

СПЕКТР АБЕРРАЦИЙ EGFR У КРЫМСКИХ ПАЦИЕНТОВ С НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНЫМ РАКОМ ЛЕГКОГО

Аль-Нсоур Р.Д.¹, Максимов А.Ю.², Петрусенко Н.А.², Олексеенко В.В.¹,
Статешный О.Н.²

¹Медицинская академия имени С.И. Георгиевского ФГАОУ ВО «КФУ им. В.И. Вернадского», Симферополь, e-mail: xitrilis@mail.ru;

²ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава РФ, Ростов-на-Дону

Немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ) составляет 85% всех видов рака легкого, который остается наиболее часто диагностируемым видом злокачественных новообразований человека с плохим прогнозом. Значительно улучшившие клиническое течение НМРЛ ингибиторы тирозинкиназы EGFR эффективны только в отношении опухолей, несущих активирующие мутации в гене *EGFR*, частота которых различается в зависимости от популяционной принадлежности пациентов. Цель нашей работы состояла в анализе ретроспективной когорты крымских пациентов с распространенным НМРЛ на наличие aberrаций гена *EGFR* и возможной ассоциации с клиническим исходом. Согласно полученным данным пациенты крымской популяции чаще демонстрируют плоскоклеточный подтип НМРЛ (57%). Изменения копийности *EGFR* относительно условно нормальной ткани зафиксированы в 30% случаев аденокарцином легкого и в 69,1% плоскоклеточного рака. Частота активирующих мутаций в образцах аденокарциномы составила 9,7% (ex9del), что ниже частоты, определенной ранее для пациентов ЮФО ($p=0,036$). Статистический анализ продемонстрировал отсутствие убедительных доказательств связи между выявленными соматическими изменениями *EGFR* и клинико-патологическими особенностями заболевания. Однако наличие мутаций и/или изменение копийности *EGFR* были связаны с более коротким периодом общей выживаемости пациентов, не получавших таргетной и иммунной терапии ($p = 0,034$).

Ключевые слова: *EGFR*, плоскоклеточный рак легкого, аденокарцинома легкого, относительная копийность генов.

SPECTRUM OF EGFR ABERRATIONS IN CRIMEAN PATIENTS WITH NON-SMALL CELL LUNG CANCER

Al-Nsour R.D.¹, Maksimov A.Yu.², Petrusenko N.A.², Olekseenko V.V.¹,
Stateshnyy O.N.²

¹Medical Academy named after S.I. Georgievsky FGAOU VO "KFU im. IN AND. Vernadsky", Simferopol, e-mail: xitrilis@mail.ru

²National Medical Research Centre for Oncology, Rostov-on-Don

Non-small cell lung cancer (NSCLC) accounts for 85% of all lung cancers and remains the most commonly diagnosed malignant neoplasm in people with a poor prognosis. EGFR tyrosine kinase inhibitors, which significantly improved the clinical course of NSCLC, are effective only against tumors carrying activating mutations in the *EGFR* gene, the frequency of which varies depending on the patient population. The aim of our work was to analyze a retrospective cohort of Crimean patients with advanced NSCLC for the presence of *EGFR* gene aberrations and a possible association with clinical outcome. According to the obtained data, the patients of the Crimean population more often demonstrate the squamous cell subtype of NSCLC (57%). Changes in EGFR copy number relative to conventionally normal tissue were recorded in 30% of cases of lung adenocarcinomas and in 69.1% of squamous cell carcinomas. The frequency of activating mutations in adenocarcinoma samples was 9.7% (ex9del), which is lower than the frequency previously determined for patients in the south of Russia ($p = 0.036$). Statistical analysis demonstrated the lack of convincing evidence of the relationship between the identified somatic changes in *EGFR* and clinical and pathological features of the disease. However, the presence of mutations and / or changes in the copy number of *EGFR* were associated with a shorter period of overall survival in patients who did not receive targeted and immune therapy ($p = 0.034$).

Keywords: lung cancer, *EGFR*, squamous cell lung cancer, lung adenocarcinoma, copy number variation.

Рак легких остается наиболее часто диагностируемым видом злокачественного новообразования человека, в том числе и в РФ [1]. Мутации, активирующие рецептор

эпидермального фактора роста (*EGFR*), характеризуют подгруппу немелкоклеточного рака легкого, для которого эффективны ингибиторы тирозинкиназы *EGFR* (*EGFR*-ТКИ), что значительно улучшило клинические исходы при НМРЛ с мутантным *EGFR* [2]. *EGFR*-ТКИ «первого поколения», включая gefитиниб и эрлотиниб, теперь являются стандартным лечением НМРЛ [3].

