

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-3-68-78>

# Структурные изменения гена *EGFR* в образцах глиобластомы как фактор прогноза и молекулярная мишень для терапии

В.О. Варачев<sup>1</sup>, О.Ю. Сусова<sup>2</sup>, А.А. Митрофанов<sup>2</sup>, Г.С. Краснов<sup>1</sup>, Д.Р. Насхлеташвили<sup>2</sup>, Ю.И. Амму<sup>1,3</sup>, С.Д. Бежанова<sup>2</sup>, Н.В. Севян<sup>2</sup>, Е.В. Прозоренко<sup>2</sup>, А.Х. Бекашев<sup>2</sup>, Т.В. Наседкина<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБУН «Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук»; Россия, 119991 Москва, ул. Вавилова, 32;

<sup>2</sup>ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115522 Москва, Каширское шоссе, 24;

<sup>3</sup>ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова»; Россия, 105064 Москва, Малый Казенный пер., 5А

**Контакты:** Татьяна Васильевна Наседкина [tanased06@rambler.ru](mailto:tanased06@rambler.ru)

**Введение.** Рецептор эпидермального фактора роста (EGFR) – трансмембранный белок семейства рецепторных тирозинкиназ, который активируется при различных видах рака (немелкоклеточном раке легкого, колоректальном раке, злокачественных опухолях головы и шеи). В глиальных опухолях головного мозга повышенный уровень экспрессии EGFR характерен для наиболее агрессивного подтипа злокачественных новообразований – глиобластомы. Частыми структурными изменениями EGFR при данной патологии являются амплификация участка хромосомы, в котором расположен ген *EGFR*, точечные мутации, а также делеция 2–7-го экзонов гена *EGFR*, приводящая к образованию транскрипта *EGFRvIII*.

**Цель исследования** – определение структурных изменений гена *EGFR* (точечные мутации и амплификация гена *EGFR*, транскрипт *EGFRvIII*) в образцах опухоли с помощью различных методов и оценка их потенциальной клинической значимости.

**Материалы и методы.** В исследование включены 75 пациентов с глиомами головного мозга (из них 70 с глиобластомами) в возрасте от 34 до 78 лет (средний возраст 56 лет). Выделение ДНК и РНК проводили из свежемороженой ткани опухоли, а также из лейкоцитов периферической крови. Мутации в гене *EGFR* выявляли методом секвенирования нового поколения (next generation sequencing, NGS), для определения копияности участков 7-й хромосомы проводили сравнительный анализ (норма – опухоль) частот  $\beta$ -аллелей ( $\beta$  allele frequency, BAF). Для подтверждения амплификации гена *EGFR* в образцах опухоли использовали полимеразную цепную реакцию в реальном времени, для обнаружения варианта *EGFRvIII* – полимеразную цепную реакцию с обратной транскрипцией.

**Результаты.** Методом NGS в образцах глиобластомы выявлены 11 (16 %) мутаций в кодирующих участках гена *EGFR*, амплификация гена *EGFR* обнаружена в 26 (37 %) случаях; в 5 образцах глиом (астроцитомы, олигодендроглиомы) структурные изменения гена *EGFR* не определены. Все случаи амплификации гена *EGFR*, выявленные с помощью NGS, подтверждены методом полимеразной цепной реакции в реальном времени. Для поиска транскрипта *EGFRvIII* исследован 31 образец РНК опухоли, в 12 из которых присутствовала амплификация *EGFR*. Транскрипт *EGFRvIII* выявлен только в образцах с амплификацией гена *EGFR* (в 4 (33 %) из 12 случаев). Для оценки клинической значимости структурных изменений гена сравнивали частоту их встречаемости в образцах первичной и рецидивной глиобластомы.

**Заключение.** Метод NGS позволяет выявлять как точечные мутации, так и амплификацию гена *EGFR*. Амплификация данного гена в 33 % случаев ассоциирована с мутацией *EGFRvIII*. Не выявлено статистически значимых различий в частоте структурных изменений гена *EGFR* между первичными и рецидивными глиобластомами.

**Ключевые слова:** ген *EGFR*, амплификация гена *EGFR*, мутация, транскрипт *EGFRvIII*, глиобластома, секвенирование нового поколения, рецидив

**Для цитирования:** Варачев В.О., Сусова О.Ю., Митрофанов А.А. и др. Структурные изменения гена *EGFR* в образцах глиобластомы как фактор прогноза и молекулярная мишень для терапии. Успехи молекулярной онкологии 2024;11(3):68–78.

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-3-68-78>

## Structural alterations of the *EGFR* gene in glioblastoma samples as a prognostic factor and molecular target for therapy

V.O. Varachev<sup>1</sup>, O.Yu. Susova<sup>2</sup>, A.A. Mitrofanov<sup>2</sup>, G.S. Krasnov<sup>1</sup>, D.R. Naskhletashvili<sup>2</sup>, Yu.I. Ammour<sup>1,3</sup>, S.D. Bezhanova<sup>2</sup>, N.V. Sevyan<sup>2</sup>, E.V. Prozorenko<sup>2</sup>, A.Kh. Bekyashev<sup>4</sup>, T.V. Nasedkina<sup>1</sup>

<sup>1</sup>V.A. Engelhardt Institute of Molecular Biology of the Russian Academy of Sciences; 32 Vavilova St., Moscow 119991, Russia;

<sup>2</sup>N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115522, Russia;

<sup>3</sup>I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera; 5A Malyy Kazennyy Pereulok, Moscow 105064, Russia

**Contacts:** Tatyana Vasilyevna Nasedkina [tanased06@rambler.ru](mailto:tanased06@rambler.ru)

**Introduction.** Epidermal growth factor receptor (EGFR) is a transmembrane protein of the receptor tyrosine kinase family that is activated in various cancers (non-small cell lung cancer, colorectal cancer, head and neck tumors). In glial brain tumors, increased EGFR expression levels are characteristic of the most aggressive subtype, glioblastoma. Frequent structural changes of *EGFR* in glioblastoma are amplification of the chromosome region where the *EGFR* gene is located, point mutations, as well as deletion of exons 2–7 of the *EGFR* gene leading to the formation of *EGFRvIII* transcript.

**Aim.** To determine structural changes of the *EGFR* gene (point mutations and amplification of the *EGFR* gene, *EGFRvIII* transcript) in tumor samples using different methods and to evaluate their potential clinical significance.

**Materials and methods.** The study included 75 patients with brain gliomas (70 of them glioblastoma) aged 34 to 78 years (mean age 56 years). DNA and RNA isolation was performed from fresh frozen tumor tissue, as well as from peripheral blood leukocytes. *EGFR* gene mutations were determined by next-generation sequencing (NGS), and  $\beta$  allele frequency (BAF) comparative analysis (normal-tumor) was performed to determine the copy number of chromosome 7 regions. Quantitative polymerase chain reaction was used to confirm the *EGFR* gene amplification in tumor samples, and reverse transcription-PCR was used to detect *EGFRvIII* variant.

**Results.** The NGS method revealed 11/70 (16 %) mutations in coding regions of *EGFR* gene in glioblastoma samples, the *EGFR* gene amplification was detected in 26/70 (37 %) cases; no structural changes of the *EGFR* gene were detected in 5 glioma samples (astrocytoma, oligodendroglioma). All cases of *EGFR* gene amplification detected by NGS were confirmed by quantitative polymerase chain reaction. To search for *EGFRvIII* transcript, 31 tumor RNA samples were examined, of which *EGFR* amplification was present in 12 samples. *EGFRvIII* transcript was detected only in samples with *EGFR* gene amplification – 4/12 (33 %). To assess the clinical significance of structural gene alterations, the frequency of occurrence in primary and recurrent glioblastoma samples was compared.

