

Бяхова М.М.<sup>1,2</sup>, Завалишина Л.Э.<sup>2</sup>, Веселкова А.Ю.<sup>1</sup>,  
Андреева Ю.Ю.<sup>2</sup>, Кузнецова О.А.<sup>2</sup>, Франк Г.А.<sup>2</sup>

DOI 10.25694/URMJ.2019.10.02

## Мутационный статус гена EGFR при немелкоклеточном раке легкого в зависимости от дифференцировки опухоли

1 — Патологоанатомическое отделение Московского областного научно-исследовательского клинического института им. М. Ф. Владимирского, Москва; 2 — Кафедра патологической анатомии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения дополнительного профессионального образования "Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования" Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва

Byakhova M.M., Zavalishina L.E., Veselkova A.Yu., Andreeva Yu. Yu., Kuznetsova O.A., Frank G.A.

### Status of EGFR mutation in non-small cell lung cancer, depending of grade of tumor

#### Резюме

Цель исследования: охарактеризовать мутации EGFR, выявляемые в немелкоклеточном раке легкого в зависимости от гистологического строения опухоли и степени ее дифференцировки, для последующего решения вопроса о тактике лечения пациентов. Материалы и методы: исследования проводили на операционном и биопсийном материале немелкоклеточного рака легкого: 104 аденокарциномы и 40 плоскоклеточных карцином. Средний возраст пациентов -  $61,6 \pm 7,2$  лет для АК и  $60,1 \pm 5,9$  для ПК, проходивших обследование и лечение с 2014 по 2019 года на базе ГБУЗ МО МОНКИ им. М. Ф. Владимирского. Результаты: 144 пациента с НМКРЛ были разбиты на 3 группы по степени дифференцировки опухоли. В общей выборке аденокарцином было выявлено 35,6 % пациентов, у которых обнаружена мутация в гене EGFR. При этом в группах АК обнаружена тенденция к снижению выявляемости мутаций с повышением градации (G) опухоли. Так в опухолях G1 мутации в гене EGFR детектируются в 60,0%, а G3 – 19,0% случаев. Преобладающими мутациями в группах были del19ex и L858R, однако в опухолях G1 и G2 встречались также редкие и двойные мутации. В группе ПК был выявлен один пациент с мутацией EGFR. Заключение: наличие мутаций в гене EGFR зависит от степени дифференцировки опухоли: чем выше grade, тем меньше частота выявления мутаций. В опухолях G1 и G2 помимо часто встречающихся мутаций del19ex и L858R, выявляются редкие и двойные мутации, определяющие различную чувствительностью опухолей к ингибиторам тирозинкиназы (ИТК) EGFR. Выявление таких мутаций позволяет скорректировать план лекарственной терапии таким пациентам и назначить поколения.

**Ключевые слова:** аденокарцинома легкого, мутации в гене EGFR, мутаций del19ex и L858R

#### Summary

Aim: to characterize EGFR mutations detected in non-small cell lung cancer depending on the histological structure of the tumor and the degree of its differentiation, for the subsequent decision on the treatment tactics of patients. Materials and Methods: Research was performed on surgical and biopsy material of non-small cell lung cancer: 104 adenocarcinomas (AD) and 40 squamous cell carcinomas (SCC). The average age of the patients was  $61.6 \pm 7.2$  years for AD and  $60.1 \pm 5.9$  for SCC that underwent examination and treatment from 2014 to 2019 on the basis of Moscow Regional Research and Clinical Institute. Results: 144 patients with NSCLC were divided into 3 groups according to the degree of tumor differentiation. In the total adenocarcinoma sample, 35.6% of patients were identified who had a mutation in the EGFR gene. At the same time, AD groups showed a tendency to decrease in the detection of mutations with an increase in the gradation (G) of the tumor. So in G1 tumors, mutations in the EGFR gene are detected in 60.0%, and G3 - 19.0% of cases. The predominant mutations in the groups were del19ex and L858R, but rare and double mutations were also found in the G1 and G2 tumors. In the SCC group, one patient was identified with an EGFR mutation. Conclusion: the presence of mutations in the EGFR gene depends on the

degree of tumor differentiation: the higher the grade, the lower the frequency of mutation detection. In addition to the frequently occurring del19ex and L858R mutations, tumors G1 and G2 also show rare and double mutations that determine the different susceptibility of tumors to tyrosine kinase inhibitors (ITK) EGFR. Identification of such mutations allows you to adjust the plan of drug therapy for such patients and assign generations.