Несмотря на высокую частоту ответа на ТКИ (до 70% при использовании gefитиниба в качестве первой линии), период ответа обычно длится менее 12 месяцев [4]. Резистентность к таргетной терапии, развивающаяся часто вследствие появления вторичных мутаций как в гене *EGFR* (Т790М), так и в других онкогенах (*MET*), дала толчок к развитию ингибиторов «следующего поколения» (например, осимертиниб) и иммунотерапии, которые расширили терапевтический арсенал онкологов. Однако, до того как доступность новых ингибиторов тирозин-киназ для пациентов улучшится, ингибиторы первого поколения все еще играют неоценимую роль в лечении мутантного по *EGFR* НМРЛ.

Сведения о частоте мутаций в гене *EGFR* значительно разнятся в зависимости от популяционной принадлежности пациентов. Например, исследования европейских когорт фиксировали данный показатель в диапазоне 10-20% [5; 6], тогда как для материкового Китая частота мутаций составила половину случаев аденокарциномы лёгкого, из которых в 48,0% фиксировали активирующие мутации [7]. Крым является особым этногеографическим регионом, в котором в силу исторических и сопутствующих этому миграционных процессов сложилась смешанная этническая структура населения с превалированием славянской и крымско-татарской этнической группы. Исследования распределения частоты клинически значимых альтераций генов *EGFR*, *ALK*, *ROSI* у больных с НМРЛ в указанных группах до настоящего времени не проводились.

Цель нашей работы состояла в анализе ретроспективной когорты крымских пациентов с распространенным НМРЛ, получавших хирургическое и химиотерапевтическое лечение, на наличие aberrаций гена *EGFR* и возможной ассоциации с клиническим исходом.

Материалы и методы исследования

Исследование включало 100 больных европеоидного типа, проживающих на территории Республики Крым, в возрасте 46-78 лет (медиана 64 года), 82% - мужчин, 18% - женщин, с диагнозом «рак легкого T1a-4N0-2M0-1» (стадия I-IV), проходивших плановое лечение в «Медицинской академии имени С.И. Георгиевского» Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Крымский федеральный университет имени В.И. Вернадского» (ФГАОУ ВО «КФУ им. В.И. Вернадского») в 2015-2017 гг. Все пациенты подписали добровольное информированное

согласие на обработку персональных данных и передачу сведений, составляющих врачебную тайну, а также на передачу биологического материала.

В ретроспективной выборке пациентов с диагнозом «рак легкого» (N=100) после пересмотра препаратов злокачественных опухолей двумя опытными морфологами был подтвержден диагноз «аденокарцинома» у 41 пациента и плоскоклеточный рак у 57 пациентов. В двух случаях морфологический подтип соответствовал крупноклеточной опухоли.

Для генетических исследований тотальную ДНК экстрагировали из парафиновых блоков опухолевой и условно здоровой ткани, как описано ранее [8]. Оценку относительной копийности *EGFR* проводили методом ПЦР в реальном времени согласно [9] с использованием в качестве референсных генетических локусов *GAPDH*, *B2M*. Последовательности праймеров для *EGFR* были разработаны на базе данных NCBI GenBank в программе Primer-BLAST (F: 5'-GCCAAGTAAGGGCGTGTCT-3'; R: 5'-GGCCGAAGAACGAAACGTC-3').

С помощью набора «therascreen EGFR RGQ PCR Kit» (Qiagen, Германия) определяли наличие мутаций в гене *EGFR* методом аллель-специфичной ПЦР в реальном времени согласно инструкции производителя. Таким образом, идентифицировали девять делеций в экзоне 19, L858R, T790M, L861Q, G719S/A/C, 3 инсерции в экзоне 20, S768I.

Статистический анализ и оценку достоверности различий проводили в программе Statistica v.10. Результаты анализа считали значимыми при значении $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

По итогам предварительных ПЦР-постановок референсных локусов *GAPDH*, *B2M* амплификабельностью обладали только 72 препарата ДНК, выделенные из тканей злокачественных опухолей.

