

ПРЕДИКТИВНИ БИОМАРКЕРИ В ОНКОЛОГИЯТА

методи за изследване и
клинично приложение

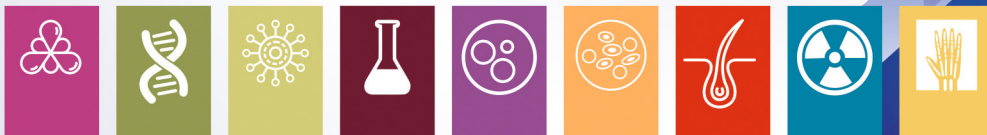


ТОМ I

СОЛИДНИ ТУМОРИ

клинично ръководство, основано на доказателства

Варна, 2017



НАЦИОНАЛЕН ЕКСПЕРТЕН БОРД 2017

проф. Алексей САВОВ

ЦГЛ – София

проф. д-р Асен ДУДОВ

Аджибадем Сити Клиник – София

д-р Борис ПЕТРОВ

Трансхеликс – София

д-р Веселина КОЛЕВА

Аджибадем Сити Клиник Болница Токуда – София

проф. д-р Галина КИРОВА

Аджибадем Сити Клиник, Болница Токуда – София

проф. д-р Георги БАЛАЦЕНКО

СБАЛХЗ – София

доц. д-р Димитър КАЛЕВ

СБАЛОЗ Д-р М. Марков – Варна

чл. кор. проф. д-р Драга ТОНЧЕВА

Медицински университет – София

доц. д-р Иван ИВАНОВ

УМБАЛ Г. Странски – Плевен

проф. д-р Ирена КОСТАДИНОВА

Аджибадем Сити Клиник – София

доц. д-р Красимир КИРОВ

СБАЛО – София

проф. д-р Маргарита ГЕНОВА

СБАЛХЗ – София

доц. Милка ГЕОРГИЕВА

Българско дружество по патология

проф. д-р Милчо МИНЧЕВ

СБАЛХЗ – София

д-р Мариела ВАСИЛЕВА

УМБАЛ Александровска – София

доц. д-р Павел БОЧЕВ

Българско дружество по нуклеарна медицина

доц. д-р Павел СТАНИМИРОВ

УМБАЛ Александровска – София

доц. Радка КЪНЕВА

Медицински университет – София

проф. д-р Савелина ПОПОВСКА

УМБАЛ Г. Странски – Плевен

проф. д-р Соня СЕРГИЕВА

СБАЛОЗ – София

д-р Тихомир ДИКОВ

УМБАЛ Александровска – София

проф. д-р Светлана ХРИСТОВА

УМБАЛ Александровска – София

проф. д-р Татяна ХАДЖИЕВА

УМБАЛ Св. Иван Рилски – София

доц. д-р Яна БОЧЕВА

Българско научно дружество
по клинична лаборатория

СЪДЪРЖАНИЕ

ВЪВЕДЕНИЕ	5
ПРЕДИКТИВНИ БИОМАРКЕРИ ПРИ СОЛИДНИ МАЛИГНЕНИ ТУМОРИ	11
1.1. Предиктивни биомаркери при анапластичен олигодендроглиом	11
1.1.1. <i>Ip/19q</i> -коделеция	11
1.1.2. <i>MGMT</i> -метиране	16
1.2. Предиктивни биомаркери при тиреоиден карцином	21
1.2.1. <i>RET M918T</i> -мутация	21
1.3. Предиктивни биомаркери при орофарингеален карцином	25
1.3.1. p16-протеин	25
1.3.2. HPV-статус	29
1.4. Предиктивни биомаркери при карцином на гърда	34
1.4.1. ER- α /PgR-статус	34
1.4.2. HER2-статус	40
1.4.3. Ki-67-пролиферативен индекс	49
1.4.4. Мултигенни сигнатури	54
1.4.5. <i>APOBEC3B</i> -мутация	59
1.4.6. <i>ESR1</i> -мутации	62
1.4.7. <i>PIK3CA</i> -мутация	67
1.4.8. <i>BRCA1/2</i> -мутации	71
1.4.9. <i>FCGR3A</i> -полиморфизми	77
1.4.10. <i>CYP2D6</i> -генотипизиране	80
1.4.11. Циркулиращи туморни клетки	83

1.5. Предикивни биомаркери при недребноклетъчен белодробен карцином	87
1.5.1. <i>EGFR</i> -активиращи мутации	87
1.5.2. <i>EGFR T790M</i> -мутация	92
1.5.3. <i>KRAS</i> -мутации	95
1.5.4. <i>ALK</i> -пренареждания	98
1.5.5. <i>ROSI</i> -пренареждания.....	104
1.5.6. <i>BRAF</i> -мутации/ <i>HER2</i> -мутации/ <i>MET</i> -аберации/ <i>RET</i> -транслокации	110
1.5.7. PD-L1-експресия	115
1.5.8. Радиомни и радиогеномни анализи и сигнатури	121
1.6. Предикивни биомаркери при дребноклетъчен белодробен карцином	126
1.6.1. PD-L1-експресия	126
1.7. Предикивни биомаркери при аденокарцином на стомах и гастроезофагеална връзка	130
1.7.1. <i>HER2</i> -статус	130
1.7.2. MSI	135
1.8. Предикивни биомаркери при панкреасен аденокарцином	139
1.8.1. SPARC-експресия.....	139
1.9. Предикивни биомаркери при колоректален карцином	142
1.9.1. MSI/MMR.....	142
1.9.2. <i>KRAS</i> - и <i>NRAS</i> -мутации	147
1.9.3. <i>BRAF</i> -мутации	150
1.9.4. <i>DPYD</i> -мутации.....	153
1.9.5. <i>UGT1A1</i> -мутацн	155
1.9.6. Мултигенни сигнатури.....	157

1.9.7. Циркулиращи туморни клетки	159
1.10. Предикивни биомаркери при анален карцином	162
1.10.1. HPV-статус и p16/p18-експресия	162
1.10.2. HIV-статус и CD4+ клетъчен брой	165
1.11. Предикивни биомаркери при невроендокринни тумори	168
1.11.1. Ki-67-пролиферативен индекс и митотичен брой	168
1.11.3. Соматостатин-рецепторна скитинграфия с ¹¹¹ In-OctreoScan/ ^{99m} Tc-Tektrotyd и ⁶⁸ Ga-DOTA ПЕТ/КТ	172
1.12. Предикивни биомаркери при овариален карцином, карцином на Фалопиева тръба и първичен перитонеален карцином	178
1.12.1. BRCA1/2-мутации	178
1.13. Предикивни биомаркери при карцином на маточна шийка	182
1.13.1. HPV-статус и p16/p18-експресия	182
1.13.2. HIV-статус и CD4+ клетъчен брой	186
1.14. Предикивни биомаркери при карцином на вулва	190
1.14.1. p16-експресия	190
1.15. Предикивни биомаркери при карцином на пикочен мехур	193
1.15.1. PD-L1-експресия	193
1.16. Предикивни биомаркери при простатен карцином	197
1.16.1. Серумна PSA-стойност	197
1.16.2. Оценка по Gleason	202
1.16.3. ARv7-експресия	206
1.16.4. Циркулиращи туморни клетки	209
1.16.5. ПЕТ/КТ	212
1.16.5. Радиомикс-базирано прицелно лъчелечебно планиране	216

1.17. Предиктивни биомаркери при карцином на penis.....	220
1.17.1. HPV- и p16-експресия.....	220
1.18. Предиктивни биомаркери при гастроинтестинален стромален тумор (GIST).....	224
1.18.1. Митотичен брой и Ki-67-пролиферативен индекс.....	224
1.18.2. <i>c-KIT/CD117</i> - и <i>PDGFRA</i> -мутации.....	228
1.19. Предиктивни биомаркери при кожни малигнени тумори.....	234
1.19.1. Предиктивни биомаркери при меланом.....	234
1.19.1.1. Туморна дебелина по <i>Breslow</i> и хистологична улцерация.....	234
1.19.1.2. Първичен туморен митотичен брой.....	237
1.19.1.3. <i>BRAF</i> -активиращи мутации.....	239
1.19.1.4. <i>c-KIT</i> -активиращи мутации.....	242
1.19.1.5. Изходен чревен микробиом.....	245
1.19.2. Предиктивни биомаркери при немеланомни малигнени кожни тумори.....	247
1.19.2.1. <i>Hedgehog</i> -мутации.....	247
1.19.2.2. МСРyV-експресия.....	250
1.20. Предиктивни биомаркери при сарком на <i>Ewing</i>	253
1.20.1. <i>EWSR1-ETS</i> -транслокация.....	253
ПРЕДИКТИВНИ БИОМАРКЕРИ ПРИ ТУМОРИ БЕЗ ЗНАЧЕНИЕ ЗА ХИСТОГЕНЕЗА/ЛОКАЛИЗАЦИЯ (АГНОСТИЧНИ ТЪКАН/МЯСТО).....	257
2.1. MSI/MMR.....	257

ВЪВЕДЕНИЕ

Настоящото ръководство е консенсусно становище на мултидисциплинарен екип, включващ експерти в областта на онкологичните предиктивни биомаркери от осем медицински специалности и техни национални браншови организации: Българско дружество по патология, Българско дружество по генетика на човека, Българско медицинско сдружение по хематология, Българска асоциация по персонализирана медицина, Българско онкологично научно дружество, Българско дружество по нуклеарна медицина, Българска асоциация по радиология, Гилдия на лъчетерапевтите в България и Българско дружество по клинична лаборатория.

Нуждата от национално ръководство за молекулярно тестване и клинична интерпретация на предиктивни биомаркери е обусловена от актуалността на фармакогеномиката, фармакопротеомиката и радиомиката като основи за терапевтични решения в прецизираната (персонализирана) медицина – медицинска онкология, онкохематология и онкологична радиология.¹ Проблемът допълнително е свързан с регулацията, фондовете и реимбурсирането на молекулярната таргетна и цитотоксичната терапии и с критериите за техния избор и провеждане.²

Цел на ръководството е да представи съвременни алгоритми за молекулярно диагностично тестване и клинично приложение на валидирани предиктивни биомаркери при лечение на малигнни солидни тумори и хематологични неоплазии според локализацията им при възрастни, включително и при тумори с агностици ткан/място. Съдържанието включва

биомаркери, които детерминират избор на определен лекарствен продукт или лечебна стратегия въз основа на доказателства за терапевтичните им резултати в условията на определена биологична констелация. Изборът на биомаркер за включване в съдържанието отразява моментната конюнктура в клиничната онкология с всякакви възможности за обновление и бъдещи промени. Всички термини са приведени в съответствие с номенклатурата на Осма редакция на Наръчника за стадиране на тумори на AJCC, 2017.³

Ръководството е предназначено за всички медицински специалности в България, свързани с различните терапевтични модалности при малигнни солидни тумори и хематологични неоплазии: патолози, молекулярни биолози, медицински генетици, медицински онколози, хематолози, нуклеарни медици, лъчетерапевти, клинични лаборанти, радиолози, фармацевти, общопрактикуващи лекари и медицински сестри.

МЕТОДИ

Ръководството за предиктивни биомаркери в онкологията е основано на доказателства и е структурирано в три главни раздела. Всеки подраздел е съставен най-малко от двама експерти, съдържа резюмиран литературен обзор върху съответен биомаркер и техниките за неговото тестване, позовавайки се изцяло на медицина, основана на доказателства. В края на всеки раздел са дефинирани препоръки, описани с четири степени на препоръчителност (A, B, C и D) според Оксфордския център за медицина, основана на доказателства (CEBM)⁴, и към тях са добавени акценти за добра практика.

Нива на доказателственост

Ниво	Тип на доказателство
1	Доказателство, получено от системен обзор или рандомизирани проучвания.
2	Доказателство, получено от отделно рандомизирано проучване или наблюдателно проучване с драматичен ефект.
3	Доказателство, получено от нерандомизирани контролирани кохортни проучвания.
4	Доказателство, получено от серии на случаи, контроли на случаи или исторически контролирани проучвания.
5	Аргументи, основани на рутинна практика.

Степени на препоръчителност

Степен	Съвместимост с ниво на доказателственост
A	Съвместима с проучвания с ниво на доказателственост 1.
B	Съвместима с проучвания с ниво на доказателственост 2 или 3 <i>или</i> екстраполации* от проучвания с ниво на доказателственост 1.
C	Проучвания с ниво на доказателственост 4 <i>или</i> екстраполации от проучвания с ниво на доказателственост 2 или 3.
D	Ниво на доказателственост 5 <i>или</i> непоследователни или неубедителни проучвания на всяко ниво.

* *Екстраполация* – използване на данни при възможност за клинично значими разлики в сравнение с оригиналната ситуация на проучването.

Акценти за добра практика

	Препоръки за най-добър подход, основани на клиничния опит на експертния борд.
--	---

ТЕРМИНИ И ДЕФИНИЦИИ

Биомаркери: клетъчни, биохимични и/или молекулярни (включително генетични или епигенетични) характеристики, които могат да бъдат обективно измерени и оценени като индикатори за нормални биологични процеси, патогенетични процеси или фармакологични отговори към терапевтични интервенции.⁵

Туморни биомаркери: биологични молекули, продуцирани или от туморни клетки, или от човешки тъкани в отговор на тумор, които могат да бъдат обективно измерени и оценени като индикатори на туморния процес в организма.⁵

Типове туморни биомаркери: прогностични, предиктивни, фармакодинамични и заместители (сурогатни). Всеки биомаркер може да служи за повече от една цел и да принадлежи към повече от една категория.⁵

Предиктивни туморни биомаркери: биологични молекули или клетъчни характеристики, които могат да бъдат обективно измерени и оценени като индикатори за предсказване на отговор към терапевтични интервенции.

Прогностични туморни биомаркери: състояния или характеристики на пациента, които може да бъдат използвани за оценка на шанса за възстановяване от болестта или риска от рецидив и за които е доказана сигнификантна връзка с показател или резултат, независим от приложеното лечение.

Предиктивни спрямо прогностични биомаркери: (i) за да се приеме, че даден биомаркер е предиктивен, е необходимо да бъде доказан в клиничното проучване (за предпочитана

не рандомизирано); статусът на биомаркера трябва да бъде определен за всички пациенти – както в подгрупата, лекувана с изследвания агент, така и в контролното рамо; официалният статистически тест за взаимодействие *лечение според биомаркер* трябва да бъде сигнификантен; (ii) за да се установи, че даден биомаркер е чисто прогностичен, трябва да се докаже, че има сигнификантна връзка между биомаркер и резултат, независимо от лечението, както и че терапевтичните ефекти не зависят от биомаркера; (iii) даден биомаркер може да демонстрира както предиктивни, така и прогностични корелации.¹¹

In vitro диагностични продукти (IVD): (i) реагенти, инструменти, системи или продукти за диагностика на болест или състояние (с цел превенция, облекчаване или лечение) чрез изследване на материали, добити от човешкото тяло; (ii) обект са на контрол и мерки за подобряване (Clinical Laboratory Improvement Amendments, CLIA'88) и според регулаторния контрол за безопасност и ефективност се класифицират в три степени: *клас I* (нисък до умерен риск) – основен контрол; *клас II* (умерен към висок) – основен и специален контрол; *клас III* (висок риск) – основен контрол и предмаркетингово одобрение (PMA); (iii) лабораторно развит тест се дефинира като IVD-продукт за клинична употреба, предназначен за работа в определена лаборатория, която формира собствена тестова система и разработва работен протокол, който трябва да се валидира и верифицира, сравнявайки се с друга сертифицирана лаборатория, която работи с предварително валидирана система¹²; (iv) придружаваща диагностика (companion diagnostics, CDx) се дефинира като IVD-тест/кит или образно средство за определяне на подходящ пациент за таргетна терапия, която въздейства на уникален биохимичен път и изисква специфични генотипи или мутации; тестът е специфичен и задължителен за назначаване на определен медикамент¹³; (v) допълваща диагностика (complementary diagnostics) се дефинира като незадължителен IVD-тест/кит или об-

разно средство, осигуряващи допълнителна информация за използване на лекарство или приложение на съответен клас терапевтични агенти, давайки допълнителна информация за очаквана терапевтична полза.¹²

Профил на туморни биомаркери: характеризира се със задължителни показатели: чувствителност, специфичност, точност, устойчивост и възпроизводимост.⁵

Валидиране на биомаркери: преминава през три задължителни стъпки: аналитична (техническа) валидност, клинична валидност и клинична полза.⁶

Аналитично валидиране (имунохистохимично): осъществява се според ръководствата за лабораторна практика, основани на доказателства (LPG), на Колегията на американските патолози^{7,8} и се дефинира като процедура, при която се проверяват резултати от един тест в конкретна лаборатория според инструкции на фирма-производител, показвайки съпоставимост с резултати от други, вече утвърдени в практиката. Включва следните подходи: (i) координиране на резултат от нов тест с морфология и

очаквани резултати; (ii) сравняване на резултат от нов тест с резултати от тестване на същите тъкани с валидиран тест в същата лаборатория; (iii) сравняване на резултати от нов тест с резултати от тестване на същите материали за потвърждаване в друга лаборатория, използвайки валидиран анализ; (iv) сравняване на резултати от нов тест с предишни валидирани неимунохистохимични тестове или (v) тестване на стари материали, оценени чрез официална тестова програма (ако има такава), и сравняване на резултатите с настоящите отговори. За валидност се приема съгласуваност за позитивен резултат при 90% и за негативен резултат – при 95%. При модифицирани тестове се изискват 40, а при клинично утвърдени тестове – 20 тъканни материала.⁹ Препоръчва се проследяване на съотношение *позитивни към негативни случаи* поне двукратно годишно с методи на вътрешен одит и сравняване с литературни резултати.

Клинична полза (доказателственост): при наличие на проспективно клинично проучване, дизайнирано за тестване на биомаркери, или съвместими резултати от ≥ 2 сходни проспективни клинични проучвания, начално недизайнирани за тестване на биомаркери.¹⁰

ЛИТЕРАТУРА

1. Deverka P, Messner DA, McCormack R, et al. Generating and evaluating evidence of the clinical utility of molecular diagnostic test in oncology. *Genet Med* 2016; 18: 780-787
2. Lyman GH, Moses HI. Biomarker tests for molecularly targeted therapies: Laying the foundation and fulfilling the dream. *J Clin Oncol* 2016; 34 (17): 2061-2066
3. AJCC Cancer staging manual, 8th edition. Ed: Amin MB. *Springer*, 2017
4. Howick J, et al. The 2011 Oxford CEBM levels of evidence. Available at: www.cebm.net/index.aspx?o=56535.

5. Biomarkers Definition Working Group. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Therapeutics* 2001; 69: 89-95
6. Teutsch SM, Bradley LA, Palomaki GE, et al. The Evaluation of Genomic Applications in Practice and Prevention (EGAPP) Initiative: methods of the EGAPP Working Group. *Genet Med* 2009; 11 (1): 3-14
7. Fitzgibbons PL, Bradley LA, Fatheree LA, et al. Principles of analytic validation of immunohistochemical assays. Guideline from the College of American Pathologists Pathology and Laboratory Quality Center. *Arch Pathol Lab Med* 2014; 138: 1432-1443
8. Stuart LN, Volmar KE, Nowak JA, et al. Analytic validation of immunohistochemistry assays. *New*

- benchmark data from a survey of 1085 laboratories. *Arch Pathol Lab Med* 2017. doi: 10.5858/arpa.2016-0559-CP
9. Fitzgibbons PL, Murphy DA, Hammond MEH, et al. Recommendations for validating estrogen and progesterone receptor immunohistochemistry assays. *Arch Pathol Lab Med* 2010; 134: 930-935
 10. Simon RM, Paik S, Hayes DF. Use of archived specimens in evaluation of prognostic and predictive biomarkers. *J Natl Cancer Inst* 2009; 101 (21): 1446-1452
 11. Ballman KV. Biomarker: predictive or prognostic? *J Clin Oncol* 2015; 33 (33): 3968-3972
 12. Framework for regulatory oversight of laboratory developed tests (LDTs). FDA, October 3, 2014; Available at: www.fda.gov
 13. Principles for codevelopment of an in vitro companion diagnostic device with a therapeutic product. FDA, July 15, 2016; Available at: www.fda.gov
 14. NCI Dictionary of Cancer terms, National Cancer Institute, 2017. Available at: www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms



1

Предиктивни биомаркери при солидни малигнени тумори

1



1

ПРЕДИКТИВНИ БИОМАРКЕРИ ПРИ СОЛИДНИ МАЛИГНИ ТУМОРИ

1.1. ПРЕДИКТИВНИ БИОМАРКЕРИ ПРИ АНАПЛАСТИЧЕН ОЛИГОДЕНДРОГЛИОМ

1.1.1. *1p/19q*-коделеция

Радка Кънева, Борис Петров

Молекулярна биология. Кодецеция на хромозомните рамене *1p/19q* за първи път е открита при олигодендроглиални тумори през 1994 г.¹ Резултат е от небалансирана транслокация между късо рамо на 1-ва хромозома и дълго рамо на 19-а хромозома $t(1;19)(q10;p10)$, като получената дериватна хромозома е загубена.¹ Глиоми с фронтален, окципитален и париетален произход имат по-голяма вероятност да носят тази кодецеция. Хипотезата за централна нестабилност е в основата на много транслокации на цели хромозомни рамена, наблюдавани в солидни тумори.^{2,3} Образоването им може да бъде провокирано от промени в метилирането на ДНК-веригата и/или под действие на хистоновы модификации.²

Кодецецията на *1p/19q* е молекулярно-генетичната характеристика на олигодендроглиомите, обикновено включваща целите хромозомни рамена. Докато единичната загуба на 19q се среща в астроцитомите, кодецецията на *1p/19q* (особено делеция, включваща целите рамена) се среща рядко при други глиоми, различни от олигодендроглиомите. Комбинираната загуба на *1p/19q* се открива в 50-80% от случаите, при които диагнозата е *олигодендроглиом*: около 85% с нискостепенен олигодендроглиом и 65% с

анапластичен олигодендроглиом имат едновременна загуба на *1p/19q* хромозомните рамена.⁴ Честотата на кодецецията *1p/19q* е значително по-ниска (20-30%) при дифузни глиоми и глиоми с неизясена хистоморфология.^{1,5,6} Според Класификация на туморите на централна нервна система, 2016 World Health Organization (WHO), дефинитивната диагноза на олигодендроглиом степен II и III (анапластична) изисква доказване както на IDH-мутация, така и на *1p/19q*-коделеция.⁷ Наличието на *1p/19q*-коделеция е важен фактор, асоцииран с повишена преживяемост при пациенти с олигодендроглиални тумори. Отношение към преживяемостта имат делеции на целите рамена на двете хромозоми, а не частични делеции.⁸ Кодецеция *1p/19q* е свързана както с чувствителност към химиотерапия, така и с по-благоприятна прогноза.^{1,9}

Аналитични методи за изследване. Има различни методи за идентифициране на *1p/19q*-коделеция и все още липсва ясен консенсус за предпочитан метод за изследване. Осъществява се върху туморни проби от парафинови блокчета. Хематоксилин-еозиновите препарати се анализират от патолог. Статусът на 1p- и 19q-локусите може да се определи чрез FISH, LOH-анализ или array-CGH/SNP array, MLPA, PCR.

Методът FISH (флуоресцентна *in situ* хибридизация) е надежден, лесен и сравнително евтин, способен да открие изменения в минимални количества туморни клетки. Двойно-флуоресцентно белязани ДНК-сонди (LSI 1p36/LSI 1q25 и LSI 19p13/LSI 19q13) се използват за откриване на 1p- и 19p-локуси в интерфазни ядра на отделни туморни клетки от срезове от FFPE-тъкани, залепени на неочветени стъкла. Промени в броя на 1p- и 19q-сигнали, сравнени с контролни сигнали, се използват за определяне на наличието на *1p/19q*-коделеция в 150-250 интерфазни ядра. Резултатите от FISH могат да бъдат представени като процент от туморни клетки с делеция или като съотношение

на тестови спрямо контролни сигнали за всяка хромозома. Определят се граници за отчитане на наличието на делеция на 1p или 19q. Коделеция *1p/19q* се съобщава при делеция едновременно на 1p и на 19q. Общият брой на сигнали се преброява средно в 200 клетки и се определя съотношение между сигнали в двете рамена на съответна хромозома. В нормални диплоидни ядра се установяват два червени и два зелени сигнала. Съотношение 1p:1q (или 19p:19q) от 0.85-1.15 се счита за нормално, без делеция, а съотношение < 0.75 се определя като делеция. За полизомия се приема ако $\geq 30\%$ от ядрата имат три или повече сигнала за 1q и 19p.¹⁰ Съществува голяма вариация между лабораториите по отношение на използваните сонди 1p и 19q за FISH. Използват се както комерсиални, така и лабораторно приготвени FISH-сонди. Има вариации в определяне на приеманите граници, за да се определи наличие на делеция.¹¹ Граничните резултати трябва да се повтарят с други методи. Предвид клиничното значение на статуса за *1p/19q*-коделеция важно е да се стандартизират протоколите във и между лабораториите. The Research Committee of the European Confederation of Neuropathological Societies (Euro-CNS) публикува практически препоръки, за да се подпомогне FISH-базирания анализ на *1p/19q* статус.¹² С използване на FISH не е възможно да се отграничи дали става дума за делеции на цели хромозомни рамена, или на фокални делеции на *1p/19q*. Това разграничение е важно, тъй като по-добра преживяемост и по-добро повлияване при терапия се свързват с цялостни коделеции на *1p/19q* при олигодендроглиоми.

Сравнителната геномна хибридизация (aCGH) и SNP-микрочипов анализ са способни да идентифицират с висока надеждност загубите както на цели, така и на части от рамената на 1p и 19q, и когато са достъпни, е по-добре да бъдат предпочитани пред FISH. В сравнение с FISH тези техники изискват по-голям брой туморни клетки за изолиране на ДНК и са сравнително скъпи.¹¹

Сравнителната геномна хибридизация (aCGH) е техника, която открива вариации в броя геномни копия с висока резолюция. Използва се ДНК, изолирана от туморна и контролна проба, които се бележат с различни флуоресцентни багрила, смесват се и хибридизират със стотици хиляди сонди, имобилизирани на твърда повърхност и покриващи целия геном. С високорезолютивни дигитални системи се сканира и обработва сигналът. Хибридационният сигнал на всяка позиция от генома е съотношение между флуоресценцията на проба и контрола. По този начин може да се определи точно броят копия във всеки локус от генома на пробата спрямо нормалния геном. Методът позволява да се откриват едновременно хромозомни анеуплоидии, делеции, дупликации и амплификации на всеки локус от генома, включен в микрочипа. Методът на SNP-микрочиповия анализ, освен промени в брой копия, дава информация и за загуба на хетерозиготност (LOH).¹²

Бърз и надежден метод за откриване на *1p/19q*-коделеция е т.нар. мултиплексна лиганд-зависима амплификация на пробите (MLPA). Това е PCR-базиран метод, при който се постига едновременно амплификация на множество проби, покриващи изследвания район, и откриване на вариации в броя копия според интензивността на сигнала на амплификация. Анализът на продуктите се извършва чрез капилярна електрофореза, софтуерна обработка и сравняване с профил на здрави контроли. Разработени са специални китове за анализ на 1p 19q-коделеция, паралелно с изследване за мутации в IDH1 и IDH2.

Друга използвана техника е PCR-анализ за LOH, използващ микросателитни ДНК-повтори. Избират се микросателити, при които двата алела имат различен брой повтори. След разделяне на PCR-продукти чрез електрофореза се сравняват профилите между тестова и контролна ДНК.¹³


Доказателства за предиктивно значение. Алелната загуба на хромозомното рамо 1р или комбинираната загуба на 1р и 19р са добри предиктивни фактори за отговор към химиотерапия. Въпреки че механизмът, чрез който загубата на генетична информация в хромозомите води до химиочувствителност остава неясен, смята се че алелните загуби демаскират инактивирани тумор-супресорни гени, които се намират в оставащите алели.¹⁴ Едновременната загуба на 1р и 19q се асоциира с по-добра прогноза не само при олигодендроглиоми, но и при астроцитомите, въпреки че при тях това увреждане е по-рядко.¹⁰ Тумори с делеция на целите хромозомни рамена 1р и 19q се характеризират с по-добра прогноза от тези с частична загуба или без загуба на хромозомен материал.¹⁴ Коделецията 1р/19q е маркер, който дефинира определена група от глиомни тумори и е характерна за олигодендроглиомите.^{4,14} На практика олигодендроглиомите имат едновременно 1р/19q-коделеция и мутации в *IDH1* или *IDH2*.^{13,15} Често заедно с делеции на 1р/19q се откриват мутации в промотора на *TERT*-гена, *CIC* и *FUBP1*, както и промоторно хиперметилиране на *MGMT*-гена.^{13,15} С малки изключения 1р/19q-коделеция и мутации в *TP53* и *ATRX* са взаимно изключващи се, като и двете характеризират глиални тумори с астроцитомен произход. Ето защо изясняване на статуса на коделецията 1р/19q, заедно с *IDH*-мутационен статус и други молекулни маркери (*ATRX*- и *TP53*-статус), може да помогне, за да разграничат олигодендроглиоми, които са с *IDH*-мутации и 1р/19q-коделеции, от тумори с астроцитомен произход, които са без 1р/19q-коделеция.^{7,16} От клинична гледна точка 1р/19q-коделетиралите олигодендроглиоми са предимно болест в зряла възраст, с пик между 40-60 години. Обичайно се срещат във фронталния лоб като някои тумори съдържат калцификати, наблюдавани при образни изследвания. Присъствието на 1р/19q-коделецията е силен независим прогностичен биомаркер, свързан с подобрена преживяемост както при дифузни нискостепенни,

така и при анапластични тумори.^{13,17-20} В голямо омикс- и клинично изследване, извършено в рамките на The Cancer Genome Atlas Research Network (TCGA), пациенти с глиоми степен II/III с *IDH*-мутации и 1р/19q-коделеции имат средна обща преживяемост от 8 години срещу 6.3 години за пациенти с *IDH*-мутации без 1р/19q-коделеции и 1.7 години при пациенти с “див” тип за *IDH*.¹³

1р/19q-коделеция като предиктивен биомаркер при глиом. Загубата на хромозомното рамо 1р или комбинираната загуба на 1р/19р са добри предиктивни фактори за отговора към химиотерапия. При продължително проследяване на две големи рандомизирани контролирани проучвания, които сравняват химиотерапия с *procarbazine/lomustine/vincristine* (PCV) в комбинация с лъчелечение срещу самостоятелно лъчелечение, се демонстрира по-добра преживяемост при първа линия химиотерапия и 1р/19q-коделетирани олигодендроглиоми.^{21,8} Продължителното проследяване и анализ в проучване EORTC 26951, което рандомизира 368 пациенти на лъчелечение или лъчелечение, последвано от PCV, показва, че средната обща преживяемост (ОП) при пациенти с 1р/19q-коделетирани тумори е 9.3 години за самостоятелно лъчелечение, но все още не е достигната при комбинирано лъчелечение и химиотерапия с PCV.²¹ При подобно изследване в клинично изпитване RTOG 9402, при което 289 пациенти получават лъчелечение или PCV, последвано от лъчелечение, средната ОП се удвоява от 7.3 на 14.7 години при пациенти с 1р/19q-коделеция, получили лъчелечение и PCV.⁸ Аналогично във фаза III рандомизирано изследване RTOG 9802 пациенти с висок риск на олигодендроглиом степен II, по-млади от 40 години, претърпели субтотална резекция или биопсия, или пациенти над 40 годишни, получили лъчелечение плюс PCV, имат по-дълга ОП, сравнени с пациенти, третирани само с лъчелечение.²² При изследване на 204 пациенти с глиоми от българска популация е потвърдена ролята на 1р/19q-ко-

делецията като независим прогностичен фактор при всички глиоми, без нискостепенни, както и ролята му като предиктивен и прогностичен фактор при третиране с *temozolomid* и лъчелечение.²⁴ Според Европейските препоръки *1p/19q*-коделецията трябва да се изследва, за да се подпомогне диагностицирането на олигодендроглиоми, и като предиктивен маркер за чувствителност към химиотерапия.^{16,23} На база на данни

от клинични изследвания EORTC 26951 и RTOG 9402 пациентите с *1p/19q*-коделецията и анапластични олигодендроглиални тумори не трябва да се третират само с лъчелечение, а да получават ранна химиотерапия с алкилиращи агенти плюс лъчелечение.²³ Подобен подход трябва да се обсъжда и в подгрупата с олигодендроглиом степен II.

A	Препоръчва се изследване на <i>1p/19q</i> -коделецията при всички тумори с олигодендроглиални характеристики за подпомагане на диагностиката и като прогностичен и предиктивен биомаркер за чувствителност към химиотерапия.
C	<ul style="list-style-type: none"> ■ Препоръчвани методи за изследване на <i>1p/19q</i>-коделецията са FISH, MLPA и aCGH. ■ Изследване за <i>1p/19q</i>-коделецията се препоръчва за селекция на пациенти, показани за адювантно химиолечение с режим PCV (<i>procarbazine, lomustine</i> и <i>vincristine</i>) след лъчелечение.
	<ul style="list-style-type: none"> ■ Методът на хибридизация на двойно-флуоресцентно белязани ДНК-сонди (FISH) е добър скринингов метод за откриване на <i>1p/19q</i>-коделецията. ■ За разграничаване на делецията на цяло рамо на хромозома <i>1p</i> и <i>19q</i> от по-малки делеции следва да се използват MLPA- и aCGH-методи. ■ Поради диагностична, прогностична и предиктивна стойност за адювантна терапия изследването на <i>1p/19q</i>-коделецията и IDH1/2-мутации следва да се включи в рутинната клинична практика в момента на диагнозата за всички пациенти с олигодендроглиални първични мозъчни тумори.

ЛИТЕРАТУРА

1. Reifenberger J, Reifenberger G, Liu L, et al. Molecular genetic analysis of oligodendroglial tumors shows preferential allelic deletions on 19q and 1p. *Am J Pathol* 1994; 145: 1175-1190
2. Jenkins RB, Blair H, Ballman K, et al. A t(1;19)(q10;p10) mediates the combined deletions of 1p and 19q and predicts a better prognosis of patients with oligodendroglioma. *Cancer Res* 2006; 66: 9852-9861

3. Hermsen M, Snijders A, Guervos MA, et al. Centromeric chromosomal translocations show tissue-specific differences between squamous cell carcinomas and adenocarcinomas. *Oncogene* 2005; 24: 1571-1579
4. Mirimanoff RO, Gorlia T, Mason W, et al. Radiotherapy and temozolomide for newly diagnosed glioblastoma: recursive partitioning analysis of the EORTC 26981/22981-NCIC CE3 phase III randomized trial. *J Clin Oncol* 2006; 24: 2563-2569

5. Walker C, du Plessis DG, Fildes D, et al. Correlation of molecular genetics with molecular and morphological imaging in gliomas with an oligodendroglial component. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 7182-7191
6. Aldape K, Burger PC, Perry A. Clinicopathologic aspects of 1p/19q loss and the diagnosis of oligodendrogloma. *Arch Pathol Lab Med* 2007; 131: 242-251
7. Louis D, Perry A, Reifenberger G, et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathologica* 2016; 131: 803-820
8. Cairncross G, Wang M, Shaw E, et al. Phase III trial of chemoradiotherapy for anaplastic oligodendrogloma: Long-term results of RTOG 9402. *J Clin Oncol* 2013; 31(3): 337-343
9. Minniti G, Arcella A, Scaringi C, et al. Chemoradiation for anaplastic oligodendroglomas: clinical outcomes and prognostic value of molecular markers. *J Neurooncol* 2014; 116 (2): 275-282
10. Horbinski C. Something old and something new about molecular diagnostics in gliomas. *Surg Pathol Clin* 2012; 5 (4): 919-939
11. Woehrer A, Sander P, Baberler C, et al. FISH-based detection of 1p 19q codeletion in oligodendroglial tumors: procedures and protocols for neuropathological practice – a publication under the auspices of the Research Committee of the European Confederation of Neuropathological Societies (Euro-CNS). *Clin Neuropathol* 2011; 30: 47-55
12. Pinkham M, Telford N, Whitfield G, et al. FISHing Tips: What Every Clinician Should Know About 1p19q Analysis in Gliomas Using Fluorescence in situ Hybridisation. *Clin Oncol* 2015; 27: 445-453
13. Cancer Genome Atlas Research Network, Brat D, Verhaak R, et al. Comprehensive, integrative genomic analysis of diffuse lower-grade gliomas. *N Engl J Med* 2015; 372: 2481-2498
14. Linz U. Commentary on effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial (Lancet Oncol. 2009;10:459-466). *Cancer* 2010; 6: 1844-1846
15. Sanson M, Marie Y, Paris S, et al. Isocitrate dehydrogenase 1 Codon 132 mutation is an important prognostic biomarker in gliomas. *J Clin Oncol* 2009; 27: 4150-4154
16. Stupp R, Brada M, van den Bent M, et al. High-grade glioma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2014;25 (Suppl 3): iii93-iii101
17. Jenkins R, Blair H, Ballman K, et al. A t(1;19)(q10;p10) mediates the combined deletions of 1p and 19q and predicts a better prognosis of patients with oligodendrogloma. *Cancer Res* 2006; 66: 9852-9861
18. Zhao J, Ma W, Zhao H. Loss of heterozygosity 1p/19q and survival in glioma: a meta-analysis. *Neuro-Oncology* 2014; 16: 103-112
19. van den Bent M, Carpentier A, Brandes A, et al. Adjuvant procarbazine, lomustine, and vincristine improves progression-free survival but not overall survival in newly diagnosed anaplastic oligodendroglomas and oligoastrocytomas: a randomized European Organisation for Research and Treatment of Cancer phase III trial. *J Clin Oncol* 2006; 24: 2715-2722
20. Cairncross G, Berkey B, Shaw E, et al. Phase III trial of chemotherapy plus radiotherapy compared with radiotherapy alone for pure and mixed anaplastic oligodendrogloma: Intergroup Radiation Therapy Oncology Group Trial 9402. *J Clin Oncol* 2006; 24: 2707-2714
21. van den Bent M, Brandes A, Taphoorn M, et al. Adjuvant procarbazine, lomustine, and vincristine chemotherapy in newly diagnosed anaplastic oligodendrogloma: long-term follow-up of EORTC brain tumor group study 26951. *J Clin Oncol* 2013; 31: 344-350
22. Buckner JC, Shaw EG, Pugh SL, et al. Radiation plus Procarbazine, CCNU, and Vincristine in Low-Grade Glioma. *N Engl J Med* 2016; 374: 1344-1355
23. Weller M, van den Bent M, Hopkins K, et al. EANO guideline for the diagnosis and treatment of anaplastic gliomas and glioblastoma. *Lancet Oncol* 2014; 15: 395-403
24. Станчева Г. Геноми и генетични изменения при глиялни тумори. Маркери с прогностична и предиктивна стойност, Дисертация, 2015, МУ – София

1.1.2. MGMT-метиране

Радка Кънева, Борис Петров

Молекулярна биология. MGMT-генът е локализиран в хромозома 10q26 и кодира Об-метилгуанин метилтрансфераза – ензим, участващ в ДНК-репарацията.¹ Алкилиращите химиотерапевтични лекарства са използвани в лечението на пациенти със злокачествени глиоми в продължение на много години. *Temozolomide* (TMZ) добавя метилова група на Об-позиция в молекулата на нуклеотида гуанин, което води до ДНК-увреждане и клетъчна смърт. Активният MGMT осигурява поправката на алкилираните гуанинови остатъци в повредените ДНК-участъци, като необратимо прехвърля метилова група от Об-позиция на модифицирания гуанин върху своя цистеинов остатък.^{2,3} Когато е загубена функцията на MGMT, клетките имат намалена способност да поправят повреди в база G, предизвикани от действието на алкилиращи агенти; в резултат на това възниква мутация, при която G се свързва неправилно с база A, а това води до активиране на mismatch-репарационната (ММР) система и апоптоза.⁴ През 2005 г. *Hegi et al.*¹⁰ съобщават, че епигенетично подтискане на експресията на MGMT подобрява преживяемостта при пациенти с глиобластом, при които е проведена едновременно химиотерапия с TMZ и лъчелечение. Високите нива на активно действащия MGMT в раковите клетки спомагат за намаляване на цитотоксичния ефект на TMZ и за създаването на т.нар. резистентен фенотип.^{6,7} Епигенетичното заглушаване на този ген чрез промоторното му хиперметиране води до намаляване на експресията на MGMT-белтък и съответно до понижена ДНК-репарационна способност. Това, от своя страна, инхибира способността на клетката да поправи алкилираната ДНК-верига и по този начин позволява по-ефективно действие на алкилиращите

лекарства.^{1,8} Експресията на MGMT при олигодендроглиални тумори е по-ниска, отколкото при други глиални тумори.⁹ Промоторно метилиране е докладвано при 47-80% от олигодендроглиалните тумори.^{9, 10} При повечето изследвания се наблюдава силна корелация между промоторно метилиране и 1p/19q-коделеция или мутации в *IDH*: понижената експресия е по-изразена при коделеция на 1p/19q.⁹ Промоторно метилиране на MGMT се среща при повече от 80% от 1p/19q-коделетирани олигодендроглиални тумори. Епигенетични промени, свързани с *IDH*, водят до CIMP-фенотип, който включва и промоторно метилиране на MGMT. При проучване на анапластични глиоми е докладвана независима прогностична стойност на промоторно метилиране на MGMT при тумори, носители на мутация в *IDH1*, независимо от прилагано лечение.¹¹ При тумори без *IDH1*-мутация метилирането на MGMT-промотор е предиктивен маркер за ефект от химиотерапия, но не и прогностичен.^{12, 13} В друго проучване също не е потвърдена прогностична стойност на биомаркера MGMT. Потвърдена е предиктивната му роля за ефект от адювантна химиотерапия.¹³⁻¹⁵ В проучване, включващо 115 пациенти, е докладвана предиктивна роля на MGMT за ефекта от химиотерапия с *procarbazine/lomustine/vincristine* (PCV): при MGMT-метиранни тумори средната обща преживяемост (ОП) е сравнително по-дълга при едновременно лъчехимиолечение с използване на PCV срещу самостоятелно лъчелечение (8.65 срещу 1.98 години).¹⁶ Отделните молекулни маркери при тези тумори не са нито взаимно изключващи се, нито независими. Определянето на метилационния статус на MGMT би трябвало да участва като част от рутинната практика, но необходимостта от изследване на този маркер трябва да се преценява индивидуално.

Аналитични методи за изследване. Тестването за MGMT-промоторно хиперметиране става все по-често търсено изследване в клиничната практика поради про-

гностичната и предиктивната му стойност, като според действащите препоръки е необходимо за рутинен избор на лечение при възрастни пациенти.¹⁸ Съществуват различни техники за определяне на метилационен статус на промотора на *MGMT*; въпреки това, все още няма консенсус кой от методите е най-подходящ за клинично изследване на *MGMT*. Повечето техники включват първоначална бисулфидна модификация на ДНК – неметираните цитозини се превръщат в урацил, докато метилираните остават непроменени.¹⁹ Трите най-често използвани методи за изследване на *MGMT*-метиране с бисулфитно превръщане на ДНК преди анализа са: (i) метил-специфичен PCR (MSP), (ii) количествен PCR в реално време или MethyLight метилационно специфичен – количествен PCR в реално време (MethyLight qMSP) и (iii) метилационно специфично секвениране, включващо и пиросеквениране. Тези методи могат да бъдат използвани за анализ на ДНК, изолирана от туморна тъкан, от FFPE или от свежо замразена туморна тъкан. Методи, които са без бисулфитно превръщане и са приложими в клинични условия, включват метил-специфична мултиплексна лиганд-зависима амплификация на проби (MS-MLPA) и имунохистохимия (ИНС) за *MGMT*-белтъчна експресия.¹⁷

Доказателства за предиктивно значение. *MGMT*-промоторното хиперметиране се среща в различните стадии на глиом и се счита, че е маркер с прогностична и предиктивна стойност.^{7, 10, 15, 20-22} За първи път предиктивността на маркера е установена при пациенти с ниски нива на експресия на *MGMT* – при тях се наблюдава по-голяма ОП и преживяемост без прогресия (ПБП) след лечение с *TMZ* в сравнение с пациенти с високи нива на експресия. Разликата в нивата на експресия корелира с нивата на метилиране на неговия промотор.²³ Анализи на дългосрочната преживяемост показват, че пациенти с метилиран *MGMT* имат по-висока ОП в сравнение с пациенти с немети-

лиран промотор.²⁴ Корелация с прогнозата е докладвана също при педиатрични глиобластоми, нискостадийни глиоми, а най-често – при анапластични глиоми (WHO клас III).^{5, 15, 21-23} Въпреки че метилационният статус на *MGMT* може да се промени с прогресия на болестта, прогностичната му значимост се отнася само за първични тумори.²⁵ При пациенти с глиобластом редица изследвания потвърждават не само прогностична значимост на *MGMT*-промоторното метилиране, но и предиктивно значение при провеждане на химиотерапия с *TMZ*.^{10, 7, 22, 26, 27} За разлика от тях, при анапластични астроцитомии *MGMT*-метилационният статус има отношение само към прогнозата на болестта, но не и към терапевтичния отговор.^{15, 23} Проучване на Rivera *et al.* установява, че наличието на *MGMT*-метиране има връзка с терапевтичния отговор при самостоятелно прилагането на лъчелечение, дори и при липсата на адювантно лечение с алкириращ химиотерапевтик.²⁸ Промоторното метилиране на *MGMT* се свързва с ефективност на терапията с *TMZ* при първото му прилагане^{21, 29}, но не и при рецидив.³⁰ Настоящият стандарт за лечение на възрастни пациенти с глиобластом е максимална резекция на тумора с последващо лъчелечение и едновременно и адювантна *TMZ*-базирана алкирираща химиотерапия.¹⁸ Данни от две рандомизирани проучвания подкрепят стратификацията на терапията според метилационния статус на промотора на *MGMT* в популация на възрастни пациенти с глиобластом (> 65 години в проучване NOA-08 и > 60 години в проучване Nordic Glioma study). В тези клинични изпитвания пациенти с неметиран *MGMT*-промотор се повлияват по-добре само от лъчелечение, докато пациенти с метилиран *MGMT*-промотор се повлияват по-добре само от терапия с *TMZ*. При млади пациенти с глиобластома *MGMT*-промоторното метилиране не изпълнява роля на предиктивен биомаркер, не насочва директно терапевтичния избор, но е силен прогностичен фактор, повлияващ клиничното поведение.

В

- При анапластични астроцитомии, олигодендроглиомии степен III и при мултиформени глиобластоми се препоръчва определяне на статус на метилиране на промотора на *MGMT* с цел селекция на пациенти за постоперативно едновременно лъчехимиолечение с *temozolomide* (при установяване на *MGMT*-метилиране).
- За определяне на *MGMT*-статус на метилиране се препоръчват количествен PCR или специфичен за метилиране PCR (MSP), RT-PCR, MS-MLPA или секвениране.



- Препоръчва се изследване на промоторно метилиране на *MGMT* за избор на първа линия адювантна терапия, когато се избира между лъчелечение и химиотерапия или когато трябва да се избере между *temozolomide* и друга химиотерапия.
- Определяне на промоторно метилиране на *MGMT* може да помогне за определяне на прогнозата при анапластичен олигодендроглиом.
- За клинично изследване на промоторно метилиране на *MGMT* се използват валидирани методи, базирани на бисулфитно конвертирана ДНК, изолирана от фиксирана или свежо замразена туморна тъкан, като специфичен за метилиране PCR, секвениране или количествен PCR.
- Методите за анализ на промоторно хиперметилиране на *MGMT* без бисулфитно третиране на ДНК, приложими в клиничната практика, са MS-MLPA и имунохистохимия.
- За надеждно определяне на *MGMT*-статус на метилиране ДНК трябва да се изолира от срезове с $\geq 80\%$ туморна площ (от фиксирана във формалин и включена в парафин туморна тъкан), определено от патолог.
- В случай на двусмислен резултат (метилиране или неметилиране) от количествен MSP (специфичен за метилиране PCR) изследването следва да се повтори с друг метод.

ЛИТЕРАТУРА

1. Keime-Guibert F, Chinot O, Taillandier L, et al. Radiotherapy for glioblastoma in the elderly. *N Engl J Med* 2007; 356: 1527-1535
2. Cahill DP, Levine KK, Betensky RA, et al. Loss of the mismatch repair protein MSH6 in human glioblastomas is associated with tumor progression during temozolomide treatment. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 2038-2045

3. Hunter C, Smith R, Cahill DP, et al. A hypermutation phenotype and somatic MSH6 mutations in recurrent human malignant gliomas after alkylator chemotherapy. *Cancer Res* 2006; 66: 3987-3991
4. Esteller M. Epigenetic lesions causing genetic lesions in human cancer: promoter hypermethylation of DNA repair genes. *Eur J Cancer* 2000; 36: 2294-2300
5. Pollack IF, Hamilton RL, Sobol RW, et al. O6-methylguanine-DNA methyltransferase expression strongly correlates with outcome in childhood malignant gliomas: results from the CCG-945 Cohort. *J Clin Oncol* 2006; 24: 3431-3437
6. Wen PY, Schiff D, Kesari S, et al. Medical management of patients with brain tumors. *J Neurooncol* 2006; 80: 313-332
7. Esteller M, Garcia-Foncillas J, Andion E, et al. Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. *N Engl J Med* 2000; 343: 1350-1354
8. Giovagnoli AR, Boiardi A. Cognitive impairment and quality of life in long-term survivors of malignant brain tumors. *Ital J Neurol Sci* 1994; 15: 481-488
9. Dubbink HJ, Atmodimedjo PN, Kros JM, et al. Molecular classification of anaplastic oligodendroglioma using next-generation sequencing: a report of the prospective randomized EORTC Brain Tumor Group 26951 phase III trial. *Neuro-Oncology* 2016; 18 (3): 388-400
10. Hegi ME, Diserens A-C, Gorlia T, Hamou M-F, et al. MGMT Gene Silencing and Benefit from Temozolomide in Glioblastoma. *N Engl J Med* 2005; 352 (10): 997-1003
11. van den Bent MJ, Dubbink HJ, Marie Y, et al. IDH1 and IDH2 mutations are prognostic but not predictive for outcome in anaplastic oligodendroglial tumors: a report of the European Organization for Research and Treatment of Cancer Brain Tumor Group. *Clin Cancer Res* 2010; 16 (5): 1597-1604
12. van den Bent MJ, Erdem-Eraslan L, Idbaih A, de Rooi J, et al. MGMT-STP27 methylation status as predictive marker for response to PCV in anaplastic Oligodendrogliomas and Oligoastrocytomas. A report from EORTC study 26951. *Clin Cancer Res* 2013; 19 (19): 5513-5522
13. Cabrini G, Fabbri E, Lo Nigro C, et al. Regulation of expression of O6-methylguanine-DNA methyltransferase and the treatment of glioblastoma (Review). *Int J Oncol* 2015; 47 (2): 417-428
14. Reifenberger G, Weber RG, Riehm V, et al. Molecular characterization of long-term survivors of glioblastoma using genome- and transcriptome-wide profiling. *Intern J Cancer* 2014; 135 (8): 1822-1831
15. Wick W, Hartmann C, Engel C, et al. NOA-04 Randomized Phase III trial of sequential radiochemotherapy of anaplastic glioma with procarbazine, lomustine, and vincristine or temozolomide. *J Clin Oncol* 2009; 27 (35): 5874-5880
16. Wick W, Meisner C, Hentschel B, et al. Prognostic or predictive value of MGMT promoter methylation in gliomas depends on IDH1 mutation. *Neurology* 2013; 81 (17): 1515-1522
17. Cankovic M, Nikiforova MN, Snuderl M, et al. The role of MGMT testing in clinical practice: a report of the association for molecular pathology. *J Mol Diagn* 2013; 15 (5): 539-555
18. Stupp R, Brada M, van den Bent M, et al. High-grade glioma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2014; 25 (Suppl 3): iii93-iii101
19. Halford S, Rowan A, Sawyer E, Talbot I, Tomlinson I. O(6)-methylguanine methyltransferase in colorectal cancers: detection of mutations, loss of expression, and weak association with G:C>A:T transitions. *Gut* 2005; 54 (6): 797-802
20. Martinez R, Schackert G, Yaya-Tur R, et al. Frequent hypermethylation of the DNA repair gene MGMT in long-term survivors of glioblastoma multiforme. *J Neurooncol* 2007; 83: 91-93
21. Everhard S, Kaloshi G, Criniere E, et al. MGMT methylation: a marker of response to temozolomide in low-grade gliomas. *Ann Neurol* 2006; 60:740-743
22. Herrlinger U, Rieger J, Koch D, et al. Phase II trial of lomustine plus temozolomide chemotherapy in addition to radiotherapy in newly diagnosed glioblastoma: UKT-03. *J Clin Oncol* 2006; 24: 4412-4417

23. van den Bent MJ, Dubbink HJ, Sanson M *et al.* MGMT promoter methylation is prognostic but not predictive for outcome to adjuvant PCV chemotherapy in anaplastic oligodendroglial tumors: a report from EORTC Brain Tumor Group Study 26951. *J Clin Oncol* 2009; 27: 5881-5886
24. Ronaghi M, Shokralla S, Gharizadeh B. Pyrosequencing for discovery and analysis of DNA sequence variations. *Pharmacogenomics* 2007; 8 (10): 1437-1441
25. Brandes AA, Franceschi E, Tosoni A, *et al.* O(6)-methylguanine DNA-methyltransferase methylation status can change between first surgery for newly diagnosed glioblastoma and second surgery for recurrence: clinical implications. *Neuro Oncol* 2010; 12: 283-288
26. Hegi ME, Diserens AC, Godard S, *et al.* Clinical trial substantiates the predictive value of O-6-methylguanine-DNA methyltransferase promoter methylation in glioblastoma patients treated with temozolomide. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 1871-1874
27. Gorlia T, van den Bent MJ, Hegi ME, *et al.* Nomograms for predicting survival of patients with newly diagnosed glioblastoma: prognostic factor analysis of EORTC and NCIC trial 26981-22981/CE.3. *Lancet Oncol* 2008; 9: 29-38
28. Rivera AL, Pelloski CE, Gilbert MR, *et al.* MGMT promoter methylation is predictive of response to radiotherapy and prognostic in the absence of adjuvant alkylating chemotherapy for glioblastoma. *Neuro Oncol* 2010; 12: 116-121
29. Sadones J, Michotte A, Veld P, *et al.* MGMT promoter hypermethylation correlates with a survival benefit from temozolomide in patients with recurrent anaplastic astrocytoma but not glioblastoma. *Eur J Cancer* 2009; 45: 146-153
30. Paz MF, Yaya-Tur R, Rojas-Marcos I, *et al.* CpG island hypermethylation of the DNA repair enzyme methyltransferase predicts response to temozolomide in primary gliomas. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 4933-4938

1.2. ПРЕДИКТИВНИ БИОМАРКЕРИ ПРИ ТИРЕОИДЕН КАРЦИНОМ

1.2.1. *RET M918T*-мутация

Милка Георгиева, Мариела Василева

Молекулярна биология. Медуларния тиреоиден карцином (МТК) е рядък ендокринен тумор с честота 3-5% от всички тумори на щитовидната жлеза. Около 75% от случаите са спорадични, а останалите са наследствени като част от синдрома на множествена ендокринна неоплазия тип 2 (MEN2) и фамилен МТК. Синдромът MEN2 произхожда от герминативна мутация в *RET*-онкогена (RE arranged during Transfection) – в кодони 918 екзон 16 (> 95%) и кодон 883 в екзон 15. Тези пациенти са с най-агресивен тип МТК. Типичен за тях е феохромоцитом, но не хиперпаратироидизъм. За разлика от другите синдроми, изявяват също и мускуло-скелетни отклонения и други дефекти на развитието.¹ Протоонкоген *RET* кодира тирозин-киназен трансмембранен рецептор и е мутирал в почти всички наследствени МТК и в около 50% от спорадичните МТК.²

Аналитични методи за изследване. Болни със спорадичен МТК трябва да получат генетична консултация и директен ДНК-анализ (секвениране по *Sanger*) за откриване на мутирал *RET*-алел. Пациенти с открита герминативна *RET*-мутация трябва да бъдат оценени и на роднините им от първа степен трябва да се предложи генетична консултация и генетично тестване. Понастоящем няма индикация за оценка на тиреоидни тумори при пациенти със спорадичен МТК за наличие на соматични *HRAS*-, *KRAS*-, *NRAS*- или *RET*-кодон *M918T*-мутации. *RET*-генът е част от панел от гени, свързани с карцином на щитовидната жлеза – ThyroSeq. Анализът на гените в този панел се извършва чрез секвениране от ново поколение (NGS) и включва общо 12 гена: *AKT1*, *BRAF*, *CTNNB1*, *GNAS*, *PIK3CA*, *TP53*, *TSHR*, *PTEN*, *HRAS*, *KRAS*, *NRAS* и *RET* и търси

сред 284 “hot spot” мутации.¹⁸ В България секвенирането на *RET*-гена за търсене на мутации при пациенти със съмнение за MEN2B е достъпно.¹⁸

Доказателства за предиктивно значение. Генетично тестване за мутации в *RET* е прието като най-добра практика за потвърждаване диагноза на MEN2, тестване за предиктивна оценка на риск за членове на семейството и пренатална диагноза на MEN2. Мутацията *M918T* е налична в 85% от соматичните *RET*-мутации и се свързва с по-лоша прогноза и с по-агресивно протичане на болестта.³ Други сигнални пътища, участващи в растежа и инвазивността на МТК, са рецепторите на епидермалния растежен фактор (EGFR), на съдовоендотелния растежен фактор (VEGFR) и на хепатоцитния растежен фактор (с-MET).⁴⁻⁶ Затова таргетирането на тези рецептори е начин на инхибиране или блокиране на тези аберантни сигнални пътища. Много от тях са взаимно свързани, което може да обясни появата на резистентност и на по-скоро частичен, отколкото пълен отговор към лекарства. Тирозинкиназните инхибитори (ТКИи) са мултикиназни, защото инхибират много тирозинкиназни рецептори (ТКРи). За първа линия системна терапия при авансирал или метастатичен МТК напоследък са одобрени два такива ТКИи – *vandetanib* и *cabozantinib*.

Vandetanib. Той е мултикиназен инхибитор на *RET*, *VEGFR 2, 3* и *EGFR*. Американската Агенция за храна и лекарства (FDA) и Европейската лекарствена агенция (EMA) одобриха през 2011 г. използването му след демонстрирана терапевтична ефикасност във фаза III проучване ZETA.⁷ Тъй като *RET*-мутацията активира по-голяма част от МТК, това проучване планира да анализира дали *RET*-мутационният статус би повлиял върху преживяемостта без прогресия (ПБП) и отговора към терапия. Този въпрос не получи отговор поради малък брой *RET*-негативни пациенти и голям брой с неизвестен мутационен статус.⁷


Cabozantinib. Той е мултикиназен инхибитор на с-MET-, VEGFR2- и RET-пътищата при МТК. За клиничната практика FDA и ЕМА одобриха използването му при пациенти с авансирал МТК след публикуване на фаза III проучване EXAM.⁸ Няма разлики в общата преживяемост (ОП) по време на началния доклад. Актуализиран анализ на преживяемостта, представен на ASCO 2015, показва, че при тумори с *RET M918T*-мутация има значимо удължена ОП с повече от две години.⁹

Съществуването на ясни генотип-фенотип-корелации с клинична полза при скрининг, наблюдение и профилактика доведе до успешно приложение на *RET*-генотипизирането при фамилни МТК случаи.^{10, 11} Например, за пациенти с мутации, специфични за MEN2B, се счита, че имат най-висок риск за агресивен МТК; за тях е необходима най-бърза профилактична тироидектомия още в първата година от живота и ранен скрининг за феохромоцитом, но не и за първичен хиперпаратироидизъм.^{11, 12} Ранна диагноза, последвана от бърза интервенция, резултира в подобрена ОП; повече от 95% от пациентите с ранна детекция остават без болест.¹³ Соматични *RET*-мутации се откриват в около 40-78% от пациентите със спорадичен МТК, като най-честа е в кодон 918 при MEN2B-синдром.^{14, 15} Както и при наследствените МТК синдроми, тумори, активирани от соматични кодони 918-мутации, са с по-агресивен фенотип.¹⁶ Около 1-7% от пациентите с предполагаем спорадичен МТК всъщност имат наследствена болест.¹⁷

Профилактична тироидектомия за деца с MEN2B. При пациенти с MEN2B и *RET M918T*-мутация (ATA-HST категория) МТК обикновено е много агресивен и ако е възможна тироидектомия, трябва да се направи рано в живота. Две групи пациенти с MEN2B трябва да се разглеждат отделно: с известен наследствен MEN2B (25% или по-малко) и с *de novo RET*-мутации и фенотипно нормални родители (75% или повече).

При деца с наследствен MEN2B могат да се получат макроскопски МТК и лимфни метастази в първата година от живота. Поради тези причини при рисковите деца трябва да се проведе генетично тестване скоро след раждане. На деца с унаследен MEN2B трябва да бъде направена тироидектомия в първата година от живота им, дори в първите месеци след раждане, като избирането на точния момент се определя от хирург и педиатър след консултация с родителите. При деца с *de novo RET*-кодон *M918T*-мутация диагнозата на MEN2B се прави след детекция на тироиден възел.¹⁷ Наскоро Американската тироидна асоциация (ATA), NCCN и Северноамериканското дружество за невроендокринни тумори (TNANTS) публикуваха препоръки за поведение при спорадичен и наследствен МТК. Всяка от четирите препоръки описва болестни фенотипове, свързани със специфични *RET*-мутации при наследствен МТК, и препоръчват ранна тироидектомия, базирана на специфична *RET*-мутация. Препоръките на ATA идентифицират различен риск за агресивност, свързан със специфични *RET* мутации: (i) най-висок риск: MEN2b и *RET*-кодон *M918T*-мутация; (ii) висок риск: *RET*-кодони C634- и A883F-мутации; (iii) умерен риск: други мутации. Според ATA всички МТК случаи, независимо дали са наследствени или спорадични, трябва да получат генетична консултация и директен ДНК-анализ за откриване на мутации в *RET*-алела.¹⁷ Ако се намери герминативна *RET*-мутация, роднините от първа степен трябва да бъдат консултирани и тествани. Въпреки че промяна в генетичната секвенция на *RET*-гена се счита за причина на MEN2-синдрома, мутацията трябва да бъде допълнена с клинична изява в член от семейството. Това изисква поне двама засегнати индивиди да са с фамилен фенотип МТК, MEN2A или MEN2B. Генетични оценки за герминативни *RET*-мутации при пациенти с МТК и MEN2 помагат на ендокринолозите да предоставят на пациентите и техните роднини по-точна диагноза.

В	При пациенти с MEN2B-фенотип или негативни за <i>RET A883F</i> (екзон 15) се препоръчва тестване за <i>RET M918T</i> -мутация (екзон 16) с цел потвърждаване на диагноза и оценка на риск; при липса на мутации и в двата екзона се препоръчва секвениране на целия <i>RET</i> -кодиращ район.
С	При деца с най-висок риск по АТА и категория с <i>RET M918T</i> -мутация се препоръчва риск-редуцираща (елективна) тиреоидектомия в първата година (в първите месеци) от живота.

	<ul style="list-style-type: none"> ■ При роднини от първа степен на пациенти с доказан наследствен медуларен тиреоиден карцином се препоръчва генетична консултация и генетично тестване за <i>RET</i>-герминативни мутации. ■ Генетично тестване за <i>RET</i>-мутации е прието като най-добра практика за потвърждаване на диагноза MEN2, за предиктивна оценка на риск за членове на семейството и пренатална диагностика на MEN2. ■ Ако MEN2B е диагностициран при близки роднини, децата трябва да бъдат изследвани при раждане поради риск за ранно развитие на болестта и агресивно протичане. Генетичното тестване за <i>RET</i>-мутации може да даде насоки към клинични решения за превенция и лечение на MEN2B-свързани тумори.
---	---

ЛИТЕРАТУРА

- Hu MI, Ying AK, Jimenez C. Update on medullary thyroid cancer. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America* 2014; 43 (2): 423-442
- Marsh DJ, Learoyd DL, Andrew SD, et al. Somatic mutations in the RET proto-oncogene in sporadic medullary thyroid carcinoma. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 1996; 44 (3): 249-257
- Elisei R, Cosci B, Romei C, et al. Prognostic significance of somatic RET oncogene mutations in sporadic medullary thyroid cancer: a 10-year follow-up study. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93 (3): 682-687
- Rodriguez-Antona C, Pallares J, Montero-Conde C, et al. Overexpression and activation of EGFR and VEGFR2 in medullary thyroid carcinomas is related to metastasis. *Endocr Relat Cancer* 2010; 17 (1): 7-16
- Papotti M, Olivero M, Volante M, et al. Expression of hepatocyte growth factor (HGF) and its receptor (MET) in medullary carcinoma of the thyroid. *Endocr Pathol* 2000; 11 (1): 19-30
- Capp C, Wajner SM, Siqueira DR, et al. Increased expression of vascular endothelial growth factor and its receptors, VEGFR-1 and VEGFR-2, in medullary thyroid carcinoma. *Thyroid* 2010; 20 (8): 863-871
- Wells SA, Jr, Robinson BG, Gagel RF, et al. Vandetanib in patients with locally advanced or metastatic medullary thyroid cancer: a randomized, double-blind phase III trial. *J Clin Oncol* 2012; 30 (2): 134-141
- Elisei R, Schlumberger MJ, Müller SP, et al. Cabozantinib in progressive medullary thyroid cancer. *J Clin Oncol* 2013; 31 (29): 3639-3646

9. Schlumberger M, et al. Final overall survival analysis of EXAM, an international, double-blind, randomized, placebo-controlled phase III trial of cabozantinib (Cabo) in medullary thyroid carcinoma (MTC) patients with documented RECIST progression at baseline [Abstract]. *J Clin Oncol* 2015; 33: 6012
10. Eng C, Clayton D, Schuffenecker I, et al. The relationship between specific RET proto-oncogene mutations and disease phenotype in multiple endocrine neoplasia type 2. International RET mutation consortium analysis. *J Am Med Assoc* 1996; 276 (19): 1575-1579
11. Kloos RT, Eng C, Evans DB, et al. Medullary thyroid cancer: management guidelines of the American Thyroid Association. *J Am Thyroid Assoc* 2009; 19 (6): 565-612
12. Frank-Raue K, Rondot S, Raue F. Molecular genetics and phenomics of RET mutations: impact on prognosis of MTC. *Mol Cell Endocrinol* 2010; 322 (1-2): 2-7
13. Frank-Raue K, Buhr H, Dralle H, et al. Long-term outcome in 46 gene carriers of hereditary medullary thyroid carcinoma after prophylactic thyroidectomy: impact of individual RET genotype. *Eur J Endocrinol/Eur Fed Endocr Soc* 2006; 155 (2): 229-236
14. Agrawal N, Jiao Y, Sausen M, et al. Exomic sequencing of medullary thyroid cancer reveals dominant and mutually exclusive oncogenic mutations in RET and RAS. *J Clin Endocrinol Metab* 2013; 98 (2): E364-369
15. Elisei R, Cosci B, Romei C, et al. Prognostic significance of somatic RET oncogene mutations in sporadic medullary thyroid cancer: a 10-year follow-up study. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93 (3): 682-687
16. Schilling T, Buerck J, Sinn HP, et al. Prognostic value of codon 918 (ATG→ACG) RET proto-oncogene mutations in sporadic medullary thyroid carcinoma. *J Int Cancer* 2001; 95 (1): 62-66
17. Wells SA, Asa SL, Dralle H, et al. Revised American Thyroid Association guidelines for the management of medullary thyroid carcinoma. The American Thyroid Association guidelines task force on medullary thyroid carcinoma. *Thyroid* 2015; 25 (6): 567-610
18. Nikiforova M, Wald A, Roy S, et al. Targeted next-generation sequencing panel (ThyroSeq) for detection of mutations in thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 2013; 98 (11): E1852-E1860

1.3. ПРЕДИКТИВНИ БИОМАРКЕРИ ПРИ ОРОФАРИНГЕАЛЕН КАРЦИНОМ

1.3.1. p16-протеин

Павел Станимиров, Светлана Христова

Молекулярна биология. Генът *CDKN2A* (cyclin-dependent kinase inhibitor 2A, *CDKN2A/p16INK4A*) е тумор-супресорен ген, локализиран в хромозома 9p21. Той кодира протеин p16, който играе ключова роля в регулацията на клетъчния цикъл чрез взаимодействие с тумор-супресорния ретинобластома-ген (Rb). Протеинът p16 инхибира циклин-зависимите кинази 4 и 6, които са необходими за фосфорилиране на Rb. Хипофосфорилираният Rb индуцира спиране на G1 на клетъчния цикъл.^{1,2} При тумори, негативни за човешки папиломавирус (HPV) p16 се инактивира чрез делеция, мутация или промоторно метилиране, докато при високорискова HPV-инфекция онкогенните протеини E6 и E7 довеждат до инактивиране на функцията на p53 и pRb.³ Вирусните онкопротеини E6 и E7 оказват ефекти свързано, като довеждат до нарушаване на хромозомната дупликация и разделянето ѝ през митоза с последваща хромозомна нестабилност, която довежда до клетъчна дисплазия и онкогенеза.⁵ Протеинът p53 в нормални условия регулира клетъчния цикъл чрез инхибиторен ефект върху митотичната активност. Вирусният онкопротеин E6 довежда до деградация на p53 с последващ антиапоптичен ефект и възможност за натрупване на хромозомни мутации и хромозомна нестабилност в инфектираните клетки.⁶ При HPV(+) орофарингеален плоскоклетъчен карцином (ОФПКК) свръхекспресията на вирусен онкопротеин E7 довежда до деградиране на pRb⁷, който инхибира транскрипцията на p16.⁸ В резултат на това се наблюдава нуклеарна и клетъчна свръхекспресия на p16, корелираща точно с HPV(+)-статус, и се предполага, че е специфична за HPV(+) ОФПКК.^{9,10} Намерена е

силна връзка между HPV-инфекция и p16-протеин. Свръхекспресията на p16 много рядко е наблюдавана в HPV(-) ОФПКК.¹¹ Докладваната експресия на p16 при HPV(-) ОФПКК е 5-8%.¹² Поради това се приема, че p16 е сурогатен маркер за HPV(+) ОФПКК.^{11,13}

Аналитични методи за изследване. Установява се голямо съответствие между HPV-статус, анализиран чрез PCR и *in situ* хибридизация (ISH), и експресия на p16.¹³ Изследването на p16 е широко достъпно и може да бъде много добър самостоятелен прогностичен маркер при ОФПКК.^{14,15} Съобщава се за чувствителност, специфичност, позитивна и негативна предиктивна сила на експресия на p16 във връзка с HPV-статус съотв. 100%, 74%, 91% и 100%.¹⁶ Добър препоръчан алгоритъм за откриване на HPV включва HPV ISH и p16 имунохистохимия (ИХХ) при ОФПКК.¹⁶ Препоръчва се като маркер от първи ред да се използва p16 ИХХ.¹⁷

Доказателства за предиктивно значение. Системен обзор с метаанализ установява, че прогнозата е по-добра в случаи с експресия на p16 в сравнение с неекспресиращи.¹⁸ Наличието на HPV(+) статус се свързва с по-добра прогноза¹⁹, по висока лъче- и химиочувствителност²⁰, включително и с по-добър изход след хирургично лечение²¹. Експресията на p16(+) при ОФПКК е независим благоприятен прогностичен фактор не само за пациенти, третирани с лъчехимиолечение, но и при лекувани хирургично със или без следоперативно лъчелечение.²² По правило p16(+) статусът се свързва с локализация на тумора в орофаринкс.²³ При класическите карциногени (тютюн и алкохол) се наблюдава дефект на p16-гена, което е и най-честа генетична алтерация при ОФПКК.²⁴ Не е намерена връзка между G-категорията и p16-експресията.²⁵ Изследванията намират, че лекувани с лъчехимиолечение p16(+) ОФПКК имат по-добра прогноза в сравнение с p16(-) случаи.²² Намерено е значително подобряване на прогнозата в

случаи с HPV(+) и едновременна експресия на p16 в сравнение само с HPV(+) тумори.²⁶ Петгодишната обща преживяемост (ОП) за p16(+) ОФПКК е 57.1% (95% CI: 37%, 73%) срещу 26.8% (95% CI: 15%, 41%) за p16(-) случаи.²²

Въпреки че HPV/p16-статусът е важен прогностичен фактор при ОФПКК, повечето изпитвания, отчитащи прогностично значение на p16 сред пациенти в рандомизира-

ни контролирани клинични проучвания, не показват разлика в ползи от нови лечебни стратегии.^{13, 27, 29} В случаи с шийни метастази от неясна първична локализация се препоръчва ИХХ-изследване на p16 или HPV ISH. Резултатите не трябва да се използват като основание за промяна на лечебното поведение, освен в случаи на клинични проучвания.³⁰

С

- Като маркер от първи ред за селектиране на подозрителни за HPV-позитивни случаи с орофарингеален плоскоклетъчен карцином се препоръчва p16-имунохистохимия.
- Засега не се препоръчва резултати от p16-имунохистохимична експресия с валидирани тестове или от HPV-*in situ* хибридизация да се използват като маркери за определяне на вид и обем на лечение.
- При шийни метастази с неизвестна първична локализация се препоръчва имунохистохимично изследване на p16 или HPV-*in situ* хибридизация. Не се препоръчва промяна на лечебното поведение, базирано на резултатите, освен в случаи на клинични проучвания.



*При локализации, суспектни за HPV-свързани плоскоклетъчни карциноми, като тонзила, орофаринкс и корен на език, при изпращане на биопсичен материал трябва да се обсъжда с патолог провеждане на p16-имунохистохимия; при позитивен резултат се обсъжда потвърждаване с HPV-*in situ* хибридизация или типизиране с PCR.*

ЛИТЕРАТУРА

1. Merlo A, Herman JG, Mao L, et al. 50 CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumour suppressor p16/CDKN2/MTS1 in human cancers. *Nat Med* 1995; 1 (7): 686-692
2. Lukas J, Parry D, Aagaard L, et al. Retinoblastoma-protein-dependent cell-cycle inhibition by the

tumour suppressor p16. *Nature* 1995; 375: 503

3. Shintani S, Nakahara Y, Mihara M, et al. Inactivation of the p14(ARF), p15(INK4B) and p16(INK4A) genes is a frequent event in human oral squamous cell carcinomas. *Oral Oncol* 2001; 37: 498-504
4. Munger K, Howley PM. Human papillomavirus immortalization and transformation functions. *Virus Res* 2002; 89 (2): 213-228

5. Duensing S, Munger K. Centrosome abnormalities, genomic instability and carcinogenic progression. *Biochim Biophys Acta* 2001;1471 (2): M81-88
6. Panwar A, et al. Human papilloma virus positive oropharyngeal squamous cell carcinoma: a growing epidemic. *Cancer Treat Rev* 2014; 40 (2): 215-219
7. Wiest T, Schwarz E, Enders C, et al. Involvement of intact HPV16 E6/E7 gene expression in head and neck cancers with unaltered p53 status and perturbed pRb cell cycle control. *Oncogene* 2002; 21: 1510-1517
8. Li Y, Nichols MA, Shay JW, Xiong Y. Transcriptional repression of the D-type cyclin-dependent kinase inhibitor p16 by the retinoblastoma susceptibility gene product pRb. *Cancer Res* 1994; 54: 6078-6082
9. Hafkamp HC, Speel EJ, Haesevoets A, et al. A subset of head and neck squamous cell carcinomas exhibits integration of HPV 16/18 DNA and overexpression of p16INK4A and p53 in the absence of mutations in p53 exons 5-8. *Int J Cancer* 2003;107: 394-400
10. Li W, Thompson CH, O'Brien CJ, et al. Human papillomavirus positivity predicts favourable outcome for squamous carcinoma of the tonsil. *Int J Cancer* 2003; 106: 553-558
11. Lizard G, Demares-Poulet MJ, Roignot P, Gambert P. In situ hybridization detection of single-copy human papillomavirus on isolated cells, using a catalyzed signal amplification system: GenPoint. *Diagn Cytopathol* 2001; 24: 112-116
12. Liang C, Marsit CJ, McClean MD, et al. Biomarkers of HPV in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 2012;72(19): 5004-5013
13. Ang KK, et al. Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer. *N Engl J Med* 2010; 363 (1): 24-35
14. Lewis Jr JS, et al. P16 positive oropharyngeal squamous cell carcinoma: an entity with a favorable prognosis regardless of tumor HPV status. *Am J Surg Pathol* 2010; 34 (8): 1088-1096
15. Rischin D, et al. Prognostic significance of HPV and p16 status in patients with oropharyngeal cancer treated on a large international phase III trial. *J Clin Oncol* 2010; 28 (27): 4142-4148
16. Singhi AD, Westra WH. Comparison of human papillomavirus in situ hybridization and p16 immunohistochemistry in the detection of human papillomavirus-associated head and neck cancer based on a prospective clinical experience. *Cancer* 2010; 2166-2173
17. Thomas J, Primeaux T. Is p16 immunohistochemistry a more cost-effective method for identification of human papilloma virus-associated head and neck squamous cell carcinoma? *Ann Diagn Pathol* 2012; 16 (2): 91-99
18. Sedghizadeh PP, Billington WD, Paxton D, et al. Is p16-positive oropharyngeal squamous cell carcinoma associated with favorable prognosis? A systematic review and meta-analysis. *Oral Oncol* 2016; 54: 15-27
19. Ragin CCR, Taioli E. Survival of squamous cell carcinoma of the head and neck in relation to human papillomavirus infection: review and meta-analysis. *Int J Cancer* 2007; 121 (8): 1813-1820
20. Ang KK, Sturgis EM. Human papillomavirus as a marker of the natural history and response to therapy of head and neck squamous cell carcinoma. *Semin Radiat Oncol* 2012; 22 (2): 128-142
21. Reimers N, Kasper HU, Weissenborn SJ, et al. Combined analysis of HPV-DNA, p16 and EGFR expression to predict prognosis in oropharyngeal cancer. *Int J Cancer* 2007; 120: 1731-1738
22. Fischer CA, Zlobec I, Green E, et al. Is the improved prognosis of p16 positive oropharyngeal squamous cell carcinoma dependent of the treatment modality? *Int J Cancer* 2010; 126: 1256-1262
23. Begum S, Cao D, Gillison M, Zahurak M, Westra WH. Tissue distribution of human papillomavirus 16 DNA integration in patients with tonsillar carcinoma. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 5694-5699
24. Reed AL, Califano J, Cairns P, et al. High frequency of p16 (CDKN2/MTS-1/INK4A) inactivation in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 1996; 56: 3630-3633
25. Higuchi E, Oridate N, Homma A, et al. Prognostic significance of cyclin D1 and p16 in patients with intermediate-risk head and neck squamous cell carcinoma treated with docetaxel and concurrent radiotherapy. *Head Neck* 2007; 29: 940-947

26. Weinberger PM, Yu Z, Haffty BG, et al. Molecular classification identifies a subset of HPV-associated oropharyngeal cancers with favorable prognosis. *J Clin Oncol* 2006; 24: 736-747
27. Smeets SJ, Hesselink AT, Speel EJ, et al. A novel algorithm for reliable detection of human papillomavirus in paraffin embedded head and neck cancer specimen. *Int J Cancer* 2007; 121 (11): 2465-2472
28. Lassen P, Eriksen JG, Tramm T, et al. HPV-associated p16-expression and response to radiobiological modifications of radiotherapy in head and neck cancer: results from the randomised DAHANCA trials. *Euro J Cancer* 2009; Suppl 7: 11
29. Nguyen-Tan P, Pajak TF, Wheeler R, et al. A phase III trial to test accelerated versus standard fractionation in combination with concurrent cisplatin for head and neck carcinomas (RTOG 0129): report of efficacy and toxicity. In Proceedings of the Multidisciplinary Head and Neck Cancer Symposium. ECCO ESMO 2010 Berlin, Chandler Arizona, February 25–27 (Abstr), 2010
30. NCCN Guidelines Version 1.2016 Head and Neck Cancers. Available at: www.nccn.com

1.3.2. HPV-статус

Павел Станимиров, Милка Георгиева

Молекулярна биология. Съществуват нарастващи доказателства за причинна връзка между човешкия папиломавирус (HPV) и орофарингеален плоскоклетъчен карцином (ОФПКК).¹⁻⁶ Метаанализ на популационни проучвания (Северна Америка и Европа) намира, че превалирането на HPV(+) ОФПКК се е увеличило от 40% (1990г.) на 70% (2000г.).⁷ Няколко изследвания показват, че HPV се свързва с повишен риск за орален карцином, независимо от употреба на тютюн и алкохол.^{3,4} Тази връзка е валидна за високорисковите HPV16 и HPV18. HPV16 вероятно е отговорен за повече от 80% от случаите с HPV(+) ОФПКК.^{1,2,5,6,8} Докладвани са малки серии, намиращи HPV-генотип 52, 58, 61.^{9,10} По правило HPV(+) ОФПКК е по-чест при млади пациенти без история за употреба на алкохол и цигари.¹¹ HPV(+) ОФПКК типично се локализира върху палатинална или лингвална тонзила, като това се отдава на характеристиките на епитела на тонзиларните крипти, който е прицелен за вируса.¹² Активна HPV-инфекция може да доведе до някои ключови алтерации на клетъчните сигнални пътища, които подпомагат туморогенезата. Експресията на E6- и E7-вирусни протеини довежда до инактивиране на два ключови тумор-супресора – p53 и Rb (ретинобластома-протеин). E6 е малък полипептид, който довежда до деградация на p53.¹³ Свързаните с HPV мутации в p53 могат да възникнат по пътя на взаимодействието на p53 с протеин E6, кодиран от онкогенен тип HPV (главно HPV-16 и HPV-18), което довежда до увеличаване на убиквитин-зависимата протеолиза на p53.¹⁴ При HPV(+) ОФПКК се наблюдава експресия на „див“ тип (WT) p53, за разлика от HPV(-), при които се наблюдава висока честота на p53-мутации. Този факт може да се свърже с по-добра прогноза при HPV(+) ОФПКК.^{1,2} Данните за превалиране на HPV-

инфекция в случаи с орален/орофарингеален плоскоклетъчен карцином варират между 15% и 30%.^{3,4} Приблизително 20-25% от случаите с плоскоклетъчен карцином на глава и шията (ПККГШ) са HPV(+).^{13,14} Причини за тези разминавания са свързани с разлики в изследвани групи, методи на изследване и географски различия. Метаанализ върху 5046 случая с ПККГШ установява в 26% превалиране на HPV, като HPV16 преобладава.¹⁵ При карцином на устна кухина честотата е 23.5% и 24% – за ларинкс.¹⁵ Преобладаваща локализация на HPV-свързани карциноми е орофаринкс, като 50% от случаите са при непущачи.¹⁶ Все още не е напълно изяснено как HPV заразява горни дихателни пътища и устна кухина. Епидемиологични данни насочват към сексуална трансмисия.^{1,6} Значителна връзка е намерена между HPV16(+) ОФПКК и орален секс¹¹, но въпреки това, няма надеждни доказателства, че заразяването е от там¹.

