystems", США). Смесь для ПЦР готовили в 20 мкл реакционной смеси следующего состава: 70 мМ Трис-НCl, pH 8,8, 16,6 мМ сульфат аммония, 0,01% Твин-20, 2 мМ хлорид магния, 200 нМ каждого dNTP, 500 нМ праймеров, 250 нМ флуоресцентных зондов, 1,5 ед. HS-Taq-ДНК-полимеразы ("Евроген"). Условия амплификации фрагментов ДНК: 95°C/2 мин – 1-й цикл; 94°C/10 с, 62°C/60 – 60 циклов; в зонды вводили флуоресцентные красители – FAM и VIC, тушители флуоресценции – BHQ-1 и BHQ-2. Комплекты олигонуклеотидов были разработаны "Тестген" (Россия), произведены "ДНК-Синтез" (Россия). ПЦР с мутантной ДНК и ДНК дикого типа проводили в одной пробирке. Последовательности праймеров и зондов для ПЦР представлены в таблице 2.

Полученные данные сравнивали с результатами ПЦР, проведённой с помощью набора theascreen® *EGFR* RGQ PCR Kit ("Qiagen") по стандартной методике производителя.

Валидацию тест-системы осуществляли на 411 образцах FFPE-блоков на базе молекулярно-диагностической лаборатории Республиканского клинического онкологического диспансера (г. Казань), являющейся референсной лабораторией Привожского федерального округа.

Определение мутаций в плазме крови

В плазме определяли мутации L858R, del19. Для получения плазмы кровь (6-10 мл) отбирали в пробирку с ЭДТА или ЦФДА, затем центрифугировали (10-15 мин, 2000-3000 g), после чего отбирали верхний слой плазмы. Плазму центрифугировали в течение 15 мин при 13000 g, затем вновь отбирали верхний слой в отдельную пробирку.

Количественное содержание цДНК и процентное содержание в ней мутантной цДНК оценивали с помощью метода стандартных разведений.

Мутации в гене *EGFR* определяли методами цифровой ПЦР и ПЦР в реальном времени с блокированием последовательности дикого типа.

Для цифровой ПЦР использовали систему "QuantStudio® 3D Digital PCR System" ("Applied Biosystems"). ПЦР-смесь готовили с помощью "3D Digital PCR Master Mix", согласно инструкции производителя, конечные концентрации праймеров

Таблица 1. Набор делеций, определяемых с помощью предложенной экспериментальной тест-системы и с помощью набора therascreen® EGFR RGQ PCR Kit с указанием ID делеции

Экспериментальная тест-система	therascreen® EGFR RGQ PCR Kit*	COSMIC ID**
2235_2249del15	2235_2249del15	6223
2235_2252>AAT (complex)	2235_2252>AAT (complex)	13551
2236_2253del18	2236_2253del18	12728
2237_2251del15	2237_2251del15	12678
2237_2254del18	2237_2254del18	12367
2237_2255>T (complex)	2237_2255>T (complex)	12384
2236_2250del15	2236_2250del15	6225
2238_2255del18	2238_2255del18	6220
2238_2248>GC (complex)	2238_2248>GC (complex)	12422
2238_2252>GCA (complex)	2238_2252>GCA (complex)	12419
2239_2247del9	2239_2247del9	6218
2239_2253del15	2239_2253del15	6254
2239_2256del18	2239_2256del18	6255
2239_2248TTAAGAGAAG>C	2239_2248TTAAGAGAAG>C	12382
2239_2258>CA (complex)	2239_2258>CA (complex)	12387
2240_2251del12	2240_2251del12	6210
2240_2257del18	2240_2257del18	12370
2240_2254del15	2240_2254del15	12369
2239_2251>C (complex)	2239_2251>C (complex)	12383
2236_2252>AT (complex)		26680
2236_2251>T (complex)		26513
2238_2252del15		23571
2237_2252>T (complex)		12386
2235_2255>GGT (complex)		85797
c.2235_2246del12		28517

Примечание: * - коммерческий набор для определения мутаций в гене EGFR фирмы “Qiagen”;
 ** - идентификационный номер мутации согласно международной базе соматических мутаций при раковых заболеваниях COSMIC.