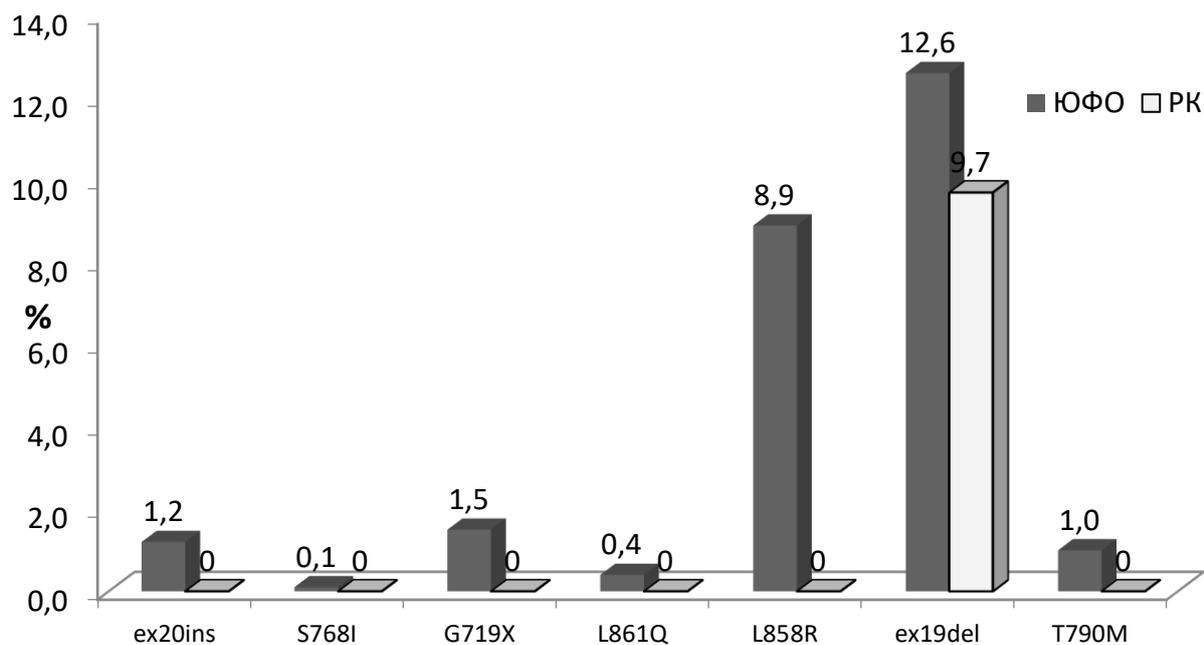
Оценка копийности *EGFR* продемонстрировала случаи амплификации локуса в 9 (30%) образцах аденокарцином, значимой потери относительной копийности при этом морфологическом подтипе зафиксировано не было. В группе плоскоклеточного рака преобладала амплификация локуса в 25 из 42 (59,6%) образцов, в 4 (9,5%) образцах было отмечено снижение копийности. В итоге различия по частоте aberrантного изменения относительной копийности *EGFR* в группах аденокарциномы и плоскоклеточного рака легкого были достоверными ($\chi^2 = 11,04$ при $p = 0,003$).

Генотипирование не выявило идентифицируемых мутаций *EGFR* в выборке плоскоклеточного рака легкого.

Общая частота мутаций *EGFR* в крымской выборке с подтвержденным морфологически диагнозом «аденокарцинома легкого» составила 9,7%. При этом были обнаружены исключительно делеции в 19 экзоне (ex19del) у некурящих женщин старше 55

лет. Согласно данным My Cancer Genome, ex19del *EGFR* - одно из наиболее часто встречающихся генетических изменений при НМРЛ. Ожидаемая общая частота соматических мутаций в гене *EGFR* при этой патологии колеблется от 10 до 50% [5-7].

На рисунке ниже проиллюстрирован анализ частоты мутаций *EGFR* в крымской выборке пациентов по сравнению с опубликованными ранее данными для пациентов с аденокарциномой легкого, проживающих в Южном федеральном округе (ЮФО) РФ [5].



Распределение частот соматических мутаций EGFR в выборке РК (Республика Крым) и ЮФО

Частота мутаций, сенсibiliзирующих к таргетной анти-ТКІ терапии, в крымской популяции (9,7%) оказалась меньше обычно регистрируемой в европейских популяциях пациентов с аденокарциномой (14,4%, 16,6%) [5; 6]. Кроме того, отмеченные различия частот мутаций были значимы при сравнении популяций Южного федерального округа и Республики Крым ($\chi^2 = 4,40$ при $p=0,036$).