**Key words:** lung adenocarcinoma, mutations in the EGFR gene, del19ex and L858R mutations.

## Введение

Немелкоклеточный рак составляет около 85% всех случаев карцином легкого. Он включает три большие гистологические подгруппы – аденокарциному (АК), плоскоклеточный (ПК) и крупноклеточный рак. Все они имеют различный онкогенез, клиническое течение и молекулярно-генетические характеристики и, как следствие, разные подходы к лечению [1,2,3].

Открытие активирующих мутаций в гене EGFR, объясняющего эффективность применения ингибиторов тирозинкиназы (ИТК) у части пациентов с аденокарциномой легкого, стимулировало поиск новых генетических мишеней для таргетной терапии [3,5].

Было выявлено более 800 соматических мутаций в гене EGFR, наиболее важными из которых являются делеции или точечные замены аминокислот в тирозинкиназном домене белка. [6]. Они встречаются в 15-20% случаев (АК) и в 1,5% случаев (ПК), что позволяет рекомендовать этим больным таргетную терапию. В отличие от химиотерапии, которая проводится по одному для всех подходов, малые молекулы (ингибиторы тирозинкиназы EGFR) используются в качестве индивидуализированной терапии, в зависимости от молекулярных характеристик опухоли [7, 8].

Лучший ответ на терапию ИТК наблюдается при наличии в опухоли классических мутаций EGFR: делеции в 19 экзоне и точечной мутации L858R в 21 экзоне, на которые примерно в равных долях приходится 90% всех нарушений структуры тирозинкиназного домена EGFR [6]. Мутация ex19del, составляет примерно 60-65% всех мутаций EGFR, причем ее частота практически одинаковая у пациентов разного возраста. А мутация L858R, встречающаяся примерно у трети пациентов с активацией EGFR, демонстрирует явную тенденцию к увеличению частоты у пожилых пациентов [5]. Редкие минорные мутации составляют 10% всех мутаций EGFR. К минорным относят мутации в экзоне 18 G719A/C/D/S, на долю которых приходится 3%. На долю мутации в 20 экзоне гена EGFR (инсерции и минус-мутации T790M, S761I и др.) приходится примерно 10% всех мутаций EGFR в НМКРЛ, и они вызывают устойчивость к ингибиторам тирозинкиназы. В первичных опухолях у ряда пациентов мутации в экзонах 19, 21 и T790M присутствуют одновременно [6,9]. Кроме того, ряд авторов отмечает, что карциномы с мутацией del19ex имеют лучшую чувствительность к ИТК, чем опухоли с мутацией L858R. Также отмечается, что мутация L858R в некоторых случаях сочетается с рядом других мутаций и прогностическая роль такого события еще не ясна [7,10].

**Целью** исследования было охарактеризовать мутации EGFR, выявляемые в немелкоклеточном раке легкого

в зависимости от гистологического строения опухоли и степени ее дифференцировки, для последующего решения вопроса о тактике лечения пациентов.

## Материалы и методы

В исследование включены 144 пациента с диагнозом немелкоклеточный рак легкого, проходивших обследование с 2014 по 2019 года на базе государственного бюджетного учреждения здравоохранения Московской области «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М. Ф. Владимирского» (ГБУЗ МО МОНИКИ им. М. Ф. Владимирского). Проводилось молекулярно-генетическое тестирование опухоли на наличие мутации EGFR с целью определения дальнейшей тактики лечения. Проведение данной работы было одобрено комитетом по этике (протокол №5 от 11 мая 2017 г). Операции и диагностические биопсии были произведены в торакальном отделении института. Диагноз ставился после гистологического исследования препаратов, окрашенных гематоксилином и эозином, а при необходимости – иммуногистохимического анализа в соответствии с рекомендациями действующей классификации Всемирной организации здравоохранения по раку легкого [1].

