

Qeyri-Kiçik Hüceyrəli Ağciyər Xərçəngində EGFR Gen Mutasiyalarının Klassifikasiyası və Müxtəlif Metodlarla Aşkarlanması

Səbinə Mehdizadə¹, Elçin Mansurov^{1,3}, Cavid Əliyev¹, Elnarə Əliyeva¹, İlqar Qasımzadə¹, Aleksandra Quliyeva¹, Leylaxanım Məlikova^{1,2}

¹Milli Onkologiya Mərkəzi, Bakı, Azərbaycan

²ETN Biofizika İnstitutu, Bakı, Azərbaycan

³Ə.Əliyev adına Azərbaycan Dövlət Həkimlərin Təkmilləşdirmə İnstitutu, Bakı, Azərbaycan

¹info@mom.gov.az, ^{1,2}Lmelikova20027@gmail.com, ³info@adhti.edu.az

Xülasə – Bu iş qeyri-kiçik hüceyrəli ağciyər xərçəngi (QKHAX) olan xəstələrdə epidermal böyümə faktoru reseptoru (EGFR) gen mutasiyalarının klinik əhəmiyyətini və müalicəyə cavab xüsusiyyətlərini təhlil edir. Tədqiqata 2013-2024-cü illərdə Milli Onkologiya Mərkəzinə müraciət edən 507 ağciyər xərçəngi diaqnozu qoyulan xəstə daxil edilib. Onlardan 133-də EGFR genin müxtəlif mutasiyaları, o cümlədə 6 xəstədə isə ikili mutasiya aşkar edilib. Müşahidələr göstərib ki, EGFR genin ikili mutasiyaları olan xəstələr tirozin kinaz inhibitoru (TKİ) müalicəsinə daha həssas olub və onlarda uzunmüddətli sağ qalma müşahidə edilmişdir. Xəstələrdə sağqalma müddəti kompleks mutasiyaların tərkibindən asılı olmuşdur. Belə ki, bu xəstələrdə müalicə strategiyaları fərdi genetik profillərə əsaslanaraq uyğunlaşdırılmalıdır.

Açar sözlər— QKHAX, EGFR geni mutasiyaları, ikili mutasiya, TKİ-inhibitoru, fərdi onkoloji müalicə.

I. GİRİŞ

Ağciyər xərçəngi global miqyasda ölümə səbəb olan əsas onkoloji xəstəliklərdən biridir. Azərbaycan Respublikasında bu xəstəlik aktual səhiyyə problemlərindən biri olaraq qalır. Statistik göstəricilərə görə, ölkədə hər 100.000 nəfərə 152,3 yeni xərçənglə xəstələnmə halı düşür və ölüm göstəricisi 93,2 təşkil edir. Bu günün statistikasına ağciyər xərçənginin kişilər arasında ən çox rast gəlinən xərçəng növlərdən biri olduğunu göstərir (37,5/100.000) [1].

QKHAX ağciyər xərçəngi hallarının əksəriyyətini təşkil edir və burada molekulyar markerlərin, xüsusilə də EGFR geninin rolu mühüm əhəmiyyət daşıyır. EGFR geni xromosomun 7p11.2 bölgəsində yerləşir və 28 ekzon və 27 introndan ibarətdir. Bu gen transmembran reseptoru kodlayır və EGF, TGF- α kimi ligandlarla bağlanaraq hüceyrə bölünməsi və sağqalımını tənzimləyən siqnal yollarını aktivləşdirir [2, 3].

EGFR geninin kinaz domenində onkogen mutasiyaların olması reseptoru konstitutiv aktivləşdirir və hüceyrənin sağ qalmasını təşviq edir [4, 5]. Belə ki, EGFR gen mutasiyalarının strukturu və biologiyası istiqamətində aparılan tədqiqatlar hədəf terapiyası kimi istifadə edilən TKİ-in (tirozin

kinaz inhibitorları) həssaslığı haqqında anlayışların yaxşılaşdırılması və EGFR TKİ-lərin dərman kəşfində güclü bir vasitədir [6]. Bu kiçik molekullu TKİ-lər EGFR kinaz domeninin ATP “cibini” geri dönməz şəkildə bağlayır və reseptorların avtofosforilasiyasını və aşağı axın siqnalına maneə törədir [7, 8].