Особенностью крымской группы также являлось отсутствие одной из наиболее часто идентифицируемых при НМРЛ мутации L858R. Кроме того, не было идентифицировано опухолей с мутацией T790M, обуславливающей первичную резистентность к EGFR-ТКІ первого поколения.

За четырёхлетний период наблюдения была собрана информация об общей выживаемости для 78 пациентов (таблица). После корректировки учёта летальных исходов, не

связанных с основным заболеванием, выявленная смертность составила 68,7% в группе с аденокарциномой и 52,2% в группе с плоскоклеточным раком.

Показатель смертности (на декабрь 2020 г.) в исследованных группах больных раком легкого

Смертность	Аденокарцинома		Плоскоклеточный рак	
	Абс. число	%	Абс. число	%
общая	26	81,3	29	63,0
связанная с основным заболеванием	22	68,7	24	52,2
Количество пациентов	32	100	46	100

Выявленный высокий показатель смертности связан, по-видимому, с доступной в 2014-2017 годах схемой лечения, включавшей только хирургическое лечение и химиотерапию.

В настоящем исследовании не была выявлена ассоциация мутации *EGFR* со стадией заболевания и общей выживаемостью пациентов с НМРЛ. Однако низкая частота мутаций, которая была зафиксирована в крымской выборке, может привести к недостаточной мощности для обнаружения статистически значимых связей. Поэтому для оценки влияния aberrации на выживаемость мы объединили все обнаруженные изменения в гене *EGFR* – мутации и изменение копийности. По результатам регрессионного анализа было выявлено, что пациенты с любым изменением *EGFR* имели более короткие значения общей выживаемости, чем пациенты без изменений ($p = 0,034$).

Проведение таргетной терапии в рассматриваемой ретроспективно группе пациентов РК не представлялось возможным, в том числе по причине отсутствия генетического тестирования в широкой клинической практике в Республике Крым в 2014-2017 гг. В связи с этим ассоциация между мутационным статусом *EGFR* и выживаемостью пациентов была оценена аналогично представленной в литературе тенденции и в целом снижала этот показатель.

Проведенное исследование в выборке пациентов с НМРЛ, проживающих на территории Республики Крым, продемонстрировало некоторые гистологические и генетические особенности. Согласно мировой статистике, наиболее распространенными подтипами немелкоклеточного рака легкого являются аденокарцинома (40-50%) и плоскоклеточный рак (25-40%) [10]. Напротив, в когорте крымских пациентов преобладали пациенты с диагнозом «плоскоклеточный рак» (57%).

Лечение ингибиторами тирозинкиназы EGFR (TKI, например, эрлотиниб, gefитиниб и афатиниб) у пациентов с аденокарциномой, положительной по мутации *EGFR*, значительно улучшило выживаемость без прогрессирования (ВБП). Мутации с делециями в экзоне 19 и мутации с однонуклеотидной заменой L858R в экзоне 21 являются наиболее частыми при НМРЛ и называются «классическими» сенсibiliзирующими мутациями [11]. Известно, что активирующие мутации рецептора эпидермального фактора роста имеют место приблизительно у 40-50% пациентов с аденокарциномой легкого азиатской расы и у 10–20% таких пациентов европейской расы [5-7; 11]. В целом выявленная у крымских пациентов частота мутаций *EGFR* соответствовала таковой в европейских популяциях, но была ниже по сравнению с пациентами ЮФО [5] и включала исключительно делеции в экзоне 19.

Предыдущие отчеты продемонстрировали убедительные доказательства связи между клинико-патологическими особенностями (например, статусом курения, полом, возрастом) и частотой мутаций *EGFR* при немелкоклеточном раке легкого [5; 12]. В частности, отмечено постепенное возрастное увеличение частоты мутаций *EGFR* у пациентов с раком легких. Например, у пациентов ЮФО частота сенсibiliзирующих мутаций была увеличена в возрастной группе ≥ 61 года ($p = 0,048$) по сравнению с возрастной группой ≤ 61 года, в то же время продемонстрировано значительное снижение частоты как сенсibiliзирующих, так и резистентных мутаций у бывших курильщиков ($p = 0,001$ и $p = 0,04$ соответственно) по сравнению с группой никогда не куривших. Наличие мутаций *EGFR* также было достоверно связано с женским полом и отказом от курения [5]. В крымской выборке отмечено наличие мутации *EGFR* только у женщин, что подтверждает тенденцию меньшей частоты обнаружения мутаций у мужчин, даже после поправки на курение.