**Conclusion.** The NGS method allows to detect both point mutations and amplification of the *EGFR* gene. The *EGFR* gene amplification was associated with *EGFRvIII* mutation in 33 % of cases. No statistically significant differences in the frequency of structural changes in the *EGFR* gene between primary and relapsed glioblastomas were found.

**Keywords:** *EGFR* gene, *EGFR* gene amplification, mutation, *EGFRvIII* transcript, glioblastoma, next-generation sequencing, recurrent tumor

**For citation:** Varachev V.O., Susova O.Yu., Mitrofanov A.A. et al. Structural alterations of the *EGFR* gene in glioblastoma samples as a prognostic factor and molecular target for therapy. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2024;11(3):68–78. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-3-68-78>

### ВВЕДЕНИЕ

Ген *EGFR* (epidermal growth factor receptor, ErbB-1) кодирует трансмембранный рецептор эпидермального фактора роста (EGFR), который экспрессируется на поверхности как нормальных, так и трансформированных эпителиальных клеток и участвует в регуляции клеточного роста и дифференцировки. Белок EGFR принадлежит семейству рецепторных тирозинкиназ ErbB, к которому относятся также ErbB2 (HER2/c-neu), ErbB3 (HER3) и ErbB4 (HER4) [1]. Рецептор имеет молекулярную массу 170 кДа и располагается на коротком плече 7-й хромосомы в локусе 7p11.2.

В нормальных клетках EGFR может быть активирован эпидермальным фактором роста (EGF), трансформирующим фактором роста  $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ) или

другими лигандами [2]. После активации происходят димеризация EGFR и аутофосфорилирование остатков тирозина на С-концевых доменах рецептора, что приводит к активации белков, расположенных ниже в сигнальном каскаде RAS/RAF/МАРК [3]. Показано, что EGFR конститутивно активирован в клетках различных эпителиальных злокачественных опухолей (немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ), колоректального рака, опухолей головы и шеи [4]); также его активность повышается при воспалительных процессах, связанных с развитием псориаза, экземы и атеросклероза [5].

При глиобластоме (ГБМ) ген *EGFR* является наиболее часто амплифицированным и гиперэкспрессированным протоонкогеном. Амплификация *EGFR* обнаруживается примерно в 40–50 % случаев ГБМ,

мутации *EGFR* встречаются в 10–26 % этих опухолей [6–8]. Классификация Всемирной организации здравоохранения 2021 г. учитывает амплификацию гена *EGFR* в качестве важного диагностического критерия, позволяющего поставить диагноз «глиобластома IV степени злокачественности» в случае астроцитомы с диким типом генов *IDH1/2* (*IDH-wildtype*) даже при отсутствии очевидных гистопатологических признаков [9]. Примерно в 50 % случаев глиобластом с амплифицированным геном *EGFR* выявляют вариант транскрипта *EGFRvIII*, который образуется в результате делеции 2–7-го экзонов, кодирующих часть внеклеточного домена [10]. Эта перестройка приводит к повышенной экспрессии усеченного рецепторного белка, неспособного взаимодействовать с лигандами и являющегося конститутивно активным [11].

Довольно спорным является вопрос относительно прогностического значения структурных изменений гена *EGFR* при ГБМ. В ходе некоторых исследований выявлена корреляция мутаций и амплификации гена *EGFR* с более благоприятным исходом [8], в то время как результаты других исследований демонстрируют связь с худшим прогнозом [12, 13], а также с менее выраженным ответом на анти-VEGFR (VEGFR – рецептор фактора роста эндотелия сосудов) терапию бевацизумабом [14].

Согласно современным представлениям ген *EGFR* может не только служить диагностическим и прогностическим маркером, но и представлять интерес как лекарственная мишень при ГБМ, благодаря высокой частоте структурных изменений при этом типе опухоли [15]. Однако в отличие от других опухолей с активированным *EGFR*, ГБМ слабо реагирует на применение *EGFR*-ингибиторов [16]. Одна из возможных причин резистентности ГБМ к молекулярно-направленной анти-*EGFR*-терапии может заключаться в том, что при данной патологии мутации в гене *EGFR* чаще всего происходят во внеклеточном, а не во внутриклеточном киназном домене, как при НМРЛ, поэтому ингибиторы, нацеленные на инактивацию киназной функции *EGFR*, оказываются менее эффективными. В качестве опухолеспецифической мишени при иммунотерапии, включая подходы на основе антител, генетически модифицированных Т-клеток и создания дендритных вакцин, рассматривают белок *EGFRvIII*, который содержит уникальную пептидную последовательность, образующуюся при слиянии 1-го и 8-го экзонов [17]. Однако иммунотерапия не дала результатов в клиническом исследовании III фазы у пациентов с впервые выявленным раком [18].

Таким образом, дальнейшие исследования спектра и частоты структурных изменений гена *EGFR* являются актуальными и имеют большое значение для выбора тактики лечения и поиска новых, более эффективных методов воздействия на молекулярные мишени в опухолевых клетках ГБМ.

**Цель исследования** – определение структурных изменений гена *EGFR* (точечные мутации и амплификация гена *EGFR*, транскрипт *EGFRvIII*) в образцах ГБМ с помощью различных методов и оценка их потенциальной клинической значимости при сравнении мутационного профиля первичных и рецидивных опухолей.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование вошли 75 пациентов с ГБМ ( $n = 70$ ) и диффузной глиомой (астроцитомой, олигодендроглиомой) ( $n = 5$ ) в возрасте от 34 до 78 лет (средний возраст 56 лет). Среди них были 46 мужчин и 29 женщин. Клинический материал включал образцы свежесзамороженной ткани опухоли и периферической крови.

ДНК экстрагировали из ткани и крови с помощью набора DNeasy Blood and Tissue Kit (GmbH, Hilden, Германия) в соответствии с протоколом производителя, РНК – из свежесзамороженной ткани с использованием RNeasy Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Германия) в соответствии с протоколом производителя. Концентрации ДНК и РНК, а также отношение 260/280 определяли с помощью спектрофотометра NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, США).

Амплификацию гена *EGFR* определяли с помощью полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) с последующим обчислением данных методом  $\Delta\Delta Ct$ . Использовали условия реакции, описанные ранее [19]. Для каждого образца ДНК опухоли или периферической крови проводили 2 ПЦР-РВ. В первую ПЦР-смесь были добавлены праймеры для гена *EGFR* (*EGFR-F* 5'-CACTGCCTCATCTCTCACCATC-3' и *EGFR-R* 5'-GACTCACCGTAGCTCCAGAC-3'), а во вторую – праймеры для референсного локуса на 2-й хромосоме *WI-3306* (*WI-3306-F* 5'-CATGACTGC-GAGCCCAAGATG-3' и *WI-3306-R* 5'-CAGGTGGT-GTCATCAGAATCAG-3'). Для образца опухоли определяли разницу в пороговом цикле  $Ct$  для контрольного гена *WI-3306* и гена *EGFR* ( $tumor\_Ct$ ). Также рассчитывали значение  $\Delta Ct$  для соответствующего образца нормальной ткани ( $blood\_Ct$ ). На основе этих данных определяли  $\Delta\Delta Ct = tumor\_Ct - blood\_Ct$ . Если  $2^{\Delta\Delta Ct} \geq 3$ , считали, что в образце опухоли присутствует амплификация гена *EGFR*.