Аналитични методи за изследване. Точността в откриването на HPV в туморна тъкан е от основно значение в случаи с персонализиран подход. Използван метод за откриване на подвидове на HPV *in situ* хибридизация (ISH).¹⁷ При него може да се използва материал от парафинови блокчета.¹⁸ Метод с много висока чувствителност е полимеразно-верижна реакция (PCR) и обратнотранскриптазна полимеразна верижна реакция (RT-PCR), при които е възможно откриване на HPV-ДНК или РНК в много малки количества туморна тъкан. Недостатък на метода е възможност за фалшиво положителен резултат, отчитайки HPV-генетичен материал в устна кухина, несвързан с туморна тъкан.¹⁹ Засега няма „златен“ стандарт в диагностичните тестове за откриване на високорисковия HPV. Най-разпространен алгоритъм препоръчва извършване на r16-имунохистохимия (ИХХ) като първи тест, защото неговата висока чувствителност елиминира HPV(-) случаи от последващи изследвания. Едновременно с r16 ИХХ или като втори тест за r16(+) случаи може да се използва HPV-ISH, при която специфичността е почти

100%. В случаи с несъответствие, като p16(+)/ISH(-), се пристъпва към разширен панел ISH за други онкогенни HPV-щамове. Препоръчва се също да се използва алтернативно PCR-базирани методи за потвърждаване.²⁰ Препоръчва се провеждане на изследване на HPV-статус в случаи с шийни метастази от неизвестна първична локализация.²¹

Доказателства за предиктивно значение. Съществуват противоречиви данни за прогностично значение на HPV-статус. Изследванията не намират разлика в преживяемостта^{3,22}, докато други установяват намаляване на риска от смърт при пациенти с HPV(+) статус в сравнение с HPV(-) тумори^{1,5}. Задълбочени проспективни и ретроспективни проучвания установяват, че пациенти с HPV(+) ОФПКК имат по-добра прогноза в сравнение с HPV(-) тумори.²³⁻²⁵ При HPV(+) ОФПКК рискът за смърт намалява с 60%, наблюдавайки се значително подобряване на специфичната преживяемост, в сравнение с HPV(-) тумори.¹ Намерена е строга връзка между HPV16(+) ОФПКК и по-голяма преживяемост.⁵ Тези резултати подкрепят теорията, че HPV(+) ОФПКК представляват различна молекулярна, биологична и клинична единица с по-добра прогноза, отколкото HPV(-) тумори.^{1,5} Метаанализ на 23 проучвания при 1747 пациенти с карциноми на глава и шия намира, че при HPV(+) статус има намаляване на риска от смърт с 28% (HR0.72, 95%CI 0.5-1.0) в сравнение с HPV(-) случаи.²⁶ Пациенти с HPV(+) статус имат с 49% по-нисък риск за рецидив в сравнение с HPV(-) статус (HR 0.51, 95%CI 0.4-0.7).²⁶ По-високата преживяемост се отдава на повишена чувствителност на HPV(+) към индукционна химиотерапия и лъчехимиолечение.²⁷ Имуният отговор към HPV-антигена (E6/E7-протеини) се предполага, че допринася за по-добрата преживяемост.²⁷ По правило HPV(+) ПККГШ има по-висока лъчечувствителност в сравнение с HPV(-). Две нови проучвания внашават, че пациенти с HPV(+) имат нисък риск за втори първичен карцином в сравнение с HPV(-).^{28, 29}

Все повече се дискутира нужда от диференциран подход при HPV(+) случаи с ОФПКК, при които се наблюдава по-добър терапевтичен отговор и повишена чувствителност към химиотерапия и лъчелечение.^{30, 31} Деинтензификация на лечението се обмисля в случаи без класически етиологични рискови фактори, непушачи, с ниска N-категория.^{32, 33} Първоначални предложения са насочени към намаляване на стандартната доза на дефинитивно лъчелечение или лъчехимиолечение.³⁵ Проучване ECOG1308 оценява отговора към индукционна химиотерапия с *paclitaxel*, *cisplatin* и *cetuximab* и според пълния отговор се определят пациенти, на които може да се редуцира дозата.³⁵⁻³⁷ Друга стратегия е използване на минимално инвазивна трансорална хирургия (TOX) като първично хирургично лечение.³⁸ Рандомизирано проучване (ECOG3311), протичащо в САЩ, оценява дали начална TOX може да позволи намаляване на дозата на адювантно лъчелечение за HPV(+) случаи.³⁷⁻³⁹ Друга възможност е назначаване на по-малко токсични алтернативни агенти като *cetuximab*. Проучвания RTOG 1016 и De-ESCALaTE оценяват ролята на едновременно биолъчелечение с *cetuximab*, рандомизирано срещу *cisplatin* при пациенти с p16-позитивен локално авансирани ОФПКК.³⁷⁻³⁹ Друго поле на интерес е възможност за изключване на химиотерапия при HPV(+) статус. Изследване върху 505 HPV(+) пациенти, третирани с лъчелечение или лъчехимиолечение, намира, че случаи с нисък риск за далечни метастази (T1-3, N0-2a) с HPV(+) ОФПКК могат да бъдат третирани със самостоятелно лъчелечение.⁴⁰ Провеждат се проучвания за намаляване на общата лъчева доза до 60 Gy, също и върху алтерниращо фракциониране с цел подобряване на качеството на живот и намаляване на лъчевата доза (NCT01088802, NCT01891695, OPTIMA NCT01847326, Quaterback NCT01706939, RAVD Chicago Trial NCT01133678, UNC 1120 NCT01530997). На този етап не се препоръчва деинтензификация на терапията при HPV(+) случаи.^{40, 41}

В

- Въпреки че HPV-позитивен статус корелира с по-добра прогноза, резултати от HPV-тестове не се препоръчват като мотив за промяна на лечебно поведение при орофарингеален плоскоклетъчен карцином, освен в клинични проучвания.
- За изследване на HPV се препоръчват тестове p16-имунохистохимия, HPV-*in situ* хибридизация и PCR.

С

- При орофарингеален карцином се препоръчва изследване на HPV-статус.
- При шийни метастази с неизвестна първична локализация се препоръчва изследване на HPV-статус.
- Засега не се препоръчва деинтензификация на терапията при HPV-позитивни пациенти.



*Най-разпространеният алгоритъм препоръчва извършване на p16-имунохистохимия като първи тест, защото неговата висока чувствителност елиминира HPV-негативни случаи от последващи изследвания. Едновременно с p16-имунохистохимия или като втори тест при p16-позитивни случаи може да се използва HPV-*in situ* хибридизация, при която специфичността е почти 100%. В случаи с несъответствие, като p16(+)/ISH(-), се пристъпва към разширен панел с *in situ* хибридизация за други онкогенни HPV-щамове. Препоръчва се алтернативно да се използват PCR-базирани методи за потвърждаване.*

ЛИТЕРАТУРА

1. Gillison ML, Koch WM, Capone RB, et al. Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92: 709-720
2. Chiba I, Shindoh M, Yasuda M, et al. Mutations in the p53 gene and human papillomavirus infection as significant prognostic factors in squamous cell carcinomas of the oral cavity. *Oncogene* 1996; 12: 1663-1668
3. Ba'ez A, Almodo'var JL, Cantor A, et al. High frequency of HPV16-associated head and neck squamous cell carcinoma in the Puerto Rican population. *Head Neck* 2004; 26: 778-784
4. Zhang Y, Sdek P, Cao J, Chen W-T. Human papillomavirus type 16 and 18 DNA in oral squamous cell carcinoma and normal mucosa. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2004; 33: 71-74
5. Schwartz SR, Yueh B, McDougall JK, et al. Human papillomavirus infection and survival in oral squamous cell cancer: A population-based study. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2001; 125: 1-9
6. Mork J, Lie AK, Glatte E, et al. Human papillomavirus infection as a risk factor for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* 2001; 344: 1125-1131
7. Mehanna H, Beech T, Nicholson T, et al. Prevalence of human papillomavirus in oropharyngeal and nonoropharyngeal head and neck cancer: Systematic review and meta-analysis of trends by time and region. *Head Neck* 2013; 35: 747-755

8. Moody CA, Laimins LA. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nat Rev Cancer* 2010; 10 (8): 550-560
9. Baboci L, Boscolo-Rizzo P, Holzinger D, et al. Evidence of the causal role of human papillomavirus type 58 in an oropharyngeal carcinoma. *Virology* 2013; 10: 334
10. Snow AN, Laudadio J. Human papillomavirus detection in head and neck squamous cell carcinomas. *Adv Anat Pathol* 2010; 17: 394-403
11. Smith EM, Ritchie JM, Summersgill KF, et al. Age, sexual behavior and human papillomavirus infection in oral cavity and oropharyngeal cancers. *Int J Cancer* 2004; 108 (5): 766-772
12. Klussmann JP, Weissenborn SJ, Wieland U, et al. Prevalence, distribution, and viral load of human papillomavirus 16 DNA in tonsillar carcinomas. *Cancer* 2001; 92 (11): 2875-2884
13. Chung CH, Gillison ML. Human papillomavirus in head and neck cancer: its role in pathogenesis and clinical implications. *Clin Cancer Res* 2009;15 (22): 6758-6762
14. Pai SI, Westra WH. Molecular pathology of head and neck cancer: implications for diagnosis, prognosis, and treatment. Annual review of pathology mechanisms of disease. *Palo Alto: Annual Rev* 2009; 49-70
15. Kreimer AR, Clifford GM, Boyle P, Franceschi S. Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention* 2005; 14: 467-475
16. D'Souza G, Kreimer AR, Viscidi R et al. Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer. *N Engl J Med* 2007; 356: 1944-1956
17. Singhi AD, Westra WH. Comparison of human papillomavirus in situ hybridization and p16 immunohistochemistry in the detection of human papillomavirus-associated head and neck cancer based on a prospective clinical experience. *Cancer* 2010; 116: 2166-2173
18. Caussy D, Orr W, Daya AD, et al. Evaluation of methods for detecting human papillomavirus deoxyribonucleotide sequences in clinical specimens. *J Clin Microbiol* 1988; 26: 236-243
19. Kim CJ, Jeong JK, Park M, et al. HPV oligonucleotide microarray-based detection of HPV genotypes in cervical neoplastic lesions. *Gynecol Oncol* 2003; 89: 210-217
20. Adelstein DJ, Ridge JA, Gillison ML, et al. Head and neck squamous cell cancer and the human papillomavirus: Summary of a National Cancer Institute State of the Science Meeting, November 9-10, 2008, Washington, D.C. *Head Neck* 2009; 31: 1393-1422
21. Begum S, Gillison ML, Nicol TL, Westra WH. Detection of human papillomavirus-16 in fine-needle aspirates to determine tumor origin in patients with metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin Cancer Res* 2007; 13 (4): 1186-1191
22. Paz IB, Cook N, Odom-Maryon T, et al. Human papillomavirus (HPV) in head and neck cancer. An association of HPV 16 with squamous cell carcinoma of Waldeyer's tonsillar ring. *Cancer* 1997; 79: 595-604
23. Ang KK, Harris J, Wheeler R, et al. Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer. *N Engl J Med* 2010; 363 (1): 24-35
24. Fakhry C, Westra WH, Cmelak SLA, et al. Improved survival of patients with human papillomavirus-positive head and neck squamous cell carcinoma in a prospective clinical trial. *J Natl Cancer Inst* 2008; 100 (4): 261-269
25. Huang SH, O'Sullivan B, Xu W, et al. Temporal nodal regression and regional control after primary radiation therapy for N2-N3 head-and-neck cancer stratified by HPV status. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2013; 87: 1078-1085
26. Ragin CCR, Taioli E. Survival of squamous cell carcinoma of the head and neck in relation to human papillomavirus infection: review and meta-analysis. *Int J Cancer* 2007; 121 (8): 1813-1820
27. Wansom D, Light E, Worden F, et al. Correlation of cellular immunity with human papillomavirus 16 status and outcome in patients with advanced oropharyngeal cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2010; 136 (12): 1267-1273
28. Licitra L, Perrone F, Bossi P, et al. High-risk human papillomavirus affects prognosis in patients with surgically treated oropharyngeal squamous cell carcinoma. *J Clin Oncol* 2006; 24 (36): 5630-5636

29. Hafkamp HC, Manni JJ, Haesvoets A, et al. Marked differences in survival rate between smokers and nonsmokers with HPV 16-associated tonsillar carcinomas. *Int J Cancer* 2008; 122 (12): 2656-2664
30. Lui VW, Grandis JR. Primary chemotherapy and radiation as a treatment strategy for HPV-positive oropharyngeal cancer. *Head Neck Pathol* 2012; 6 (1): S91-S97
31. Bol V, Gregoire V. Biological basis for increased sensitivity to radiation therapy in HPV-positive head and neck cancers. *BioMed Res Int* 2014; Available at: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/696028>
32. Ang KK, Sturgis EM. Human papillomavirus as a marker of the natural history and response to therapy of head and neck squamous cell carcinoma. *Semin Radiat Oncol* 2012; 22 (2): 128-142
33. Marur S, Burtne B. Oropharyngeal squamous cell carcinoma treatment: current standards and future directions. *Curr Opin Oncol* 2014; 26: 252-258
34. Descamps G, Karaca Y, Lechien J, et al. Classical risk factors, but not HPV status, predict survival after chemoradiotherapy in advanced head and neck cancer patients. *J Cancer Res Clin Oncol* 2016; 142: 2185-2196
35. Psyrri A, Sasaki C, Vassilakopoulou M, et al. Future directions in research, treatment and prevention of HPV-related squamous cell carcinoma of the head and neck. *Head Neck Pathol* 2012; 6 (1): S121-S128
36. Cmelak A, Li S, Marur S, et al. E1308: Reduced-dose IMRT in human papilloma virus (HPV)-associated resectable oropharyngeal squamous carcinomas (OPSCC) after clinical complete response (cCR) to induction chemotherapy (IC). *J Clin Oncol* 2014; 32 (5s): Abstr. LBA6006
37. Laskar SG, Swain M. HPV positive oropharyngeal cancer and treatment deintensification: How pertinent is it? *J Cancer Res Ther* 2015; 11: 6-9
38. Bonilla-Velez J, Mroz EA, Hammon RJ, Rocco JW. Impact of human papillomavirus on oropharyngeal cancer biology and response to therapy: Implications for treatment. *Otolaryngol Clin N Am* 2013; 46: 521-543
39. Blitzer GC, Smith MA, Harris SL, Kimple RJ. Review of the clinical and biologic aspects of human papillomavirus-positive squamous cell carcinomas of the head and neck. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2014; 88: 761-770
40. O'Sullivan B, Huang SH, Siu LL, et al. Deintensification candidate subgroups in human papillomavirus-related oropharyngeal cancer according to minimal risk of distant metastasis. *J Clin Oncol* 2013; 31 (5): 543-550
41. NCCN Guidelines Version 1.2016 Head and Neck Cancers. Available at: www.nccn.org

1.4. ПРЕДИКТИВНИ БИОМАРКЕРИ ПРИ КАРЦИНОМ НА ГЪРДА

1.4.1. ER- α /PgR-статус

Иван Иванов, Савелина Попова, Светлана Христова

Молекулярна биология. Въз основа на системно мултицентрично експертно проучване, проведено от ASCO/CAP през 2008 г., като част от клиничните и патологичните параметри при диагностика и лечение на карцином на гърда (КГ), се въвежда през 2010 г. изискване за имунохистохимична оценка (ИХХ) на индивидуалния туморен хормонален рецепторен статус за естроген и прогестерон. Като предиктивни и прогностични биомаркери, в комбинация с HER2 и Ki-67, те имат значение за определяне на хистологични субтипове на инвазивни дуктални карциноми, както и за избор на системно ендокрино, химио- или таргетно лечение при всички морфологични форми на инвазивен КГ.^{1,2} Рецепторите за стероидни хормони – естрогенови (ER- α) и прогестеронови (PgR) – са от съществено значение за нормалния растеж, диференциация и функция на гърдата, както и за развитие на неопластични промени в нея.³ Естрогеновият рецептор-алфа (ER- α) функционира като лиганд-активиран транскрипционен фактор, регулиращ нормален растеж и диференциация, както и туморна прогресия при значителна част от мамарните неоплазми. Неговата експресия при инвазивен КГ е ядрена и може да варира от липсваща при някои тумори до силно позитивна в 100% при други.⁴ Освен ER- α , съществува и ER- β , като двете рецепторни изоформи споделят 50% сходство в техните хормон-свързващи домейни, както и 95% сходство в техните ДНК-свързващи домейни.⁵ Прогестероновият рецептор също е лиганд-активиран транскрипционен фактор, който често се среща в две изоформи (A и B). Съществуват пътища на комуникация между двете изоформи на PgR и ER.⁶ Експресията на PgR е под контрол на ER и по локализация също е ядрена.⁷

Клинично КГ се разделят на ER- α -позитивен и ER- α -негативен. По правило ER е слаб прогностичен фактор.⁴ Пациенти, позитивни за ER- α , показват по-добра преживяемост в сравнение с тумори, негативни за ER- α . Едновременно с това, експресията на ER- α е полезен предиктивен фактор за отговор към ендокринна терапия.⁸ Сургутните субтипове, базирани на имунохистохимични маркери – луминален A и B/HER2-негативни КГ, могат да бъдат различавани помежду си на база експресия на ER/PgR, като се добави и стойността на пролиферативния биомаркер Ki-67.^{9,10} Освен пролиферативната активност на Ki-67, върху прогнозата на луминален HER2-негативен КГ влияе и статусът на PgR.¹¹

Аналитични методи за изследване. През 90-те години на XX век имунохистохимичният метод (ИХХ) измества лиганд-свързващата техника за определяне на хормонален статус и понастоящем не се препоръчва неговото използване. В рутинната практика за преценка на статуса на стероидни рецептори при КГ се е наложил ИХХ-методът. Към момента са налични редица валидирани първични антители за изследване на ER-статус (1D5; 6F11, SP1), както и за изследване на статуса на PgR (клон 1294; клон 312).^{1,12} За постигане на оптимални резултати при изследване на ER- и PgR-статус следва времето от отстраняване на тумора до неговата фиксация да не надвишава един час. Фиксацията трябва да се извършва в 10% неутрален буферизиран формалин с обем 10 пъти по-голям от обема на тъканта, за време от 6 до 72 часа. Препоръчва се използване на валидирани първични антители за ER и PgR. Необходимо е използване на контролни препарати и отчитане на реакцията в нормални структури, които служат за вътрешна контрола и където трябва да е наличен спектър в интензитета на ядрата на луминалните епителни клетки (от слаб, умерен, на места до силен).¹ Съществуват прагове на интензитета и процент на позитивност на туморни ядра, при които ИХХ-тестът се приема за положителен.¹

Препоръчва се ER- и PgR-статусът, определен с методи на IХХ, да се отчетат като негативен и позитивен. Статусът за ER-α и PgR се приема за позитивен в случаи, в които е налична ядрена имунопозитивност в $\geq 1\%$ от туморните клетки. Процентът на позитивност също може да носи прогностична и предиктивна информация. Клиницистите следва да бъдат информирани за случаи със слаба ядрена позитивност в 1-10% от туморните клетки.¹ В практиката намира широко приложение и т.нар. *Allred score*, представляващ точкова система, оценяваща интензитета на оцветяване по четиристепенна скала (0 – липсва позитивност, 1 – слаба ядрена позитивност, 2 – умерена ядрена позитивност и 3 – интензивна ядрена позитивност) и процент (дял) на съответната позитивност по шестстепенна скала (0 – липсва позитивност, 1 – $< 1/100$, 2 – $1/100$ до $1/10$, 3 – $1/10$ - $1/3$, 4 – $1/3$ - $2/3$ и 5 – $> 2/3$ ¹³; полученият сбор от точки (интензитет плюс процент на оцветяване) се явява обща оценка *Allred score*. За прагова стойност за позитивност се приема *Allred score* > 2 ; отрицателен резултат се счита в случаи на липса на имунопозитивност (0 + 0) и слаба ядрена позитивност в $< 1\%$ от ядрата на туморните клетки (1 + 1).¹³

Доказателства за предиктивно значение. Биомаркерите ER, PgR и HER2 са инкорпорирани към Осма редакция на TNM класификацията на AJCC.¹⁴ Те могат бъдат използвани като предиктори при редица терапевтични подходи, като техният статус предсказва отговор или резистентност към съответна терапия.

Резултати от редица проучвания от последните 10 години сочат липса на полза от добавяне на таксан към антрациклин-съдържаща химиотерапия, както и дори използване на антрациклин-съдържаща химиотерапия при естроген позитивните (луминален А тип) тумори.¹⁵ Данните за предиктивната стойност на ER-статус при КГ спрямо

отговора към цитотоксична химиотерапия са противоречиви.¹⁶ Съгласно обобщени литературни данни негативният ER-статус е предиктор на отговор към неoadювантна химиотерапия. Установено е, че при пациентите с ER-негативен КГ по често се постига пълен патологичен отговор в сравнение с ER-позитивен.¹⁷ Съгласно препоръките на Американската асоциация по клинична онкология (ASCO) от 2016 г., отнасящи се до ендокринната терапия при хормон-рецептор-позитивен КГ, са налице ситуации, при които е уместно използване на химиотерапия като стартово лечение при случаи на хормон-позитивен метастатичен КГ. Подобни случаи са пациенти, при които е налице непосредствена заплаха за живота (от страна на тумора) и бързият отговор към терапията е важен. Други случаи включват ситуации, при които се наблюдава позитивност за стероидни рецептори и позитивен HER2-статус. При последните е налице по-добра преживяемост при прилагане на химиотерапия и анти-HER2-терапия.¹⁸ Експресията на ER е добър предсказващ фактор за отговор на антиестрогенова терапия⁸, а експресията на PgR е по-слаб предиктор в сравнение с ER¹⁹. Известно е, че при КГ с нива на естрогенова експресия (*Allred score*) по-голям или равен на 3 е налице полза от прилагане на *tamoxifen* спрямо неизползване на ендокринна терапия.¹⁵ Обобщени резултати от проспективни проучвания, сравняващи действието на ароматазни инхибитори с *tamoxifen*, не установяват субгрупа с ER-позитивни тумори (с различни нива на експресия), при които е налице значима разлика в терапевтичния ефект. Прави впечатление обаче, че по-високи нива на ER-експресия са свързани с по-добър отговор към (изследваните) ендокринни терапии.¹⁷ Като цяло, адювантната ендокринна терапия и ендокринната терапия при авансирала болест показва по-добър ефект при тумори с по-високи нива на хормонална експресия спрямо тумори с по-ниски нива.¹⁵ Друг обзор демонстрира полза от приложението на *tamoxifen* при тумори с позитивен хормонален

статус; при негативен хормонален статус не се наблюдава ефект от приложението му.¹⁹ Данни от рандомизирани проучвания за употреба на комбинация от селективен естроген-рецепторен модулатор (SERM) и ароматазни инхибитори (AIs) като първа линия терапия показват като цяло противоречиви резултати що се отнася до подобряването на преживяемост без прогресия (ПБП) и обща преживяемост (ОП). След допълнителен анализ е установено, че преживяемостта се подобрява при пациенти, при които не е провеждана предходна ендокринна терапия.¹⁸

Предиктивната роля на ER-позитивност за прилагане на ендокринна терапия обаче не е абсолютна и зависи от редица фактори. Подтискането на естрогеновия сигнален път се оказва неефективно при част от пациентите с ER-позитивни тумори и след първоначална супресия от първа линия ендокринна терапия следва рецидив и развитие на ендокринна резистентност.²⁰ Резистентността към антиестрогенова терапия може да се осъществи по редица механизми: повишено съдържание на естроген в туморната микросреда, посттранслационни модификации, лиганд-независима активация на рецептора чрез *ESR1*-генна мутация, амплификация на вериги на обратна връзка, медирано посредством рецептори на редица трансмембранни растежни фактори, като рецептор на човешкия растежен фактор (HER), рецептор на фибробластния растежен фактор (FGFR) и рецептор на инсулиновия растежен фактор (IGF-R), чрез RAS/RAF/MAPK- и чрез PI3K/Akt/mTOR-пътя. Лекарствената резистентност може да се дължи и на нарушена регулация на клетъчния цикъл, засягаща циклин D/CDK 4/6/Rb-пътя.²¹ По правило резистентността към антихормонална терапия трудно може да се предскаже чрез рутинно ИХХ-изследване на рецепторен статус. Като цяло, резистентността при ER-позитивни карциноми рядко е следствие от загуба на хормонална експресия (промяна в хормоналния статус).²⁰ Известно е, че редица проучвания показват промяна в статуса на хормо-

налните рецептори при КГ в ранен и напреднал стадий. От тази промяна логически би последвала и промяна в терапевтичния план. Към момента обаче е неясно дали подобни промени в хормоналния статус са предиктивни спрямо отговор към терапия.^{22, 18}

Позитивният хормонален статус не винаги предсказва отговор към антистероидна терапия поради възможност от алтернативно активиране на клетъчния митотичен цикъл. В този контекст оценката на предиктивната роля на ER-статус при КГ изисква комплексен подход и оценка на допълнителни характеристики на конкретните тумори. Наличието на HER2-позитивен статус влияе върху предиктивността на статуса на ER спрямо ендокринна терапия. Наличието на позитивен HER2-статус при ER-позитивни тумори се свързва с повишен риск от рецидив, въпреки приложение на ароматазни инхибитори или *tamoxifen*, в сравнение с ER-позитивни тумори с негативен HER2-статус. В подобни случаи на копозитивност приложението на *docetaxel* показва известна полза.¹⁵

Естрогеновият път е свързан с редица други пътища на растежна стимулация, като неговото активиране може да се осъществи независимо от свързването с лиганд. Към момента обаче не са известни данни за наличие на значителна клинична полза от комбинирано лечение, включващо ендокринна терапия и инхибитори на растежни фактори (като *gefitinib* и *bevacizumab*) при постменопаузални пациентки с ER-позитивен КГ.²⁰ Обобщени данни от фаза II и III проучвания, разглеждащи прилагане на комбинирана хормонална терапия с mTOR-, PI3K- и CDK 4/6-инхибитори, показват подобрена ПБП. Използването на комбинирана терапия от естроген-рецепторен даунрегулатор (*fulvestrant*) и инхибитор на CDK 4/6 подобрява ПБП при постменопаузални пациентки с ER-позитивен КГ, лекуван на предходен етап с ароматазни инхибитори.²¹

По правило PgR-експресията притежава предсказваща стойност, независима от стойностите за ER; свързана е с ОП и ПБП.¹ Тумори с ER+/PR- са с по-неблагоприятна прогноза и по-често експресират HER2-рецептори. Негативността за PgR при ER+ тумори е сурогатен маркер за аберантни растежни сигнални фактори и показва резистентност към терапия с *tamoxifen*.²³ Както е известно, пациенти с негативен статус за ER нямат полза от петгодишна адювантна терапия с *tamoxifen*, но експресията на PgR може да има позитивен ефект спрямо отговора. Туморите с PgR-позитивен, ER-негативен фенотип са твърде редки. При идентифициране на КГ с подобен имунопрофил се препоръчва ретестване на естрогеновия статус.¹⁷ Предиктивната роля на статуса на PgR за отговор към химиотерапия е противоречива.¹⁶ Експресията на PgR не притежава съществен предиктивен ефект спрямо отговор към терапия с *tamoxifen*. Предиктив-

ната ѝ роля спрямо отговор към адювантна терапия с ароматазни инхибитори не е напълно изяснена.¹⁷

За разлика от ER-α, тестването и клиничното приложение на ER-β е значително по-ограничено. Известно е, че повишените нива на ER-β при КГ са свързани с повишена ОП и ПБП при пациенти, лекувани с адювантна терапия с *tamoxifen*.⁵

Към момента ER-α е единствен валидиран биомаркер при дуктален карцином *in situ*. Използването на антиестрогенна терапия достоверно снижава риска от рецидив от лезия в същата гърда. Като позитивен резултат за ER и PgR се приемат случаи с наличие на позитивност в ≥ 1% от ядрата на туморните клетки.²⁴

A	<ul style="list-style-type: none"> ■ При всички инвазивни карциноми на гърда се препоръчва имунохистохимично определяне на ER-α- и PgR-рецепторен статус чрез валидирани тестове. ■ При интерпретация на имунохистохимична оценка за рецепторен статус при инвазивни карциноми на гърда за позитивни се препоръчва прагова стойност (cut-off) на ядрена експресия за ER-α и PgR ≥ 1% и <i>Allred score</i> > 2. ■ Препоръчва се повторна имунохистохимична оценка на ER-α/PgR-рецепторен статус върху рецидивни туморни формации и/или далечни метастази. ■ При ER-α/PgR-позитивни карциноми на гърда се препоръчва ендокринна терапия.
B	<p>При карциноми на гърда <i>in situ</i> се препоръчва изследване на ER-α-статус, като за позитивни се приемат случаи с наличие на ядрена експресия в ≥ 1% от туморните клетки.</p>
C	<p>При пациенти, провели неoadювантна (предоперативна) системна терапия, се препоръчва повторно изследване на хормонален рецепторен статус и HER2.</p>



- *Тъканни материали, върху които ще се оценява рецепторен статус, трябва да се фиксират до един час след тяхното отстраняване в 10% неутрален буферизиран формалин с достатъчен обем за период от 6 до 72 часа.*
- *Необходимо е стриктно спазване на протоколите за тъканна фиксация и обработка.*
- *Интерпретацията на имунохистохимичното оцветяване трябва да се извършва в контекста на тъканни контроли (контролни стъкла и вътрешна контрола). При липса на реакция в нормални епителни структури биопсията се категоризира като неадекватна.*
- *Поради хетерогенност на ER-α/PgR-експресията имунохистохимично трябва да се изследва тъкан, обхващаща целия туморен обем; по преценка при негативен резултат се изследват повече от един парафинов блок.*
- *В стандартната имунохистохимична оценка се включва само инвазивният карциномен компонент.*
- *Синхронни/метахронни карциноми, рецидиви или далечни метастази трябва да се изследват индивидуално.*
- *Препоръчва се отразяване в медицинската документация на степен на позитивност и проценти на позитивни клетки.*
- *Биомаркерите ER-α и PgR трябва да се използват за имунохистохимична сурогатна класификация на молекулярни подтипове карцином на гърда.*
- *Лаборатории, извършващи ER-α/PgR-имунохистохимични изследвания, трябва да разполагат със стандартизирана процедура и постоянен вътрешен и външен качествен контрол на диагностика.*
- *Препоръчителни са годишни вътрешни одити на лабораториите за отчитане на процент позитивни тумори в изследваната популация и съпоставяне с данни от литературата.*
- *Поради възможност за наличие или развитие на резистентност не се препоръчва отбелязване на вероятност за отговор към ендокринна терапия в хистологичния отговор.*

ЛИТЕРАТУРА

1. Hammond MEH, Hayes DF, Dowsett M, et al. American society of clinical oncology/college of American pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *J Clin Oncol* 2010; 28: 2784-2795
2. Patani N, Martin L-A, Dowsett M. Biomarkers for the clinical management of breast cancer: International perspective. *Int J Cancer* 2013; 133: 1-13
3. Murphy LC, Watson P. Steroid receptors in human breast tumorigenesis and breast cancer progression. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2002; 56 (2): 65-77

4. Allred DC. Issues and updates: evaluating estrogen receptor- α , progesterone receptor, and HER2 in breast cancer. *Modern Pathology* 2010; 23: S52-S59
5. Hopp TA, Weiss HL, Parra IS, et al. Low levels of estrogen receptor β protein predict resistance to tamoxifen therapy in breast cancer. *Clinical Cancer Research* 2004; 10: 7490-7499
6. Daniel AR, Hagan CR, Lange CA. Progesterone receptor action: defining a role in breast cancer. *Expert Rev Endocrinol Metab* 2011; 6 (3): 359-369
7. Mohsin SK, Weiss H, Havighurst T, et al. Progesterone receptor by immunohistochemistry and clinical outcome in breast cancer: a validation study. *Modern Pathology* 2004; 17: 1545-1554
8. Allred C, Miller K, Viale G, et al. Molecular testing for estrogen receptor, progesterone receptor, and HER2. In: WHO classification of tumours of the breast. Lakhani SR, Ellis IO, Schnitt SJ; Tan PH, van de Vijver MJ Ed. 4th ed. IARC, Lyon, 2012; pp. 22-26
9. Jackisch C, Harbeck N, Huober J, et al. 14th St. Gallen International Breast Cancer Conference 2015: Evidence, controversies, consensus – primary therapy of early breast cancer: Opinions expressed by german experts. *Breast Care* 2015; 10 (3): 211-219
10. Gnant M, Thomssen C, Harbeck N. St. Gallen/Vienna 2015: A brief summary of the consensus discussion. *Breast Care (Basel)* 2015; 10 (2): 124-130
11. Sato K, Miyashita M, Ishida T, et al. Prognostic significance of the progesterone receptor status in Ki67-high and low Luminal B-like HER2-negative breast cancers. *Breast Cancer* 2016; 23 (2): 310-317
12. Fitzgibbons PL, Murphy DA, Hammond MEH, et al. Recommendations for validating estrogen and progesterone receptor immunohistochemistry assays. *Arch Pathol Lab Med* 2010; 134: 930-935
13. Harvey JM, Clark GM, Osborne CK, Allred DC. Estrogen receptor status by immunohistochemistry is superior to the ligand-binding assay for predicting response to adjuvant endocrine therapy in breast cancer. *J Clin Oncol* 1999; 17 (5): 1474-1481
14. Amin MB, Edge S, Greene F, et al. AJCC Cancer Staging Manual VIII ed. Washington, Springer, 2017
15. Lønning PE. Poor-prognosis estrogen receptor-positive disease: present and future clinical solutions. *Ther Adv Med Oncol* 2012; 4 (3) 127-137
16. Sjöström J. Predictive factors for response to chemotherapy in advanced breast cancer. *Acta Oncologica* 2002; 41 (4): 334-345
17. Weigel MT, Dowsett M. Current and emerging biomarkers in breast cancer: prognosis and prediction. *Endocrine-Related Cancer* 2010; 17: R245-R262
18. Rugo HS, Rumble RB, Macrae E, et al. Endocrine therapy for hormone receptor-positive metastatic breast cancer: american society of clinical oncology guideline. *J Clin Oncol* 2016; 34 (25): 3069-3103
19. Cianfrocca M, Goldstein LJ. Prognostic and predictive factors in early-stage breast cancer. *The Oncologist* 2004; 9: 606-616
20. Selli C, Dixon JM, Sims AH. Accurate prediction of response to endocrine therapy in breast cancer patients: current and future biomarkers. *Breast Cancer Research* 2016; 18: 118
21. Augereau P, Patsouris A, Bourbouloux E, et al. Hormonoresistance in advanced breast cancer: a new revolution in endocrine therapy. *Ther Adv Med Oncol* 2017; 9 (5): 335-346
22. Bossuyt V, Provenzano E, Symmans WF, et al. Recommendations for standardized pathological characterization of residual disease for neoadjuvant clinical trials of breast cancer by the Breast International Group-North American Breast Cancer Group (BIG-NABCG) collaboration. *Ann Oncol* 2015; 26 (7): 1280-1291
23. Arpino G, Weiss H, Lee AV, et al. Estrogen receptor-positive, progesterone receptor-negative breast cancer: association with growth factor receptor expression and tamoxifen resistance. *J Natl Cancer Inst* 2005; 97 (17): 1254-1261
24. Schnitt SJ, Allred C, Britton P, et al. Ductal carcinoma in situ. In: WHO classification of tumours of the breast. Lakhani SR, Ellis IO, Schnitt SJ; Tan PH, van de Vijver MJ Ed. 4th ed. IARC, Lyon, 2012; pp. 90-94

1.4.2. HER2-статус

Иван Иванов, Савелина Попова, Светлана Христова

Молекулярна биология. При карцином на гърда (КГ) са изследвани множество онкогени, като най-значим от тях е човешкият епидермален растежен фактор (HER2). Той е мембранен тирозинкиназен рецептор, който при активиране повишава клетъчната преживяемост и пролиферация.¹ Кодира се от *ERBB2*-ген, намиращ се в 17 хромозома, а амплификацията му е ключов момент за свръхекспресия на рецептори, за развитие и прогресия на част (около 15%) от КГ.^{1,2} Сигналният HER2-път на туморна прогресия е обект на прицелна терапия при HER2-позитивен КГ.¹ По правило HER2-статусът е неблагоприятен прогностичен и добър предиктивен фактор за отговор към таргетна терапия. Пациенти с позитивен HER2-статус, със или без метастази в лимфни възли, са с понижена обща преживяемост (ОП). Позитивността за HER2 се асоциира с висока пролиферативна активност, ниска степен на диференциация, ДНК-анеуплоидия и негативен хормонален статус. Прилагането на прицелна терапия с анти-HER2-антитяло-свързани агенти, комбинирани с химиотрапевтични схеми, драматично подобрява ОП.³

Аналитични методи за изследване. Според актуалните препоръки на ASCO/CAP от 2013 г. HER2-статус следва да се оценява при всички случаи на първичен или рецидивирал инвазивен КГ. При материали, при които ще бъде оценяван HER2-статус, се изисква стриктно спазване на протоколите за тъканна обработка – време на студена исхемия под един час и фиксация в достатъчен обем (1 част тъкан в 10 части фиксатор) с 10% неутрален буферизиран формалин за време между 6-72 часа.⁴

За определяне на HER2-статус с имунохистохимично изследване (ИХХ) се препоръчва използване на: (i) Ventana CONFIRM HER-2/neu антитяло 4B5 на Roche Tissue

Diagnostics, (ii) HercepTest™ Dako антитяло 4B5 антитяло A0485 и (iii) Bond™ Oracle™ HER-2 с производител Leica. При интерпретацията на ИХХ-резултати за позитивни се приемат случаи с HER2 3+. Случаите с резултат HER2 2+ са с неясно значение и следва да се ретестват с *in situ* хибридизационен метод върху същия или друг материал от случая. Случаите с резултат HER2 0 и HER2 1+ се приемат за негативни (виж Табл. 1). Съвпадаемостта между резултатите от ИХХ-проби и *in situ* хибридизационен метод (CISH) зависи от вида на използваните антитела.⁵ В препоръките на ASCO/CAP за изследване на HER2-статус се обръща внимание на валидирането на тестовете. Диагностиката на HER2 следва да се осъществява след първоначално валидиране на метода (виж. Въведение, Аналитично (техническо) валидиране). Изискването за осигуряване на конкордантност между даден валидиран и друг (вкл. алтернативен) валидиран метод в 90% за позитивни и негативни случаи, което присъства в препоръките от 2007 г., в ръководството от 2013 г. е заменено с препоръки за осигуряване на точни и надеждни методи и реактиви и сертифициране на лабораторията.⁶

За стандарт при тестване на амплификационен статус е приет методът на флуоресцентна *in situ* хибридизация (FISH). Като цяло, той е относително скъп и времеемък, изисква специфично оборудване и допълнително обучение на персонал.⁷ През последното десетилетие в практиката навлязоха алтернативи на FISH-метода, които са достъпни и при тях отчитането на реакцията става на светло поле. Такива методи са хромогенната *in situ* хибридизация (CISH), сребро-базираната *in situ* хибридизация (SISH) и двуцветната *in situ* хибридизация (DBISH). Установени са високи нива на конкордантност между CISH- и FISH-методите, както и между CISH- и ИХХ-методите.⁸ Съществуват данни и за различно съвпадение между FISH и SISH, както и между FISH и CISH.⁷ Засега CISH се налага като надежден метод за определяне на броя на HER2-копия върху тъканни материали от

гърда. Той може да бъде използван като алтернативен метод на FISH при алгоритми за изследване на HER2-статус.⁹ В случаи, при които FISH-тест не може да бъде използван, се препоръчват SISH и/или CISH като алтернативни методи за перкутанти иглени биопсии или хирургични резектати от гърда.¹⁰ Основен недостатък на CISH спрямо FISH е липса на маркиране на 17-а хромозома, а като предимства могат да се изтъкнат възможност за отчитане на обикновен светлинен микроскоп, отчетливост и лесна интерпретация на наблюдаваните морфологични структури и лесно архивиране.¹¹ При наличие на адекватен контрол съществуват минимални разминавания между резултати, получени чрез отделните методи на *in situ* хибридизация (FISH, CISH, SISH или DBISH).¹² Към настоящия момент съществуват различни препоръки за отчитане и интерпретация на резултати от *in situ* хибридизационно изследване. Освен препоръките на Европейската лекарствена агенция (EMA) и конкретните препоръки на производителите на китове, съществуват и препоръки на Американската асоциация по клинична онкология (ASCO) и Дружеството на американските патолози (CAP) в последвалата им ревизия от 2013 г. (Табл. 2). Докато препоръките на ASCO/CAP от 2007 г. са насочени към намаляване на фалшиво позитивни случаи, тези от 2013 г. визират снижение на фалшиво негативни случаи, диагностицирани с *in situ* хибридизационни методи.¹⁹ Приложението на препоръките на ASCO/CAP 2013 за FISH, вместо първоначално използваните препоръки на Американската агенция за храни и лекарства (FDA) в клиничното проучване HERA, довеждат до малки промени в количеството на пациенти, които биха били включени в проучването.¹⁹

Новите препоръки на ASCO/CAP 2013/2014 включват промени в преценката на амплификацията на HER2-гена, които според ретроспективно проучване на 10 468 пациенти, скринирани в клинични проучвания BCIRG-005, BCIRG-006 и BCIRG-007, създават неяснота и опасност за неправилно определяне на HER2-статуса при малък брой паци-

енти.²⁰ Препоръките на ASCO/CAP са обект на периодично актуализиране. Към настоящия момент са в ход обсъждания за промени, касаещи подобряване на определянето на HER2-статуса при КГ.²¹

Освен различните и променящи се критерии за интерпретация на резултати от *in situ* хибридизационно изследване и някои технически аспекти, свързани с преаналитичната и аналитичната фази на метода, съществуват редица допълнителни фактори, които могат да доведат до различно интерпретиране на HER2-статуса при КГ. В рутинната практика се срещат случаи, които могат да предизвикат сериозни затруднения в определяне на HER2-статус с *in situ* хибридизация. Такива са хетерогенност на тумора по отношение на HER2-статус, загуба на сигнали от хромозома 17 и едновременна (коамплификация) на HER2 и CEP17, водеща до двусмислен имунохистохимичен резултат (HER2 2+).¹² Амплификацията на CEP17 се дефинира като наличие на средно ≥ 3 сигнала за клетка. В практиката може да се наблюдава както едновременна амплификация на CEP17- и HER2-ген, така и амплификация само на CEP17. Полизомия 17 (наличие на допълнителна хромозома 17) е относително рядка. Известно е, че амплификацията на CEP17 сама по себе си няма предиктивна стойност спрямо терапия, насочена срещу HER2.¹⁹ По правило HER2 е биомаркер, който стои в основата на сурогатната молекулярна подкласификация на КГ.²²


Доказателства за предиктивно значение. HER2-позитивният статус може да бъде предиктор за отговор както към неспецифична, така и към таргентна терапия. Пациенти с КГ с HER2-амплификация могат да имат полза от адювантна химиотерапия, базирана на *doxorubicin*, както и на *paclitaxel*, приложен след четири цикъла с *doxorubicin/cyclophosphamide*. При HER2-позитивни карциноми може да се наблюдава позитивен

ефект от лечение с антрациклини. Допуска се, че отговорът към терапия с антрациклин може да се дължи на полизомия на 17-а хромозома или амплификация на *HER2*-гена и амплификация на топоизомеразата *Iia*.²³ Основно *HER2*-статусът при КГ е специфичен предиктивен маркер за отговор към *trastuzumab*, като приложението му при пациенти с авансирани карциноми се свързва с повишена преживяемост без прогресия (ПБП) и повишена обща преживяемост (ОП).²⁴ Данни от метаанализ на рандомизирани проучвания при ранен КГ с *HER2*-позитивен статус показват значима полза от адювантна терапия с *trastuzumab*, значително подобряваща преживяемостта без болест (ПББ) и ОП.²⁵ Обобщени данни от последните години показват, че двойното блокиране на *HER2* с два анти-*HER2*-медикамента (антитела) – *trastuzumab* + *pertuzumab* – е свързано с по-добър ефект от комбинацията анти-*HER2* медикамент и химиотерапия.²

При КГ с позитивен хормон-рецепторен и *HER2*-позитивен статус се наблюдава резистентност към ендокринна терапия, която се дължи на „преплитане“ на двете сигнални вериги. Обобщени данни сочат, че при жени в менопауза с метастатичен хормон-рецептор-позитивен карцином, при който е налице ниско туморно натоварване, комбинация на анти-*HER2*-таргетна терапия и ароматазен инхибитор е средство на избор.^{2, 26} Използването на *trastuzumab* в комбинация с химиотерапия като неоадювантно лечение подобрява пълния патологичен отговор и преживяемостта без събитие (ПБС).²⁷ Важно е да се отбележи, че промяната на *HER2*-статуса от позитивен в негативен след проведена неоадювантна терапия е свързана с повишен риск от рецидив на болестта.²⁸

Част от пациентите с КГ и позитивен *HER2*-статус не се повлияват от лечение с *trastuzumab* и нерядко след първоначален отговор следва прогресия. Резистентността

може да се дължи на образуване на хетеродимери *EGFR/HER3* или *EGFR*-хомодимери, които активират сигналните пътища. Друг възможен механизъм включва адаптиране (пренастройване на *PI3K/Akt/mTOR*-сигналния път).²⁶ Разработени са редица средства и подходи за таргетна терапия, целяща преодоляване на резистентността към анти-*HER2*-терапия.²⁹ Въпреки това, редица фаза III клинични проучвания показват, че след рецидив на карцином, лекуван с първа линия *trastuzumab*-базирана терапия, приложението на *trastuzumab* като втора линия се свързва с повишена преживяемост. Приложението на *trastuzumab*-базирана терапия като втора линия се препоръчва да става с промяна на химиотерапевтика, с който е бил комбиниран на първа линия, или включване на *mTOR*-инхибитор, или преминаване към комбинация от *capecitabine* плюс *lapatinib*, или превключване към *trastuzumab emtansine* (*T-DM1*).² При част от пациентите се идентифицира трукниран цитоплазмен *HER2*-рецептор, при който се наблюдава слаб отговор към анти-*HER2* терапия (*trastuzumab*), но се очаква полза от тирозинкиназен инхибитор (*lapatinib*).²³ Обзор и метаанализ на резултати от рандомизирани проучвания на комбинирано приложение на *lapatinib* и *trastuzumab* срещу самостоятелно прилагане показват значимо подобряване на пълния отговор към терапия (независимо от размер на тумора), ПББ и ОП. Авторите на цитирания метаанализ обръщат внимание на относително малкия брой анализирани случаи и възможността от надценяване на реалния ефект от комбинирана терапия.²⁷ Тъй като *trastuzumab* е с високо молекулно тегло, проникването му през хематоенцефалната бариера е до голяма степен затруднено и зависи от фактори, повишаващи проникваемостта ѝ. Това налага мозъчните метастази да бъдат третирани допълнително чрез лъчелечение или хирургия.²⁶

<p>A</p>	<ul style="list-style-type: none"> ■ При всички инвазивни карциноми на гърда се препоръчва задължително имунохистохимично определяне на HER2-статус чрез валидирани методи и тестове. ■ При HER2 2+ имунохистохимична оценка се препоръчва последващо изследване чрез <i>in situ</i> хибридизация (CISH, SISH, FISH или DBISH). ■ При HER2-позитивни карциноми на гърда се препоръчва обсъждане за анти-HER2 таргетна терапия (<i>trastuzumab, pertuzumab, lapatinib, T-DM1</i>).
<p>B</p>	<ul style="list-style-type: none"> ■ При метастатична болест се препоръчва ретестване за HER2 при възможност за провеждане на биопсия от метастаза. ■ При интерпретация на резултати от оценка на HER2-статус чрез <i>in situ</i> хибридизация с двойна проба се препоръчва да се вземат под внимание съотношението <i>HER2/CEP 17</i> и среден брой на генни копия, а при използване на единична проба – само среден брой на генни копия; при случаи на полизомия и амплификация на <i>CEP17</i> се препоръчва отбелязването им в биопсичния отговор.
<p>C</p>	<ul style="list-style-type: none"> ■ При карциноми с имунохистохимично позитивен HER2-статус на фона на ниска степен на малигненост (G1) и позитивен хормон-рецепторен статус (ER-α и PgR) се препоръчва допълнително ретестване (включително повторно имунохистохимично тестване и тестване с <i>in situ</i> хибридизационен метод). ■ При пациенти, провели предоперативно (неoadювантно) системно лечение, се препоръчва повторно изследване на HER2-рецепторен статус.
	<ul style="list-style-type: none"> ■ При имунохистохимично изследване трябва да се използват валидирани първични антители. ■ Тъканните материали, върху които ще се оценява рецепторен статус, трябва да се фиксират до един час след тяхното отстраняване в 10% неутрален буфериран формалин с достатъчен обем за период от 6 до 72 часа. ■ Интерпретацията на имунохистохимичното оцветяване трябва да се извършва в контекста на тъканни контроли (външна контрола). ■ При <i>in situ</i> хибридизационно изследване се препоръчва отчитане в медицинската документация и на среден брой на генни копия за HER2 и CEP17, особено при случаи с гранични стойности. ■ Лаборатории, извършващи HER2-имунохистохимични/молекулярнопатологични изследвания, трябва да разполагат със стандартизирана процедура и постоянен вътрешен и редовен външен качествен контрол на диагностика.



- *Препоръчителни са годишни вътрешни одити на лабораториите за отчитане на процент на позитивни тумори в изследваната популация и съпоставянето им с теоретично очаквани резултати.*
- *При материал от костни метастази за HER2-тестване се избират меки тъкани, за да се избегне декалцинация. При необходимост от декалцинация се препоръчва да се използва протокол с 10% EDTA и in situ хибридизационно изследване.*
- *Поради възможна хетерогенност на HER-експресия имунохистохимичната оценка трябва да обхваща оптимален туморен обем. По преценка допълнително се изследва друг биопсичен парафинов блок.*
- *В стандартната имунохистохимична оценка се включва само инвазивният карциномен компонент.*
- *Синхронни/метахронни карциноми, рецидиви или далечни метастази трябва да се изследват по отделно.*

Таблица 1. Оценка и интерпретация на IХХ-резултати при изследване на HER2-статус при КТ (модификация по Wolff AC, et al.⁴).

HER2-оценка	Интензитет на оцветяване (преценена на ниско увеличение 20x)	Каква част от клетъчната мембрана обхваща	% на позитивни клетки	Интерпретация Клиничен смисъл
HER2 0	липсва оцветяване	-	-	Негативен резултат
	слабо, едва доловимо	непълно мембранно оцветяване	≤ 10% от туморните клетки	
HER2 1+	слабо, едва доловимо	непълно мембранно оцветяване	> 10% от туморните клетки	Негативен резултат

HER2 2+	слабо, едва доловимо до умерено	оцветяване, обхващащо непълно циркумференцията на клетките	> 10% от туморните клетки	Двусмислен резултат. Ретества се същата тъкан (блокче)с <i>in situ</i> хибридационен метод или друго блокче от пациента с IХХ или <i>in situ</i> хибридационен метод
	интензивно	пълно мембранно оценяване	≤ 10% от туморните клетки	
HER2 3+	интензивно	пълно мембранно оценяване	> 10% от туморните клетки	Позитивен резултат

Таблица 2. Интерпретация на резултати от изследване на HER2-статус чрез *in situ* хибридационни методи според препоръки на FDA и ASCO/CAP (модифиция по Shah MV, et al.¹⁹).

	Отчитане на HER2-статус чрез <i>in situ</i> хибридационен метод според ЕМА ¹⁴	Отчитане на HER2 статуса чрез <i>in situ</i> хибридационен метод според критерии с FDA утвърдени китове			Отчитане на HER2-статус чрез <i>in situ</i> хибридационен метод според критерии на ASCO/CAP ⁶	
		Ventana INFORM HER2 dual ISH DNA probe assay (HER2:Chr17 на 20 клетки) ¹⁵	HER2 FISH pharmDx [™] (HER2:Сен17 на 20 клетки) ¹⁶	SPOT-Light [™] HER2 CISH Kit (Life Technologies) (HER2-генни копия на 30 клетки) ¹⁷	ASCO/CAP 2007 *При тестови системи без вътрешна контрола ¹⁸	ASCO/CAP 2013 ⁴
Негативен статус	HER2/Chr 17 < 2.0 или среден брой HER2-генни копия ≤ 4	HER2/Chr 17 < 2.0	HER2/Сен-17 < 2.0	Един до 5 сигнала (HER2-генни копия) за ядро в > 50% от клетките в изследваната зона	FISH HER2/СЕР17 съотношение < 1.8 или среден брой HER2-генни копия < 4 сигнала/ядро	При използване на единична проба: <ul style="list-style-type: none"> • среден брой копия за HER2 < 4.0 сигнала/клетка При използване на двойна проба: <ul style="list-style-type: none"> • HER2/СЕР17 съотношение < 2.0; при среден брой на HER2-генни копия < 4.0 сигнала/клетка

Двусмислен резултат	-	HER2/Chr 17 – 1.8-2.2 (извършва се броене в нови 20 клетки и определяне статуса на база общо 40-те клетки)	HER2/Cen-17 – 1.8-2.2 (извършва се броене в нови 20 клетки и определяне статуса на база общо 40-те клетки)	Четири до 6 сигнала (HER2-генни копия) за ядро в > 50% от клетките в изследваната зона (извършва се броене в нови 30 клетки и определяне статуса на база общо 60-те клетки)	FISH HER2/CEP17 съотношение < 1.8-2.2 или среден брой HER2-генни копия, наброяващи между 4 и 6 сигнала/ядро Извършва се допълнително броене (FISH) или ретестване посредством ИХХ-изследване на същия или друг материал. При HER2/Cen-17 ≥ 2.0 – подходящ за включване в проучвания за адювантно приложение на <i>trastuzumab</i>	При използване на единична проба: <ul style="list-style-type: none"> • среден брой копия за HER2 ≥ 4.0 и < 6.0 сигнала/клетка. При използване на двойна проба: <ul style="list-style-type: none"> • HER2/CEP17 съотношение < 2.0; при среден брой на HER2-генни копия ≥ 4.0 и < 6.0 сигнала/клетка Ретестване посредством друг ISH метод или ИХХ-изследване на същия или друг материал
Позитивен статус	HER2/Chr 17 ≥ 2.0 или среден брой HER2-генни копия > 4	HER2/Chr 17 ≥ 2.0	HER2/Cen-17 ≥ 2.0	Повече от 5 сигнала (HER2-генни копия), струпвания от генни копия, струпвания от генни копия и единични сигнали в > 50% от ядрата на клетките в изследваната зона	FISH HER2/CEP17 съотношение > 2.2 или среден брой HER2-генни копия > 6 сигнала/ядро	При използване на единична проба: <ul style="list-style-type: none"> • среден брой копия за HER2 ≥ 6.0 сигнала/клетка При използване на двойна проба: <ul style="list-style-type: none"> • HER2/CEP17 съотношение ≥ 2.0; при среден брой на HER2-генни копия ≥ 4.0 сигнала/клетка • HER2/CEP17 съотношение ≥ 2.0; при среден брой на HER2-генни копия < 4.0 сигнала/клетка HER2/CEP17 съотношение < 2.0; при среден брой на HER2-генни копия ≥ 6.0 сигнала/клетка

ЛИТЕРАТУРА

- Krishnamurti U, Silverman JF. HER2 in breast cancer: a review and update. *Adv Anat Pathol* 2014; 21 (2): 100-107
- Zhu X, Verma S. Targeted therapy in HER2-positive metastatic breast cancer: A review of the literature. *Curr Oncol* 2015; 22 (Suppl. 1): S19-S28
- Mendes D, Alves C, Afonso N, et al. The benefit of HER2-targeted therapies on overall survival of patients with metastatic HER2-positive breast cancer – a systematic review. *Breast Cancer Res* 2015; 17: 140
- Wolff AC, Hammond MEH, Hicks DG, et al. Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Update. 2013; 31 (31):3997-4013. doi: 10.1200/J CLIN ONCOL.2013.50.9984
- Rosa FE, Santos RM, Rogatto SR, Domingues MAC. Chromogenic in situ hybridization compared with other approaches to evaluate HER2/neu status in breast carcinomas. *Braz J Med Biol Res* 2013; 46 (3): 207-216
- Available at: www.cap.org/ShowProperty?nodePath=/UCMCon/Contribution%20Folders/WebContent/pdf/her2-summary.pdf
- Jacquemier J, Spyrtos F, Esterni B, et al. SISH/CISH or qPCR as alternative techniques to FISH for determination of HER2 amplification status on breast tumors core needle biopsies: a multicenter experience based on 840 cases. *BMC Cancer* 2013; 13:351
- Zhao J, Wu R, Au A, et al. Determination of HER2 gene amplification by chromogenic in situ hybridization (CISH) in archival breast carcinoma. *Mod Pathol* 2002; 15 (6): 657-665
- van de Vijver M, Bilous M, Hanna W, et al. Chromogenic in situ hybridisation for the assessment of HER2 status in breast cancer: an international validation ring study. *Breast Cancer Research* 2007; 9: R68
- Arnould L, Roger P, MacGrogan G, et al. Accuracy of HER2 status determination on breast core-needle biopsies (immunohistochemistry, FISH, CISH and SISH vs FISH). *Modern Pathology* 2012; 25: 675-682
- Arnould L, Denoux Y, MacGrogan G, et al. Agreement between chromogenic in situ hybridisation (CISH) and FISH in the determination of HER2 status in breast cancer. *British J Cancer* 2003; 88: 1587-1591
- Perez EA, Cortés J, Gonzalez-Angulo AM, Bartlett JMS. HER2 testing: Current status and future directions. *Cancer Treatment Reviews* 2014; 40: 276-284
- Shah MV, Wiktor AE, Meyer RG, et al. Change in pattern of HER2 fluorescent in situ hybridization (FISH) results in breast cancers submitted for FISH testing: experience of a reference laboratory using US food and drug administration criteria and American Society of Clinical Oncology and College of American Pathologists guidelines. *Clin Oncol* 2016; 34: 3502-3510
- Sapino A, Maletta F, Di Cantogno LV, et al. Gene status in HER2 equivocal breast carcinomas: impact of distinct recommendations and contribution of a polymerase chain reaction-based method. *The Oncologist* 2014; 19:1118-1126
- Available at: www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/pdf10/P100027c.pdf
- Available at: www.dssimage.com/images/upload/HER2FISH.pdf
- Available at: www.tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/P1840150%20CISH%20Package%20Insert%20Rev%200.0.pdf
- Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *Arch Pathol Lab Med* 2007; 131 (1): 18-43
- Stoss OC, Scheel A, Nagelmeier I, et al. Impact of updated HER2 testing guidelines in breast cancer – re-evaluation of HERA trial fluorescence in situ hybridization data. *Modern Pathology* 2015; 28: 1528-1534

20. Press MF, Sauter G, Buysse M, et al. HER2 gene amplification testing by fluorescent in situ hybridization (FISH): Comparison of the ASCO-College of American Pathologists guidelines with FISH scores used for enrollment in Breast Cancer International Research Group Clinical Trials. *J Clin Oncol* 2016; pii: *J CLIN ONCOL*666693
21. Available at: <http://www.ascopost.com/News/55679>
22. Gnant M, Thomssen C, Harbeck N. St. Gallen/Vienna 2015: A brief summary of the consensus discussion. *Breast Care (Basel)* 2015; 10 (2): 124-130
23. Weigel MT, Dowsett M. Current and emerging biomarkers in breast cancer: prognosis and prediction. *Endocrine-Related Cancer* 2010; 17: R245-R262
24. Nappi O, Carrillo G. Prognostic and predictive factors of breast carcinoma: Beyond hormonal receptors and HER2. *Eur J Cancer Suppl* 2008; 6 (14): 1-3
25. O'Sullivan CC, Bradbury I, Campbell C, et al. Efficacy of adjuvant trastuzumab for patients with human epidermal growth factor receptor 2-positive early breast cancer and tumors ≤ 2 cm: A meta-analysis of the randomized trastuzumab trials. *J Clin Oncol* 2015; 33: 2600-2608
26. Milani A, Montemurro F, Gioeni L, et al. Role of trastuzumab in the management of HER2-positive metastatic breast cancer. *Breast Cancer: Targets and Therapy* 2010; 2: 93-109
27. Xu Z-qiao, Zhang Y, Li N, et al. Efficacy and safety of lapatinib and trastuzumab for HER2-positive breast cancer: a systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *BMJ Open* 2017; 7: e013053. doi: 10.1136/bmjopen-2016-013053
28. Guarneri V, Dieci MV, Barbieri E, et al. Loss of HER2 positivity and prognosis after neoadjuvant therapy in HER2-positive breast cancer patients. *Ann Oncol* 2013; 24 (12): 2990-2994
29. Baselga J. Treatment of HER2-overexpressing breast cancer. *Ann Oncol* 2010; 21: (Suppl. 7): vii36-vii40

1.4.3. Ki-67-пролиферативен индекс

Светлана Христова, Иван Иванов, Савелина Поповска

Молекулярна биология. Ki-67-антиген е нехистонов ядрен протеин, описан за първи път през 1983 г. в Университета на Кил, Германия, от *J. Gerdes et al.* при синтезиране на миши моноклонални антитела върху клетъчни линии при болест на *Hodgkin*.¹ Проявява се с различни нива на експресия в G1, S, G2 и M фази на клетъчния цикъл, но не и в G0, което го определя като биомаркер за верификация на пролиферативен клетъчен потенциал/растеж на туморна фракция. Високи нива на Ki-67-експресия съответстват на изразена туморна пролиферация.^{2,3}

Аналитични методи за изследване. Клетъчната пролиферация може да бъде оценена посредством различни методи, вкл. микроскопско определяне на брой на митози върху хистологични препарати, ДНК-инкорпорация на маркирани нуклеотиди, ниво на клетки в S-фаза при флоуцитометрия. Най-често използван и основен метод за диагностика е имунохистохимично изследване (ИХХ) за експресия на Ki-67-антиген чрез MIB1-антитяло върху хистологични срезове от биопсични материали.² По правило ИХХ-реакция и оцветка са в пряка зависимост от преданалитична тъканна обработка, изискваща бърза фиксация в 10% неутрален буфериран формали (до 1 час) за редуциране на т.нар. студена исхемия, водеща до деструкция на таргетния протеин и евентуален фалшиво позитивен резултат.^{2,3} Разработени са множество схеми за ИХХ-микроскопска оценка, вкл. и софтуерни програми, които са без сравними резултати по отношение на клиничното им значение.⁴ Липсва общоприет метод за ИХХ определяне на Ki-67-експресия/пролиферативен индекс при карцином на гърда (КГ). Праговата стойност, над която Ki-67-индексът се приема за висок, варира между отделните ав-

тори и проучвания: 15% при *Inwald EC et al.*, 20% при *Rossi L et al.* и 30% при *Fasching PA et al.*^{3,5,6} Настоящата и единствена препоръка е дадена през 2011 г. от *M. Dowsett et al.* в International Ki-67 in Breast Cancer Working Group, според която ИХХ Ki-67-индекс се калкулира като процент на сбора от 1+, 2+, 3+ позитивни ядра, локализиращи се в инвазивния туморен компонент, спрямо негативни туморни клетки, оценени на микроскопско увеличение 40x. Оптималният брой преброени позитивни/негативни ядра трябва да е от 500 до 1000.⁷ Поради хетерогенната оцветка, зависеща от фазата на клетъчния цикъл, и по-висока пролиферативна активност в периферните туморни зони оценката се извършва след предварителен оглед на целия хистологичен препарат с препоръка Ki-67-индексът да се определя в зоните на преобладаваща позитивност. Обичайно това са инвазививните граници, но може да се наблюдава и в изолирани интратуморни огнища.^{7,8} Съгласно консенсусния панел от St. Gallen Consensus Meeting 2015 г. интерпретацията на Ki-67 е в зависимост от индивидуалните диагностични резултати на конкретната лаборатория. Стойности на Ki-67-индекс $\geq 30\%$, установени в 20% от изследваните карциноми, се приемат за сигнификантни и отговарят на добра практика, под 10% – за незадоволителни.^{9,10} Оценката на Ki-67-експресия е в процес на стандартизиране и определяне на репродуктивност, фаза II-III проучване на International Ki-67 Working Group относно интерлабораторни методи и контрол.¹¹

Доказателства за предиктивно значение. Високи нива на Ki-67 съответстват на изразена туморна пролиферация и неблагоприятна прогноза със значение за ефективност към химиотерапия и лъчелечение.² В кликоморфологичен аспект съчетание между туморно ниво на ER- α , pTN-статус и свръхекспресия на Ki-67 се приема с прогностично и предиктивно значение при определяне на преживяемост без болест (ПББ) и обща преживяемост (ОП). В комбинация с ER- α Ki-67-индексът се използва за диференциал-

на диагноза между субтипове луминален А и В на инвазивен дуктален карцином, имащо изключително важно значение за терапевтичния избор при HER2-негативни тумори.¹²⁻¹⁶ Според едни от първите рандомизирани проучвания (PACS01)¹⁷ и Breast Cancer International Research Group 001¹⁸ високи нива на Ki-67 при ER-позитивни тумори определят адювантна терапевтична комбинация с прибавяне на *docetaxel* към *fluorouracil* и *epirubicin*. По отношение на ендокринна терапия КГ с висок Ki-67-пролиферативен индекс е показан за лечение с *letrozole*.¹⁹ Резултати от фаза III на две рандомизирани международни проучвания, сравняващи приложение на *tamoxifen* и *exemestane* (TEXT) плюс супресия на яйчниковата функция (SOFT), показват предимство на *exemestane* и увеличаване на ПББ при пациентки с хормон-позитивен, HER2 негативен КГ и висок Ki-67-индекс.²⁰


Предиктивното значение за предоперативна (неoadювантна) химиотерапия е в процес на проучване и стандартизиране на протокола за лечение и ИХХ-оценка на Ki-67 върху дебелоиглени (core) биопсии – фаза III мултицентрично проучване на Breast International Group и North American Breast Cancer Group.^{11, 21, 22} В голямо фаза

II рандомизирано проучване neoMONARCH се оценява промяна на нивата на Ki-67 при 223 хормон-позитивни/HER2-негативни пациенти при самостоятелно лечение с *abemaciclib* или с комбинация *abemaciclib/ anastrozole*. Рандомизираните пациенти се представят със статистически значимо снижение на Ki-67-експресия и подтискане на пролиферативния клетъчен цикъл за период от 15 дни съответно с 92.6% при комбинирано приложение на двата препарата, в 90.6% при самостоятелен *abemaciclib* и в 63.2% при самостоятелен *anastrozole* ($p < 001$). В комбинирано рамо на проучването е включено и паралелно лъчелечение с наблюдаван позитивен отговор в 54.7% от пациентите.²¹⁻²⁴

Понастоящем според адаптираните препоръки на St Gallen International Expert Consensus за ИХХ-оценка на туморна пролиферация като висок Ki-67-индекс се приема стойност $\geq 30\%$. Тумори с такава величина подлежат на химио- и ендокринна терапия. При нисък Ki-67-индекс $\leq 15\%$ и тумори от тип луминален А се препоръчва само ендокринна терапия. Нива между 16-30% се квалифицират в т.нар. „сива зона” и са без значение за терапевтичния подход.^{9,23}

А	Ki-67 се препоръчва като прогностичен и предиктивен биомаркер при ER-α/PgR-рецептор позитивни, HER2-негативни карциноми на гърда.
В	<ul style="list-style-type: none"> ■ Имунохистохимично определяне на Ki-67 (MIB1)-експресия се препоръчва при всички инвазивни карциноми на гърда за определяне на луминален А/В субтипове на инвазивен дуктален карцином. ■ Препоръчва се имунохистохимично изследване на Ki-67 и върху хирургични биопсии след проведени неoadювантна химио/ендокринна терапия.
С	■ Препоръчва се определяне на Ki-67-индекс като процент от преброени 500-1000 клетки от инвазивен туморен компонент.

C	<ul style="list-style-type: none"> ■ При ER-α/PgR-рецептор-позитивен, HER2-негативен ранен карцином на гърда с Ki-67 индекс над 20% се препоръчва обсъждане за адювантна химиотерапия.
D	<ul style="list-style-type: none"> ■ Определяне на Ki-67-индекс върху предоперативни биопсии при избор на неoadювантно лечение е в процес на стандартизиране и понастоящем не се препоръчва.

	<ul style="list-style-type: none"> ■ Поради липса на стандартизирана методика самостоятелната предиктивна стойност на Ki-67-индекс е несигурна и интерпретацията му трябва да се извършва в комбинация с други клинично-патологични фактори. ■ Задължително е спазване на лабораторните протоколи за преданалитична обработка на тъканите. ■ Имунохистохимичната диагностика за определяне на Ki-67-индекс е в процес на стандартизация. ■ Имунохистохимична оценка на Ki-67 (MIB1) се базира на ядрена оцветка, без значение на интензивност на реакция (1+, 2+ или 3+). ■ Имунохистохимична оценка се извършва при налична ядрена оцветка в инвазивния туморен обем, предимно в периферни туморни зони/границии и/или в полета на най-интензивна реакция в интра-туморния обем. ■ Ki-67-индекс се определя като процент след преброяване на 500-1000 позитивни/негативни туморни ядра на микроскопско увеличение 40x в полета на най-интензивна експресия при предварителна обзорна оценка на целия карциномен обем на увеличение 20x. Наличен <i>in situ</i> карциномен компонент и активирани лимфоцити се изключват. ■ При установяване на гранични стойности на Ki-67-индекс между 15-25% може да се извърши повторна оценка върху друг биопсичен материал. ■ При гранични стойности за Ki-67-индекс отчитането може да се извърши и в друга лаборатория или в същата лаборатория от друг патолог. ■ Интерпретацията и оценката на Ki-67-индекс при карцином на гърда е в зависимост от индивидуалните диагностични резултати на конкретната лаборатория и изисква вътрешен контрол на резултатите. Стойности на Ki-67-индекс $\geq 30\%$, установени в 20% от изследваните карциноми, се приемат за сигнификантни и отговарят на добра практика, а под 10% – за незадоволителни. ■ Понастоящем не се препоръчва компютър-асистирана оценка на Ki-67-индекс.
---	---

ЛИТЕРАТУРА

- Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer* 1983; 31 (1): 13-20
- Patani N, Martin L-A, Dowsett M. Biomarkers for the clinical management of breast cancer: International perspective. *Int J Cancer* 2013; 133: 1-13
- Inwald EC, Klinkhammer-Schalke M, Hofstadter F, et al. Ki-67 is a prognostic parameter in breast cancer patients: results of a large population-based cohort of a cancer registry. *Breast Cancer Res Treat* 2013; 139: 539-552
- Hartman J. Digital image analysis outperforms manual biomarker assessment in breast cancer. *Modern Pathol* 2016; 29: 318-329
- Rossi L, Laas E, Mallon P, et al. Prognostic impact of discrepant Ki67 and mitotic index on hormone receptor-positive, HER2-negative breast carcinoma. *British J Cancer* 2015; 113: 996-1002
- Fasching PA, Heusinger K, Haeberle L, et al. Ki-67, chemotherapy response, and prognosis in breast cancer patients receiving neoadjuvant treatment. *BMC Cancer* 2011; 11: 486
- Dowsett M, Nielsen TO, A'Hern R. Assessment of Ki-67 in breast cancer: Recommendations from the International Ki67 in Breast Cancer Working Group. *J Natl Cancer Inst* 2011; 103 (22): 1656-1664
- Knutsvik G, Stefansson IM, Aziz S, et al. Evaluation of Ki67 expression across distinct categories of breast cancer specimens: a population-based study of matched surgical specimens, core needle biopsies and tissue microarrays. *PLoS ONE* 2014; 9 (11): e112121
- Coates AS, Winer EP, Goldhirsch A, et al. Panel Members Tailoring therapies – improving the management of early breast cancer: St Gallen International Expert Consensus on the primary therapy of early breast cancer. *Ann Oncol* 2015; 26: 1533-1154
- Esposito A, Criscitiello C, Curigliano G. Highlights from the 14th St Gallen International Breast Cancer Conference 2015 in Vienna: Dealing with classification, prognostication, and prediction refinement to personalize the treatment of patients with early breast cancer. *Ecancer* 2015; 9: 518; doi: 10.3332/ecancer.2015.518
- Leung SCY, O Nielsen T, Zabaglo L, et al. Analytical validation of a standardized scoring protocol for Ki-67: phase 3 of an international multicenter collaboration. *NPJ Breast Cancer* 2016; 2 (16014): 1-9
- Rakha EA, El-Sayed ME, Green AR, et al. Biologic and clinical characteristics of breast cancer with single hormone receptor positive phenotype. *J Clin Oncol* 2007; 25: 4772-4778
- Davies C, Godwin J, Gray R, et al. Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen: patient-level meta-analysis of randomised trials. *Lancet* 2011; 378: 771-784
- Bustreo S, Osella-Abate S, Cassoni P. Optimal Ki-67 cut-off for luminal breast cancer prognostic evaluation: a large case series study with a long-term follow-up. *Breast Cancer Res Treat* 2016; 157: 363-371
- Marrelli D, Pinto E, Neri A, et al. Mib-1 proliferation index is an independent predictor of lymph node metastasis in invasive breast cancer: A prospective study on 675 patients. *Oncology Reports* 2006; 15 (2): 425-429
- Feeley LP, Mulligan AM, Pinnaduwa D, et al. Distinguishing luminal breast cancer subtypes by Ki67, progesterone receptor or TP53 status provides prognostic information. *Modern Pathology* 2014; 27: 554-561
- Penault-Llorca F, Andre F, Sagan C, et al. Ki-67 expression and docetaxel efficacy in patients with estrogen receptor-positive breast cancer. *J Clin Oncol* 2009; 27 (17): 2809-2815
- Hugh J, Hanson J, Cheang MC, et al. Breast cancer subtypes and response to docetaxel in node-positive breast cancer: use of an immunohistochemical definition in the BCIRG 001 trial. *J Clin Oncol* 2009; 27 (8): 1168-1176
- Davies C, Godwin J, Gray R, et al. Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen: patient-level meta-analysis of randomised trials. *Lancet* 2011; 378: 771-784

20. Regan MM, Pagan O, Francis PA, et al. Predictive value and clinical utility of centrally-assessed ER, PgR and Ki-67 to select adjuvant endocrine therapy for premenopausal women with hormone receptor-positive, HER2-negative early breast cancer: TEXT and SOFT trials. *Breast Cancer Res Treat* 2015; 154 (2): 275-286
21. Ingolf J-B, Russalina M, Simona M, et al. Can Ki-67 play a role in prediction of breast cancer patients' response to neoadjuvant chemotherapy? *Bio Med Res International* 2014. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/628217>
22. Recommendations for standardized pathological characterization of residual disease for neoadjuvant clinical trials of breast cancer by the Breast International Group-North American Breast Cancer Group (BIG-NABCG) collaboration. *Ann Oncol* 2015; 00: 1-12
23. Senkus E, S. Kyriakides S, Ohno S, et al. Primary breast cancer: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2015; 26 (5): v8-v30
24. Ellis MJ, Suman VJ, Hoog J, et al. Ki-67 proliferation Index as a tool for chemotherapy decisions during and after neoadjuvant aromatase inhibitor treatment of breast cancer: results from the American College of Surgeons Oncology Group Z1031 Trial (Alliance). *J Clin Oncol* 2017; 35 (1): 1061-1071

1.4.4. Мултигенни сигнатури

Борис Петров, Милка Георгиева

Тестовите с профилиране на генна експресия са нова парадигма за оценка на потенциална полза от химиотерапия, базирана на нива на експресия на специфични гени в индивидуални тумори. Няколко мултигенни теста са налични за оценка на риск при ранен карцином на гърда (КГ). Те са най-подходящи за HER2-негативен луминален ранен КГ с до три позитивни аксиларни лимфни възли. При тези пациенти точна оценка на риск, базирана на мултигенни тестове, е предиктивен биомаркер за полза от адювантна химиотерапия. През 2016 г. в препоръките на ASCO влизат четири мултигенни теста (Oncotype DX, EndoPredict, PAM50 и Breast Cancer Index) за рутинно използване при ранен КГ.¹ В допълнение, пети мултигенен тест – MammaPrint – е включен в препоръките на AGO (Working Group for Gynecological Oncology Breast Commission).² Данни от проспективно клинично проучване за MammaPrint са представени на AACR 2016 г., т.е. след публикуването на препоръките на ASCO.

21-гена сигнатура (Oncotype DX, Recurrence Score). Тестът (Oncotype DX™ Breast Cancer Assay (Genomic Health Inc., Redwood City, USA) измерва генна експресия на 21 гена чрез количествен qRT-PCR на РНК, изолирана от парафинови блокчета. Дава т.нар. Recurrence Score (RS – оценка на риск) при жени с ранен стадий, лекувани с *tamoxifen*, ER-позитивни, с негативни лимфни възли. Анализират се 16 гена, отговорни за пролиферация, регулация на естрогенов рецептор (ER), HER2-сигнален път и инвазия, заедно с пет контролни гена. Резултатът се изразява като оценка на рецидив (RS) от 1 до 100. Туморите се класифицират в три рискови категории, базирани на техния RS: нисък риск (RS < 18), умерен риск (RS 18-30) и висок риск (RS ≥ 31).³ Този тест може

да бъде използван при новодиагностицирани пациенти от всички възрасти с ER-позитивен КГ в стадий I или II. Притежава и предиктивна стойност за ползи от ендокринна терапия (*tamoxifen* и/или ароматазни инхибитори) и от адювантна химиотерапия.

