

Авдалян А.М.¹, Панасьян А.У.¹, Иванов А.А.¹, Самуйленкова О.В.², Бахареv С.Ю.², Близнак А.С.², Лазарев А.Ф.¹

ПРОГНОСТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ РЕАРАНЖИРОВКИ *EML4-ALK* ПРИ АДЕНОКАРЦИНОМЕ ЛЁГКОГО Т1-Т2 СТАДИИ ВО ВЗАИМОСВЯЗИ С НЕКОТОРЫМИ КЛИНИКО-МОРФОЛОГИЧЕСКИМИ ПАРАМЕТРАМИ

¹Алтайский филиал ФГБУ «Российский онкологический научный центр имени Н.Н. Блохина» Минздрава России, 656049, г. Барнаул, Россия;

²КГБУЗ «Алтайский краевой онкологический диспансер», 656043, г. Барнаул, Россия

Цель исследования: определение статуса гена *ALK* (мутация) при аденокарциноме лёгкого Т1-Т2 стадии во взаимосвязи с выживаемостью, стадией, размером, метастазами в бронхопальмональных лимфоузлах и амплификацией *Her2/Neu*.

Материал: 98 случаев аденокарциномы (Ак) I-II стадии. Случаев с мутацией *ALK* было 20 (4,8% без рандомизации). Использовали иммуногистохимический способ и гибридизацию *in situ*.

Результаты: Выживаемость больных Ак при наличии метастазов в лимфоузлах была ниже, чем при их отсутствии: $8,3 \pm 7,8$ и $40,9 \pm 13\%$ соответственно. При мутации *ALK* до 9 лет не дожил ни один больной в противоположность отсутствию мутации ($37,4 \pm 12,6\%$). При наличии амплификации гена *Her2* выживаемость больных Ак была ниже по сравнению со случаями с отсутствием амплификации ($p = 0,02$). Корреляции мутации *ALK* и амплификации *Her2* с показателем *N* не выявлено. Таким образом, независимым критерием прогноза при Ак легких I-II стадии стал показатель *N* ($\chi^2 = 9,6$, $p = 0,001$). Показатель мутации *ALK* был ниже, но обладал вторым по значимости влиянием на прогноз ($\chi^2 = 7,7$, $p = 0,005$).

Ключевые слова: аденокарцинома лёгкого; реаранжировка *EML4-ALK*; прогноз.

Для цитирования: Авдалян А.М., Панасьян А.У., Иванов А.А., Самуйленкова О.В., Бахареv С.Ю., Близнак А.С., Лазарев А.Ф. Прогностическая значимость реаранжировки *EML4-ALK* при аденокарциноме лёгкого Т1-Т2 стадии во взаимосвязи с некоторыми клинико-морфологическими параметрами. *Российский онкологический журнал*. 2017; 22(4): 194–197. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/1028-9984-2017-22-4-194-197>

Для корреспонденции: Авдалян Ашот Меружанович, д-р мед. наук, ст. науч. сотр. лаборатории исследований молекулярно-генетических характеристик опухолей; 656049, г. Барнаул, ул. Никитина, д. 77. E-mail: ashot_avdalyan@mail.ru.

Avdalyan A.M.¹, Panasyan A.U.¹, Ivanov A.A.¹, Samuilenkova O.V.², Bakharev S.Y.², Bliznyuk A.S.², Lazarev A.F.¹

PROGNOSTIC SIGNIFICANCE OF REARRANGEMENTS OF *EML4-ALK* IN PATIENTS WITH STAGE T1-T2 ADENOCARCINOMA IN THE RELATIONSHIP WITH SOME CLINICAL AND MORPHOLOGICAL PARAMETERS

¹Altai Branch of the N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Barnaul, 656049, Russian Federation;

²Altai Krai Oncology Centre, Barnaul, 656043, Russian Federation

The purpose of the study: determination of *ALK* gene status (mutation) in patients with stage T1-T2 adenocarcinoma in the relationship with survival, stage, size, metastases in bronchopulmonary lymph nodes and the amplification of *Her2/Neu*.

Materials. 98 stage I-II adenocarcinoma patients. Cases with a mutation in *ALK* account for 20 (4.8% without randomization). There was used the immunohistochemical method and *in situ* hybridization.