Подготовка библиотек для секвенирования осуществлялась на платформе Illumina (США). Выделенную из замороженной ткани ДНК фрагментировали с помощью ультразвукового гомогенизатора S220 (Covaris, США). Подготовку образцов проводили по стандартному протоколу для приготовления библиотек KAPA Library Preparation Kit (Roche, Швейцария). Целевые последовательности ДНК отбирали с использованием панели жидких зондов KAPA HyperChoice (Roche, Швейцария), включающей кодирующие участки 812 генов, ассоциированных с развитием рака. Секвенирование проводили на платформе NextSeq2000 (Illumina, США) методом

**Таблица 1.** Соматические мутации в кодирующих участках гена *EGFR*, выявленные методом секвенирования нового поколения в образцах глиобластом *IDH-wt* (генотип дикого типа) ( $n = 70$ )

Table 1. Somatic mutations in coding regions of the *EGFR* gene detected by next generation sequencing in glioblastoma *IDH-wt* (wildtype genotype) samples ( $n = 70$ )

Образец Sample	Мутация Mutation	Аминокислотная замена Aminoacid change	Экзон Exon	ЧВА, % VAF, %	Патогенность Pathogenicity	Опухоль Tumor	Источник Source
G7*	c.866C>T	p.Ala289Val	7	48	ВП/П LP/P	ГБМ GBM	[21]
G22	c.787A>C	p.Thr263Pro	7	37	ВП/П LP/P	ГБМ GBM	[16, 21]
G27*	c.2308_2309insAAC	p.Asn771dup	20	–	НЗ VUS	РЛ, КРР LC, CRC	[22]
G28*	c.719G >T	p.Cys240Phe	6	63	П P	Не описан Unknown	–
G32*	c.1985T>A	p.Leu662Gln	17	89	ВП LP	ГЦК GCK	[23]
G36*	c.866C>T	p.Ala289Val	7	90	ВП/П LP/P	ГБМ GBM	[21]
G44*	c.685A>T	p.Ser229Cys	6	36	НЗ VUS	Глиома, РГШ Glioma, HNC	[23]
G56*	c.3337C>T	p.Gln1113Ter	28	90	ВП LP	Глиома, РЛ Glioma, LC	[23]
	c.754C>T	p.Arg252Cys	7	87	НЗ VUS	Глиома, ГБМ Glioma, GBM	[23]
G65	c.323G>A	p.Arg108Lys	3	39	ВП/П LP/P	ГБМ, РЛ GBM, LC	[23]
G69*	c.1793G>T	p.Gly598Val	15	30	П P	Глиома Glioma	[21]

\*Образцы с амплификацией гена *EGFR*.

**Примечание.** ЧВА – частота вариантного аллеля в образце опухоли; РЛ – рак легкого; КРР – колоректальный рак; ГЦК – гепатоцеллюлярная карцинома; РГШ – рак головы и шеи; НЗ – вариант неопределенного значения; ВП – вероятно патогенный вариант; П – патогенный вариант.

\*Samples with *EGFR* gene amplification.

**Note.** VAF – variant allele frequency in sample of the tumor; RL – lung cancer; CRC – colorectal cancer; HCC – hepatocellular carcinoma; HNC – head and neck cancer; VUS – variant of uncertain significance; LP – probably pathogenic variant; P – pathogenic variant.

парно-концевого чтения; среднее покрытие составило 300–500х.

Биоинформационный анализ проводили, как описано ранее [20]. Прочтения картировали на референсный геном человека GRCh37 (Ensembl release 75; hg19); для получения VCF-файлов использовали пакет GATK. Для оценки числа копий в различных участках генома (copy number variations, CNV) применяли сравнительный анализ частот  $\beta$ -аллелей ( $\beta$ -allele frequency, VAF) в парных образцах норма – опухоль. Отбирали все герминальные гетерозиготные варианты с частотой вариантного аллеля (variant allele frequency, VAF) от 40 до 60% в образце нормы и покрытием не менее 30 прочтений как в норме, так и в опухоли. Случаи вероятного изменения числа копий определяли, если

значения VAF для опухоли были >40–60 %, а различия в VAF между нормой и опухолью – >25 % ( $p < 0,05$ ). VAF-анализ позволяет выявлять отклонения в числе копий, но не всегда дает возможность определить характер этого отклонения (делеция, амплификация и т.д.). Аннотацию и интерпретацию выявленных вариантов проводили с помощью баз данных Varsome, ClinVar, COSMIC, для оценки патогенности использовали критерии Американского колледжа медицинской генетики и геномики (American College of Medical Genetics and Genomics, ACMG).

Транскрипт *EGFRvIII* выявляли методом ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) с последующей регистрацией результата с помощью электрофореза [23]. Для получения комплементарной ДНК проводили

реакцию обратной транскрипции, используя в качестве матрицы РНК опухоли, с помощью набора РЕБЕРТА-L (AmpliSens) согласно инструкции производителя. Применяли следующие праймеры, расположенные в 1-м и 8-м экзонах гена *EGFR*: EGFR-Ex1-F 5'-GAGTCGGGCTCTGGAGGAAA-3'; EGFR-Ex8-R 5'-CCATCTCATAGCTGTCTGGG-3'. В случае наличия матричной РНК (мРНК) *EGFRvIII* в ходе реакции образовывался продукт длиной 92 п.н., в случае наличия мРНК *EGFR* дикого типа – 893 п.н. В образцах с деградированной мРНК для обнаружения продукта *EGFR* дикого типа использовали праймеры EGFR-Ex1-F 5'-GAGTCGGGCTCTGGAGGAAA-3' и EGFR-Ex2-R 5'-CAGTTATTGAACATCCTCTGGAG-3', длина продукта составила 111 п.н.

Для секвенирования последовательности варианта *EGFRvIII* использовали праймеры EGFR-Fseq 5'-GAGTCGGGCTCTGGAGGAAA-3' и EGFR-Rseq 5'-GAGATCGCCACTGATGGAGGC-3', что позволило наработать продукт длиной 244 п.н. Секвенирование по Сэнгеру проводили на автоматическом секвенаторе Applied Biosystems 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems, США) на базе Центра коллективного пользования «Геном».

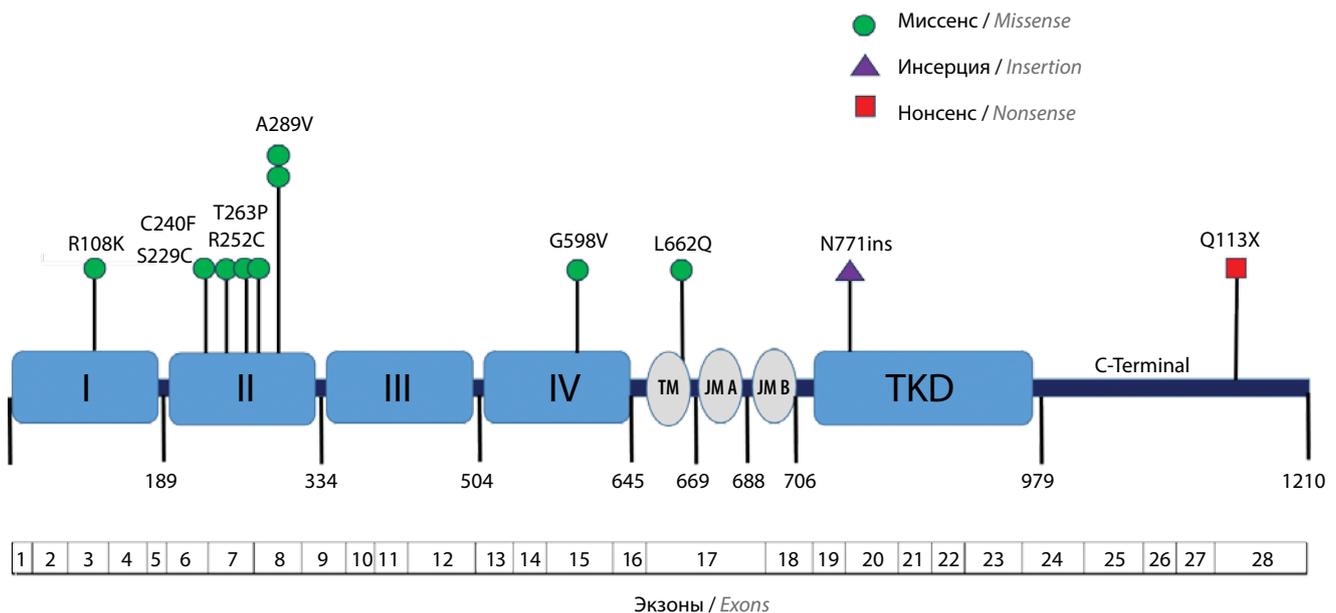
Статистический анализ проводили с помощью программы GraphPad InStat (США). Использовали точный тест Фишера, который позволяет оценить статистическую значимость различий при сравнительном анализе категориальных переменных для выборок малых размеров. Различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