Има три проспективни международни клинични проучвания с Oncotype DX за стратификация на пациенти или рандомизация: TAILORx (pN0), RxPONDER (pN1) и WSG-Plan B (pN0-1). Проучване RxPONDER все още продължава и рамото за нисък риск вече е докладвано: пациенти с нисък RS (0-10), лекувани само с ендокринна терапия, имат 93.8% петгодишна преживяемост без болест (ПББ) и 98% обща преживяемост (ОП).⁴ Проучване WSG-Plan B потвърди отличната ОП на пациенти с нисък риск (RS 0-11), лекувани само с ендокринна терапия (до три позитивни лимфни възли), с ПББ – 98% срещу пациенти на адювантна химиотерапия с 98% за умерен (RS 12-25) и с 92% за висок (RS > 25).⁵ Петгодишните резултати за пациенти с нисък RS са 94% ПББ и 99% ОП и не се различават значително от пациенти с pN0 и pN1.⁶

70-гена сигнатура (MammaPrint). Тестът (MammaPrint™; Agendia, Amsterdam, the Netherlands) е базиран на ДНК-микрочипова технология. Наскоро бе валидиран за работа с тъкани, включени в парафин.⁷ Дава резултат, определящ две групи с геномно нисък и геномно висок риск. Прогностичната стойност на MammaPrint е изследвана за нодално негативни и нодално позитивни пациенти (1-3 лимфни възли) в много ретроспективни проучвания^{8,9}, едно проспективно¹⁰, а напоследък – в едно рандомизирано проспективно проучване¹¹. Проучване MINDACT е планирано за проспективно валидиране на MammaPrint при повече от 6000 пациенти с ранен КГ, за да оцени ролята на адювантна химиотерапия при противоречиви резултати между клиникопатологична и геномна оценка на риск. Проучването (n = 6693) достига главната си крайна цел с

94.7% петгодишна ОП при пациенти с ранен КГ и висок клиничен риск, чиито тумори са с нисък риск след тестване с MammaPrint и без адювантна химиотерапия след ран-домизация.¹²

EndoPredict. Тестът (Endopredict[®]; Sividon Diagnostics GmbH, Cologne, Germany/Myriad Genetics Inc., USA) комбинира експресията на три пролиферативни гена, пет гена, асоциирани с ER-сигнален път и диференциация, и три контролни гена. Точкуването EP (EndoPredict [EP] score 0-15) се изчислява на базата на промени в експресията на РНК, изолирана от парафинови срезове чрез количествен RT-PCR. Тестът може да се провежда в децентрализирани лаборатории, което значимо скъсява времето до получаване на резултат.¹³ EndoPredict е мултигенен тест, предиктивен за вероятност от развитие на метастази за 10 години от началната диагноза при жени с позитивен естроген рецептор (ER+) и негативен HER2, които са нодално негативни или позитивни с 1-3 засегнати лимфни възли. Тестът комбинира измервания на генна експресия (EP) с нодален статус и размер на тумора, като генерира пълен резултат за риска – EPclin. Използва се за идентифициране на туморни типове, които няма да имат полза от химиотерапия. Публикуваните клинични доказателства са от три проучвания за аналитично и пет проучвания за клинично валидиране, където тестът показва възпроизводимост и прогностична стойност. В едно проучване е показано, че резултати от EndoPredict могат да променят терапевтични решения.¹⁴⁻¹⁷ При пилотно изследване с проби от проучване TransATAC за валидиране на Oncotype DX RS, PAM50 ROR и VCI е сравнена прогностичната информация от RS и EPclin за десетгодишен риск от далечни метастази: EPclin дава повече прогностична информация от RS както за първите пет години от поставяне на диагноза, така и значимо повече информация за вторите пет години.¹⁸

Prosigna (PAM50). Тестът (PAM50; Breast Cancer Prognostic Gene Signature Assay; Nanostring Technologies, Seattle, USA) е базиран на оригинални молекулярни субтипове КГ и позволява тяхното определяне чрез ползване на сигнатура PAM50 от включена в парафин тъкан. Друг резултат е *риск от рецидив* (ROR Score) със стойност между 0 и 100. ROR Score се изчислява на базата на 46 гена плюс референтни гени, пролиферационен резултат и размер на тумор. Пациентите се класифицират в групи с нисък, умерен и висок риск на базата на техния ROR Score.¹⁹ За клинична практика ROR Score включва клинична информация за размер на тумор и нодален статус. Prosigna е валидиран за децентрализирано тестване чрез Nanostring Counter технология.²⁰ PAM50 ROR Score е клинично валидиран по отношение на прогностичните си свойства в проучване ABCSG 8: дава повече и по-сигурна прогностична информация от клиничните фактори. Туморите тип луминален А се свързват със значително по-нисък риск за рецидив за десет години, отколкото тип луминален В.²¹ В допълнение, PAM50 и ROR Score дават значителна прогностична информация заедно с клиничните фактори и за късен рецидив между 5 и 15 години.²² Комбинирани анализи от проучвания TransATAC и ABCSG 8 (n = 2137) валидират прогностичната стойност на PAM50 ROR като превъзхождаща клиничната информация за късни рецидиви.²³ Потвърдена е и прогностичната му стойност за нодално позитивни пациенти.²⁴ В Европа Prosigna отчита субтип на КГ и ROR Score, докато в САЩ отчита само ROR Score. Разрешителното на Американската Агенция за храни и лекарства (FDA) от 2013 г. подчертава, че „тестът не е предназначен за диагноза или да предсказва или детектира отговор към терапия, или да помага за селектиране на оптимална терапия за пациенти“.²⁵

Breast Cancer Index (BCI). Тестът (bioTheranostics Inc, San Diego, CA, USA) е алгоритъм, базиран на генна експресия, включващ две генни сигнатури – отношение

НОХВ13:IL17BR (H/I) и Molecular Grade Index (MGI). VCI е RT-PCR-тест, който измерва експресия на H/I, MGI и четири контролни гена. Прогностичният скор (VCI Prognostic score) има цифрова стойност от 0 до 10 и категоризира нива на риск за късен (висок срещу нисък) и общ (висок, умерен и нисък) далечен рецидив. Предиктивната оценка (VCI Predictive) дава вероятност за полза от удължена над пет години адювантна ендокринна терапия.²⁶ В проучване NCIC CTGMA14 тестът дава прогностична информация за нодално негативни и нодално позитивни пациенти.²⁷

Сравняването на наличните геномни тестове показва, че те дават различна информация и корелацията им е скромна. Също разпределянето на рисковите групи е различно при тестове MammaPrint, Prosigna и EndoPredict, които обикновено класифицират повече пациенти с висок риск, отколкото Oncotype DX. От друга страна, основно предимство на EndoPredict е разделяне на пациентите само на две групи (висок/нисък риск), което преодолява неинформативни междинни резултати на другите тестове в приблизително 20% от случаите. Така всеки тест трябва да се разглежда в контекста на подкрепящите го доказателства.²⁸

A

- Препоръчва се тестване с мултигенна сигнатура (Oncotype DX, MammaPrint, Prosigna или EndoPredict) за определяне на прогноза и подпомагане на решение за прилагане на адювантна химиотерапия при ER-позитивни, HER2-негативни, нодално негативни и нодално позитивни (1-3 лимфни възела) пациенти; при нисък риск се обсъжда въздържане от адювантна химиотерапия.
- Препоръчва се тестване с VCI за определяне на прогноза и подпомагане на решение за прилагане на адювантна химиотерапия при ER-позитивни, HER2-негативни, нодално негативни пациенти.



Препоръчва се извършване на мултигенни анализи при жени с ранен ER-позитивен/HER2-негативен карцином на гърда, когато класическите клиничко-патологични фактори за определяне на прогноза са двусмислени и недостатъчно информативни.

ЛИТЕРАТУРА

1. Harris LN, Ismaila N, McShane LM, et al. Use of biomarkers to guide decisions on adjuvant systemic therapy for women with early-stage invasive breast cancer: American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline. *J Clin Oncol* 2016; 34 (10): 11340-1150
2. AGO recommendations 2016 for diagnosis and treatment of early and advanced breast cancer. Available at: www.ago-online.de
3. Cronin M, Sangli C, Liu ML, et al. Analytical validation of the Oncotype DX genomic diagnostic test for recurrence prognosis and therapeutic response prediction in node-negative, estrogen receptor-positive breast cancer. *Clin Chem* 2007; 53 (6): 1084-1091

4. Sparano JA, Gray RJ, Makower DF, et al. Prospective validation of a 21-gene expression assay in breast cancer. *N Engl J Med* 2015; 373 (21): 2005-2014
5. Gluz O, Nitz U, Christgen M, et al. The WSG phase III PlanB trial: first prospective outcome data for the 21-gene recurrence score assay and concordance of prognostic markers by central and local pathology assessment. *J Clin Oncol* 2016; 34 (20): 2341-2349
6. Gluz O, Nitz U, Christgen M, et al. Prognostic impact of 21 gene recurrence score, IHC4, and central grade in high-risk HR+/HER2-early breast cancer (EBC): 5-year results of the prospective Phase III WSG PlanB trial. *J Clin Oncol* 2016; 34: (Suppl; Abstr 556)
7. Sapino A, Roepman P, Linn SC, et al. MammaPrint molecular diagnostics on formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. *J Mol Diagn* 2013; 16: 190-197
8. van de Vijver MJ, He YD, van't Veer LJ, et al. A gene expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N Engl J Med* 2002; 347: 1999e2009
9. Bueno-de-Mesquita JM, van Harten WH, Retel VP, et al. Use of 70-gene signature to predict prognosis of patients with node-negative breast cancer: a prospective community-based feasibility study (RASTER). *Lancet Oncol* 2007; 8: 1079e87
10. Drukker CA, Bueno-de-Mesquita JM, Retel VP, et al. A prospective evaluation of a breast cancer prognosis signature in the observational RASTER study. *Int J Cancer* 2013; 133: 929e36
11. Cardoso F, van't Veer LJ, Bogaert J, et al. On behalf of the European Commission supported TRANSBIG consortium and MINDACT investigators. The 70-gene signature as an aid to treatment decisions in early breast cancer. *N Engl Med* 2016. in press
12. Piccart M, Rutgers E, van't Veer L, et al. On behalf of TRANSBIG consortium and MINDACT investigators. Primary analysis of the EORTC 10041/ BIG 3-04 MINDACT study: a prospective, randomized study evaluating the clinical utility of the 70-gene signature (MammaPrint) combined with common-clinical-pathological criteria for selection of patients for adjuvant chemotherapy in breast cancer with 0-3 positive nodes. AACR 2016: CT039
13. Dubsy P, Filipits M, Jakesz R, et al. Austrian Breast and Colorectal Cancer Study Group (ABCSG). EndoPredict improves the prognostic classification derived from common clinical guidelines in ER-positive, HER2-negative early breast cancer. *Ann Oncol* 2013; 24 (3): 640-647
14. Dubsy P, Brase JC, Jakesz R, et al. Austrian Breast and Colorectal Cancer Study Group (ABCSG). The EndoPredict score provides prognostic information on late distant metastases in ER+/HER2-breast cancer patients. *Br J Cancer* 2013; 109 (12): 2959-2964
15. Martin M, Brase JC, Calvo L, et al. Clinical validation of the EndoPredict test in node-positive, chemotherapy-treated ER+/HER2- breast cancer patients: results from the GEICAM 9906 trial. *Breast Cancer Res* 2014; 16 (2): R38
16. Denkert C, Kronenwett R, Schlake W, et al. Decentral gene expression analysis for ER+/Her2- breast cancer: results of a proficiency testing program for the EndoPredict assay. *Virchows Arch* 2012; 460 (3): 251-259
17. Muller BM, Keil E, Lehmann A, et al. The EndoPredict gene-expression assay in clinical practice – performance and impact on clinical decisions. *PLoS ONE* 2013; 8: e68252
18. Buus R, Sestak I, Kronenwett R, et al. Comparison of EndoPredict and EPclin with Oncotype DX Recurrence Score for prediction of risk of distant recurrence after endocrine therapy. *JNCI J Natl Cancer Inst* 2016; 108 (11): 1-7
19. Wallden B, Storhoff J, Nielsen T, et al. Development and verification of the PAM50-based Prosigna breast cancer gene signature assay. *BMC Med Genomics* 2015; 22 (8): 54
20. Nielsen T, Wallden B, Schaper C, et al. Analytical validation of the PAM50-based Prosigna Breast Cancer Prognostic Gene Signature Assay and nCounter Analysis System using formalin-fixed paraffin-embedded breast tumor specimens. *BMC Cancer* 2014; 13 (14): 177
21. Gnant M, Filipits M, Greil R, et al. Austrian Breast and Colorectal Cancer Study Group. Predicting distant recurrence in receptor-positive breast cancer patients with limited clinicopathological risk: using the PAM50 Risk of Recurrence score in 1478 postmenopausal patients of the ABCSG-8 trial treated with adjuvant endocrine therapy alone. *Ann Oncol* 2014; 25 (2): 339-345

22. Filipits M, Nielsen TO, Rudas M, et al. Austrian Breast and Colorectal Cancer Study Group. The PAM50 risk-of-recurrencescore predicts risk for late distant recurrence after endocrinotherapy in postmenopausal women with endocrine-responsiveearly breast cancer. *Clin Cancer Res* 2014; 20 (5): 1298-1305
23. Sestak I, Cuzick J, Dowsett M, et al. Prediction of late distantrecurrence after 5 years of endocrine treatment: a combinedanalysis of patients from the Austrian breast and colorectal cancerstudy group 8 and arimidex, tamoxifen alone or in combinationrandomized trials using the PAM50 risk of recurrence score. *J ClinOncol* 2015; 33 (8): 916-922
24. Gnant M, Sestak I, Filipits M, et al. Identifying clinically relevantprognostic subgroups of postmenopausal women withnode-positive hormone receptor-positive early-stage breast cancerreated with endocrine therapy: a combined analysis of ABCSG-8and ATAC using the PAM50 risk of recurrence score and intrinsicsubtype. *Ann Oncol* 2015; 26 (8): 1685-1691
25. FDA website. Prosigna FDA approval. 510(k) Substantial Equivalence Determinaion Decision Summary. Available at: www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/pdf13/k130010.pdf
26. Zhang Y, Schnabel CA, Schroeder BE, et al. Breast cancer indexidentifies early-stage estrogen receptor-positive breast cancerpatients at risk for early- and late-distant recurrence. *Clin Cancer Res* 2013; 19 (15): 4196-4205
27. Sgroi DC, Chapman JA, Badovinac-Crnjevic T, et al. Assessmentof the prognostic and predictive utility of the Breast Cancer Index (BCI): an NCIC CTG MA.14 study. *Breast Cancer Res* 2016; 18 (1): 1
28. Duffy MJ, Harbeck N, Nap M, et al. Clinical use of biomarkers in breast cancer: Updatedguidelines from the European Group on Tumor Markers (EGTM). *Eur J Cancer* 2017; 75: 284-298

1.4.5. APOBEC3B-мутация

Драга Тончева, Мариела Василева

Молекулярна биология. Фамилията APOBEC е съставена от протеини с каталитична активност – APOBEC1, APOBEC3 (APOBEC3A, APOBEC3B, APOBEC3C, APOBEC3D, APOBEC3E, APOBEC3G, APOBEC3H) и от деаминаза AID. APOBEC1 деаминира mRNA на аполипопротеин В и генерира APOB48, който играе роля за абсорбцията на липиди, приети с храната през тънките черва.

Генът APOBEC3 кодира протеин, който представлява цитозин-деаминазен ензим. APOBEC3 участва в защитни механизми срещу ретровируси и мобилни елементи, като деаминира цитозин в урацил в ретровирусната едноверижната ДНК и генерира C> T и C> G мутации. Според по-нови данни APOBEC3A катализира деаминиране на човешка геномна ДНК и води до развитие на карцином, метастази и резистентност към терапия. Описани са миссенс, нонсенс мутации и делеции при различни ендометриални, интестинални и стомашни карциноми. Много солидни тумори показват геномни белези, които отразяват нарушения, причинени от един или повече APOBEC-ензими. Наблюденията, че протеините APOBEC са способни да предизвикват мутагенеза, и данните за тяхната много висока експресия в тумори насочиха изследванията към молекулните механизми и тяхната дисрегулация преди и след APOBEC. APOBEC-цитидин-деаминази играят роля за натрупване на мутации при много карциноми и определят техния мутационен подпис.

Експериментални изследвания хвърлят нова светлина върху иницирането на туморогенеза в резултат от експресия на APOBEC3B, който се превръща в онкоген и индуцира

репликационен стрес.¹ По-нови изследвания доказват връзка на APOBEC3B-цитозин-деаминаза с развитие на карцином на гърда (КГ). Делеция на 30-кв в гена APOBEC3B води до образуване на химерен ген APOBEC3A-APOBEC3B, който повишава риска за злокачествени тумори на гърда и увеличава разнообразието на мутации в APOBEC-генна сигнатура. Мутация APOBEC3B* c.783delG води до загуба на функция на гена APOBEC3B, асоциира умерено КГ, но вероятно допринася за ранно начало на болестта.⁴ Висока експресия на APOBEC3B асоциира с лоша преживяемост без болест (ПББ), преживяемост без метастази (ПБМ) и обща преживяемост (ОП).⁴ При нелекувани ER-положителни (ER+) и нодално отрицателни пациенти високата експресия на APOBEC3B е маркер за лоша прогноза.⁵ Според авторите генетичните изменения, индуцирани от APOBEC3B, допринасят за прогресия на КГ. Наблюдавана е тенденция за повишена експресия на APOBEC3B, но не на APOBEC3A или APOBEC3G, в HER2-позитивни клетъчни линии и корелация между наличие на маркери и репликационен стрес.⁶ Свърхрегулация на APOBEC3B при репликационен стрес зависи отсигнален път ATR-CHK1 (checkpoint kinase 1). При изследване на връзката между експресия на APOBEC3B и лекарствена чувствителност към CHK1-инхибитора CCT244747 същите автори забелязват тенденция, че маркери за репликационен стрес, включително APOBEC3B, могат да бъдат използвани като предиктори за този агент. При анализ на всички типове карциноми и клетъчни линии авторите стигат до заключение, че експресията на APOBEC3B и APOBEC3A е значително асоциирана със чувствителност към 16-38 лекарства, т.е. вероятно е маркер за чувствителност към антикарциномни агенти. При ER+ КГ в миши модели е установено, че експресия на APOBEC3B обратно корелира с клиничната полза от лечение с *tamoxifen*, липса на експресия – с продължителен отговор на *tamoxifen*, а свръхекспресията на APOBEC3B ускорява развитие-

то на резистентност към *tamoxifen* в миши ксенографтни модели.⁷ Тези проучвания показват, че при КГ експресията на APOBEC3B води до лекарствена резистентност и инхибирането на APOBEC3B-зависим тумор може да бъде ефективна стратегия за подобряване на таргетни терапии.

Аналитични методи за изследване. Тъкannата експресия на APOBEC3-гени се определя чрез количествен PCR и се сравнява с комерсиално достъпни панели от тъканно специфични cDNA-проби на донори. Наличието на мутации в APOBEC3 се изследва с технология за секвениране от ново поколение (NGS), като за целта се използва кръв или букална лигавица. Няма клинично валидирани тестове за търсене на мутации в APOBEC3B.

Доказателства за предиктивно значение. APOBEC все още не се използва като прогностичен или предиктивен маркер в клиничната практика, тъй като не е валидиран. Няма достатъчни доказателства, че контролът върху неговата свръхрегулацията ще подобри терапията на пациентите. Трудно могат да бъдат обяснени противоречивите данни, че рискът за карцином е голям както при висока експресия на APOBEC3B, така и при носители на герминативна делеция. Остава нерешен и въпросът за ролята на APOBEC3A като клиничен маркер.⁹ Експерименталните изследвания на КГ ясно различават ролята на експресиран APOBEC3B за туморогенеза от другите членове на APOBEC3B-фамилия, които са много силно свързани със STAT1/интерферонова генна сигнатура на туморите.¹⁰

C

Засега липсват достатъчно доказателства за предиктивна и прогностична стойност на APOBEC3B-гена при хормон-рецептор-позитивен карцином на гърда и не се препоръчва неговото рутинно изследване.

ЛИТЕРАТУРА

1. Cescon D, Haibe-Kains B. DNA replication stress: a source of APOBEC3B expression in breast cancer. *Genome Biology* 2016; 17: 202
2. Candace D, Rouf Banday A, Konichi Matsuda, et al. Association of germline variants in the APOBEC3 region with cancer risk and enrichment with APOBEC-signature mutations in tumors. *Nature Genetics* 2016; 48: 1330-1338
3. Le Xu, Yuan Chang, Huimin An, Yu Zhu, et al. High APOBEC3B expression is a predictor of recurrence in patients with low-risk clear cell renal cell carcinoma. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations* 2015; 33: 340.e1-340.e8
4. Radmanesh H, Spethmann T, Enßen J, et al. Assessment of an APOBEC3B truncating mutation, c.783delG, in patients with breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2017; 162: 31-37
5. Sieuwerts AM, Scooter W, Michael B, et al. Elevated APOBEC3B correlates with poor outcomes for estrogen-receptor-positive breast cancers. *Horm Canc* 2014; 5: 405-413
6. Kanu N, Cerone MA, Goh G, et al. DNA replication stress mediates APOBEC3 family mutagenesis in breast cancer. *Gen Biol* 2016; 7 (1): 185
7. Law EK, Sieuwerts AM, LaPara K, et al. The DNA cytosine deaminase APOBEC3B promotes tamoxifen resistance in ER-positive breast cancer. *Sci Adv* 2016; 2: e1601737
8. Jian Zhang, Wei Wei, Hui-Cheng Jin, et al. The roles of APOBEC3B in gastric cancer. *Int J Clin Exp Pathol* 2015; 8 (5): 5089-5096

9. Rebhandl S, Huemer M, Gassner FJ, et al. APOBEC3 signature mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2014; 28: 1929-1932
10. Chan K, Roberts SA, Klimczak LJ, et al. An APOBEC3A hypermutation signature is distinguishable from the signature of background mutagenesis by APOBEC3B in human cancers. *Nat Genet* 2015; 47: 1067-1072
11. Cescon DW, Haibe-Kains B, Mak TW. APOBEC3B expression in breast cancer reflects cellular proliferation, while a deletion polymorphism is associated with immune activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2015; 112: 2841-2846

1.4.6. *ESR1*-мутации

Драга Тончева, Мариела Василева

Молекулярна биология. Около 70% от карциномите на гърда (КГ) имат експресиран естрогенен рецептор (ER+) и са чувствителни на хормонална блокада. Мутации в гена *ESR1*, кодиращ ER, са свързани с придобита резистентност към ендокринна терапия при пациенти с ER+ метастатичен КГ (мКГ).¹ Клетъчното сигнализиране от естроген се медира чрез два естрогенни рецептори: *ESR1* (известен също като ER- α) и *ESR2* (ER- β). Те принадлежат към суперфамилията на ядрените рецептори и по-специално – към семейството на стероидни рецептори, които действат като лиганд-регулирани транскрипционни фактори. *ESR1* и *ESR2* имат висока хомоложна последователност и афинитет към едни и същи лиганди. Свързването на специфичен лиганд активира ER чрез дисоциация на heat shock протеини (HSP70) и димеризация на рецепторни протеини. Транскрипционната активност на ER може да се промени от различни видове посттранслационни модификации като фосфорилиране, ацетилиране, убиквитиниране и метилиране. Двата рецептора (*ESR1* и *ESR2*) проявяват различни афинитети към някои природни съединения и различни модели на експресия в различни тъкани. Транскрипционната активност на *ESR1* се определя от активността на AF-1 и AF-2, а активността на *ESR2* зависи в по-голяма степен от AF-2. *ESR1* и *ESR2* имат различни активности според свързания лиганд, клетъчния тип и промотора.

Ендокринната терапия със специфични модулатори/даунрегулатори на естрогенни рецептори (SERMs/SERDs) или инхибитори на синтеза на естрогени (ароматазни инхибитори, AIs) е най-важен терапевтичен подход при ER+ мКГ. Около 40% са резистентни на първа линия ендокринна терапия, а останалите пациенти, които първоначално са реагирали на лечението, по-късно развиват резистентност.¹

Доказани са няколко горещи точки в гена *ESR1*, в които най-често настъпват мутации, засягащи лиганд-свързващия домейн и водещи до активиране в отсъствие на лиганд. Най-чести мутациите са *D538G*, *E380Q* и *D537S/N/C* (80%). Други *ESR1*-мутации в лиганд-свързващия домейн, асоциирани с придобита резистентност към антиестрогенна терапия, са *S463P*, *V534E*, *P535H*, *L536Q*, *L536R*, *Y537C*, *Y537S* и *Y537N*. Функционални изследвания разкриват, че соматични *ESR1*-мутации водят до активност на рецептора в отсъствие на неговия лиганд (естроген) и придават резистентност срещу няколко ендокринни агенти. Резултати от широко мащабни проучвания със секвениране от ново поколение (NGS) показват, че *ESR1*-мутации са рядко явление при първичен КГ и са по-чести при метастатичен тумор и в свободно циркулираща туморна ДНК (cfDNA) от пациенти с КГ, предварително третиран с ендокринна терапия.^{2, 3} Все още в клиничната практика *ESR1* не се изследва за мутации като валидиран молекулен маркер за резистентност.⁴⁻⁶ Допуска се, че *ESR1*-мутации трябва да бъдат оценени в метастатични лезии или в ctDNA чрез течни биопсии. Наличие на *ESR1*-мутации е свързано с резистентност към ендокринна терапия, затова оценката им при мКГ вероятно ще има значение за индивидуализиране на лечението.

Аналитични методи за изследване. Няколко техники могат да бъдат използвани за определяне на *ESR1*-мутации в тумори или в ctDNA. Те имат предимства и недостатъци и се различават значително по чувствителност. Методът NGS е утвърден и широко използван подход за откриване на мутации в туморна тъкан. Откриване на мутация в ctDNA е по-голямо предизвикателство, тъй като се отчита отношението на брой на мутантни към брой на “див” тип алели. По правило ctDNA варира между пациентите, като често е под 1% от общата cfDNA и е извън чувствителността на NGS.⁷ Ето защо техниката на дигитална PCR (dPCR) позволява откриване на ctDNA при често-

ти от 0.001%.^{8,9} При dPCR-базирани техники всяка отделна молекула ДНК реагира със специфична сонда за “див” тип и с друга сонда – за мутантен тип *ESR1*. Има няколко търговски достъпни dPCR-базирани подходи (ddPCR, BEAMing), различаващи се по използвани реагенти, но с подобна чувствителност.¹⁰ При сравняване на двата метода (NGS cdPCR) за детекция в cfDNA тройно повече *ESR1*-мутации (D538G) са наблюдавани при използване dPCR, отколкото с NGS.¹¹ Други автори използват нова NGS-техника за определяне на мутации и генна амплификация в ctDNA при пациенти с мКГ и доказват, че този подход може да се използва за анализ на динамично променящата се туморна хетерогенност и за стратификация на таргетна терапия.¹²

Доказателства за предиктивно значение. *ESR*-мутации са рядкост при първичен КГ (3% с NGS) и малко по-чести при използване на dPCR. Те са много по-чести в метастатични лезии (предимно D538G и Y537S)¹³ при ER+ пациенти, които са получили ендокринна терапия най-малко три месеца (11-55%). От ER+ пациенти, които не са се повлияли от многократна ендокринна терапия, около 38% носят мутация D538G.¹⁴ *ESR1*-мутации са най-чести в костни метастази (1.4% честота на вариантен алел (VAF)) и особено при мозъчни метастази (34.3-44.9%) в сравнение с първични тумори (0.07-0.2%), което показва развитие на *ESR1*-мутантни субклонове в метастатични тъкани.

При проучване FERG1 са изследвани *ESR1*- и *PIK3CA*-мутации в тъкан и в cfDNA-проби на пациенти, които не са се повлияли от лечение с AI, рандомизирани или на *fulvestrant*, комбиниран с пан-PI3K-инхибитор *pictilisib*, или на комбинация от *fulvestrant* и плацебо.¹⁵ Честотата на *ESR1*-мутации в cfDNA е 37%, като честотата на E380Q е доста висока (26%). *ESR1*-мутации не са открити в първични тумори на пациенти с *ESR1*-мутации в cfDNA. *PIK3CA*-мутации са регистрирани в cfDNA в 40% и са обикновено конкордант-

ни с мутации в метастатична тъкан. При *ESR1*-мутации по-често има дискордантност между cfDNA и метастатични биопсии. Средната VAF за *PIK3CA*-мутации е значително по-висока, отколкото за *ESR1*-мутации (3.6% срещу 0.45%). По-високите VAFs и конкордантност на *PIK3CA*-мутации в туморни тъкани и в cfDNA вероятно отразяват ролята им в по-ранни етапи на КГ¹⁶, за разлика от *ESR1*-мутации. Пациенти с различни мутации в *ESR1* реагират по различен начин на лечение. Клинични анализи в рамonto с *fulvestrant*/плацебо показват, че преживяемостта без прогресия (ПБП) не е намалена при пациенти с *ESR1*-мутация в ctDNA в сравнение с *ESR1* “див” тип при лечение с *fulvestrant*, както и при пациенти с поликлонални *ESR1*-мутации или *ESR1*-мутация с VAF над медианата. Също така не е наблюдаван ефект върху ПБП при пациенти със и без *ESR1*-мутации, лекувани с *fulvestrant* и *pictilisib*.

В проучване SoFEA пациенти, които преди това са реагирани на лечение с нестероидни AIs, са рандомизирани за *fulvestrant* в съчетание с *anastrozole*, *fulvestrant* с плацебо или само *exemestane*. Мутации са открити в началото на проучването при 39%, от които 49% са поликлонални. Пациенти с *ESR1*-мутация имат по-добра ПБП след *fulvestrant* (5.7 месеца) срещу *exemestane* (2.6 месеца, $p = 0.02$), за разлика от пациенти с “див” тип, при които е намерена подобна ПБП (5.4 срещу 8.0 месеца, $p = 0.77$). При пациенти, лекувани с *exemestane*, ПБП е по-лоша за пациенти с *ESR1*-мутации в сравнение с “див” тип (2.6 срещу 8.0 месеца, $p = 0.01$).¹⁷

В проучване PALOMA3 пациенти без подобрение от предварително проведена ендокринна терапия са рандомизирани за *fulvestrant/palbociclib* или *fulvestrant*/плацебо. Резултатите разкриват значимо по-продължителна ПБП при пациенти, приемащи *fulvestrant/palbociclib* срещу самостоятелен *fulvestrant* (9.5 срещу 4.6 месеца, $p = 0.0001$),

особено при *ESR1*-мутации (9.4 срещу 3.6 месеца, $p = 0.002$). Не се наблюдава разлика в ПБП между пациенти със/без *ESR1*-мутации, лекувани с *fulvestrant/palbociclib* (9.4 срещу 9.5 месеца).

Проучване BOLERO-2 е единственото голямо изследване върху ОП на пациенти с *ESR1*-мутации.¹⁸ Жени в менопауза с прогресия на терапия с AIs, са рандомизирани за *exemestane*, комбиниран с *everolimus*, или *exemestane* и плацебо. Като цяло, 29% от пациентите са или с *D538G*- и/или *Y537S**ESR1*-мутация в cfDNA. *ESR1*-мутации са по-чести при пациенти, които преди това са получили AIs за метастатична болест (33%), отколкото при пациенти, които са получавали адювантни AIs (11%). Резултатите показват, че ПБП е значимо по-добра при пациенти, лекувани с *everolimus/exemestane* в сравнение с *everolimus*/плацебо (7.8 срещу 3.2 месеца), но комбинираната терапия не подобрява ОП.^{19,20} В рамките с *exemestane* пациентите с мутация *D538G* са с по-кратка ПБП, отколкото с “див” тип (2.7 срещу 3.9 месеца). Такава асоциация не се наблюдава при анализ на пациенти само с *Y537S*-мутация. Величината на ПБП при *ESR1* “див” тип (3.9 месеца) се различава от проучване SoFEA (8 месеца) вероятно поради разлики в критериите за подбор. Когато *everolimus* е добавен към *exemestane*, това води до по-добра средна ПБП както при пациенти с *D538G*-мутация (5.8 месеца; HR 0.34, 95% CI 0.02-0.6), така и при “див” тип (8.5 месеца; HR 0.4, 95% CI 0.3-0.5), което предполага, че пациенти с мутирал *ESR1* все още може да имат полза от добавяне на *everolimus*. Такава полза не е установена за пациенти само с *Y537S*-мутация (4.2 месеца; HR 0.98, 95% CI 0.5-1.9) или с двете *Y537S*- и *D538G*-мутации (5.4 месеца; HR 0.53, 95% CI 0.2-1.3). Анализ на ОП според *ESR1*-мутационния статус установява, че пациенти с мутация имат по-лоша преживяемост в сравнение с “див” тип (22 срещу 32 месеца). Типът на мутаци-

ята също влияе върху ОП (26 месеца при *D538G*- срещу 20 месеца при *Y537S*-мутация, срещу 15 месеца при наличие на двете мутации). Резултатите разкриват по-агресивно развитие на КГ при *ESR1*-мутации.²²

При ретроспективен анализ на мутационни профили на голям брой мКГ от проспективни проучвания (SAFIR01, SAFIR02, SHIVA и MOSCATO), сравнени с данни за 772 първични КГ (от TCGA), са определени 12 сигнификантни гени: *TP53*, *PIK3CA*, *GATA3*, *ESR1*, *MAP3K1*, *CDH1*, *AKT1*, *MAP2K4*, *RBI*, *PTEN*, *CBFB* и *CDKN2A*. Мутациите в *ESR1* и *RBI* са водещи и специфични за мКГ. Идентифицирани са 24 различни типове мутации в *ESR1*, които са локализиращи в хормон-рецепторния домейн. Установено е, че HR+/HER2- мКГ се различава значително от HR+/HER2- ранен КГ с по-разнообразна мутационна сигнатура, свързана с APOBEC3B-активност и с по-висока честота на активни гени. *RBI*-мутации със загуба на функция се откриват при 5% от HR+/HER2- мКГ и определят първична резистентност към CDK 4/6-инхибитори. Няколко други гени по-често мутират при мКГ в сравнение с ранен карцином, но не покриват критериите за водещи мутации. Генът *PALB2* е партньор на *BRCA1*, а честотата на *PALB2*-соматични мутации е 4% при мКГ срещу 0.1% при ранен. Хетерозиготните мутации със загуба на функция са рискови за КГ, а герминативните мутации са асоциирани с лоша прогноза. *PALB2*-дефицитен мКГ е чувствителен на PARP-инхибитори. Гени, локализиращи в mTOR-пътя (*TSC1* и *TSC2*), много по-често мутират при HR+/HER2- мКГ (6%) в сравнение с HR+/HER2- ранен карцином (0.7%). Допуска се, че те играят роля за създаване на резистентност към ендокринна терапия. Клинично mTOR-инхибитори (*everolimus*) са одобрени при HR+/HER2- мКГ.²¹

В

- При пациенти с метастатичен карцином на гърда, прогресирал на предшестваща терапия с ароматазни инхибитори и предстояща ендокринна терапия с *fulvestrant*, се препоръчва обсъждане за тестване за вторична *ESR1*-мутации с оглед потенциална резистентност към ендокринна терапия.
- Препоръчва се изследване за наличие на *ESR1*-мутации в тъкани (първичен тумор или метастаза) или в *ctDNA* чрез секвениране от ново поколение (NGS) и чрез дигитален PCR (dPCR).



ESR1-мутации в *ctDNA* все още не се диагностицират рутинно като предиктивни биомаркери в клиничната практика, но може да се изследват при клинични проучвания за чувствителност към *fulvestrant* и резистентност към *exemestane* и към *everolimus* (*ESR1*-мутации *Y537S* и *D538G*).

ЛИТЕРАТУРА

1. Pritchard KI. Endocrine therapy: is the first generation of targeted drugs the last? *J Intern Med* 2013; 274: 144-152
2. Jeselsohn R, Yelensky R, Buchwalter G, et al. Emergence of constitutively active estrogen receptor-alpha mutations in pretreated advanced estrogen receptor-positive breast cancer. *Clin Cancer Res* 2014; 20: 1757-1767
3. Toy W, Shen Y, Won H, et al. *ESR1* ligand-binding domain mutations in hormone-resistant breast cancer. *Nat Genet* 2013; 45: 1439-1445
4. Osborne CK, Schiff R. Mechanisms of endocrine resistance in breast cancer. *Annu Rev Med* 2011; 62: 233-247
5. De Laurentiis M, Arpino G, Massarelli E, et al. A meta-analysis on the interaction between HER-2 expression and response to endocrine treatment in advanced breast cancer. *Clin Cancer Res* 2005;11: 4741-4748
6. Amir E, Miller N, Geddie W, et al. Prospective study evaluating the impact of tissue confirmation of metastatic disease in patients with breast cancer. *J Clin Oncol* 2012; 30: 587-592
7. Diehl F, Schmidt K, Choti MA, et al. Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. *Nat Med* 2008; 14: 985-990
8. Diehl F, Li M, He Y, Kinzler KW, et al. BEAMing: single molecule PCR on microparticles in water-in-oil emulsions. *Nat Methods* 2006; 3: 551-559
9. Vogelstein B, Kinzler KW. Digital PCR. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 9236-9241
10. Hindson BJ, Ness KD, Masquelier DA, et al. High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number. *Anal Chem* 2011; 83: 8604-8610
11. Guttery DS, Page K, Hills A, et al. Noninvasive detection of activating estrogen receptor 1 (*ESR1*) mutations in estrogen receptor-positive metastatic breast cancer. *Clin Chem* 2015; 61: 974-982
12. Page K, David SG, Fernandez-Garcia D, et al. Next generation sequencing of circulating cell-free DNA for evaluating mutations and gene amplification in metastatic breast cancer. *Clinical Chemistry* 2017; 63 (2): 532-541

13. Robinson DR, Wu YM, Vats P, et al. Activating ESR1 mutations in hormone-resistant metastatic breast cancer. *Nat Genet* 2013; 45: 1446-1451
14. Merenbakh-Lamin K, Ben-Baruch N, Yeheskel A, et al. D538G mutation in estrogen receptor-alpha: a novel mechanism for acquired endocrine resistance in breast cancer. *Cancer Res* 2013; 73: 6856-6864
15. Spoerke JM, Gendreau S, Walter K, et al. Heterogeneity and clinical significance of ESR1 mutations in ER-positive metastatic breast cancer patients receiving fulvestrant. *Nat Commun* 2016; 7: 11579
16. Nik-Zainal S, Alexandrov LB, Wedge DC, et al. Mutational processes molding the genomes of 21 breast cancers. *Cell* 2012; 149: 979-993
17. Fribbens C, O'Leary B, Kilburn L, et al. Plasma ESR1 mutations and the treatment of estrogen receptor-positive advanced breast cancer. *J Clin Oncol* 2016; 34: 2961-2968
18. Chandarlapaty S, Chen D, He W, et al. Prevalence of ESR1 mutations in cell-free DNA and outcomes in metastatic breast cancer: a secondary analysis of the BOLERO-2 Clinical Trial. *JAMA Oncol* 2016; 2: 1310-1315
19. Yardley DA, Noguchi S, Pritchard KI, et al. Everolimus plus exemestane in postmenopausal patients with HR(+) breast cancer: BOLERO-2 final progression-free survival analysis. *Adv Ther* 2013; 30: 870-884
20. Piccart M, Hortobagyi GN, Campone M, et al. Overlies plus exemestane for hormone-receptor-positive, human epidermal growth factor receptor-2-negative advanced breast cancer: overall survival results from BOLERO-2. *Ann Oncol* 2014; 25: 2357-2362
21. Lefebvre C, Bachelot Th, Filleron Th, et al. Mutational profile of metastatic breast cancers: A retrospective analysis. *PLOS Medicine* 2016; doi: 10.1371/journal.pmed.1002201
22. Toss A, Venturelli M, Peterle Ch. Molecular biomarkers for prediction of targeted therapy response in metastatic breast cancer: trick or treat? *Int J Mol Sci* 2017; 18: 85; doi: 10.3390/ijms18010085

1.4.7. PIK3CA-мутация

Мариела Василева, Драга Тончева

Молекулярна биология. Фосфатидилинозитол-3-киназите (PI3Ks) са хетеродимерни липидни кинази, съставени от каталитична субединица (p110 α) и адапторна/регулаторна субединица (p85), които са кодирани от различни гени. Тези кинази фосфорилират фосфатидилинозитол на 3-D позиция от инозитолвия пръстен, генерирайки вторични сигнали в клетката, регулирайки клетъчен растеж, диференциация, адхезия, апоптоза, оцеляване и движение.¹ Членовете на фосфатидилинозитоловата фамилия са групирани в три класа според аминокиселинната си последователност, специфичността си към субстрати и тъканното си разпределение. По отношение на регулиране на клетъчно делене и туморогенеза най-важни PI3K-протеини са тези, които принадлежат към клас IA-каталитична субединица p110 α ; тя се кодира от *PIK3CA*-ген. Без получен сигнал тази субединица се намира в ниско активно състояние в цитоплазмата; при сигнал от растежен фактор SH2-домейнът на p85-регулаторната субединица се свързва и фосфорилира тирозина в рецепторите за тирозин-кинази.² Това свързване освобождава инхибирана каталитична субединица и я насочва към плазмената мембрана. Активирането на p110- α -субединица води до продукция на фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфат PIP₂ или фосфатидилинозитол 3,4,5-трифосфат PIP₃, който насочва много адапторни и ефекторни протеини към клетъчната мембрана.³ Един от тях е Akt-серин-треонин киназа, която има значение за клетъчния цикъл, оцеляване и растеж. Регулацията на активацията на PI3K-AKT-сигналната верига се контролира от два тумор-супресорни гена – *PTEN* и *INPP4B*. Те често са инактивирани при карцином на гърда (КГ), най-вече при тройно негативни тумори. От своя страна, Akt активира про-

теин, наречен мишена за *rapamycin* при бозайници, или mTOR; това е серин-треонин киназа, която също е част от сигналната верига на PI3K, която има основно значение за клетъчния метаболизъм. По правило mTOR се отнася към два различни комплекса – mTORC1 и mTORC2, които действат по различен начин: mTORC1 е мишена за действие на *rapamycin* и негови аналози.⁴ Сигналната верига, обединяваща трите ензима, се нарича PI3K/Akt/mTOR; активирането ѝ се наблюдава при 70% от КГ.⁵

Мутациите в *PIK3CA*-гена са соматични, карцином-специфични и хетерозиготни и могат да се разделят на четири класа според домейна на каталитичната субединица, в който възникват: регулаторно свързан домейн, C2-домейн, спирален домейн и каталитичен домейн. Повечето мутации се намират в т.нар. “горещи” региони (hotspot) – E542- и E545-спирален домейн (екзон 9) и в H1047-киназен домейн (екзон 20). По правило E542 и E545 са често заменени с лизин, докато H1047 е заменен с аргинин. Много от възникналите мутации променят регулацията на киназната активност на p85-субединицата или каталитичната активност на ензима.⁶ Много проучвания анализират едновременно нормална и туморна тъкан от КГ и установяват, че мутации в *PIK3CA*-гена се наблюдават само в туморна тъкан. Метаанализи, включващи проучвания с различни тъканни субстрати (замразена тъкан, формалин-фиксирана туморна тъкан), показват честота на мутации около 26%.⁷ Най-чести са активиращите мутации при тумори, позитивни за естрогенен рецептор (ER) – около 42%.⁸

Аналитични методи за изследване. Мутационният тест Cobas® *PIK3CA* е PCR в реално време. С него се определят мутации в екзони 1, 4, 7, 9 и 20 на субединица алфа-изоформа на гена *PIK3CA* в ДНК, изолирана от фиксирани с формалин парафинови тъкани (FFPET). Тестът е по-чувствителен и по-специфичен за откриване на мутации в *PIK3CA* в сравнение със секвениране по *Sanger*.

Доказателства за предиктивно значение. Предклинични проучвания подкрепят инхибирането на сигналната верига на PI3K/Akt/mTOR със специфични инхибитори и вече няколко фаза I-III проучвания са проведени при КГ. Едно фаза II рандомизирано проучване, публикувано през 2012г., включва постменопаузални пациентки с ER-позитивен, HER2-негативен метастатичен КГ, резистентен на ароматазни инхибитори (AIs). Проучването сравнява прилагане на *tamoxifen* – 20 mg дневно в комбинация с *everolimus* (mTORC1 инхибитор) – 10 mg дневно или само на *tamoxifen* – 20 mg дневно. Крайна цел на проучването е пълн или частичен отговор, или стабилна болест след шестмесечно проследяване. Резултатите показват, че едновременно блокиране на сигналните вериги на ER и mTOR при пациенти, резистентни на AIs, удължава времето до прогресия (ВДП).⁹ Проучване BOLERO-2¹⁰ предлага добавяне на *everolimus* към лечението с AIs при пациенти с хормон-позитивен авансирал КГ; в резултат на това проучване *everolimus* е одобрен за лечение на хормон-рецептор-позитивни, HER2-негативни тумори, достоверно удължавайки преживяемостта без болест (ПББ).⁸ Метаанализ от 2014 г. оценява връзката между мутации в *PIK3CA* и рецепторна експресия, както и значението им като прогностични фактори. Връзката между мутациите в *PIK3CA*-гена и експресията на ER е изследвана при 4754 пациенти от 26 проучвания; установява се статистически значима връзка между наличие на мутации и експресия на ER. Отделен анализ, включващ 3507 пациенти от 20 проучвания, намира, че експресията на ER е също статистически значимо свързана с наличие на мутации в *PIK3CA*. Най-често използван метод за откриване на мутации в цитираните проучвания е чрез директно секвениране. В същия анализ се изследва връзка на мутации в *PIK3CA*-гена с преживяемостта при около 2000 пациенти. Когато в анализа са включени тумори, независимо от хормоналния статус, не се установява връзка между наличие на мутации и

обща преживяемост (ОП) или преживяемост без рецидив (ПБР); когато се изследва значението на различни мутации според екзона, в който са възникнали, се установява по-кратка ОП при мутация в екзон 9. Връзката между *PIK3CA*-мутации и прогнозата при пациенти с ER-позитивен КГ е оценена в осем проучвания, включващи 1021 пациенти. Пет проучвания (644 пациенти) изследват значението на тези мутации за ОП и четири – за ПБР; не се установява статистически значима зависимост между наличието на мутации в *PIK3CA* и преживяемост.¹¹ Друг метаанализ изследва връзката между *PIK3CA*-мутации и преживяемост при пациенти с операбилен КГ (метастатични тумори са изключени); анализът включва осем ретроспективни кохортни проучвания и показва, че наличието на мутации се свързва с по-добра прогноза при неселектирани пациенти.¹² Това оставя нерешен въпроса за значението на мутациите в *PIK3CA*-гена като прогностичен фактор.

След откриване на *PIK3CA*-мутациите възниква и въпросът за ролята им като предиктивен фактор за резистентност към лечение и като мишена за таргетна терапия.¹³ Няколко проучвания, изследващи значението на мутациите в *PIK3CA* за лечение на HER2-позитивни пациенти, предполагат резистентност към *trastuzumab*-базирана терапия.^{14, 15} Проучване от 2015 г. изследва връзка на *PIK3CA*-мутации с полза от неоадювантна анти-HER2-терапия; от 355 HER2-позитивни пациенти мутации в *PIK3CA* са установени в 23% от туморите. Пациенти, лекувани с комбинация от *trastuzumab* плюс *lapatinib* и без мутация в *PIK3CA*, постигат патологичен пълн отговор (pCR) в 53.1% от случаите, докато тези с налична мутация – само в 28.6% и разликата е статистически значима.¹⁶ Понастоящем инхибитори на PIK3CA, AKT и mTOR са предлагани като таргетна терапия при карциноми, носители на мутации в *PIK3CA*. Засега PIK3CA- и AKT-инхибиторите са в много ранна фаза на изследване. От друга страна, mTOR-ин-

хибитори са одобрени от Американската Агенция за храни и лекарства (FDA) за лечение на метастатичен ER-позитивен КГ, но няколко проучвания не са успели да докажат, че наличие на *PIK3CA*-мутации е маркер за полза от терапия. Понастоящем липсва клинично валидирана терапия, насочена към *PIK3CA*-мутации при КГ.¹⁷ Във фаза III клинично проучване BELLE-3 с PI3K-инхибитор *buparlisib* е доказано, че комбинира-

нето му с ендокринна терапия има добър ефект за пациенти с хормон-рецептор позитивен КГ, авансирал след лечение с *everolimus* плюс *exemestane*; подгрупата с *PIK3CA*-мутация демонстрира по-дълго ВДП (4.7 месеца) спрямо общата група, третирана с *buparlisib* (3.9 месеца).¹⁸

C

■ При постменопаузални пациенти с метастатичен хормон-рецептор-позитивен, HER2-негативен карцином на гърда, прогресирал на предшестваща терапия с ароматазни и mTOR-инхибитори и с предстояща терапия с PI3K-инхибитор (*buparlisib* плюс *fulvestrant*), се препоръчва обсъждане за тестване за *PIK3CA*-мутации с оглед потенциалното им влияние върху лекарствената ефективност.

■ Препоръчва се изследване за *PIK3CA*-мутации чрез количествен PCR или секвениране.

D

При пациенти с ранен или метастатичен HER2-позитивен карцином на гърда, показани за анти-HER2-терапия с *trastuzumab* и *lapatinib*, се препоръчва обсъждане за тестване в клинични проучвания на *PIK3CA*-мутации с оглед потенциалното им влияние върху лекарствената ефективност.



Генетично изследване на *PIK3CA*-мутации не трябва да се прави рутинно за избор на терапия, освен за целите на клинични проучвания.

ЛИТЕРАТУРА

1. Fruman D, Meyers R, Cantley L, et al. Phosphoinositide kinases. *Annu Rev Biochem* 1998; 67: 481-507
2. Bader A, Kang S, Vogt P, et al. Cancer-specific mutations in PIK3CA are oncogenic in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 1475-1479
3. Ligresti G, Militello L, Steelman L, et al. PIK3CA mutations in human solid tumors Role in sensitivity to various therapeutic approaches. *Cell Cycle* 2009; 8 (9): 1352-1358

4. Paplomata E, O'Regan R. The PI3K/AKT/mTOR pathway in breast cancer: targets, trials and biomarkers. *Ther Adv Med Oncol* 2014; 6 (4): 154-166
5. Castaneda C, Cortes-Funes H, Gomez H, et al. The phosphatidylinositol 3-kinase/AKT signaling pathway in breast cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2010; 29: 751-759
6. Huang C, Mandelker D, Schmidt-Kittler O, et al. The structure of a human p110alpha/p85alpha complex elucidates the effects of oncogenic PI3K-alpha mutations. *Science* 2007; 318: 1744-1748

7. Troxell M. PIK3CA/AKT1 mutations in breast carcinoma: A comprehensive review of experimental and clinical studies. *J Clin Exp Pathol* 2012; S1: 002
8. Deya N, Dea P, Leyland-Jones B, et al. PI3K-AKT-mTOR inhibitors in breast cancers: From tumor cell signaling to clinical trials. *Pharmacology & Therapeutics*. Available online 16 February 2017
9. Bachelot T, Bourcier C, Cropet C, et al. Receptor-positive, human epidermal growth factor receptor 2-negative metastatic breast cancer with prior exposure to aromatase inhibitors: A GINECO Study. *J Clin Oncol* 2012; 30 (22): 2718-2724
10. Beaver J, Park B. The BOLERO-2 trial: the addition of everolimus to exemestane in the treatment of postmenopausal hormone receptor-positive advanced breast cancer. *Future Oncol* 2012; 8 (6): 651-657
11. Pang B, Cheng S, Sun S, et al. Prognostic role of PIK3CA mutations and their association with hormone receptor expression in breast cancer: a meta-analysis. *Scientific Reports* 4, 2014; Article number: 6255
12. Liu Y, Jiang Y, Zuo W. PIK3CA mutations define favorable prognostic biomarkers in operable breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *Onco Targets and Therapy* 2014; 7: 543-552
13. Samuels Y, Wang Z, Bardelli A, et al. High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. *Science* 2004; 304: 554
14. Berns K, Horlings H, Hennessy B, et al. A functional genetic approach identifies the PI3K pathway as a major determinant of trastuzumab resistance in breast cancer. *Cancer Cell* 2007; 12: 395-402
15. Wang L, Zhang Q, Zhang J, et al. PI3K pathway activation results in low efficacy of both trastuzumab and lapatinib. *BMC Cancer* 2011; 11: 248
16. Majewski L, Nuciforo P, Mittempergher L. PIK3CA mutations are associated with decreased benefit to neoadjuvant human epidermal growth factor receptor 2-targeted therapies in breast cancer. *J Clin Oncol* 2015; 33 (12): 1334-1339
17. Badve S, Gökmen-Polar S. Molecular pathology of breast cancer, 2016; p. 313
18. Di Leo A, Seok Lee K, Ciruelos E, et al. BELLE-3: A phase III study of buparlisib + fulvestrant in postmenopausal women with HR+, HER2-, aromatase inhibitor-treated, locally advanced or metastatic breast cancer, who progressed on or after mTOR inhibitor-based treatment. SABCS 2016, Abstr. S4-07

1.4.8. *BRCA1/2*-мутации

Радка Кънева, Драга Тончева

Молекулярна биология. Синдромът на наследствен карцином на гърда и овариален карцином е най-често срещаната наследствена онкологична болест, като мутации в *BRCA1*- и *BRCA2*-гените обясняват около 15 до 20% от фамилните случаи на карцином на гърда (КГ). Честотата на *BRCA*-мутациите при КГ без фамилна анамнеза са съответно 1-7% за *BRCA1* и 1-3% за *BRCA2*.¹ *BRCA1*- и *BRCA2*-протеините участват в поправката на ДНК чрез хомоложна рекомбинация, регулация на клетъчния цикъл и транскрипция. Носителството на единично мутирало копие на един от двата гена значително повишава риска за развитие на карцином. Средният кумулативен риск към 70-годишна възраст за *BRCA1*-носители за КГ е 60%, 59% – за овариален карцином (ОК) и 83% – за контралатерален КГ. За носители на *BRCA2*-мутации съответните рискове са 55%, 16.5% и 62%.² Изготвени са препоръки за селекция на пациенти с висок риск за наличие на мутации в *BRCA1* и *BRCA2*.^{3,4} Съгласно препоръките на NCCN и ACOG генетично изследване и консултиране се препоръчват по време на диагноза на всички пациентки с фамилна история, ранно начало и тройно негативни. Други препоръки като тези на ESMO и страни от Западна Европа се основават на фамилна история за КГ или ОК.

В тумори, предизвикани от герминативна мутация в *BRCA1* или *BRCA2*, единственото здраво копие се уврежда от соматична мутация и обуславя дефицит в системата за поправка на ДНК чрез хомоложна рекомбинация (HR). Това повишава уязвимостта на туморните клетки към агенти, увреждащи ДНК, и PARP-инхибитори. Платина-съдържащите цитостатици причиняват двойноверижни скъсвания в ДНК, които не могат да бъдат поправени в отсъствие на HR. По подобен механизъм поли-АДФ-рибоза (PARP)

полимеразите имат важна роля при поправката на едноверижни скъсвания в ДНК. PARP-инхибиторите предизвикват акумулиране на едноверижни скъсвания в ДНК, които прерастват в двойноверижни и при нефункциониращи *BRCA1* или *BRCA2* водят до т.нар. синтетичен леталитет на туморни клетки.^{5,7}

Функционалността на *BRCA1* е необходима за осъществяване и на таксан-индуцирана програмирана клетъчна смърт; някои клинични проучвания демонстрират намалена чувствителност към химиотерапия с таксани при тумори с мутации в *BRCA1*. Други клинични проучвания отчитат ефективност на таксани и при *BRCA1*-мутантни тумори, която най-вероятно се дължи на запазване на второ копие на *BRCA1*, възстановяване на *BRCA1*-функционалността посредством вторични мутации или влияние на други фактори. Обратно, антрациклините демонстрират значителна активност при *BRCA*-мутантни карциноми. Поради повишената геномна нестабилност, тумори с мутации в *BRCA* се характеризират с повишена антигенност и потенциална чувствителност при имунна терапия.⁶

Профилактика при носители на BRCA-мутации. Няколко стратегии за редуциране на риска се прилагат за индивиди с установени патогенни *BRCA*-варианти съгласно препоръките на NCCN и ESMO.^{1,3,4} За пациенти с КГ се препоръчват клинично и инструментално проследяване и/или профилактична хирургия, според стадия на болестта по време на посттестовото генетично консултиране. Препоръчва се и ежегодна маммография и билатерална магнитнорезонансна томография (МРТ) на гърдите от 25-30-годишна възраст. Въпреки съществуващите доказателства за ползи от химиопревенция, в момента най-ефективните стратегии са профилактична мастектомия и салпинго-оофоректомия. Профилактичната мастектомия снижава риска за КГ с 90%, а профилактичната салпинго-оофоректомия – с около 50% и подобрява преживяемостта.⁵

Аналитични методи за изследване. Изследванията за герминативни *BRCA*-мутации се осъществяват с ДНК, изолирана от периферна кръв. Изследванията за *BRCA*-мутации на ДНК, изолирана от туморна тъкан, могат да покажат както герминативни, така и соматични варианти. За да се установи естеството на намерената мутация е необходимо допълнително да се анализира нормална тъкан (кръв или друга здрава тъкан). В почти всички случаи герминативните варианти са унаследени от родителите и само в редки случаи (около 1%) са възникнали *de novo*. Генетичните изследвания се извършват чрез валидирани методи за ДНК-секвениране по *Sanger* или секвениране от ново поколение (NGS). Чрез секвениране се идентифицират малки вариации (еднонуклеотидни замени, инсерции/делеции на няколко двойки нуклеотиди) и се откриват около 90% от патогенните варианти. Допълнително се прилага и т.нар. multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) тест или multiplex amplicon quantification (MAQ), за да се изключи наличие на големи делеции в *BRCA*-гените, включващи един или повече екзони. За изследване на соматични мутации няма стандартизиран метод. Прилагането на NGS, позволяващо голяма дълбочина на прочитите на всеки нуклеотид, висока специфичност и чувствителност, се налага като предпочитан метод. Разработват се различни алгоритми, улесняващи класификацията на откритите варианти и преценяващи връзката им с отговора към определени лекарства, например PARP-инхибитори. Разработени са специфични критерии за интерпретация на клиничната значимост на герминативни варианти в *BRCA*-гените от Evidence-based Network for the Interpretation of Germline Mutant Alleles (ENIGMA). Класификацията на генетичните варианти включва: патогенни, вероятно патогенни, варианти с неясно клинично значение, вероятни бенигнени и бенигнени полиморфизми. Патогенните варианти са свързани със значително повишен риск от развитие на болест.


Доказателства за предиктивно значение. Дефицит на хомоложна рекомбинация от *BRCA1/2*-мутации прави клетките чувствителни на ДНК-увреждащи агенти, докато наличието на функционален *BRCA1* повишава чувствителността към антимицротубулни агент. Данните за предиктивната роля на *BRCA1/2*-мутациите при КГ са противоречиви. Ретроспективни изследвания показват по-добър отговор на платина-базирана терапия и по-лош при терапия с таксани при неoadювантни условия.⁹ *Arun et al.* демонстрират добър отговор на антрациклин-таксан-базирани терапии при носители на *BRCA*-мутации, подложени на неoadювантна химиотерапия.¹² Напоследък *BRCA*-мутационният статус се използва като биомаркер за подбор на пациенти за клинични проучвания с PARP-инхибитори и платина-базирани режими при КГ. Преклинични доказателства предлагат химиотерапия с платина за лечение на тройно негативен КГ (ТНKG) и особено за *BRCA1*-мутантни карциноми. При клетки с дефицит на хомоложна поправка на ДНК (*BRCA1*-асоциирани) *carboplatin* и *cisplatin* проявяват антитуморно действие чрез усилване на податливостта към увреждане на ДНК.¹⁰ *Byrski et al.* демонстрират 61% пълен отговор при неoadювантна терапия с *cisplatin* на пациенти с КГ и мутации в *BRCA1*.¹¹ *Cisplatin* превъзхожда други неoadювантни терапевтични режими при носители на *BRCA1* мутации; няколко отделни изследвания демонстрират високата ѝ ефективност при нетретиран с химиотерапия *BRCA1*-асоцииран КГ.¹²⁻¹⁴ Употребата на платинени съединения при метастазирал КГ е слабо проучена. *Byrski et al.* демонстрират 80% отговор при нетретирани и третирани с химиотерапевтици носители на *BRCA1*-мутация.⁷ *Isakoff et al.* изследват *carboplatin* или *cisplatin* при *BRCA1/2*-мутации и отчитат отговор при 54.5%.¹⁵ *Tutt et al.* демонстрират преимущества на *carboplatin* спрямо *docetaxel* при метастатичен ТНKG, изразяващи се в повишен отговор (68% срещу 33%) и преживяемост без прогресия (ПБП) (6.8 срещу 3.1 месе-

ца).^{5, 16} Транслационният консорциум за изследване на карциноми на гърдата (TBCRC) провежда проучване на монотерапия с платина при метастатичен ТНKG; наблюдава се обща степен на отговор (OCO) 30% и степен на клинични ползи (СКП) 34% при първа или втора линия. Заключение е, че *BRCA*-мутационният статус и анализът на p63/p73 вероятно ще подпомогнат идентифициране на пациенти с най-висока полза.¹⁷ Няколко клинични проучвания изследват добавяне на платинени съединения към неoadювантна химиотерапия с таксани и антрациклини; демонстрирани са значими повишения на нивата на пълен отговор, но и по-висока хематологична и неврологична токсичност. Заради добавената токсичност и малките ползи за повишаване на общата преживяемост (ОП) *carboplatin* и *cisplatin* не са включвани рутинно при неoadювантно лечение на ТНKG. Няколко големи текущи проучвания изследват ползата от добавяне на платинено съединение към стандартна адювантна химиотерапия (NRG-BR003 и подобни проучвания в Китай и Корея).¹⁸ Комбинирането на платинени съединения с *epirubicin* и *5-fluorouracil* постига висока степен на пълен клиничен отговор.¹⁹

Значително постижение в таргетната терапия е разработването на агенти, предизвикващи синтетичен леталитет при тумори с *BRCA1*-и *BRCA2*-мутации.⁶ Демонстриран е усилващ ефект на PARP-инхибиторите върху въздействието на лъчелечение, акилиращи химиотерапевтици, инхибитори на топоизомеразите и платинени съединения.¹⁹ Във фаза I и II клинични проучвания монотерапия с PARP-инхибитори постига обективен отговор в 10-30% при метастазирал KG, носещ мутации в *BRCA*, и ниска или липсваща активност при карциноми без мутации. Най-широко изследваният PARP-

инхибитор *olaparib* демонстрира OCO между 8% и 22% в различни малки проучвания.¹⁸⁻²¹ Клинични проучвания демонстрират ефективност на монотерапия с *olaparib* при носители на герминативни *BRCA1/2* мутации с KG, ОК, карцином на панкреас и простата.^{22, 24, 25} Демонстрирана е ефективността на *olaparib* при носители на мутации в *BRCA* с ОК, чувствителен към платина.²³ Преклинични изследвания потвърждават ефективността на този подход при KG. Комбинирането на *olaparib* и *carboplatin* е добре поносимо при KG и ОК с герминативни *BRCA1/2*-мутации.²⁷ Друго фаза I проучване демонстрира добра поносимост и ефективност на комбинирана терапия с *olaparib* и пегилиран липозомен *doxorubicin* (PLD) при KG.²⁸ PARP-инхибиторът *niraparib* постига 50% отговор при KG, свързан с мутации в *BRCA1/2*. Висока степен на контрол върху KG и ОК с мутации в *BRCA* се постига и при терапия с *rucaparib*.²⁸ Комбинирането на *veliparib* с *carboplatin* постига повишена OCO (51% срещу 26%) спрямо стандартна химиотерапия в проучване I-SPY 2.²⁹ Голяма част от клиничните проучвания с PARP-инхибитори включват пациенти с мутации в *BRCA1/2*, подложени на предишна терапия; по време на цитотоксична терапия се наблюдава възстановяване на функционалността на *BRCA1/2* и развитие на резистентност. PARP-инхибиторите са нискоефективни при карциноми с развита платина-резистентност.⁵ Резултати от фаза III рандомизирано клинично проучване при HER2-негативен метастатичен KG (OlympiAD) показват, че монотерапия с *olaparib* дава значимо преимущество пред стандартна химиотерапия: OCO – 59.9% срещу 28.8% при стандартна химиотерапия и удължаване на ПБП с 2.8 месеца.³⁰

A	Препоръчва се изследване на герминативни или соматични <i>BRCA</i> -мутации при всички пациенти с карцином на гърда с ранно начало (< 40-годишна възраст), или тройно негативен карцином на гърда или тумори, отговарящи на критериите за фамилен карцином на гърда/овариален карцином.
B	При пациенти с карцином на гърда и установени <i>BRCA</i> -мутации се препоръчва включване в клинични изследвания с PARP-инхибитори и платина-базирани цитостатици.
C	<ul style="list-style-type: none"> ■ На пациенти с карцином на гърда с установени патогенни <i>BRCA</i>-мутации при посттестово генетично консултиране се препоръчват клинично и инструментално проследяване и/или обсъждане за риск-редуцираща (елективна) хирургия (билатерална мастектомия, салпинго-оофоректомия) според стадия на болестта и възрастта на пациентката. ■ На пациенти с карцином на гърда с установени <i>BRCA</i>-мутации се препоръчва обсъждане за приложение на <i>tamoxifen</i> с цел намаляване на риска от контралатерален карцином. ■ При пациенти с <i>BRCA</i>-негативен карцином на гърда, отговарящ на критериите за скрининг за наследствен карцином на гърда и овариален карцином, се препоръчва изследване с панел от гени за генетична предразположеност.

	<ul style="list-style-type: none"> ■ При пациенти, на които се провежда генетично изследване за герминативни <i>BRCA</i>-мутации, се предлага пре- и посттестова генетична консултация. ■ Генетични изследвания за герминативни и соматични мутации се извършват в утвърдени генетични лаборатории чрез директно секвениране или секвениране от ново поколение (NGS). ■ Изследване за големи делеции в <i>BRCA1/2</i>-гени се извършва чрез валидирани методи като MLPA.
---	---

ЛИТЕРАТУРА

- Balmaña J, Diez O, Rubio I, Castiglione M. ESMO Guidelines Working Group. BRCA in breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines. *Ann Oncol* 2010; 21 (Suppl 5): v20-v22
- Mavaddat N, Peock S, Frost D, et al. EMBRACE.. Cancer risks for BRCA1 and BRCA2 mutation

carriers: results from prospective analysis of EMBRACE. *J Nat Cancer Inst* 2013;105 (11): 812-822

- Paluch-Shimon S, Cardoso F, Sessa C, et al. ESMO Guidelines Committee. Prevention and screening in BRCA mutation carriers and other breast/ovarian hereditary cancer syndromes: ESMO Clinical Practice Guidelines for cancer prevention and screening. *Ann Oncol* 2016; 27 (Suppl 5): v103-v110

4. National Comprehensive Cancer Network (US). NCCN clinical practice guidelines in oncology. Genetic/Familial high-risk assessment: Breast and Ovarian, V.2.2017. Washington (DC): NCCN; 2015. Available at: www.nccn.com
5. Iyevleva AG, Imyanitov EN. Cytotoxic and targeted therapy for hereditary cancers. *Hered Cancer Clin Pract* 2016; 14 (1): 17
6. Maxwell KN, Domchek SM. Cancer treatment according to BRCA1 and BRCA2 mutations. *Nat Rev Clin Oncol* 2012; 9 (9): 520-528
7. Byrski T, Huzarski T, Dent R, et al. Pathologic complete response to neoadjuvant cisplatin in BRCA1-positive breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 2014; 147 (2): 401-405
8. Richards S, Aziz N, Bale S, et al. ACMG Laboratory Quality Assurance Committee. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med* 2015; 17 (5): 405-424
9. Livraghi L, Garber JE. PARP inhibitors in the management of breast cancer: current data and future prospects. *BMC Med* 2015; 13: 188
10. Moiseyenko VM, Dolmatov GD, Moiseyenko FV, et al. High efficacy of cisplatin neoadjuvant therapy in a prospective series of patients carrying BRCA1 germ-line mutation. *Med Oncol* 2015; 32 (4): 89
11. Byrski T, Huzarski T, Dent R, et al. Response to neoadjuvant therapy with cisplatin in BRCA1-positive breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 2009; 115 (2): 359-363
12. Arun B, Akar U, Gutierrez-Barrera AM, Hortobagyi GN, Ozpolat B. The PARP inhibitor AZD2281 (Olaparib) induces autophagy/mitophagy in BRCA1 and BRCA2 mutant breast cancer cells. *Int J Oncol* 2015; 47 (1): 262-268
13. Fong PC, Boss DS, Yap TA, et al. Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase in tumors from BRCA mutation carriers. *N Engl J Med* 2009; 361 (2): 12
14. Audeh MW, Carmichael J, Penson RT, et al. Oral poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor olaparib in patients with BRCA1 or BRCA2 mutations and recurrent ovarian cancer: a proof-of-concept trial. *Lancet* 2010; 376 (9737): 245-251
15. Isakoff SJ, Puhalla S, Domchek SM, et al. A randomized Phase II study of veliparib with temozolomide or carboplatin/paclitaxel versus placebo with carboplatin/paclitaxel in BRCA1/2 metastatic breast cancer: design and rationale. *Future Oncol* 2017; 13 (4): 307-320
16. Tutt A, Ellis P, Kilburn L, et al. The TNT trial: A randomized phase III trial of carboplatin (C) compared with docetaxel (D) for patients with metastatic or recurrent locally advanced triple negative or BRCA1/2 breast cancer (CRUK/07/012). SABCS 2014, Abstr. S3-01
17. Cadoo KA, Traina TA, King TA. Advances in molecular and clinical subtyping of breast cancer and their implications for therapy. *Surg Oncol Clin N Am* 2013; 22 (4): 823-840
18. Székely B, Silber AL, Pusztai L. New therapeutic strategies for triple-negative breast cancer. *Oncology (Williston Park)* 2017; 31 (2): 130-137
19. Yao H, He G, Yan S, et al. Triple-negative breast cancer: is there a treatment on the horizon? *Oncotarget* 2017; 8 (1): 1913-1924
20. Ávila-Arroyo S, Nuñez GS, García-Fernández LF, Galmarini CM. Synergistic effect of trabectedin and olaparib combination regimen in breast cancer cell lines. *J Breast Cancer* 2015; 18 (4): 329-338
21. Oza AM, Cibula D, Benzaquen AO, et al. Olaparib combined with chemotherapy for recurrent platinum-sensitive ovarian cancer: a randomized phase 2 trial. *Lancet Oncol* 2015; 16 (1): 87-97
22. Fong PC, Boss DS, Yap TA, et al. Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase in tumors from BRCA mutation carriers. *N Engl J Med* 2009; 361 (2): 123-134
23. Fong PC, Yap TA, Boss DS, et al. Poly(ADP-ribose) polymerase inhibition: frequent durable responses in BRCA carrier ovarian cancer correlating with platinum-free interval. *J Clin Oncol* 2010; 28 (15): 2512-2519

24. Tutt A, Robson M, Garber JE, et al. Oral poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor olaparib in patients with BRCA1 or BRCA2 mutations and advanced breast cancer: a proof-of-concept trial. *Lancet* 2010; 376 (9737): 235-244
25. Domchek SM, Aghajanian C, Shapira-Frommer R, et al. Efficacy and safety of olaparib monotherapy in germline BRCA1/2 mutation carriers with advanced ovarian cancer and three or more lines of prior therapy. *Gynecol Oncol* 2016; 140 (2):199-203
26. Del Conte G, Sessa C, von Moos R, et al. Phase I study of olaparib in combination with liposomal doxorubicin in patients with advanced solid tumours. *Br J Cancer* 2014; 111 (4): 651-659
27. Lee JM, Hays JL, Annunziata CM, et al. Phase I/Ib study of olaparib and carboplatin in BRCA1 or BRCA2 mutation-associated breast or ovarian cancer with biomarker analyses. *J Natl Cancer Inst* 2014; 106 (6): dju089
28. Drew Y, Ledermann J, Hall G, et al. Phase 2 multicentre trial investigating intermittent and continuous dosing schedules of the poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor rucaparib in germline BRCA mutation carriers with advanced ovarian and breast cancer. *Br J Cancer* 2016; 114 (7): 723-730
29. Rugo HS, Olopade OI, DeMichele A, et al. Adaptive randomization of veliparib-carboplatin treatment in breast cancer. *N Engl J Med* 2016; 375 (1): 23-34
30. Robson M, Im SA, Senkus E, et al. Olaparib for metastatic breast cancer in patients with a germline BRCA mutation. *N Engl J Med* 2017; doi: 10.1056/NEJMoa1706450

1.4.9. FCGR3A-полиморфизми

Мариела Василева, Драга Тончева

Молекулярна биология. Рецепторите FCGRs са подразделени на три класа според генетичната им хомоложност: FcγR1/CD64, FcγR2/CD32 и FcγR3/CD16.¹ Всеки отделен тип се кодира от специфични гени, локализирани в един и същи район на първа хромозома, които са експресирани в различни клетъчни типове: *FCGR1A*, *FCGR1B*, *FCGR1C*; *FCGR2A*, *FCGR2B1*, *FCGR2B2*, *FCGR2B3*, *FCGR2C*; *FCGR3A* и *FCGR3B*. Два гена – *FCGR3A* и *FCGR3B* – кодират две алтернативни изоформи на Fc-рецептор с нисък афинитет за IgG (FCGR3 или CD16), които имат тъканно специфична експресия. Рецепторът FCGR3A (CD16a) е трансмембранен протеин, експесиран върху повърхността на повечето клетки от имунната система – моноцити, дендритни клетки, макрофаги, клетки убийци (NK), тромбоцити и ендотелни клетки, както и в субпопулация на Т-клетки. За разлика от него, FCGR3B е експесиран в неутрофили и еозинофили след стимулация с гама-интерферон. Клетките NK експесират повече FCGR3A, отколкото FCGR2A, а дендритните клетки, макрофагите и В-клетките експесират едновременно FCGR2A и FCGR3A. В екстрацелуларния домейн 2 на *FCGR3A* е идентифицирана единична нуклеотидна замяна – субституция T>G в позиция 4985 (SNP rs396991), която кодира фенилаланин (F-алел), вместо валин (V-алел), на 158 място в генния продукт (158F/V). Вариант V се характеризира с висок афинитет към IgG1 и IgG3. F-изоформата има нисък афинитет, играе важна роля за имунни възпалителни процеси при повтарящи се вирусни инфекции (ревматоиден артрит, системен еритематоден лупус, алоимунна неонатална неутропения) и повлиява ефекта от терапия на различни болести с *rituximab* (анти-CD20). Основен механизъм за терапевтично действие на моноклонал-

ни антитела като *cetuximab*, *rituximab* и *trastuzumab* е антияло-зависима клетъчна цитотоксичност (ADCC).²⁻⁵ Моноклоналното антияло има два фрагмента: Fab-фрагмент, свързващ антигена на туморни клетки, и Fc-фрагмент, скачен към активиран FCGR3A-рецептор на ефекторната клетка. По този начин моноклоналното антияло образува мост между туморната и ефекторната клетка и последва лизис на таргетната клетка, която е прикрепена върху ефекторната клетка.^{6,7} Рецепторът FCGR3B на бели кръвни клетки е част от този механизъм. Ефектът от терапия с моноклонални антитела зависи от специфичните полиморфизми в двата гена – *FCGR2A* (H131R)^{8,9} и *FCGR3A* (V158F)^{9,11,12}, тъй като рецепторите проявяват различен афинитет към моноклонални антитела (mAbs).

Аналитични методи за изследване. Използвани методи за детекция са изолиране на геномна ДНК, амплифициране на таргетния регион, съдържащ тестовия полиморфизъм, чрез полимеразна верижна реакция (PCR) и директно секвениране.

Доказателства за предиктивно значение. При метаанализ на 1050 пациенти с неходжкинов лимфом от 10 проучвания не са установени убедителни данни за връзка на полиморфния вариант 158V/F в *FCGR3A*-ген с отговора на *rituximab*-базирана терапия.¹³ Проведен е метаанализ на 907 пациенти с метастатичен колоректален карцином, лекувани с *cetuximab*-базирана терапия, с цел да се определи ролята на полиморфизми V158F в *FCGR3A* за клиничен отговор, степен на контрол върху болестта и прогноза.¹⁴ Пациенти с F-алел имат по добър контрол върху болестта от тези с 158VV-генотип. Резултатите показват, че FCGR-полиморфизъм се асоциира с терапевтичния ефект и прогнозата при пациенти с *cetuximab*.

Ретроспективен анализ на 31 проучвания (NSABP B-31) включва 2119 жени с *ERBB2/HER2*-позитивен карцином на гърда, лекувани с адювантен режим *doxorubicin/cyclophosphamide*, последван от *paclitaxel* плюс седмичен *trastuzumab* в продължение на една година. Полиморфизми FCB3A-158V/V или FCB3A-158V/F предсказват ефект

от *trastuzumab*, постигайки почти 70% по-висока преживяемост без болест. При това изследване ефектът от анти-HER2-терапията е по-слаб при хомозиготни пациенти за F-алел, за разлика от предишни анализи, при еднакъв дизайн на проучването.¹⁵

C

- При пациенти с ранен HER2-позитивен карцином на гърда и предстояща адювантна терапия с *trastuzumab* може да се обсъжда изследване на полиморфизъм 158V/F в *FCGR3A* с оглед потенциалното му влияние върху лекарствената ефективност.
- Препоръчва се да се извършва секвениране за определяне на полиморфизъм 158V/F в *FCGR3A*-гена.



Полиморфизъм 158 V/F в *FCGR3A*-гена не се изследва рутинно за определяне на прогноза и избор на терапия, освен за целите на клинични проучвания.

ЛИТЕРАТУРА

1. Gessner JE, Heiken H, Tamm A, et al. The IgG Fc receptor family. *Ann Hematol* 1998; 76 (6): 231-248
2. Clynes RA, Towers TL, Presta LG, et al. Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nat Med* 2000; 6 (4): 443-446
3. Manches O, Lui G, Chaperot L, et al. In vitro mechanisms of action of rituximab on primary non-Hodgkin lymphomas. *Blood* 2003; 101 (3): 949-954
4. Arnould L, Gelly M, Penault-Llorca F, et al. Trastuzumab-based treatment of HER2-positive breast cancer: an antibody-dependent cellular cytotoxicity mechanism? *Br J Cancer* 2006; 94 (2): 259-267
5. Weiner LM, Surana R, Wang S. Monoclonal antibodies: versatile platforms for cancer immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 2010; 10 (5): 317-327
6. Alderson KL, Sondel PM. Clinical cancer therapy by NK cells via antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. *J Biomed Biotechnol* 2011; 2011: 379123. doi: 10.1155/2011/379123
7. Ravetch JV, Bolland S. IgG Fc receptors. *Annu Rev Immunol* 2001; 19: 275-290
8. Ghesquieres H, Cartron G, Seymour JF, et al. Clinical outcome of patients with follicular lymphoma receiving chemoimmunotherapy in the PRIMA study is not affected by FCGR3A and FCGR2A polymorphisms. *Blood* 2012; 120 (13): 2650-2657
9. Carlotti E, Palumbo GA, Oldani E, et al. FcγRIIIA and FcγRIIA polymorphisms do not predict clinical outcome of follicular non-Hodgkin's lymphoma patients treated with sequential CHOP and rituximab. *Haematologica* 2007; 92 (8): 1127-1130
10. Cang S, Mukhi N, Wang K, Liu D. Novel CD20 monoclonal antibodies for lymphoma therapy. *J Hematol Oncol* 2012; 5: 64

11. Persky DO, Dornan D, Goldman BH, et al. Fc gamma receptor 3a genotype predicts overall survival in follicular lymphoma patients treated on SWOG trials with combined monoclonal antibody plus chemotherapy but not chemotherapy alone. *Haematologica* 2012; 97 (6): 937-942
12. Prochazka V, Papajik T, Gazdova J, et al. Fc gamma RIIIA receptor genotype does not influence an outcome in patients with follicular lymphoma treated with risk-adapted immunochemotherapy. *Neoplasma* 2011; 58 (3): 263-270
13. Duo Liu, Yuyang Tian, Donglin Sun, et al. The FCGR3A polymorphism predicts the response to rituximab-based therapy in patients with non-Hodgkin lymphoma: a meta-analysis. *Ann Hematol* 2016; 95: 1483-1490
14. Xiaowan Chen, Jingxu Sun, Yongxi Song, et al. FCGR2A and FCGR3A polymorphisms predict prognosis in metastatic colorectal cancer patients treated with cetuximab-based therapies: a systematic review and meta-analysis. *Int J Clin Exp Med* 2016; 9 (2): 3280-3291
15. Gavin PG, Song N, Rim Kim S, et al. Association of polymorphisms in FCGR2A and FCGR3A with degree of trastuzumab benefit in the adjuvant treatment of ERBB2/HER2-positive breast cancer: analysis of the NSABP B-31 trial. *JAMA Oncol* 2016. doi: 10.1001/jamaoncol.2016.4884

1.4.10. CYP2D6-генотипизиране

Димитър Калев, Асен Дудов

Молекулярна биология. Биомаркерът е свързан с метаболизма на селективния естроген-рецепторен модулатор (SERM) *tamoxifen*, индициран за ендокринна терапия при ранен и авансирал карцином на гърда (КГ). Известен е и с обозначението Cytochrome P450 2D6. Двата негови по-активни метаболити са 4-хидрокситамоксифен (4-ОН-тамоксифен) и 4-хидрокси-N-десметилтамоксифен (ендоксифен).¹ В серия от изследвания се доказва, че еноксифен, сравнен с 4-ОН-тамоксифен, притежава *in vitro* еквивалентна потенция за свързване с естрогенни рецептори алфа и бета (ER- α и ER- β) и съответно за супресия на ER-зависими човешки клетъчни линии от КГ.² При жени, приемащи 20 mg *tamoxifen* дневно, плазмената *steady-state* концентрация на еноксифен е от 6 до 20 пъти по-висока от тази на 4-ОН-тамоксифен.¹ Докато метаболизмът на *tamoxifen* към 4-ОН-тамоксифен се катализира от множество ензими, еноксифен се формира чрез оксидиране на N-десметилтамоксифен, медирано предимно от CYP2D6.³

Аналитични методи за изследване. Фармакогеномното/фармакогенетичното изследване на CYP2D6-генотипа се осъществява чрез три валидирани търговски платформи: (i) AmpliChip CYP450 Test (Roche Molecular Systems, Branchburg, NJ), (ii) xTAG CYP2D6 assay (Luminex, Austin, TX) и (iii) AutoGenomics (Carlsbad, CA).⁷ Като заместител на генетичните тестове се използват циркулиращи плазмени нива на еноксифен, но само допълнителният им анализ, класифициран по метаболитен фенотип, може да предостави информация за това дали по-високи нива корелират с подобрена преживяемост.⁸ Ръководството за фармакогенетика на Националната академия за клинична биохимия (NACB, USA) препоръчва анализите да включват тестове за генетични варианти със

следните допълнения: (i) по-добро дефиниране на влиянието на ензимната функция или (ii) ясна връзка между варианта и наблюдаваното влияние върху лекарствената фармакокинетика, фармакодинамиката или токсичност.⁹ Обосновката е, че когато е налице ясна причинно-следствена връзка между вариант и степен на метаболитен клирънс, фенотипът може да бъде предвиден с голяма надеждност. Функционалните последици от промените на секвенциите са разнообразни: един вариант може самостоятелно да премахне ефекта на протеина (например 1846G > вариант на *4) или може да направи това в комбинация с друг самостоятелен вариант. От друга страна, вариант 100C > T може да намали активността на протеина, без да го премахне, което води до алели, “снижаващи функцията”, както е *10. Дори когато промяната на секвенциите сама по себе си няма ефект върху протеина, може да се окаже в неравновесна връзка с други (като част от хаплотип), променяйки протеиновата активност.⁹ Разлики могат да съществуват между *in vitro* и *in vivo* измервания: ако лекарството се метаболизира също и от други ензими, *in vitro* експерименти не могат да отразят реалната активност на определен алел.¹⁰

Доказателства за предиктивно значение. Генът CYP2D6 е високо полиморфен, локализиран е в хромозома 22q13.1, включвайки повече от 70 големи алела с 4 добре дефинирани фенотипа: лош (PM), среден (IM), разпространен (EM) и свръхбърз (UM) метаболитатор. Доказано е, че CYP2D6-генетични варианти, водещи до ниска или липсваща CYP2D6-активност, или лекарственоиндуцирано инхибиране на CYP2D6 сигнификантно снижават плазмената концентрация на еноксифен.⁴ Фенотипът за лош метаболитатор (PM) демонстрира корелации с двукратно-трикратно по-висок риск за рецидив на КГ в сравнение с фенотипа CYP2D6 EM.⁵ Въз основа на тези данни Американската Агенция за храни и лекарства (FDA) препоръчва изследването на

CYP2D6-генотипа като важен предиктивен биомаркер, свързан с ефективността на *tamoxifen*.¹ Тази препоръка обаче бе отменена след метаанализ на петгодишна преживяемост от три проспективни проучвания с 4793 пациенти (ATAC, BIG 1-98 и ABCSG8) за монотерапия с адювантен *tamoxifen* при постменопаузални жени с ER-позитивен карцином на гърда, който демонстрира корелация на лекарствената ефективност с CYP2D6-генотипа: РМ-генотипът достоверно корелира с по-ниска преживяемост без болест (HR = 1.25; CI 95% = 1.06-1.47; $p = 0.009$), но като цяло CYP2D6-статусът е ста-

тистически незначим поради липса на уточнени продължителност на прием, менопаузален статус и годишно проследяване (criterion 3, $n = 4935$; $p = 0.38$).⁶ Засега липсата на точно дефинирани включващи критерии изисква бъдещи проспективни проучвания. До тяхното осъществяване обаче повечето школи препоръчват жените с предстояща ендокринна терапия да бъдат съветвани относно потенциалното влияние на CYP2D6-генотипа върху ефективността на адювантния *tamoxifen* и за избягване на потенциални CYP2D6-инхибитори.¹

В

При пациенти с карцином на гърда и предстояща адювантна ендокринна терапия с *tamoxifen* се препоръчва обсъждане за изследване на CYP2D6-генотип с оглед потенциалното му влияние върху лекарствената ефективност.