Results. The survival rate of adenocarcinoma patients with metastases in the lymph nodes was lower than in cases without metastases: $8.3 \pm 7.8\%$ and $40.9 \pm 13\%$ respectively. None of patients with a mutation *ALK* lived up to 9 years in contrast to the cases without mutations ($37.4 \pm 12.6\%$). In the presence of amplification of the *Her2* gene survival rate in adenocarcinoma patients was lower if compared to cases without amplification ($p = 0.02$). Correlation between *ALK* mutation and amplification of *Her2* with increased *N* is not revealed. Thus, an independent criterion of the prognosis for cases with of stage I-II lung adenocarcinoma is the *N* index ($\chi^2 = 9.6$, $p = 0.001$). The rate of mutation of *ALK* was lower, but had the second largest impact on the prognosis ($\chi^2 = 7.7$, $p = 0.005$).

Key words: lung adenocarcinoma; *EML4-ALK* gene rearrangement; forecast.

For citation: Avdalyan A.M., Panasyan A.U., Ivanov A.A., Samuilenkova O.V., Bakharev S.Y., Bliznyuk A.S., Lazarev A.F. Prognostic significance of rearrangements of *EML4-ALK* in patients with adenocarcinoma T1-T2 stage in the relationship with some clinical and morphological indices. *Rossiyskiy onkologicheskiy zhurnal*. (Russian Journal of Oncology). 2017; 22(4): 194–197. (In Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/1028-9984-2017-22-4-194-197>

For correspondence: Ashot M. Avdalyan, MD, PhD, DSc, Senior Researcher of the Laboratory of Investigations of Molecular Genetic Characteristics of Tumors of the Altai Branch of the N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center; Barnaul, 656049, Russian Federation. E-mail: ashot_avdalyan@mail.ru.

Information about authors:

Avdalyan A.M., <http://orcid.org/0000-0002-2229-1713>

Panasyan A.U., <http://orcid.org/0000-0002-8786-8392>

Ivanov A.A., <http://orcid.org/0000-0001-5040-8854>

Samuilenkova O.V., <http://orcid.org/0000-0003-1858-2777>

Bakharev S.Y., <http://orcid.org/0000-0003-2956-8145>

Bliznyuk A.S., <http://orcid.org/0000-0003-0206-2603>

Lazarev A.F., <http://orcid.org/0000-0003-1080-5294>

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgment. The study has no sponsorship.

Received 04 May 2017

Accepted 25 May 2017

Актуальность

Среди немелкоклеточного рака лёгкого отмечается увеличение частоты аденокарциномы (Ак) лёгкого по отношению к плоскоклеточному раку. Во многом факторами, определяющими прогноз и влияющими на выбор терапии и последующей диспансеризации, служат известные клинико-морфологические критерии: стадия процесса, размер опухоли, наличие метастазов в бронхопульмональных лимфоузлах. Кроме того, неплохо зарекомендовали себя биомолекулярные параметры: пролиферативный индекс Ki-67, экспрессия ТороПа, статус гена *Her2/Neu*, но данные о выживаемости во взаимосвязи с этими маркерами оценивают крайне вариабельно – от 2 до 38% [1]. В клетках Ак найдены специфические генетические изменения, определяющие назначение таргетной терапии. Один из таких факторов – реаранжировка гена *ALK*, которая происходит в основном за счёт парацентрической инверсии гена *EML4*, что приводит к присоединению 2–20 экзона *EML4* к 20 экзону *ALK* *EML4-ALK*, которая при аденокарциноме выявляется в 1,4–11,2% случаев [2]. Анализ существующей литературы показал противоречивый характер связи изменений в генах *ALK* с выживаемостью больных аденокарциномой лёгкого во взаимосвязи с другими клинико-морфологическими и биомолекулярными факторами [3].

Таким образом, целью исследования стала оценка влияния статуса гена *ALK* (мутация) на выживаемость и ряд клинико-морфологических параметров при Ак лёгкого T1-T2N0-N1M0 клинической стадии.