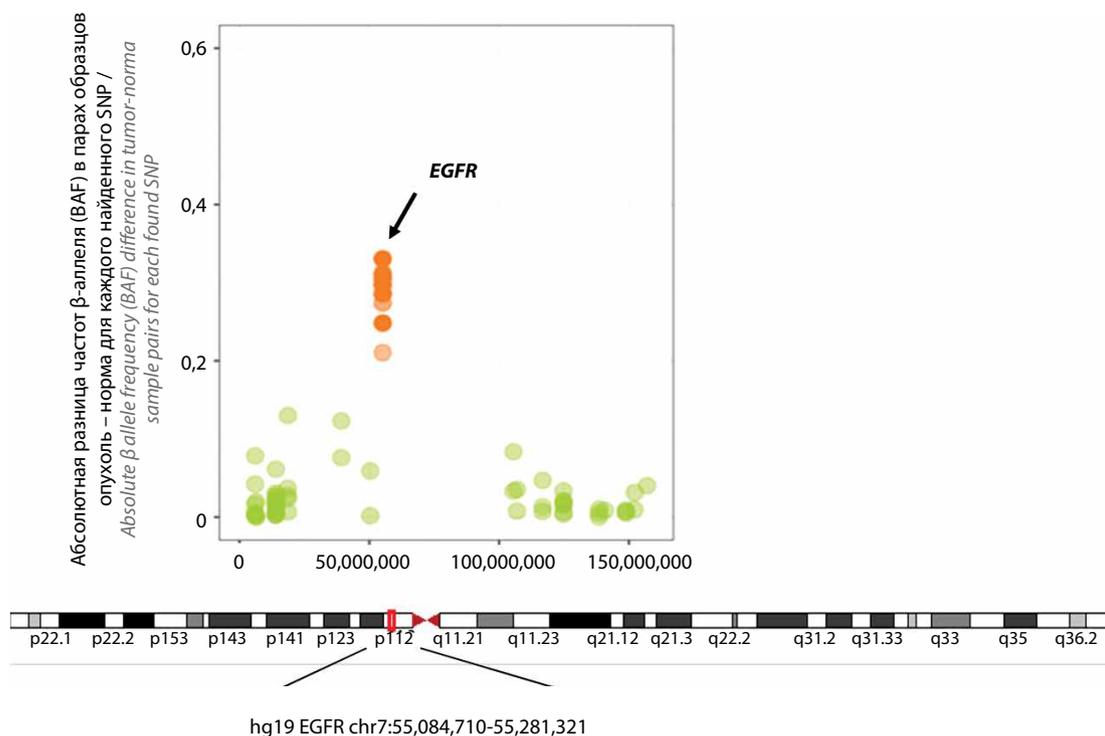
Методом NGS проанализированы 75 парных образцов опухоль – норма пациентов с глиомой (астроцитомой и олигодендроглиомой) и ГБМ. В образцах глиомы ( $n = 5$ ) выявлена мутация R132H в гене *IDH1*, таким образом, они составили группу глиом *IDH-mut*. Мутаций в гене *EGFR* в этой группе выявлено не было. Образцы ГБМ, не имеющие мутаций в генах *IDH1/2*, составили группу ГБМ *IDH-wt* ( $n = 70$ ). В них обнаружены 11 (16 %) мутаций *EGFR* у 10 пациентов, у 1 пациента в опухоли присутствовали 2 мутации в этом гене (табл. 1).

Большинство выявленных вариантов представлено миссенс-мутациями (в 9 (82 %) из 11 случаев), в 1 (9 %) случае обнаружена инсерция аминокислоты p.N771\_P772insN, в 1 (9 %) – однонуклеотидная замена с образованием стоп-кодона p.Q1113X. Более 70 % мутаций ранее определены в образцах глиомы или ГБМ, мутация p.Ala289Val (A289V), относящаяся к повторяющимся мутациям при ГБМ, в нашей выборке обнаружена в 2 образцах. Большая часть мутаций локализована во внеклеточных доменах, участвующих в связывании с лигандами (73 % случаев), также выявлены отдельные мутации в трансмембранном, тирозинкиназном и С-концевом доменах (рис. 1).

Определение частоты вариантных аллелей для отдельных однонуклеотидных полиморфизмов (single nucleotide polymorphism, SNP) с высокой частотой распространения в популяции (beta-allele frequency, BAF) вдоль длины хромосомы в парных образцах опухоль – норма и оценка потери гетеро-



**Рис. 1.** Распределение мутаций в гене *EGFR*, обнаруженных в образцах глиобластомы. I, II, III, IV – внеклеточные лиганд-связывающие домены; TM – трансмембранный домен; JM-A и JM-B – околосмембранные домены; TKD – тирозинкиназный домен; C-Terminal – С-концевой домен  
Fig. 1. Distribution of mutations in the *EGFR* gene identified in the glioblastoma samples. I, II, III, IV – extracellular ligand-binding domains; TM – transmembrane domain; JM-A and JM-B – juxtamembrane domains; TKD – tyrosine kinase domain; C-Terminal – C-terminal domain



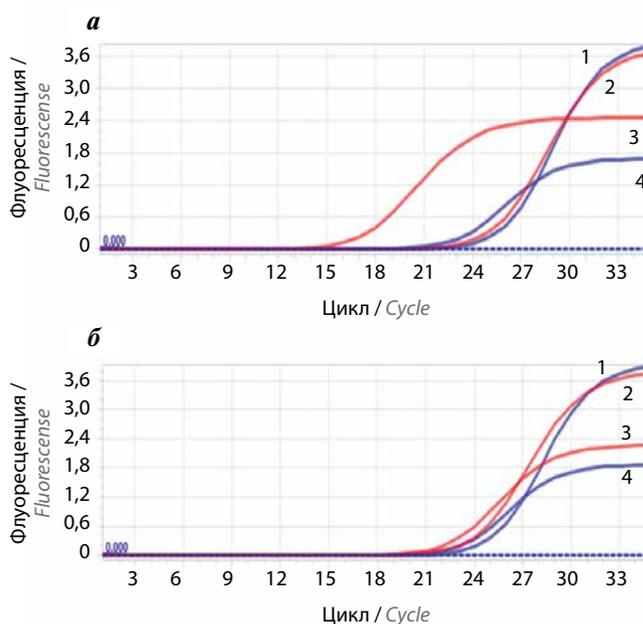
**Рис. 2.** Определение амплификации гена *EGFR* при сравнении частот  $\beta$ -аллелей (BAF) в опухоли и норме по длине 7-й хромосомы (оранжевым цветом отмечены однонуклеотидные полиморфизмы (SNPs), для которых выявлены статистически значимые различия)  
**Fig. 2.** Detection of *EGFR* gene amplification when comparing  $\beta$  allele frequencies (BAF) in tumor and norma along the length of chromosome 7 (single nucleotide polymorphisms (SNPs) for which statistically significant differences were detected are marked in orange)

зиготности позволяют выявить в опухолевых клетках участки хромосом с CNV. При анализе CNV в 7-й хромосоме наиболее часто обнаруживали сильное различие числа копий между опухолью и нормой в области 50–60 млн п.н., в которой локализован ген *EGFR* (рис. 2).