Исследованная выборка характеризовалась наличием отдаленных метастазов у 5% пациентов уже на стадии первичной постановки диагноза. В литературе описаны прямо противоположные тенденции, связывающие наличие в опухоли активирующих мутаций в гене *EGFR* и метастазирование в мозг [5]. На фоне противоречивых оценок у ряда авторов мы не смогли связать наличие aberrаций *EGFR* с риском метастазов в региональные лимфоузлы или различные участки тела ($p > 0,05$).

Предыдущие исследования, посвященные изучению клинического прогноза, демонстрировали либо отсутствие [13], либо, наоборот, значительную разницу [2] в клинических характеристиках между пациентами с немелкоклеточным раком легкого, несущими делецию экзона 19 (ex19del) и точечную мутацию в 21 экзоне (L858R) гена *EGFR*. Несущественные различия в выживаемости между пациентами с разными генотипами опухолей были приписаны влиянию значительно более молодого возраста группы с ex19del по сравнению с группой носителей мутации L858R [13]. Тем не менее предшествующие

исследования показали, что пациенты с *ex19del* характеризуются более продолжительной общей выживаемостью после лечения ТКИ первой линии по сравнению с пациентами с мутацией L858R [14].

Механизмы различной чувствительности к EGFR-ТКИ опухолей, несущих *ex19del* или L858R, не ясны. Они могут быть связаны как с интенсивностью активации EGFR-сигнального пути, так и со схемой реализации онкогенеза при наличии *ex19del* или L858R. Например, известно, что мутация L858R чаще встречается в сочетании с другими более редкими мутациями, такими как L861Q, G719X, G719X и *ex20Ins* [5], что, очевидно, также влияет на чувствительность к лечению EGFR-ТКИ.

В работе Hong W. и соавторов [2] была проанализирована выживаемость без прогрессирования 137 пациентов с распространенным НМРЛ и мутациями *EGFR*, которые были разделены на группы по типу лечения (химиотерапия, терапия ингибиторами ТКИ в первой линии и во второй линии). Авторы продемонстрировали значимое увеличение у носителей мутации *ex19del* после терапии ТКИ в первой линии, тогда как не было отмечено различий между группами *ex19del* и L858R после химиотерапии и терапии ТКИ во второй линии. Одновременно у носителей L858R большую выгоду получали пациенты, перенесшие химиотерапию с последующей терапией ТКИ, чем пациенты, лечившиеся ТКИ в первой линии. Результаты исследования предполагают персонификацию лечения пациентов с распространенным НМРЛ не только по наличию мутаций в *EGFR*, но и по типу активирующей мутации.

Анализ логистической регрессии наших данных показал, что женский пол, возраст, морфологический подтип, отдаленные метастазы и химиотерапия не связаны с мутацией гена *EGFR* у пациентов с НМРЛ, однако это может быть связано с низкой частотой абберрации и недостаточностью объема выборки.

Настоящее пилотное исследование выявило особенности опухолей НМРЛ крымских пациентов, что диктует необходимость дальнейших исследований для оценки представленности в популяции более редких клинически значимых биомаркеров, а также для планирования медицинской помощи этой категории больных.

Выводы

Пациенты с немелкоклеточным раком легкого крымской популяции чаще демонстрируют плоскоклеточный подтип заболевания (57%). При отсутствии L858R частота активирующей мутации *ex19del* гена *EGFR* в случаях аденокарциномы составляет 9,7%. Более частая альтерация *EGFR* была выявлена при оценке копийности локуса в опухоли относительно условно нормальной ткани: изменения зафиксированы для 30% случаев аденокарциномы легкого и 69,1% плоскоклеточного рака. Наличие мутаций и/или изменение

копийности *EGFR* связаны с более коротким периодом общей выживаемости пациентов, не получавших таргетной или иммунной терапии.