Материал и методы

В исследование были включены 98 операционных случая Ак лёгкого T1-T2 стадии за 2007–2016 г. (случаи с отдалёнными метастазами и множественными опухолями исключены из исследования). В 82 из них была проведена лобэктомия, а в 16 – пульмонэктомия. Предоперационная химиолучевая терапия не проводилась. Во всех 98 случаях отсутствовала мутация гена *EGFR*. В исследование включили 20 случаев с мутацией *ALK*. *ALK*-позитивные случаи были рандомизированы динамическим адаптивным способом с суммацией 16 проспективных и 4 ретроспективных случаев. Таким образом, общая частота встречаемости мутации составила 4,8%. Патогистологическая характеристика опухолей определена согласно классификации TNM 7-го пересмотра: T1 – 30(31%), T2 – 68(69%); N0 – 74(76%), N1 – 24(24%). Средний размер опухоли, независимо от статуса гена *ALK*, составил $3,2 \pm 0,2$ см.

Методом иммуногистохимии определяли белок мутированного гена *ALK* (клон D5F3, Ventana), а также статус гена *Her2* методом SISH (Ventana) в автоматическом иммуногистостейнере и гибридайзере VentanaXT по рекомендованным протоколам. Прочёт результатов вели согласно рекомендациям про-

изводителей и действующим руководствам. Статистический анализ полученных данных осуществляли в программе Statistica 8.0. Выживаемость оценивали актуриальным способом Каплана–Мейера, который подразумевал оценку общей и безрецидивной скорректированной канцерассоциированной выживаемости (в днях) и проценты выживших за определённый промежуток времени. Проводили многофакторный регрессионный анализ Кокса.

Результаты

При Ак лёгкого мутация *ALK* встречалась в 4,8% случаев, преимущественно в опухолях ацинарного строения. Экспрессия белка мутированного гена в цитоплазме клеток аденокарциномы была выраженной гранулярной (рис. 1, см. 2-ю полосу вклейки). При Ак положительный *Her2* статус определён в 16 (20%) случаях, чаще в виде кластеров, хотя выявлялись и случаи с дискретным разбросом участка гена (рис. 2, см. 2-ю полосу вклейки). При определении взаимосвязи мутации *ALK* с клинико-морфологическими и биомолекулярными параметрами не было обнаружено корреляции статуса гена со стадией процесса и размером опухоли (табл. 1). Вместе с тем выявлено, что только в трети случаев при *ALK*+ обнаруживались метастазы в бронхопульмональных лимфоузлах. Кроме того, при мутации гена *ALK* никогда не выявляли амплификацию гена *Her2/Neu*.

Выживаемость (общая безрецидивная) больных Ак I–II стадии за 3-, 5- и 9-летний период после операции составила соответственно $50,7 \pm 5,4$, $39,1 \pm 5,3$ и $33,6 \pm 5,2\%$. При анализе выживаемости больных Ак лёгкого во взаимосвязи с клинико-морфологическими и биомолекулярными параметрами и в первую очередь *ALK* статусом было выявлено, что при I стадии процесса относительно II стадии 9-летняя выживаемость была значимо лучше: $42,9 \pm 13,7$ и $13,1 \pm 9,9\%$ соответственно, $p = 0,006$ (рис. 3, а). Кроме того, прогноз у больных Ак лёгкого I–II ста-

Таблица 1

Взаимосвязь мутации *ALK* с рядом клинико-морфологических и биомолекулярных параметров

	Параметр	ALK+, %	p
Стадия	I	10 ± 5,4	0,1
	II	25 ± 8,8	
Размер	≤ 3 см	50 ± 27,8	0,06
	> 3 см	50 ± 28,6	
N	N+	33,3 ± 9,8	0,001*
	N–	100 ± 3,3	
	Амплификация <i>Her2</i>	0	0,002*

Примечание. * – статистически значимые отличия при $p \leq 0,05$.