Исследования проводили на операционном и биопсийном материале немелкоклеточного рака легкого: 104 аденокарциномы и 40 плоскоклеточных карцином. Средний возраст пациентов - 61,6±7,2 лет для АК и 60,1±5,9 для ПК. Соотношение мужчин и женщин в группе аденокарцином легкого почти равное (50/54), в группе плоскоклеточных карцином преобладали мужчины (38/2).

Выявление мутаций в гене EGFR в ткани РЛ осуществлялось методом ПЦР в режиме реального времени с использованием набора реагентов Therascreen®EGFR RGQ PCR Kit (Qiagen) на оборудовании Rotor-Gene Q (Qiagen) по протоколу производителя. ДНК из парафиновых блоков выделялась при помощи набора Cobas DNA SamplePreparation Kit.

## Результаты и обсуждение

Определение статуса гена EGFR уже вошло в рутинную клиническую практику и позволяет назначать соответствующее персонализированное лечение. В нашем исследовании, включавшем 144 пациента с НМКРЛ, обследованных на наличие мутаций, были получены результаты, аналогичные российским и зарубежным исследованиям [2,3,7,10,11]. На основании преобладающего варианта строения все АК были разделены на 3 группы по степени дифференцировки (grade) [1]. Первая группа высокодифференцированных опухолей (G1) включала АК с преимущественно стелющимся (lepidic) строением (25 из 104 случаев). Средний возраст больных этой груп-

Таблица 1. Характеристики АК легкого в зависимости от степени дифференцировки.

Grade опухоли	Количество случаев (n%)	Возраст (ср. возраст $\pm$ ср. откл.)	Мужчины (n%)	Женщины (n%)
G1	25 / 24,0	58,7 $\pm$ 7,2	5 / 20,0	20 / 80,0
G2	58 / 55,8	62,4 $\pm$ 7,7	33 / 56,9	25 / 43,1
G3	21 / 20,2	62,5 $\pm$ 8,2	12 / 57,1	9 / 42,9
Всего	104 / 100	61,6 $\pm$ 7,2	50 / 48,1	54 / 51,9

Таблица 2. Статус мутации EGFR в зависимости от Grade опухоли.

Grade опухоли	мутация в гене EGFR (n%)	нет мутации в гене EGFR (n%)
G1	15 / 60,0	10 / 40,0
G2	18 / 31,0	40 / 69,0
G3	4 / 19,0	17 / 81,0
Всего	37 / 35,6	67 / 64,4

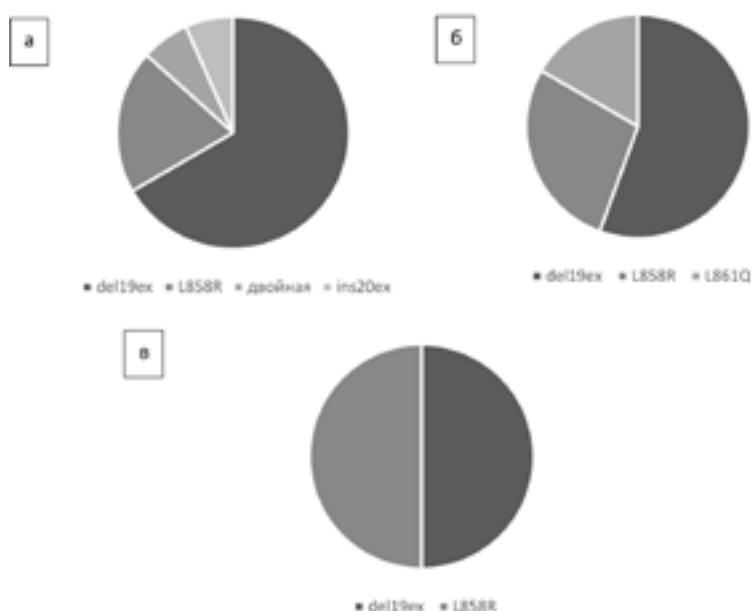


Рисунок 1. Соотношение выявленных мутаций в зависимости от Grade опухоли.

