обзори
Торакална Медицина
Том X, бр.3
ноември 2018

УСТАНОВЯВАНЕ НА *EGFR* МУТАЦИОНЕН СТАТУС ОТ БРОНХОАЛВЕОЛАРЕН ЛАВАЖ ПРИ ПАЦИЕНТИ С ПЪРВИЧЕН БЕЛОДРОБЕН АДЕНОКАРЦИНОМ

Н. Янев, Д. Вълев, Е. Меков, Д. Маринова, Д. Костадинов

Катедра по белодробни болести, Медицински Факултет,
Медицински Университет – София

Резюме

В последните години се наблюдава революция в геномното профилиране и молекулярното типизиране на белодорбния карцином. Пълното геномно профилиране е препоръчително за преценка на оптимална персонализирана терапия. Рецепторът на епидермалния растежен фактор (EGFR) е ключов онкоген за провеждане на таргетна терапия. Златен стандарт за определяне на EGFR мутационния статус са хистологични материали, взети чрез бронхоскопски метод (трансбронхиална биопсия, щипкова биопсия и др.). Но в някои случаи е трудно да бъде взета достатъчно туморна тъкан за морфологична и молекулярна верификация и се налага избор на друг хирургичен биопсичен метод. Бронхоскопските биопсии и цитологични материали, вземането на които се свързва с по-висок риск от усложнения, са единствения материал при повече от 80% от пациентите с недребноклетъчен карцином. Изолирането на свободноциркулираща туморна ДНК (ctDNA) от периферна кръв и други телесни течности (лаваж, плеврален пунктат), известно като "течна биопсия", е неинвазивен метод, алтернатива на тъканната биопсия за провеждане на молекулярен скрининг при пациенти на таргетна терапия. Ограничен брой проучвания са насочени към изследване на EGFR мутационен статус от брохоалвеоларен лаваж. Последният има редица предимства – полуинвазивен метод, свързан с по-малък риск за пациента, дори и в по-напредналите стадии на заболяването.

Ключови думи: белодробен карцином, бронхоалвеоларен лаваж, EGFR.

reviews
Thoracic Medicine
Volume X, Issue 3
November 2018

DETERMINATION OF *EGFR* MUTATION STATUS FROM BRONCHOALVEOLAR LAVAGE IN PATIENTS WITH PRIMARY PULMONARY ADENOCARCINOMA

N. Yanev, D. Valev, E. Mekov, D. Marinova, D. Kostadinov

Department of Pulmonary Diseases, Medical Faculty,
Medical University – Sofia, Bulgaria

Abstract

In recent years, there has been a revolution in genomic profiling and molecular typing of lung carcinoma. Full genomic profiling is recommended for assessment of optimal personalized therapy. The epidermal growth factor receptor (EGFR) is a key oncogene for targeted therapy. A gold standard for determining EGFR mutation status is histological specimens taken by a bronchoscopic method (transbronchial biopsy, forceps biopsy, etc.) but it is often difficult to get enough tumour tissue for morphological and molecular verification and other surgical procedure is required. Bronchoscopic biopsies and cytological materials which are associated with a higher risk of complications are the only material in over 80% of patients with non-small cell carcinoma. Isolation of free circulating tumour DNA (ctDNA) in peripheral blood and other body fluids (lavage, pleural effusion) is known as 'liquid biopsy' and is a non-invasive method, an alternative to tissue biopsy for conducting molecular screening in patients on targeted therapy. A limited number of studies investigate EGFR mutation status from a bronchoalveolar lavage. The latter has a number of advantages – a semi-invasive method associated with a lower risk for the patient, even in advanced stages of the disease.

Keywords: lung cancer, bronchoalveolar lavage, EGFR.

Торакална Медицина
Том X, бр.3
ноември 2018

В последните години се наблюдава революция в геномното профилиране и молекулярното типизиране на белодорбния карцином. Пълното геномно профилиране е препоръчително за преценка на оптимална персонализирана терапия. Рецепторът на епидермалния растежен фактор (EGFR) е ключов онкоген за провеждане на таргетна терапия, наред с други онкогени като ALK, BRAF, MET и ROS. Лечение с първа и втора генерация EGFR тирозин-киназни инхибитори като erlotinib, gefitinib и afatinib се пропръчва при пациенти с чувсвителни мутации (Exon 19 делеции, L858R) в киназния домейн на гена на EGFR (1).

Мултицентрово проучване, проведено в България при 1427 пациента с недребноклетъчен карцином, установява по-висока честота на EGFR положителен мутационен статус при пациенти с аденокарцином (12.5%), жени (19.4%), непушачи (22.9%) и такива в напреднала възраст. Тези резултати са съпоставими с получените при изследвани пациенти в Северна Америка и Западна Европа (2).