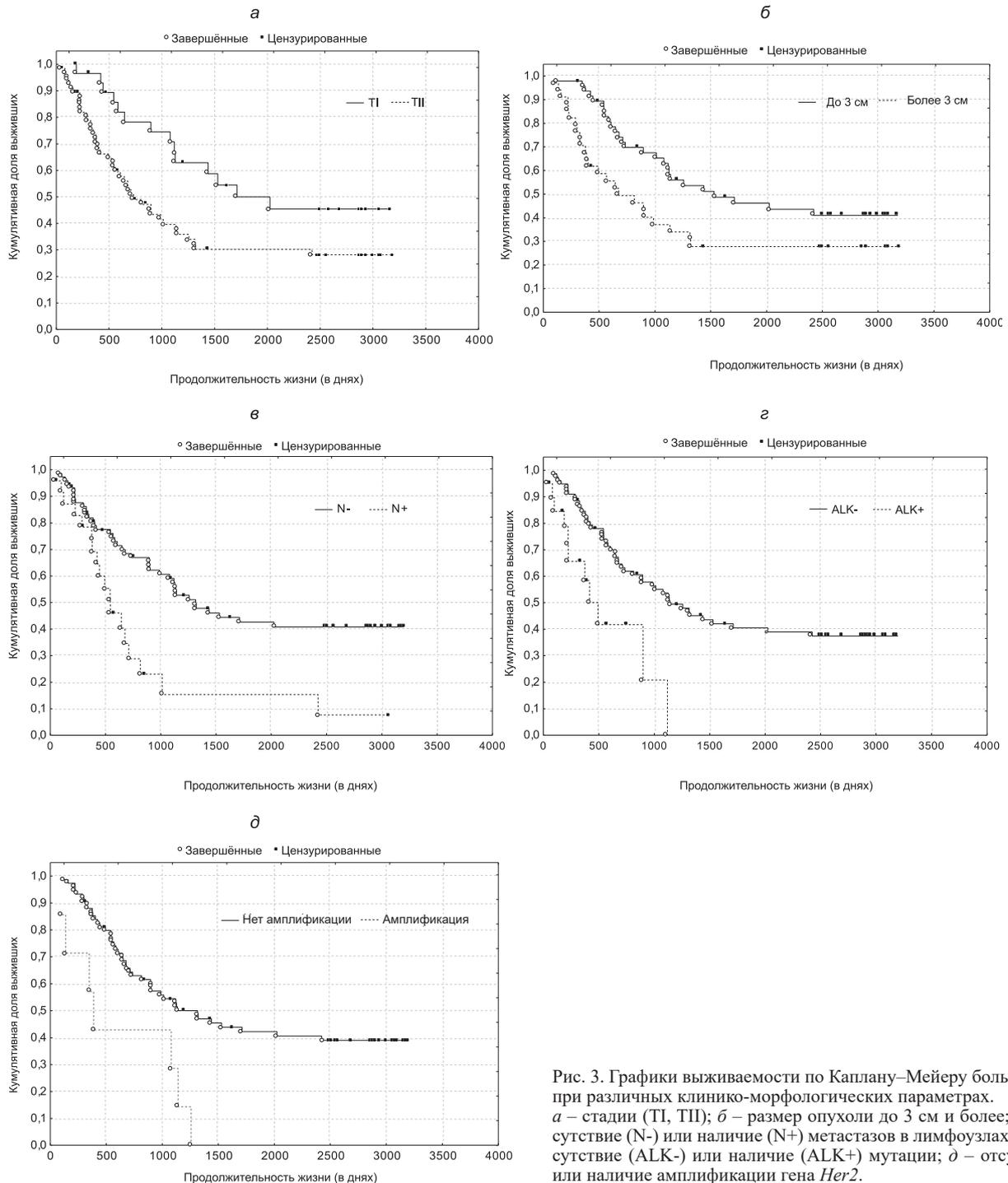


Рис. 3. Графики выживаемости по Каплану–Мейеру больных Ак при различных клинико-морфологических параметрах. а – стадии (Т1, Т2); б – размер опухоли до 3 см и более; в – отсутствие (N-) или наличие (N+) метастазов в лимфоузлах; з – отсутствие (ALK-) или наличие (ALK+) мутации; д – отсутствие или наличие амплификации гена *Her2*.

дии был значимо благоприятней при наличии опухоли до 3 см и становился значимо неблагоприятнее при выявлении метастазов в бронхопюльмональных лимфоузлах (рис. 3, б–в; табл. 2).