С

За фармакогенетично тестване на CYP2D6 се препоръчват валидирани методи за генотипизиране.



При адювантна ендокринна терапия с *tamoxifen*, освен CYP2D6-генотипа, трябва да се има предвид избягване на употреба на CYP2D6-инхибитори, предимно антидепресанти и антипсихотици.

ЛИТЕРАТУРА

- Goetz MP, Erichman C, Lopirinzi CL, Kohli M. Hormonal agents. In: Cancer. Principles & Practice of Oncology. Editors: DeVita V, Lawrence TS and Rosenberg SA. 10th edition. Wolters Kluwer Health 2015. pp. 278-289
- Wu X, Hawse JR, Subramaniam M, et al. The tamoxifen metabolite, endoxifen, is a potent antiestrogen that targets estrogen receptor alpha for degradation in breast cancer cells. *Cancer Res* 2009; 69: 1722-1727

- Desta Z, Ward BA, Soukhova NV, et al. Comprehensive evaluation of tamoxifen sequential biotransformation by the human cytochrome P450 system in vitro: prominent roles for CYP3A and CYP2D6. *J Pharmacol Exp Ther* 2004; 310: 1062-1075
- Stearns V, Johnson MD, Rae JM, et al. Active tamoxifen metabolite plasma concentrations after coadministration of tamoxifen and the selective serotonin reuptake inhibitor paroxetine. *J Natl Cancer Inst* 2003; 95 (23): 1758-1764

5. Shroth W, Goetz MP, Hamann U, et al. Association between CYP2D6 polymorphisms and outcomes among women with early stage breast cancer treated with tamoxifen. *JAMA* 2009; 302 (13): 1429-1436
6. Province MA, Goetz MD, Brauch H, et al. CYP2D6 genotype and adjuvant tamoxifen: meta-analysis of heterogeneous study populations. *Clin Pharmacol Ther* 2014; 95 (2): 216-227
7. Lyon E, Foster JG, Palomaki GE, et al. Laboratory testing of CYP2D6 alleles in relation to tamoxifen therapy. *Genetics in Medicine* 2012; 14: 990-1000
8. Goetz MP, Kamal A, Ames MM. Tamoxifen pharmacogenomics: the role of CYP2D6 as a predictor of drug response. *Clin Pharmacol Ther* 2008; 83: 160-166
9. Valdes RV, Payne D, Linder MW, et al. Guidelines and recommendations for laboratory analysis and application of pharmacogenetics to clinical practice: DRAFT. National Academy of Clinical Biochemistry Laboratory Medicine Practice Guidelines. 2010. Available at: www.aacc.org/members/nacb/LMPG/OnlineGuide/PublishedGuidelines/LAACP/Documents/PGx_Guidelines.pdf
10. Marez D, Legrand M, Sabbagh N, et al. Polymorphism of the cytochrome P450 CYP2D6 gene in a European population: characterization of 48 mutations and 53 alleles, their frequencies and evolution. *Pharmacogenetics* 1997; 7:193-202

1.4.11. Циркулиращи туморни клетки

Милчо Минчев, Борис Петров

Молекулярна биология. Циркулиращите туморни клетки (ЦТК) са такива, които са се освободили от първичното туморно ложе и са навлезли в кръвното или лимфатично русло. През последното десетилетие бяха разработени няколко метода за откриване и оценка на количеството на ЦТК при болни с неопластични болести, включително и карцином на гърда (КГ).^{1,2} Молекулярният анализ на ЦТК или т.нар. течна биопсия преди лечение на неопластична болест дава възможност за нейното оптимизиране и персонализиране. Този анализ обаче поставя нови предизвикателства относно чистотата и количеството на изолирани ЦТК, тъй като съвременните технологии позволяват геномно и транскриптомно профилиране дори и на една единствена клетка.³ Освен това, те се приемат като сурогат на метастатични клетки.^{4,5} Засега са правени поредица от проучвания за характеризирани на ЦТК с омикс-анализи.⁶ Между протеините от потенциален терапевтичен интерес са изследвани естроген (ER)- и прогестерон (PgR)-рецептори, HER2, Ki-67 протеини. Анализът върху една клетка изисква сложно оборудване за сортиране, основано на микрофлуиди и дълго време за изработка. Секвениране от ново поколение (NGS) обаче позволява висок добив от единични нуклеотидни варианти. По този начин се откриват единични нуклеотидни полиморфизми в гените, отговорни за регулацията на клетъчен цикъл, пролиферация и миграция, апоптоза, както и за ДНК-репарация и други.^{7,8}

Аналитични методи за изследване. По правило при болни с неопластични болести ЦТК се откриват чрез имунологични, молекулярни или функционални тестове. Имунологичните тестове се основават на антитела, насочени към мембранно и/или вътре-

клетъчно експресирани епителни (E), мезенхимни (M), тъкан- или тумор-специфични антигени. На този принцип е разработен одобреният от Американската Агенция за храни и лекарства (FDA) CellSearch[®] (Veridex). Молекулярните техники използват РНК- и ДНК-базирани технологии.^{9,10} Съществуват *in vitro* (fluо-ELISPOT– чрез антитела, насочени срещу секретирани от ЦТК специфични туморни маркери)^{11, 12} или *in vivo* (развитие на тумори след инжектиране на ЦТК в имунодефицитни мишки) тестове за откриване на ЦТК. Единственият одобрен досега от FDA такъв тест е системата CellSearch[®] (Janssen Diagnostics, LLC, Raritan, NJ), която използва покрити с антитяло ферофлуиди за разделяне на ЦТК от нормални кръвни компоненти. За да бъде отчетена като ЦТК, клетката трябва да бъде кръгла до овална, да е позитивно оцветена за цитокератин и диамидино-2-фенилиндола (наличие на ядро) и да е отрицателна за експресия на CD45 (левкоцитен маркер). Основният недостатък на този метод е зависимостта му от експресията на повърхностни маркери, а експресията на EpCAM е силно намалена¹³, особено при ЦТК, които са претърпели епително-мезенхимен преход (ЕМП)¹⁴, като това ги прави неоткриваеми¹⁴. Използват се също така методи, основаващи се на RT-PCR за откриване на епителни транскрипти като сурогати на ЦТК^{15, 16}, тъй като са с най-висока чувствителност^{17, 18}.

Доказателства за предиктивно значение. Независимо от ниския им брой в периферията, нивото на ЦТК по време на лечение се оказва ранен прогностичен маркер за терапевтичен отговор.^{19, 20} При пациенти с малки тумори и неанжирани лимфни възли наличието на ЦТК не повлиява значително изхода от болестта. Това показва, че пациенти с ранен стадий могат успешно да бъдат лекувани, независимо от присъствието на минимална резидуална болест в периферната кръв.²¹ При мултивариационен анализ се намира, че за разлика от хистологичния тип, наличието на менопауза или

на проведена нео- или адювантна терапия, големината на тумора, ангажираността на лимфните възли и експресията на хормонални рецептори и на HER2, заедно с наличието на ЦТК, са статистически значими прогностични фактори при начален КГ.²¹ От друга страна, HER2-експресията в ЦТК при стадии I-III се свързва с по-лоша прогноза и с намалена преживяемост без болест (ПББ).²² Проблем при посочените проучвания представлява сръвнително късият срок на наблюдаваните пациенти – до 100 месеца.²³ Терапевтичните решения при неметастатичен КГ се основават на характеристиката на първичния тумор, без да се отчита наличие на минимална резидуална болест (МРБ) и дали молекулярният профил на последната се отличава от първичния тумор.²⁴ При 71% от пациентите с ЕР-позитивни първични тумори се откриват ЕР-отрицателна МРД в костен мозък, като този факт може да допринесе за развитие на резистентност към ендокринна терапия.²⁵ По същия начин при 19% жени с HER2-отрицателни първични тумори се намират HER2-позитивни ЦТК в периферна кръв.²⁶ Съгласно сега действащите указания пациенти с HER2-отрицателни тумори не са показани за лечение с анти-HER2-насочени агенти, тъй като се отчита само позитивността в първичната или метастатичната лезия. Доколко това се отразява на преживяемостта на пациентите ще се прецени в провежданото в момента клинично проучване TREAT CTC.²⁷

По правило ЦТК представляват хетерогенна популация, в това число и резистентни на системна терапия туморни клетки, които могат да метастазират. Засега обаче клиничните данни за предиктивното значение на специфични подтипове персистиращи

ЦТК са оскъдни. Противоречиви са и резултатите от откриване на персистиращи ЦТК след провеждане на неоадювантна химиотерапия.²⁸ В проучване с неоадювантна химиотерапия REMAGUS02 наличието на ЦТК след приключване на лечението не корелира с пълния терапевтичен отговор, но предполага развитие на рецидив.²⁹ Пациенти с КГ, при които минималната резидуална болест в костен мозък персистира и след адювантна химиотерапия, са с по-голяма вероятност от рецидив.³⁰ Съгласно най-голямото клинично проучване, проведено досега (German SUCCESS study group (EUDRA-CT No. 2005-000490-21, NCT02181101), пациенти с неметастатичен КГ, при които се откриват ЦТК в периферна кръв, по-често развиват рецидив на болестта.³¹ Когато се сравни наличие на ЦТК преди и след химиотерапия, общата преживяемост (ОП) и ПББ са по-продължителни при пациенти, при които липсват ЦТК. Жени с повече от 5 ЦТК в периферна кръв са с най-лоша прогноза за ПББ. Проучване SUCCESS показва, че наличието на ЦТК в периферната кръв се свързва с по-лоша прогноза и с по-къси ПББ и ОП.³¹ Персистирането на ЦТК две години след приключване на химиотерапия при клинично здрави пациенти предсказва по-лоша преживяемост.³⁰ При 40-80% от пациентите с метастатичен КГ се откриват ЦТК. Наличието на повече от 5 ЦТК в 7.5 mL периферна кръв при диагноза на болестта се свързва с по-лоша прогноза.^{32,33} Тази стойност по-късно е потвърдена и в други проучвания.³⁴⁻³⁶ Промяна в нивото на ЦТК по време на химиотерапия при метастатичен КГ има прогностичен характер и в мониторинга на лечението проследяването му може да бъде по-подходящо от образна диагностика.³⁷

C

- Засега циркулиращи туморни клетки при карцином на гърда не са предиктивен биомаркер и могат да бъдат изследвани в този аспект само в условия на клинични проучвания.
- Изследване на циркулиращи туморни клетки при карцином на гърда може да се обсъжда за оценка на прогноза и мониторинг на отговор към терапия.



В клиничната практика не се подкрепя използване на циркулиращи туморни клетки като предиктивен биомаркер при карцином на гърда.

ЛИТЕРАТУРА

1. Esmaeilsabzali H, et al. Detection and isolation of circulating tumor cells: principles and methods. *Biotechnol Adv* 2013; 31 (7): 1063-1084
2. Pantel K, Alix-Panabieres C, Riethdorf S. Cancer micrometastases. *Nat Rev Clin Oncol* 2009; 6 (6): 339-351
3. San Lucas FA, et al. Minimally invasive genomic and transcriptomic profiling of visceral cancers by next-generation sequencing of circulating exosomes. *Ann Oncol* 2016; 27 (4): 635-641
4. Alix-Panabieres C, K Pantel. Circulating tumor cells: liquid biopsy of cancer. *Clin Chem* 2013; 59 (1): 110-118
5. Alix-Panabieres C, K. Pantel. Challenges in circulating tumour cell research. *Nat Rev Cancer* 2014; 14 (9): 623-631
6. Kanwar N, et al. Identification of genomic signatures in circulating tumor cells from breast cancer. *Int J Cancer* 2015; 137 (2): 332-344
7. Yee SS, et al. A novel approach for next-generation sequencing of circulating tumor cells. *Mol Genet Genomic Med* 2016; 4 (4): 395-406
8. Palmirotta R, et al. Next-generation sequencing (NGS) analysis on single circulating tumor cells (CTCs) with No need of whole-genome amplification (WGA). *Cancer Genomics Proteomics* 2017; 14 (3): 173-179
9. Pantel K, Alix-Panabieres C. Real-time liquid biopsy in cancer patients: fact or fiction? *Cancer Res* 2013; 73 (21): 6384-6388
10. Markou A, et al. Molecular characterization of circulating tumor cells in breast cancer by a liquid bead array hybridization assay. *Clin Chem* 2011; 57 (3): 421-430
11. Alix-Panabieres C. EPISPOT assay: detection of viable DTCs/CTCs in solid tumor patients. *Recent Results Cancer Res* 2012; 195: 69-76
12. Kuske A, et al. Improved detection of circulating tumor cells in non-metastatic high-risk prostate cancer patients. *Sci Rep* 2016; 6: 39736
13. Went PT, et al. Frequent EpCam protein expression in human carcinomas. *Hum Pathol* 2004; 35 (1): 122-128
14. Gorges TM, et al. Circulating tumour cells escape from EpCAM-based detection due to epithelial-to-mesenchymal transition. *BMC Cancer* 2012; 12: 178

15. Allard WJ, et al. Tumor cells circulate in the peripheral blood of all major carcinomas but not in healthy subjects or patients with nonmalignant diseases. *Clin Cancer Res* 2004; 10 (20): 6897-6904
16. de Bono JS, et al. Circulating tumor cells predict survival benefit from treatment in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2008; 14 (19): 6302-6309
17. Janni WJ, et al. Pooled analysis of the prognostic relevance of circulating tumor cells in primary breast cancer. *Clin Cancer Res* 2016; 22 (10): 2583-2593
18. Wulfing P, et al. HER2-positive circulating tumor cells indicate poor clinical outcome in stage I to III breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 2006; 12 (6): 1715-1720
19. Lucci A, et al. Circulating tumour cells in non-metastatic breast cancer: a prospective study. *Lancet Oncol* 2012; 13 (7): 688-695
20. Banyas M, et al. Circulating tumor cells in breast cancer. *Clin Chim Acta* 2013; 423: 39-45
21. Fehm T, et al. ERalpha-status of disseminated tumour cells in bone marrow of primary breast cancer patients. *Breast Cancer Res* 2008; 10 (5): R76
22. Riethdorf S, et al. Detection and HER2 expression of circulating tumor cells: prospective monitoring in breast cancer patients treated in the neoadjuvant GeparQuattro trial. *Clin Cancer Res* 2010; 16 (9): 2634-2645
23. Ignatiadis M, et al. Liquid biopsy-based clinical research in early breast cancer: The EORTC 90091-10093 Treat CTC trial. *Eur J Cancer* 2016; 63: 97-104
24. Hall C, et al. Circulating tumor cells after neoadjuvant chemotherapy in stage I-III triple-negative breast cancer. *Ann Surg Oncol* 2015; 22 (Suppl. 3): S552-558
25. Pierga JY, et al. Circulating tumor cell detection predicts early metastatic relapse after neoadjuvant chemotherapy in large operable and locally advanced breast cancer in a phase II randomized trial. *Clin Cancer Res* 2008; 14 (21): 7004-7010
26. Janni W, et al. Persistence of disseminated tumor cells in the bone marrow of breast cancer patients predicts increased risk for relapse--a European pooled analysis. *Clin Cancer Res* 2011; 17 (9): 2967-2976
27. Rack B, et al. Circulating tumor cells predict survival in early average-to-high risk breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst* 2014; 106(5). doi: 10.1093/jnci/dju066
28. Cristofanilli M, et al. Circulating tumor cells: a novel prognostic factor for newly diagnosed metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 2005; 23 (7): 1420-1430
29. Cristofanilli M. Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *Semin Oncol* 2006; 33 (Suppl. 9): S9-14
30. Giuliano M, et al. Circulating tumor cells as prognostic and predictive markers in metastatic breast cancer patients receiving first-line systemic treatment. *Breast Cancer Res* 2011; 13 (3): R67
31. Giordano A, et al. Establishment and validation of circulating tumor cell-based prognostic nomograms in first-line metastatic breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 2013; 19 (6): 1596-1602
32. Bidard FC, et al. Clinical validity of circulating tumour cells in patients with metastatic breast cancer: a pooled analysis of individual patient data. *Lancet Oncol* 2014; 15 (4): 406-414
33. Budd GT, et al. Circulating tumor cells versus imaging--predicting overall survival in metastatic breast cancer. *Clin Cancer Res* 2006; 12 (21): 6403-6409

1.5. ПРЕДИКТИВНИ БИОМАРКЕРИ ПРИ НЕДРЕБНОКЛЕТЪЧЕН БЕЛОДРОБЕН КАРЦИНОМ

1.5.1. EGFR-активиращи мутации

Милка Георгиева, Алексей Савов

Молекулярна биология. Едни от най-ефективните таргетни онкогени при недребноклетъчен белодробен карцином (НДКБК) са мутациите на рецептора за епидермален растежен фактор (EGFR) и те се считат за стандартна грижа. Молекулярно EGFR е трансмембранен гликопротеинов рецептор; при свързване с лиганд се активира цитоплазматичният му тирозинкиназен домейн чрез димеризиране и фосфорилиране, активират се нисходящите сигнални пътища и резултатът е клетъчна пролиферация. Мутациите в EGFR-гена водят до конститутивно активиране на сигнални пътища, критични за туморен растеж. Откриват се в 15% до 40% от пациентите с НДКБК, най-често при жени и непушачи.^{1, 2-5} По правило EGFR-мутациите са хетерогенни. Има много места в EGFR-гена, където могат да се случат активиращи мутации и те се асоциират с различна чувствителност към EGFR-инхибиране. Най-чести EGFR-мутации са in-frame делеции в екзон 19 и L858R точкови мутации в екзон 21. Двете заедно отговарят за около 85% от EGFR-мутациите при НДКБК.⁵⁻⁷

Аналитични методи за изследване. Тъй като EGFR-мутациите са детектирани най-често в аденокарциноми, съвременните ръководства препоръчват тестване за EGFR-мутации при аденокарциноми, смесени белодробни карциноми с аденокарциномен компонент (като аденосквамозен карцином) и малки биопсии, при които аденокарциномният компонент не може да бъде изключен.

EGFR-мутационно тестване може да се осъществява на проби от тънкоиглена биопсия, кор биопсия, бронхоскопия и резекционни материали. Препоръчва се използване на почувствителни тестове, способни да детектират мутации в проби с 10% туморни клетки. Също трябва да се тестват мутации дори и в 1% аденокарциноми. Тъкани от парафинови блокчета, както и замразени тъкани или фиксирани в алкохол тъкани, са подходящи за PCR-тестове. Освен на туморна тъкан, мутационно тестване може да се осъществява и на т.нар. течна биопсия в циркулираща туморна ДНК (ctDNA), при липса на тъкан или за откриване на мутации за първична или придобита резистентност; тази неинвазивна биопсия използва периферна кръв и е заместител за директен анализ на солидни тумори.²⁰

Мутации в EGFR-гена при пациенти с НДКБД се детектират чрез алел-специфичен Real-time PCR, секвениране по *Sanger*, пиросеквениране и секвениране от ново поколение (NGS). Секвенирането по *Sanger* изследва целия ген за наличие на мутации. Открива известни и нови мутации, но не е чувствителен за детекция на алелни честоти под 20% поради едновременно детектиране на нормални и мутантни алели в същата реакция. Пиросеквенирането е друга секвенционна техника, която е по-чувствителна от *Sanger* и може да детектира алелни честоти до 10%, което се равнява на около 20% туморни клетки, но поради късата дължина на четене по-трудно се анализира. По правило PCR-методите са много по-чувствителни от *Sanger*-секвенирането, защото могат да детектират мутантни алели до 1%, но откриват само тези мутации, за които е създаден тестът. Разработени са мултиплексни алел-специфични PCR-тестове за едновременно откриване на много мутации в EGFR-гена, одобрени от Американската Агенция за храни и лекарства (FDA). Примери за такива тестове са Cobas EGFR mutation test (Roche Molecular Systems), който открива 41 EGFR мутации, Therascreen EGFR RGQ PCR Kit (Qiagen) и AMOY Dx, които откриват 29 EGFR-мутации.

Една сравнително нова технология е дигиталният PCR, наскоро използвана за L858R-и T790M-мутациите, както и за екзон 19-делеции. Тази техника е относително лесна, евтина и много чувствителна, способна да открива *EGFR*-мутации в тъканни проби и в циркулираща туморна ДНК (ctDNA).²¹


Секвенирането от ново поколение (NGS) позволява количествен анализ на редки алели и едновременна оценка на много гени или цели геноми. Запазва чувствителността си дори при нисък процент туморни клетки и може да открие нови аберации, които няма да бъдат открити с алел-специфичното тестване. Таргетното секвениране на определен панел туморни гени в една платформа все повече се използва в клиниката.

Доказателства за предиктивно значение. Активиращи *EGFR*-мутации са предиктивни за отговор към *EGFR* тирозинкиназни инхибитори (ТКИи) – *gefitinib*, *erlotinib* и *afatinib*. Много рандомизирани проучвания демонстрират подобрени отговори, много

по-добро качество на живот и по-дълга преживяемост без прогресия (ПБП) и обща преживяемост (ОП), отколкото традиционните цитотоксични химиотерапии. Съвременните ръководства ги препоръчват за първа линия терапия на НДКБД пациенти с активиращи *EGFR*-мутации.^{8, 9-11, 18, 19} В клиничната практика са най-чести *EGFR*-мутации са екзон 19-делеции и L858R-мутации.⁵⁻⁷ Тумори с тези мутации са много чувствителни към терапия с *erlotinib*, *gefitinib* и с инхибитори от втора генерация *afatinib* и *dacomitinib*.^{8, 9-11} Налице са клинични доказателства за достоверно превъзходство на *dacomitinib* пред *afatinib* при избор на първа линия.²² Тумори с по-редки мутации, като екзон 18-мутация G719 и екзон 21-мутация L861Q, също са чувствителни към терапия с *EGFR*-инхибитори.^{12, 13} От друга страна обаче, тумори с екзон 20 in-frame инсерции (около 4-10% от всички *EGFR*-мутации) обикновено не се повлияват от лечение с *EGFR*-инхибитори.¹⁴⁻¹⁶ Въпреки че тези инсерционни мутации активират *EGFR*, те нямат увеличен афинитет към *EGFR*-инхибитори, както е при други *EGFR*-мутации.¹⁷

А

- Препоръчва се молекулярнопатологично изследване на *EGFR* на белодробен аденокарцином по време на диагноза в авансирал стадий или при прогресия на първоначално по-нисък стадий, който не е тестван предварително.
- Препоръчва се изследване на *EGFR* на тумори с хистология, различна от аденокарцином: (1) малки биопсии, при които аденокарциномният компонент не може да бъде изключен – недробноклетъчен неопределен тип (NOS), дребноклетъчна морфология при млади пациенти непущачи; (2) едроклетъчен; (3) нискодиференциран плоскоклетъчен; (4) смесени белодробни карциноми с аденокарциномен компонент (аденосквамозен).
- Препоръчително е лабораториите да използват клинично валидирани методи за изследване на *EGFR*, като алел-специфичен PCR с ДНК, изолирана от формалин-фиксирана и включени в парафин тъкани.
- Препоръчва се молекулярнопатологично изследване на *EGFR* с цел селектиране на пациенти с активиращи мутации, подходящи за *EGFR*-таргетна терапия (*erlotinib*, *gefitinib*, *afatinib*, *dacomitinib*), независимо от клиничните характеристики или когато аденокарцином не може да се изключи.

<p>В</p>	<ul style="list-style-type: none"> ■ Като подходящи проби за молекулярно изследване на биомаркери на недребноклетъчен белодробен карцином се препоръчва използване на клетъчни парафинови блокчета или цитологични препарати. ■ В случаи, когато тъканта е ограничена или недостатъчна, за молекулярно изследване се препоръчва използване на течна биопсия от плазма (cfDNA тест). ■ Молекулярно изследване на подходящи генетични таргети се препоръчва да се прави или на първични тумори, или на метастатични лезии.
<p>С</p>	<ul style="list-style-type: none"> ■ За идентифициране на други терапевтични опции, извън EGFR, ALK и ROS-1, вместо тестване на един ген, се препоръчват мултиплексни генетични секвенционни панели. ■ Препоръчително е молекулярно изследване на тумори при диагноза в ранен стадий, но решението за това трябва да бъде взето от лабораторията в колаборация с мултидисциплинарен екип. ■ Препоръчва се оценяването на пробите за биомаркерно изследване да се осъществява от патолози чрез определяне на адекватност на пробата (качество и количество на тъкан, съдържание на туморни клетки) и изготвяне на срезове, от които се изолират ДНК и РНК.
	<ul style="list-style-type: none"> ■ <i>Хистоморфологична верификация, преценка на адекватност на пробите (определяне на количество и качество на тъканта), определяне на съдържание на туморни клетки, изготвяне на срезове и молекулярнопатологично тестване трябва да се извършват в един център. Хистопатологичната оценка на пробите е критична за достоверността на резултатите, предпазва от фалшиво негативни резултати и неуспешни тестове. Това предполага задължително включване на правила за молекулярнопатологично тестване като част от националния стандарт по патология.</i> ■ <i>При тестване на биомаркери трябва да се следват правила за контрол, политики и процедури за осигуряване на качеството, както при останалите клинични лабораторни тестове.</i> ■ <i>Срок на извършване на EGFR-изследване трябва да е ≤ 7 работни дни за повече от 90% от пробите (от дата на получаване в тестващата лаборатория до време за даване на резултат).</i>



- Лабораториите трябва да използват валидирани методи за биомаркерно тестване на недребноклетъчен белодробен карцином, които да изглеждат стандартите за клинични молекулярнопатологични тестове.
- Необходимо е да се организира и изгради национална система от мерки за бързо пренасяне на тъканни проби от референтни центрове до тестващи лаборатории, за да се минимизира времето за тестване и да се избегне забавяне на информацията за пациентите.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ding L, Getz G, Wheeler DA, et al. Somatic mutations affect key pathways in lung adenocarcinoma. *Nature* 2008; 455: 1069-1075
2. Rosell R, Moran T, Queralt C, et al. Screening for epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *N Engl J Med* 2009; 361: 958-967
3. Pao W, Miller V, Zakowski M, et al. EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from "never smokers" and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 13306-13311
4. Marchetti A, Martella C, Felicioni L, et al. EGFR mutations in non-small-cell lung cancer: analysis of a large series of cases and development of a rapid and sensitive method for diagnostic screening with potential implications on pharmacologic treatment. *J Clin Oncol* 2005; 23: 857-865
5. Gahr S, Stoehr R, Geissinger E, et al. EGFR mutational status in a large series of Caucasian European NSCLC patients: data from daily practice. *Br J Cancer* 2013; 109: 1821-1828
6. Li C, Fang R, Sun Y, Han X, Li F, Gao B, et al. Spectrum of oncogenic driver mutations in lung adenocarcinomas from East Asian never smokers. *PLoS ONE* 2011; 6: e28204
7. Sequist LV, Bell DW, Lynch TJ, Haber DA. Molecular predictors of response to epidermal growth factor receptor antagonists in nonsmall-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2007; 25: 587-595
8. Fukuoka M, Wu YL, Thongprasert S, et al. Biomarker analyses and final overall survival results from a phase III, randomized, open-label, first-line study of gefitinib versus carboplatin/paclitaxel in clinically selected patients with advanced non-small-cell lung cancer in Asia (IPASS). *J Clin Oncol* 2011; 29: 2866-2874
9. Sequist LV, Yang JC, Yamamoto N, et al. Phase III study of afatinib or cisplatin plus pemetrexed in patients with metastatic lung adenocarcinoma with EGFR mutations. *J Clin Oncol* 2013; 31: 3327-3334
10. Rosell R, Carcereny E, Gervais R, et al. Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for European patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (EURTAC): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2012; 13: 239-246
11. Zhou C, Wu YL, Chen G, et al. Erlotinib versus chemotherapy as first-line treatment for patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (OPTIMAL, CTONG-0802): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 study. *Lancet Oncol* 2011; 12: 735-742
12. Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, et al. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med* 2004; 350: 2129-2139
13. Yeh P. DNA-Mutation Inventory to Refine and Enhance Cancer Treatment (DIRECT): a catalog of clinically relevant cancer mutations to enable genome-directed anticancer therapy. *Clin Cancer Res* 2013; 19: 1894-1901
14. Arcila ME, Nafa K, Chaff JE, et al. EGFR exon 20 insertion mutations in lung adenocarcinomas:

- prevalence, molecular heterogeneity, and clinicopathologic characteristics. *Mol Cancer Ther* 2013; 12: 220-229
15. Wu JY, Wu SG, Yang CH, et al. Lung cancer with epidermal growth factor receptor exon 20 mutations is associated with poor gefitinib treatment response. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 4877-4882
 16. Yasuda H. EGFR exon 20 insertion mutations in non-small-cell lung cancer: preclinical data and clinical implications. *Lancet Oncol* 2012; 13: e23-31
 17. Yasuda H, Park E, Yun CH, et al. Structural, biochemical, and clinical characterization of epidermal growth factor receptor (EGFR) exon 20 insertion mutations in lung cancer. *Sci Transl Med* 2013; 5: 216ra177
 18. Lee CK, Brown C, Gralla RJ, et al. Impact of EGFR inhibitor in non-small cell lung cancer on progression-free and overall survival: a meta-analysis. *J Natl Cancer Inst* 2013; 105 (9): 595-605
 19. Lee JK, Hahn S, Kim DW, et al. Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors vs conventional chemotherapy in non-small cell lung cancer harboring wild-type epidermal growth factor receptor: a meta-analysis. *JAMA* 2014; 311: 1430-1437
 20. Min Zheng. Classification and pathology of lung cancer. *Surg Oncol Clin N Am* 2016; 25: 447-468
 21. Sheikine Y, Rangachari D, McDonald DC, et al. EGFR testing in advanced non-small-cell lung cancer: *Clinical Lung Cancer* 2016; doi: 10.1016/j.clcc.2016.05.016
 22. Mok T, Cheng Y, Zhou X, et al. Dacomitinib versus gefitinib for the first-line treatment of advanced EGFR mutation positive non-small cell lung cancer (ARCHER 1050): A randomized, open-label phase III trial. *J Clin Oncol* 2017; 35 (Suppl; Abstr. LBA9007)

1.5.2. EGFR T790M-мутация

Милка Георгиева, Алексей Савов

Молекулярна биология. Повечето пациенти с недреноклетъчен белодробен карцином (НДКБК) прогресират след 9-12-месечна терапия с EGFR-тирозинкиназни инхибитори (ТКИи). Описани са различни механизми на придобита резистентност към първа генерация EGFR-ТКИи.¹ Най-разпространеният механизъм (49-60%) на придобита резистентност е поява на единична миссенс-мутация в екзон 20, обозначавана като Т790М-мутация.^{2,3} Тя води до субституция на треонин с метионин на позиция 790, който кодира част от киназния домейн на рецептора. Последва увеличен афинитет към АТФ и резистентност към инхибиране от обратими EGFR-ТКИи, като *gefitinib* и *erlotinib*.^{4,5} Мутация на Т790М може рядко да се намери при ТКИ-наивни пациенти с НДКБК. В тези случаи мутациите са обикновено свързани в комбинация с други активиращи EGFR-мутации (на същия алел), като L858R-субституция или екзон 19-делеция. Понякога се откриват герминативни Т790М-мутации с ниска честота и в контекста на фамилен туморен синдром.^{8,9}

Аналитични методи за изследване. Пациенти, прогресирали след EGFR-ТКИи, трябва да бъдат подложени на ребиопсия, за да се направи молекулярен анализ, специфичен за детекция на EGFR Т790М-мутация. Това повлиява на следващата терапевтична стъпка или показва алтернативни механизми на EGFR-ТКИ-резистентност, като трансформиране в плоскоклетъчен карцином или заобиколни пътища, които могат да бъдат изследвани в клинични проучвания. Валидна алтернатива на тъканна ребиопсия е течната биопсия, която е валидирана.¹⁰ Представява сурогатен източник на ДНК и е нова стратегия за генотипизиране на тумори – главно по време на

прогресия на EGFR-мутирани пациенти.¹¹⁻¹³ В случаи на откриване на Т790М-мутация в периферна кръв терапията с трета генерация EGFR-ТКИ е оправдана.¹⁴ Ако се получи негативна течна биопсия, се препоръчва тъканна ребиопсия, ако е възможна и ако е приета от пациента.¹⁵

Мутации в *EGFR*-гена при пациенти с НДКБК се детектират чрез алел-специфичен Real-time PCR, секвениране по *Sanger*, пиросеквениране и секвениране от ново поколение (NGS). *Sanger*-секвенирането изследва целия ген за наличие на мутации. Открива известни и нови мутации, но не е чувствителен за детекция на алелни честоти под 20% поради едновременното детектиране на нормални и мутантни алели в същата реакция. Пиросеквенирането е друга секвенционна техника, която е по-чувствителна от *Sanger* и може да детектира алелни честоти до 10%, което се равнява на около 20% туморни клетки, но поради късата дължина на четене по-трудно се анализира. По правило PCR-методите са много по-чувствителни от *Sanger*-секвенирането, защото могат да детектират мутантни алели до 1%, но откриват само тези мутации, за които е създаден тестът. Разработени са мултиплексни алел-специфични PCR-тестове за едновременно откриване на много мутации в *EGFR*-гена, одобрени от Американската Агенция за храна и лекарства (FDA). Примери за такива тестове са Cobas EGFR mutation test (Roche Molecular Systems), който открива 41 *EGFR*-мутации, Therascreen EGFR RGQ PCR Kit (Qiagen) и AMOY Dx, които откриват 29 *EGFR*-мутации.


Една сравнително нова технология е дигиталният PCR, наскоро използвана за L858R- и Т790М-мутациите, както и за екзон 19-делеции. Тази техника е относително лесна, евтина и много чувствителна, способна да открива EGFR-мутации в тъканни проби и в циркулираща туморна ДНК (ctDNA).

По правило NGS позволява количествен анализ на редки алели и едновременна оценка на много гени или цели геноми.¹⁶ Запазва чувствителността си дори при нисък процент туморни клетки и може да открие нови аберации, които няма да бъдат открити с аел-специфичното тестване. Таргетното секвениране на определен панел туморни гени в една платформа все повече се използва в клиниката.

Доказателства за предиктивно значение. Голям брой от трета генерация EGFR-ТКИи, създадени специфично да таргетират EGFR T790M-мутация, преминаха клинични изпитвания. От тях *osimertinib* – орален селективен и необратим EGFR-ТКИ, с

активност срещу T790M-мутация, е лицензиран за пациенти, развили EGFR T790M-резистентна мутация, и е избор на лечение.^{6,7} В обобщен анализ от три рандомизирани проспективни проучвания (AURA, AURA2 и AURA3) *osimertinib* демонстрира медианна преживяемост без болест (ПББ) – 12.3 месеца срещу 4.4 месеца при лекувани с конвенционално химиотерапия.^{7,17} При първичен анализ в AURA, AURA2 и AURA3 степента на обективен отговор е съответно 61.6%, 70.4% и 71%. Степента на контрол на болестта е изключително висока – 90.5% при AURA и 91.9% при AURA2; в AURA3 е 93% в рамото с *osimertinib* срещу едва 74% в рамото с платинов дублет.

А	<ul style="list-style-type: none"> ■ При авансирал недребноклетъчен белодробен карцином се препоръчва рутинно анализиране на <i>EGFR</i>-мутационен статус. ■ Препоръчва се методологията на теста адекватно да покрива мутации в екзони 18-21, включително и тези, свързани със специфична лекарствена резистентност. При ограничени възможности или материал като минимум трябва да бъдат тествани най-разпространените активиращи мутации: екзон 19-делеции и екзон 21 (L858R)-точкова мутация, включително и екзон 20 T790M.
В	<ul style="list-style-type: none"> ■ При пациенти, прогресирали на терапия с EGFR-тирозинкиназни инхибитори, се препоръчва ребиопсия за търсене на T790M-мутация и на подходяща терапевтична стратегия. Като алтернатива на тъканна биопсия се препоръчва течна биопсия. ■ При пациенти, придобили T790M-резистентна мутация след терапия с EGFR-тирозинкиназни инхибитори, се препоръчва лечение с <i>osimertinib</i>.

	<p>При тестване на биомаркери трябва да се прилага качествен контрол, политики и процедури за осигуряване на качество, сходни с другите клинични лабораторни тестове.</p>
---	---

ЛИТЕРАТУРА

1. Cortot AB, Jänne PA. Molecular mechanisms of resistance in epidermal growth factor receptor-mutant lung adenocarcinomas. *Eur Respir Rev* 2014; 23: 356-366
2. Yu HA, Arcila ME, Rekhtman N et al. Analysis of tumor specimens at the time of acquired resistance to EGFR-TKI therapy in 155 patients with EGFR-mutant lung cancers. *Clin Cancer Res* 2013; 19: 2240-2247
3. Blakely CM, Bivona TG. Resiliency of lung cancers to EGFR inhibitor treatment unveiled, offering opportunities to divide and conquer EGFR inhibitor resistance. *Cancer Discov* 2012; 2: 872-875
4. Pao W, Miller VA, Politi KA et al. Acquired resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib is associated with a second mutation in the EGFR kinase domain. *PLoS Med* 2005; 2: e73
5. Yun CH, Mengwasser KE, Toms AV et al. The T790M mutation in EGFR kinase causes drug resistance by increasing the affinity for ATP. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105: 2070-2075
6. Jänne PA, Yang JCH, Kim DW et al. AZD9291 in EGFR inhibitor-resistant non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2015; 372: 1689-1699
7. Mitsudomi T, Tsai CM, Shepherd FA et al. AZD9291 in pre-treated T790M positive advanced NSCLC: AURA2 phase II study. *J Thorac Oncol* 2015; 10 (Suppl. 2): S320
8. Girard N, Lou E, Azzoli CG, et al. Analysis of genetic variants in never-smokers with lung cancer facilitated by an internet-based blood collection protocol: a preliminary report. *Clin Cancer Res* 2010; 16: 755-763
9. Bell DW, Gore I, Okimoto RA, et al. Inherited susceptibility to lung cancer may be associated with the T790M drug resistance mutation in EGFR. *Nat Genet* 2005; 37: 1315-1316
10. Douillard JY, Ostoros G, Cobo M, et al. First-line gefitinib in Caucasian EGFR mutation-positive NSCLC patients: a phase-IV, open-label, single-arm study. *Br J Cancer* 2014; 110: 55-62.
11. Marchetti A, Del Grammastro M, Felicioni L et al. Assessment of EGFR mutations in circulating tumor cell preparations from NSCLC patients by next generation sequencing: toward a real-time liquid biopsy for treatment. *PLoS ONE* 2014; 9: e103883
12. Marchetti A, Palma JF, Felicioni L et al. Early prediction of response to tyrosine kinase inhibitors by quantification of EGFR mutations in plasma of NSCLC patients. *J Thorac Oncol* 2015; 10: 1437-1443
13. Sueoka-Aragane N, Katakami N, Satouchi M, et al. Monitoring EGFR T790 M with plasma DNA from lung cancer patients in a prospective observational study. *Cancer Sci* 2016; 107: 162-167
14. Oxnard GR, Thress KS, Alden RS, et al. 135O_PR: plasma genotyping for predicting benefit from osimertinib in patients (pts) with advanced NSCLC. *J Thorac Oncol* 2016; 11 (Suppl. 4S): S154
15. Novello S, Barlesi F, Califano R, et al. Metastatic non-small-cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2016; 27 (Suppl. 5): v1-v27
16. Sheikine Y, Rangachari D, McDonald DC, et al. EGFR testing in advanced non-small-cell lung cancer: *Clinical Lung Cancer* 2016. doi: 10.1016/j.clcc.2016.05.016
17. Ng TL, Camidge DR. AURA 3: the last word on chemotherapy as a control arm in EGFR mutant NSCLC? *Ann Transl Med* 2017; 5 (Suppl. 1): S14

1.5.3. KRAS-мутации

Милка Георгиева, Алексей Савов

Молекулярна биология. Вирусният онкогенен хомолог на саркома на *Kirsten* при плъх (*Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*, KRAS) принадлежи към семейството на RAS-онкогените, заедно с HRAS и NRAS. Генът KRAS кодира GTP-свързващ протеин.¹ По правило KRAS действа нисходящо от няколко тирозинкиназни рецептора, вкл. EGFR, и е свързан с активирането на RAS/RAF/MAP-киназа (MEK/ERK) и RAS/MAPK-сигнални пътища.² Мутации в KRAS има в 25% до 35% от пациентите с недребноклетъчен белодробен карцином (НДКБК), най-често при аденокарциноми.³ Известно е, че KRAS-мутациите са по-силно асоциирани с тютюнопушене, отколкото повечето други активиращи онкогенни мутации, описани при НДКБК. Идентифицирани са KRAS-мутации при 34% пушачи и 6% непущачи с белодробен аденокарцином.⁴ При около 95% от случаите мутациите са миссенс-варианти в кодони 12 и 13.^{4,5} При непущачи най-чести KRAS-мутации са G12D и G12V, докато G12C е най-честа при пушачи.^{3,4}

Аналитични методи за изследване. KRAS-мутационно тестване може да се осъществява на тъканни проби от биопсии или резекционни материали. Препоръчва се използване на по-чувствителни тестове, способни да детектират мутации в проби с 10% туморни клетки. Също трябва да се тестват мутации дори и в 1% аденокарциноми. Тъкани от парафинови блокчета са подходящи за PCR-тестове.

Мутации в KRAS-гена при пациенти с НДКБД се детектират чрез алел-специфичен Real-time PCR, секвениране по *Sanger*, пиросеквениране и секвениране от ново поколение (NGS).¹⁵ *Sanger*-секвенирането изследва целия ген за наличие на мутации. Открива

известни и нови мутации, но не е чувствителен за детекция на алелни честоти под 20% поради едновременно детектиране на нормални и мутантни алели в същата реакция. Пиросеквенирането е друга секвенционна техника, която е по-чувствителна от *Sanger* и може да детектира алелни честоти до 10%, което се равнява на около 20% туморни клетки, но поради късата дължина на четене по-трудно се анализира.

По правило PCR-методите са много по-чувствителни от *Sanger*-секвенирането, защото могат да детектират мутантни алели до 1%, но откриват само тези мутации, за които е създаден тестът. Разработени са мултиплексни алел-специфични PCR-тестове за едновременно откриване на много мутации в KRAS-гена, одобрени от Американската Агенция за храна и лекарства (FDA). Примери за такива тестове са Therascreen KRAS RGQ PCR Kit (Qiagen) и AMOY Dx.

По правило NGS позволява количествен анализ на редки алели и едновременна оценка на много гени или цели геноми. Запазва чувствителността си дори при нисък процент туморни клетки и може да открие нови аберации, които няма да бъдат открити с алел-специфичното тестване. Таргетното секвениране на определен панел туморни гени в една платформа все повече се използва в клиниката.

Доказателства за предиктивно значение. Наличието на KRAS-мутация може да се асоциира с лоша прогноза⁶ и да е негативен предиктор за отговор към химиотерапия⁷. Допълнително е свързана с увеличена вероятност от наличие на втори първичен тумор⁸ и при НДКБК е предиктивен маркер за резистентност към таргетна терапия с EGFR тирозинкиназни инхибитори (ТКИИ) като *gefitinib* или *erlotinib*.⁹ Тъй като KRAS-, EGFR- и ALK-мутациите се считат за взаимноизключващи се, първоначално KRAS-

тестването беше предложено като сурогатен тест за изключване на EGFR- и ALK-позитивни случаи^{2, 10}, но това засега не се препоръчва. Скорошни данни показват, че е възможно наличие на съпътстващи мутации: в едно проучване на 282 случая на НДКБК при 3 от тях (1.1%) е налице едновременно EGFR-и KRAS-мутации, а 7 случая (2.5%) имат съпътстващи EML4-ALK- и KRAS-мутации.¹⁰

Понастоящем се провеждат клинични проучвания, които тестват разнообразни инхибитори при KRAS-мутирани белодробни аденокарциноми, включително и съединения, таргетиращи сигналните пътища RAS/RAF/MEK и PI3K/AKT/mTOR и циклин-зависи-

ми кинази.¹¹ В процес на създаване е KRAS-инхибитор и тече фаза III проучване на инхибитора на низходящия RAS-сигнален път *selumetinib*.¹² Установено е, че експресията на протеина на програмирана смърт (programmed cell death protein 1, PD-1) е значително асоциирана с наличие на KRAS-мутации ($p=0.006$).¹³ Доказано е, че експресията на лиганда за PD-1 (PD-L1) е повишена в премалигнени KRAS-клетки и че активиране на ERK медира конститутивно увеличаване на PD-L1-експресия чрез активираща KRAS-мутация в тези клетки. От тези данни се предполага, че KRAS-мутация може директно да активира PD-1/PD-L1-имунните контролни точки (чекпоинт).¹⁴

C

- Молекулярни изследвания за KRAS засега не се препоръчва като рутинен самостоятелен тест извън контекста на клинични проучвания.
- За идентифициране на алтернативни терапевтични опции е подходящо KRAS да се включи като част от по-големи панели, осъществявани след негативни рутинни тестове за EGFR, ALK и ROS1.



При тестване на биомаркери трябва да се следват правила за контрол, политики и процедури за осигуряване на качество както при останалите клинични лабораторни тестове.

ЛИТЕРАТУРА

1. Stella GM, Scabini R, Inghilleri S, et al. EGFR and KRAS mutational profiling in fresh non-small cell lung cancer (NSCLC) cells. *J Cancer Res Clin Oncol* 2013; 139 (8): 1327-1335
2. Sholl LM. Biomarkers in lung adenocarcinoma: a decade of progress. *Arch Pathol Lab Med* 2015; 139 (4): 469-480
3. Kempf E, Rousseau B, Besse B, et al. KRAS oncogene in lung cancer: focus on molecularly driven clinical trials. *Eur Respir Rev* 2016; 25 (139): 71-76
4. Dogan S, Shen R, Ang DC, et al. Molecular epidemiology of EGFR and KRAS mutations in 3,026 lung adenocarcinomas: higher susceptibility of women to smoking-related KRAS-mutant cancers. *Clin Cancer Res* 2012; 18 (22): 6169-6177
5. Fujimoto J, Wistuba II. Current concepts on the molecular pathology of nonsmall cell lung carcinoma. *Semin Diagn Pathol* 2014; 31 (4): 306-313

6. Ying M, Zhu XX, Zhao Y, et al. KRAS mutation as a biomarker for survival in patients with non-small cell lung cancer, a meta-analysis of 12 randomized trials. *Asian Pac J Cancer Prev* 2015; 16 (10): 4439-4445
7. Macerelli M, Caramella C, Faivre L, et al. Does KRAS mutational status predict chemoresistance in advanced non-small cell lung cancer (NSCLC)? *Lung Cancer* 2014; 83 (3): 383-388
8. Shepherd FA, Domerg C, Hainaut P, et al. Pooled analysis of the prognostic and predictive effects of KRAS mutation status and KRAS mutation subtype in earlystage resected non-small-cell lung cancer in four trials of adjuvant chemotherapy. *J Clin Oncol* 2013; 31 (17): 2173-2181
9. Pao W, Wang TY, Riely GJ, et al. KRAS mutations and primary resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib. *PLoS Med* 2005; 2 (1): e17
10. Amadori D, Bravaccini S, Calistri D, et al. Frequency of Concomitant EGFR, EML4-ALK or KRAS alterations in NSCLC patients and correlation with response to treatment. IASLC World Meeting, September 6-9, 2015; Denver, CO
11. Randomized phase II study of AZD6244 MEK-inhibitor with erlotinib in KRAS wild type and KRAS mutant advanced non-small cell lung cancer. ClinicalTrials.gov Web site. US National Institutes of Health. Available at: www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01229150
12. Stinchcombe TE. Novel agents in development for advanced non-small cell lung cancer. *Ther Adv Med Oncol* 2014; 6 (5): 240-253
13. D'Incecco A, Andreozzi M, Ludovini V, et al. PD-1 and PD-L1 expression in molecularly selected non-small-cell lung cancer patients. *Br J Cancer* 2015; 112 (1): 95-102
14. Carbone D, Dubinett S, Garon E, et al. ERK activation mediates increased PD-L1 expression in KRAS mutated premalignant human bronchial epithelial cells. IASLC World Meeting 2015
15. Zheng M. Classification and pathology of lung cancer. *Surg Oncol Clin N Am* 2016; 25: 447-468

1.5.4. ALK-пренареждания

Борис Петров, Савелина Поповска

Молекулярна биология. Киназата на анапластичния лимфом (ALK) или CD246 е трансмембранен тирозинкиназен (ТК) рецептор.¹ Идентифициран е за първи път като фузионен партньор на нуклеофозмин при анапластичен едроклетъчен лимфом, откъдето идва абривиатурата му. Притежава вътреклетъчен домейн, който е въввлечен в сигналните пътища RAS/RAF/MAPK, PI3K/AKT и JAK-STAT. Рецепторът се кодира от *ALK*-ген, намиращ се в късото рамо на хромозома 2 (2p23). Около 3-7% от пациентите с недребноклетъчен белодробен карцином (НДКБК) се диагностицират с фузии на *ALK*.^{2,3} Най-чест фузионен партньор е *EML4*, което води до малка инверсия на късото рамо на хромозома 2. *ALK*-пренарежданията са свързани с определени клинични характеристики (непушачи или леки пушачи и по-млада възраст) и хистологични характеристики (аденокарцином, муцинозна морфология или морфология *пръстен с камък*).^{4,5} Подобно на *EGFR*, клиникопатологичните характеристики не следва да се използват за изключване на карцинома от *ALK*-молекулно тестване. *ALK*-пренарежданията са взаимноизключващи се с други онкогенни активиращи мутации. Карциноми с *ALK*-пренареждания са зависими от непрекъсната сигнализация чрез фузионния протеин, поради което са високо чувствителни към таргетна терапия.⁶

Аналитични методи за изследване. Клиничните ръководствата препоръчват всички белодробни аденокарциноми да бъдат тествани за наличие на *ALK*-пренареждания.⁷ Препоръчаният от Американската Агенция за храни и лекарства (FDA) метод за тестване е двойно-флуоресцентно белязан Break-apart FISH.⁸ Наличието на фузионен продукт се идентифицира, когато SpectrumOrange-белязаният 5'-теломерен край на *ALK*

е пространствено раздалечен от SpectrumGreen-белязания 3'-центромерен край. Важно е да се разграничат туморните клетки от заобикалящите ги нетуморни. Тестване трябва да се извършва от патолог, биолог и лаборант с необходимо обучение за изследване на солидни тумори чрез FISH. Случаите се отчитат като позитивни, ако 15% или повече от 50 туморни ядра показват разделени сигнали.⁹ Формалин-фиксираните проби са препоръчителни, доколкото използването на алкохолни фиксатори може да компрометира FISH-сондите. За разлика от FDA, на европейско ниво тестване за *ALK*-пренареждания се изисква само при доказателство за авансирал НДКБК, което дава методологична флексибилност.

По-нови публикации докладват по-висока чувствителност и специфичност на имунохистохимия (ИХХ) за *ALK*-пренареждания.^{10,11} Клон 5A4 (Novocastra) е валидиран като част от European Thoracic Oncology Platform (ETOP).¹² Оценката на ИХХ-експресия се оценява по четириточкова система от 0 до 3. В този случай съществува съвпадение на резултатите между ИХХ ALK 3+ и ALK FISH при над 90% от пациентите. Поради това е необходимо да се извършва потвърдителен FISH само за ИХХ ALK 1+/2+. Непротиворечива ALK 3+ експресия може да се интерпретира като достатъчно индикативна за лечение и поради вероятност несъвпаденията да са резултат на фалшиво негативни FISH-резултати.

Системата D5F3 Optiview System (Ventana) е валидирана в проучване European Harmonization Study.¹³ Съществена разлика с други техники е отчитане на експресия по бинарна система (положителна/отрицателна). Въпреки по-опростената система на отчитане, налични са случаи на хетерогенно и слабо оцветяване, което също налага потвърждение с FISH.¹³ Разработено е по-ново антияло-клон OT1A4 (Origene, Rockville)

и първи сравнения с D5F3 Optiview System показват неговата повишена чувствителност и специфичност за фузионни продукти със сравними и дори превъзхождащи резултати.^{14, 15} Протоколите за намиране на ALK с клон CD246 показват лоша чувствителност.

Системата RT-PCR е използвана успешно за идентифициране на позитивни случаи с чувствителност – 100% и специфичност – 85-100%. Мултиплексната RT-PCR е лесна за извършване, бърза и сравнително евтина методика. Недостатък е, че поради постоянно нарастващия списък на ALK-фузионни партньори RT-PCR има вероятност да изпусне по-редки пренареждания. По тази причина използването на метода е ограничен в клиничната практика.

Разработени са поредица от иновативни подходи, базирани на секвениране от ново поколение (NGS) за намиране на генни фузии между много таргетни гени. Забележително е, че някои от тези комплексни тестове изискват само до 10 ng РНК и имат сравнително ниска степен на неуспех при използване на тъкан в парафин. Много чувствителна NGS-техника за оценка на пренареждания, включващи ALK и други генни пренареждания при НДКБК, е Anchored Multiplex PCR. Тя е насочена само към интересувания ни ген, което позволява намиране на специфични промени, независимо от фузионния партньор. Валидирането на панела за генни пренареждания при използването на FFPE-проби показва 100% чувствителност и специфичност.

Доказателства за предиктивно значение. ALK-позитивният НДКБК показва различна преживяемост без прогресия (ПБП), което най-често е следствие от развиваща се резистентност към *crizotinib* (ALK-инхибитор от първа генерация) за период от 1-2

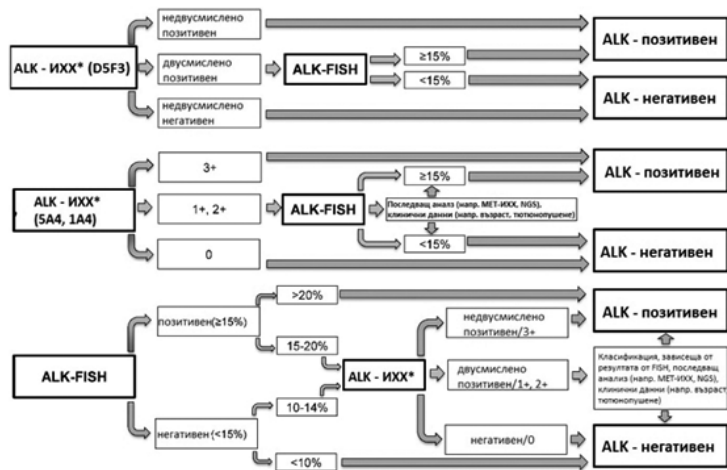
години. Подобно на *EGFR*, прогресия може да се причини от резистентни мутации в ТК-домейн на *ALK*, най-често L1196M-мутация.^{16, 17} Тази мутация причинява структурна промяна на рецептора, която води до намален отговор към *crizotinib*. За разлика обаче от резистентността към EGFR-тирозинкиназни инхибитори (ТКИи), в някои тумори, резистентни към ALK-ТКИ, съществуват множество мутации в киназния домейн (G1269A, G1202R, S1206Y, F1174C/L, D1203N) и извън него (треонин-инсерции на 1151, C1156Y, L1152R).^{1, 18-20} *In vitro* проучвания показват, че различните мутации носят различно ниво на резистентност към структурно различни ТКИи. Това подчертава нуждата за идентифициране на вторични резистентни мутации чрез извършване на повторни или течни биопсии. За установяване на придобита резистентност е удачно използване на секвенционен метод.^{21, 22} В други случаи резистентност към ALK-ТКИ се причинява от амплификация на фузионния продукт, установена с FISH-тестване, която може да е самостоятелна или да се съпътства с резистентна мутация. При единични пациенти е установено, че *EGFR* “див” тип може да се активира в условия на ALK-инхибиране.²³ Подобни байпас-пътища са идентифицирани в единични случаи и чрез амплификация на *cKIT*.²⁰ И двата пътя ефективно активират сигнални пътища на клетъчна пролиферация при наличие на ALK-инхибиране. Начални *in vitro* проучвания демонстрират, че инхибиране на EGFR в тези случаи ресенсибилизира раковите клетки към *crizotinib*. Това подкрепя тезата за мултикиназно инхибиране като начин за адресиране на вторична придобита резистентност.²² Няколко рандомизирани проспективни проучвания доказват клиничната ефективност на втора генерация ALK-инхибитори *ceritinib*²⁴ и *alectinib*²⁵ при рецидивиращ ALK-позитивен НДКБК. Доказателствата за клиничната ефективност на *alectinib* го препоръчват като медикамент на избор за първа линия.²⁶

A

- *ALK*-молекулярно изследване се препоръчва за селекция на пациенти с авансирал недребноклетъчен белодробен карцином, показани за таргетна терапия с *ALK*-тирозинкиназни инхибитори (*allectinib*, *crizotinib*, *ceritinib*). Пациенти с белодробен аденокарцином не трябва да бъдат изключвани от изследване според клинични характеристики.
- При резекционни белодробни биопсии се препоръчва *ALK*-изследване за аденокарциноми и смесени белодробни карциноми с аденокарциномна компонента, независимо от хистологичната диференциация.
- При резекционни белодробни биопсии не се препоръчва *ALK*-изследване за тумори без никаква аденокарциномна компонента, каквито са „чистите“ плоскоклетъчни и дребноклетъчни карциноми.
- При малки белодробни биопсии, където аденокарциномна компонента не може да бъде напълно изключена, *ALK*-изследване се препоръчва и при пациенти с плоскоклетъчна или дребноклетъчна хистология с индикативни клинични критерии (млада възраст, непушачи).
- При определяне на *ALK*-статус за първичен избор на лечение еднакво се препоръчва биопсичен материал от първичен тумор или от метастатични лезии.
- Изследване за *ALK*-пренареждания се препоръчва при диагноза на пациенти с авансирал стадий на болестта (стадий III-IV според Осма редакция на TNM-класификация), които са подходящи за лечение, или при рецидив или прогресия на по-ранен стадий, неизследвани преди това.
- Като методи на изследване се препоръчват имунохистохимия или *ALK* break-apart FISH.



- *Предлага се алгоритъм за рутинна клинична практика, основан на имунохистохимичен скрининг, с последващо потвърждение чрез ALK break-apart FISH при двусмислени резултати (Фиг. 1).*
- *Интерпретация при различни случаи на съвпадащи и разминаващи се FISH и имунохистохимични резултати са представени на Табл.1.*
- *Вече навлизат РНК-базирани методи за едновременно търсене на няколко онкогенни фузии, включително ALK-, RET-, ROS1- и NTRK1-гени.*



Фигура 1. Алгоритъм за скрининг на ALK-статус при НДКБК (по Laffert M, et al.)¹³.

Таблица 1. Клинична интерпретация на съвпадащи и разминаващи се резултати от FISH и IXX (по Laffert M, et al.)¹³.

ALK-резултат	Оценка/клинична интерпретация
ИХХ-/FISH-	ALK-негативен статус
ИХХ-/FISH+(FISH гранично+)	Технически артефакти на FISH Негативен ALK-статус
ИХХ+/FISH-(FISH гранично+)	Технически артефакти на FISH ALK-позитивен статус
ИХХ+/FISH+	ALK-позитивен статус
ИХХ-/FISH+	Препоръчва се да се използва друга платформа – NGS
ИХХ+/FISH не е наличен поради ограничението на материала	ALK-позитивен статус

ЛИТЕРАТУРА

- Shaw AT, Engelman JA. ALK in lung cancer: past, present, and future. *J Clin Oncol* 2013; 31: 1105-1111
- Soda M, Choi YL, Enomoto M, et al. Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature* 2007; 448: 561-566
- Kwak EL, Bang YJ, Camidge DR, et al. Anaplastic lymphomakinase inhibition in non-small cell lung cancer. *N Engl J Med* 2010; 363: 1693-1703
- Shaw AT, Yeap BY, Mino-Kenudson M, et al. Clinical features and outcome of patients with non-small-cell lung cancer who harbor EML4-ALK. *J Clin Oncol* 2009; 27: 4247-53
- Wong DW, Leung EL, So KK, et al. The EML4-ALK fusion gene is involved in various histologic types of lung cancers from non-smokers with wild-type EGFR and KRAS. *Cancer* 2009; 115: 1723-33
- McDermott U, Iafrate AJ, Gray NS, et al. Genomic alterations of anaplastic lymphoma kinase may sensitize tumors to anaplastic lymphoma kinase inhibitors. *Cancer Res* 2008; 68: 3389-95
- Lindeman NI, Cagle PT, Beasley MB, et al. Molecular testing guideline for selection of lung cancer patients for EGFR and ALK tyrosine kinase inhibitors. *Arch Lab Med Pathol* 2013; 137: 828-860
- Perner S, Wagner PL, Demichelis F, et al. EML4-ALK fusion lung cancer: a rare acquired event. *Neoplasia* 2008; 10: 2983-02
- Camidge DR, Kono SA, Flacco A, et al. Optimizing the detection of lung cancer patients harboring anaplastic lymphoma kinase (ALK) gene rearrangements potentially suitable for ALK inhibitor treatment. *Clin Cancer Res* 2010; 16: 5581-90
- Tsao MS, Hirsch FR, Yatabe Y, editors. IASLC ATLAS of ALK testing in lung cancer. IASLC Press; 2013
- Wynes MW, Sholl LM, Dietel M, et al. An international interpretation study using the ALK IHC antibody D5F3 and a sensitive detection kit demonstrates high concordance between ALK IHC and ALK FISH and between evaluators. *J Thorac Oncol* 2014; 9: 6318
- Blackhall FH, Peters S, Bubendorf L, et al. Prevalence and clinical outcomes for patients with ALK-positive stage I to III adenocarcinoma: Results from the European Thoracic Oncology Platform Lungscape project. *J Clin Oncol* 2014 Jul 28
- von Laffert M, Warth A, Penzel R, et al. Multicenter immunohistochemical ALK-testing of non-small-cell lung cancer shows high concordance after harmonization of techniques and interpretation criteria. *J Thorac Onco* 2014; 9: 1685-1692
- Mino-Kenudson M, Chirieac LR, Law K, et al. A novel, highlight sensitive antibody allows for the routine detection of ALK-rearranged lung adenocarcinomas by standard immunohistochemistry. *Clin Cancer Res* 2010; 16: 1561-71
- K. Gruber, M. Kohlhauf, G. Friedel, et al. A novel highly sensitive ALK antibody 1A4 facilitates effective screening for ALK rearrangements in lung adenocarcinomas by standard immunohistochemistry. *J Thorac Oncol* 2015; 10: 713-716
- Choi YL, Soda M, Yamashita Y, et al. EML4-ALK mutations in lung cancer that confer resistance to ALK inhibitors. *N Engl J Med* 2010; 363: 1734-9
- Katayama R, Khan TM, Benes C, et al. Therapeutic strategies to overcome crizotinib resistance in non-small cell lung cancers harboring the fusion oncogene EML4-ALK. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108: 7535-40
- Kataama R, Shaw AT, Khan TM, et al. Mechanisms of acquired crizotinib resistance in ALK-rearranged lung cancers. *Sci Transl Med* 2012; 4: 120ra17
- Camidge DR, Doebele RC. Treating ALK-positive lung cancer – yearly successes and future challenges. *Nat Rev Clin Oncol* 2012; 9: 268-277

20. Doebele RC, Pilling AB, Aisner DL, et al. Mechanisms of resistance to crizotinib in patients with ALK gene rearranged nonsmall cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2012; 18: 1472-1482
21. Heuckmann JM, Holzel M, Sos ML, et al. ALK mutations conferring differential resistance to structurally diverse ALK inhibitors. *Clin Cancer Res* 2011; 17: 7394-7401
22. Friboulet L, Li N, Katayama R, et al. The ALK inhibitor ceritinib overcomes crizotinib resistance in non-small cell lung cancer. *Cancer Discov* 2014; 4: 662-673
23. Sasaki T, Koivunen J, Oginio A, et al. A novel ALK secondary mutation and EGFR signaling cause resistance to ALK kinase inhibitors. *Cancer Res* 2011; 71: 6051-6060
24. Felip E, Orlov S, Park K, et al. Phase II study of ceritinib in previously treated ALKi-naive patients with ALK+ NSCLC: Whole-body efficacy in all patients and in patients with baseline brain metastases. 2016 ESMO Congress, Abstr. 1208O
25. Nokihara H, Hida T, Kondo M, et al. Alectinib versus crizotinib in ALK inhibitor naive ALK-positive non-small cell lung cancer: Primary results from the J-ALEX study. ASCO 2016, Abstr. 9008
26. Shaw AT, Peters S, Mok T, et al. Alectinib versus crizotinib in treatment-naive advanced ALK positive non-small cell lung cancer (NSCLC): Primary results of the global phase III ALEX study. *J Clin Oncol* 2017; 35 (Supl; Abstr. LBA9008)

1.5.5. ROS1-пренареждания

Борис Петров, Савелина Поповска

Молекулярна биология. ROS1 принадлежи към семейството на човешката рецепторна тирозинкиназа (ТКР) и е еволюционно близка до семейството на ALK, което е част от научната обосновка за използване на ALK-инхибитори като инхибитори на ROS1. Генът ROS1 се намира в хромозома 6 (6q22) и кодира трансмембранен протеинов рецептор. Екстрацелуларният му N-терминален участък съдържа повече от 1800 аминокиселини, което го превръща в един от най-големите извънклетъчни домейни сред всички човешки ТКРи. Въпреки това, досега не е известен нито един ROS1-лиганд при хора и физиологичната функция на този рецептор е все още неясна. C-терминалната част на ROS1 съдържа киназен и трансмембранен домейн.¹⁻⁴ Геномни пренареждания, включващи ROS1, се срещат в 1-2% от недребноклетъчния белодробен карцином (НДКБК).^{1, 5-10} Известни ROS1-фузионни партньори при НДКБК са FIG, CD74, SLC34A2 и SDC4, като този списък се увеличава. CD74-ROS1 е най-често откривана ROS1-фузия. При всички известни фузионни гени киназният домейн на ROS1 е напълно запазен, а ROS1-мястото на фузия на РНК-ниво (иРНК) винаги се извършва в 5'-края на екзони 32, 34, 35 или 36. Механизмът, чрез който ROS1-фузионни протеини стават конститутивно активни, не е точно известен. Много от известните фузионни партньори на ROS1 не съдържат димеризационен домейн.⁹ Експресията на фузионни протеини води до автофосфорилиране на ROS1 и други кинази и тези ефекти могат да се блокират чрез фармакологично инхибиране на ROS1. Субклетъчната локализация и низходяща сигнализация може да се различава според фузионния партньор на ROS1, но като цяло, активираните каскади включват общите сигнални пътища за растеж и оцеляване, които се активират също и от други ТКРи.^{6, 7, 11, 12}

Аналитични методи за изследване. Когато се тества ROS1, е препоръчително да се тества същият туморен материал, избран за тестване на EGFR и ALK. Идеалният вариант е това да става паралелно при налична тъкан от първата серия срезове.¹³ Традиционният подход за намиране на ROS1-гени пренареждания е чрез двуцветна „break apart“ флуоресцентна *in situ* хибридизация (FISH). В нормални клетки флуоресцентно белязаните сонди генерират сигнали, които са сходни по размер и се припокриват. След настъпване на транслокация посочените сигнали се разделят и вече не са колокализирани. Това включва маркиране на 3' (центромерна)-част на мястото на фузията с един флуорохром и 5' (теломерна)-част с друг флуорохром.^{10, 14-16} За оптимални резултати от FISH е желателно спазване на няколко важни условия. Използване на срезове от материали, по-стари от 6 месеца, може да доведе до лоша хибридизация. В аналитичната фаза е важно да се оценяват само интактни туморни клетки с неприпокриващи се ядра. Използване на автоматичен софтуер може да улесни отчитането на резултатите. FISH-тестването за ROS1 не се ограничава само до хистологични тъканни срезове, но е приложимо и за цитологични проби.^{17, 18}

Имунохистохимията (ИХХ) е ефективен скринингов метод за намиране на ROS1-позитивен НДКБК с чувствителност – 100% и променлива специфичност – 92-100% според границата, използвана за определяне на позитивност.^{7, 16, 19-24} Тези резултати са основани на използване на ROS1 (D4D6)-заешко моноклонално антитяло. За разлика от ALK, където ганглийни клетки от апендикс служат като адекватна външна контрола, при ROS1 досега няма външна контрола от доброкачествена тъкан, затова се използват клетъчни линии, съдържащи фузионен ген.⁷ Липсва универсално приета система за оценка на резултатите от ИХХ. В един случай използваната граница включва както всяко надфоново (ако е налично), така и умерено или силно оцветяване (2+/3+). Друга опция е да се използва H-Score с оптимална граница за ROS1-позитивност, дефинирана като > 100¹⁸

или > 150²². В едно проучване е намерено слабо или фокално оцветяване при 31% от 253 ROS1 „див“ тип, но това не е оказало каквото и да е влияние върху специфичността, когато са използвани подходящи граници за позитивност (H-Score > 150).²³ Нито един от докладваните методи не е показал ясно превъзходство спрямо другия, доколкото всички са довели до много добра и отлична корелация с резултатите от FISH. С оглед на междулабораторна вариабилност на специфичността силно се препоръчва потвърждение на позитивни или несигурни IXX-резултати чрез FISH или друг метод.

Методът на RT-PCR изисква поредица от специфични праймери за дискриминиране на известни фузионни варианти, които могат след това да се потвърдят чрез секвениране.²⁵ Техниката на RT-PCR е използвана успешно за идентифициране на позитивни случаи с чувствителност – 100% и специфичност – 85-100% при сравнение с FISH като референтен стандарт.^{19, 21} Мултиплексната RT-PCR е лесна за извършване, бърза и сравнително евтина методика.²⁶ Недостатък е, че с постоянно нарастващия списък на ROS1-фузионни партньори има вероятност да се изпуснат редки пренареждания. Поради това използването на метода е ограничен в клиничната практика.

Разработени са поредица от иновативни подходи, базирани на секвениране от ново поколение (NGS), за намиране на генни фузии между много таргетни гени. Някои от тези комплексни тестове изискват само до 10 ng РНК и имат сравнително ниска степен на неуспех при използване на тъкан в парафин.²⁷ Много чувствителна NGS-техника за оценка на пренареждания, включващи ROS1 и други генни транслокации при НДКБК, е Anchored Multiplex PCR. Тя е насочена само към интересувания ни ген, което позволява намиране на специфични промени, независимо от фузионния партньор. Валидирането на панела за генни пренареждания при използване на FFPE проби показва 100%

чувствителност и специфичност, сравнен с референтни проби.²⁸ Методиката може да бъде използвана като самостоятелен метод или като допълнителен тест в алгоритъма на избор на пациенти за лечение с ROS1-, RET-или NTRK-инхибитори.²⁹

Доказателства за предиктивно значение. Инхибиране на ROS1 с *crizotinib* е проучвано в редица клинични изпитвания в ранна фаза при пациенти с авансирал ROS1-положителен НДКБК. В разширена кохорта на фаза I проучване с *crizotinib* степента на обективен отговор (COO) е 72%, средната продължителност на отговора е 17.6 месеца, а средната преживяемост без прогресия (ПБП) е 19.2 месеца. Не се наблюдава връзка между ROS1-фузионния партньор и продължителността на лечението с *crizotinib*.³⁰ При силно претретирани пациенти в ретроспективно проучване степента на обективен отговор (COO) с *crizotinib* е 80%, а средната преживяемост без прогресия (ПБП) е 9.1 месеца.³¹ При пациенти с авансирал ROS1-положителен НДКБК, получаващи *crizotinib* във фаза II проучване, COO е 69%, а средната ПБП е 9.1 месеца.³² При пациенти от Източна Азия с авансирал ROS1-положителен НДКБК във фаза II проучване с *crizotinib* COO е 69%, а средната ПБП е 12.9 месеца.³³⁻³⁵

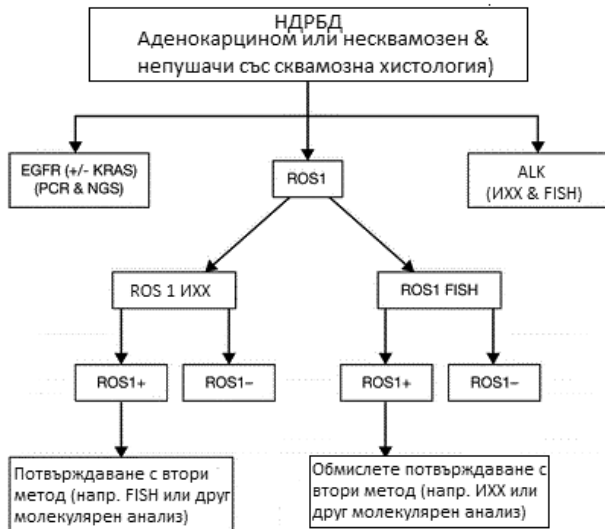
Групата на вероятни носители на ROS1-фузиал ген е същата както при препоръчаната за тестване на EGFR-мутации и ALK-пренареждания.^{36, 37} Тестването за ROS1 често се осъществява на втори етап при пациенти, негативни за EGFR, ALK и KRAS, които никога не са пушили или са дългосрочно непушещи бивши пушачи. Това се основава на наблюдения, че тези адиктивни онкогени са взаимноизключващи се за едновременно наличие. Сега европейските ръководства препоръчват тестване за ROS1-пренареждания при пациенти с авансирал НДКБК, негативни за EGFR-мутации и ALK-пренареждания, вкл. всички хистологични субтипове, стадии IIIB/IV при непушачи и неплюскоклетъчни субтипове при настоящи или бивши пушачи.

В

- *ROS1*-молекулярно изследване се препоръчва за селекция на пациенти, показани за таргетна терапия с ALK/*ROS1*-тирозинкиназни инхибитори (*crizotinib*). Пациенти с белодробен аденокарцином не трябва да бъдат изключвани от изследване според клинични характеристики.
- При определяне на *ROS1*-статус за първичен избор на лечение еднакво се препоръчва изследване на биопсичен материал от първичен тумор и от метастатични лезии.
- Препоръчително е *ROS1* да се изследва от същия туморен материал, избран за тестване на *EGFR* и *ALK*, паралелно при налична тъкан от първа серия срезове.
- Изследване на *ROS1*-пренареждания се препоръчва при поставяне на диагноза при пациенти с авансирал стадий на болестта (стадий IIIБ-IV според Осма редакция на TNM-класификация), които са подходящи за лечение, или при рецидив или прогресия на по-ранен стадий, нетествани преди това.
- Като методи на изследване на *ROS1*-статус се препоръчват валидирана имунохистохимия или *ROS1* break-apart FISH.



- *Предлага се алгоритъм за рутинна клинична практика, основан на имунохистохимичен скрининг, с последващо потвърждение чрез ROS1 break-apart FISH при позитивни или двусмислени резултати (Фиг. 1).*
- *Вече навлизат РНК-базирани методи за едновременно търсене на няколко онкогенни фузици, включително ALK-, RET-, ROS1- и NTRK1-гени, което може драстично да ограничи използването на имунохистохимични и FISH-тестове.*



Фигура 1. Алгоритъм за имунохистохимичен скрининг на ROS1-пренареждания при НДКБК.

Таблица 1. Критерии за ROS1-пренареждания при НДКБК с двойна „break-apart“ проба на FISH.