Высказано предположение, что изменение копийности данного участка хромосомы является амплификацией гена *EGFR*. Для подтверждения этого использовали метод ПЦР-РВ. Проводили сравнительный анализ пороговых циклов для гена *EGFR* и контрольного гена *WI-3306* в образце опухоли и нормальной ткани по методу  $\Delta\Delta C_t$  (рис. 3).

В образцах глиомы *IDH*-mut не выявлена амплификация гена *EGFR*. Одновременно с помощью двух методов проанализированы 62 образца *IDH*-wt ГБМ (табл. 2). Результаты определения амплификации гена *EGFR* совпали в 60 (97 %) случаях. В 8 (30 %) из 27 образцов с амплификацией гена *EGFR* также наблюдались точечные мутации в гене *EGFR* (см. табл. 1), в то время как в группе без амплификации мутации выявлены лишь в 2 (5 %) из 41 образца ( $p < 0,05$ ).

Наличие транскрипта *EGFRvIII* исследовали в 31 образце РНК, выделенной из свежемороженой опухолевой ткани пациентов с ГБМ *IDH*-wt. Из них в 12 образцах обнаружена амплификация гена *EGFR*, в 18 образцах она отсутствовала (рис. 4). Вариант *EGFRvIII* выявлен в 4 (33 %) из 12 образцов с амплифицированным геном *EGFR*, в образцах без его амплификации этот структурный вариант отсутствовал ( $p < 0,05$ ).



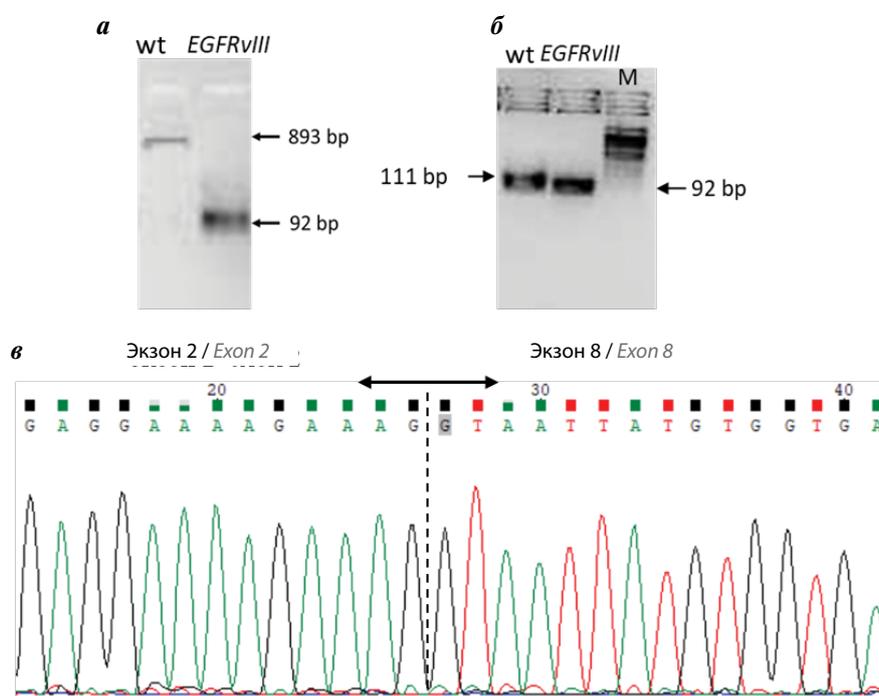
**Рис. 3.** Определение амплификации гена *EGFR* в образцах глиобластомы методом полимеразной цепной реакции в реальном времени: а – образец опухоли содержит амплификацию гена *EGFR*; б – в образце опухоли присутствует нормальное число копий гена *EGFR*. Кривые амплификации: 1 – ген *EGFR* в нормальной ткани; 2 – ген *WI-3306* в нормальной ткани; 3 – ген *EGFR* в опухоли; 4 – ген *WI-3306* в опухоли  
**Fig. 3.** Determination of *EGFR* gene amplification in glioblastoma samples by quantitative polymerase chain reaction: а – tumor sample contains *EGFR* gene amplification; б – normal number of the *EGFR* gene copies is present in the tumor sample. Amplification curves: 1 – the *EGFR* gene in normal tissue; 2 – the *WI-3306* gene in normal tissue; 3 – the *EGFR* gene in tumor; 4 – the *WI-3306* gene in tumor

**Таблица 2.** Результаты определения амплификации гена *EGFR* в образцах глиобластом *IDH-wt* (генотип дикого типа) ( $n = 70$ ),  $n$  (%)  
**Table 2.** Results of the *EGFR* gene amplification analysis in glioblastoma *IDH-wt* samples ( $n = 70$ ),  $n$  (%)

Статус гена <i>EGFR</i> Status of the <i>EGFR</i> gene	ПЦР-РВ ( $\Delta\Delta Ct$ ) ( $n = 68$ ) qPCR ( $\Delta\Delta Ct$ ) ( $n = 68$ )	NGS (BAF-анализ) ( $n = 63$ ) NGS (BAF-analysis) ( $n = 63$ )
Есть амплификация Amplification is present	27 (40)	25 (40)
Нет амплификации No amplification	41 (60)	38 (60)

**Примечание.** ПЦР-РВ – полимеразная цепная реакция в реальном времени; NGS – секвенирование нового поколения; BAF – частоты  $\beta$ -аллелей.

**Note.** PCR-RV – real-time polymerase chain reaction; NGS – next generation sequencing; BAF –  $\beta$ -allele frequency.



**Рис. 4.** Определение транскрипта *EGFRvIII*: а – электрофореграмма продуктов полимеразной цепной реакции (ПЦР) длиной 893 п.н. (*EGFR* дикого типа) и 92 п.н. (*EGFRvIII*); б – электрофореграмма продуктов ПЦР длиной 111 п.н. (*EGFR* дикого типа) и 92 п.н. (*EGFRvIII*) в случае деградированной ДНК; в – фрагмент хроматограммы сиквенса *EGFRvIII*, пунктиром и стрелками отмечено место слияния 2-го и 8-го экзонов (bp – нуклеотидная пара, п.н.)

**Fig. 4.** Detection of *EGFRvIII* transcript: а – electropherogram of 893 bp (wild-type *EGFR*) and 92 bp (*EGFRvIII*) polymerase chain reaction (PCR) products; б – electropherogram of 111 bp (wild-type *EGFR*) and 92 bp (*EGFRvIII*) PCR products in case of degraded DNA; в – a fragment of the *EGFRvIII* sequence chromatogram, dotted lines and arrows indicate the site of fusion of exons 2 and 8 (bp – base pair)

Операция по удалению опухоли проведена 1 из 51 пациентов с ГБМ *IDH-wt* (первичная ГБМ). У 19 больных с ГБМ *IDH-wt* материал опухоли получен в результате повторного хирургического вмешательства (рецидивная ГБМ). Проведен также сравнительный анализ частоты

встречаемости структурных вариантов гена *EGFR* в группах с первичной и рецидивной ГБМ *IDH-wt* (табл. 3). Статистически значимых различий между пациентами с первичной и рецидивной ГБМ выявлено не было.