Златен стандарт за определяне на EGFR мутационния статус са хистологични материали, взети чрез бронхоскопски метод (трансбронхиална биопсия, щипкова биопсия и др.). Но в някои случаи е трудно да бъде взета достатъчно туморна тъкан за морфологична и молекулярна верификация (3) и се налага избор на друг хирургичен биопсичен метод. Бронхоскопските биопсии и цитологични материали, вземането на които се свързва с по-висок риск от усложнения (4), са единствения материал при повече от 80% от пациентите с недребноклетъчен карцином (50.

От обобщаващи данни на *Spicer и сътрудници*, EGFR мутационен статус не е изследван при 19% от пациентите с недребноклетъчен карцином (6). Като основни причини се явяват: недостатъчно тъканен материал, тежко общо състояние на пациента и удължаване на времето за поставяне на диагнозата (7).

Резултатите от генетичните изследвания от биопсия на един участък от тумора не са отражение на туморната хетерогенност и не позволяват проследяване на молекулярната резистентост в процеса на лечение (8). Изолирането на свободноциркулираща туморна ДНК (ctDNA) от периферна кръв и други телесни течности (лаваж, плеврален пунктат), известно като "течна биопсия", е неинвазивен метод, алтернатива на тъканната биопсия за провеждане на молекулярен скрининг при пациенти на таргетна терапия. Чувствителността и специфичността на метода варира в зависимост от платформата на изследване и качеството на изследвания материал (9).

In recent years, there has been a revolution in genomic profiling and molecular typing of lung carcinoma. Full genomic profiling is recommended for assessment of optimal personalized therapy. The epidermal growth factor receptor (EGFR) is a key oncogene for targeted therapy along with other oncogenes like ALK, BRAF, MET, and ROS. Treatment with first and second generation EGFR tyrosine-kinase inhibitors such as erlotinib, gefitinib, and afatinib is recommended in patients with sensitive mutations (Exon 19 Deletions, L858R) in the kinase domain of the EGFR gene (1).

A multicenter study in 1427 non-small cell lung cancer (NSCLC) patients in Bulgaria found a higher incidence of EGFR positive mutation status in patients with adenocarcinoma (12.5%), women (19.4%), non-smokers (22.9%) and elderly. These results are comparable to those obtained among patients in North America and Western Europe (2).

A gold standard for determining EGFR mutation status is histological specimens taken by a bronchoscopic method (transbronchial biopsy, forceps biopsy, etc.) but it is often difficult to get enough tumour tissue for morphological and molecular verification (3) and other surgical procedure is required. Bronchoscopic biopsies and cytological materials which are associated with a higher risk of complications (4) are the only material in over 80% of patients with non-small cell carcinoma (5).

Spicer et al. in their study showed that EGFR mutation status was not determined in 19% of patients with non-small cell carcinoma (6). The main reasons are: inadequate tissue specimen, severe overall condition of the patient, and prolongation of time to diagnosis (7).

The results of genetic examinations from a biopsy in single tumour site are not a reflection of tumour heterogeneity and do not allow monitoring of molecular resistance in the treatment process (8). Isolation of free circulating tumour DNA (ctDNA) in peripheral blood and other body fluids (lavage, pleural effusion) is known as 'liquid biopsy' and is a non-invasive method, an alternative to tissue biopsy for conducting molecular screening in patients on targeted therapy. The sensitivity and specificity of the method varies depending on the research platform and the quality of the examined material (9).

Бързият растеж на туморната формация води до апоптоза и некроза. В някои случаи количеството на постапоптоичните остатъци и фрагменти надвишава фагоцитния клирънс и те попадат в системното кръвообращение, откъдето се изолират (10). Използването на плазма за провеждане на течна биопсия има известни ограничения поради изключително малкото количество ctDNA, което налага употреба на по-чувствителни диагностични методи, свързани с по-високи разходи (11, 12).

Резултати от метаанализ на проучвания с 1590 пациента за чувствителността на метода "течна биопсия" от кръвна плазма спрямо тъканна биопсия за определяне на мутационния статус показват съпоставимост на двата метода между 65-70% и висока специфичност – 88.5%. Авторите обаче не препоръчват метода поради по-ниската чувствителност спрямо хистологичен препарат (13).