Birinci, ikinci və ya üçüncü nəsil tirozin kinaz inhibitorları ilə müalicə edildikdə klinik nəticələrdə nəzərəcarpacaq irəliləyiş göstərən EGFR onkogen mutasiyaları klassik EGFR mutasiyaları (L858R və ekson 19 delesiyaları) kimi təsnif edilir [9, 10]. Kinaz domendəki digər EGFR mutasiyaları (ekzonlar 18–21), nadir EGFR mutasiyaları adlandırılmışdır [11]. Bu mutasiyaların da onkogen mutasiya olduğu və kiçik hüceyrəli olmayan ağciyər xərçənginə (QKHAX) səbəb olduğu göstərilmişdir. EGFR genin S768I, L861Q, G719X, T790M, ekson 20ins9, ekson 20ins GGT/CAC mutasiyaları nadir mutasiyalar adlanır.

Bu mutasiyalar, struktur və funksional cəhətdən klassik mutasiyalardan fərqləndiyi üçün terapevtik yanaşmaların fərdiləşdirilməsini tələb edir. Bəzi nadir mutasiyalar birinci və ikinci nəsil TKİ-lərə qarşı zəif cavab verə bilər, bu da klinik idarəetmədə molekulyar testlərin və individual müalicə strategiyalarının əhəmiyyətini artırır. Üstəlik, son illərdə aparılan tədqiqatlar göstərir ki, bəzi qeyri-adi EGFR mutasiyaları üçün üçüncü nəsil inhibitorlar və kombinasiya edilmiş müalicə protokolları daha effektiv nəticələr verə bilər [12]. Bu səbəbdən, nadir EGFR mutasiyalarının aşkarlanması və onların klinik mənasının düzgün interpretasiyası ağciyər xərçəngi olan xəstələrdə optimal müalicə planının hazırlanmasında mühüm rol oynayır.

II. İŞİN MƏQSƏDİ

Əsas məqsəd Azərbaycan populyasiyasında kiçik hüceyrəli olmayan ağciyər xərçəngində aşkarlanan EGFR gen mutasiyalarının təsnifatıdır. Bu təsnifat, pasiyentlər arasında mutasiya növlərinin tezliyini müəyyən etməklə yanaşı, müalicə strategiyalarının fərdiləşdirilməsi və proqnostik göstəricilərin qiymətləndirilməsi baxımından da mühüm əhəmiyyət kəsb edir.

III. MATERIAL VƏ METOD

Bu tədqiqat 2013–2024-cü illər ərzində Azərbaycan Respublikası Milli Onkologiya Mərkəzinə (MOM) müraciət etmiş və EGFR genotipləmə analizi aparılmış 507 QKHAX xəstəsini əhatə etmişdir. Mili Onkologiya Mərkəzinin tərkibində olan elmi şura tədqiqat işinin aparılmasına icazə vermişdir.

Genetik analizlər formalinlə fiksasiya olunmuş parafin bloklarından (FFPE) əldə olunmuş DNT nümunələri üzərində QIAGEN (Cat. No. 56404) və EntroGene firmasının (EGFRRT-52) reagentləri ilə həyata keçirilmişdir. Çoxsaylı mutasiyalar daşıyan xəstələrin klinik xüsusiyyətləri və müalicə nəticələri retrospektiv şəkildə təhlil olunmuşdur. Bəzi analizlərin təsdiqi yeni nəsil sequins (NGS) və Doctor VIDA məşinində aparılıb.

Doctor Vida cihazı CE-IVD və ISO 13485 sertifikatlı olmaqla EGFR analizlərini sürətli və effektiv şəkildə aparmaq imkanı yaradır. Cihaz Portuqaliyanın Stab Vida kompaniyası tərəfindən təqdim olunmuşdur.

