

## АНАЛИЗ МУТАЦИОННОГО СТАТУСА ГЕНА *EGFR* У БОЛЬНЫХ РАКОМ ЛЕГКОГО

Кит О. И., Водолажский Д. И., Лазутин Ю. Н., Олейникова Е. Н., Двадненко К. В.,  
Енин Я. С., Олейников Д. Д., Пыльцин С. П., Чубарян А. В.

*ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт», Ростов-на-Дону, Россия, e-mail:rnioi@list.ru*

Рак легкого занимает одно из ведущих мест по показателю смертности среди онкологических заболеваний. Понимание факторов, участвующих в этиологии рака легкого, требуется для прогнозирования потенциальных групп риска, которые могут иметь клиническое значение для разработки оптимальных схем лечения. Проведен анализ частот встречаемости 29 соматических мутаций в гене *EGFR* методом RT-PCR у 435 пациентов Юга России с диагнозом «аденокарцинома легкого». Учитывались гендерная принадлежность и статус курения у пациентов. Полученные данные свидетельствуют о важной роли не только статуса курения, но и гендерной принадлежности в возникновении соматических мутаций в гене *EGFR*. В группе некурящих мужчин частота встречаемости мутаций в гене *EGFR* была в 19 раз больше, чем в группе курящих мужчин; в группе некурящих женщин – в 2 раза больше, чем в группе курящих женщин; в группе некурящих мужчин – в 2,2 раза меньше, чем в группе некурящих женщин. Частота встречаемости мутантного типа гена *EGFR* у курящих мужчин была почти в 23 раза меньше, чем в группе курящих женщин. Можно предположить, что частота встречаемости соматических мутаций в гене *EGFR* положительно регулируется женскими половыми гормонами.

Ключевые слова: аденокарцинома легкого, мутации в гене *EGFR*, гендерная принадлежность пациента, статус курения.

## ANALYSIS OF *EGFR* GENE MUTATION STATUS IN LUNG CANCER PATIENTS

Kit O. I., Vodolazhsky D. I., Lazutin Y. N., Oleynikova E. N., Dvadnenko K.V., Enin Y. S.,  
Oleynikov D. D., Pylytsin S. P., Chubaryan A. V.

*Rostov Research Institute of Oncology, Rostov-on-Don, Russia, e-mail:rnioi@list.ru*

Lung cancer mortality rate is one of the highest among cancer death rates. Understanding of the factors involved in the etiology of lung cancer is necessary to predict the potential risk groups which may be clinically significant for the development of optimal treatment regimens. The frequency of 29 somatic mutations in the *EGFR* gene was analyzed by RT-PCR in 435 patients in the South of Russia diagnosed with adenocarcinoma of the lung. Gender and smoking status of the patients were taken into account. The results demonstrate that not only the smoking status but the gender as well is important in the occurrence of somatic mutations in the *EGFR* gene. The frequency of *EGFR* mutations in the group of non-smoking men was 19 times higher than in the group of male smokers; in the group of non-smoking women – twice as high as in the group of women smokers; in the group of non-smoking men - 2.2 times lower than in the group of non-smoking women. The frequency of mutant *EGFR* gene detection in male smokers was almost 23 times lower than in the group of female smokers. We can suppose that the frequency of somatic mutations in the *EGFR* gene is positively regulated by female sex hormones.

Keywords: adenocarcinoma of the lung, mutations in the *EGFR* gene, patient gender, smoking status.

Рак легкого (РЛ) занимает одно из ведущих причин смертности среди онкологических заболеваний во многих странах мира. Понимание факторов, участвующих в этиологии рака легкого требуется для прогнозирования потенциальных групп риска, которые могут иметь существенное клиническое значение для разработки оптимальных схем лечения этого заболевания [1]. Острота проблемы обусловлена не только высокой распространенностью этого заболевания, но и его традиционно поздней диагностикой [3].