Ограничен брой проучвания са насочени към изследване на EGFR мутационен статус от брохоалвеоларен лаваж. Последният има редица предимства – полуинвазивен метод, свързан с по-малък риск за пациента, дори и в по-напредналите стадии на заболяването. От друга страна въз основа на факта, че повече клетъчни остатъци, резултат на туморната апоптоза и некроза, се натрупват в локализирана зона в белите дробове преди да навлязат в съдовата система, концентрацията на ctDNA би била по-висока в бронхоалвеоларен лаваж (БАЛ), отклокото в плазма (14, 15). Това по-високо ниво на ctDNA би било по-подходящо за идентифициране на EGFR мутационния статус. Също така в БАЛ теоретично е възможно да има фрагменти ctDNA от различни участъци на туморната повърхност (туморна хетерогенност), което увеличава шанса за идентифициране на мутация от местоположение, от което не може да бъде взет материал с друг метод.

Проучване на *Schmidt и сътрудници* доказва възможността за изолиране на свободна туморна ДНК от лаваж (16). В проучване на Park мутационният статус е установен при 91,7% от БАЛ, като за целта е ползван високочувствителен метод (17). Проучване на *Buttitta и сътрудници* доказват EGFR мутационен статус в БАЛ чрез метода next- generation sequencing (NGS), като диагностичната чувствителност достига до 78.8% (18). За разлика от тях *Kim и сътрудници*, търсещи EGFR мутации в плазма, установяват чувствителност на PCR метода 16.1% (19).

PCR методът за установяване на мутационен статус е най-широко използвания в България. Проучването на *Бичев и сътрудници* (2)

The rapid growth of the tumour leads to apoptosis and necrosis. In some cases, the amount of post apoptotic residues and fragments exceeds the phagocytic clearance and they spill into the systemic circulation from where they are isolated [10]. The use of blood plasma for conducting a liquid biopsy has several limitations due to the very small amount of ctDNA, which requires the use of more sensitive diagnostic methods associated with higher costs (11, 12).

Results from a meta-analysis of 1590 patients regarding the sensitivity of liquid biopsy method from blood plasma compared to a tissue biopsy to determine the mutation status show comparability between the two methods between 65-70% and a high specificity – 88.5%. However, the authors do not recommend the method because of low sensitivity compared to a histological sample (13).

A limited number of studies investigate EGFR mutation status from a bronchoalveolar lavage. Bronchoalveolar lavage has a number of advantages – a semi-invasive method associated with a lower risk for the patient, even in advanced stages of the disease. On the other hand, due to the fact that more cellular residues resulting from tumour apoptosis and necrosis accumulates in a localized area in the lungs before entering the vascular system, the ctDNA concentration should be higher in bronchoalveolar lavage (BAL) rather than in plasma (14, 15). This higher level of ctDNA would be more appropriate to identify the EGFR mutation status. Moreover, in BAL it is possible in theory to have ctDNA fragments from different regions of the tumour surface (tumour heterogeneity), which increases the chance of identifying a mutation from a location which is inaccessible by other method for obtaining a material.

A study of *Schmidt et al.* proves the potential of free tumour DNA isolation from a lavage (16). In a study of Park, BAL identifies the mutation status in 91.7% using high-sensitivity method (17). *Buttitta et al.* identified EGFR mutation status in BAL by next-generation sequencing (NGS) with diagnostic sensitivity up to 78.8% (18). In contrast, *Kim et al.* reported 16.1% sensitivity of PCR method for identifying EGFR mutations in plasma (19).

The most widely used method for determining mutation status in Bulgaria is PCR. A study by *Bichev et al.* (2) was conducted on a Cobas

е проведено на система Cobas, която е икономически по-изгодна за провеждане на рутинни ежедневни изследвания, и за нея е натрупана значителна база данни за периода от 2015 г. насам за пациенти с аденокарцином. По данни от същия автор, чувствителността на метода за установяване на мутационен статус при изследване на периферна кръв е 7%, а от тъканна проба – до 12.5% (2).

В заключение, установяването на EGFR мутационен статус от БАЛ ще доведе до следните приноси: 1) бронхоскопски инвазивен метод с по-нисък риск за пациента; 2) възможност за поставяне на диагноза при пациенти, неподходящи за инвазивна методика, или 3) с недостатъчен тъканен материал; 4) установяване на мутационния статус преди започване на таргетното лечение; 5) проследяване с оглед установяване на терапевтична резистентност.

system that is more cost-effective for routine examination, and a significant database of adenocarcinoma patients has been accumulated since 2015. Based on data from the same author, the method sensitivity of mutation status detection in peripheral blood sample is 7%, and in tissue sample – up to 12.5% (2).

In conclusion, identifying the EGFR mutation status by BAL will lead to the following contributions: 1) a bronchoscopic method with lower risk for the patient; 2) possibility of diagnosing patients not suitable for invasive methods or 3) with inadequate tissue sample; 4) establishing the mutation status prior starting the targeted treatment; 5) follow-up for establishing a therapeutic resistance.