Показатели	Критерии за позитивност
Брой на клетки	50 клетки при първо броене, 100 клетки за второ
Модели за позитивност	Типично: два разделени 3'- и 5'-сигнала и един слят сигнал Атипична находка: изолиран 3'-сигнал и един слят сигнал
Първа стъпка	
Точкуване на позитивност	25 от 50 клетки
Негативност	По-малко от 5 позитивни клетки
Двусмислен резултат	5-25 позитивни клетки с опция за второ лице, осъществяващо броене
Втора стъпка за двусмислен резултат	≥ 15% позитивни клетки от 100 изследвани

ЛИТЕРАТУРА

- Bergethon K, Shaw AT, Ou SH, et al. ROS1 rearrangements define a unique molecular class of lung cancers. *J Clin Oncol* 2012; 30 (8): 863-870
- Acquaviva J, Wong R, Charest A. The multifaceted roles of the receptor tyrosine kinase ROS in development and cancer. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1795 (1): 37-52
- Davies KD, Doebele RC. Molecular pathways: ROS1 fusion proteins in cancer. *Clin Cancer Res* 2013; 19 (15): 4040-4045
- Kim MH, Shim HS, Kang DR, et al. Clinical and prognostic implications of ALK and ROS1 rearrangements in never-smokers with surgically resected lung adenocarcinoma. *Lung Cancer* 2014; 83 (3): 389-395
- Govindan R, Ding L, Griffith M, et al. Genomic landscape of non-small cell lung cancer in smokers and never-smokers. *Cell* 2012; 150 (6): 1121-1134
- Rikova K, Guo A, Zeng Q, et al. Global survey of phosphotyrosine signaling identifies oncogenic kinases in lung cancer. *Cell* 2007; 131 (6): 1190-1203
- Rimkunas VM, Crosby KE, Li D, et al. Analysis of receptor tyrosine kinase ROS1-positive tumors in non-small cell lung cancer: identification of a FIG-ROS1 fusion. *Clin Cancer Res* 2012; 18 (16): 4449-4457
- Seo JS, Ju YS, Lee WC, et al. The transcriptional landscape and mutational profile of lung adenocarcinoma. *Genome Res* 2012; 22 (11): 2109-2119
- Takeuchi K, Soda M, Togashi Y, et al. RET, ROS1 and ALK fusions in lung cancer. *Nat Med* 2012; 18 (3): 378-381
- Yoshida A, Kohno T, Tsuta K, et al. ROS1-rearranged lung cancer: a clinicopathologic and molecular study of 15 surgical cases. *Am J Surg Pathol* 2013; 37 (4): 554-562
- Jun HJ, Johnson H, Bronson RT, et al. The oncogenic lung cancer fusion kinase CD74-ROS activates a novel invasiveness pathway through E-Syt1 phosphorylation. *Cancer Res* 2012; 72 (15): 3764-3774
- Charest A, Kheifets V, Park J, et al. Oncogenic targeting of an activated tyrosine kinase to the Golgi apparatus in a glioblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100 (3): 916-921
- Felip E, Concha Á, de Castro J, et al. Biomarker testing in advanced non-small-cell lung cancer: National Consensus of the Spanish Society of Pathology and the Spanish Society of Medical Oncology. *Clin Transl Oncol* 2013; 17 (2): 103-112
- Thunnissen E, Bubendorf L, Dietel M, et al. EML4-ALK testing in non-small cell carcinomas of the lung: a review with recommendations. *Virchows Arch* 2012; 461 (3): 245-257
- Gainor JF, Shaw AT. Novel targets in non-small cell lung cancer: ROS1 and RET fusions. *Oncologist* 2013; 18 (7): 865-875
- Mescam-Mancini L, Lantuejoul S, Moro-Sibilot D, et al. On the relevance of a testing algorithm for the detection of ROS1-rearranged lung adenocarcinomas. *Lung Cancer* 2014; 83 (2): 168-173
- Bozzetti C, Nizzoli R, Tiseo M, et al. ALK and ROS1 rearrangements tested by fluorescence in situ hybridization in cytological smears from advanced non-small cell lung cancer patients. *Diagn Cytopathol* 2015; 43 (11): 941-946
- Savic S, Bubendorf L. Role of fluorescence in situ hybridization in lung cancer cytology. *Acta Cytol* 2012; 56 (6): 611-621
- Shan L, Lian F, Guo L, et al. Detection of ROS1 gene rearrangement in lung adenocarcinoma: comparison of IHC, FISH and real-time RT-PCR. *PLoS ONE* 2015; 10 (3): e0120422
- Boyle TA, Masago K, Ellison KE, et al. ROS1 immunohistochemistry among major genotypes of non-small-cell lung cancer. *Clin Lung Cancer* 2015; 16 (2): 106-111
- Cao B, Wei P, Liu Z, et al. Detection of lung adenocarcinoma with ROS1 rearrangement by IHC, FISH, and RT-PCR and analysis of its clinicopathologic features. *Onco Targets Ther* 2016; 9: 131-138

22. Sholl LM, Sun H, Butaney M, et al. ROS1 immunohistochemistry for detection of ROS1-rearranged lung adenocarcinomas. *Am J Surg Pathol* 2013; 37 (9): 1441-1449
23. Yoshida A, Tsuta K, Wakai S, et al. Immunohistochemical detection of ROS1 is useful for identifying ROS1 rearrangements in lung cancers. *Mod Pathol* 2014; 27 (5): 711720
24. Rogers TM, Russell PA, Wright G, et al. Comparison of methods in the detection of ALK and ROS1 rearrangements in lung cancer. *J Thorac Oncol* 2015; 10 (4): 611-618
26. Ribeiro-Silva A, Zhang H, Jeffrey SS. RNA extraction from ten year old formalin-fixed paraffin-embedded breast cancer samples: a comparison of column purification and magnetic bead-based technologies. *BMC Mol Biol* 2007; 8: 118
27. Thermo Fisher Scientific. OncoPrint™ Solid Tumour Fusion Transcript Kit Product Information. Available at: www.thermofisher.com/uk/en/home/clinical/molecular-diagnostics/oncology-diagnostics.html
28. Zheng Z, Liebers M, Zhelyazkova B, et al. Anchored multiplex PCR for targeted next-generation sequencing. *Nat Med* 2014; 20 (12): 1479-1484
29. Swanton C, Govindan R. Clinical implications of genomic discoveries in lung cancer. *N Engl J Med* 2016; 374 (19): 1864-1873
30. Shaw AT, Ou SH, Bang YJ, et al. Crizotinib in ROS1-rearranged non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2014; 371 (21): 1963-1971
31. Mazieres J, Zalcman G, Crino L, et al. Crizotinib therapy for advanced lung adenocarcinoma and a ROS1 rearrangement: results from the EUROS1 cohort. *J Clin Oncol* 2015; 33 (9): 992-999
32. Moro-Sibilot D, Faivre L, Zalcman G, et al. Crizotinib in patients with ROS1 NSCLC. Preliminary results of the AcSé trial. *J Thorac Oncol* 2015; 10 (9): S261-S406
33. Goto K, Yang JCH, Kim D-W, et al. Phase II study of crizotinib in East Asian patients (pts) with ROS1-positive advanced non-small cell lung cancer (NSCLC). *J Clin Oncol* 2016; 34 (15 Suppl.): Abstr. 9022
34. Solomon BJ, Mok T, Kim DW, et al. First-line crizotinib versus chemotherapy in ALK-positive lung cancer. *N Engl J Med* 2014; 371 (23): 2167-2177
35. Shaw AT, Kim DW, Nakagawa K, et al. Crizotinib versus chemotherapy in advanced ALK-positive lung cancer. *N Engl J Med* 2013; 368 (25): 2385-2394
36. Kerr KM, Bubendorf L, Edelman MJ, et al. Second ESMO consensus conference on lung cancer: pathology and molecular biomarkers for non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol* 2014; 25 (9): 1681-1690
37. Lindeman NI, Cagle PT, Beasley MB, et al. College of American Pathologists International Association for the Study of Lung C, Association for Molecular P (2013) 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 (4): 415-453

1.5.6. BRAF-мутации/HER2-мутации/MET-аберации/RET-транслокации

Борис Петров, Савелина Поповска

Молекулярна биология. BRAF е медиатор в сигналния път на RAS, който активира пътя на митоген-активираната протеинкиназа (МАРК). Активиращите BRAF-мутации се намират при 1-3% от недребноклетъчен белодробен карцином (НДКБК) и при пушачи.^{1,2} Локализирани са на позиция V600 в екзон 15 (както при меланом) така и извън този домейн.

HER2 (ERBB2) е рецептор на тирозинкиназа от фамилията на EGFR. Мутациите са по типа на in-frame инсерции или точкови мутации в екзон 20. Тези тумори са обикновено аденокарциноми при непущачи и при жени. Мутации в HER2 се намират при 1-2% от НДКБК.

MET е тирозинкиназен рецептор за хепатоцит-растежния фактор (HGF). Аберациите включват MET-екзон 14 skipping мутация (при 3% от белодробните аденокарциноми и до 20% от белодробните карциноми тип саркоматиден вариант), MET-генна амплификация (при 2-4% при нелекуван НДКБК) и MET с EGFR-комутации (при 5-20% от EGFR-мутиралите тумори, които са придобили резистентност към EGFR-инхибитори).³⁻⁷

По правило RET-генът кодира тирозинкиназен рецептор на клетъчната повърхност, който често е променен при медуларен карцином на щитовидна жлеза. Повтарящи се транслокации между RET и различни фузионни партньори (CCDC6, KIF5B, NCOA4) са идентифицирани при 1-2% от аденокарциномите и се намират по-често при млади пациенти и непущачи.⁸

Аналитични методи за изследване. Мутации в BRAF и HER2 при пациенти с НДКБК са установени чрез PCR или секвениране от ново поколение (NGS).^{9,10} Екзон 14 skipping мутации се намират най-често чрез NGS, докато MET-амплификация може да се установи чрез FISH или някои NGS-панели.^{11,12} RET-транслокациите могат да се установят с break-apart FISH или NGS.

По-голяма част от тези геномни алтерации могат да се търсят в туморна тъкан и чрез течна биопсия в циркулираща туморна ДНК (ctDNA), когато няма тъкан за изследване или за да се търсят механизми на придобита първична или вторична резистентност.

Доказателства за предиктивно значение. Идентификацията на различни специфични активиращи мутации доведе до разработване на прицелни лекарства, които са предпочитано лечение при селектирани пациенти с НДКБК. Например BRAF-инхибиране с перорални нискомолекулни тирозинкиназни инхибитори (ТКИ) (*dabrafenib* в комбинация с MEK-инхибитора *trametinib*) е ефективна стратегия в лечението на авансирал НДКБК с BRAF V600-мутация, първоначално доказана в проучването BR113928 (NCT01336634) със средна продължителност на отговор от 12.6 месеца при претретирани пациенти с НДКБК.¹⁵ В последвало клинично изпитване, този път при нелекувани пациенти с авансирал BRAF V600-мутирал НДКБК, е постигната степен на общ отговор (COO) от 64% (46-79%) и среден контрол над болестта (СКБ) 72% (55-86%). Според независима оценка постигнатата продължителност на отговора е 15.2 месеца (95% CI 7.8-23.5), а средната преживяемост без прогресия (ПБП) е 14.6 месеца (7.0-22.1).¹⁶ От юни 2017 г. комбинацията *dabrafenib* плюс *trametinib* е одобрена от Европейската лекарствена агенция (ЕМА) за лечение на възрастни пациенти с авансирал НДКБК с BRAF V600-мутация.

Други стратегии за пациенти с *BRAF*-мутирала карциноми включват използване на монотерапия с МЕК ТКИ; тя е от особен интерес при някои тумори с *BRAF*-мутация, различна от V600E, които не са показани за лечение с наличните *BRAF*-инхибитори.

Клиничните характеристики и прогнозата на *BRAF*-мутирала белодробни аденокарциноми са илюстрирани в един център при 697 пациенти, диагностицирани между 2009 г. и 2013 г.¹ Преобладават (57%) пациенти с V600E-мутация, като 92% са пушачи, въпреки че мутиралите по-вероятно е да са слаби пушачи или непущачи, сравнени с тези, имащи не-V600-мутации (42% срещу 11%). Между 32 пациенти с ранен стадий (19%) развиват синхронен или метакронен втори първичен белодробен карцином, всеки от които е с мутации в *KRAS*. За тези с авансирал НДКБК прогнозата е значително по-добра при пациенти с V600-мутация в сравнение с не-V600-мутация (преживяемост на трета година – 24% срещу 0%). Шест от 10 пациенти с авансирала болест и V600E-мутация са с частичен отговор към лечение с *BRAF*-инхибитор, трима са със стабилна болест, а средната продължителност на отговор е над 6 месеца.

Поредица от клинични случаи предполагат, че тумори с *HER2*-инсерции често отговарят на *trastuzumab* плюс химиотерапия^{10, 18} или на *afatinib* (*EGFR/HER2* ТКИи).^{10, 19} В поредица от 65 пациенти, получили *ERBB2*-таргетна терапия, СОО е 51%. За получили *trastuzumab* с химиотерапия и за тези на *afatinib* СОО е съотв. 50% и 18%, СКБ е 75% и 64%, а ПБП е съотв. 5.1 и 3.9 месеца.²⁰ Стратегия с пулсова доза на *afatinib* от 280 mg седмично е с добра поносимост, като един от тримата лекувани пациенти е с частичен отговор от 5 месеца, а друг е със стабилна болест за 11 месеца.²¹

В проучване са и други *HER2*-таргетни агенти. Във фаза I проучване са включени петима пациенти с НДКБК с *HER2*-мутации за оценка на отговора на необратимия пан-*HER*-инхибитор *neratinib* и на механизичната цел на *mTOR*-инхибитора *temsirolimus*. Двама са с

частичен отговор за приблизително 4 и 8 месеца, а другите трима са със стабилна болест за 3 до 5 месеца.²² По-големи клинични проучвания са в ход за последваща оценка на ефикасността на тези класове агенти. Няма очевидна връзка между *HER2*-амплификация и *HER2*-мутации, като предхождащи проучвания не демонстрират полза от *trastuzumab* при *HER2*-амплифициран НДКБК, поради което не се препоръчва такова изследване.^{23, 24}


Проучвана е поредица от инхибитори с активност срещу *MET* за три аномалии. Първата е *MET*-екзон 14 skipping мутация, която намалява разграждането на *MET*-протеина, правейки го онкогенен драйвер. *Crizotinib* е мощен *MET*-инхибитор, освен че инхибира *ALK* и *ROS1*. В поредица от 17 пациенти с *MET*-екзон 14 skipping мутации, лекувани с *crizotinib*, 5 са с потвърден отговор и 5 са с непотвърден частичен отговор.²⁵ *Cabozantinib*, който има активност срещу *MET*, е приложен при един пациент и води до стабилна болест за 5 месеца. Друго проучване при пациенти с НДКБК с тази мутация докладва отговор към *capmatinib* – *MET*-инхибиторна молекула в проучване.

Втората аномалия е *MET*-амплификация. Повишена експресия на *MET* може да предскаже отговор към *MET*-таргетни лекарства, но също изглежда да е свързана като цяло с по-лоша прогноза.^{26, 27} Първи проучвания с *crizotinib* при високо селектирана група от 12 пациенти с умерена или висока *MET*-гена амплификация показват отговор при 5 пациенти и стабилна болест при други 5, като ефектът е особено продължителен при пациенти с висока *MET*-амплификация.¹¹ Има налични няколко клинични проучвания с *MET*-инхибитори за *MET*-амплифициран НДКБК.

Трета аномалия е *MET* при налични *EGFR*-мутации. Поради това, че *MET*-амплификацията може да допринесе за придобита резистентност към *EGFR* ТКИи, комбинирането им с *MET*-инхибитори е в клинични проучвания.

Във фаза II проучване на *cabozantinib* при 25 пациенти с *RET*-транслокация води до частичен отговор при 7 (28%) и стабилна болест при 9 (36%) пациенти.^{28,29} При средна проследяемост от 8.9 месеца ПБП е 5.5 месеца, а средната ОП – 9.9 месеца. Публика-

ции докладват и отговор на пациенти с *RET*-транслокации към *vandetanib*, *sunitinib* и *alectinib*.³⁰⁻³³ В ретроспективно проучване на 165 пациенти с *RET*- пренареден НДКБК отговорът към *cabozantinib*, *vandetanib* и *sunitinib* е съотв. 37%, 18% и 22%.³⁴

В	<ul style="list-style-type: none"> ■ При авансирал недребноклетъчен белодробен карцином се препоръчва изследване за <i>BRAF</i> V600-мутации с оглед селекция на пациенти, индицирани за комбинирано лечение с <i>dabrafenib</i> плюс <i>trametinib</i>. ■ За изследване на <i>BRAF</i> V600 се препоръчват PCR или секвениране от ново поколение (NGS) като част от генетичен панел.
С	<ul style="list-style-type: none"> ■ При пациенти с <i>HER2</i>-екзон 20 инсерции, прогресирали на химиотерапия, се предлагат извън индикация <i>HER2</i>-таргетни лекарства – или монотерапия с <i>afatinib</i>, или <i>trastuzumab</i> в комбинация с монокимиотерапия (<i>vinorelbine</i> или <i>docetaxel</i>). Препоръчва се употреба на количествен PCR или секвениране. ■ При пациенти с <i>MET</i>-екзон 14 skipping мутация или <i>MET</i>-амплификация, прогресирали на химиотерапия, се препоръчва извън индикация по-скоро <i>MET</i>-инхибитор (<i>crizotinib</i> или <i>cabozantinib</i>), отколкото монокимиотерапия или имунотерапия. ■ За установяване на <i>MET</i>-екзон 14 skipping мутация се препоръчва метода на генно секвениране, а за <i>MET</i>-амплификация – FISH или секвениране. ■ При пациенти с <i>RET</i>-пренареждания, прогресирали на химиотерапия, вместо монокимиотерапия или имунотерапия, се предлага извън индикация следваща линия с <i>RET</i>-инхибитори (<i>cabozantinib</i>, <i>vandetanib</i> или <i>alectinib</i>). ■ За <i>RET</i>-пренареждания се препоръчват методите break-apart FISH или генно секвениране.
	<ul style="list-style-type: none"> ■ Когато е възможно, на пациентите би трябвало да се предлага участие в контролирани клинични проучвания (NCI-MATCH), включващи подгрупи за повечето геномни промени при недребноклетъчен белодробен карцином. ■ При пациенти без достъп до клинично проучване за таргетна терапия могат да се използват извън индикация някои одобрени лекарства, като последваща линия след прогресия на предхождаща химиотерапия.

ЛИТЕРАТУРА

- Paik PK, Arcila ME, Fara M, et al. Clinical characteristics of patients with lung adenocarcinomas harboring BRAF mutations. *J Clin Oncol* 2011; 29: 2046
- Kinno T, Tsuta K, Shiraishi K, et al. Clinicopathological features of nonsmall cell lung carcinomas with BRAF mutations. *Ann Oncol* 2014; 25: 138
- Planchard D, Besse B, Groen HJ, et al. Dabrafenib plus trametinib in patients with previously treated BRAF(V600E)-mutant metastatic non-small cell lung cancer: an open-label, multicentre phase 2 trial. *Lancet Oncol* 2016; 17: 984
- Planchard D, Besse B, Groen HJM, et al. An open-label phase II trial of dabrafenib (D) in combination with trametinib (T) in patients (pts) with previously treated BRAF V600E-mutant advanced non-small cell lung cancer (NSCLC; BRF113928). *J Clin Oncol* 2016; 34S: ASCO #107
- Sequist LV, Waltman BA, Dias-Santagata D, et al. Genotypic and histological evolution of lung cancers acquiring resistance to EGFR inhibitors. *Sci Transl Med* 2011; 3: 75ra26
- Cappuzzo F, Marchetti A, Skokan M, et al. Increased MET gene copy number negatively affects survival of surgically resected non-small-cell lung cancer patients. *J Clin Oncol* 2009; 27: 1667
- Awad MM, Oxnard GR, Jackman DM, et al. MET exon 14 mutations in non-small-cell lung cancer are associated with advanced age and stage-dependent MET genomic amplification and c-Met overexpression. *J Clin Oncol* 2016; 34: 721
- Kohno T, Ichikawa H, Totoki Y, et al. KIF5B-RET fusions in lung adenocarcinoma. *Nat Med* 2012; 18: 375
- Fehrenbacher L, Spira A, Ballinger M, et al. Atezolizumab versus docetaxel for patients with previously treated non-small-cell lung cancer (POPLAR): a multicentre, open-label, phase 2 randomised controlled trial. *Lancet* 2016; 387: 1837
- Herbst RS, Baas P, Kim DW, et al. Pembrolizumab versus docetaxel for previously treated, PD-L1-positive, advanced non-small-cell lung cancer (KEYNOTE-010): a randomised controlled trial. *Lancet* 2016; 387: 1540
- Liu X, Jia Y, Stoopler MB, et al. Next-generation sequencing of pulmonary sarcomatoid carcinoma reveals high frequency of actionable MET gene mutations. *J Clin Oncol* 2016; 34: 794
- Paik PK, Drilon A, Fan PD, et al. Response to MET inhibitors in patients with stage IV lung adenocarcinomas harboring MET mutations causing exon 14 skipping. *Cancer Discov* 2015; 5: 842
- Litvak AM, Paik PK, Woo KM, et al. Clinical characteristics and course of 63 patients with BRAF mutant lung cancers. *J Thorac Oncol* 2014; 9:1669
- Villaruz LC, Socinski MA, Abberbock S, et al. Clinicopathologic features and outcomes of patients with lung adenocarcinomas harboring BRAF mutations in the Lung Cancer Mutation Consortium. *Cancer* 2015; 121: 448
- Planchard D, Kim TM, Mazieres J, et al. Dabrafenib in patients with BRAF V600-mutant advanced non-small cell lung cancer (NSCLC): A multicenter, open-label, phase II trial (BRF113928). *Ann Oncol* 2014; 25: 1
- Planchard D, Smit EF, Groen JM, et al. Dabrafenib plus trametinib in patients with previously untreated BRAFV600E-mutant metastatic non-small-cell lung cancer: an open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol* 2016; 17 (7): 984-993
- Arcila ME, Chaft JE, Nafa K, et al. Prevalence, clinicopathologic associations, and molecular spectrum of ERBB2 (HER2) tyrosine kinase mutations in lung adenocarcinomas. *Clin Cancer Res* 2012; 18: 4910
- Mazières J, Peters S, Lepage B, et al. Lung cancer that harbors an HER2 mutation: epidemiologic characteristics and therapeutic perspectives. *J Clin Oncol* 2013; 31: 1997
- Cappuzzo F, Bemis L, Varella-Garcia M. HER2 mutation and response to trastuzumab therapy in non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2006; 354: 2619
- De Grève J, Teugels E, Geers C, et al. Clinical activity of afatinib (BIBW 2992) in patients with lung adenocarcinoma with mutations in the kinase domain of HER2/neu. *Lung Cancer* 2012; 76: 123

21. Mazières J, Barlesi F, Filleron T, et al. Lung cancer patients with HER2 mutations treated with chemotherapy and HER2-targeted drugs: results from the European EUHER2 cohort. *Ann Oncol* 2016; 27: 281
22. Costa DB, Jorge SE, Moran JP, et al. Pulse Afatinib for ERBB2 Exon 20 Insertion-Mutated Lung Adenocarcinomas. *J Thorac Oncol* 2016; 11: 918
23. Gandhi L, Bahleda R, Tolaney SM, et al. Phase I study of neratinib in combination with temsirolimus in patients with human epidermal growth factor receptor 2-dependent and other solid tumors. *J Clin Oncol* 2014; 32: 68
24. Camidge DR, Ou SI, Shapiro G, et al. Efficacy and safety of crizotinib in patients with advanced c-MET-amplified non-small cell lung cancer (NSCLC). 2014 ASCO meeting, Abstract 8001
25. Spigel DR, Ervin TJ, Ramlau RA, et al. Randomized phase II trial of Onartuzumab in combination with erlotinib in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2013; 31:4105
26. Drilon AE, Camidge R, Ou S-H I, et al. Efficacy and safety of crizotinib in patients (pts) with advanced MET exon 14-altered non-small cell lung cancer (NSCLC). *J Clin Oncol* 2016; 34S: ASCO #108
27. Wang R, Hu H, Pan Y, et al. RET fusions define a unique molecular and clinicopathologic subtype of non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2012; 30: 4352
28. Mukhopadhyay S, Pennell NA, Ali SM, et al. RET-rearranged lung adenocarcinomas with lymphangitic spread, psammoma bodies, and clinical responses to cabozantinib. *J Thorac Oncol* 2014; 9: 1714
29. Drilon A, Rekhman N, Arcila M, et al. Cabozantinib in patients with advanced RET-rearranged non-small-cell lung cancer: an open-label, single-centre, phase 2, single-arm trial. *Lancet Oncol* 2016; 17: 1653
30. Drilon AE, Sima CS, Somwar R, et al. Phase II study of cabozantinib for patients with advanced RET-rearranged lung cancers. *J Clin Oncol* 2015; (Suppl. 33; Abstr. 8007)
31. Gautschi O, Zander T, Keller FA, et al. A patient with lung adenocarcinoma and RET fusion treated with vandetanib. *J Thorac Oncol* 2013; 8: e43
32. Drilon A, Wang L, Hasanovic A, et al. Response to Cabozantinib in patients with RET fusion-positive lung adenocarcinomas. *Cancer Discov* 2013; 3: 630
33. Falchook GS, Ordóñez NG, Bastida CC, et al. Effect of the RET inhibitor vandetanib in a patient with RET fusion-positive metastatic non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2016; 34: e14135
34. Planchard D, Besse B, Groen HJM, et al. An open-label phase II trial of dabrafenib (D) in combination with trametinib (T) in patients (pts) with previously treated BRAF V600E-mutant advanced non-small cell lung cancer (NSCLC; BRF113928). *J Clin Oncol* 2016; 34 (Suppl; Abstr. 107)

1.5.7. PD-L1-експресия

Милчо Минчев, Светлана Христова

Молекулярна биология. Отдавна се предполага, че малигнените клетки избягват имунната атака чрез поддържане на имunosупресивна среда в туморния обем. Част от тази имunosупресия се дължи на експресия върху туморните клетки на лиганд за рецептора на програмираната смърт (programmed death receptor) PD-1 (CD279). PD-1 регулира клетъчното активиране и терминологично е добил гражданственост като контролна точка (чекпойнт) в Т-лимфоцит-опосредстваната анти туморна атака.¹⁻⁴ По правило PD-1 е експресиран върху повърхността на Т-лимфоцити, В-лимфоцити и моноцити.⁵ PD-L1 и PD-L2 са лиганди за PD-1 и се откриват, освен при туморни, върху клетъчни мембрани в нормални тъкани като сърце, бял дроб и плацента. PD-L1 е 40 kDa тип 1 трансмембранен белтък, играещ основна роля при подтискане на имунната система при бременност, трансплантации, автоимунни и неопластични болести. Свързването на PD-1 към PD-L1 или PD-L2 инхибира Т-клетъчното активиране и подтиска вече активираните Т-клетки.^{6,7} Експресията на PD-L1 от туморни клетки е може би основен механизъм, чрез който те блокират имунната система. Тази експресия може да бъде конститутивна, но може и да се придобива по време на еволюцията на туморните клетки.⁸ Биологично активен е мембранно-свързания PD-L1, а пусков механизъм за експресията му е или фокална (след секреция на гама-интерферон), или конститутивна и дифузна (чрез онкогенен стимул).^{9, 10} По правило PD-L1-експресията при възпалителен процес е компонент от адаптивния имуен отговор и често е свързан с наличие на имуен инфилтрат, докато онкогенно стимулираната експресия може да не е свързана с имунна реакция.^{11, 12} Многобройни смущения в клетъчната сигнализа-

ция се свързват с конститутивната експресия на PD-L1. Например загубата на фосфатаза-тензин хомолог (PTEN) се асоциира с повишена експресия при глиобластом и колоректален карцином.^{12, 13} Увеличената активност на киназата на анапластичния лимфом (ALK), резултираща с повишената експресия на STAT3, води до индукция на PD-L1 и до избягване на имунологичния контрол при лимфоми.¹⁴

Аналитични методи за изследване. Изследването на мембранно експресирана структура върху биопсичен материал се извършва чрез имунохистохимия (ИХХ), но интерпретацията на PD-L1-експресията е затруднена поради множество фактори. Използват се различни моноклонални антитела като 28-8, 5H1, M1H1 и 405.9A11, но липсата на ясно определение за позитивност, вариращо до положително оцветяване на > 1% до > 50% от туморните клетки, както и хетерогенността на PD-L1-експресията в туморна микросреда, представляват проблем.¹⁵ Освен това, ограничените места за свързване на тези антитела върху молекулата на PD-L1, притежаваща само две хидрофилни области, затруднява ИХХ-анализ върху фиксирани с формалин парафинови срезове. Антителата, използвани за ИХХ, и терапевтичните антитела свързват различни области от PD-L1, което представлява бариера за интерпретация на клиничните резултати. По-високата степен на PD-L1-експресията е в граничната зона имунни клетки-тумор (т.нар. туморна интерфаза), в среда богата на гама-интерферон, секретирани от имунните клетки, а това може да се интерпретира като начален защитен отговор срещу успешна туморна лиза от тумор-инфилтриращи лимфоцити чрез свърхекспресия на PD-L1. Това съвпада с кинетиката на PD-1, където началната експресия се свързва с активиране на Т-лимфоцити, а с напредване на времето свърхекспресията е белег на Т-клетъчно изтощаване, вероятно поради експресия на други чекпойнт-молекули като гена на лимфоцитна активация 3 (LAG-3), Т-клетъчен мембранен протеин 3 (TIM-3) и

др.¹⁶ Ето защо прогностичната и предиктивна стойност на PD-L1-експресията се влияе от момента на биопсията (развитие на лезията, проведено дотогава лечение).

За целите на клиничната практика и избора на таргетна имунотерапия ИХХ-определяне на PD-L1-позитивност все още е в процес на стандартизиране. Настоящите препоръки за позитивен тумор включват ИХХ-частична/пълна грануларна мембранна оцветка.^{17, 18} Оценката се извършва върху хистологични срезове от включени в парафин фиброскопски или хирургични тъкани материали. За всеки PD/PD-L1-инхибитор е създадена индивидуална ИХХ-платформа, включваща отделен клон антитяло, оцветителен протокол, самостоятелна система за оценка и дефиниране на позитивност (Табл. 1). Най-често използвани анти-PD-L1-моноклонални антители и диагностични системи/кит са 22C3 pharmDx тест, 28-8 pharmDx, SP142 antibody. Всяка платформа изисква оценка на минимален брой туморни клетки: минимум 50 за SP142 антитяло и ≥ 100 за 28-8 и 22C3 pharmDx assay. Реакцията се представя като мембранна и/или интрацитоплазмена позитивна оцветка в туморната клетъчна популация и в интра-туморните имунокомпетентни (стромни) клетки – лимфоцити и алвеоларни макрофаги, които имат роля на вътрешна контрола. Огромните разходи, свързани с лечението с имунни чекпойнт-инхибитори, както и големите очаквания на лекари и пациенти, изисква определяне на по-малка група от пациенти, където вероятността за успех на терапията е най-голяма. Имунохистохимичното определяне на експресия на PD-L1 е най-добрият, въпреки и не оптимален в момента, биомаркер. Възможно е в бъдеще да се търси оптимална, заедно с PD-L1-експресия, комбинация от биомаркери, като туморна лимфоцитна инфилтрация (TLI), имунни генини сигнали, мутационен товар, които да предскажат нуждата от включване на анти-PD/PD-L1-терапия.

Доказателства за предиктивно значение. Анализът на експресията на PD-L1 като предиктивен биомаркер е правен при недребно клетъчен белодробен карцином (НДКБК). В две от четири публикации, използващи PD-L1-антитяло клон 28–8, се демонстрира предиктивната стойност на PDL1-експресията с оглед терапия с чекпойнт инхибитори. В по-малкото клинично проучване Checkmate 063 24% от позитивните и 14% от негативните пациенти имат обективен отговор на лечение. В клиничното проучване Checkmate 057 за позитивна граница се приема $\geq 5\%$, а това корелира с 34% срещу 14% повлияване съотв. на позитивни срещу негативни пациенти. При Checkmate 017 позитивността за PD-L1 не е прогностичен или предиктивен маркер за благоприятен изход след терапия с чекпойнт-инхибитори при неплюскоклетъчен НДКБК.¹⁹ Проучване СHECKMATE 017, обаче, поради по-малкия брой пациенти в сравнение с СHECKMATE 057, е лимитирано да направи тази разлика и по-задълбочена ревизиране на изпитването предполага не само тенденция към подобрен отговор и обща преживяемост (ОП) за PD-L1-позитивни случаи, но и почти удвояване на броя пациенти в „опашката“ на кривата за преживяемост без прогресия (ПБП) на PD-L1 позитивни, предполагайки вероятност от дългосрочна полза за тях.²⁰ Интересно е, че във всички проучвания значителна част от негативните пациенти се повлияват благоприятно от лечение с *nivolumab*. Въз основа на това Американската Агенция за храни и лекарства (FDA) одобрява *nivolumab* за клинично приложение, без да посочва праг за позитивност на PD-L1 експресия. Съвременните данни сочат, че терапия с чекпойнт-инхибитори е по-успешна, когато е налице висока експресия на PD-L1, изследвана чрез ИХХ.^{20, 21} Три клинични изпитвания (Keynote 001, Keynote 010 и Keynote 024) изследват и проспективно валидират PD-L1 като предиктивен биомаркер за монотерапия на недребно клетъчен белодробен карцином (НДКБК) с *pembrolizumab*, използвайки 22C3 IHC PharmDx съотв. за втора линия при \geq

50% експресия на PD-L1 (аналитично валидирана), втора линия при $\geq 1\%$ експресия на PD-L1 (клинично валидирана) и първа линия при $\geq 50\%$ експресия на PD-L1 (клинично потвърждение).²⁷ В Keynote 001 *pembrolizumab* е с приемлив профил на безопасност и показва антитуморна активност при пациенти с авансирал НДКБД. PD-L1 експресия в поне 50% от туморните клетки се свързва с подобрена ефикасност на *pembrolizumab*.²¹ В Keynote 010 *pembrolizumab* удължава ОП и има по-благоприятен профил риск/полза при PD-L1-позитивни пациенти с предшестващо лечение с платина-базирана химиотерапия. Тези данни налагат *pembrolizumab* като нова терапевтична възможност и валидират селектиране на пациенти според експресията на PD-L1 за тази популация. В проучването проспективно се валидира клиничната полза, базирана на селекция според експресия на PD-L1 $\geq 1\%$ и клиничното представяне на 22C3 Pharm DX като съпътстваща диагностика за *pembrolizumab* при тази гранична стойност (1%).²⁸ В проучване Keynote-024 при паци-

енти с напреднал НДКБД и с PD-L1-експресия в над 50% от туморните клетки приложението на *pembrolizumab* се свързва със значително по-дълга ПБП и по-малко странични ефекти от платина-базирана химиотерапия.²² В резултат на това PD-L1-експресия в над 50% от туморни клетки след оцветяване с 22C3 моноклонално антитяло е приета като предиктивен биомаркер за монотерапия с *pembrolizumab* от първа линия при възрастни без налични *EGFR*-активиращи туморни мутации или *ALK*-пренареждания.

PD-L1 експресия в над 1% от туморни клетки след оцветяване с 22C3 моноклонално антитяло е приета като предиктивен биомаркер за монотерапия с *pembrolizumab* на локално авансирал или метастатичен НДКБД при възрастни, на които е приложена поне една предходна химиотерапевтична схема. Пациенти с активиращи *EGFR*-мутации или *ALK*-пренареждания трябва да са получили таргетна терапия преди лечение с *pembrolizumab*.²³

A

PD-L1-експресия върху туморни клетки при недребноклетъчен белодробен карцином се препоръчва като предиктивен биомаркер за: (1) първа линия монотерапия с *pembrolizumab* при метастатична болест с висока експресия на PD-L1 от туморните клетки (тумор-пропорционален скор (ТПС) $> 50\%$), определен след оцветяване с антитяло 22C3 и липса на експресия на мутирал *EGFR* и на фузионен ген *EML4-ALK*; (2) втора линия монотерапия с *pembrolizumab*, *nivolumab* или *atezolizumab* при локално авансирала или метастатична болест, чиито туморни клетки експресират PD1/PD-L1 (ТПС $> 1\%$), според специфичните диагностични платформи, при прогресия след платина-базирана химиотерапия; при наличие на експресия на мутирал *EGFR* и на фузионен ген *EML4-ALK* пациентите трябва да са получили съответна таргетна терапия.



- При имунохистохимично изследване на бронхоскопски биопсии за оценка на PD/PD-L1 се изискват минимум четири тъканни късчета от туморния обем или минимум 50-100 налични туморни клетки според индивидуалните лекарствени платформи и използвани антитела.
- Имунохистохимичната реакция зависи от начина и продължителността на фиксация, които при бронхиални биопсии трябва да са в 10% неутрален буфериран формалин за период от 6 часа, но не повече от 24 часа.

Таблица 1. PD-L1 имунохистохимична оценка според лекарствената форма и диагностичния тест.²⁴

Лекарство	PD-L1 диагностично антитяло, клон	Диагностична платформа	Критерии за PD-L1-позитивност
<i>Nivolumab</i>	28-8 (rabbit) Agilent Technology/Dako	Link 48 Autostainer Agilent Technology/Dako	≥ 1% туморни клетки
<i>Pembrolizumab</i>	22C3 (mouse) Agilent Technology/Dako	Link 48 Autostainer Agilent Technology/Dako	≥ 50% туморни клетки
<i>Atezolizumab</i>	SP142 (rabbit) Ventana	BenchMark ULTRAVentana	туморни клетки и/или тумор-инфилтриращи имунни клетки
<i>Durvalumab</i>	SP263 (rabbit) Ventana	BenchMark Ventana	≥ 25% туморни клетки
<i>Avelumab</i>	73-10 Agilent Technology/Dako	Dako assay	≥ 1% туморни клетки



- **Имунохистохимичната PD/PD-L1-реакция се оценява по два показателя: интензивност и процент от туморната популация при сравнение с имунокомпетентни клетки – лимфоцити и макрофаги като вътрешна контрола.**
- **Процентът на позитивни туморни клетки се определя на микроскопско увеличение 20x, а интензивността на имунохистохимичната реакция – на увеличение 40x.**
- **При имунохистохимична оценка на PD/PD-L1-позитивност трябва стриктно да се спазват правилата и изискванията, определени за отделните платформи и антитела.**

ЛИТЕРАТУРА

1. Leach DR, MF Krummel, JP Allison. Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade. *Science* 1996; 271 (5256): 1734-1736
2. Hurwitz AA, et al. CTLA-4 blockade synergizes with tumor-derived granulocyte-macrophage colony-stimulating factor for treatment of an experimental mammary carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95 (17): 10067-10071
3. Keir ME, et al. Tissue expression of PD-L1 mediates peripheral T cell tolerance. *J Exp Med* 2006; 203 (4): 883-895
4. Keir ME, et al. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Ann Rev Immunol* 2008; 26: 677-704
5. Bennett F, et al. Program death-1 engagement upon TCR activation has distinct effects on costimulation and cytokine-driven proliferation: attenuation of ICOS, IL-4, and IL-21, but not CD28, IL-7, and IL-15 responses. *J Immunol* 2003; 170 (2): 711-718
6. Latchman Y, et al. PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nat Immunol* 2001; 2 (3): 261-268
7. Keir ME, et al. Tissue expression of PD-L1 mediates peripheral T cell tolerance. *J Exp Med* 2006; 203: 883-895
8. Blank C, TF Gajewski, A Mackensen. Interaction of PD-L1 on tumor cells with PD-1 on tumor-specific T cells as a mechanism of immune evasion: implications for tumor immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother* 2005; 54 (4): 307-314
9. Quezada SA, KS Peggs. Exploiting CTLA-4, PD-1 and PD-L1 to reactivate the host immune response against cancer. *Br J Cancer* 2013; 108 (8): 1560-1565
10. Sharpe AH, et al. The function of programmed cell death 1 and its ligands in regulating autoimmunity and infection. *Nat Immunol* 2007; 8 (3): 239-245
11. Taube JM, et al. Colocalization of inflammatory response with B7-h1 expression in human melanocytic lesions supports an adaptive resistance mechanism of immune escape. *Sci Transl Med* 2012; 4 (127): 127-137
12. Taube JM, et al. Association of PD-1, PD-1 ligands, and other features of the tumor immune microenvironment with response to anti-PD-1 therapy. *Clin Cancer Res* 2014; 20 (19): 5064-5074
13. Parsa AT, et al. Loss of tumor suppressor PTEN function increases B7-H1 expression and immunoresistance in glioma. *Nat Med* 2007; 13 (1): 84-88
14. Marzec M, et al. Oncogenic kinase NPM/ALK induces through STAT3 expression of immunosuppressive protein CD274 (PD-L1, B7-H1). *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105 (52): 20852-20857

15. Dong H, et al. B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion. *Nat Med* 1999; 5 (12): 1365-1369
16. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* 2012; 12: 252-264
17. Passiglia F, et al. PD-L1 expression as predictive biomarker in patients with NSCLC: a pooled analysis. *Oncotarget* 2016; 7 (15): 19738-19747
18. Ilie M, et al. Assessment of the PD-L1 status by immunohistochemistry: challenges and perspectives for therapeutic strategies in lung cancer patients. *Virchows Arch* 2016; 468 (5): 511-525
19. Rizvi NA, et al. Activity and safety of nivolumab, an anti-PD-1 immune checkpoint inhibitor, for patients with advanced, refractory squamous non-small-cell lung cancer (CheckMate 063): a phase 2, single-arm trial. *Lancet Oncol* 2015; 16 (3): 257-265
20. Lim SH, et al. Pembrolizumab for the treatment of non-small cell lung cancer. *Expert Opin Biol Ther* 2016; 16 (3): 397-406
21. Garon EB, et al. Pembrolizumab for the treatment of non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2015; 372 (21): 2018-2028
22. Reck M, et al. Pembrolizumab versus chemotherapy for PD-L1-positive non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2016; 375 (19): 1823-1833
23. EMEA, WC50019099 - Anex 1 Summary of product characterization. Available at: www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/003820/WC500190990.pdf, 2017
24. Tsao MSK, Keith M, et al. IASLC atlas of PD-L1 immunohistochemistry testing in lung cancer. 2017, North Fort Myers, FL: Editorial Rx Press
25. Hirsch FR et al. *JTO* (2017); Volume 12, Issue 2, Pages 208–222
26. Grigg C, Rizvi NA. PD-L1 biomarker testing for NSCLC: truth or fiction? *J Immunother Cancer* 2016; 4: 48
27. Ilie M, Hofman V, Arch V. (2016) 468: 511-525
28. Herbst RS, Baas P, Kim DW, et al. Pembrolizumab versus docetaxel for previously treated, PD-L1-positive, advanced non-small-cell lung cancer (KEYNOTE-010): a randomised controlled trial. *Lancet* 2016; 387 (10027): 1540-1550

1.5.8. Радиомни и радиогеномни анализи и сигнатури

Татяна Хаджиева, Галина Кирова

Радиомика. Изучава количествени и качествени характеристики на образите, събрани през целия онкологичен път на пациента. Тя екстрахира и анализира огромен обем от количествени и морфологични образи по време на диагностика, лечение и проследяване на пациента на компютър-томография (КТ), магнитнорезонансна томография (МРТ) и позитронноемисионна томография с компютър-томография (ПЕТ/КТ). Рационалността и перспективността на метода е в огромния брой образи, получавани в хода на стандартна диагностика, лечение и проследяване. Важно е, че те изобразяват целия тумор, а не само негова част, като при геномен анализ. Може да оцени и туморната строма. Позволява широко лонгитудинално мониториране. При диагноза и определяне на план за лечение (индивидуализирано) поради изобразяване на втъртурмората хетерогенност може да се насочи място на биопсията за диагноза и оценка на лечение. При използване на КТ се прилагат следните стъпки: (i) получаване на образ; (ii) идентифициране на област на интерес с прогностично значение (хабилитат); (iii) сегментиране на обемите (очертаване) и определяне на описателните характеристики на обема; (iv) екстрахирането им, създаване на разграничителни модели с предиктивна стойност, самостоятелно или чрез допълнителна информация като демографски, клинични и геномни данни. По всеки от тези показатели предстои много работа и стандартизиране. Тези характеристики и зони на интерес се променят от лечението и това следва да бъде изучено. На следващ етап се осъществява съпоставяне на тези образи с геномни изследвания, определяно като задача на радиогеномика – създаване на прогностични радиомни сигнатури въз основа на туморната хетерогенност, асоци-

ирана със съпроводена гена експресия. Крайната, но все още много далечна, цел е изграждане на модели за предикция на туморния отговор на различни лечебни методи и по-специално – на лъчелечение (ЛЛ) и прогноза. Счита се, че е настъпило време, когато радиомиката следва да излезе от сферата на бутикови изследвания и да премине в транслационна технология. Известни дружества като American College of Radiology, RSNA, The Society of Nuclear Medicine and Molecular Imaging, International Society of Magnetic Resonance in Medicine и World Molecular Imaging Society продължават да включват в ръководствата си насоки за обработване на количествени образи.

Доказателства за прогностични и предиктивни значения на радиомиката. *Радиомика с КТ.* *Aerts et al.* провеждат първо широко мащабно радиомно проучване върху три кохорти от белодробен карцином (БК) и две групи на тумори на глава и шия с обща бройка около 1000 пациенти. Авторите оценяват прогностичната стойност на 200 показателя, екстрахирани от КТ преди лечение. Намерени са радиомни характеристики, които описват туморната хетерогенност и могат да бъдат полезни при предсказване на преживяемост.¹ Проучват се възможност на радиомиката да прогнозира върху КТ-образи риск от далечни метастази при белодробен аденокарцином. Туморните фенотипни разлики (неправилна форма, инфилтрация, хетерогенност и некрози) могат да бъдат количествено определяни след анализ на огромно количество характеризиращи образите алгоритми. При общо 182 болни (98 пациенти и 84 случая за валидиране) са определени 635 радиомни параметри. Установено е, че 35 радиомни сигнатури имат прогностичен характер за далечни метастази, а 12 – за преживяемост. Всички пациенти са провели дефинитивно ЛЛ, като при 179 има едновременно лъчехимиолечение (ЛХЛ), при 28 – индукционна химиотерапия (ХТ) и при 79 – адювантна ХТ.² Определят се зони на интерес в тумора или негови части (хабилитати), разглеждани като трииз-

мерни образи, оценяват се количествено с определени параметри и се съпоставят с клинични и геномни данни. Целта е да се разработят модели – диагностични, предиктивни и прогностични. При БК са налице категорични данни за туморна хетерогеност на СТ-образите, изразяващи се в спикюли и градиент на ентропия. Grove *et al.* считат тези показатели за надежни прогностични индикатори при ранен БК.³ Проведени са и други изследвания върху недребноклетъчен белодробен карцином (НДКБК), но са използвани различни параметри и друга методология за анализ, така че сравненията са затруднени.^{4,5} Проблемът с туморната хетерогеност е генетична, но тя се изразява в различна стромна архитектура, консумация на кислород, глюкозен метаболизъм, експресия на растежни фактори, така че отделни части на тумора имат различна кръвоснабденост, пермеабилитет на кръвоносните си съдове, клетъчна пролиферация, клетъчна смърт и други биологични характеристики. Наблюдавана е както туморна хетерогеност между индивидите, така и интра туморна хетерогеност в един тумор. Установени са различни показатели на хетерогеност във вид на количество разпределение на параметрите. Създадени са хистограми, изследвани в 200 публикации (PubMed, October 2014), но все още не са валидирани и нямат принос при НДКБК.

Радиомика с ПЕТ/КТ. В литературата съществува един системен анализ на данни до 2010 г.⁶, който е допълнително осъвременен в Швеция⁷. Въпросът е дали прилагането на ПЕТ/КТ в планиране на ЛЛ при НДКБК допринася за повишаване на преживяемостта, качеството на живота, промяна в мишенния обем и целта на ЛЛ. Системният анализ обединява предишния и го допълва до ноември 2015 г. чрез данни от Medline, Embase и Cochrane Library на 37 проучвания, едно рандомизирано фаза II и едно кохортно проучване (общо над 1600 болни). Нито едно от проучвания не докладва обща преживяемост (ОП), преживяемост без прогресия (ПБП) и качество на живот (КнЖ). Оценени са само промени

в мишенния обем в 36% (95% CI: 16-62) и промяната на целта на терапията от радикално в палиативно ЛЛ в 20% (95% CI: 9-39). Единственото рандомизирано проучване на Ung *et al.*⁸ върху 310 болни показва подобрене в двугодишната ОП след планиране чрез ПЕТ/КТ – 53% срещу 41% след планиране само чрез КТ; отчита се промяна в мишенния обем в 43% и промяната на целта на ЛЛ от радикално в палиативно в 22%. Изследването на Socha *et al.* върху 223 болни е кохортно и сравнява с данни от историческа контрола; показва подобрене в тригодишната ОП след планиране чрез ПЕТ/КТ – 33% срещу 19% само чрез КТ.⁹ Общо заключение на системния анализ за ползата от ПЕТ/КТ при планиране на ЛЛ е: две от пет проучвания показват значима промяна в мишенния обем след ПЕТ/КТ и едно от пет проучвания регистрират смяна на целта на ЛЛ от радикално високодозово облъчване към палиативно. Отбелязва се и риск от подобен подход: част от пациентите, предложени на палиативно ЛЛ, имат фалшиво позитивни ПЕТ/КТ-данни и затова се препоръчва хистологична верификация. Използвайки петточкова скала на препоръки¹⁰, системният анализ оценява принос по следния начин: (i) ПЕТ/КТ за планиране може да подобри преживяемостта (2 точки); (ii) вероятно води до промяна на определяне на мишенния обем (3 точки) и (iii) променя целта на ЛЛ от радикално в палиативно (3 точки). Шведските автори считат, че са събрани много обемни данни, които да обосновават защо организации като NCCN, ESTRO, IAEA и Swedish National Board of Health and Welfare препоръчват ПЕТ/КТ за подпомагане при планиране на туморния обем при НДКБК.¹¹⁻¹⁴ Акцентира се, че липсват фаза III рандомизирани проучвания и няма предвидени такива.⁷

Радиогеномика. Използва се за определяне на геномни сигнатури, имащи отношение към лъчечувствителността на тумори и нормални тъкани. Радиомиката трябва да се разграничи от радиогеномиката, която представлява цялостен геномен анализ за определена на генетични причини в разликите в лъчечувствителността на тумор и здрави тъкани.

Молекулярна патология. По правило НДКБК проявява широк спектър от терапевтичен отговор на ЛЛ. При някои пациенти се получава отличен отговор с дълготраен локален туморен контрол (АТК), докато други рецидивират дори след високи дози ЛЛ. Разлики се наблюдават и в лъчевите реакции на нормалните тъкани около тумора (рани и късни), понякога като тежки лъчеви увреждания, а в други случаи – като минимални. Научните дирения са за откриване на методи, идентифициращи хетерогенността на отговора, което се дефинира от персонализираната медицина.

Предиктивни биомаркери за лъчечувствителност/лъчерезистентност на НДКБК. Клетъчни линии от БК, приложени в експериментални проучваният, показва различни фенотипни реакции. В 14 клетъчни линии на НДНБК са установени криви на фракцията на преживяване след облъчване с 2 Gy (т.нар. SF2), показваща по-ниска лъчечувствителност от дребноклетъчен БК (ДКБК).¹⁵ За съжаление, клиничното приложение е затруднено заради разлики и взаимодействие с фактори на средата и промяна в сигналните пътища. Проведени са широк спектър проучвания на генетични и епигенетични алтерации, включващи мутации в последователността на ДНК, промени в ДНК-копия, промени в miRNA, в протеиновата експресия, както и промени в туморната среда (ангиогенеза), разкриваща потенциални детерминанти и сигнални пътища за прогресия и туморегенеза на БК. Проучване показва, че туморната експресия на ERCC1 (фактор в репарационната система на ДНК) е предиктор на преживяемост при пациенти, лекувани с комбинация от платина и ЛЛ.^{16, 17} Мутации в EGFR, като делеция в екзон 19 или мутация в екзон 21 (L858R), също се изследват в посока на лъчечувствителност.^{17, 18} Установена е повишена лъчечувствителност, свързана с промяна на мутантния EGFR, което затруднява взаимодействието на ДНК-зависимата протеинкиназа (DNA-ПК), ключов фактор при възстановяване на двойноверижни разкъсвания, причинени от ЛЛ. Така клетъчни линии от НДКБК, носещи

мутирал домейн на тирозинкиназа в EGFR, са няколко пъти по-лъчечувствителни в сравнение с тумори, носещи “див” тип EGFR.¹⁸ *In vitro* проучване показва, че ЛЛ, комбинирано с инхибитори на VEGF- и EGF-рецептори, повишава антитуморния ефект.¹⁸ Друго проучване показва, че прилагане на EGFR-инхибитор *erlotinib* повишава лъчевата чувствителност при тумор с “див” тип EGFR.¹⁹ Малки проучвания показват, че АХЛ с *erlotinib* увеличава многократно фистулите на хранопровода и тези проучвания са прекратени. Предвижда се *erlotinib* да се прилага като индукционна терапия, а не заедно.¹⁹


Torres-Roca et al. се опитват да изработят радиационен класификатор, предсказващ лъчечувствителност на клетъчни линии чрез предсказване на стойности на фракция на преживяване след 2 Gy при SF2 22 от 35 клетъчни линии. Идентифицирани са три нови гена (RbAp48, RGS10 и R5PIA), чиято експресия корелира с лъчечувствителност. За съжаление, изводите са разнопосочни.²⁰ Друго направление на изследване е установяване на влияние на родоначалните клетки на тумора върху лъчечувствителността. Изследват се с голяма амбиция и mRNA-сигнатури и се очаква в следващите три-пет години секвенирането от ново поколение (NGS) да предложи приложими в практиката биомаркери за целия тумор.²¹

Предиктивни биомаркери за лъчечувствителност на здрави тъкани под риск. За БК основни тъкани под риск са белият дроб и сърцето. Създадена е голяма база-данни за установяване на полиморфизъм на гени (*XRCC1*, *XRCC2*, *XRCC3*, *XRCC4*, *XRCC5*), свързани с лъчеви реакции по механизъм на затрудняване на ДНК-репарация след лъчеви промени.²²⁻²⁴ Осемнадесет гена са свързани с лъчерезистентност, но само три са валидирани – MDM2, Livin α и TP54I3.²⁴ Данни за НДКБК показват, че полиморфизъм на XRCC1 rs25487 (G > A) може да повлияе върху лъчечувствителността на нормален

бял дроб и спомага за развитие на *степен 2* радиационен пневмонит. За съжаление, противоречиви са резултатите за склоност към пулмонит при пациенти с друг SNPs XRCC2 rs3218536 (G > A).²²⁻²⁴ Търсят се различни комбинация от показатели. Комбинация от съотношение > 1 на TGF- β и средна доза в белия дроб > 20 Gy категоризират болните в три рискови категории: без риск за пулмонит (< 5%), умерен риск (50%) и висок риск (66%).²⁴ При 164 болни с НДКБК са потърсени SNPs в ген *TGF- β* ; установено е, че CT/CC генотиповете rs1982073:T869C TGF β 1-алели имат нисък риск за радиационен пневмонит, независимо от дозиметричните ограничения за средна доза на белия дроб V20. Предлага се това да се изследва преди ЛЛ и да насочва към персонализирано ЛЛ.²⁴

Токсичността на сърцето също е свързана с ЛЛ, но досега описаните по-горе биомаркери не са тествани за това. В ранни фази на рандомизирани проучвания се обмисля едновременно хиперфракционирано ЛХЛ с *erlotinib* (NCT00983307) и ZD1839 (NCT00328562). Предвид данни за повишена токсичност с езофагиални фистули¹⁹ дизайнът им е променен, като таргетната терапия се прилага индукционно. Всички тези изследвания са на предклинично ниво и върху експериментални клетъчни линии *in vitro* с различни показатели, от които най-надеждна е връзката между *EGFR* и ЛЧ. Това следва да бъде потвърдено в ретроспективни изследвания и в проспективни рандомизирани проучвания.

В	Препоръчва се използване на ПЕТ/КТ като помощно средство към планираща компютър-томография за прецизиране на клиничен мишенен обем при лъчелечение.
С	Засега не съществуват валидирани радиогеномни сигнали, оценяващи фенотипен лъчев отговор на тумор и нормални тъкани.

	Липсват доказателства за съчетание на клинична интерпретация, терапевтични прогнози и предсказания на лъчева чувствителност на тумор или здрави тъкани около него. Създават се въпросници, които да уеднаквят показателите за фенотипна оценка.
---	---

ЛИТЕРАТУРА

1. Aerts HJWL, et al. Decoding tumour phenotype by noninvasive imaging using a quantitative radiomics approach. *Nat Commun* 2014; 5. doi: 10.1038/ncomms5006 open access.
2. Coroller TP, Grossmann P, Hou Y, et al. CT-based radiomic signature predicts distant metastasis in lung adenocarcinoma. *Radiother Oncol* 2015;114(3): 345-350
3. Grove O, Berglund AE, Schabath MB, et al. Quantitative computed tomographic descriptors associate tumor shape complexity and intratumor heterogeneity with prognosis in lung adenocarcinoma. *PLoS ONE* 2015; 10 (3)
4. Ganeshan B, Panayiotou E, Burnand K, Dizdarevic S, Miles K. Tumour heterogeneity in non-small cell lung carcinoma assessed by CT texture analysis: a potential marker of survival. *Eur Radiol* 2012; 22: 796-802

5. Fried DV, Tucker SL, Zhou S, et al. Prognostic Value and reproducibility of pretreatment CT texture features in stage III non-small cell lung cancer. *Int J Radiat Oncol* 2014; 90 (4): 834-842
6. Ung YC, Bezjak A, Coakley N, Evans WK. Positron emission tomography with 18fluorodeoxyglucose in radiation treatment planning for non-small cell lung cancer: A systematic review. *J Thorac Oncol* 2011; 6 (1): 86-97
7. Hallqvist A, et al. Positron emission tomography and computed tomographic imaging prior to radiotherapy for lung cancer. Göteborg: Västra Götalandsregionen, Sahlgrenska Universitetssjukhuset, HTAcentrum; 2016. Regional activity-based HTA 2016:88
8. Ung YC, Gu C, Cline K, et al. An Ontario clinical oncology (COGO) randomized trial (PET START) of FDG PET/CT in Stage 3 non-small cell lung cancer (NSCLC): Impact of PET on survival. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2011; 81 (2 Suppl. 1): S137
9. Socha J, Kolodziejczyk M, Kepka L. Outcome after PET-CT based radiotherapy for non-small cell lung cancer. Wyniki radioterapii planowanej na podstawie badania PET-CT u chorych na niedrobnokomorkowego raka płuca. *Pneumonol Alergol Pol* 2013; 81 (1): 30-39
10. Atkins D, Best D, Briss PA, et al. GRADE Working Group. Grading quality of evidence and strength of recommendations. *BMJ* 2004; 328 (7454): 1490-1494
11. European Organisation for Research and Treatment of Cancer (EORTC): FDG-PET is recommended in the process of target delineation (de Ruyscher 2010)
12. National comprehensive cancer network (NCCN): PET/CT significantly improves target accuracy, should be obtained preferably within four weeks before treatment and ideally in the treatment position. Available at: www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/nscl.pdf
13. International atomic energy agency (IAEA): A combined PET/CT acquisition is now the standard method of acquiring FDG-PET images for the purposes of baseline staging and for radiotherapy treatment planning (RTP) (Konert 2015)
14. Swedish national board of health and welfare: PET/CT is recommended (level 3, where level 10 is the lowest level of recommendation) for planning of radiotherapy in the curative setting (NSCLC stage III). Available at: www.socialstyrelsen.se/nationellariklinjerforlungcancervard
15. Carmichael J, Degraff WG, Gamson J. Radiation sensitivity of human lung cancer cell lines. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1989;25(3): 527-534
16. Hwang IG, Ahn MJ, Park BB. ERCC1 expression as a prognostic marker in N2(+) nonsmall-cell lung cancer patients treated with platinum-based neoadjuvant concurrent chemoradiotherapy. *Cancer* 2008; 113(6): 1379-1386
17. Fujii T, Toyooka S, Ichimura K. ERCC1 protein expression predicts the response of cisplatin based neoadjuvant chemotherapy in non-small-cell lung cancer. *Lung Cancer* 2008; 59 (3): 377-384
18. Shibuya K, Komaki R, Shintani T. Targeted therapy against VEGFR and EGFR with ZD6474 enhances the therapeutic efficacy of irradiation in an orthotopic model of human non-small-cell lung cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2007; 69 (5): 1534-4153
19. Chinnaiyan P, Huang S, Vallabhaneni G. Mechanisms of enhanced radiation response following epidermal growth factor receptor signaling inhibition by erlotinib (Tarceva). *Cancer Res* 2005; 65 (8): 3328-3335
20. Torres-Roca JF, Eschrich S, Zhao H. Prediction of radiation sensitivity using a gene expression classifier. *Cancer Res* 2005; 65 (16): 7169-7176
21. Arechaga-Ocampo E, Villegas-Sepulveda N, Lopez-Urrutia E, et al. (2013). Biomarkers in lung cancer: Integration with radiogenomics data oncogenomics and cancer proteomics - novel approaches in biomarkers discovery and therapeutic targets in cancer, Dr. Cesar Lopez (Ed.), ISBN: 978-953-51-1041-5, InTech. doi: 10.5772/53426
22. Li T, Kung HJ, Mack PC, et al. Genotyping and genomic profiling of non small- cell lung cancer: implications for current and future therapies. *J Clin Oncol* 2013; 31: 1039-1049
23. Zhao L, Wang L, Ji W, et al. Elevation of plasma TGF-beta1 during radiation therapy predicts radiation-induced lung toxicity in patients with non-small cell lung cancer: a combined analysis from Beijing and Michigan. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2009; 74: 1385-1390
24. Yuan X, Liao Z, Liu Z, et al. Single nucleotide polymorphism at rs11982073: T869C of the TGFbeta1 gene is associated with the risk of radiation pneumonitis in patients with non-small-cell lung cancer treated with definitive radiotherapy. *J Clin Oncol* 2009; 27: 3370-3378

1.6. ПРЕДИКТИВНИ БИОМАРКЕРИ ПРИ ДРЕБНОКАЛЕТЪЧЕН БЕЛОДРОБЕН КАРЦИНОМ

1.6.1. PD-L1-експресия

Милчо Минчев

Молекулярна биология. Отдавна се предполага, че малигнените клетки избягват имунната атака чрез поддържане на имunosупресивна среда в туморния обем. Част от тази имunosупресия се дължи на експресия върху туморните клетки на лиганд за рецептора на програмираната смърт (programmed death receptor) PD-1 (CD279). PD-1 регулира клетъчното активиране и терминологично е добил гражданственост като контролна точка (чекпойнт) в Т-лимфоцит-опосредстваната антитуморна атака.¹⁻⁴ По правило PD-1 е експресиран върху повърхността на Т-лимфоцити, В-лимфоцити и моноцити.⁵ PD-L1 и PD-L2 са лиганди за PD-1 и се откриват, освен при туморни, върху клетъчни мембрани в нормални тъкани като сърце, бял дроб и плацента. PD-L1 е 40 kDa тип 1 трансмембранен белтък, играещ основна роля при подтискане на имунната система при бременност, трансплантации, автоимунни и неопластични болести. Свързването на PD-1 към PD-L1 или PD-L2 инхибира Т-клетъчното активиране и подтиска вече активираните Т-клетки.⁶ Експресията на PD-L1 от туморни клетки е може би основен механизъм, чрез който те блокират имунната система. Тази експресия може да бъде конститутивна, но може и да се придобива по време на еволюцията на туморните клетки.⁸ Биологично активен е мембранно-свързаният PD-L1, а пусков механизъм за експресията му е или фокална (след секрция на гама-интерферон), или конститутивна и дифузна (чрез онкогенен стимул).⁹ По правило PD-L1-експресията при възпалителен процес е компонент от адаптивния имунен отговор и често е свързан с наличие на имунен инфилтрат, докато онкогенно

стимулираната експресия може да не е свързана с имунна реакция.^{11, 12} Многобройни смущения в клетъчната сигнализация се свързват с конститутивната експресия на PD-L1. Например загубата на фосфатаза-тензин хомолог (PTEN) се асоциира с повишена експресия при глиобластом и колоректален карцином.^{12, 13} Увеличената активност на киназата на анапластичния лимфом (ALK), резултираща с повишената експресия на STAT3, води до индукция на PD-L1 и до избягване на имунологичния контрол при лимфоми.¹⁴

Аналитични методи за изследване. Изследването на мембранно-експресирана структура върху биопичен материал се извършва чрез имунохистохимия (ИХХ), но интерпретацията на PD-L1-експресията е затруднена поради множество фактори. Използват се различни моноклонални антитела като 28-8, 5H1, M1H1 и 405.9A11, но липсата на ясно определение за позитивност, вариращо до положително оцветяване на > 1% до > 50% от туморните клетки, както и хетерогенността на PD-L1-експресията в туморна микросреда, представляват проблем.¹⁵ Освен това, ограничените места за свързване на тези антитела върху молекулата на PD-L1, притежаваща само две хидрофилни области, затруднява ИХХ-анализ върху фиксирани с формалин парафинови срезове. Антителата, използвани за ИХХ, и терапевтичните антитела свързват различни области от PD-L1, което представлява бариера за интерпретация на клиничните резултати. По-високата степен на PD-L1-експресията е в граничната зона имунни клетки – тумор (т.нар. туморна интерфаза), в среда богата на гама-интерферон, секретирани от имунните клетки, а това може да се интерпретира като начален защитен отговор срещу успешна туморна лиза от тумор-инфилтриращи лимфоцити чрез свърхекспресия на PD-L1. Това съпада с кинетиката на PD-1, където началната експресия се свързва с активиране на Т-лимфоцити, а с напредване на времето свърхекспресията е белег на Т-клетъчно изтощаване, вероятно поради експресия на други чекпойнт-молекули като

гена на лимфоцитна активация 3 (LAG-3), Т-клетъчен мембранен протеин 3 (TIM-3) и др.¹⁶ Ето защо прогностичната и предиктивна стойност на PD-L1-експресията се влияе от момента на биопсията (развитие на лезията, проведено до тогава лечение).

За целите на клиничната практика и избора на таргетна имунотерапия ИХХ-определяне на PD-L1-позитивност все още е в процес на стандартизиране. Настоящите препоръки за позитивен тумор включват ИХХ-частична/пълна грануларна мембранна оцветка.^{17, 18} Оценката се извършва върху хистологични срезове от включени в парафин фиброскопски или хирургични тъканни материали. За всеки PD-1/PD-L1-инхибитор е създадена индивидуална ИХХ-платформа, включваща отделен клон антитяло, оцветителен протокол, самостоятелна система за оценка и дефиниране на позитивност (виж *Раздел 1.5.7., Табл. 1*). Най-често използвани анти-PD-L1-моноклонални антители и диагностични системи/кит са 22C3 pharmDx тест, 28-8 pharmDx, SP142 antibody. Всяка платформа изисква оценка на минимален брой туморни клетки: минимум 50 за SP142 антитяло и ≥ 100 за 28-8 и 22C3 pharmDx assay. Реакцията се представя като мембранна и/или интрацитоплазмена позитивна оцветка в туморната клетъчна популация и в интратуморните имунокомпетентни (стромни) клетки – лимфоцити и алвеоларни макрофаги, които имат роля на вътрешна контрола. Огромните разходи, свързани с лечението с имунни чекпойнт-инхибитори, както и големите очаквания на лекари и пациенти, изисква определяне на по-малка група от пациенти, където вероятността за успех на терапията е най-голяма. Имунохистохимичното определяне на експресия на PD-L1 е най-добрият, въпреки и не оптимален в момента, биомаркер. Възможно е в бъдеще да се търси оптимална, заедно с PD-L1-експресия, комбинация от биомаркери, като туморна лимфоцитна инфилтрация (TLI), имунни гени сигнатури, мутационен товар, които да предскажат нуждата от включване на анти-PD-1/PD-L1-терапия.

Доказателства за предиктивно значение. Прогностичната и предиктивна стойност на PD-L1-експресията варира според момента на вземане на биопсия (проведено дотогава лечение, развитие на лезията). От друга страна, при липса на Т-клетки в биопсичен материал, за които се предполага да са ефектори в антитуморната атака, е трудно да се предположи, че чекпойнт-инхибитори ще имат ефект, дори и при PD-L1-позитивни тумори. Оказва се обаче, че и пациенти с PD-L1-отрицателни тумори отговарят на анти-PD-1- или анти-PD-L1-лечение, ако се приложи подходящ агент, водещ до инфилтриране на туморите с Т-лимфоцити. Това се потвърждава при комбинирано приложение на *nivolumab* (анти-PD-1) с *ipilimumab* (анти-CTLA-4) и то най-вече при пациенти с начални PD-L1-отрицателни тумори.¹⁹⁻²¹ Съществува и друг сценарий, при който пациенти с PD-L1-негативни тумори отговарят на лечение с чекпойнт-инхибитори поради фалшиво отрицателни резултати от имунохистохимичен тест. Освен това, значението на PD-L1-отрицателни тумори ще бъде различно в случаите, при които съществува генетичен дефект, в резултат на който липсва експресия на лиганда. В този случай комбинираното лечение, описано по-горе, не би довело до Т-клетъчна инфилтрация и в тези случаи трябва да се търсят други чекпойнт-механизми, чрез които туморните клетки избягват имунологичната атака.^{22, 23} На този фон е правен анализ на експресия на PD-L1 като предиктивен маркер при дребноклетъчен белодробен карцином (ДКБК) с оглед възможното лечение с чекпойнт-инхибитори. Клинични проучвания показват, че анти-PD-L1- (*nivolumab*), анти-PD-1- (*pembrolizumab*) и анти-CTLA-4- (*ipilimumab*) антители показват терапевтична активност при ДКБК. В клинично проучване CheckMate 032 монотерапия с *nivolumab* е сравнена с комбинирано лечение с *nivolumab* и *ipilimumab*²⁴; отговор на лечението се наблюдава при 18% от пациентите (пълна ремисия – 0, частична ремисия – 18% при *nivolumab* и пълна ре-

мисия – 2.2%, частична ремисия – 16% при комбинация *nivolumab/ipilimumab*); общата преживяемост (ОП) съотв. е 4.4 срещу 8.2 месеца. В клинично проучване Keynote-028 всички пациенти са PD-L1-позитивни (праг на експресия – 1%, определен чрез ИХХ); частичен отговор след приложение на *pembrolizumab* се наблюдава при 29% от пациентите. Тези резултати са обещаващи и в момента текат други клинични проучвания

на монотерапия с *pembrolizumab* (NCT02359019; NCT02402920). Мястото на PD-L1 за определяне на вид на лечение, обаче, е все още неясен поради наличие на положителен отговор при някои негативни пациенти. Огромните разходи, свързани с това лечение, както и големите очаквания на лекари и пациенти, може да наложат определяне на селектирана група, където вероятността за терапевтичен успех е най-голяма.

C

При дребноклетъчен белодробен карцином PD-L1 не е предиктивен маркер за лечение с чекпоинт-инхибитори и не се препоръчва изследване му, освен в условия на клинично проучване.



При дребноклетъчен белодробен карцином терапевтичен отговор при приложение на чекпоинт-инхибитори може да бъде постигнат както при PD-L1-експресия, така и при липса на такава.

ЛИТЕРАТУРА

1. Leach DR, MF Krummel, JP Allison. Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade. *Science* 1996; 271 (5256): 1734-1736
2. Hurwitz AA, et al. CTLA-4 blockade synergizes with tumor-derived granulocyte-macrophage colony-stimulating factor for treatment of an experimental mammary carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95 (17): 10067-10071
3. Keir ME, et al. Tissue expression of PD-L1 mediates peripheral T cell tolerance. *J Exp Med* 2006; 203 (4): 883-895
4. Keir ME, et al. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol* 2008; 26: 677-704
5. Bennett, F, et al. Program death-1 engagement upon TCR activation has distinct effects on costimulation and cytokine-driven proliferation: attenuation of ICOS, IL-4, and IL-21, but not CD28, IL-7, and IL-15 responses. *J Immunol* 2003; 170 (2): 711-718
6. Latchman Y, et al. PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nat Immunol* 2001; 2 (3): 261-268
7. Keir ME, et al. Tissue expression of PD-L1 mediates peripheral T cell tolerance. *J Exp Med* 2006; 203: 883-895
8. Blank C, TF Gajewski, A Mackensen. Interaction of PD-L1 on tumor cells with PD-1 on tumor-specific T cells as a mechanism of immune evasion: implications for tumor immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother* 2005; 54 (4): 307-314
9. Quezada SA, KS Peggs. Exploiting CTLA-4, PD-1 and PD-L1 to reactivate the host immune response against cancer. *Br J Cancer* 2013; 108 (8): 1560-1565

10. Sharpe AH, et al. The function of programmed cell death 1 and its ligands in regulating autoimmunity and infection. *Nat Immunol* 2007; 8 (3): 239-245
11. Taube JM, et al. Colocalization of inflammatory response with B7-h1 expression in human melanocytic lesions supports an adaptive resistance mechanism of immune escape. *Sci Transl Med* 2012; 4 (127): 127-137
12. Taube JM, et al. Association of PD-1, PD-1 ligands, and other features of the tumor immune microenvironment with response to anti-PD-1 therapy. *Clin Cancer Res* 2014; 20 (19): 5064-5074
13. Parsa AT, et al. Loss of tumor suppressor PTEN function increases B7-H1 expression and immunoresistance in glioma. *Nat Med* 2007; 13 (1): 84-88
14. Marzec M, et al. Oncogenic kinase NPM/ALK induces through STAT3 expression of immunosuppressive protein CD274 (PD-L1, B7-H1). *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105 (52): 20852-20857
15. Dong H, et al. B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion. *Nat Med* 1999; 5 (12): 1365-1369
16. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* 2012; 12: 252-264
17. Passiglia F, et al. PD-L1 expression as predictive biomarker in patients with NSCLC: a pooled analysis. *Oncotarget* 2016; 7 (15): 19738-19747
18. Ilie M, et al. Assessment of the PD-L1 status by immunohistochemistry: challenges and perspectives for therapeutic strategies in lung cancer patients. *Virchows Arch* 2016; 468 (5): 511-525
19. Wolchok J, et al. Nivolumab plus ipilimumab in advanced melanoma. *N Engl J Med* 2013; 369: 122-133
20. Larkin J, FS Hodi, JD Wolchok. Combined nivolumab and ipilimumab or monotherapy in untreated melanoma. *N Engl J Med* 2015; 373 (13): 1270-1271
21. Postow MA, et al. Nivolumab and ipilimumab versus ipilimumab in untreated melanoma. *N Engl J Med* 2015; 372(21): 2006-2017
22. Snyder A, et al. Genetic basis for clinical response to CTLA-4 blockade in melanoma. *N Engl J Med* 2014; 371 (23): 2189-2199
23. Zaretsky JM, et al. Mutations associated with acquired resistance to PD-1 blockade in melanoma. *N Engl J Med* 2016; 375 (9): 819-829
24. Antonia SJ, et al. Nivolumab alone and nivolumab plus ipilimumab in recurrent small-cell lung cancer (CheckMate 032): a multicentre, open-label, phase 1/2 trial. *Lancet Oncol* 2016; 17 (7): 883-895

1.7. ПРЕДИКТИВНИ БИОМАРКЕРИ ПРИ АДЕНОКАРЦИНОМ НА СТОМАХ И ГАСТРОЕЗОФАГАЛНА ВРЪЗКА

1.7.1. HER2-статус

Светлана Христова, Иван Иванов, Савелина Поповска

Молекулярна биология. Генът, кодиращ рецептора за човешки епидермален растежен фактор тип 2 (HER2, ERBB2), е протоонкоген, локализиран на дългото рамо на 17 хромозома (17q12). Неговата амплификация при карцином на стомах и хранопровод засяга най-често locus 17q12-q21 и е свързана с повишени нива на HER2-мембранни рецептори. Фосфорилирането на HER2-рецепторите води до висока клетъчна пролиферация, диференциация, устойчивост на апоптозни стимули и неоваскуларизация.^{1, 2} Според отделни серийни проучвания при карциноми на стомах (КС) и гастроезофагеалната връзка (КГЕВ) честотата на HER2-гена амплификация и свръхекспресия на мембранный рецептор се доказва в много широк интервал – между 4.4% до 53.4%, с превес при КГЕВ. При КС варира според хистологичния вариант, преобладащо при интестинален тип и умерено диференциран аденокарцином (G2).^{2-4, 6}

Понастоящем липсва консенсус за прогностичната роля на HER2 при КС и КГЕВ. Според резултати от единични проучвания при нелекувани пациенти с КС HER2-статусът не е свързан с изход на болестта.^{4, 5} Повечето проучвания обаче приемат прогностично значение на HER2. В литературата преобладават данни, че при КС и КГЕВ наличието на амплификация на HER2-гена и свръхекспресия на рецептора е неблагоприятен фактор, свързан с понижена обща преживяемост (ОП).²⁻⁷

Аналитични методи за изследване. Основен диагностичен метод е имунохистохимична (ИХХ) верификация и определяне на нивата на мембранный рецептор. За разлика от карцим на гърда, при КС и КГЕВ HER2-експресията се представя с много по-изразена хетерогенност и различен тип ИХХ-реакция. Диагностичният протокол за оценка с ИХХ/*in situ* хибридизация (ISH) е създаден в 2007-2008 г. след тестване в лабораторията по молекулярна патология TARGOS, Касел, Германия, от *M. Hofmann, J Rüschoff et al.* Протоколът е адаптиран за индивидуална оценка върху материали от хирургична резекция и фиброскопски биопсии.³ Препоръчва се от ASCO/CAP и се прилага във всички лаборатории, извършващи определяне на HER2 при КС и КГЕВ (Табл. 1).³⁻⁵ С доказана диагностична ИХХ-ефективност са HercepTest и HER2-антитела клонове 4B5, A0485, SP3 и CB11.⁶ Според стандарта на NCCN при HER2 ИХХ-оценка 2+ се изисква допълнителна верификация чрез FISH или друг ISH-метод.² По данни от литературата ISH+ (амплификация на HER2-гена) се установява в 30-50% от тумори с HER2+ статус.⁶ За FISH-позитивност се приема HER2:CEP17 съотношение ≥ 2 (Табл.2).^{2, 3} В началното системно проучване ToGA е установен висок процент (94%) на съпадение между позитивните оценки: ИХХ HER2 3+/ISH+, което се потвърждава от множество последващи студии. Разликите между ИХХ- и ISH-оценки варират в две посоки – ИХХ(0-1+)/ISH(+) и ИХХ(3+)/ISH(-).^{1, 6-8} Методите, валидирани за ISH диагностика, са: Ventana HER2 DNAprobe (BDISH; RocheTissue Diagnostics), Ventana HER2 DualISHDNA ProbeCocktail и HER2 FISHpharmDx kit (Dako).^{4, 9} При избор на лечение с *trastuzumab* водещо и основно значение има ИХХ-изследване тъй като 3+ HER2-мембранна експресия е таргетният онкопротеин и не е в зависимост от ISH-доказване на амплификация/полизомия на *HER2*-гена.⁶ По правило ИХХ HER2-статусът може да се определя върху биопсии или хирургични материали. При ендоскопски биопсии се

изисква изследване на минимум 5-6 до 8 материала от туморния обем, за да бъде направена оценка на интратуморната хетерогенност.⁶⁻⁸ Изисква се стриктно спазване на стандартните процедури за вземане на материал и неговата фиксация. Времето на студена исхемия трябва да бъде минимално, особено при малки по обем биопсии, които изсъхват бързо. Фиксацията трябва да се извършва в 10% неутрален буферизиран формалин за период от минимум 8 часа, максимум – 48 часа.⁹ Препоръчва се преди въвеждане на рутинно изследване на HER2 всяка диагностична лаборатория да проведе сравнителен контролен тест, включващ 25 до 50 паралелни IXX/ISH проби. Съпадението на резултатите между двата метода трябва да надхвърля 90%.¹⁰

При КС е установена изразена интратуморна хетерогенност както и вариации в HER2-експресия според хистологичните класификационни варианти: при интестинален тип – до 50%, при дифузен и смесен тип – до 25% от случаите. Подобни разлики се наблюдават и според използвания метод – до 80% за IXX и около 25-50% за ISH.⁹⁻¹¹ В контекста на хетерогенността изследването на повече от един тъканен материал (биопсичен блок) може да редуцира фалшиво негативните случаи с близо 10%. Преценката е в зависимост от морфологичната туморна характеристика и трябва да бъде индивидуална при всеки пациент. При аденокарциноми избраният парафинов блок да съдържа понискодиференцирания карциномен компонент. По правило HER2-статусът в първичен тумор и в метастатични огнища може да се различава, което изисква повторна оценка върху биопсирани метастази.⁹

Доказателства за предиктивно значение. Прицелното лечение на пациенти с HER2-позитивен КС е насочено към инактивиране на ErbB2-рецепторите за растежни фактори. Може да се осъществи чрез рекомбинантни антитела, въздействащи вър-

ху екстрацелуларните части на рецептора, или посредством малки молекули, т.нар. тирозинкиназни инхибитори, въздействащи върху вътреклетъчни тирозинкиназен рецепторен домейн.¹² Въз основа на рандомизирано мултицентрично контролирано проучване в 122 центъра от 24 държави (ToGA) от 2010 г. се въвежда изискване за IXX- и/или ISH-определяне на HER2 като предиктивен биомаркер за избор на лечение с *trastuzumab* при авансирал аденокарцином на стомах и ГЕВ. При пациенти с HER2-позитивни тумори, лекувани с конвенционална терапия в комбинация с *trastuzumab*, е наблюдавана повишена обща преживяемост (ОП) и преживяемост без прогресия (ПБП), сравнено със самостоятелна химиотерапия.¹³ Проучване на приложение на тирозинкиназния инхибитор *lapatinib* при HER2-позитивен КС и КГЕВ (LOGiC) показва противоречиви резултати и не демонстрира статистически значимо повишаване на ОП при приложение на *lapatinib* плюс химиотерапия спрямо химиотерапия. При допълнителни анализи обаче са установени субгрупи, при които е налична сигнификантна разлика в ОП (при азиатци и пациенти на възраст < 60 години). Друго изследване, сравняващо ефекта на *lapatinib* в комбинация с *paclitaxel* (като втора линия) спрямо *paclitaxel* при КС с амплификация на HER2-ген по FISH, показва несигнификантно повишаване на ОП при комбинирана терапия. Разширен анализ установява сигнификантно повишена ОП при пациенти, получили комбинация *lapatinib* плюс *paclitaxel* спрямо *paclitaxel* в група с IXX HER2-позитивен (HER2 3+) КС.¹⁴ Според препоръките на Европейската асоциация по медицинска онкология (ESMO) наличието на протеинова свръхекспресия, установена посредством IXX-метод и/или амплификация на HER2-гена, установена чрез *in situ* хибридизационен метод, се използва за подбор на пациенти с метастатичен КС и КГЕВ, подходящи за лечение с терапевтична схема, съдържаща *trastuzumab*.^{15,16}

A

- Имунохистохимична верификация на HER2-рецепторен статус при авансирал аденокарцином на стомах и гастроезофагеална връзка се препоръчва при обсъждане на таргетно лечение с *trastuzumab*.
- При HER2 2+ имунохистохимична оценка се препоръчва допълнително изследване чрез *in situ* хибридизационен метод (CISH, SISH, FISH).
- При оценка на HER2-статус при аденокарцином на стомах и гастроезофагеална връзка посредством имунохистохимия/*in situ* хибридизация е препоръчително да се използва метода на *Rüschhoff/Hofmann*.