Таблица 2. Нуклеотидные последовательности праймеров и зондов для определения мутаций гена EGFR методом ПЦР

Ген	Мутация	dbSNP*	Праймеры и зонды
EGFR	Leu858Arg	rs121434568	F, GAACGTAAGTGGTGAACA R, CTCCTTCTGCATGGTATTC FAM, GATTTTGGGCGGGCCAAA VIC, GATTTTGGGCTGGCCAAA Блокирующий олигонуклеотид: P-CACAGATTTTGGGCTGGCCAAACTGC-P
	del19	—	F, GTAACATCCACCCAGATC R, CAAAGCAGAACTCACAT EGFR-del-N-VIC, aagGaAtTaaGaGaaGcaac EGFR-del15-FAM, ctAtCaAnnnAtCtCcGaa EGFR-del15-FAM2, tCgCtAtCaAnnnAtCtCcGaAag EGFR-del18-FAM, ctatCaAnnnnnnGaAaGcc EGFR-del9-FAM, ctAtCaAnnnnnnCaAcAtct EGFR-del12-FAM, ctAtCaAnnnnnnAtCtccg Большие буквы в зондах – LNA n – 5'-нитроиндол Блокирующий олигонуклеотид: P-AAGGAATTAAGAGAAGCAAC-P

Примечание: * - идентификационный номер последовательности согласно международной базе данных NCBI.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОМАТИЧЕСКИХ МУТАЦИЙ *EGFR* БОЛЬНЫХ НМРЛ

и зондов составляли 900 нМ и 600 нМ соответственно. Условия амплификации фрагментов ДНК: 95°C/2 мин – 1-й цикл; 94°C/10 с, 60°C/90 с – 40 циклов.

Для ПЦР в реальном времени с блокированием последовательности дикого типа (PCR-clamp) использовали термоциклер “StepOnePlus” или “ABI 7500” (“Applied Biosystems”). ПЦР-смесь готовили в 20 мкл реакционной смеси следующего состава: 70 мМ Трис-НСl, рН 8,8, 16,6 мМ сульфат аммония, 0,01% Твин-20, 2 мМ хлорид магния, 200 нМ каждого dNTP, 500 нМ праймеров, 250 нМ флуоресцентных зондов, смесь ДНК-полимераз – 0,2 ед. HS-Taq и 10 ед. SNPdetect (“Евроген”) без 5'-экзонуклеазной активности. Условия амплификации фрагментов и олигонуклеотиды такие же, как в случае парафиновых блоков. Последовательности блокирующих зондов приведены в таблице 2. ПЦР с мутантной ДНК и ДНК дикого типа проводили в разных пробирках для зондов FAM и VIC, при этом ПЦР на мутантной ДНК проводили в трёх повторностях.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При разработке методик идентификации мутаций с помощью разрушаемых олигонуклеотидных зондов основной проблемой является неспецифичный отжиг зондов для мутации на нормальный аллель, что приводит к ложноположительным результатам. Для устранения этого необходимо выбирать наиболее короткие зонды и оптимизировать концентрацию олигонуклеотидов в смеси.

Характеристики метода флуоресцентной детекции ДНК определяли с использованием смеси праймеров и зондов для мутации L858R и делеций гена *EGFR*, а также различные концентрации положительных плазмидных контролей. В оптимизации добивались максимальной разницы в значениях C_t между реакцией с мутантным праймером на нормальной ДНК и реакцией с нормировочным геномным локусом. Концентрацию праймеров и зондов варьировали в диапазоне 100–1000 нМ с шагом 100 нМ для праймеров и 50–500 нМ с шагом 50 нМ для зондов. Аналогичные эксперименты проводили со всеми вариантами концентраций праймеров и зондов.