Анализ 9-летней выживаемости больных Ак лёгкого I–II стадии в зависимости от статуса *ALK* показал, что 3-летняя выживаемость при наличии мутации гена была значимо хуже, чем при её отсутствии, а до 5 и 9 лет не доживал ни один больной с мутацией: 3-летняя выживаемость $24,9 \pm 8,9\%$ при наличии мутации и $53,8 \pm 8\%$ при отсутствии ($p = 0,01$; рис. 3, з, табл. 2). Кроме того, при

прогностическом анализе статуса гена *Her2/Neu* было выявлено, что при наличии амплификации прогноз значимо ухудшался, чем если она отсутствовала: $28,6 \pm 11,9$ и $51,6 \pm 8,4\%$ соответственно ($p = 0,02$; рис. 3, д, см. табл. 2).

При проведении многофакторного регрессионного анализа по Коксу параметр показателя N стал ведущим критерием прогноза, что позволило выделить его в разряд независимых ($\chi^2 = 9,6$; $p = 0,001$; табл. 3). Мутация гена *ALK* была относительно высокой и стала вторым критерием с показателем $\chi^2 = 7,7$; $p = 0,005$. В меньшей степени на прогноз

Таблица 2

Выживаемость больных Ак при некоторых клинико-морфологических параметрах и при различном статусе генов *ALK* и *Her2/Neu*, %

Параметр	Выживаемость				p	
	Ме-диана (дни)	3	5	9		
Стадия	I	1286	59,5 ± 8,4	44,9 ± 10,6	42,9 ± 13,7	0,006
	II	542	30,8 ± 13,6	19,6 ± 10,4	13,1 ± 9,9	
Размер	≤ 3 см	1173	58,8 ± 10	46,5 ± 12	41,2 ± 15,5	0,06
	> 3 см	660	36,7 ± 14,5	27,1 ± 16,7	25,6 ± 16,4	
N	N-	1102	59,4 ± 8	42,7 ± 9,7	40,9 ± 13	0,006
	N+	517	29,8 ± 13,3	16,6 ± 16,3	8,3 ± 7,8	
Ампли-фикация <i>Her2</i>	-	1086	51,6 ± 8,4	42,3 ± 9,8	38,9 ± 12,5	0,02
	+	387	28,6 ± 11,9	0	0	
<i>ALK</i>	-	1083	53,8 ± 8	40,6 ± 9,8	37,4 ± 12,6	0,01
	+	285	24,9 ± 8,9	0	0	

Таблица 3

Многофакторный регрессионный анализ

Параметр	Значимость, χ^2	p
Стадия	5,6	0,01
Размер опухоли	6,4	0,01
Показатель N	9,6	0,001
Мутация <i>ALK</i>	7,7	0,005
Амплификация <i>Her2/Neu</i>	5,3	0,02

оказывали влияние размер опухоли и стадия процесса (см. табл. 3).

Амплификация *Her2*, будучи связанной статистически с другими параметрами, стала относительно ниже ведущих критериев ($\chi^2 = 5,3; p = 0,02$).

Обсуждение

Чаще всего в Ак реаранжировка происходит за счёт внутривитрихромосомной мутации – инверсии на коротком плече 2 хромосомы части гена *ALK* с геном *EML4*, в результате чего образуется слитный белок *EML4-ALK*, приводящий к активации внутриклеточных каскадов и повышению пролиферации, угнетению апоптоза клетки. Мутация *ALK* при Ак выявляется в 1,4–11,2% случаев [4, 5]. В нашем исследовании встречаемость мутации составила 4,8%, что соответствует мировой и общероссийской статистике [6]. Ряд авторов при анализе прогностической значимости биомолекулярных и клинико-патологических параметров и их взаимосвязи с мутацией гена *ALK* выявляли, что одним из важных критериев является стадия процесса, при этом мутации гена *ALK* в качестве предиктора прогноза отводилась скромная роль [7]. Однако группами сравнения были случаи с клиническими стадиями I–IV, и это нельзя считать корректной выборкой. В нашем исследовании стадия процесса была взаимосвязана с прогнозом значимо меньше, чем размер опу-