**Таблица 3.** Частота структурных изменений гена *EGFR* в образцах первичной и рецидивной глиобластомы *IDH-wt* (генотип дикого типа), *n* (%)**Table 3.** Frequency of *EGFR* gene structural alterations in primary and relapsed glioblastoma *IDH-wt* (wildtype genotype) samples, *n* (%)

Структурные варианты гена <i>EGFR</i> Structural variants of the <i>EGFR</i> gene	Первичная глиобластома ( <i>n</i> = 51) Primary glioblastoma ( <i>n</i> = 51)	Рецидивная глиобластома ( <i>n</i> = 19) Recurrent glioblastoma ( <i>n</i> = 19)	<i>p</i>
Мутации Mutations	10/51 (19,6)	1/19 (5,2)	>0,05
Амплификация гена <i>EGFR</i> Amplification of the <i>EGFR</i> gen	21/51 (41)	6/19 (32)	>0,05
Вариант <i>EGFRvIII</i> ( <i>n</i> = 31) Variant <i>EGFRvIII</i> ( <i>n</i> = 31)	3/25 (12)	1/6 (17)	>0,05

**Примечание.** Для статистического анализа применяли точный тест Фишера.  
*Note.* Fisher's exact test was used for statistical analysis.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Секвенирование нового поколения является наиболее часто используемым на сегодняшний день подходом к анализу молекулярных маркеров при опухолях головного мозга, в том числе при глиомах разной степени злокачественности [21]. Мы продемонстрировали эффективность этого подхода в определении различных генетических aberrаций, включая однонуклеотидные замены и изменения числа копий участков хромосом, на примере анализа структурных изменений гена *EGFR* при ГБМ (см. рис. 1, 2).

В нашем исследовании в образцах ГБМ *IDH-wt* мутации гена *EGFR* выявлены в 16 % случаев, амплификация гена *EGFR* – в 40 % (см. табл. 1, 2), что в целом согласуется с данными литературы [7, 8, 24, 25]. Большинство мутаций ранее выявляли в образцах различных опухолей, в том числе опухолей центральной нервной системы [23]. Мутация с.719G>T (p.Cys240Phe), приводящая к замене цистеина на фенилаланин в кодоне 240, не отмечена в базах данных соматических мутаций (cBioPortal, COSMIC), в то время как другая нуклеотидная замена в этой же позиции с.719G>A (p.Cys240Tyr, COSM3412176) определена в образцах глиом [23]. Мутация с.719G>T локализуется во внеклеточном домене белка, согласно критериям ACMG она является вероятно патогенной, однако ее влияние на активность *EGFR* не определено. В 80 % случаев мутации ассоциированы с амплификацией гена *EGFR* (*p* < 0,05). Для верификации результатов определения амплификации гена *EGFR* методом NGS использован метод ПЦР-РВ. Совпадение данных, полученных двумя методами, составило 97 %. Для выявления транскрипта *EGFRvIII* использовали ОТ-ПЦР (см. рис. 3), которая является «золотым стандартом» [19], хотя также широко распространены различные методы на основе ПЦР-РВ и иммуногистохимический анализ [8, 26]. В нашем исследовании вариант *EGFRvIII* выявлен только

в образцах с амплификацией гена *EGFR* (13 % от общего числа исследованных образцов и 33 % от общего числа образцов с амплификацией гена *EGFR*). В целом структурные изменения гена *EGFR* обнаружены в 41,4 % случаев ГБМ *IDH-wt*, что согласуется с данными литературы.

Выявлено, что структурные изменения *EGFR* при ГБМ приводят к гиперэкспрессии или конститутивной активации *EGFR* без связывания лиганда EGF. В свою очередь, это вызывает активацию нижележащих сигнальных путей и оказывает антиапоптотическое действие на опухолевую клетку, запуская механизмы онкогенной трансформации [4, 19].

При исследовании прогностической значимости структурных изменений гена *EGFR* оценивают общую и безрецидивную выживаемость и состояние пациентов по шкале Карновского. В нашем исследовании мы сравнили частоту структурных изменений гена *EGFR* у больных с первичными и рецидивными ГБМ *IDH-wt*. Мутации и амплификация гена *EGFR* чаще встречались у пациентов с первичными ГБМ, чем у пациентов с рецидивными ГБМ: 19,6 и 5,2 % случаев соответственно и 41 и 32 % случаев соответственно (см. табл. 3), однако эти различия статистически незначимы. В работе M. Radovan и соавт. мутации и амплификация гена *EGFR* значимо чаще встречались при рецидивной ГБМ, таким образом, являясь фактором риска развития рецидива опухоли [27]. В целом данные относительно прогностической роли мутаций и амплификации гена *EGFR* довольно противоречивы. В ряде работ эти молекулярные события рассматривают в качестве благоприятных прогностических факторов, ассоциированных с лучшим исходом [8]. В то же время по результатам метаанализа, включавшего 10 исследований и 1074 пациентов, повышенная экспрессия гена *EGFR*, которую связывают с aberrантным мутационным статусом, статистически значимо ассоциирована с плохим прогнозом при ГБМ [28].

Вариант *EGFRvIII* в нашем исследовании чаще встречался в образцах рецидивной ГБМ по сравнению с первичной (17 % против 12 %); разница статистически незначима. Эти данные не противоречат тому, что экспрессия *EGFRvIII* в клетках опухоли в большинстве работ рассматривается как прогностически неблагоприятный фактор [29]. В целом различия в оценке прогностической роли структурных изменений в гене *EGFR* могут быть связаны с разным размером исследованных выборок, различиями в протоколах лечения, а также наличием мутаций в других генах, которые также могут существенно влиять на клинический исход.

Рецепторная тирозинкиназа EGFR является наиболее частой мишенью молекулярно-направленной терапии при ГБМ [30]. С одной стороны, это обусловлено тем, что структурные изменения гена *EGFR* являются очень распространенными генетическими изменениями, которые встречаются в 40 % и более случаев ГБМ [6]. С другой стороны, довольно хорошо изучены их роль в развитии опухоли и механизм онкогенной трансформации. Эксперименты на моделях EGFR-мутантных клеточных линий ГБМ и ксено-трансплантатов, полученных от пациентов, показали, что ингибирование и/или нокдаун EGFR вызывает гибель клеток, что подтверждает критическую роль конститутивной активации EGFR в глиоматогенезе [31]. Кроме того, в связи с успешным применением ингибиторов рецепторных тирозинкиназ, в том числе EGFR, в лечении различных видов рака, прежде всего НМРЛ, выделен непрерывно пополняемый ряд химических соединений с антионкогенной активностью, направленной на блокирование EGFR-зависимого сигнального пути.

Однако на сегодняшний день пока не выявлено ни одного соединения из класса ингибиторов тирозинкиназы, демонстрирующего однозначный положительный эффект при лечении ГБМ. Ингибиторы, которые были успешно использованы в лечении НМРЛ при наличии активирующих мутаций внутриклеточного тирозинкиназного домена EGFR, показали практически нулевой результат в отношении ГБМ [32]. При ГБМ мутации происходят чаще всего во внеклеточной части белка, нарушают специфичность распознавания лигандов и влияют на процессы димеризации EGFR [33]. Актуальным является поиск ингибиторов EGFR, не зависящих от наличия мутаций, так как при амплификации гена *EGFR* опухолевые клетки часто экспрессируют белок EGFR дикого типа. Транскрипт *EGFRvIII* рассматривается в качестве перспективной мишени для таргетной терапии, поскольку довольно распространен и обладает выраженным онкогенным потенциалом. Однако показано, что вариант *EGFRvIII* может присутствовать в опухолевых клетках в виде

внехромосомной ДНК, устраняться из клеток под действием препаратов и появляться снова после прекращения терапии [34]. Анти-EGFR-моноклональные антитела (цетуксимаб, панитумумаб, нимотузумаб) не показали какого-либо эффекта в лечении пациентов с ГБМ [35].

В терапии ГБМ применяют также осимертиниб — пероральный ингибитор тирозинкиназы III поколения, необратимо ингибирующий EGFR. Он разработан для лечения пациентов с устойчивой мутацией T790M в гене *EGFR* при EGFR-мутированном НМРЛ. Данный препарат обладает способностью проникать через гематоэнцефалический барьер и продемонстрировал высокую эффективность в отношении метастазов в головной мозг при EGFR-мутантном НМРЛ [36]. Также при лечении рецидивной ГБМ отмечен хороший ответ на мультикиназный ингибитор регорафениб [37].