Thoracic Medicine
Volume X, Issue 3
November 2018

Книгопис:
References:

1. Novello S, Barlesi F, Califano R, et al. Metastatic non-small-cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines or diagnosis, treatment and follow-up. Ann Oncol 2016;27:v1 – v27.
2. Bichev SN, Marinova DM, Slavova YG, Savov AS. Epidermal growth factor receptor mutations in East European non-small cell lung cancer patients. Cell Oncol 2015;38:145–53.
3. Lindeman NI, Cagle PT, Beasley MB, et al. Molecular testing guideline for selection of lung cancer patients for EGFR and ALK tyrosine kinase inhibitors guideline from the College of American Pathologists, International Association for the Study of Lung Cancer, and Association for Molecular Pathology. J Mol Diagn 2013;15:415–53.
4. Lokhandwala T, Bittoni MA, Dann RA, et al. Costs of Diagnostic Assessment for Lung Cancer: A Medicare Claims Analysis. Clin Lung Cancer 2017;18:e27-e34.
5. Bubendorf L, Lantuejoul S, de Langen AJ, et al. Nonsmall cell lung carcinoma: diagnostic difficulties in small biopsies and cytological specimens: Number 2 in the Series "Pathology for the clinician" Edited by Peter Dorfmüller and Alberto Cavazza. Eur Respir Rev 2017;26:170007.
6. Spicer J, Tischer B, Peters M. EGFR mutation testing and oncologist treatment choice in advanced NSCLC: global trends and differences. Ann Oncol 2015;26:i57-i61.
7. Reck M, Hagiwara K, Han B et al. ctDNA determination of EGFR mutation status in European and Japanese patients with advanced NSCLC: The ASSESS study. J Thorac Oncol 2016;11:1682–9.
8. Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, et al. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. N Engl J Med 2012;366:88 –92.
9. Sacher AG, Komatsubara KM, Oxnard GR. Application of Plasma Genotyping Technologies in Non-Small Cell Lung Cancer: A Practical Review. J Thorac Oncol 2017;12:1344–56.
10. Diehl F, Schmidt K, Choti MA, et al. Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. Nat Med 2008;14:985–90.
11. Zachariah RR, Schmid S, Buerki N, Radpour R, Holzgreve W, Zhong X. Levels of circulating cell-free nuclear and mitochon- drial DNA in benign and malignant ovarian tumors. Obstet Gynecol 2008;112:843–50.
12. Zanetti-Dallenbach RA, Schmid S, Wight E, et al. Levels of circulating cell-free serum DNA in benign and malignant breast lesions. Int J Biol Markers 2007;22:95–9.
13. Li Z, Zhang Y, Bao W, Jiang C. Insufficiency of peripheral blood as a substitute tissue for detecting EGFR mutations in lung cancer: a meta-analysis. Target Oncol 2014;9:381–8.
14. Jahr S, Hentze H, Englisch S, et al. DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. Cancer Res 2001;61:1659–65.
15. Stroun M, Lyautey J, Lederrey C, Olson-Sand A, Anker P. About the possible origin and mechanism of circulating DNA apoptosis and active DNA release. Clin Chim Acta 2001;313:139–42.
16. Schmidt B, Carstensen T, Engel E, Jandrig B, Witt C, Fleis- chhacker M. Detection of cell-free nucleic acids in bronchial lavage fluid supernatants from patients with lung cancer. Eur J Cancer 2004;40:452–60.
17. Park S, Hur J, Lee K, et al. Assessment of EGFR mutation status using cell-free DNA from bronchoalveolar lavage fluid. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM) 2017;55(10):1489–95.
18. Buttitta F, Felicioni L, Del Grammastro M, et al. Effective assessment of egfr mutation status in bronchoalveolar lavage and pleural fluids by next-generation sequencing. Clin Cancer Res 2013;19:691–8.
19. Kim HR, Lee SY, Hyun DS, et al. Detection of EGFR mutations in circulating free DNA by PNA-mediated PCR clamping. J Exp Clin Cancer Res 2013;32:50.

Кореспонденция
Д-р Николай Янев, дм
МБАЛББ „Света София“ ЕАД
Бул. „Акад. Иван Гешов“ 19
Медицински Факултет
Медицински Университет – София

Correspondence
Nikolay Yanev, MD, PhD
MHATPD 'Sveta Sofia'
19 Acad. Ivan Geshov blvd.
Medical Faculty
Medical University – Sofia
Bulgaria

e-mail:
dr.nikolay.yanev@gmail.com