- Оценка на HER2-статус с имунохистохимия/*in situ* хибридизация върху гастроскопски материали трябва да се извършва върху оптимален туморен обем, включващ минимум шест късчета щипкови биопсии от туморна формация.
- Фиброскопските биопсии трябва да се поставят във фиксиращ разтвор максимум до един час с оглед редукция на т.нар. „студен“ исхемичен период, водещ до белтъчна деструкция.
- За целите на диагностика с имунохистохимия фиброскопските и хирургичните биопсични материали трябва да се фиксират в 10% неутрален буферизиран формалин за период съотв. от 6-8 часа и 12-78 часа.
- Неспазването на правилата за фиксация и преданалитична обработка на тъканни материали може да бъде причина за неадекватна имунохистохимична/*in situ* хибридизационна оценка на изследваните биопсии.
- За анализ с имунохистохимия/*in situ* хибридизация се избират тъканни клетъчни блокове с оптимален туморен обем и полета с по-ниска степен на диференциация.
- При карциноми с хетерогенна морфологична структура може да се изследва повече от един парафинов блок.
- Трябва да се избягва интерпретация на имунохистохимично изследване на материали, съдържащи фокуси на интестинална метаплазия и кръш-феномен.
- Интерпретацията на имунохистохимичната реакция (оцветяване) трябва да се извършва в контекста на тъканни контроли (контролни стъкла).
- При *in situ* хибридизационни изследвания налични ниски нива на амплификация или полизомия на CEP17 следва да се отбелязват в биопсичния отговор.

Таблица 1. Имунохистохимична оценка на HER2-експресия при аденокарцином на стомах и гастроезофагеална връзка за избор на лечение с trastuzumab.^{3,5,11}

HER2 IXX-оценка	Върху хирургични биопсии оценката се базира на % позитивни туморни клетки	Върху ендоскопски биопсии не се изисква определане на % позитивни туморни клетки	Обща оценка в клиничен аспект
0	Липсва мембранна реакция/или реакция в < 10% от туморни клетки	Липсва мембранна реакция	ИХХ HER2-негативен тумор
1+	Фина или частична мембранна реакция в ≥ 10% от туморни клетки	Фина или частична мембранна реакция в кохезивни туморни клетки < 5 в група	ИХХ HER2-негативен тумор
2+	Слаба до умерена базолатерална/латерална или пълна мембранна реакция в > 10% от туморни клетки	Слаба до умерена базолатерална/латерална мембранна реакция в кохезивни туморни клетки ≥ 5 в група	Изисква се контролно изследване чрез ISH-метод (CISH, SISH, FISH)
3+	Силна по интезитет базолатерална/латерална или пълна мембранна реакция в ≤ 10% от туморни клетки	Силна по интезитет базолатерална/латерална мембранна реакция в кохезивни туморни клетки ≥ 5 в група	HER2-позитивен аденокарцином

Таблица 2. Отчитане и интерпретация на HER2 ISH-статус при карцином на стомах и гастроезофагеална връзка (адаптирано по J. Ruschoff и сътр.).¹¹

In situ хибридизационен метод за оценка (FISH, SISH/dual ISH)	
Негативен статус	Съотношение на HER2:центромер на хромозома 17 < 2.0%, отчетено в 20 кохезивни туморни клетки, показващи най-голям брой генни копия. При < 4 броя на генни копия се приема негативен статус.
	Съотношение на HER2:центромер на хромозома 17 – 1.8-2.2%, отчетено в 20 кохезивни туморни клетки, показващи най-голям брой генни копия. Изброяват се нови 20 клетки, след което се взема решение за оценка позивитеност/негативност на HER2-амплификация/полизомия.
Позитивен статус	Съотношение на HER2:хромозома 17 ≥ 2.0, отчетено в 20 кохезивни туморни клетки, показващи най-голям брой генни копия. При > 6 броя на генни копия се приема позитивен статус.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bartley AN, Christ J, Fitzgibbons PL, et al. Template for reporting results of HER2 (ERBB2) bio-marker testing of specimens from patients with adenocarcinoma of the stomach or esophagogastric junction. *Arch Pathol Lab Med* 2015; 139: 618-620
2. Sheffield BS, Garratt J, Kaloger SE, et al. HER2/neu testing in gastric cancer by immunohistochemistry. Assessment of interlaboratory variation. *Arch Pathol Lab Med* 2014; 138: 1495-1502
3. Abrahao-Machado LF, Scapulatempo-Neto C. HER2 testing in gastric cancer: An update. *World J Gastroenterol* 2016; 22 (19): 4619-4625
4. Van Cutsem E, Bang Y-J, Feng-yi F, et al. HER2 screening data from ToGA: targeting HER2 in gastric and gastroesophageal junction cancer. *Gastric Cancer* 2015; 18: 476-484
5. Press MF, Ellis CE, Gagnon RC, et al. HER2 status in advanced or metastatic gastric, esophageal, or gastroesophageal adenocarcinoma for entry to the TRIO-013/LOGIC trial of Lapatinib. *Mol Cancer Ther* 2017; 16 (1): 228-238
6. Bartley AN, Washington MK, Colasacco C, et al. HER2 testing and clinical decision making in gastroesophageal adenocarcinoma: guideline from the college of american pathologists, American Society for Clinical Pathology, and the American Society of Clinical Oncology. *J Clin Oncol* 2017; 35 (4): 446-464
7. Ajani JA, D'Amico TA, Almhanna K, et al: NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN-Guidelines). Gastric Cancer, v 3, 2015
8. Behrens HM, Warneke VS, Boger C, et al. Reproducibility of Her2/neu scoring in gastric cancer and assessment of the 10% cut-off rule. *Cancer Med* 2015; 4: 235-244
9. Grillo F, Fassan M, Sarocchi F, et al. HER2 heterogeneity in gastric/gastroesophageal cancers: From benchside to practice. *World J Gastroenterol* 2016; 22 (26): 5879-5887
10. Ruschoff J, Hanna W, Bilous M, et al. HER2 testing in gastric cancer: a practical approach. *Modern Pathol* 2012; 25: 637-650
11. Wada R, Hirabayashi K, Ohike N, Morii E. New guidelines for HER2 pathological diagnostics in gastric cancer. *Pathol International* 2016; 66: 57-62
12. Dokmanovic M, Wu WJ. Trastuzumab-induced HER2 phosphorylation: exploring the mechanisms and implications. *Receptor Clin Invest* 2014; 1: e340. doi: 10.14800/rci.340.
13. Bang Y-J, Van Cutsem E, Feyereislova A. Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): a phase 3, open-label, randomised controlled trial. *Lancet* 2010; 376 (9742): 687-697
14. Kim C, Mulder K, Spratlin J. How prognostic and predictive biomarkers are transforming our understanding and management of advanced gastric cancer. *Oncologist* 2014; 19: 1046-1055
15. Smyth EC, Verheij M, Allum W, et al. Gastric cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2016; 27 (Suppl. 5): v38-v49
16. Lordick F, Mariette C, Haustermans K, et al. Oesophageal cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2016; 27 (Suppl. 5): v50-v57

1.7.2. MSI

Светлана Христова, Борис Петров

Молекулярна биология. Понастоящем са идентифицирани четири ключови гена, отговорни за корекция на „грешки“ при ДНК-репарация: *mutL* homologue (*MLH1*), *mutS* homologue 2 (*MSH2*), *mutS* homologue 6 (*MSH6*) и *postmeiotic segregation increased 2* (*PMS2*), които кодират комплекс от протеини (MMR).¹ Погрешна репликация/възстановяване на ДНК поради мутации в репаративни гени води до инсерция или делеция на нуклеотиди, нарушена функцията на регулаторни протеини (dMMR) и се проявява фенотипно като микросателитна нестабилност (MSI). При стомашен карцином (СК) MSI се наблюдава предимно при наследствена предиспозиция в контекста на синдром на *Lynch* и по-рядко при спорадичен карцином, с обща честота 25-50%.² При около 12-15% от СК високите нива на MSI (MSI-H-фенотип) се определят от мутации в *MLH1*- и *MSH2*-гени, а в над 50% от случаите са свързани с епигенетична хиперметилация и инактивация на *MLH1*-промотора.³⁻⁵ Стомашен карцином с dMMR/MSI формира отделен подтип и като такъв се развива по различни сигнални пътища. По правило MSI при СК е свързан с предходни мутации в множество гени, имащи значение за dMMR: *TGFβRII*, *IGF1R*, *TCF4*, *RIZ*, *BAX*, *CASPASE5*, *FAS*, *BCL10* и *APAF1*, участващи в регулацията на клетъчния цикъл и апоптоза, и *MSH6*, *MSH3*, *MED1*, *RAD50*, *BLM*, *ATR* и *MRE11*, отговорни за поддържане на геномната цялост и стабилност. Алтерация в тези гени е предпоставка за развитие на MSI и малигнен фенотип.^{6,7}

Молекулярно-биологичните характеристики на MSI при СК по отношение на предиктивно и прогностично значение все още са в процес на проучване. Според метаанализ на *L Zhu et al.* честотата на високи нива на MSI-H варира между 8.2% до 37% и е в зави-

симост от броя на изследваните случаи.⁸ Статистически значими резултати са получени в три ретроспективни проучвания, показващи, че СК с MSI-H е по-чест при възрастни пациенти, жени, дистална анатомична локализация, предимно високо диференцирани аденокарциноми от интестинален тип по *Lauren* според СЗО класификация, с повърхностна инвазия, тенденция за нисък нодален метастатичен потенциал, ранен pTNM и клиничен стадий.¹⁰⁻¹⁴ Значението на MSI при СК не е напълно дефинирано и изисква допълнителна верификация и оценка на асоциация с прогноза и лечение.^{8, 12, 13}

Аналитични методи за изследване. Настоящият препоръчителен метод за диагностика на MMR/MSI е имунохистохимична (ИХХ) верификация на таргетни протеини. Стандартната методология е валидирана за колоректален карцином. Включва ИХХ-доказване на MMR/MSI посредством четири антитела, свързващи се с *MSH2*, *MLH1*, и хетеродимери *MSH6* и *PMS2*. Според индивидуалната ИХХ позитивна/негативна туморна експресия се определят нивата на MSI: висока (MSI-H) – при позитивност за ≥ 2 маркера, ниска – при позитивност за един маркер (MSI-L) или стабилна (MSS) – при липса на позитивна реакция. Тумори с ИХХ MSI-H статус се класифицират като MSI-позитивни, а тези с MSI-L и MSS – негативни.^{11,15} По правило *MLH1* формира хетеродимерен комплекс с *PMS2*. Липсваща експресия само на *PMS2* е индикация за дефект в *PMS2*-гена. Комбинация от *PMS2*- и *MLH1*-негативност предполага инактивация на *MLH1*, който регулира стабилността на *PMS2*. Подобно е съотношението и при *MSH6/MSH2*: загуба само на *MSH6* е белег за дефект в *MSH6*, докато липса на експресия и на двата протеина отговаря на инактивация на *MSH2*.^{1, 3} Антигенните таргети за диагностичните антитела при ИХХ-определяне на MMR/MSI/MSS са частично зависими от начина на фиксация, което изисква оценката да се извършва върху оптимално фиксирани туморни биопсии и адекватни хистологични срезове. Недобре фиксирани,

централно локализираните полета от туморния обем се изключват. Като вътрешна позитивна тъканна контрола се използва позитивна реакция в нормален епител, пери/интратуморни лимфоцити или стромни клетки (фибробласти), показващи силна ядрена имунопозитивност за всички четири MMR-протеини.¹⁶ Хетерогеност, намалена оцветителна интензивност или интрацитоплазматична реакция могат да бъдат свързани с експресия на т.нар. „отрязан“ белтък с намалена стабилност, неравномерна фиксация и обработката на туморната тъкан или проведено неоадювантно лъчехимиолечение.^{1,17,18}

Доказателства за предиктивно значение. Повечето публикувани данни за значението на dMMR/MSI в канцерогенеза, прогноза и предиктивност са при колоректален

карцином. Относно предиктивна стойност на MSI при 5-FU-базирана химиотерапия данните от настоящите проучвания са противоречиви и все още не е определен алгоритъм за адювантно химиолечение на СК с прояви на MSI-H.^{10, 11, 14} През май 2017 г. FDA одобрява приложение на PD-1-чекпойнт-инхибитора *pembrolizumab* като втора линия терапия на рецидивирал/авансирал КС и КГЕВ с MSI-H статус. Резултатите от фаза II клинично проучване Keynote-059 при неколоректален гастроинтестинален карцином, вкл. СК, показват пълен отговор при 25% от пациентите, частичен – в 24% и стабилна болест – в 49% за период на проследяване от 5.3 месеца. Последна статистическа оценка на резултатите от проучването при тумори с MSI-H показват, че средният терапевтичен отговор е 57.1% (n = 7), сравнено с 9% при MSI-негативни (n = 167).²¹⁻²⁴

В

Препоръчва се имунохистохимично изследване за високи нива на микросателитна нестабилност (MSI-H) при избор на втора линия лечение с *pembrolizumab* при авансирал аденокарцином на стомах и гастроезофагеална връзка.



- *Имунохистохимичният метод за dMMR/MSI е бърз, относително лесен и достъпен индиректен анализ за определяне в клиничната практика на експресия на MLH1-, MSH2-, MSH6- и PMS2-антигенни протеини.*
- *Имунохистохимичното установяване на MSI-H при стомашен карцином е с позитивно прогностично значение и корелира с ранен клиничен стадий (I-II), по-дълга преживяемост без болест и е по-често наблюдавана при интестинален хистологичен вариант.*
- *Интерпретацията на имунохистохимичната оценка трябва да се извършва само при налична позитивна вътрешна реакция в ядра на стромни, възпалителни клетки или нормален (нетуморен) епител.*
- *При имунохистохимично установена MSI-позитивна ядрена експресия в туморни клетки се приема като нормална експресия (MSS) при налична позитивна вътрешна контрола.*



- При имунохистохимично установена MSI-негативна ядрена реакция в туморните клетки се приема като негативна при налична позитивна вътрешна контрола.
- Като задължителна външна имунохистохимична контрола се използват тъкани от тонзила или апендикс при позитивност в лимфни инфилтрати и фоликули.

ЛИТЕРАТУРА

1. Richman S. Deficient mismatch repair: Read all about it (Review). *Int J Oncol* 2015; 47 (4): 1189-1202
2. Ottini S, Falchetti M, Lupi R, et al. Patterns of genomic instability in gastric cancer: clinical implications and perspectives. *Ann Oncol* 2006; 17 (Suppl. 7): vii97-vii102
3. Wu MS, Lee CW, Shun CT, et al. Distinct clinicopathologic and genetic profiles in sporadic gastric cancer with different mutator phenotypes. *Genes Chromosomes and Cancer* 2000; 27 (4): 403-411
4. Bacani J, Zwingerman R, Di Nicola N, et al. Tumormicrosatellite instability in early onset gastric cancer. *J Molec Diagn* 2005; 7 (4): 465-477
5. Hudler P. Genetic aspects of gastric cancer Instability. *Sci World J* 2012; article ID 761909; doi: 10.1100/2012/761909
6. Iacopetta BJ, Soong R, House AK, Hamelin R. Gastric carcinomas with microsatellite instability: clinical features and mutations to the TGF- β type II receptor, IGFII receptor, and BAX genes. *J Pathol* 1999; 187 (4): 428-432
7. Nobili S, Bruno L, Landini I, et al. Genomic and genetic alterations influence the progression of gastric cancer. *World J Gastroenterology* 2011; 17 (3): 290-299
8. Zhu L, Li Z, Wang Y, Zhang C, et al. Microsatellite instability and survival in gastric cancer: A systematic review and meta-analysis. *Mol Clin Oncol* 2015; 3: 699-705
9. Hayden JD, Cawkwell L, Quirke P, et al. Prognostic significance of microsatellite instability in patients with gastric carcinoma. *Eur J Cancer* 1997; 33: 2342-2346
10. Beghelli S, de Manzoni G, Barbi S, et al. Microsatellite instability in gastric cancer is associated with better prognosis in only stage II cancers. *Surgery* 2006; 39 (1): 347-356
11. An C, Choi IS, Yao JC, et al. Prognostic significance of CpG island methylator phenotype and microsatellite instability in gastric carcinoma. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 656-663
12. Corso G, Pedrazzani C, Marrelli D, et al. Correlation of microsatellite instability at multiple loci with long-term survival in advanced gastric carcinoma. *Arch Surg* 2009; 144: 722-727
13. Lee HS, Choi SI, Lee HK, et al. Distinct clinical features and outcomes of gastric cancers with microsatellite instability. *Mod Pathol* 2002; 15: 632-640
14. Fadhil W, Ilyas M. Immunostaining for mismatch repair (MMR) protein expression in colorectal cancer is better and easier to interpret when performed on diagnostic biopsies. *Histopathol* 2012; 60: 653-655
15. Arends M, Ibrahim M, Happerfield L, et al. Interpretation of immunohistochemical analysis of mismatch repair (MMR) protein expression in tissue sections for investigation of suspected Lynch/hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC) syndrome. *UK NEQAS ICC & ISH*, 2008
16. Bao F, Panarelli NC, Rennert H, et al. Neoadjuvant therapy induces loss of MSH6 expression in colorectal carcinoma. *Am J Surg Pathol* 2010; 34: 1798-1804
17. Riquelme I, Saavedra K, Espinoza JA, et al. Molecular classification of gastric cancer: towards a pathway-driven targeted therapy. *Oncotarget* 2015; 6 (28): 24750-24779

18. Le DT, Uram JN, Wang H, et al. PD-1 blockade in mismatch repair deficient non-colorectal gastrointestinal cancers. *J Clin Oncol* 2016; 34 (Suppl. 4S); Abstr 195
19. Fuchs CS, Doi T, Jang RW-J, et al. KEYNOTE-059 cohort 1: Efficacy and safety of pembrolizumab (pembro) monotherapy in patients with previously treated advanced gastric cancer. *J Clin Oncol* 2017; 35 (Suppl.): Abstr. 4003
20. Broderick JM. Pembrolizumab granted priority review from FDA for MSI-H cancer. Available at: www.targetedonc.org

1.8. ПРЕДИКТИВНИ БИОМАРКЕРИ ПРИ ПАНКРЕАСЕН АДЕНОКАРЦИНОМ

1.8.1. SPARC-експресия

Драга Тончева, Мариела Василева

Молекулярна биология. SPARC е тумор-супресорен ген. Той кодира протеин SPARC (Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine), известен и като протеин 40 на базалната мембрана (BM) или остеоонектин (ON). SPARC представлява екстрацелуларен, матрикс-асоцииран гликопротеин (ECM), който играе роля за минерализация на кости. Той има четири домейна: (1) Ca⁺⁺ свързващ район, (2) район, богат на цистеин, (3) хидрофобен и (4) EF-мотив, свързващ Ca(2+) с голям афинитет.¹ Известни са три транскрипционни варианти, които кодират различни изоформи на остеоонектин. Секретира се от остеообласти, свързва калций и мед, иницира минерализация и образуване на кристали. Остеонектин супресира тумори, но корелира с метастазирание, тъй като повишава синтеза и активността на матрикс-металопротеиназите (MMP-7) и играе важна роля за инвазия на ракови клетки в костите.²⁻⁶ Има значение за ангиогенеза, клетъчна адхезия, пролиферация и миграция на ракови клетки. Свърхекспресираният остеоонектин се среща при карцином на гърда, простатен и колоректален карцином. SPARC играе значима роля в процесите на малигнизация: моделиране на ECM и туморна микросреда (TME), антиадхезивно действие и регулация на апоптоза, туморен растеж, миграция и инвазия, активиране на TGF β , регулация на Notch1/STAT3- и p53/p21Cip1/Waf1-пътя и повишаване на отговора към химиотерапия.

Аналитични методи за изследване. Експресията на SPARC в стромални фибробласти и туморен епител се определя чрез имунохистохимично оцветяване (ИХХ) с ON1-1 анти-SPARC-моноклонални антитела (Invitrogen). Експресията на SPARC се отчита като

висока при $\geq 50\%$ оцветени фибробласти или ниска – при $< 50\%$. Експресията на SPARC в стромални фибробласти и в туморен епител е негативна (0), ниска (< 100) или висока (≥ 100). Експресията на SPARC в плазма се определя чрез ELISA.

Доказателства за предиктивно значение. Панкреасният дуктален аденокарцином (ПАК) е гастроинтестинален тумор с най-лоша прогноза и петгодишната преживяемост е под 5%. Предиктивното значение на SPARC-експресия е проучено от много автори.^{8,9} В едно проучване, сравняващо експресия на SPARC в клетки от нормален панкреас, първичен ПАК и клетки от метастатични лимфни възли, авторите установяват, че SPARC се експресира изключително в клетки на туморна строма и нивото ѝ корелира с прогнозата.¹⁰ Друго проучване изследва с ИХХ туморна и перитуморна експресия на SPARC при 299 пациенти с първичен ПАК; установява се, че пациенти, при които фибробластите в стромата на тумора експресират SPARC, имат значимо по-лоша прогноза от пациенти, при които такава не се наблюдава. В допълнение, експресията на SPARC в самите ракови клетки не се свързва с прогнозата.¹¹ Експресията на SPARC от стромални клетки е най-вероятната причина за дезмопластична реакция и слаба васкуларизация на стромата, дължаща се на инхибиране на VEGF. От друга страна, едно проспективно проучване изследва нивото на експресия на SPARC при 134 пациенти и асоциацията му с други клинично-патологични параметри и преживяемостта; експресията на SPARC в строма не показва асоциация с преживяемостта. Цитоплазмена експресия на SPARC се установява при 55% от туморите. Експресията в първичния тумор корелира значително с по-кратка преживяемост без болест (ПББ) и обща преживяемост (ОП). При пациенти с *gemcitabine*-базирана химиотерапия цитоплазмената експресия на SPARC е негативен прогностичен фактор.¹² Един метаанализ от 2016 г. обобщава резултати от 1623 пациенти от 10 налични проучвания и показва, че SPARC-експресията е негативен прогностичен фактор, особено в туморна строма. Резултатите не успяват да оценят асоциацията на SPARC с ПББ.¹³

Цитостатикът *nab-paclitaxel* (*Abraxane*) представлява ново поколение *paclitaxel*, свързан с албумин. SPARC има основно значение за свързване на *nab-paclitaxel* на определени места в тумора, като играе роля на рецептор за албумина и по този начин натрупва комплекс между албумин и *paclitaxel* в места, богати на SPARC. Първоначално приложението на *nab-paclitaxel* при АКП се обосновава с взаимодействието му с SPARC, което причинява т.нар. феномен на колапс на стромата – стромата намалява, което доближава туморните клетки една до друга и до кръвоносните съдове и по този начин подобрява достъпа на лекарства до тях.¹⁴

Проведени са няколко фаза I/II проучвания, оценяващи ролята на SPARC като мишена за действие на *nab-paclitaxel*, докато стартира първото фаза III проучване (MPACT) при 861 пациенти с метастатичен дуктален ПАК, разномозирани да получат *nab-paclitaxel* – 125 mg/m² и *gemcitabine* – 1000 mg/m² в дни 1, 8 и 15 на всеки 4 седмици, или само *gemcitabine* – 1000 mg/m² седмично за 7 седмици (първи цикъл), след това на ден 1, 8 и 15 на всеки 4 седмици. Резултатите показват по-добра ОП и ПББ в групата, получаваща комбинация.¹⁵ Нивата на SPARC-експресия са измерени в туморна строма при 256 па-

циенти, в туморна епителна тъкан – при 301 и в плазма – при 343 пациенти. Пробите от туморна строма са от метастази или първичен тумор. Проучването не установява зависимост между ниво на SPARC-експресия в строма с ОП или с по-добър терапевтичен отговор нито в групата на комбинирана терапия на *nab-paclitaxel* и *gemcitabine*, нито в групата на самостоятелен *gemcitabine*.¹⁶ През 2017 г. е публикуван метаанализ, оценяващ ефекта на комбинация от *nab-paclitaxel* и *gemcitabine* при пациенти от различни групи; повечето проучвания изследват значението ѝ като първа линия при метастатичен ПАК. Резултатите показват, че прилагането на комбинацията е ефективен модел на лечение. Понастоящем NCCN и ESMO препоръчват комбинация от *nab-P/gem* като стандартно лечение при метастатичен АКП, независимо от ниво на SPARC -експресия.¹⁷ Следваща стъпка е да се определи най-подходящ агент или комбинация от агенти, с които да се прилага *nab-paclitaxel*. Изследванията в предклинични модели предполагат, че специфичен синергичен ефект може да съществува между *nab-paclitaxel* и *gemcitabine*. Остава без отговор въпросът за комбиниране на *nab-paclitaxel* с *5-fluorouracil* или платина. Разработвани са и други агенти, насочени срещу туморната строма.¹⁸

C

- При аденокарцином на панкреас може да се препоръча изследване за експресия на SPARC като прогностичен биомаркер за по-голяма агресивност на тумора.
- Препоръчва се експресията на SPARC в стромални фибробласти и туморен епител да се определя чрез имунохистохимия.



Експресионни нива на SPARC не следва да се изследват за определяне на прогноза и терапия при карцином на панкреас, освен за целите на клинични проучвания.

ЛИТЕРАТУРА

- Villarreal XC, Mann KG, Long GL. Structure of human osteonectin based upon analysis of cDNA and genomic sequences. *Biochemistry* 1989; 28 (15): 6483-6491
- Zi-Yi Chen, Jun-Ling Zhang, Hong-Xin Yao, et al. Aberrant methylation of the SPARC gene promoter and its clinical implication in gastric cancer. *Scientific Reports* 2014; 4: 7035. doi:10.1038/srep07035
- Ledda MF, et al. Suppression of SPARC expression by antisense RNA abrogates the tumorigenicity of human melanoma cells. *Nat Med* 1997; 3: 171-176
- LaneTF, Sage EH. The biology of SPARC, a protein that modulates cellmatrix interactions. *FASEB J* 1994; 8: 163-173
- Socha MJ, et al. Aberrant promoter methylation of SPARC in ovarian cancer. *Neoplasia* 2009; 11: 126-135
- Mok SC, et al. SPARC, an extracellular matrix protein with tumor-suppressing activity in human ovarian epithelial cells. *Oncogene* 1996; 12: 1895-1901
- Nagaraju GP, Dontula R, El-Rayes BF, Lakka SS. Molecular mechanisms underlying the divergent roles of SPARC in human carcinogenesis. *Carcinogenesis* 2014; 35 (5): 967-973
- Zi-Yi Chen, Jun-Ling Zhang, Hong-Xin Yao, et al. Aberrant methylation of the SPARC gene promoter and its clinical implication in gastric cancer. *Sci Rep* 2014; 4: 7035. doi: 10.1038/srep07035
- Wei Han, Fang Cao, Min-bin Chen, et al. Prognostic value of SPARC in patients with pancreatic cancer: A systematic review and meta-analysis. *PLoS ONE* 2016; doi:10.1371/journal.pone.0145803
- Gundewar C, A Sasor, Hilmersson K., et al. The role of SPARC expression in pancreatic cancer progression and patient survival. *Scand J Gastroenterol* 2015; 50 (9): 1170-1174
- Guweidhi A, J Kleeff, H Adwan, et al. Osteonectin influences growth and invasion of pancreatic cancer cells. *Ann Surg* 2005; 242 (2): 224-234
- Ormanns S, M Haas, S Baechmann, et al. Impact of SPARC expression on outcome in patients with advanced pancreatic cancer not receiving nab-paclitaxel: a pooled analysis from prospective clinical and translational trials. *British J Cancer* 2016; 115:1520-1529
- Han W, F Cao, M Chen. Prognostic value of SPARC in patients with pancreatic cancer: A systematic review and meta-analysis. *PLoS ONE* 2016; 11 (1): e0145803
- Garber K. Stromal depletion goes on trial in pancreatic cancer. *J Nat Canc Instit* 2010; 102 (7): 448-450
- Hoff V, Ervin D, Arena T, et al. Randomized phase III study of weekly nab-paclitaxel plus gemcitabine versus gemcitabine alone in patients with metastatic adenocarcinoma of the pancreas (MPACT). *J Clin Oncol* 2012; 30 (Suppl. 34), Abstr. LBA148
- Hidalgo M, Plaza C, Musteanu M, et al. SPARC Expression Did Not Predict Efficacy of nab-Paclitaxel plus Gemcitabine or Gemcitabine Alone for Metastatic Pancreatic Cancer in an Exploratory Analysis of the Phase III MPACT Trial. *Clin Cancer Res* 2015; 21 (21): 4811-4818
- Kim G, et al. Nab-Paclitaxel for the treatment of pancreatic cancer. *Cancer Manag Res* 2017; 9: 85-96
- Caparello C, Meijer L, Garajova I, et al. FOLFIRINOX and translational studies: Towards personalized therapy in pancreatic cancer. *World J Gastroenterol* 2016; 22 (31): 6987-7005

1.9. ПРЕДИКТИВНИ БИОМАРКЕРИ ПРИ КОЛОРЕКТАЛЕН КАРЦИНОМ

1.9.1. MSI/MMR

Радка Кънева, Борис Петров, Светлана Христова

Молекулярна биология. Системата за поправка на неправилно сдвоени бази на ДНК (Mismatch Repair, MMR) е механизъм за възстановяване на ДНК-последователността след настъпване на грешки от типа “неправилно сдвояване на бази” при процеса на ДНК-репликация, рекомбинация или увреждания.^{1,2} Четири гена кодират белтъците, които регулират MMR-механизма: *mutL* хомолог 1 (*MLH1*), *mutS* хомолог 2 (*MSH2*), *mutS* хомолог 6 (*MSH6*) и *PMS2*. Тези белтъци образуват хетеродимери *MLH1/PMS2* и *MSH2/MSH6*. Биалелното инактивиране на един от тези гени (поради соматична или герминативна мутация или епигенетично подтискане на тяхната експресия) водят до дефицит в MMR (dMMR), свързан с повишено натрупване на мутации в генома.³ Микросателитите са повторени ДНК-последователности с дължина, варираща от 1 до 6 бази, които се срещат както в кодиращи, така и в некодиращи региони на генома.³ Те са високополиморфни в популацията, но стабилни в рамките на индивида.⁴ Последователността на тези ДНК-повтори ги прави особено чувствителни на грешки поради неправилно сдвояване на бази. При dMMR това води до натрупване на мутации от типа вариации в дължината на повторите, определено като микросателитна нестабилност (MSI). Ето защо микросателитната нестабилност е маркер за дефект в репарацията (dMMR) и е характеристика на хипермутабилен геном на клетките.⁵

Изследването за MSI оценява състоянието на MMR-системата на клетката и има различно клинично значение при спорадични и наследствени тумори. По правило MSI

има определена роля за идентифициране на наследствени онкологични синдроми и е от прогностично и предиктивно значение за хирургично отстранени гастроинтестинални тумори. Освен това, се оказва, че MSI може да има определен предиктивен потенциал и за отговора на имунотерапия.⁶ Всичко това повишава клиничното търсене на молекулярното изследване на MSI и го утвърждава като тест, необходим, за да предотврати изследвания, излишно натоварващи здравната система.

Синдром на Lynch. Наследственият неполипозен колоректален карцином (HNPCC) или синдром на *Lynch* е най-честият онкологичен синдром, причинен от хетерозиготни герминативни мутации в един от четирите MMR-гена.⁷ Пациентите се характеризират с ранно начало на болестта (средна възраст < 45 години), основно колоректален (КРК) и ендометриален карцином, но също и тумори в други органи, като преобладаващите мутации са в *MLH1* или *MSH2* (съотв. 42% и 33%), последвани от *MSH6* и *PMS2* (съотв. 18% и 7%).⁸ Разработени са няколко различни препоръки за идентифициране на HNPCC пациенти, като Амстердамски критерии⁹, Бетезда критерии, Йерусалимски критерии¹⁰, както и предложение за универсално въвеждане на MSI-изследване при КРК.^{11,12} Синдромът на *Lynch* може да се дължи и на други герминативни мутации, като такива в *TACSTD1*-ген. Друга молекула промяна, идентифицирана при семейства с HNPCC, е унаследяемо епигенетично изключване на *MSH2* поради хетерозиготна герминативна делеция на екзон 3 на *TACSTD1*-ген, кодиращ епителално клетъчна адхезионна молекула (EPCAM).¹⁴

Аналитични методи за изследване. Има два основни клинично приложими теста за откриване на dMMR при онкологични заболявания: (1) идентификация на MSI чрез молекулярно генетично изследване на поли-А микросателити, което е директно до-

казателство за dMMR; (2) имунохистохимично изследване на експресия на MMR-белтъци (имунохистохимия, ИХХ); това е индиректен метод, като липсата на експресия насочва към dMMR и трябва да се потвърди с MSI молекулярно изследване.

Съществуват разработени комерсиални антители срещу четирите MMR-белтъци (MLH1, MSH2, MSH6 и PMS2) и ИХХ се използва за изследване на експресията им. Загубата на експресия е силно конкордантна (> 90%) с ДНК-базирано MSI-позитивно изследване с висока специфичност и чувствителност.¹⁹ Тъй като белтъците образуват хетеродимери, загубата на единичен белтък или хетеродимерна двойка предполага dMMR. Необходимо е допълнително потвърждаване чрез молекулярно изследване на MSI, тъй като наблюдаваната загуба на експресия хистохимично може да е поради технически или биологични причини.²⁰ В случаи на карциноми с dMMR, доказани с молекулярно изследване, загубата на експресия, наблюдавана при ИХХ-анализ, се използва да посочи гена, чиято експресия е увредена от герминативна, соматична мутация или инактивация, дължаща се на промоторно химерметиране.²¹ Най-голямо предимство на ИХХ е широката достъпност в патологичните лаборатории. Ограниченията са, че този метод не могат да се открият случаи, в които мутациите в гени MLH1 или MSH6 водят до синтез на нефункционален белтък. Наблюдават се както фалшиво негативни, така и фалшиво позитивни случаи.²¹

Молекулярно-генетично изследване на *po1A* микросателити е най-подходящ избор на метод за директно откриване на MSI, което е доказателство за dMMR в даден тумор. По правило ИХХ може да се използва като ефикасен индиректен тест за dMMR, когато не е налична молекулярна лаборатория. Молекулярните изследвания се провеждат върху ДНК, изолирана от свежа, замразена или включена в парафин

туморна тъкан с използване на PCR-базиран тест за откриване на MSI. Съществува референтен панел от микросателитни маркери, който включва два мононуклеотида (BAT25 и BAT26) и три динуклеотида (D2S123, D5S346, D17S250), като статусът им трябва да бъде изследван и сравнен с ДНК, изолирана от нормална и туморна тъкан на пациента.²² Най-висока специфичност и чувствителност се постига с използване на три или повече поли-А мононуклеотидни маркери (BAT25, BAT26, NR-21, NR-22, NR-24, NR-27).³ Според резултатите се дефинират три различни субтипа: (i) MSI-high (MSI-H), ако два и повече микросателити показват нестабилност; (ii) MSI-low (MSI-L), ако само един маркер е нестабилен и (iii) MS-stable (MSS), ако всички изследвани маркери са стабилни.²² Тези препоръки претърпяват развитие, като само MSI-H се смята за истински MSI-тумори и само ако двата маркера са мононуклеотиди, поли-А микросателити. Това довежда до използване на панел, включващ три или повече поли-А маркери.¹⁰ Промените в другите микросателити може да са свързани с по-генерализирана геномна нестабилност, а не с dMMR. Наличието на клиничнопатологични разлики между MSI-L и MSS може да се дължи на вариабилни дефиниции и различни използвани MSI-маркери, така че често не може да се разграничи надеждно MSI-L и хромозомна стабилност; това предполага, че тези тумори следва да се класифицират като един молекулен подтип, MSS неоплазми.^{3,10}

Доказателства за предиктивно значение. По правило MSI се смята за благоприятен прогностичен фактор за ранни стадии на КРК с по-дълга преживяемост без прогресия (ПБП) и обща преживяемост (ОП).^{23, 24} Изказана е хипотеза, че това може да се дължи отчасти на повишен имунен отговор при dMMR неоплазми.²⁴ Преклинични изследвания демонстрират, че dMMR засяга негативно отговора на КРК към химиотерапевтици, като пиримидинови аналози, цисплатина, *temozolomide*, *procarbazine*. *5-fluorouracil*

(5-FU)-базирана адювантна терапия подобрява изхода от болестта, особено при КРК стадий II с MSS/MSI-L тумори, но не и при тези, показващи MSI-H.²³⁻²⁵ Има много и противоречиви данни за предиктивната стойност на MMR-статус и отговор към 5-FU-базирана терапия. Някои изследвания докладват полза от 5-FU, докато повечето посочват липса на полза, дори негативен ефект при MSI.²⁶ В публикация на Ribic et al., включваща данни от рандомизирани клинични проучвания на хирургично лечение срещу 5-FU-базирана терапия, MSI пациенти нямат полза от адювантно лечение, дори то е вредно по отношение на ОП.²³ Това се потвърждава от проучване на 1027 пациенти, при които не се наблюдават разлики в петгодишна ОП при третиранни пациенти с MSI (512 болни със стадий II и III), за разлика от нетретиранни пациенти.²⁵ В това проучване се наблюдава по-добра ПБП при пациенти със стадий III с MSS-тумори, получили адювантна 5-FU-химиотерапия, но не и при пациенти със стадий III с MSI-тумори. Подобна тенденция, макар и незначима, статистически се наблюдава и за тумори в стадий II.


В проучване MOSAIC 2246 пациенти с КРК от стадий II и III са лекувани с 5-FU/leucovorin (LV) или FOLFOX; окончателните резултати дават убедителни доказателства, че добавянето на oxaliplatin води до подобрена петгодишна ПБП и ОП. Вследствие на това са проведени изследвания, за да определи дали микросателитният статус е предиктивен за отговор към oxaliplatin. Zaanan et al. анализират 233 пациенти с MSI-H в стадий III, третиранни с 5-FU/LV или FOLFOX; оказва се, че подгрупата с FOLFOX има по-добра тригодишна преживяемост. Друго проучване със 135 пациенти на следоперативна терапия с FOLFOX не демонстрира никакви разлики в петгодишна преживяемост или ОП при сравняване на MSI-статус.²⁷ Ретроспективно изследване показва статистически значима разлика на по-добра ОП при пациенти с dMMR тумори след

добаване на bevacizumab към адювантна терапия с FOLFOX, сравнено с пациенти без дефект в репарационната система.³⁰ Противоречиви са също данните за предиктивна стойност на MMR-статус и отговора към irinotecan.²⁸

Без съмнение може да се твърди, че само MMR-статусът не може да се използва, за да се определи отговорът към терапия. От друга страна, за адювантна терапия наличието на dMMR/MSI-H е добър прогностичен маркер, докато при метастатична болест доказателствата предполагат обратното. В подгрупа на метастатичен КРК (мКРК) има ниска честота на dMMR (5%), сравнено с ранни карциноми, и се асоциира с лоша прогноза, вероятно поради висока честота на BRAF V600E-мутация, в сравнение с тумори, запазили интактна MMR-система.²⁹

Напоследък се докладва използване на MSI-статус като обещаващ предиктивен маркер за отговор на анти PD-1-терапия при стадий IV на КРК.⁶ Освен това се открива висока честота на Th1/CTL (цитотоксични Т-лимфоцитни инфилтрати, TILs) при MSI КРК. Те са асоциирани с повишена регулация на поне пет молекули, свързани с ключови точки на контрол на клетъчния цикъл, които са таргети на инхибитори в процес на клинични изследвания. По правило MSI може да бъде придобита и по време на химиотерапия, в резултат на селектирани мутации в MMR-гени.^{1, 2} В проучването CheckMate 142 пациенти с авансирани КРК от dMMR/MSI-H субтип са с данни за повишен контрол на болестта с 6 месеца след терапия с nivolumab. Началният анализ на комбинацията на nivolumab с ipilimumab за лечение на пациенти с dMMR/MSI H метастатичен КРК демонстрира контролируем профил на безопасност и клинична активност на комбинацията, характеризирани от висока честота на контрол на болестта и обнадеждаваща преживяемост при проследяване от ≥ 6 месеца (NCT02060188).^{27, 28}

В	<ul style="list-style-type: none"> ■ При колоректален карцином стадий II се препоръчва тестване за MSI/MMR с цел селектиране на пациенти с евентуална полза от адювантна 5-<i>fluorouracil</i>-базирана химиотерапия при MSS/pMMR. ■ При пациенти с метастатичен колоректален карцином, прогресирал след лечение с флуоропиримидини, <i>oxaliplatin</i> и <i>irinotecan</i>, се препоръчва идентификация на MSI-H или dMMR-статус на тумора с цел обсъждане на последваща имунотерапия с <i> pembrolizumab</i>. ■ При пациенти, изпълняващи Бетезда- или Амстердам-критерии за синдром на <i>Lynch</i>, се препоръчва PCR или секвениране за търсене на герминативни мутации в MMR гените от периферна кръв.
С	<p>При пациенти с метастатичен колоректален карцином се препоръчва идентификация на dMMR/MSI H-фенотип с цел обсъждане на комбинирана терапия от имунни чекпоинт-инхибитори (<i>nivolumab</i> с <i>ipilimumab</i>).</p>

	<ul style="list-style-type: none"> ■ <i>Имуохистохимичният метод за dMMR е бърз, относително лесен и достъпен анализ в клиничната практика за определяне на белтъчна експресия на MLH1, MSH2, MSH6 и PMS2.</i> ■ <i>Има убедителни доказателства за негативен прогностичен ефект на dMMR при метастатичен колоректален карцином.</i>
---	--

ЛИТЕРАТУРА

1. Sinicrope FA, Rego RL, Foster N, et al. Microsatellite instability accounts for tumor site-related differences in clinicopathologic variables and prognosis in human colon cancers. *Am J Gastroenterol* 2006; 101: 2818-2825
2. Jass JR. Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features. *Histopathology*. 2007; 50: 113–130
3. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990; 61: 759-767
4. Thibodeau SN, French AJ, Cunningham JM, et al. Microsatellite instability in colorectal cancer: Different mutator phenotypes and the principal involvement of hMLH1. *Cancer Res* 1998; 58: 1713-1718
5. Cunningham JM, Christensen ER, Tester DJ, et al. Hypermethylation of the hMLH1 promoter in colon cancer with microsatellite instability. *Cancer Res* 1998; 58: 3455-3460
6. Cunningham JM, Kim CY, Christensen ER, et al. The frequency of hereditary defective mismatch repair in a prospective series of unselected colorectal carcinomas. *Am J Hum Genet* 2001; 69: 780-790
7. Kane MF, Loda M, Gaida GM, et al. Methylation of the hMLH1 promoter correlates with lack of expression of hMLH1 in sporadic colon tumors and mismatch repair-defective human tumor cell lines. *Cancer Res* 1997; 57: 808-811
8. Poynter JN, Siegmund KD, Weisenberger DJ, et al. Molecular characterization of MSI-H colorectal cancer by MLH1 promoter methylation, immunohistochemistry, and mismatch repair germline muta-

- tion screening. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008; 17: 3208-3215
9. Lynch HT, Shaw MW, Magnuson CW, et al. Hereditary factors in cancer. Study of two large midwestern kindreds. *Arch Intern Med* 1966; 117: 206-212
 10. Plazzer JP, Sijmons RH, Woods MO, et al. The InSiGHT database: Utilizing 100 years of insights into Lynch syndrome. *Fam Cancer* 2013; 12: 175-180
 11. Hitchins MP, Ward RL. Constitutional (germline) MLH1 epimutation as an aetiological mechanism for hereditary non-polyposis colorectal cancer. *J Med Genet* 2009; 46: 793-802
 12. Richman S. Deficient mismatch repair: Read all about it (Review). *Intern J Oncology* 2015; 47 (4): 1189-1202
 13. Fadhil W, Ilyas M. Immunostaining for mismatch repair (MMR) protein expression in colorectal cancer is better and easier to interpret when performed on diagnostic biopsies. *Histopathology* 2012; 60: 653-655
 14. Bao F, Panarelli NC, Rennert H, et al. Neoadjuvant therapy induces loss of MSH6 expression in colorectal carcinoma. *Am J Surg Pathol* 2010; 34: 1798-1804
 15. Capper D, Voigt A, Bozukova G, et al. BRAF V600E-specific immunohistochemistry for the exclusion of Lynch syndrome in MSI-H colorectal cancer. *Int J Cancer* 2013; 133: 1624-1630
 16. Bapat B, Lindor NM, Baron J, et al. The association of tumor microsatellite instability phenotype with family history of colorectal cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2009; 18: 967-975
 17. Graham T, Halford S, Page KM, Tomlinson IP. Most low-level microsatellite instability in colorectal cancers can be explained without an elevated slippage rate. *J Pathol* 2008; 215: 204-210
 18. Halford S, Sasieni P, Rowan A, et al. Low-level microsatellite instability occurs in most colorectal cancers and is a nonrandomly distributed quantitative trait. *Cancer Res* 2002; 62: 53-57
 19. Tomlinson I, Halford S, Aaltonen L, et al. Does MSI-low exist? *J Pathol* 2002; 197: 6-13
 20. Cicek MS, Lindor NM, Gallinger S, et al. Quality assessment and correlation of microsatellite instability and immunohistochemical markers among population- and clinic-based colorectal tumors results from the Colon Cancer Family Registry. *J Mol Diagn* 2011; 13: 271-281
 21. Pritchard CC, Smith C, Salipante SJ, et al. ColoSeq provides comprehensive lynch and polyposis syndrome mutational analysis using massively parallel sequencing. *J Mol Diagn* 2012; 14: 357-366
 22. Venderbosch S, Nagtegaal ID, Maughan TS, et al. Mismatch repair status and BRAF mutation status in metastatic colorectal cancer patients: A pooled analysis of the CAIRO, CAIRO2, COIN, and FOCUS studies. *Clin Cancer Res* 2014; 20: 5322-5330
 23. Elsaleh H, Joseph D, Griou F, et al. Association of tumour site and sex with survival benefit from adjuvant chemotherapy in colorectal cancer. *Lancet* 2000; 355: 1745-1750
 24. Des Guetz G, Schischmanoff O, Nicolas P, et al. Does microsatellite instability predict the efficacy of adjuvant chemotherapy in colorectal cancer? A systematic review with meta-analysis. *Eur J Cancer* 2009; 45: 1890-1896
 25. Kim ST, Lee J, Park SH, et al. Clinical impact of microsatellite instability in colon cancer following adjuvant FOLFOX therapy. *Cancer Chemother Pharmacol* 2010; 66: 659-667
 26. Roth AD, Tejpar S, Delorenzi M, et al. Prognostic role of KRAS and BRAF in stage II and III resected colon cancer: Results of the translational study on the PETACC-3, EORTC 40993, SAKK 60-00 trial. *J Clin Oncol* 2010; 28: 466-474
 27. Andre T. Combination of nivolumab (nivo) + ipilimumab (ipi) in the treatment of patients (pts) with deficient DNA mismatch repair (dMMR)/highmicrosatellite instability (MSI-H) metastatic colorectal cancer (mCRC): CheckMate 142. ASCO 2017, Abstr. 3531
 28. Overman MJ, Lonardi S, Leone F, et al. Nivolumab in patients with DNA mismatch repair deficient/microsatellite instability high metastatic colorectal cancer. 2017 Gastrointestinal Cancers Symposium. Abstr. 519

1.9.2. KRAS- и NRAS-мутации

Милка Георгиева, Алексей Савов

Молекулярна биология. Молекулярно-патологично тестване за селекция на таргетни и конвенционални терапии при пациенти с колоректален карцином (КПК) е обект на голям брой изследвания и е стандартна практика за поведение. Гените *KRAS* и *NRAS* са тясно свързани членове на RAS-онкогенното семейство. Промени в екзони 2, 3 и 4 при всеки ген конститутивно активират RAS и са взаимноизключващи се. Досега няколко ретроспективни анализа от рандомизирани клинични проучвания валидират пан-RAS-мутациите като негативни предиктивни фактори за анти-EGFR-терапия.^{1,2}

KRAS-протеинът е глюкозотрифосфатаза (GTP-аза), свързана към интрацелуларната част на клетъчната мембрана и действа в EGFR/ RAS/RAF/MEK/ERK-сигналния път. Предава извънклетъчни сигнали от рецептора на епидермалния растежен фактор (EGFR) към ядрото и регулира пролиферация, клетъчен растеж и апоптоза; действа като класически онкоген. От друга страна, *KRAS*-генът е локализиран на късото рамо на 12 хромозома. При КПК честотата на *KRAS*-мутации е 35-40%. Точкови мутации в *KRAS*-гена обикновено има в кодони 12 (82-87%) и 13 (13-18%) на екзон 2, кодони 59 и 61 на екзон 3 и кодони 117 и 146 на екзон 4.³ При пациенти с *KRAS* “див” тип (немутирал), свързването на анти-EGFR-антитела към рецептора индуцира конформационни промени, засягащи неговото интернализиране, причинявайки директно инхибиране на тирозинкиназната (ТК) активност и блокиране на RAS/RAF/MEK/ERK-сигналния път. По правило *KRAS*-мутациите отменят индуцираното от антитела инхибиране на EGFR и конститутивно активират *KRAS* вътреклетъчния домейн.⁴ Ретроспективен анализ дава потенциална негативна прогностична роля на *RAS*-мутации при пациенти с

метастатичен КПК, като е докладвана по-лоша прогноза при *NRAS*- и *KRAS*-мутирални пациенти (25.6 срещу 30.2 месеца) в сравнение с всички пациенти с “див” тип.⁵

Невробластома-RAS (*NRAS*)-генът принадлежи към RAS-онкогенното семейство и е локализиран на 1 хромозома. Кодира GTP-аза-мембранен протеин, който функционира като молекулярен превключвател между клетъчната мембрана и системата на *Golgi*. По правило *NRAS*-мутациите са с честота 3-5%, особено в екзон 2 кодони 12 и 13 и екзон 3 кодони 59 и 61 и по-рядко – в екзон 4 кодони 117 и 146. При КПК те се асоциират с неуспешно анти-EGFR-лечение. Мутациите в *KRAS*, *BRAF* и *NRAS* са взаимно изключващи се.⁶


Аналитични методи за изследване. За детекция на *RAS*-мутации в проби от КПК могат да се използват различни методи, като мутационно-специфичен Real-time PCR, секвениране по *Sanger*, пиросеквениране и секвениране от ново поколение (NGS). Има няколко производители на таргетни генетични панелни теста за откриване на *RAS*-мутации в проби от пациенти с КПК. Тъкани материали от първични или от метастатични лезии могат да се използват за *RAS*-мутационно тестване, тъй като съвпадението между първични тумори и метастази е около 93%.⁷

Доказателства за предиктивно значение. *Cetuximab* и *panitumumab* са антитела, които се свързват с извънклетъчния домейн на EGFR, блокират свързването на EGF и други вътрешни лиганди и така стопират EGFR-сигнализирането. Известно е, че таргетни EGFR-терапии със *cetuximab* или *panitumumab* подобряват преживяемостта без прогресия (ПБП) и общата преживяемост (ОП) при пациенти с метастатичен КПК с “див” тип, но не и при пациенти с мутирал *KRAS*.⁸⁻¹⁰ В тези по-ранни изследвания са от-

четени само мутации в *KRAS*-екзон 2. Скорешни изследвания показват убедителни доказателства, че и други *RAS*-мутации в *KRAS*-екзони 3 и 4 и *NRAS*-екзони 2, 3 и 4 също са свързани с липса на отговор на метастатичен КПК към терапия с анти-EGFR-моноклонални антитела.^{11,11,12} Резултатите доказват, че трябва да се направи разширено *RAS*-мутационно тестване (*KRAS*-екзони 2, 3 и 4 и *NRAS*-екзони 2, 3 и 4) преди насочване

към терапия с анти-EGFR-моноклонални антитела.¹¹ Така *RAS*-мутационният статус е негативен предиктивен биомаркер за избор на терапия с EGFR-таргетни моноклонални антитела при метастатичен КПК. Настоящите доказателства показват, че *cetuximab* и *panitumumab* трябва да бъдат предписвани само на пациенти с метастатичен КПК, които са “див” тип/немутирани за всички известни *RAS*-активиращи мутации.¹¹

A	<ul style="list-style-type: none"> ■ При всички пациенти с метастатичен колоректален карцином се препоръчва разширено изследване на <i>RAS</i> с алел-специфичен PCR или секвениране, включващо <i>KRAS</i>-екзони 2, 3 и 4 (кодони 12, 13, 59, 61, 117 и 146) и <i>NRAS</i>-екзони 2, 3 и 4 (кодони 12, 13, 59, 61, 117 и 146), заедно с <i>BRAF</i> V600 мутации. ■ Препоръчва се задължително изследване на <i>RAS</i> преди терапия с EGFR-таргетните моноклонални антитела <i>cetuximab</i> и <i>panitumumab</i>. ■ Препоръчително е за изследване на <i>RAS</i> да се използва тъкан от първичен или метастатичен колоректален карцином.
C	<p>Препоръчително е пробите за биомаркерно изследване да се оценяват за адекватност от патолози чрез определяне на качество и количество на тъкан и съдържание на туморни клетки и чрез изготвяне на срезове за изолиране на ДНК.</p>

	<ul style="list-style-type: none"> ■ <i>Хистоморфологична верификация, преценка на адекватност на пробите (определяне количество и качество на тъкан), определяне на съдържание на туморни клетки, изготвяне на срезове и молекулярно-патологично тестване трябва да се извършват в един център.</i> ■ <i>Хистопатологична оценка на пробите е критична за достоверност на резултатите, предпазва от фалшиво негативни резултати и неуспешни тестове. Това предполага задължително включване на правила за молекулярно-патологично тестване като част от стандарт по патология.</i> ■ <i>При тестване на биомаркери трябва да се следват сходни качествен контрол, политики и процедури за осигуряване на качеството, както при останалите клинични лабораторни тестове.</i> ■ <i>За повече от 90% от пробите срокът за извършване на разширено <i>RAS</i>-тестване трябва да е ≤ 7 работни дни от датата на получаване в тестващата лаборатория.</i>
---	---



- Лабораториите трябва да използват валидирани методи за биомаркерно тестване на колоректален карцином, които да изпълняват стандартите за клинични молекулярно-патологични тестове.
- Лабораториите, предоставящи разширено RAS-тестване на колоректални тумори, трябва да имат успешно участие в подходяща схема за външен контрол на качеството и да са акредитирани.
- Необходимо е организиране и изграждане на система от мерки за бързо пренасяне на тъканните проби от референтните центрове до тестващите лаборатории, за да се минимизира времето за тестване и да се избегне забавяне на информацията за пациентите.

ЛИТЕРАТУРА

1. Douillard JY, Oliner KS, Siena S, Tabernero J, et al. Panitumumab-FOLFOX4 treatment and RAS mutations in colorectal cancer. *N Engl J Med* 2013; 369: 1023-1034
2. Heinemann V, von Weikersthal LF, Decker T, Kiani A, et al. FOLFIRI plus cetuximab versus FOLFIRI plus as first-line treatment for patients with metastatic colorectal cancer (FIRE-3): a randomised, open-label, phase 3. *Lancet Oncol* 2014; 15: 1065-1075
3. Puerta-García E, Cañadas-Garre M, Calleja-Hernández MÁ. Molecular biomarkers in colorectal carcinoma. *Pharmacogenomics* 2015; 16: 1189-1222
4. Wong R, Cunningham D. Using predictive biomarkers to select patients with advanced colorectal cancer for treatment with epidermal growth factor receptor antibodies. *J Clin Oncol* 2008; 26: 5668-5670
5. Schirripa M, Cremolini C, Loupakis F, et al. Role of NRAS mutations as prognostic and predictive markers in metastatic colorectal cancer. *Int J Cancer* 2015; 136: 83-90
6. Hawkes E, Cunningham D. Relationship between colorectal cancer biomarkers and response to epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies. *J Clin Oncol* 2010; 28: e529-e331
7. Wong N, Gonzalez D, Salto-Tellez M, et al. RAS testing of colorectal carcinoma – a guidance document from the association of clinical pathologists molecular pathology and diagnostics group. *J Clin Pathol* 2014; 67: 751-757
8. Grothey A. EGFR antibodies in colorectal cancer: Where do they belong? *J Clin Oncol* 2010; 28: 4668-4670
9. De Roock W, Claes B, Bernasconi D, et al. Effects of KRAS, BRAF, NRAS, and PIK3CA mutations on the efficacy of cetuximab plus chemotherapy in chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer: A retrospective consortium analysis. *Lancet Oncol* 2010; 11: 753-762
10. Karapetis CS, Khambata-Ford S, Jonker DJ, et al. K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. *N Engl J Med* 2008; 359: 1757-1765
11. Sorich MJ, Wiese MD, Rowland A, et al. Extended RAS mutations and anti-EGFR monoclonal antibody survival benefit in metastatic colorectal cancer: A meta-analysis of randomized, controlled trials. *Ann Oncol* 2015; 26: 13-21
12. Van Cutsem E, Lenz HJ, Kohne CH, et al. Fluorouracil, leucovorin, and irinotecan plus cetuximab treatment and RAS mutations in colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2015; 33: 692-700

1.9.3. BRAF-мутации

Милка Георгиева, Алексей Савов

Молекулярна биология. Серин-треонин киназата BRAF е от семейството на RAF-киназите и има важна роля в MAPK-сигналния път, който влияе на клетъчно деление, диференциация и секреция. Една BRAF-мутация е асоциирана с негативен отговор към EGFR-инхибитори и лоша прогноза.¹ При метастатичен колоректален карцином (мКРК) BRAF-мутациите (почти винаги V600E) са с честота между 8% и 12% и са почти неприпокриващи се с RAS-мутации.²⁻⁴ Известно е, че BRAF мутира на няколко места, но най-честата мутация е V600E (1799T-A-нуклеотидна промяна), характеризираща до 80% от всички BRAF-мутации. Тя води до промяна, причиняваща конститутивна киназна активност.² По правило BRAF V600E-мутирал КРК споделя особени клинични и патологични характеристики: среща се по-често при жени, отколкото при мъже, често е локализиран в десен колон, с муцинова хистология и висока микросателитна нестабилност (MSI-H). На практика BRAF-мутацията показва по-висока честота на нодални и перитонеални метастази и по-ниска честота на белодробни метастази.^{3,4} При радикално резецирани чернодробни метастази BRAF V600E-мутиралите тумори често рецидивират рано поради наличие на екстрахепатални лезии.⁵ Напоследък са открити и други мутации: BRAF 594- и 596-мутирала при < 1% от мКРК. Тези мутации идентифицират рядък и неизследван молекулярен субтип на мКРК с клинични и патологични свойства, различни от BRAF V600E-мутирала.⁶

Аналитични методи за изследване. За клинични цели BRAF V600E-мутационен статус се определя чрез PCR-амплификация и ДНК-секвенционен анализ или аел-специфичен PCR на тъкан, включена в парафин, от първични тумори или метастази. Тестването за BRAF-мутации трябва да се прави при диагноза на КРК, тъй като това

представя уникален субтип с лоша прогноза и ограничен отговор към терапии. В комбинация с тестване за MMR-дефицит може да помогне при идентифициране на герминативна срещу соматична причина за dMMR. Тези резултати са в съзвучие с ръководства на NCCN, където силно се препоръчва генотипизиране при всички пациенти със стадий IV на туморна тъкан за RAS и BRAF.¹⁹ При пациенти с мКРК BRAF-статус трябва да се анализира заедно с RAS-мутационния статус за прогностична оценка (и/или потенциална селекция за клинични проучвания).

Доказателства за предиктивно значение. Мутационният статус на BRAF е свързан с лоша прогноза в много ретроспективни проучвания. Тази специфично лоша прогноза е подкрепена от голям брой рандомизирани изследвания със специфични химиотерапевтични режими.^{3,4,7} На базата на тези доказателства се счита, че BRAF-мутацията е негативен прогностичен маркер при мКРК и че този ефект, за разлика от RAS-мутациите, не е ограничен само до изхода от анти-EGFR-терапията. По отношение на стандартните таргетни терапии с анти-EGFR-моноклонални антитела предиктивната роля на V600E активиращата BRAF-мутация все още не е достатъчно убедителна, вероятно заради ниската ѝ честота и ограниченията на ретроспективните субгрупови анализи. Два метаанализа показват, че ползата от терапия с EGFR-антитела е по-голяма при пациенти с RAS “див” тип/BRAF “див” тип, отколкото при тези с RAS “див” тип/BRAF-мутирала тумори.^{8,9} По правило BRAF V600E-мутирала меланоми са чувствителни към BRAF-инхибитор (*vemurafenib*)¹⁰, докато BRAF-мутирал КРК не е чувствителен.^{11,12} Компенсаторно обратно реактивиране на EGFR при КРК може да обясни резистентността към BRAF-инхибитори.^{12,13} Провеждат се клинични проучвания за тестване на таргетни терапии при BRAF-мутирал мКРК, като се използват режими от BRAF-инхибитори (*dabrafenib*, *vemurafenib* или *encorafenib*), комбинирани с MEK- и EGFR-инхи-

битори, а в някои случаи – с конвенционална цитотоксична терапия.^{14,15} Соматичните *BRAF V600E*-мутации се свързват със спорадични случаи на дефицит на репарация на погрешно дсвоена ДНК с MSI-фенотип (dMMR).¹⁶ Така *BRAF V600E*-мутация в MSI-

Н-колоректален тумор е много силна индикация за спорадичен карцином и може да помогне за изключване на синдром на *Lynch*.^{17, 18} Затова целта на *BRAF V600E*-мутационното тестване е начин да се изключи този синдром.

A

- За дефиниране на фенотип с лоша прогноза и ограничен отговор към стандартна химиотерапия при пациенти с метастатичен колоректален карцином се препоръчва едновременно изследване на *BRAF V600*-мутации чрез алел-специфичен PCR или секвениране, заедно с *RAS*-мутационен статус и dMMR/MSI-H-тестване, с цел прогностично стратифициране.
- При MMR-дефицитни тумори със загуба на MLH1 се препоръчва изследване на *BRAF V600*-мутации за оценка на риск от синдром на *Lynch*. Наличие на *BRAF*-мутация силно подкрепя спорадична патогенеза, докато липсата ѝ не изключва риск за синдром на *Lynch*.



- *Хистоморфологична верификация, преценка на адекватност на пробите (определяне количество и качество на тъканта), определяне на съдържание на туморни клетки, изготвяне на срезове и молекулярно-патологично тестване трябва да се извършват в един център.*
- *Хистопатологичната оценка на пробите е критична за достоверност на резултатите, предпазва от фалшиво негативни резултати и неуспешни тестове. Това предполага задължително включване на правила за молекулярно-патологично тестване като част от стандарт по патология.*
- *За повече от 90% от пробите срокът за извършване на разширено *RAS/BRAF*-изследване трябва да е ≤ 7 работни дни от датата на получаване в тестващата лаборатория.*
- *Лабораториите трябва да използват валидирани методи за биомаркерно изследване на колоректален карцином, които да изпълняват стандартите за клинични молекулярно-патологични тестове.*
- *Необходимо е организиране и изграждане на система от мерки за бързо пренасяне на тъканните проби от референтните центрове до изследващите лаборатории, за да се минимизира времето за изследване и да се избегне забавяне на информацията за пациентите.*
- *При изследване на биомаркери трябва да се следват качествен контрол, политики и процедури за осигуряване на качеството, сходни с тези при останалите клинични лабораторни тестове.*

ЛИТЕРАТУРА

- Lavoie H, Therrien M. Regulation of RAF protein kinases in ERK signalling *Nat Rev Mol Cell Biol* 2015; 16: 281-298
- Tran B, Kopetz S, Tie J, et al. Impact of BRAF mutation and microsatellite instability on the pattern of metastatic spread and prognosis in metastatic colorectal cancer. *Cancer* 2011; 117: 4623-4632
- Venderbosch S, Nagtegaal ID, Maughan TS, et al. Mismatch repair status and BRAF mutation status in metastatic colorectal cancer patients: a pooled analysis of the CAIRO, CAIRO2, COIN, and FOCUS studies. *Clin Cancer Res* 2014; 20: 5322-5330
- Yaeger R, Cercek A, Chou JF, et al. BRAF mutation predicts for poor outcomes after metastasectomy in patients with metastatic colorectal cancer. *Cancer* 2014; 120: 2316-2324
- Cremolini C, Di Bartolomeo M, Amatu A, et al. BRAF codons 594 and 596 mutations identify a new molecular subtype of metastatic colorectal cancer at favorable prognosis. *Ann Oncol* 2015; 26: 2092-2097
- Van Cutsem E, Kohne CH, Lang I, et al. Cetuximab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: updated analysis of overall survival according to tumor KRAS and BRAF mutation status. *J Clin Oncol* 2011; 29: 2011-2019
- Pietrantonio F, Petrelli F, Coinu A, et al. Predictive role of BRAF mutations in patients with advanced colorectal cancer receiving cetuximab and panitumumab: a meta-analysis. *Eur J Cancer* 2015; 51: 587-594
- Rowland A, Dias MM, Wiese MD, et al. Meta-analysis of BRAF mutation as a predictive biomarker of benefit from anti-EGFR monoclonal antibody therapy for RAS wild-type metastatic colorectal cancer. *Br J Cancer* 2015; 112: 1888-1894
- Sosman JA, Kim KB, Schuhter L, et al. Survival in BRAF V600-mutant advanced melanoma treated with vemurafenib. *N Engl J Med* 2012; 366: 707-714
- Kopetz S, Desai J, Chan E, et al. Phase II pilot study of vemurafenib in patients with metastatic BRAF-mutated colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2015; 33: 4032-4038
- Prahallad A, Sun C, Huang S, et al. Unresponsiveness of colon cancer to BRAF (V600E) inhibition through feedback activation of EGFR. *Nature* 2012; 483: 100-103
- Corcoran RB, Ebi K, Turke AB, et al. EGFR-mediated re-activation of MAPK signaling contributes to insensitivity of BRAF mutant colorectal cancers to RAF inhibition with vemurafenib. *Cancer Discov* 2012; 2: 227-235
- Corcoran RB, Atreya CE, Falchook GS, et al. Combined BRAF and MEK inhibition with dabrafenib and trametinib in BRAF V600-mutant colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2015; 33: 4023-4031
- Hyman DM, Puzanov I, Subbiah V, et al. Vemurafenib in multiple nonmelanoma cancers with BRAF V600 mutations. *N Engl J Med* 2015; 373: 726-736
- Domingo E, Niessen RC, Oliveira C, et al. BRAF-V600E is not involved in the colorectal tumorigenesis of HNPCC in patients with functional MLH1 and MSH2 genes. *Oncogene* 2005; 24: 3995-3998
- Bettstetter M, Dechant S, Ruemmele P, et al. Distinction of hereditary nonpolyposis colorectal cancer and sporadic microsatellite-unstable colorectal cancer through quantification of MLH1 methylation by real-time PCR. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 3221-3228
- Loughrey MB, Waring PM, Tan A, et al. Incorporation of somatic BRAF mutation testing into an algorithm for the investigation of hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Fam Cancer* 2007; 6: 301-310
- National Comprehensive Cancer Network. NCCN Guidelines: Colon Cancer. Volume 2. Version 3. 2015. Accessed August 12, 2015. Available at: www.nccn.org

1.9.4. DPYD-мутации

Димитър Калев, Асен Дудов

Молекулярна биология. Биомаркерът е свързан с метаболизма на 5-флуоропиримидините – *5-fluorouracil* (*5-FU*) и неговия орален продраг *capecitabine*, индицирани за адювантна химиотерапия на колоректален карцином и за третиране на метастатичен колоректален карцином. Допълнителни индикации за приложение са карцином на гърда, невроендокринни тумори и др. Ензимът дихидропиримидин-дехидрогеназа (DPYD) е първичен регулатор на *5-FU*-активността, защото катаболизира 85% от лекарствената субстанция.¹ Известен е също и с абривиатура DPD. Дефицитът му резултира във високи плазмени нива на *5-FU*, значително натрупване на активни метаболити, клинично манифестиращи се с тежка или фатална токсичност, в която преобладава миелосупресия, мукозити и церебеларна токсичност.²

Аналитични методи за изследване. Ензимният дефицит се тества чрез радиоимунотричен анализ за DPYD, но този тест не е лесно достъпен. Разработен е лесен респираторен тест, с който може да се осигури ефективен скрининг.³

Доказателства за предиктивно значение. Всички токсични феномени теоретично биха могли да се редуцират или избегнат чрез скриниране на DPYD-активността върху периферни мононуклеарни клетки, като сурогат на тъканна проба, но техниките засега

са трудно осъществими. За по-уместно се счита проспективно идентифициране на пациенти с DPYD-дефицит като популация с висок риск за тежка *5-FU*-токсичност. Генът, кодиращ DPYD, е съставен от 21 екзона и са известни поне 23 единични нуклеотидни полиморфизми (NSPs).⁴ Изследвания върху пациенти с DPYD-дефицит идентифицират няколко различни молекулярни варианти, свързани с ниска ензимна активност. Повечето са редки, но превалиращ вариант е сплайсинг в интрон 14 (DPYD*2A), където субституцията от G към A резултира в ензимна неактивност.⁵ При хетерозиготни индивиди този полиморфизъм е свързан с тежък DPYD-дефицит. Последни изследвания доказват, че 61% от онкологичните пациенти с тежка токсичност от *5-FU* имат снижена DPYD-активност в периферни мононуклеарни клетки и най-често се открива DPYD*2A.⁶ При усложнения с неутропения от степен 4 в 50% се открива DPYD*2A. По епидемиологични данни честотата на хомозиготи за този алелен вариант в Кавказката раса е само 0.1%, а хетерозиготите варират – от 0.5% до 2%.¹ Съществуват и допълнителни DPYD-мутации, свързани с нарушена ензимна активност: DPYD*3 и DPYD*13.

Ръководството на Консорциума за клинична фармакогенетична дейност (CPIC, USA) препоръчва стандартно дозиране на *5-FU* при хомозиготни пациенти с DPYD “див тип”.⁷ При хетерозиготни индивиди (*1/*2A) се налага редукция на дозата поне с 50%, а ако пациентите са хомозиготен вариант (*2A/*2A), се препоръчва употреба на алтернативен лекарствен продукт.

В	<ul style="list-style-type: none"> ■ При пациенти с предстояща терапия с <i>5-fluorouracil/capecitabine</i> се препоръчва скрининг с <i>DPYD</i>-фенотипизиране. ■ При пациенти с немутирал <i>DPYD</i>-ген (“див” тип) се препоръчва стандартно дозиране на <i>5-fluorouracil/capecitabine</i>. ■ При <i>DPYD</i>-хетерозиготни индивиди (*1/*2A) се препоръчва редукция на дозата най-малко с 50%, а при пациенти с хомозиготен вариант (*2A/*2A) се препоръчва алтернативна терапия.
С	За определяне на <i>DPYD</i> -генотип се препоръчва ДНК-секвениране или фенотипизиране с радиоимунотричен анализ.



При пациенти с клинични данни за тежка медикаментозна токсичност от *5-fluorouracil/capecitabine* трябва да се обсъжда *DPYD*-дефицит и при възможност да се изследват за *DPYD*-мутации.

ЛИТЕРАТУРА

1. Walko CM, McLeod H. Pharmacogenomics. In: Cancer. Principles & Practice of Oncology. Editors: DeVita V, Lawrence TS and Rosenberg SA. 10th edition. Wolters Kluwer Health 2015. pp. 183-188
2. Caudle KE, Thorn CF, Klein TE, et al. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium guidelines for dihydropyrimidine dehydrogenase genotype and fluoropyrimidine dosing. *Clin Pharmacol Ther* 2013; 94 (6): 640-645
3. Mercier C, Ciccolini J. Profiling dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency in patients with cancer undergoing 5-fluorouracil/capecitabine therapy. *Clin Colorectal Cancer* 2006; 6: 288-296
4. McLeod H, Collie-Duguid ES, Vreken P, et al. Nomenclature for human *DPYD* alleles. *Pharmacogenetics* 1998; 8: 455-459
5. Johnson M, Wang K, Diasio R. Profound dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency resulting from a novel compound heterozygote genotype. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 768-774
6. Van Kuilenburg A, Meinsma R, Zoetekouw L, et al. Increased risk of grade IV neutropenia after administration of 5-fluorouracil due to a dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency: high prevalence of the IVS14+1g>a mutation. *Int J Cancer* 2002; 101: 253-258
7. Caudle KE, Thorn CF, Klein TE, et al. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium guidelines for dihydropyrimidine dehydrogenase genotype and fluoropyrimidine dosing. *Clin Pharmacol Ther* 2013; 94: 640-645

1.9.5. UGT1A1-мутации

Димитър Калев, Асен Дудов

Молекулярна биология. Биомаркерът е свързан с метаболизма на топоизомеразата I-инхибитора *irinotecan*, индициран за първа и последваща линии химиотерапия на метастатичен колоректален карцином. Допълнителни негови индикации са дребноклетъчен белодробен и панкреасен карцином. Фармакокинетично *irinotecan* е продраг и за да захване топоизомеразата I (TOP1cc), се нуждае от конверсия към активния метаболит SN-38.¹ Биохимично SN-38 се формира чрез хидролиза от карбоксилестерази и се метаболизира в черния дроб от ензим, наречен член A1 от фамилия 1 на UDP-глюкуронозилтрансфераза (UGT1A1). По правило всякакви дефицити в този биохимичен път повишават риска от лекарствена токсичност – диария и миелосупресия.

Аналитични методи за изследване. Американската агенция за храни и лекарства

(FDA) препоръчва тестване за алел UGT1A1*28 чрез валидирана методика. Клинично генотипизиране се извършва върху екстрахирана от кръв геномна ДНК чрез TATA-бокс секвениране или чрез фрагментарен анализ, последвани от PCR-секвениране.²

Доказателства за предиктивно значение. По правило *UGT*-гените са полиморфни и за многообразието им допринасят геномни процеси като вариации на брой копия, сплайсинг и епигенетични фактори. Идентифицирани са полиморфизми на *UGT1A1*-гена, локализиран в хромозома 2q37, а хомозиготно присъствие на полиморфизъм UGT1A1*28 (*28/*28) корелира с диария от късен тип и неутропения от *степен 3-4*, налагащи редукция на дозата с 30%, ако първоначално е планирана над 250 mg/m².^{4,5} В друго изследване хетерозиготите демонстрират двойно по-висок риск от тежка диария.⁶ При фенотип *1/*28 не се налага модификация на дозата. Допълнително редукция на дозата на *irinotecan* се препоръчва и при пациенти с чернодробна дисфункция и със стойности на серумен билирубин над 25.65 mmol/L.⁷

В

- При пациенти с предстояща терапия с *irinotecan* се препоръчва рутинен скрининг с *UGT1A1*-генотипизиране (*1/*1, *1/*28 и *28/*28).
- При пациенти с генотип *UGT1A1*-фенотип *1/*1 или *1/*28 се препоръчва стандартно дозиране на *irinotecan*.
- При *UGT1A1*-хомозиготен генотип (*28/*28) се препоръчва редукция на *irinotecan* с 30%, ако планираната доза е над 250 mg/m².

С

За *UGT1A1*-изследване се препоръчва секвениране на ДНК от кръвна проба.



При пациенти с клинични данни за тежка медикаментозна токсичност от *irinotecan* трябва да се обсъжда наличие на *UGT1A1*-хомозиготен генотип и при възможност да се изследват за *UGT1A1*-полиморфизми.

ЛИТЕРАТУРА

1. Do KT, Kummar S, Doroshow J, Pommier Y. Topoisomerase interactive agents. In: *Cancer. Principles & Practice of Oncology*. Editors: DeVita V, Lawrence TS and Rosenberg SA. 10th edition. Wolters Kluwer Health 2015. pp. 218-227
2. Shulman K, Cohen I, Barnett-Griness O, et al. Clinical implications of UGT1A1*28 genotype testing in colorectal cancer patients. *Cancer* 2011; 117: 3156-3162
3. Innocenti F, Undevia SD, Iyer L, et al. Genetic variants in the UDP-glucuronosyltransferase 1A1 gene predict the risk of severe neutropenia of irinotecan. *J Clin Oncol* 2004; 22: 1382-1388
4. Guillemette C. Pharmacogenomics of human UDP-glucuronosyltransferase enzymes. *Pharmacogenomics J* 2003; 3 (3): 136-158
5. Toffoli G, Cecchin E, Corona G, et al. The role of UGT1A128 polymorphism in the pharmacodynamics and pharmacokinetics of irinotecan in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2006; 24: 3061-3068
6. de Jong FA, Kehrer DE, Mathijssen RH, et al. Prophylaxis of irinotecan-induced diarrhea with neomycin and potential role for UGT1A128 genotype screening: a double-blind, randomized, placebo controlled study. *Oncologist* 2006; 11: 944-954
7. Schaaf LJ, Hammond LA, Tipping SJ, et al. Phase 1 and pharmacokinetic study of intravenous irinotecan in refractory solid tumor patients with hepatic dysfunction. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 3782-3791

1.9.6. Мултигенни сигнатури

Милка Георгиева, Борис Петров

Молекулярна биология. Създадени са мултиплексни платформи за генноекспресионни тестове, базирани на известни биомаркери за прогноза и терапевтични отговори при колоректален карцином (КРК), за да се идентифицират пациенти в стадий II и III, за които е по-вероятно да развият рецидив и да са кандидати за адювантна химиотерапия (ХТ).¹ Въпреки че все още не са стандартизирани или широко използвани, тези тестове са крайно необходими, тъй като клиникопатологичните характеристики не могат ефективно да идентифицират пациенти със стадий II с висок риск, които да имат полза от адювантна ХТ, сходна на тази, показана при пациенти в стадий III или метастатичен КРК (мКРК).^{1,2} Три прогностични генноекспресионни сигнатури са реализирани за клинично ползване след обширно валидиране на външни кохорти и са комерсиално достъпни: (i) Oncotype DX[®] (Genomic Health, Redwood City, CA) за КРК – 12-гена, RT-PCR тест³⁻⁸, (ii) ColoPrint[®] (Agendia, Irvine, CA) – 18-гена микроарейс тест⁹⁻¹¹ и (iii) GeneF_x Colon[®] (бивш CoI Dx) – 634-гена микроарейс тест¹².

Oncotype DX. Използва 12-гена сигнатура, състояща се от гени, свързани с рецидив и клинична полза от 5-*fluorouracil* (5-FU); стратифицира тумори с нисък, среден и висок риск за рецидив. Тестът използва точкуване за рецидив (RS), за да предсказва тригодишен риск при стадий II и III: нисък RS – 12%, умерен RS – 18% и висок RS – 22%.³ Абсолютната разлика между тези групи (10% между групите с нисък и висок риск, 4% между групите с умерен и висок риск) може да не е достатъчна за вземане на клинично решение. Счита се, че при създаване на бъдещи платформи ще се търси по-широко раз-

граничаване между тези рискови категории, което ще може по-ясно да идентифицира пациенти, които трябва или не трябва да бъдат лекувани с адювантна ХТ.

ColDx (GeneF_x colon). Тестът обхваща 634-гена сигнатура, която диференцира тумори в стадий III с нисък и висок петгодишен риск за рецидив: (i) висок риск – 40%, (ii) нисък риск – 70%.

ColoPrint. Използва 18-гена сигнатура, която идентифицира пробите като нисък или висок петгодишен риск за развитие на далечни метастази при пациенти в стадий II или III: (i) висок риск – петгодишна преживяемост без рецидив в 67.2% и (ii) нисък риск – петгодишна преживяемост без рецидив в 87.6%.¹³

Доказателства за предиктивно значение. Наличните доказателства показват, че генноекспресионните тестове за КРК могат да подобрят предикцията за риск, особено за този от рецидив при стадий II или III. От друга страна обаче, те не са достатъчни, за да се направят изводи как класификацията на тези тестове се сравнява с други методи за идентифициране на риска от рецидив при пациенти в стадий II или каква е клиничната полза за пациентите. Доказателствата са недостатъчни и за да се направят изводи как генноекспресионната класификация се сравнява с други методи за поведение при други стадии на КРК. Затова тестовете за предсказване на вероятност от рецидив при пациенти с КРК се считат за изследователски. В допълнение, липсват доказателства за предиктивна стойност по отношение на потенциална полза от ХТ за всеки от наличните мултигенни тестове. Счита се, че няма достатъчно доказателства, за да се препоръча използване на мултигенни тестове за определяне на адювантна терапия.