Doctor Vida cihazının təqdimatı və eləcə də analizlərin bu portativ cihazda təsdiqlənməsi məqsədi ilə analizlər Milli Onkologiya Mərkəzinin Molekulyar Onkologiya laboratoriyasında aparılmışdır.

Şəkildə göstərilirdi ki, xəstədən götürülmüş 5ml qan nümunəsindən əvvəlcədən bit metodu ilə hüceyrədən kənar bədxassəli şiş DNT fraqmentləri ayrılıb. Ondan sora isə lamp metod ilə sintez olunmuş praymerlər vasitəsi ilə 1saat ərzində mutasiyanın aşkarlanması təsdiq olunur.

Doctor Vida® sisteminin təsdiqi. Eyni genomik DNT həmçinin Doctor Vida LAMP analizindən istifadə edərək Doctor Vida® avadanlığında təhlil edilib. Qısaca olaraq, hər bir DNT nümunəsindən 5 µL birbaşa üç reaksiya borusuna əlavə edildi: insan EGFR geninə nəzarət, p.L858R variantını aşkar etmək üçün xüsusi və ən tez-tez Exon 19 silinməsinə aşkar etmək üçün spesifik, p.E746_A750del.

Bütün borular otaq temperaturunda 5 dəqiqə inkubasiya edildi və sonra Doctor Vida® avadanlığından (STAB VIDA, Caparica, Portuqaliya) istifadə edilərək emal edildi. Nəticələr Doctor Vida mobil proqramı vasitəsilə real vaxt rejimində API serverinə köçürüldü və saxlanıldı.

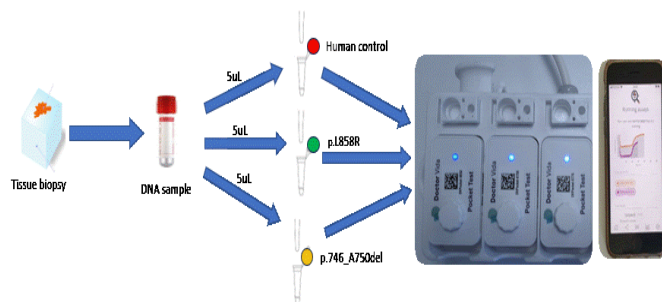
Nəticə vermək üçün məlumatlar 1 saat ərzində avtomatik olaraq təhlil edilib və mobil proqram vasitəsilə son istifadəçiyə təqdim edilib (şəkil 1).

NGS təsdiqi. Genomik DNT, KAPA HiFi HotStart ReadyMix® (Roche Sequencing Solutions, Pleasanton, CA, ABŞ) reaktivləri və LAMP üsulu üçün hazırlanmış xarici spesifik primerlər (F3 və B3) vasitəsilə PCR üsulu ilə çoxaldılmışdır.

Bu primerlər EGFR geninin 19 və 21-ci ekzonlarını hədəfləyirdi. Bioinformatik analiz CLC Genomics proqram təminatı vasitəsilə həyata keçirilmişdir və Phred keyfiyyət göstəricisinin 30 və daha yüksək olması təmin olunmuşdur.

Orta sekvensləmə dərinliyi $\geq 10,000\times$ təşkil etmişdir və variant allel tezliyi (VAF) üçün aşağı hədd $\geq 1\%$ olaraq təyin edilmişdir.

Sekvens nəticələrinin müqayisəli analizi, uyğunlaşdırmanın optimizasiyası və variantların müəyyən edilməsi CLC Genomics Workbench proqramının 12-ci versiyası ilə aparılmışdır.



Şəkil 1. EGFR gen mutasiyalarının Doctor Vida cihazı ilə aşkarlanma prosesi.

Bu tədqiqatın əsas sonlanma nöqtəsi ümumi sağqalım (ÜS) olmuşdur. ÜS və onunla əlaqəli proqnostik amillər çoxdəyişənli analizlər vasitəsilə qiymətləndirilmişdir. Sağqalım ehtimalları Kaplan–Meier metodu ilə hesablanmış, qruplar arasındakı fərqlər log-rank testi ilə müqayisə olunmuşdur (şəkil 2).