В 2012 году во всем мире было зарегистрировано 1 825 000 новых случаев заболеваний РЛ. Из них – приблизительно 68 % среди мужчин и 32 % – среди женщин. При этом общий показатель смертности составил 1 590 000 случаев (1 099 000 – среди мужчин, 491 000 – среди женщин) или почти 90 % [5]. Показатель распространенности заболеваемости РЛ в России в 2014 г. составил 90,6 на 100 000 населения с тенденцией к повышению, что обусловлено как ростом заболеваемости и выявляемости, так и с увеличением выживаемости онкологических больных [6].

Курение является на сегодняшний день основным источником рака легких. Сигаретный дым содержит по меньшей мере 73 известных канцерогена, в том числе бензапирен, нитрозамины (NNK), 1,3-бутадиен и  $\alpha$ -радиоактивный изотоп полония, полоний-210. В мире 85–95 % случаев РЛ этиологически связаны с курением у мужчин и 65–80 % РЛ – у женщин [9]. По данным отчета ВОЗ за 2011 г. распространенность РЛ среди курящих женщин составляет 38, а среди курящих мужчин – 125 на 100 тысяч населения, тогда как среди некурящих этот показатель равен 7 на 100 тысяч человек [10].

Открытие соматических мутаций в гене *EGFR* явилось ключевым моментом в разработке таргетного подхода лечения немелкоклеточного рака легкого и привело к необходимости скрининга чувствительности/устойчивости клеток опухолей легкого к ингибиторам тирозинкиназ с использованием молекулярно-генетических методов [8]. Мутации в гене *EGFR* чаще обнаруживаются в аденокарциномах легкого у некурящих женщин. Однако мутации гена *EGFR* также могут обнаруживаться в других подгруппах пациентов с немелкоклеточным раком легкого (NSCLC), в том числе у бывших или настоящих курильщиков [2].

При сравнении пациентов с диким типом гена *EGFR*, пациенты с мутантным геном, получающие терапию ингибиторами тирозинкиназ, имеют более продолжительный период выживаемости, чем получающие химиотерапию. Медиана периода выживаемости у пациентов с метастатическим раком легкого с мутантным вариантом гена *EGFR*, получавшим лечение ингибиторами EGFR первого и второго поколения, составляет около 2-х лет [7].

ЮФО в совокупности с Северным Кавказом представляет собой уникальный регион с оседлым проживанием различных этносов. В связи с этим данное исследование может служить моделью для скрининга проявления частот мутаций в гене *EGFR*, что крайне важно для прогнозирования стандартов лечения и планирования скрининговых программ при использовании таргетных препаратов. Поэтому **целью** настоящего исследования являлось изучение закономерностей в частотах встречаемости 29 соматических мутаций в гене *EGFR*

тканей опухолей пациентов Юга России с диагнозом «аденокарцинома легкого» и выявление ассоциаций обнаруженных мутаций с гендерной принадлежностью и статусом курения.

### Материалы и методы

В данное исследование были включены 435 пациентов с подтвержденным диагнозом «аденокарцинома легкого», получавших стационарное лечение в ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» МЗ РФ. Проведен анализ в частотах проявления мутаций в гене *EGFR* с учетом гендерных особенностей и статуса курения. Мужчины – 278 человек (64 %) из них: 105 (37,7 %) никогда не курили и 173 (62,2 %) курили. Женщины – всего 157 человек (36 %) из которых никогда не курили – 145(92,3 %), а курили – 12 (7,6 %).

Для молекулярно-генетических исследований использовались FFPE блоки, фиксированные в 10 % забуференном формалине, содержащие не менее 20 % опухолевой ткани, из которых получали срезы толщиной 3 мкм. Экстракция ДНК проводилась после стандартной процедуры двойной депарафинизации срезов орто-ксилолом и спиртом, с использованием набора QIAamp® DNAFFPETissueKit (QIAGEN, Германия) согласно протоколу производителя. Концентрацию полученной ДНК из образцов измеряли на флуориметре Qubit 2.0® с использованием набора Quant-iT™ dsDNA High-Sensitivity (HS) AssayKit (Invitrogen, США). Детекцию 29 соматических мутаций в гене *EGFR* проводили с помощью набора реагентов «The rescreen EGFR RGQPCRKit» (QIAGEN, Германия) с использованием термоциклера Rotor-GeneQ (QIAGEN, Германия).