холи и показатель N ($\chi^2 = 5,6, p = 0,01; \chi^2 = 6,4, p = 0,01; \chi^2 = 9,6, p = 0,001$ соответственно). Мутация *ALK* была важным прогностическим биомолекулярным критерием при Ак лёгкого I–II клинической стадии ($\chi^2 = 7,7, p = 0,005$). Такая высокая значимость прослеживается не во всех работах, и одна из главных причин такого разброса – многофакторный анализ с регрессионной моделью Кокса в группах поздних клинических стадий III–IV, при которых все остальные критерии становятся малозначимыми. Вместе с тем при наличии мутации *ALK*, по данным различных авторов, 5-летняя выживаемость колеблется от 63,3% (при отсутствии мутации) до 47,8% (при её наличии) [8]. Амплификация *Her2/Neu* в нашей модели обладала значимо минимальной взаимосвязью с прогнозом относительно всех изученных маркеров ($\chi^2 = 5,3, p = 0,02$), что совпадает с данными мировых исследований [9].

Выводы

1. Ведущим независимым клинико-морфологическим критерием выживаемости при Ак лёгкого TI–II клинических стадий служит показатель N.
2. Из биомолекулярных критериев ведущим параметром стала мутация гена *ALK* в клетках Ак лёгкого. Этот маркер – второй по значимости в многофакторной прогностической регрессионной модели по Коксу.
3. Менее важными критериями выживаемости при Ак лёгкого являются размер опухоли, стадия процесса и амплификация гена *Her2/Neu*.
4. Данные о прогностической значимости мутации гена *ALK* значительно колеблются по данным различных авторов, что требует дальнейшего детального изучения.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Lee J.K., Park H.S., Kim D.W. et al. Comparative analyses of overall survival in patients with anaplastic lymphoma kinase-positive and matched wild-type advanced nonsmall cell lung cancer. *Cancer*. 2012; 118: 3579–86.
2. Soda M., Choi Y.L., Enomoto M. et al. Identification of the transforming *EML4-ALK* fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature*. 2007; 448: 561–6.
3. Al-Saad S., Al-Shibli K., Donnem T., Andersen S., Bremnes R.M., Busund L.T. Clinical significance of epidermal growth factor receptors in non-small cell lung cancer and a prognostic role for HER2 gene copy number in female patients. *J. Thorac. Oncol.* 2010; 5: 1536–43.
4. Kwak E.L., Bang Y.J., Camidge D.R. et al. Anaplastic lymphoma kinase inhibition in non-small-cell lung cancer. *N. Engl. J. Med.* 2010; 363: 1693–703.
5. Mino-Kenudson M., Chirieac L.R., Law K. et al. A novel, highly sensitive antibody allows for the routine detection of *ALK*-rearranged lung adenocarcinomas by standard immunohistochemistry. *Clin. Cancer Res.* 2010; 16: 1561–71.
6. Demidova I., Grinevich V., Avdalian A. et al. Detection of *ALK* rearrangements in 4002 Russian patients: The utility of different diagnostic approaches. *Lung Cancer*. 2017; 103: 17–23.
7. Warth A., Penzel R., Lindenmaier H., Brandt R., Stenzinger A., Herpel E. et al. EGFR, KRAS, BRAF and *ALK* gene alterations in lung adenocarcinomas: patient outcome, interplay with morphology and immunophenotype. *Eur. Respir. J.* 2014; 43: 872–3.
8. Lee J.O., Kim T.M., Lee S.H. et al. Anaplastic lymphoma kinase translocation: a predictive biomarker of pemetrexed in patients with non-small cell lung cancer. *J. Thorac. Oncol.* 2011; 6: 1474–80.
9. Nakamura H., Saji H., Ogata A., Hosaka M., Hagiwara M., Kawasaki N. et al. Correlation between encoded protein overexpression and copy number of the *HER2* gene with survival in non-small cell lung cancer. *Int. J. Cancer*. 2003; 103: 61–6.