Risk nisbətləri (hazard ratio) Mantel–Haenszel metodu ilə hesablanmışdır. Statistik əhəmiyyətlik üçün $p < 0.05$ (ikitarəfli) səviyyəsi qəbul edilmişdir. Bütün statistik təhlillər IBM SPSS Statistics proqramının 30.0 versiyası ilə aparılmışdır.

IV. NƏTİCƏ

Ümumi olaraq 507 ağciyər xərçəngi diaqnozu qoyulmuş xəstə tədqiqata daxil edilmişdir. Onlardan 492 xəstəyə adenokarsinoma, 15-i yastı hüceyrəli ağciyər xərçəngi diaqnozu qoyulmuşdur.

133 (26.23%) xəstənin bəd xassəli şiş materialında EGFR geninin mutasiyası aşkar edilmişdir. Bu mutasiyaların 85-i klassik, 38-i nadir, 6-sı isə ikili (kompleks) mutasiyalar olmuşdur (cədvəl 1).

İkili mutasiyalar daşıyan xəstələrdə morfoloji olaraq yalnız adenokarsinoma qeydə alınmışdır.

CƏDVƏL 1. AZƏRBAYCANDA AĞCIYƏR XƏRÇƏNGİ XƏSTƏLƏRİNDƏ EGFR MUTASIYALARININ BÖLGÜSÜ (N=133)

Klassik mutasiyalar	Nadir mutasiyalar	Kompleks mutasiyalar
85 (63.9%)	38 (28.5%)	6 (4.5%)

Cədvəldən göründüyü kimi klassik mutasiyalar daha çox xəstədə aşkar edilib. Onların L858R və ekson 19 delesiyaları olmaqla iki hissəyə bölünür. Cədvəl 2-də bu mutasiyaların təsnifatı verilib.

CƏDVƏL 2. AĞCIYƏR XƏRÇƏNGİ XƏSTƏLƏRİNDƏ AŞKARLANAN KLASSİK EGFR MUTASIYALARIN TƏSNİFATI (N=85)

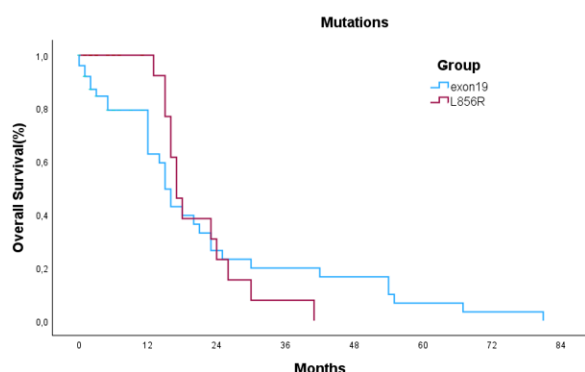
Exon 19del	L858R
61(77,7 %)	24 (22,3 %)

Nadir EGFR mutasiyaları olan xəstələrdə mutasiyaların müxtəlifliyi və terapeutik cavab fərqliliyi bu qrup pasiyentlər üçün fərdi və molekulyar əsaslı müalicə yanaşmalarının zəruriliyini göstərir. Say olaraq azlıq təşkil etsə də, klinik baxımdan yüksək əhəmiyyətə malik olduğunu özlüyündə sübut edir.

Exon19 və L858R mutasiyalarına malik pasiyentlər üçün median sağqalım müddətləri Kaplan–Meier metodu ilə hesablanmışdır.

Kaplan–Meier sağqalım əyriləri IBM SPSS Statistics (versiya 30.0) proqramında “Survival” proseduru vasitəsilə qurulmuşdur. Sağqalım müddəti zaman dəyişəni kimi daxil edilmiş, hadisə statusu isə binar dəyişən kimi kodlaşdırılmışdır (1 = hadisə baş verib, 0 = senzura olunub). Mutasiya qrupları arasındakı fərqlər log-rank testi ilə qiymətləndirilmişdir. Exon19 mutasiyası olan pasiyentlərdə median sağqalım müddəti 15.000 gün (95% etibarlılıq intervalı [Eİ]: 12.923–17.077 gün), L858R mutasiyası olanlarda isə 17.000 gün (95% Eİ: 14.651–19.349 gün) olaraq təyin edilmişdir.