а. G1: *del19ex* - 66,6%, *L858R* – 20%, двойная мутация (*L858R/S768I*) – 6,7%, *ins20ex* – 6,7%. б. G2: *del19ex* – 55,5%, *L858R* – 27,8%, *L861Q* – 16,7%. в. G3: *del19ex* – 50%, *L858R* – 50%.

пы составил 58,7 $\pm$ 7,2 лет, с преобладанием женщин (20 из 25). Во вторую группу вошли умереннодифференцированные опухоли (G2), преимущественно ацинарного и папиллярного строения (58 из 104 наблюдений). Средний возраст пациентов - 62,4 $\pm$ 7,7 лет, с преобладанием мужчин (33 из 58). В третьей группы включили низкодифференцированные опухоли (G3) солидного и микропапиллярного строения. Средний возраст пациентов третьей группы - 62,5 $\pm$ 8,2 лет, с преобладанием мужчин (12 из 21). (Таблица №1).

Таким образом, при повышении градации рака отмечено заметное преобладание больных мужского пола, а также повышение возраста пациентов. Интересно, что в группе G1 преобладали женщины, а средний возраст был ниже характерного для аденокарцином, в то время как в группе G3 наблюдались противоположные тенденции.

Все пациенты с АК и некурящие пациенты с ПК были направлены на молекулярно-генетическое тестиро-

вание с целью определения статуса гена EGFR. В общей выборке АК было выявлено 35,6 % пациентов, у которых обнаружена мутация в гене EGFR. В группе ПК был выявлен один пациент с мутацией EGFR. Полученные результаты согласуются с данными мировой литературы: выявляемость нарушений при АК варьирует от 10 до 50% в зависимости от расовой и половой принадлежности, а также статуса курения[2,11,12].

При анализе встречаемости мутаций в зависимости от степени дифференцировки опухоли было обнаружено, что нарушения в гене EGFR коррелируют с градацией опухоли. (Таблица №2).

При анализе трех групп АК выявлялась тенденция к снижению выявляемости мутаций с повышением grade опухоли. Так при G1 мутации в гене EGFR детектируются в 60,0%, а при G3 – 19,0% случаев. В исследовании Levy M. с соавторами (2017) была обнаружена сходная тенденция. Так для пациентов с G1 и G2 частота мутации

EGFR составила 38,6% и 36,6% соответственно, и 11,3% для G3. В этом же исследовании показано, что такая тенденция сохраняется и для пациентов различной расовой и половой принадлежности [13]. В работе Lin Ch.Y. с соавторами (2017) также было продемонстрировано, что степень дифференцировки влияет на частоту мутаций в гене EGFR: при G1 мутация выявлялась в 58,6%, при G2 – 34,5%, а при G3 – 6,9 % случаев.

В нашей работе также был проанализирован профиль выявленных мутаций, данные по которому представлены в виде диаграмм на рисунке 1. В группе G1 преобладающей мутацией была del19ex (10/15), затем - мутация L858R (3/15), а кроме того, были выявлены единичные случаи с двойной мутацией (L858R/S768I) и с ins20ex. В группе G2 выявлялось меньшее количество мутаций, но соотношение между ними сохранялось, как и в группе G1: del19ex – 10/18, L858R – 5/18. Также в этой группе, как и в первой выявлялись редкие варианты мутаций в гене EGFR – L861Q (3/18). В группе G3 крайне редко встречались только два вида мутаций del19ex и L858R в равных пропорциях.