Оптимальная концентрация праймеров в реакционной смеси – 500 нМ, зондов – 200 нМ, температура отжига – 600°C.

Зонды подбирали так, чтобы обеспечить максимальную специфичность амплификации целевой последовательности. Таким образом, ПЦР с мутантной ДНК и ДНК дикого типа можно проводить в одной пробирке, что упрощает процедуру для рутинного использования в клинико-диагностических целях. При этом сигнал от аллелей дикого типа служит внутренним контролем в данной ПЦР, который позволяет оценить присутствие ингибиторов ПЦР в ДНК, выделенной из парафиновых блоков.

На рисунке 1 представлены кривые накопления сигнала флуоресценции в отсутствие мутации и в её присутствии. В отсутствии мутации

кривая остаётся на базовом уровне (отсутствие неспецифичного сигнала проверяли вплоть до концентрации 500 нг/реакцию). Таким образом, выбранные нами концентрации и температуры отжига зондов характеризуются 100% специфичностью к детектируемым образцам.

Полученные данные суммированы в таблице 3. Определённые значения параметров ПЦР позволяют сделать вывод о том, что все отобранные наборы праймеров и зондов могут использоваться для проведения анализа, имеют высокую эффективность и близкие к единице значения линейности реакции (R^2).

Таблица 3. Основные характеристики экспериментальной тест-системы, использованной для выявления мутаций в гене *EGFR*

Мутация	Эффективность %		Линейность (R^2)	
	норма	мутация	норма	мутация
L858R	90	74	0,9992	0,9971
del19	92	не менее 80	0,9976	не менее 0,9900

Эффективность амплификации с помощью различных комбинаций праймеров и зондов оценивали с использованием разведений контрольной плазмидной ДНК (количество копий: 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1). Воспроизводимости и чувствительности методики идентификации мутаций анализировали с помощью искусственных смесей контрольных плазмидных ДНК, содержащих 20%, 10%, 5% и 1% мутантного аллеля, с абсолютной концентрацией 200, 100, 50 и 10 копий мутантной ДНК на реакцию.

Показано, что методика детекции мутаций позволяет определить не менее 5% мутантной ДНК в образце (аналитическая чувствительность 50 копий ДНК на реакцию).

Значения порогового цикла для различных дублей одной и той же концентрации мутантной ДНК характеризуются незначительной вариабельностью: $C_t=23,66\pm0,22$ для 20% мутантной ДНК, $C_t=30,75\pm0,16$ для 5% мутантной ДНК.

Опытный образец тест-системы прошёл проверку на образцах крови здоровых доноров, показавшую отсутствие ложноположительных результатов.

Сравнение с результатами анализа, проведённого с помощью набора theascreen® *EGFR* RGQ PCR Kit (“Qiagen”) по стандартному протоколу производителя, показало 100% конкордантность двух методик.

Результаты валидации тест-системы представлены в таблице 4. Полученные данные совпадают с данными европейских исследовательских лабораторий [10, 15].

Таблица 4. Результаты проверки образцов на экспериментальной тест-системе

Всего образцов	Мутация L858R	Делеция del19
Разработка: 156	13 (8,3%)	22 (14,1%)
Валидация: 411	35 (8,5%)	60 (14,6%)