Lakin bu iki mutasiya qrupu arasında sağqalım baxımından statistik olaraq əhəmiyyətli fərq müşahidə olunmamışdır ($p = 0.821$, log-rank testi), bu da EGFR mutasiyalarının bu iki alt növü arasında ümumi sağqalım baxımından mühüm fərqin olmadığını göstərir.



Şəkil 2. Klassik mutasiyası olan EGFR xəstələrində TKİ-lə müalicə və onun nəticələri.

Klassik mutasiyalı olan xəstələrdə TKİ-ərin birinci xətt istehsalı olan “Erlotinib”-in işlədilməsi və alınan sağ qalma müddəti şəkil 1-də göstərilib. Xəstələrin sağ qalma müddəti exon 19del və L585R mutasiyası üçün uyğun olaraq 4,5 və 4,7 olmuşdur.

Nadir mutasiyalar birinci xətt TKİ-a həssas deyil və onlar daha çox üçüncü xətt TKİ-la müalicə olunmalıdırlar. Üçüncü nəsil TKİ-lərin baha başa gəlməsi səbəbindən, nadir mutasiyası olan ağciyər xərçəngi xəstələri tez-tez kimyaterapiyaya yönləndirilir. Bu isə həmin xəstələrdə həyat keyfiyyəti və sağ qalım müddətində potensial azalmaya səbəb ola bilər.

Kompleks mutasiyalar daşıyan QKHAX xəstələrində TKİ müalicəsinə cavab ümumilikdə qənaətbəxşdir və bir çox hallarda uzunmüddətli sağ qalım müşahidə olunur.

Bəzi xəstələrdə 5 ildən artıq sağ qalım qeydə alınmışdır ki, bu da ABŞ-da IV mərhələ QKHAX üçün orta hesabla 5 illik sağ qalım göstəricisi olan 9%-dən xeyli yüksəkdir [13]. Bu, həm molekulyar hədəflənmiş müalicələrin effektivliyini, həm də bu genetik profilə malik xəstələrdə fərdi yanaşmanın vacibliyini sübut edir. Əldə olunan nəticələr onu göstərir ki, kompleks mutasiyalar arasında EGFR T790M kimi müqavimət mutasiyası aşkarlanmamışdır. Bu, xəstələrin erkən mərhələdə TKİ-lərlə davamlı və düzgün müalicə aldıklarını və mutasiyaların daha sabit formasını daşıdıklarını göstərir. Bu sabitlik, klonal seleksiyanın az olması və xəstəliyin daha yavaş inkişafı ilə də əlaqələndirilə bilər.

Əlavə olaraq, bəzi xəstələrdə ağciyərin hər iki payında ayrıca əsaslı şişlərin olması, bu mutasiyaların inkişaf mexanizminin kompleksliyini və ehtimal edilən irsi meylləri vurğulayır.

Bu tip multifokal şişlərdə hər bir şişin molekulyar profilinin ayrı-ayrılıqda təhlili, fərqli klonların mövcudluğunu aşkar etməyə və daha fərdiləşdirilmiş terapiya strategiyalarını müəyyən etməyə imkan yaradır. 133 xəstənin 34 analizi həm real time həm də doctor vida da təsdiqlənib. Eyni zamanda 34 analizin NGS təsdiqi də vardır.