Список литературы

1. Состояние онкологической помощи населению России в 2019 году / Под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, А.О. Шахзадовой. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2020. 239 с.
2. Hong W., Wu Q., Zhang J., Zhou Y.. Prognostic value of EGFR 19-del and 21-L858R mutations in patients with non-small cell lung cancer. *Oncol Lett.* 2019. Vol. 18 (4). P. 3887-3895.
3. Burotto M., Manasanch E.E., Wilkerson J., Fojo T. Gefitinib and erlotinib in metastatic non-small cell lung cancer: a meta-analysis of toxicity and efficacy of randomized clinical trials. *Oncologist.* 2015. Vol. 20 (4). P. 400–410.
4. Mok T.S., Wu Y.L., Thongprasert S., Yang C.H., Chu D.T., Saijo N., Sunpaweravong P., Han B., Margono B., Ichinose Y. Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. *N Engl J. Med.* 2009. Vol. 361 (10). P. 947–957.
5. Kit O.I., Vodolazhsky D.I., Timoshkina N.N., Vladimirova L.Yu, Turkin I.N., Kutsyn K.S., Enin Y.S., Panina S.B., Jurisic V. EGFR mutations and tumor metastases in patients with non-squamous non-small cell lung cancer (NSCLC) in the South of Russia. *JBUON.* 2017. Vol. 22 (6). P. 1410-1415.
6. Rosell R., Moran T., Queralt C., Porta R., Cardenal F., Camps C., Majem M., Lopez-Vivanco G., Isla D., Provencio M., Insa A., Massuti B., Gonzalez-Larriba J.L., Paz-Ares L., Bover I., Garcia-Campelo R., Moreno M.A., Catot S., Rolfo C., Reguart N., Palmero R., Sánchez J.M., Bastus R., Mayo C., Bertran-Alamillo J., Molina M.A., Sanchez J.J., Taron M.. Spanish Lung Cancer Group. Screening for epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *N Engl J. Med.* 2009. Vol. 361 (10). P. 958-967.
7. Shi Y., Li J., Zhang S., Wang M., Yang S., Li N., Wu G., Liu W., Liao G., Cai K., Chen L., Zheng M., Yu P., Wang X., Liu Y., Guo Q., Nie L., Liu J., Han X.. Molecular Epidemiology of EGFR Mutations in Asian Patients with Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer of Adenocarcinoma Histology - Mainland China Subset Analysis of the PIONEER study. *PLoS One.* 2015. Vol. 10 (11). P. e0143515.
8. Петрусенко Н.А., Вереникина Е.В., Якубова Д.Ю., Тимошкина Н.Н. Мутации в генах *BRCA1/2* у пациенток юга России с злокачественными новообразованиями яичников // *Якутский медицинский журнал.* 2020. № 4 (72). С. 87-89.

9. Водолажский Д.И., Тимошкина Н.Н., Маслов А.А., Колесников Е.Н., Татимов М.З. Копийность 17-ти генетических локусов у пациентов с диагнозом аденокарцинома желудка // Современные проблемы науки и образования. 2017. № 3. [Электронный ресурс]. URL: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=26405> (дата обращения: 18.10.2021).
10. Howlader N., Noone A.M., Krapcho M., Garshell J., Neyman N., Altekruse S.F., Kosary C.L., Yu M., Ruhl J., Tatalovich Z., Cho H., Mariotto A., Lewis D.R., Chen H.S., Feuer E.J., Cronin K.A. (eds). SEER Cancer Statistics Review, 1975 –2010, National Cancer Institute. Bethesda, MD, http://seer.cancer.gov/csr/1975_2010/ (link is external), SEER (Surveillance, Epidemiology, and End Results). www.SEER, 2013.
11. Gazdar A.F. Activating and resistance mutations of EGFR in non-small-cell lung cancer: role in clinical response to EGFR tyrosine kinase inhibitors. *Oncogene*. 2009. Vol. 28 (1). P. S24-S31.
12. Ren J.H., He W.S., Yan G.L., Jin M., Yang K.Y., Wu G. EGFR mutations in non-small-cell lung cancer among smokers and non-smokers: a meta-analysis. *Environ Mol. Mutagen*. 2012. Vol. 53. P. 78-82.
13. Zhuo M., Zheng Q., Zhao J., Wu M., An T., Wang Y., Li J., Wang S., Zhong J., Yang X., Chen H., Jia B., Dong Z., Gao E., Wang J., Wang Z.. Survival difference between EGFR Del19 and L858R mutant advanced non-small cell lung cancer patients receiving gefitinib: a propensity score matching analysis. *Chin J Cancer Res*. 2017. Vol. 29 (6). P. 553-560.
14. Riely G.J., Pao W., Pham D.K., Li A.R., Rizvi N., Venkatraman E.S., Zakowski M.F., Kris M.G., Ladanyi M., Miller V.A.. Clinical course of patients with non-small cell lung cancer and epidermal growth factor receptor exon 19 and exon 21 mutations treated with gefitinib or erlotinib. *Clin Cancer Res*. 2006. Vol. 12. P. 839–844.