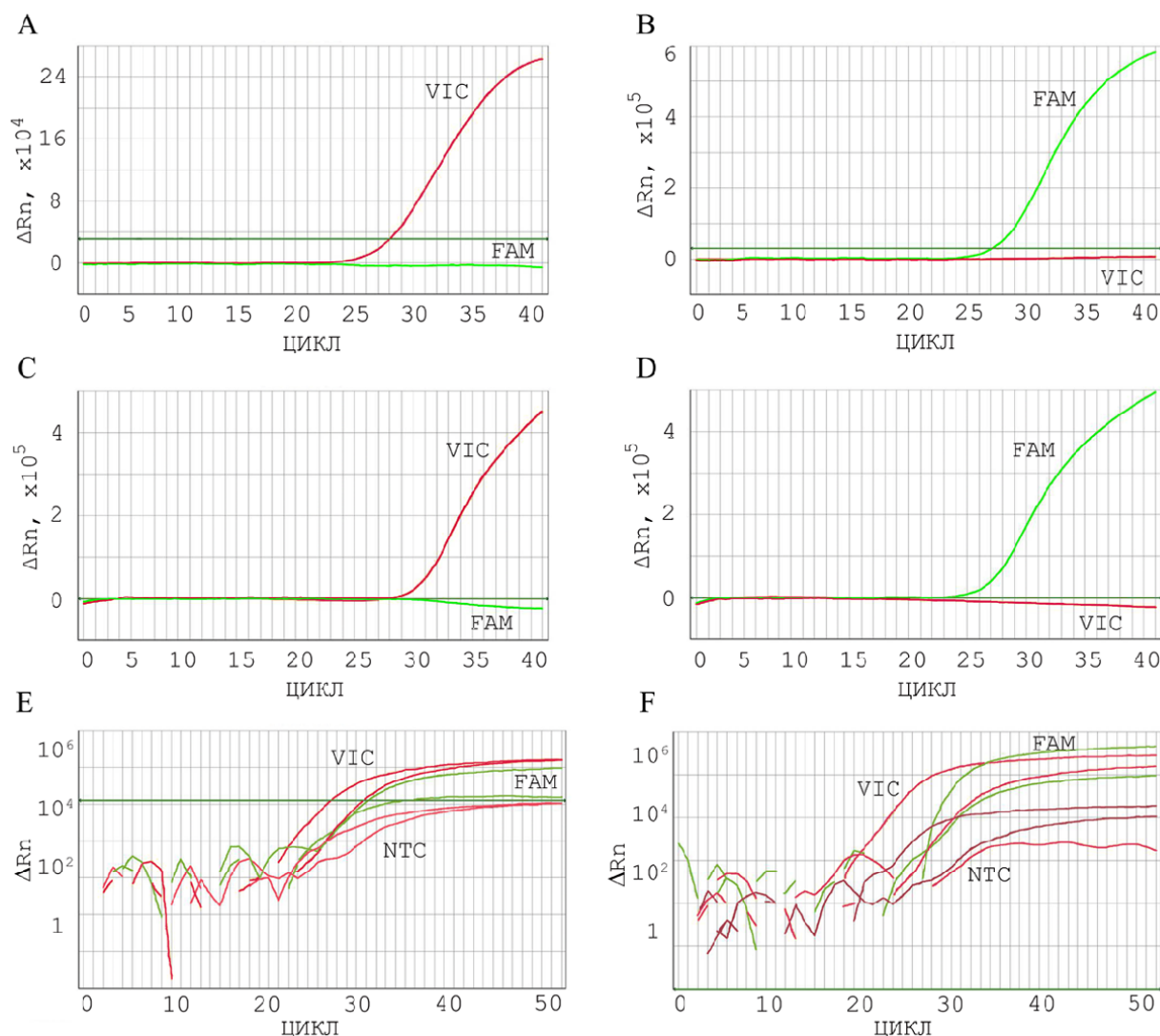


Рисунок 1. Кривые накопления флуоресценции без мутации L858R гена *EGFR* (А), с мутацией L858R гена *EGFR* (Б), без делеций в экзоне 19 гена *EGFR* (В) и с делецией 15 п.н. в этом экзоне (Г). Краситель FAM (светлая кривая) - сигнал мутации, краситель VIC (тёмная кривая) - сигнал нормы. Базовая концентрация образцов составляла 10000 копий/реакцию. Кривые накопления флуоресценции с мутацией L858R гена *EGFR* (Д) и ДНК с делецией 15 п.н. в экзоне 19 гена *EGFR* (Е) в концентрации 10% и 5%. Краситель FAM (светлая кривая) - сигнал мутации, краситель VIC (тёмная кривая) - сигнал нормы, кривая под пороговым уровнем - сигнал от пробы без мутации (NTC, 0%). Общая концентрация положительных контрольных образцов -- 5000 копий/реакцию.