V. YEKUN

EGFR genində ikili (kompleks) mutasiyalar daşıyan QKHAX xəstələrinin klinik müşahidələri sübut edir ki, bu pasiyentlərdə tirozin kinaza inhibitorlarına qarşı davamlı və effektiv cavab mümkündür. Bu nəticələr fərdi yanaşmaya əsaslanan müalicə metodlarının inkişaf etdirilməsi baxımından böyük əhəmiyyət daşıyır. Xüsusilə, kompleks mutasiya profillərinin dərinə təhlili, xəstələrin TKİ-lərə cavab potensialını əvvəlcədən proqnozlaşdırmağa və optimal terapeutik protokolların seçilməsinə şərait yaradır.

Gələcəkdə bu mutasiyaların bioloji mənşəyinin və irsi faktorların daha dərinə araşdırılması hədəflənmiş müalicə strategiyalarının təkmilləşdirilməsinə mühüm töhfə verə bilər.

VI. MÜZAKIRƏ

Tədqiqatın nəticələri göstərdi ki, EGFR genində birinci xətt TKİs-i klissik mutasiyalarda müvəffəqiyyətlə işləyə bilər. Bu TKİ-lər daha ucuz və bu xəstələr üçün effektivdir. Bu qrupdan olan 9 xəstədə terapiyaya dirənc yaranmışdır. Onlardan 2xəstədə EGFR-in irsi T790M mutasiyası aşkarlanmışdır. T790M mutasiyası TKİ-lərə qarşı əldə edilmiş müqavimət mexanizmlərindən biri kimi tanınır və ikinci xətt və ya üçüncü nəsil TKİ-lərin istifadəsini zəruri edir.

ACKNOWLEDGMENT

The authors thank the National Oncology Center for supporting this research and providing access to patient data used in this study.

İSTİNADLAR

- [1] International Agency for Research on Cancer. Cancer Fact Sheets: Azerbaijan. <https://canscreen5.iarc.fr>
- [2] EGFR (epidermal growth factor receptor) - Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology. <https://atlasgeneticsononcology.org>
- [3] Cell Signaling Pathways – EGFR. Current Biology. <https://www.cell.com/current-biology>
- [4] Zhenfang D., Jinghan S., Yunkai Z., Nigaerayi H., Qi X., “et al.” Structure-Guided Strategies of Targeted Therapies for Patients with EGFR-Mutant Non-Small Cell Lung Cancer. *Biomolecules* 2023, 13(2), 210.
- [5] Yun, C.H., Boggon, T.J., Li, Y., Woo, M.S., “et al.” Structures of lung cancer-derived EGFR mutants and inhibitor complexes: Mechanism of activation and insights into differential inhibitor sensitivity. *Cancer Cell* 2007, 11, 217–227.
- [6] Ruan, Z., Kannan and N. Altered conformational landscape and dimerization dependency underpins the activation of EGFR by alphaC-beta4 loop insertion mutations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2018, 115, E8162–E8171
- [7] Yan, X.E., Ayaz, P., Zhu, S.J., Zhao, P., “et al.” Structural Basis of AZD9291 Selectivity for EGFR T790M. *J. Med. Chem.* 2020, 63, 8502–8511.
- [8] Jacquelyne P R. and Xiuning L. Structure-based classification predicts drug response in EGFR-mutant NSCLC. *Nature.* 2021. 15;597(7878):732–737.
- [9] Rosell R. Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for European patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (EORTAC): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2012;13:239–246.
- [10] Soria J.C. Osimertinib in untreated EGFR-mutated advanced non-small-cell lung cancer. *N. Engl. J. Med.* 2018;378:113–125.
- [11] Ramalingam S.S. Overall survival with osimertinib in untreated, EGFR-mutated advanced NSCLC. *N. Engl. J. Med.* 2020;382:41–50.
- [12] Massarelli E., Johnson F.M., Erickson H.S., Wistuba I.I. and Papadimitrakopoulou V. Uncommon epidermal growth factor receptor mutations in non-small cell lung cancer and their mechanisms of EGFR tyrosine kinase inhibitors sensitivity and resistance. *Lung Cancer.* 2013;80:235–241.
- [13] Castaneda-Gonzalez JP. Verywell Health. Lung Cancer with EGFR Mutation. <https://www.verywellhealth.com/lung-cancer-with-an-egfr-mutation-4097338>