Как в нашем исследовании, так и по данным мировой литературы, наибольшее число мутаций, выявляемых в аденокарциномах – это del19ex и L858R, на долю которых приходится до 90% всех мутаций [5,9]. Именно эти опухоли обладают наибольшей чувствительностью к ингибиторам тирозинкиназы EGFR первого поколения. Однако в ряде работ показано, что АК с del19ex отличается биологическими свойствами от АК с подтвержденной мутацией в L858R [7,15]. Так Patel N. с соавторами (2017) установили, что медиана выживаемости без прогрессирования существенно выше у пациентов, имеющих делеции в 19 экзоне, по сравнению с пациентами с наличием мутации L858R. Сходные результаты были получены Yang J.C. с соавторами (2015). В нашем исследовании за весь период наблюдения один пациент с наличием делеции в 19 экзоне умер, а у двух больных с наличием мутаций del19ex и L858R отмечено прогрессирование процесса.

Еще около 10% мутаций приходится на долю редких, таких как L861Q, G719X и ins20ex. В нашей выборке встречались мутации L861Q и ins20ex, обладающие разной чувствительностью к ИТК EGFR. Они выявлялись только в группах аденокарцином G1 и G2. Мутация L861Q так же, как и мутации del19ex и L858R чувствительна к ингибиторам тирозинкиназ первого поколения, а мутация ins20ex отвечает за резистентность к гефитинибу и эрлотинибу, в этом случае показано применение ингибиторов второго поколения – афатиниба [6,9].

Определение статуса гена EGFR было проведено нами и у части пациентов с подтвержденным диагнозом ПК. В эту группу входили некурящие относительно молодые (60,1±5,9 лет) мужчины (38/40) и женщины (2/40). У одного из пациентов с плоскоклеточным неороговевающим раком G2 удалось выявить драйверную мутацию в гене EGFR (G719X). При иммуногистохимическом исследовании этой опухоли выявлена экспрессия p63 и CK 5/6 при отсутствии экспрессии TTF-1, CK 7. Пациенту была назначена таргетная терапия ингибиторами тиро-

зинкиназы EGFR. До настоящего времени у больного не выявлено прогрессирования заболевания. В ряде других исследований также находят мутации в плоскоклеточном раке легкого в 1-2% случаев [13].

## Заключение

Таким образом, результаты нашего исследования показывают, что наличие мутаций в гене EGFR зависит от степени дифференцировки опухоли: чем выше grade, тем меньше частота выявления мутаций. Было также обнаружено, что в высоко- и умеренно дифференцированных опухолях помимо часто встречающихся мутаций del19ex и L858R, выявляются редкие и двойные мутации, определяющие различную чувствительностью опухолей к ИТК EGFR. Выявление наличия таких мутаций позволяет скорректировать план лекарственной терапии и назначить ингибиторы тирозинкиназы второго поколения. ■

*к.м.н. Бяхова М.М., Патологоанатомическое отделение Московского областного научно-исследовательского клинического института им. М. Ф. Владимирского, Москва, Кафедра патологической анатомии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения дополнительного профессионального образования "Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования" Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва д.б.н. Завалишина Л.Э., Кафедра патологической анатомии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения дополнительного профессионального образования "Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования" Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва д.б.н. Веселкова А.Ю., Патологоанатомическое отделение Московского областного научно-исследовательского клинического института им. М. Ф. Владимирского, Москва, д.б.н. Андреева Ю.Ю., Кафедра патологической анатомии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения дополнительного профессионального образования "Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования" Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва д.м.н., профессор, академик РАН Франк Г.А., Кафедра патологической анатомии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения дополнительного профессионального образования "Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования" Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва. Автор, ответственный за переписку — Бяхова Мария Михайловна, 129110, г. Москва, ул. Щепкина 61/2, корпус 13, e-mail: biakhovatt@mail.ru*