С

Засага при колоректален карцином не се препоръчва рутинно тестване с мултигенни сигнатури и употребата им трябва да бъде ограничена в рамките на клинични проучвания.

ЛИТЕРАТУРА

- Shi C, Washington K. Molecular testing in colorectal cancer: Diagnosis of Lynch syndrome and personalized cancer medicine. *Am J Clin Pathol* 2012; 137: 847-859
- O'Connor ES, Greenblatt DY, LoConte NK, et al. Adjuvant chemotherapy for stage II colon cancer with poor prognostic features. *J Clin Oncol* 2011; 29: 3381-8.
- Gray RG, et al. Validation study of a quantitative multigene reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay for assessment of recurrence risk in patients with stage II colon cancer. *J Clin Oncol* 2011; 29 (35): 4611-4619
- Venook AP, Niedzwiecki D, Lopatin M, et al. Biologic determinants of tumor recurrence in stage II colon cancer: validation study of the 12-gene recurrence score in cancer and leukemia group B (CALGB) 9581. *J Clin Oncol* 2013; 31: 1775-1781
- Yothers G, O'Connell MJ, Lee M, et al. Validation of the 12-gene colon cancer recurrence score in NSABP C-07 as a predictor of recurrence in patients with stage II and III colon cancer treated with fluorouracil and leucovorin (FU/LV) and FU/LV plus oxaliplatin. *J Clin Oncol* 2013; 31: 4512-4519
- Srivastava G, Renfro LA, Behrens RJ, et al. Prospective multicenter study of the impact of oncoTYPE DX colon cancer assay results on treatment recommendations in stage II colon cancer patients. *Oncologist* 2014; 19: 492-497
- Reimers MS, Zeestraten EC, Kuppen PJ, et al. Biomarkers in precision therapy in colorectal cancer. *Gastroenterol Rep (Oxf)* 2013; 1: 166-183
- Reimers MS, Kuppen PJ, Lee M, et al. Validation of the 12-gene colon cancer recurrence score as a predictor of recurrence risk in stage II and III rectal cancer patients. *J Natl Cancer Inst* 2014; 106 (11). doi: 10.1093/jnci/dju269
- Salazar R, et al. Gene expression signature to improve prognosis prediction of stage II and III colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2011; 29 (1): 17-24
- Maak M, Simon I, Nitsche U, et al. Independent validation of a prognostic genomic signature (ColoPrint) for patients with stage II colon cancer. *Ann Surg* 2013; 257: 1053-1058
- Kopetz S, Taberno J, Rosenberg R, et al. Genomic classifier ColoPrint predicts recurrence in stage II colorectal cancer patients more accurately than clinical factors. *Oncologist* 2015; 20: 127-133
- Kennedy RD, Bylesjo M, Kerr P, et al. Development and independent validation of a prognostic assay for stage II colon cancer using formalin-fixed paraffin-embedded tissue. *J Clin Oncol* 2011; 29: 4620-4626
- Ghee C, Meropol NJ. Current status of gene expression profiling to assist decision making in stage II colon cancer. *The Oncologist* 2014; 19: 704-711

1.9.7. Циркулиращи туморни клетки

Борис Петров, Милчо Минчев

Молекулярна биология. Ролята на циркулиращи туморни клетки (ЦТК) като прогностичен биомаркер при колоректален карцином (КРК) е проучвана повече от 20 години. Най-често за маркиране на ЦТК са използвани антитела срещу епително клетъчната адхезивна молекула (ЕрСАМ), която се експресира върху клетки с епителна диференциация. Впоследствие ЦТК се идентифицират и изброяват на база на ядреното им оцветяване с 4,6-диамино-2-фенилиндола (DAPI), антицитокератин и анти-CD45-антитела, които различават CD45-епителни клетки от CD45+ левкоцити.

Аналитични методи за изследване. Единственият досега тест за детекция на ЦТК, одобрен от Американската Агенция за храна и лекарства (FDA), е системата CellSearch[®] (Janssen Diagnostics, LLC, Raritan, NJ), която използва покрити с антитяло ферофлуиди за разделянето им от нормални кръвни компоненти. Нормалните хематопоеични клетки не експресират повърхностни епителноклетъчни протеини, налични върху ЦТК. За увеличаване на специфичността, освен с DAPI, изолираните клетки се маркират и с флуоресцентно маркирано антитуморно антитяло. Автоматично получените изображения се анализират от патолог за оценка на брой на налични туморни клетки на база на комбинация от флуоресцентно имунооцветяване и морфология.

Разработени са различни други техники за детекция на ЦТК. Между тях е една микрофлуидно основана техника (lab-on-a-chip), която е доста обещаваща, но нейната по-добра чувствителност все още не е потвърдена в големи кохорти. Друг метод с повишена чувствителност използва намиране на промяна в електрическата проводимост, причи-

нена от наличие на магнитни имуночастици върху клетки, вместо да се разчита на анализ на изображение на отделени ЦТК. Подобно на флоуцитометрията, тази система позволява множество антигени да се свържат в клетката едновременно към множество флуоресцентно-маркирани антитела, като така се повишава специфичността.

Доказателства за предиктивно значение. В първото проспективно мултицентрово проучване при метастатичен КРК (мКРК) със системата CellSearch[™] са изброени ЦТК впроби от 7.5 mL кръв на 430 пациенти. Резултатите показват, че случаи, при които са установени ≥ 3 ЦТК/7.5 mL кръв, имат по-кратка средна и обща преживяемост (ОП), сравнени с пациенти с < 3 ЦТК ($p < 0.0001$); тези разлики остават налични през целия период на проследяване след лечение. Заключение е, че при мКРК броят на ЦТК е независим прогностичен фактор за преживяемост без прогресия (ПБП) и ОП в добавка на информация от образни изследвания.⁵ Повечето последващи ранни изследвания и един метаанализ с 3094 пациенти показват, че нива на ЦТК в периферна кръв >1 клетка/mL корелират с лоша прогноза по отношение на ПБП (HR 3.06; 95% CI 1.74-5.38).⁶ По-скорошен метаанализ на 1329 пациенти с мКРК с използване на антитяло към ЕрСАМ показва, че ОП (HR 2.47; 95% CI 1.74-3.51) и ПБП (HR 2.07; 95% CI 1.44-2.98) са по-кратки при пациенти с високи нива на ЦТК.⁷ Повечето от проучванията в този преглед и други 12 проучвания в метаанализ на други автори³ използват за идентифициране на ЦТК експресия на цитокератин 19 (СК19), СК20 или карциноембрионалния антиген (СЕА). За тези маркери е известно, че се експресират в голяма степен при ЦТК у пациенти с инфламаторни дебелочревни болести и са довели до неприемливо голям брой на фалшиво положителни резултати.^{2,4,8}

Промяната в броя на ЦТК се проучва и като сурогатен маркер за оценката на отговор към лечение. В проучване с 90 пациенти с КРК в стадий III, лекувани адювантно

с FOLFOX, продължаващото наличие на ЦТК след химиотерапия е отчетено като ефективен маркер за определяне на клиничния изход в лицето на ПБП (HR 6.27; 95% CI 2.44-16.12).⁹ В клинично проучване с четворна комбинация при авансирал КРК пациенти с висок брой на ЦТК, измерени чрез CellSearch, преживяват повече от очакваното в сравнение с контроли, докато пациенти с нисък брой на ЦТК имат допълнителна полза.¹⁰ В проучване с 239 неметастирали и потенциално лечими пациенти с КРК броят на ЦТК корелира позитивно с повишаване на стадия; стойност ≥ 1 ЦТК/mL кръв се оказва най-силен прогностичен фактор при КРК в стадий I-III (HR 5.5; 95% CI 2.3-13).^{6, 11} Не всички пациенти с наличие на ЦТК изживяват прогресия на болестта и обратно – при някои пациенти без ЦТК се появява прогресия.^{1, 4, 5, 12} В повечето случаи обаче ЦТК могат да се открият като доказателство

за метастазирание по-рано от образната диагностика (компютър-томография или ПЕТ/КТ).¹² В проучване на авансирал КРК с методика CellSearch броят на ЦТК преди и по време на лечение е независим прогностичен маркер за ПБП и ОП.¹³ Вече се приема, че епително-мезенхимната клетъчна трансформация (EMT+) при ЦТК води до фенотип на ранни ракови стволови клетки, експресиращи N-кадхерин, виментин и фибронектин^{16, 17} със загуба на ЕрСАМ^{15, 18}. Този фенотип е свързан с резистентност към химиотерапия и лъчелечение.¹⁹ В тези случаи методологията, основана на висока експресия на ЕрСАМ, е компрометирана и подценява реалния брой на ЦТК, което води до възможен пропуск за предсказване на прогресия на болестта.¹⁴ Поради това тези методики имат ниска чувствителност и специфичност.²⁰⁻²²

С

- Изследване на циркулиращи туморни клетки като предиктивен маркер за лечение на колоректален карцином не се препоръчва извън клинични проучвания.
- Циркулиращи туморни клетки при колоректален карцином може да се обсъждат за оценка на прогноза и мониторинг на отговор към терапия.



При пациенти с колоректален карцином в стадий II-III, в добавка към други клиникопатологични характеристики на тумора, може да се препоръча анализ на циркулиращи туморни клетки като критерий, определящ нужда от адювантна химиотерапия.

ЛИТЕРАТУРА

1. Hardingham JE, et al. Detection of circulating tumor cells in colorectal cancer by immunobead-PCR is a sensitive prognostic marker for relapse of disease. *Mol Med* 1995; 1: 789-794
2. Hardingham JE, et al. Molecular detection of blood-borne epithelial cells in colorectal cancer patients and in patients with benign bowel disease. *Int J Cancer* 2000; 89: 8-13
3. Sergeant G, Penninckx F, Topal B. Quantitative RT-PCR detection of colorectal tumor cells in peripheral blood—a systematic review. *J Surg Res* 2008; 150: 144-152

4. Lloyd JM, et al. Identification of early-stage colorectal cancer patients at risk of relapse post-resection by immunobead reverse transcription-PCR analysis of peritoneal lavage fluid for malignant cells. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 417-423
5. Cohen SJ, et al. Relationship of circulating tumor cells to tumor response, progression-free survival, and overall survival in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2008; 26: 3213-3221
6. Rahbari NN, et al. Meta-analysis shows that detection of circulating tumor cells indicates poor prognosis in patients with colorectal cancer. *Gastroenterology* 2010; 138: 1714-1726
7. Groot Koerkamp B, Rahbari N, Büchler M, et al. Circulating tumor cells and prognosis of patients with resectable colorectal liver metastases or widespread metastatic colorectal cancer: a meta-analysis. *Ann Surg Oncol* 2013; 20: 2156-2165
8. Pantel K, et al. Circulating epithelial cells in patients with benign colon diseases. *Clin Chem* 2012; 58: 936-940
9. Lu CY, et al. Circulating tumor cells as a surrogate marker for determining clinical outcome to mFOLFOX chemotherapy in patients with stage III colon cancer. *Br J Cancer* 2013; 108: 791-797
10. Krebs MG, et al. Circulating tumor cell enumeration in a phase II trial of a four-drug regimen in advanced colorectal cancer. *Clin Colorectal Cancer* 2015; 14: 115-122
11. Bork U, et al. Circulating tumour cells and outcome in non-metastatic colorectal cancer: a prospective study. *Br J Cancer* 2015; 112: 1306-1313
28. Paterlini-Brechot P, Benali NL. Circulating tumor cells (CTC) detection: clinical impact and future directions. *CancerLett* 2007; 253: 180-204
12. Krebs MG, Hou JM, Ward TH, et al. Circulating tumour cells: their utility in cancer management and predictive outcomes. *Ther Adv MedOncol* 2010; 2: 351-365
13. Tol J, et al. Circulating tumour cells early predict progression-free and overall survival in advanced colorectal cancer patients treated with chemotherapy and targeted agents. *Ann Oncol* 2010; 21: 1006-1012
14. Grover PK, Cummins AG, Price TJ, et al. Circulating tumour cells: the evolving concept and the inadequacy of their enrichment by EpCAM-based methodology for basic and clinical cancer research. *AnnOncol* 2014; 25: 1506-1516
15. Gorges T, et al. Circulating tumour cells escape from EpCAM-based detection due to epithelial-to-mesenchymal transition. *BMC Cancer* 2012; 12: 178
16. Polyak K, Weinberg RA. Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nat Rev Cancer* 2009; 9: 265-273
17. Bednarz-Knoll N, Alix-Panabières C, Pantel K. Plasticity of disseminating cancer cells in patients with epithelial malignancies. *Cancer Met Rev* 2012; 31: 673-687
18. Mani SA, et al. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* 2008; 133: 704-715
19. Mitra A, Mishra L, Li S. EMT, CTCs and CSCs in tumor relapse and drug-resistance. *Oncotarget* 2015; 6: 10697-10711
20. Wicha MS, Hayes DF. Circulating tumor cells: not all detected cells are bad and not all bad cells are detected. *J Clin Oncol* 2011; 29: 1508-1511
21. van de Stolpe A, Pantel K, Sleijfer S, et al. Circulating tumor cell isolation and diagnostics: toward routine clinical use. *Cancer Res* 2011; 71: 5955-5960
22. Paterlini-Brechot P. Circulating tumor cells: who is the killer? *Cancer Microenviron* 2014; 7: 161-176

1.10. ПРЕДИКТИВНИ БИОМАРКЕРИ ПРИ АНАЛЕН КАРЦИНОМ

1.10.1. HPV-статус и p16/p18-експресия

Светлана Христова, Мариела Василева

Молекулярна биология. Човешките папилома вируси (HPVs) показват голямо разнообразие от генотипове. Идентифицирани и изцяло секвенирани са 85 типа, а повече от 120 типа са частично анализирани. Всички типове инфектират епителни клетки на аногенитална или орофарингеална лигавица.¹ Геномът на HPVс представлява 8 килобази двойноверижна циркулярна ДНК с ранен регион, който кодира протеини E1, E2, E4, E5, E6 и E7, и късен регион, който кодира два структурни капсулни протеина – L1 (голям капсулен протеин) и L2 (малък капсулен протеин). Тези два региона са разделени от некодиращ регулаторен участък, съдържащ четири места за свързване на E2 или други клетъчни транскрипционни фактори. Протеин E2 е експресиран, когато геномът на HPV е останал в своята циркулярна плазмидна форма, т.е. физически е разделен от хромозомната ДНК на клетката гостоприемник. Когато всичките четири свързващи места на регулаторния участък са свързани с E2, експресията на E6- и E7-онкогените е подтисната и тяхната онкогенна функция е отслабена. Една от стъпките на малигнена трансформация е интегрирането на HPV-ДНК в хромозомна ДНК на гостоприемната клетка. Разцепването обикновено се осъществява в E2-кодиращия регион и когато HPV-ДНК се интегрира в ДНК на гостоприемника, експресията на E2 се нарушава; местата за свързване на E2 в некодиращия участък вече не са заети, експресията на E6 и E7 не е подтисната и това определя повишен капацитет за клетъчна трансформация. Тип 16 HPV кодира E6 и E7, които се свързват с ключови клетъчни тумор-супресори. По правило E6 се свързва с p53, което води до дерегулация в сигналните вериги на

ДНК и редуция на апоптоза. Обикновено E7 се свързва с pRb и така определя повишен клетъчна пролиферация и геномна нестабилност.^{2,3}

Развитие на плоскоклетъчен анален карцином (АК) е в пряка връзка с HPV-инфекция. Висок риск за прекурсорна интраепителна неоплазия (АИН) и АК е персистираща HPV-инфекция, главно субтипове HPV16/HPV18.^{4,6} Над 93% от АК е асоцииран с HPV. Най-често (85%) се доказва HPV16 и значително по-рядко – тип 18.⁵ Обобщени данни от 35 ретроспективни системни проучвания върху анални биопсии показват наличие на HPV16/18 в 72% от пациенти с инвазивен плоскоклетъчен карцином. Заедно с АИН честотата достига до 80-85%.⁶⁻⁹

Аналитични методи за изследване. Основните рутинни и/или скринингови методи са микроскопско изследване на цитонамазки и биопсии от суспектни лезии (АИН/АК) за откриване на характерни HPV-контаминирани епителни клетки – койлоцити.⁷ Чрез специфични биомаркери доказване на HPV позитивност при анални лезии може да бъде осъществено по два метода: молекулярно-генетичен PCR-анализ за откриване на вирусна ДНК върху цитологични или биопсични материали или имунохистохимично (ИХХ) чрез верифициране на вирусни протеини.^{10,11} Най-често използван е ИХХ-метод за доказване на E6-протеин чрез анти тяло p16INK4a. Резултати от неголеми серийни проучвания, включващи малък брой пациенти с АК, определят широки граници на чувствителност за p16INK4a ИХХ-позитивност – от 22% до 100%.^{5,11-14} Според различните диагностични платформи стойността, чувствителността и сензитивността на PCR-тестване за p16 при АК не е напълно дефинирана.¹² Понастоящем препоръките на Американската Агенция за храна и лекарства (FDA) с приложимост за молекулярна диагностика на HPV-позитивност при АК включват само Hybrid Capture 2 HPV-тест.¹⁵

Доказателства за предиктивно значение. За разлика от други органични локализации, самостоятелно предиктивно значение на анална HPV-инфекция е в процес на проучване. Усилията са насочени преди всичко към над 29 молекулярни биомаркера, свързани с HPV дерегулация – p16, Ki-67, MCM7, K17, K7, K2 и HPV E4, но без доказана ефективност. Предполага се добър отговор към лъчехимиолечение (ЛХЛ) при с HPV-позитивност в асоциация с “див” тип тумор-супресорен ген P53. Според рандомизиран анализ върху 240 пациенти с HPV-позитивен АК мутации в p53 са определящи за по-лоша прогноза и преживяемост.¹⁶ Други проучвания акцентират върху комбинация на HPV-

геномна позитивност и ИХХ p16INK4a-експресия. Пациентите са третирани с ЛХЛ или само с лъчелечение; HPVp16 е установен в 81.0% от изследваните биопсии, HPVp18 – в 2.2% и корелира със значимо увеличаване на общата преживяемост и преживяемостта без болест при пациенти в клиничен стадий I-III, сравнено с HPVp16-негативна контролна група.^{15, 17-19} Очакван допълнителен терапевтичен подход при метастатичен АК като втора линия след ЛХЛ е имунотерапия според фаза II на клинично мултицентрично проучване ADXS11-001.²⁰

С

- При пациенти с анален карцином може да се обсъжда имунохистохимично изследване на p16INK4a или молекулярна диагностика чрез Hybrid Capture 2 HPV-тест като прогностични фактори.
- Имунохистохимично доказване на p16INK4a-експресия върху биопсични материали се препоръчва като допълнителен метод за верификация на анални HPV-асоциирани плоскоклетъчни интраепителни лезии и преканцерози (AIN).
- Не се препоръчва скрининг или рутинно изследване на HPV-статус при анален карцином.



- *Имунохистохимична верификация на p16INK4a не се изисква като рутинен допълнителен диагностичен метод за откриване на HPV-свързани морфологични промени върху анални биопсии.*
- *Имунохистохимично изследване на p16 би трябвало да се използва при несъответствие в професионалната хистологична интерпретация на нискостепенни/високостепенни интраепителни неоплазии (AIN).*
- *Лаборатории, извършващи HPV-диагностика, трябва да разполагат със стандартизирана процедура и качествен контрол на диагностика.*

ЛИТЕРАТУРА

- Hausen H. Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92 (9): 690-698
- Zheng Z, Baker C. Papillomavirus genome structure, expression, and post-transcriptional regulation. *Front Biosci* 2006; 11: 2286-2302
- Thomas M, Pitot H, Liem A. Dominant role of HPV16 E7 in anal carcinogenesis. *Virology* 2011; 421 (2): 114-118
- Kutlubay Z, Engin B, Zara T. Anogenital malignancies and premalignancies: Facts and controversies. *Clinics Dermatol* 2013; 31 (4): 362-373
- Hoots BE, Palefsky JM, Pimenta JM, Smith JS. Human papillomavirus type distribution in anal cancer and anal intraepithelial lesions. *Int J Cancer* 2009; 124 (10): 2375-2383
- Serup-Hansen E, Linnemann D, Skovridner-Ruminski W, et al. Human papillomavirus genotyping and p16 expression as prognostic factors for patients with American Joint Committee on Cancer stages I to III carcinoma of the anal canal. *J Clin Oncol* 2014; 32 (17): 1812-1817
- Cotter M, Sheahan K. The pathology of anal dysplasia. *Diagn Histopathol* 2013; 19 (11): 419-425
- Smith E, Capogrossi K, Estabrooks P. School wellness policies: effects of using standard templates. *Am J Prev Med* 2012; 43: 304-308
- Johnson L, Madeleine M, Newcomer L, et al. Anal cancer incidence and survival: the surveillance, epidemiology, and end results experience, 1973-2000. *Cancer* 2004; 101: 281-288
- Surveillance Research Program. SEER stat fact sheets: Anal Cancer. Bethesda, MD: National Cancer Institute, 2015
- Leeds IL, Fang SH. Anal cancer and intraepithelial neoplasia screening: A review. *World J Gastrointest Surg* 2016; 8 (1): 41-51
- Welton ML, Lambert R, Bosman FT. Tumours of anal canal. Bosman FT, Carneiro F, Hruban RH, Theise ND (Eds). WHO classification of tumours of digestive system. IARC press: Lyon, 4th ed., 2010; 185-93
- Castle P, Follansbee S, Borgonovo S. A comparison of human papilloma virus genotype-specific DNA and E6/E7 mRNA detection to identify anal precancer among HIV-Infected men who have sex with men. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2013; 22 (1): 42-49
- Darragh TM, Colgan TJ, Cox JT, et al. The lower anogenital squamous terminology standardization project for HPV-associated lesions: background and consensus recommendations from the college of American Pathologists and the American Colposcopy and Cervical Pathology. *Arch Pathol Lab Med* 2012; 136: 1e32
- Maia L, Marinho L, Bocca A, et al. Hybrid capture II and PapilloCheck² tests for detection of anal high-risk human papillomavirus. *Rev Soc Bras Med Trop* 2014; 47(2). Available at: <http://dx.doi.org/10.1590/0037-8682-0081-2012>
- Glynn-Jones R, Nilsson PJ, Aschele C, et al. Anal cancer: ESMO-ESSO-ESTRO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2014; 25 (Suppl 3): iii10-iii20
- Koerber SA, Schoneweg C, Slynko A, et al. Influence of human papillomavirus and p16^{INK4a} on treatment outcome of patients with anal cancer. *Radiother Oncol* 2014; 113 (3): 331-336
- Hansen E, Linnemann D, Skovridner-Ruminski W, et al. Human papillomavirus genotyping and p16 expression as prognostic factors for patients with American Joint Committee on Cancer stages I to III carcinoma of the anal canal. *J Clin Oncol* 2014; 32 (17): 1812-1817
- Meulendijks D, Tomaso N, Dewit L. HPV-negative squamous cell carcinoma of the anal canal is unresponsive to standard treatment and frequently carries disruptive mutations in TP53. *British J Cancer* 2015; 112: 1358-1366
- Phase 2 Study of ADXS11-001 in subjects with carcinoma of the anorectal canal. Phase 2 study of ADXS11-001 in subjects with carcinoma of the anorectal canal. ClinicalTrials.gov. N.p., n.d. Web. 07 May 2017

1.10.2. HIV-статус и CD4+ клетъчен брой

Яна Бочева, Веселина Колева

Молекулярна биология. Известно е, че заболяемостта от анален карцином (АК) сред HIV-позитивни хомосексуални мъже, HIV-негативни хомосексуални мъже и жени, практикуващи анален секс, е повишена. Този тип неоплазия е два пъти по-честа при HIV-позитивни хомосексуални мъже спрямо HIV-негативни и от 4-30 пъти по-рядка при HIV-позитивни жени в САЩ.^{1,2} Счита се, че заболяемостта от инвазивен АК не корелира с CD4-клетъчният брой в периферна кръв, но има публикации, отчитащи, че нисък CD4-клетъчен брой повишава риска от болестта.^{3,4} Пациенти с продължителност на HIV-инфекция, по-голяма от 15 години, имат 12 пъти по-висок индекс на заболяемост от тези с до 5 години. Въпреки повишаващият се брой на пациенти на високо активна антиретровирусна терапия (НААРТ), рискът от заболяване не намалява в конкретната група.^{4,6} Като застрашена популация се отбелязват и хора с имуноен дефицит от различна генеза – след органна трансплантация, продължителна химиотерапия, автоимунни заболявания и др.⁷

Аналитични методи за изследване. Методологичните секции в различните публикации, третиращи използването на резултати от определяне на CD4-клетъчен брой, визират най-често пет различни техники: TruCOUNT, Dual Platform, FACSCount, Easy CD4 и CyFlow. Към момента BD FACSCount се определя като референтна аналитична техника.^{23,24}

Доказателства за предиктивно значение. Голямо ретроспективно проучване, включващо 33420 HIV-позитивни и 66840 HIV-негативни пациенти, проследява ролята

на не-СПИН-свързана онкологична болест в двете групи в продължение на 5.1 години. Резултатите показват, че АК е сред най-често установените неоплазии и честотата му не намалява, независимо от ранно започване на антиретровирусна терапия. Установена е статистически значима разлика в имunosупресията между групи на HIV-инфектирани със и без наличие на АК: среден брой CD4+ Т-лимфоцити 156 клетки/mm³ при АК срещу 270 клетки/mm³ при пациенти без АК ($p < 0.001$), което е с 42% по-нисък брой.⁸ Според проспективно проучване сред кохорта от 23 437 HIV-позитивни пациенти, третиращо рисков фактори за смъртност в тази група, се установява че тежестта на имunosупресията е силен предиктор за смърт от онкологична болест при HIV-позитивни пациенти. Резултатите показват, че смъртността от СПИН-свързан карцином намалява статистически значимо в групата пациенти с брой CD4+ > 500 клетки /mm³.^{3,9}

Въпреки някои публикации за повишена токсичност на едновременно лъчехимиолечение (ЕЛХЛ) с цел запазване на сфинктерна функция, тя е адаптирана и за HIV-позитивни пациенти. Конкретни студии маркират CD4-клетъчен брой под 200 mm³ към момента на диагностициране на карцинома като рисков гранична стойност (cut off) за повишаване на токсичните ефекти от терапия.¹⁰ В същото проучване се посочва, че макар свързаната с лечението вторична болестност да е повишена в групата с CD4-клетъчен брой под 200 mm³ при диагностициране, седем от осем случая достигат пълен контрол на болестта. Повечето проучвания, коментиращи токсичност, изход и стандартни показатели за преживяемост на HIV-позитивни спрямо HIV-негативни кохорти, са ретроспективни; малка част от тях извеждат по-лоши показатели и повишена токсичност в HIV-позитивната група.^{11,12} По отношение на петгодишен пълен терапевтичен отговор повечето студии не отчитат разлика в резултатите на двете групи.¹²⁻¹⁵ В проучванията не се отчита разлика по отношение на токсичност, ефикасност от ЕЛХЛ, както

и двегодишен период на преживяемост при сравнение на HIV-позитивни спрямо HIV-негативни групи.¹⁴⁻¹⁶ Няма данни доколко добрата поносимост на HAART е причина за добър изход в посттерапевтичния период при HIV-позитивни пациенти. На практика последните данни от скорешни и по-високобройни проучвания отхвърлят тезата за зависимост на изхода, посттерапевтичната токсичност и нейната тежест от CD4-клетъчния брой при старт на терапията, независимо от провеждане на HAART, както и типа на 5-fluorouracil-базирано EЛХЛ – инфузионна или перорална.¹⁷⁻²¹ Последни проучва-

ния установяват статистически значимо намаление на CD4-клетъчен брой след EЛХЛ, което персистира около година.^{21,22} В едно от тези студии 6% от пациентите умират по време на ремисия от опортюнистични инфекции и вторични неоплазии, свързани с имуносупресия, израз на която е заниженият CD4-клетъчен брой.²¹ Тези данни акцентират върху необходимостта от стриктен контрол върху HIV-позитивни пациенти след EЛХЛ по отношение на вторични неоплазии и опортюнистични инфекции.

В

- Препоръчва се използване на едновременно лъчехимиолечение при HIV-позитивни пациенти с анален карцином, независимо от претерапевтичния CD4-клетъчен брой в периферна кръв.
- При HIV-позитивни пациенти с анален карцином не се препоръчва проследяване на динамиката в пре- и посттерапевтичен CD4-клетъчен брой като предиктивен фактор за лъчехимиотерапевтична токсичност и лош терапевтичен изход.
- Препоръчва се оценка на степен на имуносупресия като прогностичен фактор за смъртност от анален карцином.



- *Стартиране на антиретровирусна терапия незабавно след установяване на HIV-позитивен статус не води до намален риск от развитие и смъртност от анален карцином.*
- *За оценка на риск от анален карцином при HIV-инфектирани пациенти се препоръчва проследяване на количество на CD4+ T-хелперни лимфоцити в периферна кръв.*

ЛИТЕРАТУРА

1. Silverberg MJ, et al. Risk of anal cancer in HIV-infected and HIV-uninfected individuals in North America. *Clin Infect Dis* 2012; 54 (7): 1026-1034
2. Stier EA, et al. Prevalence of anal human papillomavirus infection and anal HPV-related disorders in women: a systematic review. *Am J Obstet Gynecol* 2015; 213 (3): 278-309
3. Frisch M, Biggar RJ, Goedert JJ. Human papillomavirus-associated cancers in patients with human immunodeficiency virus infection and acquired immunodeficiency syndrome. *J Natl Cancer Inst*

- 2000; 92: 1500-1510
4. Patel P, Hanson DL, Sullivan PS, et al. Incidence of types of cancer among HIV-infected persons compared with the general population in the United States, 1992-2003. *Ann Intern Med* 2008; 148: 728-736
 5. Powles T, Robinson D, Stebbing J, et al. Highly active antiretroviral therapy and the incidence of non-AIDS-defining cancers in people with HIV infection. *J Clin Oncol* 2009; 27: 884-890
 6. Crum-Cianflone NF, Hullsiek KH, Marconi VC, et al. Anal cancers among HIV-infected persons: HAART is not slowing rising incidence. *AIDS* 2010; 24: 535-543
 7. UCSF Anal Dysplasia Clinic. Information about anal cancer, HSIL and LSIL. Accessed Dec 29 2016
 8. Bedimo RJ, McGinnis KA, Dunlap M, et al. Incidence of non-AIDS-defining malignancies in HIV-infected versus noninfected patients in the HAART era: impact of immunosuppression. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2009; 52: 203-208
 9. Monforte A, Abrams D, Pradier C, et al. HIV-induced immunodeficiency and mortality from AIDS-defining and non-AIDS-defining malignancies. *AIDS* 2008; 22: 2143-2153
 10. Hoffman R, Welton ML, Klencke B, et al. The significance of pretreatment CD4 count on the outcome and treatment tolerance of HIV-positive patients with anal cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1999; 44: 127-131
 11. Grew, et al. HIV Infection is associated with poor outcomes for patients with anal cancer in the highly active antiretroviral therapy era. *Dis Colon Rectum* 2015; 58 (12): 1130-1136
 12. Oehler-Jänne, et al. HIV-specific differences in outcome of squamous cell carcinoma of the anal canal: a multicentric cohort study of HIV-positive patients receiving highly active antiretroviral therapy. *J Clin Oncol* 2008; 26 (15): 2550-2557
 13. Chiao EY, Giordano TP, Richardson P, El-Serag HB. Human immunodeficiency virus-associated squamous cell cancer of the anus: epidemiology and outcomes in the highly active antiretroviral therapy era. *J Clin Oncol* 2008; 26 (3): 474-479
 14. Seo Y, Kinsella MT, Reynolds HL, et al. Outcomes of chemoradiotherapy with 5-Fluorouracil and mitomycin C for anal cancer in immunocompetent versus immunodeficient patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2009; 75 (1): 143-149
 15. White EC, Khodayari B, Erickson KT, et al. Comparison of toxicity and treatment outcomes in HIV-positive versus HIV-negative patients with squamous cell carcinoma of the anal canal. *Am J Clin Oncol* 2014, doi: 10.1097/COC. 0000000000000172
 16. Coghill AE, Shiels MS, Suneja G, Engels EA. Elevated cancer-specific mortality among HIV-infected patients in the United States. *J Clin Oncol* 2015; 33 (21): 2376-2383
 17. Edelman S, Johnstone PA. Combined modality therapy for HIV-infected patients with squamous cell carcinoma of the anus: outcomes and toxicities. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2006; 66: 206-211
 18. Wexler A, Berson AM, Goldstone SE, et al. Invasive anal squamous-cell carcinoma in the HIV-positive patient: outcome in the era of highly active antiretroviral therapy. *Dis Colon Rectum* 2008; 51: 73-81
 19. Seo Y, Kinsella MT, Reynolds HL, et al. Outcomes of chemoradiotherapy with 5-Fluorouracil and mitomycin C for anal cancer in immunocompetent versus immunodeficient patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2009; 75: 143-149
 20. Barriger RB, Calley C, Cardenas HR. Treatment of anal carcinoma in immunocompromised patients. *Clin Transl Oncol* 2009; 11: 609-614
 21. M. Alfa-Wali, et al. Chemoradiotherapy for anal cancer in HIV patients causes prolonged CD4 cell count suppression. *Ann Oncol* 2012; 23: 141-147
 22. Fraunholz I, Weiss C, Eberlein K, et al. Concurrent chemoradiotherapy with 5-fluorouracil and mitomycin C for invasive anal carcinoma in human immunodeficiency virus-positive patients receiving highly active antiretroviral therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2010; 76: 1425-1432
 23. Scott LE. Choosing a new CD4 technology: Can statistical method comparison tools influence the decision? *Cytometry B Clin Cytom* 2017; doi: 10.1002/cyto.b.21522
 24. Peeling RW, et al. CD4 enumeration technologies: a systematic review of test performance for determining eligibility for antiretroviral therapy. *PLoS ONE* 2015; 10 (3): e0115019

1.11. ПРЕДИКТИВНИ БИОМАРКЕРИ ПРИ НЕВРОЕНДОКРИННИ ТУМОРИ

1.11.1. Ki-67-пролиферативен индекс и митотичен брой

Савелина Поповска, Тихомир Диков

Молекулярна биология. Невроендокринните тумори (НЕТи) са неоплазми, характеризиращи се с невроендокринна диференциация, които могат да възникват първично в различни анатомични локализации. По правило НЕТи имат свои клинични и биологични особености, които ги отличават в различна степен едни от други.¹⁻⁴ Освен хистологичните характеристики и експресията на невроендокринни маркери, важен компонент от морфологичната диагноза е определяне на степен на малигненост (хистологичен грейдинг, G), която се базира на пролиферативен (Ki-67) индекс и брой митози на единица площ.¹⁻⁴ Към настоящия момент съществуват редица организации, посветили дейността си на НЕТи, и редица ръководства, в които са включени основни препоръки за градирането им.⁵

Ki-67 е събирателно понятие за група нехистонови протеини, експресирани във всяка клетка във фаза на делене, без G0. В рутинната практика се използва анти тяло клон MIB-1 за целите на имунооцветяване и визуализация на ядра на клетки с пролиферативен потенциал. Факторите, влияещи на експресията, са свързани с пред- и интрааналитични моменти – лабораторен метод, дебелина на срез, плътност на сигналите, преценка на позитивност и др. Препоръчва се броене само на добре различими, тъмнокафяви сигнали при липсващо цитоплазмено неспецифично маркиране.⁶

Аналитични методи за изследване. За определяне на митотичен индекс се препоръчва поле на голямо увеличение (ПГУ) – 400x (40x обектив, 10x окуляр). Разнообразието

от производители налага преизчисляване в случаите с различни стойности на увеличението на обектива и окуляра. При броене на митози на определена площ първоначално следва да се калкулира размерът на видимото поле при дадено увеличение в средината равнина на виждане чрез диаметъра на диафрагмата на окуляра с помощта на линейка. Определянето на брой митози се свежда до три опции: (1) докладване на изчислен брой митози на брой туморни клетки, т.нар. митотичен индекс, напр. “n брой/100 туморни клетки”; (2) митотичен брой на единица измерена площ, напр. “n брой/мм²”; (3) комбинация от двете възможности за отчитане – често публикуваните препоръки не уточняват как точно да се докладва резултатът.

Методите за броене са мануално преброяване и анализ на дигитален образ. Съчетанието от камера-образ (cam-capture) или принтирана версия на екран с последващо мануално броене се счита за практична, възпроизводима и ефективна система за премятане на Ki-67-индекс по отношение на цена/качество.⁷⁻⁹ В етап на валидация е и първи по рода си хибриден метод, използващ митотично-специфичен имунохистохимичен маркер при НЕТ, фосфохистон H3, като първоначалните съобщения докладват добра конкордантност с опитна преценка на митотичен брой върху рутинно оцветен препарат.¹⁰

Съчетанието на митотичен брой и пролиферативна активност са в основата на класификационно-диагностични и прогностични и алгоритми при НЕТ. През 2006 г. е публикувана първата TNM-класификация по предложение на ENETS за невроендокринни тумори в определени анатомични отдели на гастроинтестиналния тракт (ГИТ). Акцентира се върху пролиферативната активност на туморната популация чрез комбинирано броене на митотични фигури и положителни Ki-67-сигнали и се утвърждават като

ефективен прогностичен биомаркер при пациенти с НЕТ на панкреас и други органи на ГИТ, оставяйки на заден план цитологичната атипия и дисеминация на туморите.

Пролиферативният статус разпределя туморите в три обособени категории: (i) G1, < 2 митози на 2 mm² (проектиращо се в 10 ПГУ) и/или Ki-67-индекс ≤ 2%; (ii) G2, 3-20 митози на 2 mm² и/или Ki-67-индекс 3-20%; (iii) G3, 21 или повече митози на 2 mm² и/или Ki-67-индекс > 20%. Препоръката е изброяване на митози върху Н&Е оцветен слайд на единица площ, равна на 2 mm², кореспондираща на 10 полета голямо увеличение 40x. В допълнение, препоръката е да се изброят поне 40 ПГУ, когато е възможно, в зони с висока честота на митотични фигури и само след преглед на всички налични препарати.¹¹ Минималният брой ПГУ, обаче, не е отбелязан изрично, когато се борави с лимитиран по обем биопсичен материал. Ki-67-индекс е дефиниран като брой положително маркирани ядра при оценка на 2000 туморни клетки в зони с висока концентрация на сигнали, без да са налице препоръки дали да се насочи вниманието към изолирана зона, или да се сумират няколко горещи зони. В допълнение, отсъства базиран на доказателства алгоритъм за справяне със ситуации, в които митотичен сбор и Ki-67-индекс са разнопосочни и осигуряват миграция на тумора в различна G-категория, както и в случаите с биопсичен материал от първичен тумор и метастатичен депозит. За да стандартизира Ki-67-индексът, ENETS по-късно публикува нова препоръка за оценка на 100 туморни клетки в гореща зона и с готовност за оценка на няколко зони при наличен висок вътретуморен хетерогенитет.¹² Първата валидация на предложената система за градиране е осъществена от *Pape et al.*¹³ върху 131 панкреасни НЕТ; докладва се значимо по-ниска преживяемост при G2 и G3.

През 2009 г. AJCC публикува Седма редакция на TNM с НЕТ-класификация и с известни разлики в терминологията, въвеждайки промени само в частта със стадиране

на НЕТ, без да адресира градирането им.¹⁴ В публикацията на WHO от 2010 г. важен принцип, залегнал в предложението за класификация, е ясното разграничение между хистологични модификатори (градиране, еднакво за всички гастроинтестинални локализации) и стадиране, базирано на AJCC/TNM 7. Понастоящем WHO 2010 ревизията разделя НЕТ в три групи: (i) невроендокринни тумори *grade1* или G1 НЕТ, (ii) невроендокринни тумори *grade2* или G2 НЕТ и (iii) невроендокринни карциноми, *grade 3* или G3 НЕК, разделени на дребноклетъчен и едроклетъчен вариант. Хистологичното градиране се базира на морфологични критерии и пролиферативна фракция според схемата на ENETS и при идентични разграничителни стойности (cut-offs), но с леки нюанси: броенето следва да се базира на 50 ПГУ при размер на полето, равно на 0.2 mm², т.е. площ с размери 10 mm². Ki-67-индекс се изчислява като процент положителни клетки при преброяване на 500-2000 клетки. Ако митотичен брой и Ki-67-индекс се разминават, докладва се по-високият грейдинг, двете изследвания са комплементарни и не са реципрочно заменяеми.³ В скорешни публикации *Basturk et al.* акцентират върху митотичен брой/Ki-67-индекс дискордантни случаи; в категорията G2 НЕТ е установена по-добра преживяемост с G2 митотичен брой и G3 Ki-67-индекс в сравнение с G3 НЕК и G2 НЕТ с конкордантни митотичен брой и Ki-67-индекс.¹⁵ *Yamaguchi T, et al.* установяват, че разделянето на НЕТи на ниска/умерена степен на малигненост на база Ki-67-индекс от 3% предсказва по-добре потенциала на туморите да метастазират и рецидивират.¹⁶ Съгласно дефинициите в уводната част на същата публикация G1 и G2 НЕТи са добре диференцирани неоплазии, които все пак носят определен малигнен потенциал и не се препоръчва употребата на термини като *карциноид* или *атипичен карциноид*. В практиката, обаче, е възможна необичайна комбинация от хомогенна туморна тъкан с характеристики на високодиференцирана невроендокринна

неоплазия (недребноклетъчна/недроклетъчна характеристика), но с пролиферативна фракция, надхвърляща прага за диагноза НЕК, или нискодиференцирана неоплазма с ниски абсолютни стойности на митотичен брой и/или Ki-67-индекс, както и микстури от различни варианти в единна туморна маса. На този етап, поне при панкреасни НЕТ, е допустимо използване на G3 НЕТ категория⁶, но отделните морфологични и градиращи находки следва детайлно да бъдат отразени в биописичния доклад и реферирани към специализирано диагностично заведение с готовност за допълнителна типизация.

Доказателства за предиктивно значение. Според обобщени данни от последните години Ki-67-индексът и митотичният индекс при гастро-ентеро-панкреатични НЕТи са утвърдени като прогностични фактори, както и като фактори, подпомагащи избора на терапевтичен подход. Така например гастро-ентеро-панкреатични НЕТи с Ki-67-индекс < 2% (Grade 1) е предиктивен спрямо соматостатинова таргетна терапия (напри-

мер с *octreotide*). Ниско диференцирани NEC, при които Ki-67-индексът надхвърля 70% не показват добър отговор към соматостатинова таргетна терапия. Друг пример за предиктивната роля на Ki-67 е по-добрият отговор на пациенти с панкреатични НЕТ и Ki-67 > 5% към комбинирана химиотерапия с *capecitabine* и *temozolomide* спрямо пациенти с Ki-67 < 5% на същата терапия. В цитирания обзор се посочва и предиктивност за по-добър отговор към химиотерапия с платинов дублет при случаи на G3 НЕТи с Ki-67 > 55% спрямо случаите с Ki-67 < 55%.¹⁷ За разлика от гастро-ентеро-панкреатичните НЕТ, ролята на Ki-67-индекса при невроендокринни тумори на белия дроб в предиктивно отношение далеч не е така ясна. Ki-67-индексът се използва в подкрепа на диагностиката, заедно с другите морфологични параметри, като по този начин косвено подобрява шанса за терапевтичен отговор.^{17,18} С времето Ki-67-индексът може да се променя в хода на болестта и в контекста на лечението при даден пациент.¹⁸

A

- При невроендокринни тумори се препоръчва задължително хистологично степенуване според брой митози и пролиферативна активност, определена имунохистохимично с Ki-67-ядрена експресия.
- Препоръчва се определяне на митотичен/пролиферативен индекс чрез светлинна микроскопия и имунохистохимично изследване.
- При метастатични невроендокринни тумори се препоръчва степенуване като база за избор на системна терапия (соматостатин-рецепторни анализи, mTOR-инхибитори, химиотерапия и др.).



- *Степенуването на невроендокринни тумори трябва да бъде съобразено с тяхната локализация (бял дроб, гастроинтестинален тракт) и/или органен произход.*



- При противоречие между пролиферативен индекс и митотичен брой се приема този, определящ по-висока категория.
- Задължително трябва да се съблюдава площта, върху която се отчитат митози и пролиферативен индекс (да отговаря на изискваната от ръководствата).

ЛИТЕРАТУРА

1. Kunz PL. Carcinoid and neuroendocrine tumors: building success. *J Clin Oncol* 2015; 33: 1855-1863
2. Amin MB, Edge S, Greene F, et al. AJCC Cancer Staging Manual. (8th Edition). New York: Springer-Verlag, Nov 2016
3. Bosman F, Carneiro F, Hruban R, Theise N (Eds.) WHO Classification of Tumours of the Digestive System 4th Edition, IARC, Lyon 2010
4. Travis W, Brambilla E, Burke A, Marx A, Nicholson A (Eds.) WHO Classification of tumours of the lung, pleura, thymus and heart, 4th Edition, IARC, Lyon 2015
5. Ong ES Neuroendocrine Tumors Guidelines Updated: Dec 15, 2016. Available at: <http://emedicine.medscape.com/article/2500010-overview>
6. Reid MD, Balci S, Saka B, Adsay NV. Neuroendocrine tumors of the pancreas: current concepts and controversies. *Endocr Pathol* 2014; 25 (1): 65-79
7. Kroneman TN, Voss JS, Lohse CM, et al. Comparison of three Ki-67 index quantification methods and clinical significance in pancreatic neuroendocrine tumors. *Endocr Pathol* 2015; 26 (3): 255-262
8. Tang LH, Gonen M, Hedvat C, et al. Objective quantification of the Ki67 proliferative index in neuroendocrine tumors of the gastroenteropancreatic system: a comparison of digital image analysis with manual methods. *Am J Surg Pathol* 2012; 36 (12): 1761-1770
9. Reid MD, Bagci P, Ohike N, et al. Calculation of the Ki67 index in pancreatic neuroendocrine tumors: a comparative analysis of four counting methodologies. *Mod Pathol* 2015; 28 (5): 686-694
10. Voss SM, Riley MP, Lokhandwala PM, et al. Mitotic count by phosphohistone H3 immunohistochemical staining predicts survival and improves interobserver reproducibility in well-differentiated neuroendocrine tumors of the pancreas. *Am J Surg Pathol* 2015; 39 (1): 13-24
11. Rindi G, Kloppel G, Alhman H, et al. TNM staging of foregut (neuro) endocrine tumors: a consensus proposal including a grading system. *Virchows Arch* 2006; 449: 395-401
12. Kloppel G, Couvelard A, Perren A, et al. ENETS Consensus Guidelines for the Standards of Care in Neuroendocrine Tumors: towards a standardized approach to the diagnosis of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors and their prognostic stratification. *Neuroendocrinology* 2009; 90: 162-166
13. Pape UF, Jann H, Muller-Nordhorn J, et al. Prognostic relevance of a novel TNM classification system for upper gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *Cancer* 2008; 113: 256-265
14. Sobin LH, Gospodarowicz MA, Wittekind C, eds. TNM classification of malignant tumors. 7th edn. Heidelberg: Springer, 2009
15. Basturk O, Yang Z, Tang LH, et al. The high-grade (WHO G3) pancreatic neuroendocrine tumor category is morphologically and biologically heterogeneous and includes both well differentiated and poorly differentiated neoplasms *Am J Surg Pathol* 2015; 39 (5): 683-690
16. Yamaguchi T, Fujimori T, Tomita S, et al. Clinical validation of the gastrointestinal NET grading system: Ki67 index criteria of the WHO 2010 classification is appropriate to predict metastasis or recurrence. *Diagn Pathol* 2013; 8: 65
17. Chan DL, Clarke SJ, Diakos CI, et al. Prognostic and predictive biomarkers in neuroendocrine tumours. *Crit Rev Oncol Hematol* 2017; 113: 268-282
18. Pelosi G, Rindi G, Travis WD, Papotti M. Ki-67 antigen in lung neuroendocrine tumors unraveling a role in clinical practice. *J Thorac Oncol* 2014; 9: 273-284

1.11.3. Соматостатин-рецепторна скintiграфия с ^{111}In -OctreoScan/ $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Tektrotyd и ^{68}Ga -DOTA ПЕТ/КТ

Соня Сергиева, Павел Бочев, Ирена Костадинова

Метаболитни принципи и биология. По-голямата част от невроендокринните тумори (НЕТи) показват свръхекспресия на повърхностноклетъчни соматостатинови рецептори SSTR1-SSTR5, взаимодействащи с естествените соматостатинови фракции, като това зависи от хистологичната диференциация и вида на тумора.¹⁻⁶ Имунохистохимични изследвания при гастроентеро-панкреатични (ГЕП) НЕТи показват, че в най-голям процент се експресира тип SSTR2 (84-100% от случаите с G1-G2), в по-малка степен – SSTR3 (53-79%) и SSTR5 (55-83%), като честотата намалява съответно до 23% при G3b-фенотип.^{5,6} Свръхекспресията на соматостатинови рецептори от малигнено трансформирани клетки се използва като таргет за визуализиране на НЕТи посредством различни нуклеарномедицински методи.⁶ С оглед създаване на стабилни соматостатинови аналози, подходящи за терапевтично приложение, е синтезиран *octreotide*. През 2000 г. са публикувани първи клинични резултати от приложение на соматостатинов аналог, маркиран с $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HYNIC-TOC (Tektrotyd, Polatom).⁷⁻⁹ Основни предимства на радиофармацевтик с $^{99\text{m}}\text{Tc}$ се обуславят от следните дозиметрични характеристики: (1) по-малко лъчево натоварване за пациентите с ефективна еквивалентна доза на радиоактивност след апликация на 970 MBq $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Tektrotyd/70kg от 4.2 mSv; (2) по-малка продължителност на изследването с възможност за провеждане на еднодневен протокол на сканиране в рамките на 2-4 часа след инжектиране, без необходимост от сканиране на 24 и час; (3) значително по-малко физиологично биоразпределение в черен дроб за детекция на хепатални лезии; (4) висока чувствителност на свързване с

рецептори от SSTR2-подтип, но в по-малка степен и с SSTR3 и SSTR5; (5) възможност за приготвяне и дозиране намясто според конкретни нужди на пациентите.⁹ Въвеждането на хибридни СPECT-СТ-апарати оптимизира в голяма степен планарните и СPECT-соматостатин-рецепторни скintiграфи¹⁰⁻¹² и прави възможно изобразяване на огнища с размери под 10 mm. С навлизане в клиничната практика на позитронноемисионна томография с компютър-томография (ПЕТ/КТ) бяха синтезирани нови радиофармацевтици за визуализиране на НЕТ, маркирани с позитронни емитери, като ^{68}Ga , ^{18}F -DOPA и др.^{13,14} Публикувани са данни за предимства на ПЕТ/КТс белязани соматостатинови аналози вследствие на по-висока разделителна способност при детекция и значително подобрена чувствителност, варираща между 80-100% при визуализиране на минимални по големина лезии, и специфичност между 82% и 90%.¹⁷⁻²⁰ Най-често използвани позитронни радиофармацевтици са ^{68}Ga -DOTA; като агонистите се свързват приоритетно с различни подтипове соматостатинови рецептори¹⁶ – ^{68}Ga -DOTA⁰-Tyr³octreotide (^{68}Ga -DOTA-TOC, ^{68}Ga -edotreotide), ^{68}Ga -DOTA⁰-¹NaI³ octreotide (^{68}Ga -DOTA-NOC) и ^{68}Ga -DOTA⁰-Tyr³octreotate (^{68}Ga -DOTA-TATE).¹⁷⁻¹⁹ Най-често прилаган е ^{68}Ga -DOTA-NOC, който е с най-висок афинитет към рецепторите от SSTR2-подтип. Точността на детекция достига 96%, значително по-висока както от КТ (точност 75%), така и от останалите нуклеарномедицински методи.¹⁹ ^{68}Ga -DOTA-TOC се свързва предимно със SSTR2 и SSTR5-подтип, а ^{68}Ga -DOTA-TATE – основно със SSTR2-подтип. Независимо от разликите в афинитета, основните клинични индикации за диагностика, стадиране и рестадиране на НЕТи са приблизително еднакво добре покрити и от трите радиофармацевтика. От друга страна, образните характеристики не винаги корелират с афинитета; например афинитетът на ^{68}Ga -DOTA-TATE към SSTR2-подтип е почти десет пъти по-висок от този на ^{68}Ga -DOTA-TOC, което обаче при директно срав-

нение не показва по-висока чувствителност. В сравнително проучване дори се установява по-високи стойности на стандартизирано отношение на натрупване (SUV_{max}) и повече визуализирани туморни лезии с ⁶⁸Ga-DOTA-TOC, отколкото с ⁶⁸Ga-DOTA-TATE.²⁰ Тези разлики са без съществено значение за диагностичните изследвания на НЕТ, но следва да се взимат в съображение при планиране на радиопептидна терапия.

При ПЕТ/КТ с ⁶⁸Ga-DOTA-съединения се получава допълнителна важна диагностична информация при 14% от пациентите със СPECT и при 21% от пациентите с КТ.¹⁷⁻¹⁹ Данните доказват водеща роля на ⁶⁸Ga-DOTA PET-CT и по отношение на цялостно изследване с магнитнорезонансна томография (МРТ) с контраст, като е цитирана точност съотв. 99% и 89%.¹⁷⁻²⁰ Подчертава се предимството на ⁶⁸Ga-DOTA ПЕТ/КТ при детекцията на ангажирани лимфни възли (100% срещу 73%) и белодробни лезии (100% срещу 87%), но ПЕТ/КТ отстъпва по чувствителност при визуализацията на костномозъчни метастази (92% срещу 99% с МРТ) и чернодробни лезии (82% срещу 96%).²⁰ Други автори определят чувствителност от 94.8% и специфичност от 86.5%, с висока позитивна и негативна предикативна стойност от 91% и 92%.²¹ Допълнително преимущество е уникалната възможност за цялостно изследване и количествена оценка за функционална активност на лезиите и степен на експресия на соматостатинови рецептори, предпоставка за прилагане на персонализирана терапия.¹⁸ Напоследък съществуват публикации и върху използване на соматостатин-рецепторни антагонисти, които са със сходен афинитет към всички субтипове рецептори. Приложението им към момента е само пилотно и не може да се счита за дефинитивно валидирано.²⁴

По правило НЕТи могат да бъдат визуализирани и чрез други радиофармацевтици, базирани на техните невроендокринни функционални характеристики. Най-широко из-

следван е 18F-DOPA при тумори с ниска или променлива соматостатинова експресия, каквито са невроектодермалните тумори с наличие на катехоламинови рецептори: медуларен карцином на щитовидна жлеза, феохромоцитом, невробластом. Показана е за визуализиране на първични туморните формации и определяне на стадий на болестта, но няма роля за определяне на индикации за соматостатинова терапия.²²

ПЕТ/КТ с 18F-FDG е показано за визуализация на НЕТи с по-ниска клетъчна диференциация и слаба експресия на соматостатинови рецептори, основно при G3b тумори, медуларен карцином на щитовидна жлеза с високи стойности на серумен калцитонин (> 1000 pg), смесени адено-невроендокринни карциноми, синхронни/метахоронни злокачествени болести. Осигурява важна прогностична информация за наличие на по-агресивни тумори и необходимост от прилагане на химиотерапия.²³

Преди соматостин-рецепторна сцинтиграфия с ^{99m}Tc-HYNIC-TOC (Tektrotyd) или ⁶⁸Ga-DOTA ПЕТ/КТ е препоръчително лечението със соматостатинов аналог да бъде спряно 3-4 седмици преди деня на апликация, за да се избегне възможна блокада на соматостатиновите рецептори.^{1, 13, 14}

Индикации и доказателства за предиктивно значение. При диагностика и стадиране на НЕТи индикациите са следните: (1) за визуализиране на suspect първичен НЕТ в изследван орган или телесна структура; (2) за определяне на размери и точна локализация на съмнително огнище за биопсия; (3) за откриване на окултен първичен тумор при метастатичен процес с неизвестен първичен произход; (4) за определяне на биологичната характеристика на туморната формация – наличие и степен на свръхекспресия на соматостатинови рецептори като предиктивен маркер за терапевтичен

отговор към соматостатинови аналози; (5) определяне на морфологична структура на туморната формация; (6) за N/M-стадиране на болестта. При негативна SRS, най-често при нискодиференциран G3b тумор и смесен НЕТ с невроендокринна компонента под 30%, е целесъобразно провеждане на ПЕТ/КТ с ^{18}F -FDG. Използва се за очертаване на същинския туморен обем (GTV) и клиничния прицелен обем (CTV) за целите на лъчелечебно планиране. Предпочита се и за проследяването на пациенти с НЕТ след провеждане на комплексна терапия и рестадиране: (1) за ранно откриване на локален рецидив при абнормни клинични и параклинични показатели, напр. повишени серумни стойности на хромогранин АСgА, СЕА и калцитонин или 5-НlАА в урина; (2) за откриване, локализиране и определяне на степен на разпространение на метастатичен процес; (3) за отдиференциране на патологични хиперфиксиращи огнища от физиологична активност, фиброзна тъкан или бенигни образувания; (4) за определяне степен на терапевтичен отговор при метастатична болест – пълен отговор, частична ремисия, стабилна болест, прогресия. Косвен показател е повишена стойност на серумен Сg А – предиктивен белег за наличие за свръхекспресирани повърхностноклетъчни рецептори за соматостатин.^{8,10}

Тераностика (диагностика и терапия) е нова концепция за специфична диагностика и прицелно ефективно лечение след прилагане на една таргетна молекула, свързана с различни радиоактивни изотопи, при прогресиращи авансирани НЕТ.^{13,14} Соматостатиновите аналози се маркират съответно с $^{99\text{m}}\text{Tc}/^{68}\text{Ga}$ или с $^{177}\text{Lu}/^{90}\text{Y}$ за диагностич-

ни цели или за метаболитна брахитерапия. По този начин се визуализира наличие и степен на свръхекспресия на соматостатинови рецептори, топографска локализация и възможност за терапевтична алтернатива при пациенти с рефрактерни НЕТ.^{13, 14} В идеалния случай планирането на радиопептидна терапия следва да се извърши със същия комплекс хелатор/пептид, както и терапията (покриване на дефиницията за т.нар. тераностици – една и съща молекула за терапия и диагностика). Независимо от спазването на това правило, дори промяната в радиометала (от ^{68}Ga към $^{177}\text{Lu}/^{90}\text{Y}$) може да доведе до промени в афинитета към SSTR, биоразпределението и фармакокинетиката.²² Тераностиката се утвърждава като съвременен подход за персонализирана диагностика и терапия при НЕТ.^{13,14}

Друг нуклеарномедицински метод с предиктивно значение е $^{123/131}\text{I}$ -MIBG (metaiodbenzylguanidine), който се използва за визуализиране на тумори в надбъбречна медула, най-често феохромоцитом, параганглиом, невробластом, ганглионевробластом и др. Този радиофармацевтик се свързва с повърхностноклетъчни катехоламини рецептори, експресирани от туморната клетка, концентрира се в цитозола посредством активен трансмембранен транспорт и се съхранява интрацелуларно в невросекреторни гранули.¹⁵ Целотелесна сцинтиграфия с последващо СПЕКТ-СТ-изследване с $^{123/131}\text{I}$ -MIBG е много чувствителен и специфичен метод за изобразяване и стадиране на първичен тумор и служи като предиктивен метод за ефективност на метаболитна брахитерапия с тепаревтични дози ^{131}I -MIBG.¹⁵

В

- Соматостатинови аналози, маркирани с $^{99m}\text{Tc}/^{68}\text{Ga}$ за SPECT-CT или PET/КТ изследвания, се препоръчват за определяне на биологична характеристика на невроендокринни тумори (наличие и степен на свръхекспресия на соматостатинови рецептори) като предиктивен маркер за терапевтичен ефект от соматостатинови аналози и соматостатин-рецепторна радиопептидна терапия.
- При туморна хетерогенност на соматостатин-рецепторна експресия (при метастатични G3a тумори (НЕТ) и G3b невроендокринни карциноми (НЕК)) се препоръчва комбинирана предиктивна оценка със соматостатин-рецепторни изследвания и PET/КТ с ^{18}F -FDG за дефиниране на рискови SSTR-негативни/FDG-позитивни лезии с оглед селективен терапевтичен подход.
- При планиране на соматостатин-рецепторна радиопептидна терапия е препоръчително използваната диагностична/предиктивна молекула да е идентична в частта хелатор/пептид с тази, използвана за терапия.
- SPECT-CT-соматостатин-рецепторна сцинтиграфия или PET/КТ с ^{68}Ga -маркирани соматостатинови аналози се препоръчва за лъчетерапевтично планиране при невроендокринни тумори: очертаване на същински туморен обем (GTV) и клиничен прицелен обем (CTV).
- Соматостатин-рецепторна сцинтиграфия с ^{111}In -OctreoScan/ ^{99m}Tc -Tektrotyd се препоръчва за оценка на соматостатин-рецепторен статус като предиктор за отговор към лечение с *octreotide LAR* при тумори с неизвестна или вариабилна експресия на соматостатинови рецептори, където лечението със соматостатинови аналози не е стандарт.



- Соматостатин-рецепторната сцинтиграфия с ^{111}In -OctreoScan/ ^{99m}Tc -Tektrotyd или PET/КТ с ^{68}Ga -маркирани соматостатинови аналози за визуализиране на невроендокринни тумори са строго регламентирани като необходими базисни изследвания с цел *in vivo* онагледяване на експресията и плътността на соматостатиновите рецептори и предопределяне на индивидуалния терапевтичен ефект от соматостатинови аналози, белязани с терапевтични радиоуклиди.
- Прицелните SPECT-CT сцинтиграфии с ^{99m}Tc -Tektrotyd и цялостелните PET/КТ-изследвания с ^{68}Ga -маркирани соматостатинови аналози значително повишават чувствителността, специфичността и диагностичната точност на детекция при невроендокринни тумори в сравнение с другите образни методи.



- При прилагане на принципите на тераностика (диагностика и терапия) се препоръчва таргетната молекула за диагностика и прицелно лечение да е една и съща.
- ^{68}Ga DOTA TOC/NOC/TATE са взаимно заменяеми като диагностични радиофармацевтици, въпреки известни разлики в афинитета си към различните соматостатинови рецепторни субтипове, с изключение на случаи с планиране на радиопептидна терапия и при серийно проследяване.
- При всички случаи, когато това е възможно, освен цялостно соматостатин-рецепторно сканиране, се препоръчва и последващо таргетно SPECT-CT-изследване. Ако SPECT-CT-камера не е налична като апаратура, е допустимо провеждане на софтуерна корегистрация с налични актуални компютър-томографски образи.
- Провеждането на соматостатин-рецепторна сцинтиграфия следва да е съобразено с терапията със соматостатинови аналози, като се осигури минимум 20-дневен срок между последна апликация на дългодействащи препарати и сцинтиграфско изследване. В практиката това се постига, когато сканирането се изтегли максимално преди поредна апликация.

Литература

1. Kulke MH. Neuroendocrine tumours: clinical presentation and management of localized disease. *Cancer Treat Rev* 2003; 29 (5): 363-370
2. Oberg K, et al. Neuroendocrine bronchial and thymic tumours: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2010; 21 (Suppl. 5): v220-222
3. Oberg K, et al. Neuroendocrine gastroenteropancreatic tumours: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2010; 21 (Suppl. 5): v223-227.
4. Williams ED, Sandler M. The Classification of Carcinoid Tumors. *Lancet* 1963; 2: 1 (7275): 238-239
5. Gill Anthony. WHO 2017 Neuroendocrine Tumor Grading System. 4th Edition 2017
6. Reubi JC, Caser B. Concomitant expression of several peptidereceptors in neuroendocrine tumors: molecular basis for in vivo multireceptor tumour targeting. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2003; 30: 781-79
7. Krenning E, et al. Somatostatin receptor imaging with ^{111}In -octreotide. *Eur JNM* 1993; 20: 716-731
8. Krenning EP, et al Somatostatin receptor scintigraphy with [^{111}In -DTPA-D-Phe1]- and [^{123}I -Tyr3]- octreotide: the Rotterdam experience with more than 1000 patients. *Eur J Nucl Med* 1993; 20 (8): 716-731
9. Decristoforo C, Mather S, Cholewinski W, Donnemiller E, Riccabona G, Moncayo R. $^{99\text{mTc}}$ -EDDA/HYNIC-TOC: a new $^{99\text{mTc}}$ -labelled radiopharmaceutical for imaging somatostatin receptor-positive tumors: first clinical results and intra-patient comparison with ^{111}In -labelled octreotide derivatives. *Eur J Nucl Med* 2000; 27 (9): 1318-1325
10. Parisella MG, Chianelli M, Alessandria CD, Todino V, Mikolajczak R, Papini E et al. Clinical indications to these of $^{99\text{mTc}}$ -EDDA/HYNIC-TOC to detect somatostatin receptor-positive neuroendocrine tumors. *Q J Nucl Med Mol Imaging* 2012; 56: 90-98
11. Sergieva S, Robev B, Dimcheva M, Fakirova A, Hristoskova R. Clinical application of SPECT-CT with $^{99\text{mTc}}$ -Tektrotyd in bronchial and thymic neuroendocrine tumors (NETs). *Nucl Med Rev Cent East Eur* 2016; 19: 81-87

12. Bural G, Muthukrishnan A, Oborski M, Mountz J. Improved benefit of SPEC/CT compared to SPECT alone for the accurate localization of endocrine and neuroendocrine tumors. *J Mol Imaging Radionucl Ther* 2012; 21 (3): 91-96
13. Zaknun J, Bodei L, et al. The joint IAEA, EANM, and SNMMI practical guidance on peptide receptor radionuclide therapy (PRRNT) in neuroendocrine tumours. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2013; 40 (5): 800-816
14. Baum RP, Kulkarni HR. THERANOSTICS: From Molecular Imaging Using Ga-68 Labeled Tracers and PET/CT to Personalized Radionuclide Therapy. *Theranostics* 2012; 2 (5): 437-447
15. Van Der Horst-Schrivers AN, et al. Iodine-123 metaiodobenzylguanidine scintigraphy in localising pheochromocytomas: experience and meta-analysis. *Anticancer Res* 2006; 26 (2B): 1599-1604
16. Reubi JC et al. Distribution of somatostatin receptors in normal and neoplastic human tissues: recent advances and potential relevance. *Yale J Biol Med* 1997; 70 (5-6): 471-479
17. Virgolini I, et al. EANM Procedure guidelines for PET/CT tumour imaging with 68Ga-DOTA-conjugated peptides: 68Ga-DOTA-TOC, 68Ga-DOTA-NOC, 68Ga-DOTA-TATE. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2010; 37: 2004-2010
18. Wild D, Schmitt JS, Ginj M, et al. DOTA-NOC, a high-affinity ligand of somatostatin receptor subtypes 2, 3 and 5 for labelling with various radiometals. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2003; 30 (10): 1338-1347
19. Campana D, Ambrosini V, Pezzilli R, et al. Standardized uptake values of 68Ga-DOTANOC PET: A promising prognostic tool in neuroendocrine tumors. *J Nucl Med* 2010; 51 (3): 353-359
20. Poeppel TD et al. Differential uptake of (68)Ga-DOTATOC and (68)Ga-DOTATATE in PET/CT of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *Recent Results Cancer Res* 2013; 194: 353-371
21. Reubi JC, Schär JC, Waser B, et al. Affinity profiles for human somatostatin receptor subtypes SST1-SST5 of somatostatin radiotracers selected for scintigraphic and radiotherapeutic use. *Eur J Nucl Med* 2000; 27 (3): 273-282
22. Strosberg J, et al. NETTER-1 Phase III in patients with midgut neuroendocrine tumors treated with 177Lu-Dotatate: Efficacy and safety results. *J Nucl Med* 2016; 57 (Suppl. 2): 629
23. Carrasquillo J, Chen C. Molecular imaging of neuroendocrine tumors. *Semin Oncol* 2010; 37 (6): 662-679
24. Wang X, Fani M, Schulz S, et al. Comprehensive evaluation of a somatostatin-based radiolabelled antagonist for diagnostic imaging and radionuclide therapy. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2012; 39 (12): 1876-1885

1.12. ПРЕДИКТИВНИ БИОМАРКЕРИ ПРИ ОВАРИАЛЕН КАРЦИНОМ, КАРЦИНОМ НА ФАЛОПИЕВА ТРЪБА И ПЪРВИЧЕН ПЕРИТОНЕАЛЕН КАРЦИНОМ

1.12.1. *BRCA1/2*-мутации

Драга Тончева, Радка Кънева

Молекулярна биология. *BRCA1*- и *BRCA2*-гените са локализирани съответно на хромозоми 17q21 и 13q12.3. Те са тумор-супресорни гени, които кодират белтъци, участващи в поддържането на геномната стабилност и контрола на клетъчния растеж.¹ *BRCA1*- и *BRCA2*-протеините са включени в поправката на двойноверижни скъсвания (DSBs) чрез механизма на хомоложна рекомбинация (HR).^{2,3} Дефицит на активни *BRCA1* и *BRCA2* води до висока степен на хромозомна нестабилност, хромозомни счупвания, анеуплоидия и центромерна амплификация.⁶⁻⁸ Нестабилността отключва използването на алтернативни пътища за репарация на DSBs, като нехомоложно свързване на краища (NHEJ) и едноверижно сдвояване (SSA). При дефицит на *BRCA1* доминира NHEJ-механизъм на репарация, свързан с натрупване на много грешки, докато при дефицит на *BRCA2* са активни и двата механизма на репарация (NHEJ и SSA). Загубата на *BRCA1/2*-функция може да се дължи на герминативни или соматични мутации, епигенетични въздействия, които водят до зависимост от механизмите на репарация, различни от хомоложна рекомбинация, и комбинации от много грешки, водещи до геномна нестабилност и малигнена трансформация на клетките.^{9,10} Герминативни мутации в *BRCA1/2*-гените се унаследяват по доминантен механизъм и се асоциират с кумулативен риск за развитие на епителен овариален карцином от 40% до 50% при пациенти, носители на *BRCA1*-мутации и от 20% до 25% при носители на *BRCA2*-мутации.¹¹ Герминативни мутации в *BRCA1/2* се наблюдават

при 14% от пациентите с немущинозен епителен овариален карцином, включващи 17% от високостепенни серозни карциноми, като 44% от тези пациенти имат фамилна история за карцином на гърда (КГ) и овариален карцином (ОК), докато соматични мутации в *BRCA1/2* се откриват в 6% от пациентите с високостепенен серозен ОК.^{12,13}

Популационни изследвания показват, че при пациентки с ОК се наблюдават патогенни варианти в повече от 10%, независимо от възраст и фамилна история за КГ или ОК. Честотата на носителство на патогенни варианти е средно около 1 на 400, но варира в различните етнически групи.¹⁴ Честотата на патогенни варианти се увеличава при пациенти със серозен ОК (17-20%), високостепенен серозен (23-25%) и при платина-чувствителни пациенти (30-40%). Патогенните мутации в *BRCA1*- и *BRCA2*-гените са относително редки в общата популация. Експертите предлагат да се извършва мутационен анализ на здрави лица само когато има индикации от индивидуална или фамилна история за вероятно носителство на патогенни мутации в *BRCA1* и *BRCA2*. Изследването се предлага на жени с фамилна история за КГ, ОК, карцином на Фалопиева тръба или първичен перитонеален карцином, което повишава риска за мутация в един от двата гена. Преди и след извършване на генетично изследване пациентките трябва да получат медико-генетична консултация от лекар със специалност по медицинска генетика. Ръководства на ASCO препоръчват да се обучават специалисти от здравния сектор за предлагане на генетични изследвания и използване на подходящи стратегии за лечение, проследяване и снижение на риска.

Аналитични методи за изследване. Герминативни *BRCA*-мутации се изследват в ДНК, изолирана от периферна кръв, чрез секвениране по *Sanger* или със секвениране от ново поколение (NGS). При “див” тип алели в *BRCA1/2*-гени се извършва допълнителен MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) анализ за делеции.

Соматични мутации се изследват в ДНК, изолирана от определен сегмент на туморна тъкан, включен в FFPE-блок, определен от патонатом при оцветяване с хематоксилин и еозин (H&E). Поради големия спектър от мутации важно е да се определи тяхната функционална значимост. Всяка лаборатория, извършваща генетични изследвания, следва да използва класификация на генетичните варианти, базирана на настоящите препоръки за добра лабораторна практика (Evidence-based Network for the Interpretation of Germline Mutant Alleles (ENIGMA), <https://enigmaconsortium.org/>).

Доказателства за предиктивно значение. AstraZeneca е финализираща три клинични проучвания, известни като SOLO (Studies of olaparib in ovarian cancer) за определяне на ефекта от терапия с *olaparib* при пациенти с ОК.¹⁵⁻²¹ В клинично проучване SOLO1 са включени жени с новодиагностициран *BRCA*-мутирал ОК, а в SOLO2 – пациенти с ре-

цидивирал ОК след лечение. В SOLO3 са включени жени, които имат рецидивиращ ОК, карцином на Фалопиева тръба или първичен перитонеален карцином, които носят патогенна герминативна *BRCA*-мутация, които имат завършени поне два курса платинова химиотерапия (*carboplatin*, *cisplatin* и *oxaliplatin*) и последният курс е завършил преди поне шест месеца или които имат платина-чувствителен тумор, който е намалял или изчезнал след последната линия на платинова химиотерапия. Ефективността на *olaparib* е сравнена с друго лечение – химиотерапия по избор на лекаря, който участва в проучването и която не е платина базирана. *Olaparib* е одобрен от Американската агенция за храна и лекарства (FDA) и от Европейската лекарствена агенция (EMA) за лечение на жени с високостепенен серозен ОК и с герминативни *BRCA*-мутации, които преди това са получили три или повече курса на платина-базирана химиотерапия.

A

- Препоръчва се изследване на герминативни или соматични *BRCA*-мутации при всички пациенти с високостепенен серозен овариален карцином, карцином на Фалопиева тръба и първичен перитонеален карцином.
- При пациенти с метастатичен платина-чувствителен високостепенен серозен овариален карцином, карцином на Фалопиева тръба и първичен перитонеален карцином с доказана герминативна или соматична *BRCA*-мутация се препоръчва поддържаща терапия с *olaparib*.
- Препоръчва се изследване на *BRCA1/2*-гени чрез секвениране по *Sanger* или чрез секвениране от ново поколение (NGS). При нормален резултат се препоръчва допълнителен MLPA-анализ за наличие на делеции.



- Преди и след извършване на генетично изследване за мутации в *BRCA1/2*-гени болните трябва да проведат медико-генетична консултация.



- При носители на герминативни BRCA-мутации се обсъжда клинично и инструментално проследяване и/или профилактична хирургия на гърда и/или яйчник, според възрастта на пациента.
- Изследване на BRCA-мутации трябва да се провежда само в лаборатории, преминали външен качествен контрол.

ЛИТЕРАТУРА

1. Yoshida K and Miki Y. Role of BRCA1 and BRCA2 as regulators of DNA repair, transcription, and cell cycle in response to DNA damage. *Cancer Science* 2004; 95 (11): 866-871
2. Ashworth A. A synthetic lethal therapeutic approach: poly(ADP) ribose polymerase inhibitors for the treatment of cancers deficient in DNA double-strand break repair. *J Clin Oncol* 2008; 26 (22): 3785-3790
3. Banerjee S, Kaye S. PARP inhibitors in BRCA gene mutated ovarian cancer and beyond. *Current Oncology Reports* 2011; 13 (6): 442-449
4. Foulkes WD, Shuen AY. In brief: BRCA1 and BRCA2. *The Journal of Pathology* 2013; 230 (4): 347-349
5. Welsh PL, King MC. BRCA1 and BRCA2 and the genetics of breast and ovarian cancer. *Human Molecular Genetics* 2001; 10 (7): 705-713
6. Deng C, Scott F. Role of the tumor suppressor gene Brca1 in genetic stability and mammary gland tumor formation. *Oncogene* 2000; 19 (8): 1059-1064
7. Kraakman-van der Zwet M, Overkamp WJI, van Lange REE, et al. Brca2 (XRCC11) deficiency results in radioresistant DNA synthesis and a higher frequency of spontaneous deletions. *Molecular and Cellular Biology* 2002; 22 (2): 669-679
8. Patel KJ, Yu VP, Lee H, et al. Involvement of Brca2 in DNA repair. *Molecular Cell* 1998; 1 (3): 347-357
9. Tutt A, Ashworth A. The relationship between the roles of BRCA genes in DNA repair and cancer predisposition. *Trends Mol Med* 2002; 8 (12): 571-576
10. Venkitaraman AR. Cancer susceptibility and the functions of BRCA1 and BRCA2. *Cell* 2002; 108 (2): 171-182
11. Jazaeri AA. Molecular profiles of hereditary epithelial ovarian cancers and their implications for the biology of this disease. *Mol Oncol* 2009; 3 (2): 151-156
12. Cancer Genome Atlas Research Network. Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma. *Nature* 2011; 474: 609-615
13. Alsop K, Fereday S, Meldrum C, et al. BRCA mutation frequency and patterns of treatment response in BRCA mutation-positive women with ovarian cancer: a report from the Australian Ovarian Cancer Study Group. *J Clin Oncol* 2012; 30: 2654-2663
14. Levine DA, Argenta PA, Yee CJ, et al. Fallopian tube and primary peritoneal carcinomas associated with BRCA mutations. *J Clin Oncol* 2003; 21 (22): 4222-4227
15. Levine DA, Argenta PA, Yee CJ, et al. Fallopian tube and primary peritoneal carcinomas associated with BRCA mutations. *J Clin Oncol* 2003; 21 (22): 4222-4227
16. Dougherty BA, Lai Z, Hodgson DR, Orr MCM, et al. Biological and clinical evidence for somatic mutations in BRCA1 and BRCA2 as predictive markers for olaparib response in high-grade serous ovarian cancers in the maintenance setting. *Oncotarget* 2017. doi: 10.18632/oncotarget.17613
17. Lee JM, Cimino-Mathews A, Peer CJ, et al. Safety and clinical activity of the programmed death-ligand 1 inhibitor durvalumab in combination with poly (ADP-Ribose) polymerase inhibitor olaparib or vascular endothelial growth factor receptor 1-3 inhibitor cediranib in women's cancers: A dose-escalation, phase I study. *J Clin Oncol* 2017. doi: 10.1200/J CLIN ONCOL.2016.72.1340

18. Lheureux S, Lai Z, Dougherty BA, et al. Long-term responders on olaparib maintenance in high-grade serous ovarian cancer: Clinical and Molecular Characterization. *Clin Cancer Res* 2017; doi: 10.1158/1078-0432.CCR-16-2615
19. Ledermann JA, Harter P, Gourley C, et al. Quality of life during olaparib maintenance therapy in platinum-sensitive relapsed serous ovarian cancer. *Br J Cancer* 2016; 115 (11): 1313-1320
20. Dirix L, Swaisland H, Verheul HM, et al. Effect of itraconazole and rifampin on the pharmacokinetics of olaparib in patients with advanced solid tumors: Results of two phase I open-label studies. *Clin Ther* 2016; 38 (10): 2286-2299
21. Ledermann JA, Harter P, Gourley C, et al. Overall survival in patients with platinum-sensitive recurrent serous ovarian cancer receiving olaparib maintenance monotherapy: an updated analysis from a randomised, placebo-controlled, double-blind, phase 2 trial. *Lancet Oncol* 2016; 17 (11): 1579-1589
22. Tappenden P, Harnan S, Ren S, et al. Olaparib for maintenance treatment of BRCA 1 or 2 mutated, relapsed, platinum-sensitive ovarian, fallopian tube and peritoneal cancer in people whose relapsed disease has responded to platinum-based chemotherapy: An evidence review group perspective of a NICE single technology appraisal. *Pharmacoeconomics* 2017; 35 (1): 97-109

1.13. ПРЕДИКТИВНИ БИОМАРКЕРИ ПРИ КАРЦИНОМ НА МАТОЧНА ШИЙКА

1.13.1. HPV-статус и p16/p18-експресия

Светлана Христова

Молекулярна биология. Човешкия папиломен вирус (HPV) е етиопатогенетичен фактор при преканцерози и карцином, локализиран в аногениталната област. Рисъкът за развитие на цервикален карцином (ЦК) е свързан с продължително персистираща HPV-инфекция. HPV се инкорпорира и взаимодейства с покривния плосък епител по два основни пътя, определящи различни патоморфологични находки. С благоприятна прогноза и преходни, обратими епителни промени, свързани с вирусна репликация, са нискостепенна епителна лезия/лекостепенна дисплазия и кондилом. Втората форма на HPV-епително взаимодействие се представя с промени, класифицирани като преканцерози, корелиращи със свръхекспресия на HPV-вирусни онкогенни белтъчни продукти, отключващи моноклонална пролиферация на относително недиференцирани клетки. Основно значение има HPV протеин 16.¹⁻³ Патогенетично интрацелуларните таргети за HPV-вирусите включват алтерация на множество протеини, участващи в регулация на клетъчния цикъл, като циклини/циклин зависими кинази и инхибитори (CDK). HPV E6- и E7-онкопротеини инактивират тумор-супресорните p53 и ретинобластома (pRB)-протеини с ефект за геномна нестабилност и висока клетъчна пролиферация. Функцията на pRB е свързана с инхибиране на клетъчната прогресия в пролиферативна фаза и се регулира от циклин D1. Прогресивно и продължително фосфорилиране на pRB води до неговата инактивация и редуция на супресурната му активност. Подтискането на функцията на pRB се медира от E2F-подобен транскрипционен фактор, намиращ се в строга зависимост от активация на CDK и повишени нива на CDKN2A-генния продукт p16INK4A. По правило

P16INK4A е вирусен тумор-супресорен протеин, който активира CDK4 и CDK6, участващи във фосфорилиране на pRB.⁴⁻⁷

Аналитични методи за изследване. Като диагностични методи за доказване на HPV-свързани преканцерози и ЦК са приети имунохистохимично (ИХХ) изследване и молекулярно-генетичен анализ. На тъканно ниво p16INK4a се доказва в огнища на високостепенни плоскоклетъчни интраепителни лезии/цервикална интраепителна неоплазия (SIL/CIN) и карцином. P16INK4a е удобен и полезен биомаркер за ИХХ разграничаване на нискостепенни (LSIL/CIN1) от високостепенни (HSIL/CIN2-3) епителни дисплазии и прекацерози. Има значение и за снижаване на процента на фалшиво негативни и фалшиво позитивни хистологични оценки и/или като скринингов тест при препоръка за молекулярно-патологично изследване в контекста на терапевтичния подход.³⁻⁵ Върху цервикални биопсии силна по интензитет и дифузна имунохистохимична оцветка е с висока чувствителност за доказване на HPV-асоциирани HSIL/CIN2-3 и диференциална диагноза с LSIL/CIN1, незряла плоскоклетъчна метаплазия, атрофични/регенераторни епителни промени. За ИХХ-оценка се използват множество специализирани диагностични китове.³⁻⁶⁻⁹ Клинично валидиран и препоръчван от WHO/ASCO/CAP ИХХ-тест е CINtec16 Histology.^{2,12,13} За молекулярно-генетично откриване на високорискови HPV-типове при цервикални лезии Американската Агенция за храна и лекарства (FDA) има одобрени пет теста: Hybrid Capture 2 HPV, Cervista HPV HR, Cervista HPV 16/18, Cobas 4800 HPV и Aptima HPV. Понастоящем всички налични фармакодиагностични платформи за доказване на HPV-позитивност подлежат на стандартизиране и уеднаквяване на диагностичната оценка.^{9,12,14}

Доказателства за предиктивно значение. HPV-асоциация на цервикални неоплазии не е включена в рутинните терапевтични схеми, базиращи се основно на хистморфо-

логична оценка. Основните терапевтични процедури са хирургични, самостоятелно или в комбинация с химиолъчелечение, което осигурява петгодишна преживяемост в 66-79% при ЦК.¹⁵ *Cisplatin*-базирана първа линия постига относително добър контрол на болеста.^{16,17} Втора линия химиотерапия е с нисък клиничен ефект.¹⁶ За периода 1998-2015 г. са проведени над 20 фаза II клинични проучвания на Gynecologic Oncology Group (GOG) при пациенти с рецидивирал/метастатичен ЦК, вкл. приложение на молекулярно таргетиращи малки молекули като *pazopanib*, *lapatinib*, *cetuximab*, *sunitinib* и *bevacizumab*.¹⁷⁻²⁰ Въз основа на резултатите от GOG 227C със средна преживяемост 73 месеца и обща преживяемост (ОП) – 1 година в 30% от кохортата FDA одобрява *bevacizumab* при комбинирано лечение на авансирал ЦК.²¹

Текущи проучвания са насочени за търсене на молекулярно-биологични таргети, свързани с HPV-онкогенетичните промени. Първите опити са свързани с имунотерапия за стимулиране на Т-клетъчния ендегенен имунен отговор срещу HPV Е6- и

Е7-антигени. *S Stevanovic et al.* при ЦК в метастатичен стадий доказват почти пълна туморна регресия чрез инфузии на *in vivo* стимулирана Т-лимфоцитна пролиферация върху индивидуална за пациента туморн тъкан.²² През март 2017 г. са публикувани резултатите от фаза II проучване на GOG/NRG 0265 за приложение на *axalimogene filolisbac* (AXAL), самостоятелно или като втора линия след лечение, включващо *cisplatin*, *bevacizumab* локална пелвична радиотерапия. По правило AXAL-имунотерапията се базира на биоинженерно модифицирани бактерии *Listeria monocytogenes* със способност за секреция на HPV-16 Е7-протеин, съединяващ се със стволовия фрагмент на hemolysin listeriolysin O. Имунотерапевтично повлиява HPV-трансформирани клетки като индуцира Т-клетъчна имунореактивност и прекъсване на туморния имунен толеранс. Позитивните резултати от самостоятелно приложение на AXAL при 63 пациента са статистически значими ($p = 0.02$) при ОП от 6.2 месеца и 12-месечна преживяемост в 38%.²³

В	Специализирани изследвания за доказване на HPV-антигени/онкогени при преканцерози и карцином на маточна шийка се препоръчва в рамките на клинични проучвания за таргетно имунолечение.
С	<ul style="list-style-type: none"> ■ Имунохистохимично изследване на p16-експресия върху биопсични тъканни материали се препоръчва за оценка и диференциална диагноза между нискостепенни интраепителни лезии (LSIL/CIN1) и прекацерози (HSIL/CIN2-3). ■ Имунохистохимично изследване на p16-експресия се препоръчва за разпознаване на високостепенни интраепителни лезии (HSIL/CIN2-3) спрямо незряла плоскоклетъчна метаплазия, репаративни или атрофични епителни промени. ■ При избрани рискови пациенти HPV-инфекция може да бъде доказана чрез молекулярногенетичен (PCR) или молекулярно-патологичен <i> in situ</i> хибридизационен анализ (ISH).