Поступила 04.05.17
Принята к печати 25.05.17

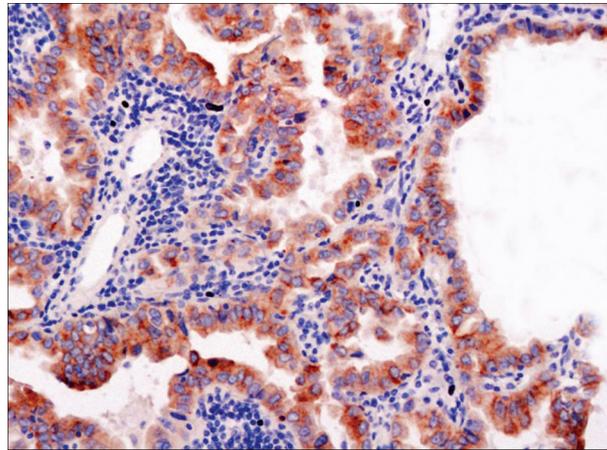


Рис.1. Положительная экспрессия ALK при преимущественно ацинарной Ак. Иммуногистохимический метод. Ув. 200.

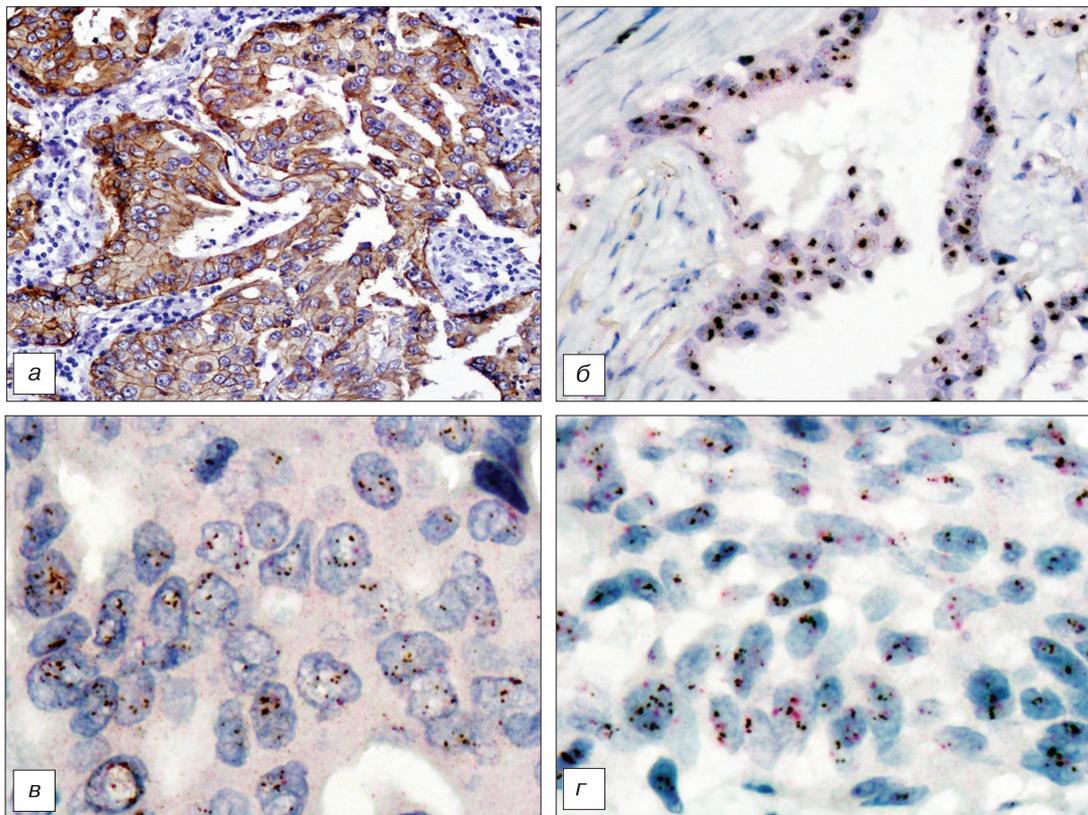


Рис. 2. Экспрессия белка Her2 и статус гена *Her2*, *CEP17* при Ак.
a – положительная экспрессия белка Her2 в преимущественно ацинарном типе, иммуногистохимический метод. Ув. 400; *б* – высокий уровень амплификации (кластерный) гена *Her2* в преимущественно ацинарном типе. Здесь и далее: SISH метод. Ув. 1000; *в* – низкий уровень амплификации (дискретный) гена *Her2* в преимущественно солидном типе; *г* – низкий уровень амплификация (дискретный) гена *Her2* совместно с увеличением *CEP17* в преимущественно солидном типе.