Обнаружено совпадение типа мутаций, выявляемых в парафиновых блоках и в плазме крови. Сравнение статуса мутаций *EGFR* в плазме и образцах тканей показало конкордантность 88,7%, чувствительность – 83,3%, специфичность – 100%. Аналитическая чувствительность цифровой ПЦР составила 0,1%, аналитическая специфичность – 99,5%. Аналитическая чувствительность ПЦР в реальном времени составила 0,2%, аналитическая специфичность – 99,7% (табл. 5). Показана возможность надежной детекции сверхнизких концентраций цДНК с содержанием мутаций менее 1% (5-10 копий мутантного гена на реакцию) на фоне избытка ДНК дикого типа (соотношение мутантной ДНК и ДНК дикого типа равно 1:10000). Пример анализа образцов с помощью ПЦР в реальном времени и цифровой ПЦР представлен на рисунках 2-3.

Таблица 5. Сравнение характеристик ПЦР в реальном времени и цифровой ПЦР, использованных для анализа 36 образцов мутантной цДНК из плазмы крови

Метод	Чувствительность, %	Специфичность, %	Конкордантность, %
ПЦР в реальном времени	0,2	99,7	100
Цифровая ПЦР	0,1	99,5	

Таким образом, несмотря на более высокие аналитические характеристики цифровой ПЦР, полученные с применением плазмид в качестве положительного контроля, ПЦР в реальном времени с блокированием последовательностей дикого типа обладает сходными диагностическими характеристиками и может применяться для детекции мутаций в плазме крови.

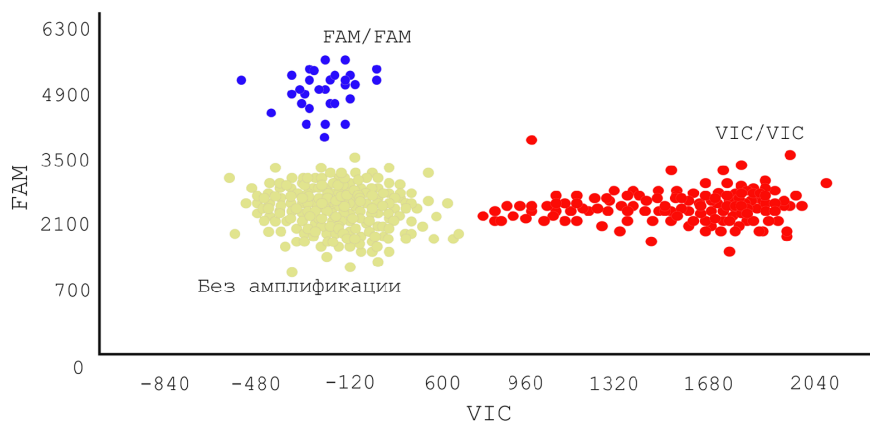


Рисунок 2. Распределение облаков цифровой ПЦР для ДНК дикого типа и с мутацией L858R гена *EGFR* (содержание мутации 10%, концентрация цДНК 300 ГЭ/реакцию).