**Литература:**

1. Travis W.D., Brambilla E., Burke A.P., et al. editors. *WHO Classification of tumours of the lung, pleura, thymus and heart. 4th ed.* Lyon: IARC; 2015.
2. Russell P.A., Wainer Z., Wright G.M., Daniels M., Conron M., Williams R.A. Does lung adenocarcinoma subtype predict patient survival?: A clinicopathologic study based on the new International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society international multidisciplinary lung adenocarcinoma classification. // *J Thorac Oncol.* 2011 Sep;6(9):1496-504.
3. Kalemkerian G.P., Narula N., Kennedy E.B. et al. *Molecular Testing Guideline for the Selection of Patients with Lung Cancer for Treatment with Targeted Tyrosine Kinase Inhibitors: American Society of Clinical Oncology Endorsement of the College of American Pathologists/International Association for the Study of Lung Cancer/Association for Molecular Pathology Clinical Practice Guideline Update.* // *J Clin Oncol.* 2018 Mar 20;36(9):911-919.
4. Демидова И.А., Баринов А.А., Савелов В.Н., Гриневич В.Н., Попов М.И., Столяровский Д.Л., Махсон А.Н. Исследование молекулярно-генетических нарушений у больных аденокарциномой легких // *Онкология. Журнал им. П.А. Герцена.* 2012;1(2): 28-34
5. Имянитов Е.Н. Современные представления о молекулярных мишенях в опухолях легкого. // *Практическая онкология – Т19.,»2 – 2018. – с93-104.*
6. Мазуренко Н.Н., Кушлинский Н.Е. Молекулярно-генетические маркеры немелкоклеточного рака легкого. // *Молекулярная медицина. - №4, 2014, с.4-13*
7. Patel N., Wu P., Zhang H. Comparison of gefitinib as first- and second-line therapy for advanced lung adenocarcinoma patients with positive exon 21 or 19 del epidermal growth factor receptor mutation. // *Cancer Manag Res.* 2017 Jun 28;9:243-248.
8. Torre L.A., Bray F., Siegel R.L., Ferlay J., Lortet-Tieulent J., Jemal A. *Global cancer statistics, 2012.* // *CA Cancer J Clin.* 2015 Mar;65(2):87-108.
9. Gallant J.N., Lovly C.M. Established, emerging and elusive molecular targets in the treatment of lung cancer. // *J Pathol.* 2018 Apr;244(5):565-577.
10. Kuan F.C., Kuo L.T., Chen M.C. et al. Overall survival benefits of first-line EGFR tyrosine kinase inhibitors in EGFR-mutated non-small-cell lung cancers: a systematic review and meta-analysis. // *Br J Cancer.* 2015 Nov 17;113(10):1519-28.
11. Vincenten J.P., Smit E.F., Grünberg K. et al. Is the current diagnostic algorithm reliable for selecting cases for EGFR- and KRAS-mutation analysis in lung cancer? // *Lung Cancer.* 2015 Jul;89(1):19-26.
12. Moutzios G., Dimopoulos M.A., Soria J.C., Sanoudou D., Papadimitriou C.A. Histopathologic and genetic alterations as predictors of response to treatment and survival in lung cancer: a review of published data. // *Crit Rev Oncol Hematol.* 2010 Aug;75(2):94-109.
13. Levy M., Lyon L., Barbero E., Wong J., Suga M., Sam D., Pan M. Histologic Grade Is Predictive of Incidence of Epidermal Growth Factor Receptor Mutations in Metastatic Lung Adenocarcinoma. // *Med Sci (Basel).* 2017 Dec 11;5(4). pii: E34.
14. Lin C.Y., Wu Y.M., Hsieh M.H., Wang C.W., Wu C.Y., Chen Y.J., Fang Y.F. Prognostic implication of EGFR gene mutations and histological classification in patients with resected stage I lung adenocarcinoma. // *PLoS One.* 2017 Oct 24;12(10):e0186567.
15. Yang J.C., Wu Y.L., Schuler M. et al. Afatinib versus cisplatin-based chemotherapy for EGFR mutation-positive lung adenocarcinoma (LUX-Lung 3 and LUX-Lung 6): analysis of overall survival data from two randomised, phase 3 trials. // *Lancet Oncol.* 2015 Feb;16(2):141-51.