Статистический анализ проводили с использованием программ Microsoft Excel 2013 и STATISTICA 7. Оценивали достоверность различий с использованием непараметрического критерия  $\chi^2$ , для общепринятого уровня статистической значимости  $p < 0,05$ . Определяли различия в проявлении частот мутантного и дикого типов гена *EGFR* в группах пациентов, сгруппированных на основании их гендерной принадлежности и статуса курения.

### Результаты и обсуждение

Согласно полученным в нашем исследовании данным, средняя частота встречаемости мутантного типа гена *EGFR* среди всех пациентов Юга России составила 25,7 % (табл. 1).

**Таблица 1**

Частоты встречаемости мутантного типа гена *EGFR* у мужчин и женщин

Пол	Общее число пациентов, n= 435(100%)	Статус гена <i>EGFR</i>		Значение критерия $\chi^2$	Значение p, статистическая значимость p<0,05
		Дикий тип, n= 323 (74,2%)	Мутантный тип, n= 112(25,7%)		
<i>Пол</i>					
Мужчины	278 (64%)	236(84,9%)	42(15,1%)	45.60	0,0000 значимо
Женщины	157(36%)	87(55,4%)	70(44,5%)		

При анализе частоты встречаемости мутантного типа гена *EGFR* среди пациентов с учетом гендерного признака (без учёта статуса курения) замечено, что у пациентов мужского пола этот показатель составил 15,1 %, что было в 3 раза меньше аналогичного показателя в группе пациентов женского пола – 44,5 %. ( $\chi^2=45.60$   $p=0,0000$ ). Полученные различия являются статистически достоверными для уровня значимости  $p<0.05$ . (Таблица 1).

На следующем этапе нашего исследования частоты встречаемости мутантного типа гена *EGFR* у пациентов с диагнозом «аденокарцинома легкого» были проанализированы с учётом статуса курения, но без учета гендерных различий (табл. 2).

**Таблица 2**

Частоты встречаемости мутантного типа гена *EGFR* в зависимости от статуса курения

Статус курения	Общее число пациентов, n= 435(100%)	Статус гена <i>EGFR</i>		Значение критерия $\chi^2$	Значение p, статистическая значимость $p<0,05$
		Дикий тип, n= 323 (74,2%)	Мутантный тип, n= 112(25,7%)		
<i>Статус курения</i>					
Никогда не курил	250(57,4%)	161(64,4%)	89 (35,6%)	29,85	0,0000 значимо
Курил	185(42,5%)	162(87,5%)	23 (12,4%)		

В группе не курящих пациентов Юга России частота встречаемости мутантного типа в гене *EGFR* составила – 35,6 %, что почти в 3 раза больше, чем в группе курящих пациентов – 12,4 % ( $\chi^2 =29,85$ ;  $p= 0,0000$ ). В рамках нашего исследования отличия мутантного типа в гене *EGFR* в группе курящих и не курящих пациентов независимо от пола являются статистически достоверными для уровня значимости  $p<0,05$ . Далее каждая гендерная группа была дополнительно проанализирована с учётом статуса курения пациентов. Группа пациентов мужского пола была разделена на курящих и тех, кто никогда не курил (табл. 3).

**Таблица 3**

Частоты встречаемости мутантного типа гена *EGFR* у мужчин в зависимости от статуса курения

Статус курения	Общее число пациентов, n= 278(100%)	Статус гена <i>EGFR</i>		Значение критерия $\chi^2$	Значение p, статистическая значимость $p<0,05$
		Дикий тип, n= 236(84,9%)	Мутантный тип, n=42(15,1%)		
<i>Мужчины</i>					
Никогда не курил	105 (37,7%)	83 (79%)	22 (21%)	4,49	0,0340 значимо
Курил	173(62,2%)	153(88,4%)	20(1,1%)		

В группе никогда не куривших мужчин частота встречаемости мутантного типа гена *EGFR* составила 21 %, что в 19 раз превышало аналогичный показатель для группы курящих

мужчин – 1,1 %. Данные различия были статистически достоверны ( $\chi^2=4,49$   $p=0,0340$ ) для уровня значимости  $p<0,05$ .