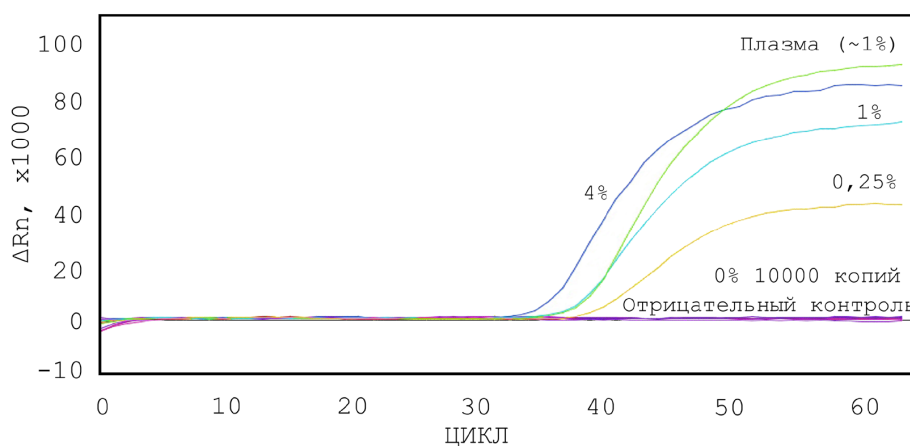


Рисунок 3. Кривые амплификации ДНК дикого типа и ДНК с мутацией L858R гена *EGFR* методом ПЦР в реальном времени (содержание мутации 1%, концентрация цДНК образца с мутацией 1000 геном-эквивалентов (ГЭ)/реакцию, образца без мутации 10000 ГЭ/реакцию, содержание мутации в плазмидных контролях 0,25, 1 и 4%).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработан простой и производительный метод выявления активирующих мутаций гена *EGFR* в ДНК, полученной из парафиновых блоков, с помощью ПЦР в реальном времени. Метод не требует предварительной количественной оценки содержания ДНК в образце, позволяет проводить реакцию в одной пробирке, общее время анализа не превышает 90 мин. На основе проведенных экспериментов создан опытный образец тест-системы, состоящий из контрольной смеси, смесей для мутаций L858R и делеций экзона 19 гена *EGFR*, положительного контрольного образца, Taq-полимеразы и деионизированной воды. Предложенная система показала высокую эффективность при анализе ДНК из парафиновых блоков, это в значительной степени обусловлено выбором коротких последовательностей зондов и оптимизированной концентрацией олигонуклеотидов в смеси. Таким образом, высокие показатели чувствительности, специфичности и воспроизводимости результатов позволяют рекомендовать данную методику для потокового скрининга в клиничко-диагностической лаборатории. Результаты валидации разработанной тест-системы не противоречат опубликованным данным о частотах встречаемости мутации L858R и делеций del19 [22, 23].

Показана принципиальная возможность выявления соматических мутаций в гене *EGFR* в образцах плазмы. Сравнение методов цифровой ПЦР и ПЦР “в реальном времени” с блокированием последовательностей дикого типа показывает 100% конкордантность получаемых результатов. Нами получены результаты, актуальные для надёжного и экономичного определения мутаций в плазме крови, поскольку в 2016 году были внесены изменения в инструкции по применению гефитиниба, позволяющие назначать терапию по данным определения цДНК в плазме [24]. Однако для валидации полученных результатов требуется проведение клинических испытаний.

ЛИТЕРАТУРА

1. Hirsch F., Varella-Garcia M., Cappuzzo F. et al. (2007) Ann. Oncol., **18**, 752-760.
2. Tomizawa Y., Iijima H., Sunaga N. et al. (2005) Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res., **11**, 6816-6822.
3. Емельянова М.А., Амосенко Ф.А., Семьянихина А.В. и др. (2015). Мол. биология, **49**, 617-627.
4. Шаназаров Н.А., Сабиров А.Х., Сироткина С.М. (2009) Российский биотерапевтический журнал, **8**, 85-90.
5. Brewer M.R., Yun C.-H., Lai D. et al. (2013) Proc. Natl. Acad. Sci., **110**, 604-638.