В качестве основных причин отсутствия эффекта при использовании анти-EGFR-таргетной терапии отмечают гетерогенность опухоли и наличие субклонов с различным спектром мутаций. Возможны компенсаторная активация других рецепторных киназ, например PDGFRA и MET, и переключение на другие сигнальные пути, что в будущем может потребовать более тщательного анализа субклональной структуры опухоли и применения комбинаторных методов лечения [35]. Также важной причиной неудачи анти-EGFR-терапии в клинических испытаниях является неэффективное проникновение препарата в центральную нервную систему и распределение в ней из-за наличия гематоэнцефалического барьера и, как правило, крайне разветвленной сосудистой сети в самой опухоли, что может привести к заметному снижению концентрации препарата (ниже терапевтических значений).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Метод секвенирования нового поколения позволяет выявлять точечные мутации, инсерции, делеции и изменения числа копий гена *EGFR*. Суммарно различные структурные изменения этого гена (мутации, амплификация, вариант *EGFRvIII*) обнаружены в 41,4 % ГБМ *IDH-wt*. Статистически значимых различий в частоте встречаемости структурных изменений гена *EGFR* в образцах первичных и рецидивных ГБМ не выявлено. Дальнейшее изучение мутационного статуса гена *EGFR* в сопоставлении с клиническими характеристиками, анализ субклональной организации опухоли, лучшее понимание гетерогенности ГБМ, исследование микроокружения опухоли, а также более глубокое изучение EGFR-зависимого сигнального пути и его взаимодействия с другими внутриклеточными путями позволят создать предпосылки для повышения эффективности молекулярно-направленной терапии ГБМ.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Herbst R.S. Review of epidermal growth factor receptor biology. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2004;59(2):21–6. DOI: 10.1016/j.ijrobp.2003.11.041
- Hynes N.E., Lane H.A. ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nat Rev Cancer* 2005;5(5):341–54. DOI: 10.1038/nrc1609
- Jones S., Rappoport J.Z. Interdependent epidermal growth factor receptor signalling and trafficking. *Int J Biochem Cell Biol* 2014;51:23–8. DOI: 10.1016/j.biocel.2014.03.014
- Sigismund S., Avanzato D., Lanzetti L. Emerging functions of the EGFR in cancer. *Mol Oncol* 2018;12(1):3–20. DOI: 10.1002/1878-0261.12155
- Dreux A.C., Lamb D.J., Modjtahedi H., Ferns G.A. The epidermal growth factor receptors and their family of ligands: their putative role in atherogenesis. *Atherosclerosis* 2006;186(1):38–53. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2005.06.038
- Saadeh F.S., Mahfouz R., Assi H.I. EGFR as a clinical marker in glioblastomas and other gliomas. *Int J Biol Markers* 2018;33(1):22–32. DOI: 10.5301/ijbm.5000301
- Brennan C.W., Verhaak R.G., McKenna A. et al. TCGA Research Network. The somatic genomic landscape of glioblastoma. *Cell* 2013;155(2):462–77. DOI: 10.1016/j.cell.2013.09.034
- Higa N., Akahane T., Hamada T. et al. Distribution and favorable prognostic implication of genomic EGFR alterations in IDH-wildtype glioblastoma. *Cancer Med* 2023;12(1):49–60. DOI: 10.1002/cam4.4939
- Louis D.N., Perry A., Wesseling P. et al. The 2021 WHO classification of tumors of the central nervous system: a summary. *Neuro Oncol* 2021;23(8):1231–51. DOI: 10.1093/neuonc/naab106
- Gan H.K., Cvriljevic A.N., Johns T.G. The epidermal growth factor receptor variant III (EGFRvIII): where wild things are altered. *FEBS J* 2013;280(21):5350–70. DOI: 10.1111/febs.12393
- Esiksson E., Rosland G.V., Talasila K.M. et al. EGFRvIII mutations can emerge as late and heterogeneous events in glioblastoma development and promote angiogenesis through Src activation. *Neuro Oncol* 2016;18(12):55. DOI: 10.1093/neuonc/now113
- Alnahhas I., Rayi A., Guillermo Prieto Eibl M.D.P. et al. Prognostic implications of epidermal and platelet-derived growth factor receptor alterations in 2 cohorts of IDH wt glioblastoma. *Neurooncol Adv* 2021;3(1):vdab127. DOI: 10.1093/naojnl/vdab127
- Li J., Liang R., Song C. et al. Prognostic significance of epidermal growth factor receptor expression in glioma patients. *Onco Targets Ther* 2018;2018(11):731–42. DOI: 10.2147/OTTS.155160
- Hovinga K.E., McCreary H.J., Brennan C. et al. EGFR amplification and classical subtype are associated with a poor response to bevacizumab in recurrent glioblastoma. *J Neurooncol* 2019;142(2):337–45. DOI: 10.1007/s11060-019-03102-5
- Le Rhun E., Preusser M., Roth P. et al. Molecular targeted therapy of glioblastoma. *Cancer Treat Rev* 2019;80:101896. DOI: 10.1016/j.ctrv.2019.101896
- Vivanco I., Robins H.I., Rohle D. et al. Differential sensitivity of glioma- versus lung cancer-specific EGFR mutations to EGFR kinase inhibitors. *Cancer Discov* 2012;2(5):458–71. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-11-0284
- Desai R., Suryadevara C.M., Batich K.A. et al. Emerging immunotherapies for glioblastoma. *Expert Opin Emerg Drugs* 2016;21(2):133–45. DOI: 10.1080/14728214.2016.1186643
- Weller M., Butowski N., Tran D.D. et al. Rindopepimut with temozolomide for patients with newly diagnosed, EGFRvIII expressing glioblastoma (ACT IV): a randomised, double-blind, international phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2017;18(10):1373–85. DOI: 10.1016/S1470-2045(17)30517-X
- Felsberg J., Hentschel B., Kaulich K. et al. German Glioma Network. Epidermal growth factor receptor variant III (EGFRvIII) positivity in EGFR-amplified glioblastomas: prognostic role and comparison between primary and recurrent tumors. *Clin Cancer Res* 2017;23(22):6846–55. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-17-0890
- Краснов Г.С., Гукасян Л.Г., Абрамов И.С., Наседкина Т.В. Определение субклональной структуры опухоли по данным высокопроизводительного секвенирования на примере остроуго миелоидного лейкоза у детей и акральная меланомы. *Молекулярная биология* 2021;55(5):829–45. DOI: 10.31857/S0026898421050050
- Krasnov G.S., Ghukasyan L.G., Abramov I.S., Nasedkina T.V. Determination of the subclonal tumor structure in childhood acute myeloid leukemia and acral melanoma by next-generation sequencing. *Molekulyarnaya biologiya = Molecular Biology* 2021;55(5):829–45. (In Russ.). DOI: 10.31857/S0026898421050050
- Chang M.T., Asthana S., Gao S.P. et al. Identifying recurrent mutations in cancer reveals widespread lineage diversity and mutational specificity. *Nat Biotechnol* 2016;34(2):155–63. DOI: 10.1038/nbt.3391
- Naidoo J., Sima C.S., Rodriguez K. et al. Epidermal growth factor receptor exon 20 insertions in advanced lung adenocarcinomas: clinical outcomes and response to erlotinib. *Cancer* 2015;121(18):3212–20. DOI: 10.1002/cncr.29493
- The cBio Cancer Genomics Portal. <https://www.cbioportal.org/>.
- Zacher A., Kaulich K., Stepanow S. et al. Molecular diagnostics of gliomas using next generation sequencing of a glioma-tailored gene panel. *Brain Pathol* 2017;27(2):146–59. DOI: 10.1111/bpa.12367
- Blobner J., Dengler L., Blobner S. et al. Significance of molecular diagnostics for therapeutic decision-making in recurrent glioma. *Neurooncol Adv* 2023;5(1):vdad060. DOI: 10.1093/naojnl/vdad060
- Rutkowska A., Strózik T., Jędrzychowska-Dańska K. et al. Immunohistochemical detection of EGFRvIII in glioblastoma – anti-EGFRvIII antibody validation for diagnostic and CAR-T purposes. *Biochem Biophys Res Commun* 2023;685:149133. DOI: 10.1016/j.bbrc.2023.149133
- Padovan M., Maccari M., Bosio A. et al. Actionable molecular alterations in newly diagnosed and recurrent *IDH1/2* wild-type glioblastoma patients and therapeutic implications: a large mono-institutional experience using extensive next-generation sequencing analysis. *Eur J Cancer* 2023;191:112959. DOI: 10.1016/j.ejca.2023.112959
- Li J., Liang R., Song C. et al. Prognostic significance of epidermal growth factor receptor expression in glioma patients. *Onco Targets Ther* 2018;11:731–42. DOI: 10.2147/OTTS.155160
- Yang K., Ren X., Tao L. et al. Prognostic implications of epidermal growth factor receptor variant III expression and nuclear translocation in Chinese human gliomas. *Chin J Cancer Res* 2019;31(1):188–202. DOI: 10.21147/j.issn.1000-9604.2019.01.14
- Begagic E., Pugonja R., Bečulić H. et al. Molecular targeted therapies in glioblastoma multiforme: a systematic overview of global trends and findings. *Brain Sci* 2023;13(11):1602. DOI: 10.3390/brainsci13111602
- An Z., Aksoy O., Zheng T. et al. Epidermal growth factor receptor and EGFRvIII in glioblastoma: signaling pathways and targeted therapies. *Oncogene* 2018;37(12):1561–75. DOI: 10.1038/s41388-017-0045-7
- Hegi M.E., Diserens A.C., Bady P. et al. Pathway analysis of glioblastoma tissue after preoperative treatment with the EGFR tyrosine kinase inhibitor gefitinib – a phase II trial. *Mol Cancer Ther* 2011;10(6):1102–12. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-11-0048
- Hu C., Leche C.A., Kiyatkin A. et al. Glioblastoma mutations alter EGFR dimer structure to prevent ligand bias. *Nature* 2022;602(7897):518–22. DOI: 10.1038/s41586-021-04393-3
- Nathanson D.A., Gini B., Mottahedeh J. et al. Targeted therapy resistance mediated by dynamic regulation of extrachromosomal mutant EGFR DNA. *Science* 2014;343(6166):72–6. DOI: 10.1126/science.1241328