Группа пациентов женского пола была также разделена на куривших и никогда не куривших пациентов (Табл. 4).

**Таблица 4**

Частоты встречаемости мутантного типа гена *EGFR* у женщин в зависимости от статуса курения

Статус курения	Общее число пациентов, n= 157(100%)	Статус гена <i>EGFR</i>		Значение критерия $\chi^2$	Значение р, статистическая значимость $p<0,05$
		Дикий тип, n= 87(55,4%)	Мутантный тип, n=70(44,5%)		
<i>Женщины</i>					
Никогда не курила	145(92,3%)	78(53,8%)	67 (46,2%)	2,02	0,1555 не значимо
Курила	12(7,6%)	9(75%)	3 (25%)		

Частота проявления мутантного типа гена *EGFR* у женщин, которые никогда не курили, составила 46,2 %, что почти в 2 раза выше по сравнению с аналогичной группой курящих женщин – 25 % ( $\chi^2=2,02$   $p=0,1555$ ), что соответствует данным других исследований [4]. Однако полученные нами различия носили характер тенденции и не были статистически достоверными для уровня значимости  $p<0,05$  в силу недостаточности анализируемых событий (всего 12 куривших женщин из 157 пациенток женского пола или 7,6 %).

Также нами были проанализированы частоты встречаемости мутантного типа гена *EGFR* в зависимости от статуса курения и гендерной принадлежности пациентов (Табл. 5).

**Таблица 5**

Частоты встречаемости мутантного типа гена *EGFR* в зависимости от статуса курения в различных гендерных группах

Характеристика	Общее число пациентов, n= 157(100%)	Статус гена <i>EGFR</i>		Значение критерия $\chi^2$	Значение р, статистическая значимость $p<0,05$
		Дикий тип, n= 87(55,4%)	Мутантный тип, n=70(44,5%)		
<i>Не курят</i>					
Мужчины	105 (37,7%)	83 (79%)	22 (21%)	16,94	0,0000 значимо
Женщины	145(92,3%)	78(53,8%)	67(46,2%)		
<i>Курят</i>					
Мужчины	173(62,2%)	153(88,4%)	20(1,1%)	1,86	0,1724 не значимо
Женщины	12(7,6%)	9(75%)	3(25%)		

Частота проявления мутантного типа гена *EGFR* у не курящих мужчин составила 21 %, что в 2,2 раза меньше, чем в аналогичной группе женщин – 46,2 % ( $\chi^2=16,94$   $p=0,0000$ ). При этом у курящих мужчин частота встречаемости мутантного типа гена *EGFR* составила 1,1 %, что почти в 23 раза меньше по сравнению с группой курящих женщин – 25 % ( $\chi^2=1,86$   $p=0,1724$ ). Однако такие большие различия носили характер тенденции, так как не были

статистически достоверны для общепринятого уровня значимости ( $p < 0.05$ ). Мы объясняем это особенностью расчета критерия  $\chi^2$ , который требует наличия определенного количества зарегистрированных событий. В данном случае малочисленной оказалась группа курящих женщин (Таблица 5).

### **Заключение**

Полученные в рамках данного исследования данные подтверждают высокую значимость статуса курения для частоты проявления мутаций в гене *EGFR*: частота проявляемости мутаций в гене *EGFR* у пациентов Юга России была существенно выше в группе не курящих пациентов. Нами выявлены статистически достоверные различия в частотах проявления мутаций в гене *EGFR* в различных гендерных группах пациентов Юга России с учетом статуса курения. Частота мутаций в гене *EGFR* (без учета статуса курения) среди мужчин составила 15,1 %, что было в 3 раза меньше, чем частота встречаемости мутантного типа гена *EGFR* среди женщин – 44,5 %. В ходе исследования выявлено, что частота мутаций в гене *EGFR* в группе мужчин, которые никогда не курили (21 %), была в 19 раз больше, чем в аналогичной группе курящих мужчин (1,1 %). Частота встречаемости мутантного типа гена *EGFR* в группе не курящих женщин была равна 46,2 %, что практически в 2 раза больше, чем в аналогичной группе курящих женщин – 25 %. В группе не курящих мужчин частота встречаемости мутантного типа гена *EGFR* составила 21 %, что в 2,2 раза меньше, чем в группе не курящих женщин – 46,2 %. При этом частота встречаемости мутантного типа гена *EGFR* у курящих мужчин в нашем исследовании составила величину 1,1 %, что почти в 23 раза меньше, чем в группе курящих женщин – 25%.