6. Kosaka T., Yamaki E., Mogi A., Kuwano H. (2011) J. Biomed. Biotechnol., **23**, 25-32.
7. Peng L., Song Z., Jiao S. (2015) OncoTargets Ther., **8**, 905-910.
8. Jackman D.M., Yeap B.Y., Sequist L.V. et al. (2006) Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res., **12**, 3908-3914.
9. Lynch T.J., Bell D.W., Sordella R. et al. (2004) N. Engl. J. Med., **350**, 2129-2139.
10. Gazdar A.F. (2009) Oncogene, **28**(Suppl 1), 24-31.
11. Politi K., Lynch T. (2012) Clin. Cancer Res., **18**, 1490-1492.
12. Pallis A.G., Fennell D.A., Szutowicz E. et al. (2011) Br. J. Cancer. **105**, 1-8.
13. Ikeda T., Nakamura Y., Yamaguchi H. et al. (2012) Clin. Lung Cancer. **13**, 369-374.
14. Jones S., Chen W., Parmigiani G. et al. (2008) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **105**, 4283-4288.
15. Bratman S.V., Newman A.M., Alizadeh A.A., Diehn M. (2015) Expert Rev. Mol. Diagn., **15**, 715-719.
16. Kapp J.R., Diss T., Spicer J. et al. (2014) J. Clin. Pathol., **68**, 111-118.
17. Sharma S.V., Bell D.W., Settleman J., Haber D.A. (2007) Nat. Rev. Cancer, **7**, 169-181.
18. Nagai Y., Miyazawa H., Huqun et al. (2005) Cancer Res., **65**, 7276-7282.
19. Heitzer E., Ulz P., Geigl J.B. (2015) Clin. Chem., **61**, 112-123.
20. Емельянова М.А., Мазуренко Н.Н., Гагарин И.М. и др. (2012) Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, **23**, 617-627.
21. Dominguez P.L., Kolodney M.S. (2005) Oncogene, **24**, 6830-6834.
22. Hanahan D., Weinberg R.A. (2000) Cell, **100**, 57-70.
23. Douillard J.-Y., Shepherd F.A., Hirsh V. et al. (2010) J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol., **28**, 744-752.
24. Ипсека® [http://www.lsgeotar.ru/pharma_tn/3891.html].

Поступила: 01. 07. 2016.
Принята к печати: 28. 10. 2016.

DETERMINATION OF *EGFR* GENE SOMATIC MUTATIONS IN TISSUES AND PLASMA OF PATIENTS WITH ADVANCED NON-SMALL CELL LUNG CANCER

**O.I. Brovkina¹, M.G. Gordiev², A.N. Toropovskiy³, D.S. Khodyrev¹, R.F. Enikeev²,
O.A. Gusev^{4,5}, L.H. Shigapova⁴, A.G. Nikitin¹**

¹Federal Research and Clinical Center, FMBA of Russia,
28 Orechoviy bvd., Moscow, 115682 Russia; tel.: (499)725-26-91; e-mail: brov.olia@gmail.com

²Tatarstan Cancer Center, Kazan, Russia

³LLC "TestGene", Ulianovsk, Russia

⁴Kazan Federal University, Kazan, Russia

⁵RIKEN, Yokohama, Japan

The presence of activating mutations in the *EGFR* gene influences cell proliferation, angiogenesis, and increases metastatic ability; it has a significant impact on the choice of medical therapy of non-small cell lung cancer (NSCLC). The use of targeted therapy with tyrosine kinase inhibitors requires performance of appropriate genetic tests. The aim of this study was to design a real-time PCR-based diagnostic kit for fast and cheap of *EGFR* mutations testing in paraffin blocks and plasma, and kit validation using samples from patients with NSCLC, and also comparative estimation of diagnostic features of real-time PCR with wild type blocking and digital PCR for mutation testing in blood plasma. The study included 156 patients with various types of adenocarcinoma differentiation. It was designed a simple and efficient real-time PCR-based method of detecting L858R activating mutation and del19 deletion in the *EGFR* gene for DNA isolated from paraffin blocks. Kit for *EGFR* mutations was validated using 411 samples of paraffin blocks. The proposed system showed high efficiency for DNA testing from paraffin blocks: a concordance with results of testing with theascreen® EGFR RGQ PCR Kit ("Qiagen", Germany) was 100%. It has been shown the possibility of using this test system for the detection of mutations in plasma

Key words: activating mutations in EGFR gene, real-time PCR, non-small cell lung cancer, plasma