35. Eskilsson E., Røslund G.V., Solecki G. et al. EGFR heterogeneity and implications for therapeutic intervention in glioblastoma. *Neuro Oncol* 2018;20(6):743–52. DOI: 10.1093/neuonc/nox191
36. Soria J.-C., Ohe Y., Vansteenkiste J. et al. Osimertinib in untreated EGFR-mutated advanced non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2018;378(2):113–25. DOI: 10.1056/NEJMoa1713137
37. Chiesa S., Mangraviti A., Martini M. et al. Clinical and NGS predictors of response to regorafenib in recurrent glioblastoma. *Sci Rep* 2022;12(1):16265. DOI: 10.1038/s41598-022-20417-y

#### Вклад авторов

В.О. Варачев: проведение молекулярно-генетических исследований, секвенирования нового поколения, интерпретация данных, написание текста статьи;

О.Ю. Сусова: сбор материала, проведение молекулярно-генетических тестов, анализ и интерпретация данных, написание текста статьи;

А.А. Митрофанов: ведение пациентов с глиобластомами, сбор клинического материала, анализ и интерпретация данных;

Г.С. Краснов: биоинформационный анализ результатов секвенирования, анализ и интерпретация данных;

Д.Р. Насхлеташвили: ведение пациентов с глиомами и глиобластомами, анализ результатов молекулярно-генетического исследования и интерпретация данных;

Ю.И. Аммур: проведение молекулярно-генетических исследований, анализ и интерпретация данных;

С.Д. Бежанова: сбор и анализ клинического материала;

Н.В. Севян, Е.В. Прозоренко: ведение пациентов с глиобластомами, сбор операционного материала;

А.Х. Бекашев: разработка дизайна исследования, сбор операционного материала, анализ и интерпретация результатов, научное редактирование;

Т.В. Наседкина: разработка концепции исследования, планирование экспериментов, анализ и интерпретация результатов, написание текста статьи.

#### Authors' contributions

V.O. Varachev: conducting molecular genetic research, sequencing a new generation, interpreting data, article writing;

O.Yu. Susova: collecting material, conducting molecular genetic tests, analyzing and interpreting data, article writing;

A.A. Mitrofanov: management of patients with glioblastomas, collection of clinical material, analysis and interpretation of data;

G.S. Krasnov: bioinformatic analysis of sequencing results, data analysis and interpretation;

D.R. Naskhletashvili: management of patients with gliomas and glioblastomas, analysis of the results of molecular genetic research and interpretation of data;

Yu.I. Ammour: conducting molecular genetic studies, data analysis and interpretation;

S.D. Bezhanova: collection and analysis of clinical material;

N.V. Sevyan, E.V. Prozorenko: management of patients with glioblastomas, collection of surgical material;

A.Kh. Bekyashev: research design development, collection of operational material, analysis and interpretation of results, scientific editing;

T.V. Nasedkina: development of the research concept, experimental planning, analysis and interpretation of the results, article writing.

#### ORCID авторов / ORCID of authors

В.О. Варачев / V.O. Varachev: <https://orcid.org/0000-0002-3567-3761>

О.Ю. Сусова / O.Yu. Susova: <https://orcid.org/0000-0001-8192-7913>

А.А. Митрофанов / A.A. Mitrofanov: <https://orcid.org/0000-0002-4125-7342>

Г.С. Краснов / G.S. Krasnov: <https://orcid.org/0000-0002-6493-8378>

Д.Р. Насхлеташвили / D.R. Naskhletashvili: <https://orcid.org/0000-0002-4218-9652>

Ю.И. Аммур / Yu.I. Ammour: <https://orcid.org/0000-0003-0223-5738>

С.Д. Бежанова / S.D. Bezhanova: <https://orcid.org/0000-0001-7336-9210>

Н.В. Севян / N.V. Sevyan: <https://orcid.org/0000-0001-5841-7480>

Е.В. Прозоренко / E.V. Prozorenko: <https://orcid.org/0000-0001-8880-1758>

А.Х. Бекашев / A.Kh. Bekyashev: <https://orcid.org/0000-0002-4160-9598>

Т.В. Наседкина / T.V. Nasedkina: <https://orcid.org/0000-0002-2642-4202>

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

**Финансирование.** Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 22-15-00304).

**Funding.** The study was carried out with the financial support of the Russian Science Foundation (grant No. 22-15-00304).

#### Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики

Протокол исследования одобрен локальным этическим комитетом ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (протокол № 7 от 27 июля 2023 г.).

Пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.

#### Compliance with patient rights and principles of bioethics

The study was approved by the committee on biomedical ethics of N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia (protocol No. 7 dated 27 July, 2023).

The patients signed an informed consent to participate in the study

**Статья поступила:** 30.11.2023. **Принята к публикации:** 10.09.2024. **Опубликована онлайн:** 09.10.2024.

**Article submitted:** 30.11.2023. **Accepted for publication:** 10.09.2024. **Published online:** 09.10.2024.