Таким образом, значимым фактором в возникновении SNP – мутаций в гене *EGFR* является не только статус курения, но и гендерная принадлежность пациента. Это позволяет нам предположить, что возникновение соматических мутаций в гене *EGFR* усиливается женскими половыми гормонами.

### **Список литературы**

1. Владимирова Л.Ю., Кит О.И., Шолохова Е.А. Роль гистологического и молекулярного анализа в выборе метода лечения немелкоклеточного рака легкого поздних стадий //Фарматека. – 2012. – № 8 (241). – С.9-22.
2. Водолажский Д.И., Кит О.И., Максимов А.Ю., Антонец А.В., Двадненко К.В., Владимирова Л.Ю., Лейман И.А., Лазутин Ю.Н. Связь мутаций гена EGFR с клинико-патологическими особенностями аденокарциномы легкого у пациентов Юга России // Клиническая медицина. – 2014. – № 7. – С.49-53.

3. Сахарова Г.М., Антонов Н.С. Противодействие табачной эпидемии – сохранение здоровья людей // Профилактическая медицина. – 2010. – № 6. – С. 3-7.
4. EGFR in Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC) [Electronic resource]. - Access mode: (<http://www.mycancergenome.org/content/disease/lung-cancer/egfr/>) (date of the application: 6.10.2015).
5. Globacan 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012 [Electronic resource]. - Access mode: [http://globocan.iarc.fr/Pages/fact\\_sheets\\_cancer.aspx](http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx) (date of the application: 6.10.2015).
6. Lynch T.J., Bell D.W., Sordella R., Gurubhagavatula S., Okimoto R.A., Brannigan B.W., Harris P.L., Haserlat S.M., Supko J.G., Haluska F.G., Louis D.N., Christiani D.C., Settleman J., Haber D.A. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib // N Engl J Med. – 2004. – № 21. – P. 1260-1261.
7. Maemondo M., Inoue A., Kobayashi K., Sugawara S., Oizumi S., Isobe H., Gemma A., Harada M., Yoshizawa H., Kinoshita I., Fujita Y., Okinaga S., Hirano H., Yoshimori K., Harada T., Ogura T., Ando M., Miyazawa H., Tanaka T., Saijo Y., Hagiwara K., Morita S., Nukiwa T. Gefitinib or chemotherapy for non-small-cell lung cancer with mutated EGFR// N Engl J Med. – 2010. – № 25. – P. 2380-2388.
8. Pao W., Miller V., Zakowski M., Doherty J., Politi K., Sarkaria I., Singh B., Heelan R., Rusch V., Fulton L., Mardis E., Kupfer D., Wilson R., Kris M., Varmus H. EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from «never smokers» and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. – 2004. – Vol. 101. – P. 13 306–13 311.
9. Thun M.J., Henley S.J. Tobacco : Cancer Epidemiology and Prevention / Oxford: Oxford University Press [Eds . by D. Schottenfeld, J.F. Fraumeni.]. UK, 2006. – P. 217–242.
10. WHO. Report on the Global Tobacco Epidemic, 2008 [Electronic resource]. – Access mode: [http://www.who.int/tobacco/mpower/mpower\\_report\\_full\\_2008.pdf](http://www.who.int/tobacco/mpower/mpower_report_full_2008.pdf) (date of the application: 6.10.2015).

**Рецензенты:**

Франциянц Е.М., д.б.н., профессор, руководитель лаборатории изучения патогенеза злокачественных опухолей ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» МЗ РФ, г. Ростов-на-Дону;

Горошинская И.А., д.б.н., профессор, главный научный сотрудник лаборатории изучения патогенеза злокачественных опухолей ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» МЗ РФ, г. Ростов-на-Дону.