- *Имунохистохимично доказване на p16 при несигурна морфологична оценка върху Н&Е-оцветени биопсии е допълнителен метод за верификация на HPV-асоциирани лезии и разпознаване на клетъчни промени, имитиращи преканцероза (атипична плоскоклетъчна метаплазия, атрофия, регенерация).*
- *При нискостепенни интраепителни лезии (LSIL/CIN1) p16-имунопозитивност липсва или е локализирана в базален/парабазален клетъчен слой.*
- *Силна по интензитет дифузна p16-експресия потвърждава наличие на преканцерозни клетъчни промени (HSIL/CIN2-3).*
- *Имунохистохимично изследване на p16 би трябва да се използва при несъответствие в професионална хистологична интерпретация на нискостепенни/високостепенни интраепителни неоплазии.*
- *Понастоящем в България не е задължително рутинно/скринингово тестване върху биопсични/цитологични материали за откриване на HPV-позитивни преканцерози и цервикален карцином.*
- *Лаборатории, извършващи HPV-диагностика, трябва да използват само валидирани имунохистохимични и молекулярно-генетични платформи, да разполагат със стандартизирана процедура и качествен контрол на диагностика.*

ЛИТЕРАТУРА

1. Bosch FX, Lorincz A, Munoz N, et al. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol* 2002; 55 (4): 244-265
2. Darragh TM, Colgan TJ, Cox JT, et al. The lower anogenital squamous terminology standardization project for HPV-associated lesions: background and consensus recommendations from the College of American Pathologists and the American Society for Colposcopy and Cervical Pathology. *Int J Gynecol Pathol* 2013; 32 (1): 76-115
3. Hirschowitz L, Faruqi A, Fulmali R, et al. Tissue pathways for gynaecological pathology. Royal College of Pathologists UK, www.rcpath.org, 2015; 12-13
4. Southern SA, Herrington CS. Disruption of cell cycle control by human papillomaviruses with special reference to cervical carcinoma. *Int J Gynecol Cancer* 2000; 10 (4): 263-274
5. Mantovani F, Banks L. The human papillomavirus E6 protein and its contribution to malignant progression. *Oncogene* 2001; 20 (54): 7874-7887
6. zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer* 2002; 2 (5): 342-350
7. Sano T, Oyama T, Kashiwabara K, et al. Expression status of p16 protein is associated with human papillomavirus oncogenic potential in cervical and genital lesions. *Am J Pathol* 1998; 153 (6): 1741-1748
8. Zhang G, Yang B, Abdul-Karim FW. p16 Immunohistochemistry is useful in confirming high-grade squamous intraepithelial lesions (HSIL) in women with negative HPV testing. *Int J Gynecol Pathol* 2015; 34 (2): 180-186
9. Lesnikova I, Lidang M, Hamilton-Dutoit S, Koch J. p16 as a diagnostic marker of cervical neoplasia: a tissue microarray study of 796 archival specimens. *Diagnostic Pathology* 2009; 4: 22-29

10. Stoler M, Bergeron C, Colgan TJ, et al. Tumours of the uterine cervix. In: Kurman RJ, Carcangiu ML, Herrington CS, Young RH (Eds.), WHO classification of tumours of female reproductive organs. Lyon, France: IARC and WHO, 2014: 169-206
11. Zhang G, Yang B, Abdul-Karim FW. P16 Immunohistochemistry is useful in confirming high-grade squamous intraepithelial lesions (HSIL) in women with negative HPV testing. *Int J Gynecol Pathol* 2015; 34 (2): 180-186
12. Galgano M, Castle P, Atkins K, et al. Using biomarkers as objective standards in the diagnosis of cervical biopsies. *Am J Surg Pathol* 2010; 34 (8): 1077-1087
13. Stoler M, Bergeron C, Colgan TJ, et al. Tumours of the uterine cervix. In: Kurman RJ, Carcangiu ML, Herrington CS, Young RH (Eds.) WHO classification of tumours of female reproductive organs. Lyon, France: IARC and WHO, 2014: 169-206
14. Zhao C, Huaitao Y. Approved assays for detecting HPV DNA-design, indications, and validation. *CAP Today* 2012; Available at: <http://captopday.epubxp.com/i/52881/39>
15. Stern PL, van der Burg SH, Hampson IN, et al. Therapy of human papillomavirus-related disease. *Vaccine* 2012; 30 (05): F71-F82
16. Ramondetta L. What is the appropriate approach to treating women with incurable cervical cancer? *J Natl Compr Canc Netw* 2013; 11: 348-355
17. Tewari KS, Sill MW, Long HJ 3rd, et al. Improved survival with bevacizumab in advanced cervical cancer. *N Engl J Med* 2014; 370: 734-743
18. Monk BJ, Mas Lopez L, Zarba JJ, et al. Phase II, open-label study of pazopanib or lapatinib monotherapy compared with pazopanib plus lapatinib combination therapy in patients with advanced and recurrent cervical cancer. *J Clin Oncol* 2010; 28: 3562-3569
19. Santin AD, Sill MW, McMeekin DS, et al. Phase II trial of cetuximab in the treatment of persistent or recurrent squamous or non-squamous cell carcinoma of the cervix: A Gynecologic Oncology Group study. *Gynecol Oncol* 2011; 122: 495-500
20. Mackay HJ, Tinker A, Winquist E, et al. A phase II study of sunitinib in patients with locally advanced or metastatic cervical carcinoma: NCIC CTG Trial IND.184. *Gynecol Oncol* 2010; 116: 163-167
21. Monk BJ, Sill MW, Burger RA, et al. Phase II trial of bevacizumab in the treatment of persistent or recurrent squamous cell carcinoma of the cervix: A Gynecologic Oncology Group study. *J Clin Oncol* 2009; 27 (7): 1069-1074
22. Stevanovic S, Draper LM, Langhan MM, et al. Complete regression of metastatic cervical cancer after treatment with human papillomavirus-targeted tumor-infiltrating T cells. *Clin Oncol* 2015; 33: 1543-1550
23. Huh WK, et al. ADXS11-001 immunotherapy in squamous or non-squamous persistent/recurrent metastatic cervical cancer: Results from stage I of the phase II GOG/NRG0265 study. ASCO 2017, Abstr. 5516

1.13.2. HIV-статус и CD4+ клетъчен брой

Веселина Колева, Яна Бочева

Молекулярна биология. Цервикалният арцином (ЦК) е водеща причина за смърт от онкологична болест сред 20 милиона жени в света, заразени с HIV.¹ Много проучвания показват по-висока честота на цервикална интраепителна неоплазия (CIN) сред HIV-позитивни спрямо HIV-негативни жени – 19% срещу 5% според проучване HER и 38.3% срещу 16.2% според Women's Interagency HIV Study Group (WIHS).^{2,3} Случайно открита CIN също е много по-честа сред HIV-позитивни. Освен нисък CD4+ клетъчен брой, също и висок вирусен товар (повече от 100 000 копия/mL) се свързва с повишен риск от развитие на ЦК.

Аналитични методи за изследване. Методологичните секции в различните публикации, третиращи използване на резултати от определяне на CD4+клетъчен брой, визират най-често пет различни техники: TruCOUNT, Dual Platform, FACSCount, Easy CD4 и CyFlow. Към момента BD FACSCount се определя като референтна аналитична техника.

Доказателства за предиктивно значение. В проучване, проведено в Ню Йорк, случаи на CIN при HIV-позитивни са 8.3/100 жени за една година срещу 1.8/100 жени при HIV-негативни.⁴ При проследяване на пациентки WIHS докладват наличие на поне една патологична цитонамазка при 73% от HIV-позитивни пациентки спрямо 42.3% при HIV-отрицателни жени, като откриването на нови високостепенни интраепителни плоскоклетъчни лезии (H-IESL) е еднакво и при двете групи.⁵ Основни фактори, свързани с CIN-находка, са наличие на HIV- или HPV-инфекция, нисък брой на CD4+

клетки и висок вирусен товар за HIV-РНК. Друго проучване от 2010 г., проведено в Южна Африка, показва, че HIV-позитивни жени с нисък брой на CD4+ Т-лимфоцити по-често имат патологична цитонамазка. От включените и проследени за 24 месеца 2325 жени по време на първоначален скрининг 38% имат преканцерозна лезия. Средният брой CD4+ клетки при жени с преканцерозна лезия е статистически значимо по-нисък спрямо тези с нормална цитонамазка: 254 клетки/mm³ спрямо 351 клетки/mm³ ($p < 0.0001$). Авторите правят заключението, че всяко увеличение в броя на CD4+ клетки с 100/mm³ води до намаляване на риска за поява на нискостепенна лезия с 13%, а на високостепенна лезия – с 18%.⁶ В проучване, проведено в Нигерия, с включени 369 жени, инфектирани с HIV, в 68.3% от случаите се установява патологична цитологична находка. Броят на CD4+ клетки е сигнификатно по-нисък сред пациентки с доказана дисплазия на маточна шийка спрямо тези с нормална находка (142 срещу 170 клетки/mm³; $p = 0.04$), а HIV-РНК-вирусният товар е значимо по-висок (101781 срещу 77497 копия/mL; $p = 0.002$).⁷ Основни рискови фактори, свързани с рецидив след лечение на ЦК при HIV-позитивни пациентки, са тежест на имunosупресия, оценена според брой на CD4+ лимфоцити, и наличие на остатъчна болест. Установено е, че CIN също може да рецидивира при HIV-позитивни жени, дори в случаи без наличие на резидуална болест.⁸ Проучване от 2011 г. показва, че HIV-инфектирани пациентки с нисък брой CD4+ имат по-голяма вероятност за прогресия: при CD4+ < 200 клетки/mm³ рискът от прогресия е два пъти по-висок в сравнение с пациентки с CD4+ > 500 клетки/mm³ ($p < 0.0001$). Антиретровирусна терапия намалява риска от прогресия с 28% ($p < 0.05$).⁶ Нисък брой на CD4+ лимфоцити при жени с HIV-инфекция се свързва и с по-висока честота на неуспешно лечение на CIN. Проучване показва, че при жени с CD4+ < 200 клетки/mm³ е наблюдаван неуспех в лечението на CIN в 71% от случаите, докато

при CD4+ между 201 и 500 клетки/mm³ този дял е 57%, а при CD4+ > 500 клетки/mm³ е 20%. Заключение е, че жени с CD4+ < 200 клетки/mm³ имат 2.93 пъти по-голям риск от неуспех в терапията спрямо тези с CD4+ > 500 клетки/mm³ (95 CI 1.06-8.11).⁹ Наличието на съпътстваща HIV-инфекция при ЦК има сигнификантно значение и за преживяемостта. В едно проучване^{1,10} са включени 348 жени, от които 231 (66.4%) са HIV-позитивни. При 81.8% от инфектираните с HIV пациентки е провеждана антиретровирусна терапия преди откриване на ЦК и средният брой CD4+ клетки е 397/mm³. След проследяване средно от 19.7 месеца 50.7% от жените с HIV и 41.7% от тези без HIV-инфекция са починали. Тригодишната преживяемост на пациентки с HIV е изчислена на 35% (95%CI 27-44%), а в групата без HIV – на 48% (95%CI 35-60%). Резултатите показват, че наличието на HIV-инфекция достоверно увеличава риска от смърт при всички пациентки с ЦК 1.95 пъти (95%CI 1.20-3.17), а в подгрупата с лечима болест – 2.63 пъти (95%CI 1.05-6.55). Влиянието на HIV-инфекция върху преживяемостта е по-силно в случаи на по-ранен стадий на болестта, при жени, лекувани дефинитивно, и при тези с по-нисък брой CD4+ лимфоцити. Напредналият стадий и неправилното или непълно лечение допринасят за по-висока смъртност при HIV-позитивните пациентки. В обзор на *Ntekim et al.*¹¹ авторите показват данни, че въпреки по-ранна изява на ЦК с около една декада при инфектирани с HIV (40 срещу 52 години), не се наблюдава разлика в хистологичния тип и в стадия на болестта в момента на откриването му. Данни от мултикохортно проспективно проучване в Северна Америка за връзка на HIV-инфекция, имуносупресия и честотата на инвазивен ЦК показват по-висока

честота на карцином при HIV-позитивни пациентки, без разлика в честота по възраст. Проучването документира по-висок риск от заболяване при по-нисък CD4+ клетъчен брой, визирайки прагова стойност от 350 клетки/mm³. Дори и при пациентки с CD4+ клетъчен брой над 350 клетки/mm³ заболяемостта остава два пъти по-висока от тази в контролната HIV-негативна кохорта. Независимо от това, тези резултати маркират препоръка за поддържане на по-високи нива на CD4+ с цел намаляване на заболяемостта от ЦК в разглежданата група. При пациентки на антиретровирусна терапия се отчита намаление на CD4+ клетъчния брой непосредствено преди диагностициране, което липсва при пациентките без КМШ. Значително по-слаба е статистическата зависимост по отношение на вирусния товар.¹²

Засага няма стандартни препоръки за поведение при HIV-позитивни пациентки с ЦК. Поведението при тази група е както при HIV-отрицателни пациентки. След публикуване на резултатите от проучване START¹³ през 2015 г. WHO, Европейската асоциация по СПИН, Европейското клинично дружество по СПИН (EACS) и редица национални организации препоръчват включване на високо активна антиретровирусна терапия (HAART) веднага след установяване на позитивен HIV-статус, независимо от броя на CD4+ клетките. Проучването показва, че ранен старт на антиретровирусна терапия води до намаляване на риска от не-СПИН свързани сериозни болести и смърт с 57%. Освен това показва предимство по отношение на ефективност на лечение, токсичност и контрол на болестта при HIV-позитивни пациентки.

В

- При HIV-позитивни пациентки се препоръчва поддържане на нива на CD4+ T-лимфоцити > 500 клетки/mm³ с цел намаляване на заболяемостта от карцином на маточна шийка.
- Едновременно с антитуморно лечение при HIV-позитивен карцином на маточна шийка се препоръчва високо активна антиретровирусна терапия (HAART), независимо от броя CD4+ клетки, с цел по-ниска токсичност, по-добър терапевтичен ефект и по-добра преживяемост.
- Като прогностичен маркер за висок риск от неуспех на терапия, рецидив или прогресия на карцином на маточна шийка се препоръчва прагова стойност (cut-off) на CD4+ < 200 клетки/mm³.
- При HIV-позитивни пациентки с цервикална интраепителна неоплазия (CIN) се препоръчва своевременно започване на лечение с цел по-голям шанс за успех.
- Препоръчва се поддържане на оптимална вирусна супресия (неоткриваем HIV-РНК-вирусен товар) при HIV-позитивни пациентки с карцином на маточна шийка за по-добър ефект от лечение и за намаляване на риска от рецидив, остатъчна болест или лечебна токсичност.



- При HIV-позитивни жени е желателно да се провежда редовен скрининг за карцином на маточна шийка.
- Броят на CD4+ клетки е с много променливи стойности. Времето на деня, умората и стресът могат да окажат влияние на резултатите от изследването. Най-добре е пробата за брой на CD4+ клетки да се взема по едно и също време на деня и в една и съща лаборатория, която участва в системата за външен качествен контрол.
- Инфекции и ваксинации също оказват силно влияние върху броя на CD4+ клетките. Не е желателно да се изследва брой на CD4+ клетки поне няколко седмици след интеркурентна инфекция или ваксина.

ЛИТЕРАТУРА

1. Dryden-Peterson S, Bvochora-Nsingo M, Suneja G, et al. HIV infection and survival among women with cervical cancer. *J Clin Oncol* 2016; 34: 3749-3757
2. Duerr A, Kieke B, Warren D, et al. Human papillomavirus-associated cervical cytologic abnormalities among women with or at risk of infection with human immunodeficiency virus. *Am J Obstet Gynecol* 2001; 184 (4): 584-590
3. Massad LS, Riestler KA, Anastos KM, et al. Women's Interagency HIV Study Group. Prevalence and predictors of squamous cell abnormalities in Papanicolaou smears from women infected with HIV-1. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1991; 21 (1): 33-41
4. Ellerbrock TV, Chiasson MA, Bush TJ, et al. Incidence of cervical squamous intraepithelial lesions in HIV-infected women. *JAMA* 2000; 283 (8): 1031-1037
5. Massad LS, Ahdieh L, Benning L, et al. Evolution of cervical abnormalities among women with HIV-1: evidence from surveillance cytology in the women's interagency HIV study. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2001; 27 (5): 432-442
6. Omar T, et al. Progression and regression of premalignant cervical lesions in HIV-infected women from Soweto: a prospective cohort. *AIDS* 2011; 25 (1): 87-94
7. Agaba PA, Thacher TD, Ekwempu CC, Idoko JA. Cervical dysplasia in Nigerian women infected with HIV. *Int J Gynaecol Obstet* 2009; 107 (2): 99-102
8. Fruchter RG, Maiman M, Sedlis A, et al. Multiple recurrences of cervical intraepithelial neoplasia in women with the human immunodeficiency virus. *Obstet Gynecol* 1996; 87: 338-344
9. Reimers LL, Sotardi S, Daniel D, et al. Outcomes after an excisional procedure for cervical intraepithelial neoplasia in HIV-infected women. *GynecolOncol* 2010; 119: 92-97
10. Mileshkin L, Freimund A. Improvement of outcomes for women with HIV infection and cervical cancer. *J Clin Oncol* 2016; 34: 3719-3721
11. Ntekim A, Campbell O, Rothenbacher D. Optimal management of cervical cancer in HIV-positive patients: A systematic review. *Cancer Med* 2015; 4: 1381-1393
12. Abraham AG, et al. Invasive cervical cancer risk among HIV-infected women: A North American multi-cohort collaboration prospective study. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2013; 62 (4): 405-413
13. The INSIGHT START Study Group. Initiation of Antiretroviral Therapy in Early Asymptomatic HIV Infection. *N Engl J Med* 2015; 373: 795-807

1.14. ПРЕДИКТИВНИ БИОМАРКЕРИ ПРИ КАРЦИНОМ НА ВУЛВА

1.14.1. p16-експресия

Светлана Христова

Молекулярна биология. Човешките папиломавируси (HPV) са ДНК-вируси от групата на *Papillomaviridae*. Геномът на HPV е изграден от малка двойноверижна ДНК-кодираща вирусна репликация на шест ранни секвенции (E1, E2, E4, E5, E6 и E7) и два късни протеина (L1 и L2). По правило E1-и E2-протеините са отговорни за вирусната инокулация и репродукция. Главно E2 регулира експресия на E6 и E7, а E4/E5 подпомагат вирусната стабилност и растеж. Протеини L1 и L2 формират малки или големи капсидни варианти. Въз основа на тяхната ДНК-секвенция типове на HPV се класифицират като alpha, beta, gamma, delta и mu, а според онкогенния потенциал – на високо/ниско рискови. Вирусът атакува базални клетки, с което си осигурява размножаване и репликация.¹⁻³ Взаимодействието на HPV с таргетни епителни клетки се опосредства чрез мембранни рецептори като хепарин-сулфат протеоглигани и α -6-интегрини.^{4,5}

Честотата на HPV-асоциирани неоплазии на долен женски генитален тракт се определя на 100% при маточна шийка, около 43% при вулва и около 70% за вагинални тумори при годишна заболеваемост от 530000 случая за цервикален карцином и 21000 за карцином на вулва и влагалище.⁶ Подобно на други локализации, честотата на HPV-асоциирани вулварни карциноми се увеличава, особено у млади жени. Системен анализ определя 3.3% прогресия на вулварна интраепителна неоплазия (VIN).⁷

Патоморфологичните и молекулярно-патологични белези при преканцерози (VIN) и плоскоклетъчен карцином на вулва (ПКВ) са с еднаква характеристика с находките

в други анатомични локализации от аногениталната област при налична високорискова HPV-инфекция (виж *Раздели 1.11.1 и 1.13.1*). Вирус-асоцираната прекурсорна вулварна лезия condylomata acuminata се дължи на HPV-6 или HPV-11, докато т.нар. bowenoid papulosis е свързана с HPV-16 субтип.⁸

Аналитични методи за изследване. Биопсичното изследване е основен метод за разпознаване на реактивни епителни промени спрямо HPV-медирана вулварна интраепителна неоплазия (VIN1-3) и е в пряка зависимост от диагностичния опит.^{6,8} Като допълнителен помощен метод може да се използва имунохистохимично (ИХХ) определяне на нива на p16-епителна експресия за потвърждаване на високорискова HPV-свързана VIN. Налична ИХХ-позитивност, доказана чрез p16INK4a-антитяло, верифицира HPV p16-онкопротеин и спомага за отдиференциране на нискостепенни от високостепенни плоскоклетъчни интраепителни лезии (VIN2-3), давайки сигурност в индивидуалната морфологична диагноза и прогноза. Поради висока чувствителност на p16-ИХХ за откриване на преанцерозни лезии методът е препоръчителен при идентификация на малки или неясни интраепителни клетъчни промени, микроскопски подозрителни за VIN2-3 върху биопсични материали.⁹⁻¹¹ Като позитивна p16INK4a ИХХ-експресия се приема силна по интензитет ядрена или ядрена плюс цитоплазмена оцветка, локализирана в до една трета от епителния слой в суспектни или подозрителни участъци (при предварителна микроскопска оценка върху хистологични срезове, оцветени по H&E). Всички p16 ИХХ-позитивни огнища в епитела подлежат на последваща контролна хистологична преоценка според морфологичните критерии за високостепенна лезия.^{12,13} Като допълнителни ИХХ-маркери за определяне на VIN може да се използват Ki-67 (MIB1) и p53. Молекулярно-генетично определяне на HPV-субтип и онкогени е с по-висока специфичност, приема се като основен метод, но не намира приложение в ежедневната диагностична практика.^{10,11}

Доказателства за предиктивно значение. В клиничната практика се използват множество противовирусни лекарствени форми и методи с обща терапевтична ефективност от 50-60% при VIN2-3: *imiquimod* като модификатор на имунния отговор, *cidofovir* за инхибиране на вирусна репликация и активиране на апоптоза, фотодинамична терапия с ефект за директна туморна деструкция и стимулиране на възпалителна анти-

туморна имунна инфилтрация. Във фаза на предклинични изпитвания са възможности за нови лекарствени форми от типа на малки молекули с таргети ДНК-свързани активирани HPV E1/E2 или антиапоптозни E6/E7 вирусни онкогени. В начални клинични проучвания е приложение на протеазомни и хистоновы деацетилазни инхибитори за активиране на апоптоза при HPV-позитивни туморни клетки.¹⁴⁻¹⁶

C

- Доказване на HPV 16/18-онкогени при прекурсорни, морфологично доказани епителни промени се препоръчва при избор на адювантна антивирусна терапия и/или анти-HPV-ваксина.
- Имунохистохимично тестване за експресия на p16INK4a-онкопротеин се препоръчва като допълнителен метод при морфологична верификация на HPV-асоциирани вулварни епителни промени и преканцерози.
- При избрани рискови пациенти (p16INK4a-негативни) HPV-инфекция може да бъде доказана чрез молекулярно-генетичен (PCR) или молекулярно-патологичен *in situ* хибридизационен анализ.



- При сигурна хистологична оценка за нискостепенна интраепителна лезия (VIN1) не се изисква последваща имунохистохимична верификация за p16-експресия.
- Имунохистохимично изследване на p16INK4a има стойност при диагностика на високостепенни интраепителни лезии/преканцерози (VIN2-3) и би трябвало да се използва при несъответствие в професионалната хистологична интерпретация на нискостепенни/високостепенни интраепителни вулварни неоплазии.
- Понастоящем в България не е прието задължително рутинно или скрингово тестване за откриване на HPV-позитивни преканцерози и карцином на вулва.

ЛИТЕРАТУРА

1. Nwokolo NC, Barton SE. Sexually transmitted diseases of the vulva. The vulva, Ridley's edit, 3th ed. 2009; 6: 44-70
2. De Sanjosé S, Diaz M, Castellsagué X, et al. Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 2007; 7: 453-459
3. Bansal A, Singh MP, Rai B. Human papillomavirus-associated cancers: A growing global problem. *Int J Appl Basic Med Res* 2016; 6 (2): 84-89
4. Evander M, Frazer IH, Payne E, et al. Identification of the alpha6 integrin as a candidate receptor for papillomaviruses. *J Virol* 1997; 71: 2449-2456
5. Joyce JG, Tung JS, Przysiecki CT, et al. The L1 major capsid protein of human papillomavirus type 11 recombinant virus-like particles interacts with heparin and cell-surface glycosaminoglycans on human keratinocytes. *J Biol Chem* 1999; 274: 5810-5822
6. Lowy DR, Schiller JT. Reducing HPV-associated cancer globally. *Cancer Prev Res (Phila)* 2012; 5 (1): 18-23
7. van Seters M, van Beurden M, de Craen AJ. Is the assumed natural history of vulvar intraepithelial neoplasia III based on enough evidence. A systematic review of 3322 published patients? *Gynecol Oncol* 2005; 97: 645-651
8. Crum CP, Herrington CS, McQuigg WG, et al. Tumours of the vulva. In: Kurman RJ, Carcangiu ML, Herrington CS, Young RH eds. WHO classification of tumours of female reproductive organs. 4th ed, Lyon, France: IARC and WHO, 2014; 232-235
9. Darragh TM, Colgan TJ, Cox JT, et al. The lower anogenital squamous terminology standardization project for HPV-associated lesions: Background and consensus recommendations from the College of American Pathologists and the American Society for Colposcopy and Cervical Pathology. *Int J Gynecol Pathol* 2013; 32 (1): 76-115
10. Del Pino M, Rodriguez-Carunchio L, Ordi J. Pathways of vulvar intraepithelial neoplasia and squamous cell carcinoma. *Histopathology* 2013; 62: 161-175
11. Hirschowitz L, Faruqi A, Fulmali R, et al. Tissue pathways for gynaecological pathology. Royal College of Pathologists UK, 2015; 5-9. Available at: www.rcpath.org
12. McCluggage WG. Recent developments in vulvovaginal pathology. *Histopathology* 2009; 54: 156-173
13. Reyes MC, Cooper K. An update on vulvar intraepithelial neoplasia: terminology and a practical approach to diagnosis. *J Clin Pathol* 2014; 67: 290-294
14. zur Hausen H. Papilloma viruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer* 2002; 2 (5): 342-350
15. Paavonen J, Naud P, Salmerón J, et al. Efficacy of human papillomavirus (HPV)-16/18 AS04-adjuvanted vaccine against cervical infection and precancer caused by oncogenic HPV types (PATRICIA): Final analysis of a double-blind, randomised study in young women. *Lancet* 2009; 374: 301-314
16. Arbyn M, de Sanjosé S, Saraiya M, et al. EUROGIN 2011 roadmap on prevention and treatment of HPV-related disease. *Int J Cancer* 2012; 131: 1969-1982

1.15. ПРЕДИКТИВНИ БИОМАРКЕРИ ПРИ КАРЦИНОМ НА ПИКОЧЕН МЕХУР

1.15.1. PD-L1-експресия

Светлана Христова, Милчо Минчев

Молекулярна биология. Системни проучвания в областта на локалната интратуморна имунна защита определят водещата роля на специфични рецептори, локализирани върху мембраните на имунокомпетентни клетки: CTLA-4 (цитотоксичен Т-лимфоцит-свързан протеин 4, CD152) и PD-1/PD-L1 (протеин на програмирана смърт 1, CD279/лиганд на програмирана смърт 1, CD274). По правило PD-1 е 40kDa, тип 1 трансмембранен рецептор, свързващ PD-L1-и PD-L2-лигандипри активирани Т- и В-лимфоцити, НК-клетки, моноцити, макрофаги, дендритни клетки и др. Функционално PD-L1 има водещо значение за лимфоцитна стимулация и е подчинен на регулаторните функции на тумор-некротичен фактор алфа (TNF α) и гама-интерферон (IFN γ). Може PD-1/PD-L1-2 да се експресира и по повърхността на туморни клетки, което води до инактивация на Т-клетъчно медиацията противотуморен имунен отговор, свързано със супресия на Т-лимфоцитна миграция, пролиферация и секреция на цитотоксични медиатори.^{1,4} При уротелен карцином на пикочния мехур (УК) високи нива на PD-L1 корелират с ниска степен на диференциация, по-чести постоперативни рецидиви и неблагоприятна прогноза. Неговата експресия има самостоятелно значение, независимо от рТ-стадия и нива на инвазивност в мускулния слой. По правило се наблюдава в напреднали клинични и патоморфологични стадии: при около 7% от тумори в рТа, при 16% в рТ1, при 23% в рТ2 и при 0% при рТ3/4.^{5,6} Туморната PD-L1-експресия е асоциирана с повишена резистентност към BCG-терапия поради локална инактивация на имунната система.^{7,8}

Аналитични методи за изследване. Имунохистохимично (ИХХ) определяне нивата на PD-L1 при УК все още не е напълно стандартизирано. В част от клиникоморфологични проучвания се сравнява ИХХ-интензивност на реакцията спрямо процент PD-L1-позитивни туморни клетки, в други се калкулира и паралелна позитивност на рецептора в интратуморно локализирани имунокомпетентни клетки (т.нар. стромна реакция). По правило ИХХ-изследване се извършва върху замразена или включена в парафин туморна тъкан. Оценка и определяне на процент позитивни клетки с препоръка за лечение е различна според диагностичните платформи за терапевтично приложение на отделни таргетни имунотерапевтични лекарствени форми.⁹⁻¹² Праговите стойности, приемани за позитивност, варират от > 1/5% или > 10/12% клетки в изследван туморен обем.¹² Сравнително проучване на *J. Bellmunt et al.*, основано на ИХХ-верификация с моноклонални анти-PD-L1-антитела върху биопсии от 160 пациента с УК, показва, че туморна PD-L1-позитивност \leq 5% няма предиктивност за общата преживяемост (ОП), за разлика от PD-L1-експресия върху тумор-инфилтриращи мононуклеарни клетки, определяща високостепенна корелация с удължена ОП при метастатичен стадий.^{13,14}

Доказателства за предиктивно значение. Стандартната *cisplatin*-базирана химиотерапия при пациенти с УК в метастатичен стадий осигурява средна преживяемост от 9 до 15 месеца.^{15,16} През последните 10 години нови терапевтични подходи са обект на клинични изследвания, вкл. PD-1/PD-L1-инхибитори. Въз основа на фаза II мултицентрично проучване IMvigor210 (NCT02108652), проведено върху 310 пациента с иноперабилен, локално авансирал или метастатичен УК, първият клинично изпитан и одобрен от Американската Агенция за храни и лекарства (FDA) през май 2017 г. за втора линия лечение PD-L1 инхибитор е *atezolizumab* – моноклонално антитяло, инхибиращо PD-L1-протеин, експресиращ се в туморната популация, което осигурява активация на Т-лимфоцитния противотуморен отговор.^{17,18} Като диагностична плат-

форма се използва паралелна ИХХ-оценка на PD-L1-позитивност върху неопластичните и тумор-инфилтриращи имунокомпетентни клетки. При средно проследяване от 17.5 месеца анализът на резултатите показва стабилен терапевтичен отговор в 16% от всички пациенти и 28% от тези с PD-L1 експресия, налична в $\geq 5\%$ от имунните клетки. Предстои рандомизирана фаза III на проучването (IMvigor211) за прилагане на *atezolizumab* при начално адювантно лечение на клинично авансирал УК.^{18,19}

Във фаза на клинични проучвания са и много други лекарствени форми, приложими за анти-PD-L1 туморна инхибция и имунотерапия при локализиран и/или клинич-

но авансирал УК на пикочен мехур: *pembrolizumab*, *nivolumab*, *durvalumab*, *avelumab* (Табл. 1). През май 2017 г. за клинично прилагане от FDA са одобрени: *avelumab* и *durvalumab* при прогресия след платина-базирана терапия; *pembrolizumab* за първа и втора линия лечение на авансирал и метастатичен УК (Keynote-045 и Keynote-052) при доказана висока средна преживяемост от 10.3 месеца, сравнено с химиотерапия – 7.4 месеца. Диагностичната платформа и оценка на ефекта са базирани на комбиниран сбор $\geq 10\%$ позитивни туморни и инфилтриращи имунни клетки. Изследването е ИХХ с PD-L1 22C3 pharm Dx assay върху дебелиоглени ексцизионни биопсии или резектати.²⁰⁻²⁸

В	<ul style="list-style-type: none"> ■ При метастатичен или нерезектабилен локално авансирал уротелен карцином на пикочен мехур се препоръчва имунохистохимична оценка на PD-L1-експресия с цел селектиране на пациенти с добър отговор на първа или втора (след платина-базирана химиотерапия) линия имунотерапия с <i>atezolizumab</i>. ■ За имунохистохимична оценка на PD-L1-експресия при уротелен карцином се препоръчва използване на индивидуални фармакодиагностични китове и антителиа според изисквания на диагностичните платформи при таргетно лечение.
С	При нерезектабилен локално авансирал или метастатичен уротелен карцином на пикочен мехур се препоръчва имунохистохимична оценка на PD-L1-експресия с цел селектиране на пациенти след платина-базирана химиотерапия за имунотерапия с <i>pembrolizumab</i> , <i>avelumab</i> и <i>durvalumab</i> в рамките на клинични проучвания.


	<ul style="list-style-type: none"> ■ Имунохистохимичната оценка на PD-L1-туморна експресия при уротелен карцином на пикочен мехур е диагностичен метод за определяне на терапия с имунни чекпоинт-инхибитори, използван предимно в клинични проучвания. ■ Понастоящем липсва общоприет стандарт за рутинна имунохистохимична оценка на PD-L1-туморна експресия при уротелен карцином на пикочен мехур. ■ Имунохистохимичната оценка и позитивност на PD-L1-туморна експресия при уротелен карцином на пикочен мехур трябва да се извършва според изискванията на диагностичните платформи при избор на таргетен лекарствен препарат в рамките на съответно клинично проучване.
---	---

Таблица 1. Резултати от текущи клиникоморфологични проучвания за лечение на пациенти с уротелен карцином на пикочен мехур с анти PD-1/PD-L1-инхибитори.²⁰⁻²⁷

Терапевтичен агент	Клинично проучване/фаза	Популация/брой изследвани пациенти	Терапевтичен отговор според PD-L1-експресия
<i>Nivolumab</i>	CheckMate032/037 фаза I-II	след ≥ 1 курс платина-базирано лечение/78	24% при PD-L1 P1% 26% при PD-L1 < P1%
<i>Pembrolizumab</i>	Keynote-045 фаза III	Втора линия за лечение/542 пациента	21.5%
<i>Durvalumab</i>	Фаза I-II	иноперабилен/метастатичен 61 пациенти	в 31% от 46% пациенти с PD-L1 експресия
<i>Avelumab</i>	Javelin фаза Ib при солидни тумори	метастатичен уротелен карцином 129 пациенти	в над 17% от 50% тумори с PD-L1 експресия

ЛИТЕРАТУРА

1. Fife BT, Bluestone JA. Control of peripheral T-cell tolerance and autoimmunity via the CTLA-4 and PD-1 pathways. *Immunol Rev* 2008; 224: 166-182
2. Park JJ, et al. B7-H1/CD80 interaction is required for the induction and maintenance of peripheral T-cell tolerance. *Blood* 2010; 116 (8): 1291-1298
3. Topalian SL, Drake, C, Pardoll G. Targeting the PD-1/B7-H1 (PD-L1) pathway to activate anti-tumor immunity. *Curr Opin Immunol* 2012; 24 (2): 207-212
4. Blank C, Gajewski TF, Mackensen A. Interaction of PD-L1 on tumor cells with PD-1 on tumor-specific T cells as a mechanism of immune evasion: implications for tumor immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother* 2005; 54 (4): 307-314
5. Nakanishi J, Wada Y, Matsumoto K, et al. Overexpression of B7-H1 (PD-L1) significantly associates with tumor grade and postoperative prognosis in human urothelial cancers. *Cancer Immunol Immunother* 2007; 56: 1173-1182
6. Boorjian SA, Sheinin Y, Crispen PL, et al. T-cell coregulatory molecule expression in urothelial cell carcinoma: clinicopathologic correlations and association with survival. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 4800-4008
7. Inman BA, Sebo TJ, Frigola X, et al. PD-L1 (B7-H1) expression by urothelial carcinoma of the bladder and BCG-induced granulomata: associations with localized stage progression. *Cancer* 2007; 109: 1499-505
8. Zibelman M, Ramamurthy C, Plimack ER. Emerging role of immunotherapy in urothelial carcinoma-advanced disease. *Urol Oncol* 2016; 34: 538-547
9. Drake CG, Bivalacqua TJ, Hahn NM. Programmed cell death ligand-1 blockade in urothelial bladder cancer: to select or not to select. *J Clin Oncol* 2016; 34 (26): 3115-3116
10. Mullane SA, Werner L, Callea M, et al. PD-L1 expression in mononuclear cells and not in tumor cells, correlated with prognosis in metastatic urothelial carcinoma. ASCO 2014; *J Clin Oncol* 2014; 32: 5s (Suppl.; Abstr. 4552)
11. Patel SP, Kurzrock R. PD-L1 expression as a predictive biomarker in cancer immunotherapy. *Mol Cancer Ther* 2015; 14 (4): 847-856

12. Zhou TC, Sankin AI, Porcelli SA, et al. A review of the PD-1/PD-L1 checkpoint in bladder cancer: from mediator of immune escape to target for treatment. *Urol Oncol Semin Orig Invest* 2017; 35: 14-20
13. Bellmunt J, Mullane SA, Werner L, et al. Association of PD-L1 expression on tumor-infiltrating mononuclear cells and overall survival in patients with urothelial carcinoma. *Ann Oncol* 2015; 26: 812-817
14. Bellmunt J, Powles T, Vogelzang NJ. A review on the evolution of PD-1/PD-L1 immunotherapy for bladder cancer: the future is now. *Cancer Treatm Rev* 2017; 54: 58-67
15. De Santis M, Bellmunt J, Mead G, et al. Randomized phase II/III trial assessing gemcitabine/carboplatin and methotrexate/carboplatin/vinblastine in patients with advanced urothelial cancer who are unfit for cisplatin-based chemotherapy: EORTC study 30986. *J Clin Oncol* 2012; 30 (2): 191-199
16. Clark EP, Spiess PE, Agarwal N, et al. NCCN Guidelines® Insights Bladder Cancer, Version 2.2016. Available at: www.nccn.org
17. Patients with advanced bladder cancer benefit from anti-PD-L1 Immunotherapy. ASCO 2017. Available at: <https://www.asco.org>
18. Loriot Y, Rosenberg JE, Powles TB, et al. Atezolizumab (atezo) in platinum (plat)-treated locally advanced/metastatic urothelial carcinoma (mUC): updated OS, safety and biomarkers from the Ph III Mvigor210 study. ESMO, Copenhagen, Denmark: Proceedings; 2016; Abstr. 783P
19. Rosenberg JE, Hoffman-Censits J, Powles T, et al. Atezolizumab in patients with locally advanced and metastatic urothelial carcinoma who have progressed following treatment with platinum-based chemotherapy: a single-arm, multicentre, phase 2 trial. *Lancet* 2016; 387: 1909-1920
20. Sharma P, et al. Nivolumab in metastatic urothelial carcinoma after platinum therapy (CheckMate 275): a multicentre, single-arm, phase 2 trial. *Lancet Oncol* 2017; 18 (3): 312-322
21. Plimack ER, et al. Safety and activity of pembrolizumab in patients with locally advanced or metastatic urothelial cancer (KEYNOTE-012): a non-randomised, open-label, phase 1b study. *Lancet Oncol* 2017; 18 (2): 212-220
22. Smith DC, Gajewski T, Hamid O, et al. Epcadostat plus pembrolizumab in patients with advanced urothelial carcinoma: Preliminary phase I/II results of ECHO-202/KEYNOTE-037. *J Clin Oncol* 2017; 35: (Suppl): Abstr. 4503
23. Sharma P, Callahan MK, Bono P, et al. Nivolumab monotherapy in recurrent metastatic urothelial carcinoma (CheckMate 032): a multicentre, open-label, two-stage, multi-arm, phase 1/2 trial. *Lancet Oncol* 2016; 17: 1590-1598
24. Apolo AB, Infante JR, Hamid O, et al. Avelumab (MSB0010718C; anti-PD-L1) in patients with metastatic urothelial carcinoma from the JAVELIN solid tumor phase 1b trial: Analysis of safety, clinical activity, and PD-L1 expression. 2016 ASCO, Abstr. 4514
25. Patel MR, Ellerton J, Agrawal M, et al. Avelumab (MSB0010718C; anti-PD-L1) in patients with metastatic urothelial carcinoma progressed after platinum-based therapy or platinum ineligible. European society for medical oncology. Copenhagen, Denmark: ESMO 2016, Abstr. 777PD
26. Apolo AB, Infante JR, Balmanoukian A, et al. Avelumab, an anti-programmed death-ligand 1 antibody, in patients with refractory metastatic urothelial carcinoma: results from a multicenter, phase 1b study. American Society of Clinical Oncology. *J Clin Oncol* 2017; 35: 1-10
27. Massard C, Gordon MS, Sharma S, et al. Safety and efficacy of durvalumab (MEDI4736), an anti-programmed cell death ligand-1 immune checkpoint inhibitor, in patients with advanced urothelial bladder cancer. *J Clin Oncol* 2016; 34: 3125-3199
28. Bellmunt J, de Wit R, Vaughn DJ, et al. Pembrolizumab as second-line therapy for advanced urothelial carcinoma. *N Engl J Med* 2017; 376 (11): 1015-1026

1.16. ПРЕДИКТИВНИ БИОМАРКЕРИ ПРИ ПРОСТАТЕН КАРЦИНОМ

1.16.1. Серумна PSA-стойност

Яна Бочева, Веселина Колева

Молекулярна биология. Простатноспецифичният антиген (PSA) е есенциален компонент на семенната течност с молекулярна маса 33 kDa. Той е едноверижен гликопротеин, съставен от 240 аминокиселини и има активност на серинова протеаза. Синтезата му се кодира от *KLK3*-ген, разположен на 19-а хромозома. Синтезира се от епителните клетки на ацините и от дукталния епител на жлезата в дукталната система на простатата. Функцията му е свързана с втечняване на семенния коагулум, което има отношение към мъжкия фертилитет. В серум концентрацията му е ниска, повишава се при разрушаване на структурата на жлезата, дори и при микролезии. В серум PSA се свързва с алфа-2-макроглобулин и с алфа-1-антихимотрипсин, с които формира стабилни комплекси. Около 86% от циркулиращия PSA е под форма на стабилен PSA-алфа-1-антихимотрипсин, малка порция от антигена е свързана с алфа-2-макроглобулин и останалото е свободен PSA.¹

Аналитични методи за изследване. Методологичните секции в различните публикации, третиращи резултати от определяне на PSA, посочват като рутинно използвани индиректните хомогенни имуноанализи, като CLIA, ECLIA и CMIA. Въвеждането от WHO на утвърден стандарт за калибриране на тестовете за PSA води до по-ниски стойности и поставя въпроса необходимо ли е да се променят препоръките за биопсия и за оценка на риска.

Доказателства за предиктивно значение. В контекста на серумна концентрация на PSA като предиктивен биомаркер при простатен карцином (ПК) понятието *биохимичен*

чен рецидив се дефинира в клиничната практика като повишение на показателя след радикална простатектомия или лъчелечение като самодостатъчно за рецидив или прогресия на болестта. Въпреки техническото усъвършенстване на тези лечебни процедури, данните сочат PSA-рецидиви между 27% и 53%.² Коментирайки биохимичният рецидив, конкретните му цифрови стойности за PSA се различават съществено при пациенти, при които е проведено лечение с радикална простатектомия, и при проведено лъчелечение. Рискът за смърт от ПК при двете групи с биохимичен рецидив е различен. При преминали радикална простатектомия нивото на PSA, което дефинира биохимичен рецидив, е > 0.2 ng/mL и покачващи се стойности.³ За прецизиране на групата, лекувани с радикална простатектомия, където таргетната стойност за биохимичен рецидив е ниска и касае малък интервал от стойности (от недетектабилна до 0.2 ng/mL), е нужно разделянето им в три основни групи: (i) пациенти, при които серумното ниво на маркера не достига недетектабилни стойности след радикална простатектомия – персистираща болест; (ii) пациенти, които достигат недетектабилни стойности след радикална простатектомия, но при проследяване са отчетени повишаващи се нива на туморния маркер при две или повече последователни лабораторни измервания – рекурентна болест; (iii) пациенти (в действителност единични случаи), при които персистират ниски стойности на туморния маркер заради забавен PSA-метаболизъм или налична бенигна простатна тъкан. На практика липсва консенсусно становище за количествения цифров израз на понятието *недетектабилни стойности на PSA*. Те са категорично методологично зависими и по тази причина проследяването следва да става в една и съща клинична лаборатория, работеща според стандартите на добър вътрешен и външен лабораторен контрол. Това особено важи в случаи, когато при проследяване се изчисляват PSA-производни показатели като PSA-динамика и

време за удвояване на PSA. Третата горе дефинирана група не изисква по-нататъшно уточняване до детектиране на повишени стойности на PSA. Първа и втора групи изискват търсене на далечни метастази, т.е. на практика рестадиране на пациента. Специфичните рестадиращи изследвания зависят от клиничните особености на пациента. Според *Pound et al.* след радикална простатектомия само 34% от пациентите с биохимичен рецидив прогресират клинично.⁴ Други автори публикува подобни данни от наблюдение на 2400 пациенти, като само 22.9% от тези с биохимичен рецидив след радикална простатектомия реализират клиничен рецидив, а само 5.8% умират от КП.⁵

Няколко проучвания правят опит да идентифицират рискови фактори за метастази при пациенти със самостоятелен PSA-рецидив след радикална простатектомия. Високорисковият профил в тази група са пациенти с период на удвояване на PSA < 3 месеца, инвазия на семеннимехурчена (pT3b), оценка по *Gleason* 8-10 и време до PSA-рецидив < 3 години. Групата с нисък риск за истински клиничен рецидив се характеризира с период на удвояване на PSA > 12 месеца, pT3a, оценка по *Gleason* под 7 и време до PSA-рецидив > 3 години.^{6,7} На практика повечето с висок риск се презентират с микрометастази или явен локален рецидив, докато тези от нискорискова субгрупа – с бавно прогресиращ локален рецидив. И в двата случая в съображение влиза спасително лъчелечение ± андрогенна блокада.^{2,8} Във високорисковата субгрупа провеждането на спасителна терапия следва да се включи максимално рано и агресивно (още при PSA < 0.5 ng/ml), докато в нискорисковата група и наблюдението е опция. И в двата случая при обсъждане *за и против* спасителна терапия в съображение влизат възраст и период на очакван остатъчен живот, както и фактът, че повечето пациенти в нискорисковата група имат много добра прогноза и без включване на терапия. Стартиране на навременна спасителна терапия във високорискова група увеличава трикратно преживяемостта, но ефектът не се дос-

тига при пациенти, при които се отчита период на удвояване на PSA < 6 месеца, както и болни, отложили терапия с повече от две години след биохимичен рецидив.⁹

Според RTOG-ASTRO Phoenix Consensus Conference за гранична стойност (cut off) за биохимичен рецидив при пациенти с проведено първично (дефинитивно) лъчелечение (със или без хормонолечение) се определя всяко повишение на стойността на PSA с повече от 2 ng/ml над индивидуалния PSA-надир, независимо от неговата стойност.¹⁰ И в тази група се очертават две прогностични субгрупи за развитие на далечни метастази и смъртност. Високорисковата подгрупа се характеризира с период на удвояване на PSA < 3 месеца, клиничен стадий cT3b-T4, оценка по *Gleason* 8-10, време до PS-рецидив < 3 години. Нискорисковата подгрупа се определя с период на удвояване на PSA > 15 месеца, клиничен стадий < cT3a, оценка по *Gleason* под 7 и време до PSA-рецидив > 3 години.^{7,9} И в тази подгрупа изборът на последваща спасителна терапия – радикална простатектомия, спасителна крихирургия, брахитерапия или високоинтензивен фокусиран ултразвук (HIFU) – се обсъждат според онкологичния рисков профил на пациента, неговите очаквания за остатъчен период на живот и качество на живот.^{2,8}

Започване на втора линия лечение след биохимичен рецидив без доказани далечни метастази или локален рецидив, т.е. при изолиран PSA-рецидив, е спорно, но се обсъжда в ръководствата на европейските и американските експертни бордове. При PSA-рецидив след радикална простатектомия терапевтичните опции са лъчелечение на простатно ложе, пълна андрогенна блокада, непълна андрогенна блокада или наблюдение. При PSA-рецидив след дефинитивно лъчелечение опциите са идентични с по-горе описаните, с изключение на повторно перкутанно лъчелечение. Спасително лъчелечение, крио- и брахитерапия са в съображение при внимателен подбор на пациенти.²


Множество проучвания използват PSA като маркер за отговор на терапия при кастрация-рефрактерен простатен карцином (КРПК), въпреки че към настоящия момент няма категорични данни за значение на степента или продължителността на снижение на PSA. Данни от проучвания на отговор към терапия с ваксини показва сигнификантно подобрене на преживяемостта без промяна в серумни нива на PSA, което го прави неподходящ маркер за мониториране на терапия с нехормонални нецитотоксични лекарства. От друга страна, има данни за отчетена корелация между подобрена преживяемост при снижение на PSA с повече от 30%. В друго проучване се отчита сигнификантна разлика в преживяемостта на болни, нормализирали PSA < 4 ng/ml – 33 месеца срещу 15.8 месеца при група с абнормни стойности.² Като цяло, даните за използване на PSA при мониториране на този тип лечение са противоречиви и няма категорична препоръка за използването му.^{2,8}

Разнопосочни са данните за PSA-предикция при КРПК. Дефиницията за прогресия при КРПК според Европейска урологична асоциация (EAU) включва серумен тестостерон < 1.7 nmol/L, съвместно с биохимична (PSA > 2 ng/mL или три последователно из-

мерени стойности, надвишаващи с 50% надира на стойността на PSA за пациента) или радиологична прогресия. Безспорно е, че честият контрол на PSA след терапия ще доведе до по-ранно откриване на прогресия, но към момента няма проучвания, които да доказват ползи от незабавно започване на лечение при повишаващи се нива на PSA при пациенти без клинични и образни данни за метастази.¹¹ Консенсус на PCa Radiographic Assessments for Detection of Advanced Recurrence (RADAR) group препоръчва костна скитинтиграфия при достигане на PSA > 2 ng/mL и ако резултатът е негативен, да се повтори при достигане на PSA > 5 ng/l, както и при всяко удвояване на маркера при асимптоматични пациенти. Маркерът следва да се тества на всеки 3 месеца.^{2,12} Много настоящи проучвания третират PSA като маркер за отговор на терапия, въпреки че към момента липсва общоприета препоръка за степен и продължителност на снижение, което да се приеме за значимо. Счита се, че > 30% снижение на маркера след лечение е предиктор за сигнификантно по-добра прогноза за преживяемост.^{2,13} Добрият PSA-отговор (PSA < 4 ng/l) според проучването TAX327 повишава преживяемостта до 33 месеца срещу 15.8 месеца в групата с абнормни стойности.^{2,14}

В

- Препоръчва се използване на PSA за дефиниране на рискови групи при поставяне на диагноза простатен карцином.
- Препоръчва се активното проследяване на простатен карцином да включва изследване на серумно ниво на PSA на всеки 6 месеца, ректално дигитално изследване на всеки 12 месеца и повторна простатна биопсия не по-рано от 12 месеца, освен ако не възникнат други клинични обстоятелства.
- При простатен карцином след дефинитивно лъчелечение се препоръчва изследване на серумно ниво на PSA на всеки 6-12 месеца през първите пет години и ежегодно след това.
- При пациенти след радикална простатектомия препоръчително ниво на PSA, което дефинира биохимичен рецидив, е > 0.2 ng/ml и покачващи се стойности.

В	<ul style="list-style-type: none"> ■ След дефинитивно лъчелечение, със или без хормонотерапия, като прагова стойност за биохимичен рецидив се препоръчва всяко повишение на стойността на PSA с повече от 2 ng/ml над индивидуалния PSA-надир, независимо от неговата стойност.
С	<ul style="list-style-type: none"> ■ Серумен PSA не се препоръчва като маркер за мониториране на терапия с нехормонални нецитотоксични лекарства (имунотерапия). ■ Не се препоръчва пациенти с неметастатичен кастрация-рефрактерен простатен карцином и биохимична прогресия да се лекуват извън клинично проучване. ■ Препоръчва се пациенти с кастрация-рефрактерен простатен карцином, лекувани с максимална андрогенна блокада, да преустановят лечението с антиандроген при запазване на LHRH-агонист при прогресия в PSA.
	<ul style="list-style-type: none"> ■ Стойностите на PSA се влияят от спецификата на лабораторните реактиви, методи и анализатори. ■ Препоръчително е при изследване на PSA-динамика пациентът да използва една и съща лаборатория, работеща според стандартите на добър вътрешен и външен лабораторен контрол.

ЛИТЕРАТУРА

1. Thomas L, Clinical Laboratory Diagnostic, 1998. ISBN 3-9805215-4-0
2. Mottet N (Chair), J. Bellmunt, E. Briers, R.C.N. van den Bergh, M. Bolla, N.J. van Casteren. Guidelines on Prostate Cancer, 2016. Available at: http://uroweb.org/wp-content/uploads/09-Prostate-Cancer_LR.pdf
3. Moul JW. Prostate specific antigen only progression of prostate cancer. *J Urol* 2000; 163 (6): 1632-42.
4. Pound CR, Partin AW, Eisenberger MA, et al. Natural history of progression after PSA elevation following radical prostatectomy. *JAMA* 1999; 281 (17): 15917
5. Boorjian SA, Thompson RH, Tollefson MK, et al. Long-term risk of clinical progression after biochemical recurrence following radical prostatectomy: the impact of time from surgery to recurrence. *Eur Urol* 2011; 59 (6): 893-899
6. Antonarakis ES, Feng Z, Trock BJ, et al. The natural history of metastatic progression in men with prostatespecific antigen recurrence after radical prostatectomy: longterm follow-up. *BJU Int* 2012; 109 (1): 32-39
7. Brockman JA, Alanee S, Vickers AJ, et al. Nomogram predicting prostate cancer-specific mortality for men with biochemical recurrence after radical prostatectomy. *Eur Urol* 2014; 67 (6): 1160-1167
8. NCCN Clinical practice guidelines in oncology. Prostate cancer, v.2.2017. Available at: www.nccn.org
9. Trock BJ, Han M, Freedland SJ, et al. Prostate cancer-specific survival following salvage radiotherapy vs observation in men with biochemical recurrence after radical prostatectomy. *JAMA* 2008; 299: 2760-2769

10. Roach M 3rd, Hanks G, Thames H Jr, et al. Defining biochemical failure following radiotherapy with or without hormonal therapy in men with clinically localized prostate cancer: recommendations of the RTOG-ASTRO Phoenix Consensus Conference. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2006; 65: 965-974
11. Smith, M.R., et al. Natural history of rising serum prostate-specific antigen in men with castrate non-metastatic prostate cancer. *J Clin Oncol* 2005; 23: 2918
12. Crawford, E.D., et al. Challenges and recommendations for early identification of metastatic disease in prostate cancer. *Urology* 2014; 83: 664
13. Petrylak, D.P., et al. Evaluation of prostate-specific antigen declines for surrogacy in patients treated on SWOG 99-16. *J Natl Cancer Inst* 2006; 98: 516
14. Tannock IF, et al. Docetaxel plus prednisone or mitoxantrone plus prednisone for advanced prostate cancer. *N Engl J Med* 2004; 351: 1502

1.16.2. Оценка по *Gleason*

Савелина Поповска

Патологични принципи. Системата за степенуване на простатен карцином (ПК) по *Gleason* е общоприет начин за определяне на степен на диференциация на малигнения тумор и неговата прогноза.¹⁻⁴ В исторически план тя се е наложила над други предлагани системи за микроскопска оценка на степен на диференциация. Основени критерий е оценка на архитектурни модели на рутинно оцветяване, отчитащи форма, размери, разположение на жлезни структури, инфилтрация в околни тъкни, оценявана в пет степени, без да се отчитат цитологични характеристики на туморните клетки.¹⁻⁶ Крайната оценка се формира, като се определя т.нар. сбор/скор по *Gleason*, който варира от 2 (най-добре диференциран) до 10 (недиференциран) и представлява сума от оценка на степен на преобладаващ (първичен, най-добре представен) хистологичен модел, плюс втори по честота архитектурен начин на строеж и растеж на туморни клетки.⁶ През 2014 г. Международната асоциация по урологична патология (ISUP) модифицира системата за степенуване на ПК, което е прието от и Световна здравна организация (WHO).^{7, 8, 10} Това е съвременна валидирана актуализация на степенуването, която прави по-точна стратификация на пациенти и опростява различните комбинации от архитектурни модели.⁷

Аналитични методи за изследване. В оригиналната схема на *Gleason* архитектурният модел 1, където туморът е изграден от плътно разположени и еднакви по размер и форма жлези, оформящи добре отграничени нодули, без инфилтрация в околни структури, най-вероятно описващ атипична аденоматозна хиперплазия, понастоящем не намира практическо приложение.⁸ Вторият архитектурен модел, при който се наблюдават вариации в неопластичните жлези и увеличено количество строма между тях, с неправилна форма на


лезията в периферията, също се среща много рядко. Най-често срещан модел е *Gleason 3*, съставен от индивидуални неопластични структури с малки или вариабилни жлезисти формирования, които инфилтрират строма и съседни бенигнни жлези. Понастоящем крибриформни структури с неправилни контури и „гломерулоиден“ вид се преценяват като 4-ти хистологичен модел, а не като 3-ти, както е при по стария вариант на градиране. Препоръките са за приемане на всички крибриформни формации за 4-ти модел, който е негативен прогностичен фактор, доказан в множество проучвания.⁸ Освен гореописаните, 4-ти модел включва слети и неправилни жлези, които не са самостоятелни ациарни структури. В по-новата актуализация на системата структури с некрози от комедо-тип се преместват в 5-и архитектурен модел, който по принцип се представя със солиден архитектурен строеж на неопластични клетки или повлекла от такива.⁹ Крибриформен и папиларен дуктален карцином се преценяват като архитектурен 4-ти модел, дуктален аденокарцином с комедо-некрози – 5-и модел, а подобният на PIN дуктален карцином, изграден от дискретни жлезни формации, се преценява като 5-и модел. Модификациите на системата за градиране вземат предвид и площта на намерените модели по *Gleason*. При намиране на високостепенен модел той винаги се включва в скората, докато нискостепенен модел под 5% не се отразява. На иглена биопсия, ако е наличен третичен високостепенен компонент, заемащ най-малка площ, при формиране на скората той се отразява като вторичен.⁸ Ако тъканните цилиндри при дебелоиглена биопсия са изпратени в отделни контейнери или са маркирани по различен начин, се интерпретиран с отделна оценка по *Gleason*.⁸

По правило оценка по *Gleason 2-5* не трябва да се използва на иглена биопсия поради недобра възпроизводимост на интерпретацията между различни експерти и несъвпадение с последващи материали от радикална простатектомия, което води до погрешно поведение и подвежда клиницистите.

Доказателства за предиктивно значение. За терапевтични нужди и на основата на метаанализ, включващ повече от 20 000 пациенти с ПК, лекувани с радикална простатектомия, се предлага групиране в пет групи, които имат различна прогностична стойност (Табл. 1).⁷ Това предлага по-добра клинична стратификация на пациентите, опростяване на множеството комбинации от различни архитектурни модели и се препоръчва да се отбелязва успоредно с ISUP-модификацията от 2014 г.¹⁰ Значението на хистологичната оценка по *Gleason* е свързано предимно с определяне на индивидуална прогноза и терапевтичен подход. Оценката е определяща за предвиждане на метастази и летален край в комбинация с допълнителни клинични и патоморфологични прогностични фактори, вкл. биохимични нива на PSA, патологично стадиране. Оценката по *Gleason* е независим предиктивен морфологичен фактор при пациенти с проведена предоперативна или адювантна хормонална терапия.⁶ Редица проучвания установяват неблагоприятен предиктивен фактор за отговор към лъчелечение за недиференцирани модели като *Gleason* 5.¹¹⁻¹⁵ Точната диагностика и степенуване на ПК са от критично значение за определяне на терапевтичните опции.

Оценката по *Gleason* е важен компонент на т.нар. CAPRA-скор (Prostate Risk Assessment, UCSF-CAPRA), който е с предиктивно значение за предсказване на биохимичен рецидив и смъртност след проведена простатектомия и лъчелечение.¹⁷ Консенсусът за степенуване на ПК, приет през 2005 г. и актуализиран от ISUP през 2014 г., подобрява системата за степенуване на неоплазмата, въпреки че остават някои ограничения по тяхното приложение в ежедневната практика.¹⁶

Ползата от стойността на *Gleason*-оценка при първоначална диагноза (< 8 или ≥ 8) като предиктивен маркер за отговор към *abiraterone acetate* (AA) плюс *prednisone* при пациенти с метастатичен кастрация-рефрактерен простатен карцином е обект на ретроспективни проучвания при 2 000 пациента – COU-AA-301 (NCT00638690) и COU-AA-302 (NCT00887198). Според резултати от проучванията оценката по *Gleason* по време на първоначалната диагноза не може да се използва за вземане на решение за терапия с *abiraterone acetate* поради факта, че метастатичната болест се различава по степен на диференциация от първоначалната лезия.¹⁸

A	За степенуване на простатен карцином се препоръчва модифицираната система на Международна асоциация по урологична патология (ISUP) (приета от WHO). За терапевтични нужди се препоръчва формиране на прогностични групи според архитектурните модели и сбора по <i>Gleason</i> .
B	Оценка по <i>Gleason</i> по време на първоначалната диагноза не може да се използва за вземане на решение за терапия с <i>abiraterone acetate</i> .
	■ При оценка по <i>Gleason</i> на материал от иглена биопсия трябва да се вземат предвид спецификата на ограничената анализирана площ.



- Идентифициран високостепенен модел в материал от иглена биопсия задължително се включва в оценката, независимо от площта, докато нискостепенен модел под 5% не се отразява.
- Ако е наличен третичен високостепенен компонент, при формиране на оценката той се отразява като вторичен.
- Ако тъканните цилиндри са изпратени в отделни контейнери или са маркирани по различен начин, се оценяват по Gleason поотделно.
- Оценка по Gleason 2-5 не трябва да се използва на материал от иглена биопсия поради опасност от погрешно последващо клинично поведение.

Таблица 1. Прогностични групи и техните възможни архитектурни модели.⁷

Група и сбор по Gleason	Възможен архитектурен модел
Група 1 (Gleason скор ≤ 6)	Архитектурният модел се състои само от индивидуални добре оформени жлези
Група 2 (Gleason скор 3+4=7)	Предимно добре формирани жлези и малък компонент на лошо формирани, сливащи се или крибриформени структури
Група 3 (Gleason скор 4+3=7)	Предимно лошо формирани, слети или крибриформени туморни жлезисти структури с наличен малък компонент на добре оформени жлези.
Група 4 (Gleason сбор 8 (4+4; 3+5 или 5+3))	Наблюдават се три възможни модела: (1) само недобре формирани, слети или крибриформени жлези (2) предимно добре оформени жлези с малък компонент от солидни структури (3) предимно без формиране на жлези и малък компонент от добре оформени жлези
Група 5 (Gleason скор 9-10)	Липса на оформени жлезисти структури или такива с некрози/със или без лошо оформени, слети или крибриформени жлези или недобре оформени, слети и крибриформени жлези

ЛИТЕРАТУРА

- Gleason DF. The Veterans Administration Cooperative Urological Research Group. Histologic grading and clinical staging of prostatic carcinoma. In Tannenbaum M (ed.): Urologic pathology. The prostate. Philadelphia, 1977, Lea and Febiger
- Mostofi, FK, Price EB Jr. Tumors of the Male Genital System, Atlas of Tumor Pathology, Second Series, Fascicle 8. Washington DC, Armed Forces Institute of Pathology. 1973; pp. 202-217
- Gleason DF, Mellinger GT. Prediction of prognosis for prostatic adenocarcinoma by combined histological grading and clinical staging. *J Urol* 1974; 111: 58-64
- Gleason DF. Histologic grading of prostate cancer: a perspective. *Hum Pathol* 1992; 23: 273-279
- Rosai J. Prostate and seminal vesicles in Rosai and Akerman's Surgical Pathology, 9th ed., IRAC Press, 2011, vol1
- Поведение при простатен карцином, Национално ръководство, MOPE 2012. Национален експертен борд. Арт Трейсър, Варна, 2011
- Epstein JI, Zelefsky MJ, Sjoberg DD, et al. A contemporary prostate cancer grading system: A validated alternative to the Gleason score. *Eur Urol* 2015; doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.eururo.2015.06.046>
- Moch H, Humphrey PA, Ulbright TM, et al. WHO Classification of Tumors of the Urinary System and Male Genital Organs, Lyon, 2016, pp. 152-154
- Amin MB, Grignon DJ, Humphrey PA, editors. Gleason grading of prostate cancer. A contemporary approach. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2004: 1-116
- Epstein JI, Zelefsky MJ, Sjoberg DD, et al. A contemporary prostate cancer grading system: A validated alternative to the Gleason score. *Eur Urol* 2016; 69 (3): 428-435
- Sabolch A, Feng FY, Daignault-Newton S, et al. Gleason pattern 5 is the greatest risk factor for clinical failure and death from prostate cancer after dose-escalated radiation therapy and hormonal ablation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2011; 81: e351-360
- Stone NN, Stone MM, Rosenstein BS, et al. Influence of pretreatment and treatment factors on intermediate to long-term outcome after prostate brachytherapy. *J Urol* 2011; 185: 495-500
- Stenmark MH, Blas K, Halverson S, et al. Continued benefit to androgen deprivation therapy for prostate cancer patients treated with dose-escalated radiation therapy across multiple definitions of high-risk disease. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2011; 81: e335-344
- Stock RG, Cesaretti JA, Stone NN. Disease-specific survival following the brachytherapy management of prostate cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2006; 64: 810-816
- Sylvester JE, Grimm PD, Wong J, et al. Fifteen-year biochemical relapse-free survival, cause-specific survival, and overall survival following I (125) prostate brachytherapy in clinically localized prostate cancer: Seattle experience. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2011; 81: 376-381
- Epstein JI, Egevad L, Amin MB, et al. The 2014 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma: definition of grading patterns and proposal for a new grading system. *Am J Surg Pathol* 2016; 40 (2): 244-252
- Punnen S, Freedland S, Presti Js Jr, et al. Multi-institutional validation of the CAPRA-S score to predict disease recurrence and mortality after radical prostatectomy. *European Urology* 2014; 65 (6): 1171-1177
- Fizazi K, Flaig TW, Stöckle M, et al. Does Gleason score at initial diagnosis predict efficacy of abiraterone acetate therapy in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer? An analysis of abiraterone acetate phase III trials. *Ann Oncol* 2016; 27 (4): 699-705

1.16.3. ARv7-експресия

Драга Тончева

Молекулярна биология. Генът на андрогенния рецептор (AR) е локализиран върху хромозома Xq11-12. Андроген-рецепторният протеин принадлежи към фамилията на нуклеарните рецептори за стероидни хормони и играе важна роля за развитие на метастатичния кастрация-рефрактерен простатен карцином (мКРПК). Разработените нови генерации от хормонални лекарства (анти-AR-терапия с *abiraterone acetate* и *enzalutamide*) подтискат AR-активност, но и към тях се развива лекарствена резистентност. Нови проучвания отдават значение на AR-сплайс вариантите (AR-Vs) и особено на AR-V7 като предиктивни маркери.¹ По правило AR-генът е транскрипционен фактор, който се активира от лиганд и регулира експресията на определени гени. Той е съставен от 8 екзона, които кодират съответни функционални райони на протеина с обособени три домейна.² Първият, N-терминален домейн, кодиран от екзон 1 (NTD или AF1-активираща фракция 1), регулира транскрипцията на AR и включва вариабелен брой полиглутамин или полиглицин повтори, като тяхната дължина влияе върху AR-активност. Вторият, ДНК-свързващ домейн (DBD), се кодира от екзони 2 и 3.³⁻⁶ Третият, андроген-свързващ домейн (ligand-binding domain, LDB), се кодира от екзони 4-8; LDB образува джоб от 12 огънати спирали, които разпознават специфичния хормон, а според скачения лиганд (агонист или антагонист) спиралите са различно организирани. Районът между DBD и LDB е подвижен и контролира активността на AR.⁷ Функционално AR свързва хормонен лиганд и преминава в активно състояние, дисоциира от асоциирани протеини, навлиза в ядрото, димеризира и действа като транскрипционен фактор на андрогени гени.

Алтернативният сплайсинг води до образуване на различни структурни и функционални AR-варианти (AR-Vs). Идентифицирани са 15 различни AR-Vs⁸⁻¹⁰ и повечето от тях съдържат интронна последователност, която кодира къс специфичен пептид, вместо лиганд-свързващ домейн (LBD). Вариантите на AR са структурно и функционално различни от рецептора с цялостна структура (full-length AR, AR-FL), но техните молекулярни механизми все още не са изяснени. Въпреки данните за свърхекспресия на AR-V1 при тумори на простата, особено при КРПК, няма достатъчно клинични проучвания, които да определят прогностичната му стойност. Знае се, че AR-V12 съдържа екзони 1-4 и екзон 8, но липсват екзони 5-7. Този вариант е експресиран както при бенигнени лезии, така и при малигнен и метастатичен ПК, и поддържа клетъчната пролиферация и прогресия. Единствено AR-V7 е често експресиран при КРПК и до момента представлява най-важен вариант, свързан с резистентност към анти-AR-терапия с *abiraterone acetate* и *enzalutamide*. Този вариант има екзони 1, 2, 3 (скрит екзон 3, CE3) и делетиран лиганд-свързващ домейн (LBD). По правило AR-V7-вариантът е конститутивно активен и експресиран при КРПК, регулирайки транскрипционна програма, подобна, но не идентична, с тази на “див” тип ген AR-FL. Предложена е хипотеза, според която при превключване от AR-FL към AR-V7 сплайс-вариантът придобива нова функция в сравнение с AR-V7, експресирайки уникална група от гени, и променя транскрипционната програма на клетките, повишавайки онкогенния потенциал на тумора.¹¹

Аналитични методи за изследване. Вариантът AR-V7 mRNA може да бъде диагностицирана с RT-PCR или с имунохистохимично изследване чрез използване на специфични поликлонални антитела срещу 16aa COOH-terminal extension, кодиран от CE3 на AR-V7-изоформа. Тестът с антитела Adnatest за имунохистохимично определяне на AR-V7 не е валидиран.

Доказателства за предиктивно значение. Пациенти с метастатичен ПК имат малки терапевтични опции (таксани, *abiraterone acetate*, *enzalutamide* и *sipuleucel-T*), към които е възможно да се развие резистентност. По правило AR играе важна роля за прогресия на болестта. В последните години AR-Vs, по-специално AR-V7/AR3, се разглежда като важен фактор за прогресия.^{12,13} Той е установен с по-висока честота при пациенти с новодиагностициран метастатичен в сравнение с локален ПК. Наличието на AR-V7/AR3 е свързано с по-лоша прогноза и по-ниска преживяемост. Изследвания показват, че AR-V7 m-RNA е установена в циркулиращи туморни клетки (ctCs) на пациенти с КРПК¹⁴; пациенти с по-висока експресия имат по-къса преживяемост без прогресия (ПБП). Данните показват, че AR-V7 може да служи като прогностичен биомаркер за лоша прогноза при пациентите с метастатичен ПК.

При изследвания на големи кохорти са получени резултати за намалена ефективност на андроген-подтискаща терапия (АПТ) (*bicalutamide* и *enzalutamide*) при AR-V7-тумори.¹⁵ Тези резултати определят конститутивния AR-V7-вариант като маркер за

резистентност към *enzalutamide* или *abiraterone acetate*, но предиктивната му роля за чувствителност към таксани не е съвсем ясно определена.⁶ Все още някои автори повдигат неизяснени въпроси, свързани с клиничната роля на AR-V7-варианта: данните сочат, че той не е свързан с първична или вторична резистентност към таргетна терапия, а по-скоро с намалена чувствителност към тези лекарства. Необходими са по-широки изследвания за валидиране на AR-V7 като предиктивен маркер и стандартизиране на неговата чувствителност.

Предложен е модел за участие на AR-V7/AR3 в патогенетични механизми на мКРПК. При андрогенна аблацията се получава генетична нестабилност (АР-локусна амплификация), промяна в транскрипция/сплайсинг (SAM68, U2AF/ASF/SF2, Lin28) и в епигенетичната регулация (miR-124). Настъпва промяна на експресията и активността на AR-V7/AR3 и свърхрегулация на група таргетни гени, които промотират метастазирание (TGFβ, miR29, EMT), клетъчно оцеляване и растеж (AKT, UBE2C), промяна в метаболизма (GLUD1) на раковите клетки и развитие на КРПК.¹⁷

C

- При пациенти с метастатичен кастрация-рефрактерен простатен карцином се препоръчва изследване на AR-V7-вариант като прогностичен и предиктивен биомаркер за резистентност към *enzalutamide* и *abiraterone acetate*.
- Препоръчва се определяне на AR-V7-вариант чрез RT-PCR или с имунохистохимично изследване.



*При пациенти с метастатичен кастрация-рефрактерен простатен карцином конститутивният AR-V7-вариант не е валидиран предиктивен маркер за резистентност към *enzalutamide* и *abiraterone acetate*.*

ЛИТЕРАТУРА

1. Ciccarese Ch, Santoni M, Brunelli M, et al. AR-V7 and prostate cancer: The watershed for treatment selection? *Cancer Treat Rev* 2016; 43: 27-35
2. Gelmann EP. Molecular biology of the androgen receptor. *J Clin Oncol* 2002; 20: 3001-3015
3. Supakar PC, Song CS, Jung MH, et al. A novel regulatory element associated with age-dependent expression of the rat androgen receptor gene. *J Biol Chem* 1993; 268: 26400-26408
4. Härd T, Kellenbach E, Boelens R, et al. Solution structure of the glucocorticoid receptor DNA-binding domain. *Science* 1990; 249: 157-160
5. Schoenmakers E, Alen P, Verrijdt G, et al. Differential DNA binding by the androgen and glucocorticoid receptors involves the second Zn-finger and a C-terminal extension of the DNA-binding domains. *Biochem J* 1999; 314: 515-521
6. Dahlman-Wright K, Wright A, Gustafsson JA, Carlstedt-Duke J. Interaction of the glucocorticoid receptor DNA-binding domain with DNA as a dimer is mediated by a short segment of five amino acids. *J Biol Chem* 1991; 266: 3107-3112
7. Haelens A, Tanner T, Denayer S, et al. The hinge region regulates DNA binding, nuclear translocation, and transactivation of the androgen receptor. *Cancer Res* 2007; 67: 4514-4523
8. Hu R, Dunn TA, Wei S, et al. Ligand-independent androgen receptor variants derived from splicing of cryptic exons signify hormone-refractory prostate cancer. *Cancer Res* 2009; 69: 16-22
9. Guo Z, Yang X, Sun F, et al. A novel androgen receptor splice variant is up-regulated during prostate cancer progression and promotes androgen depletion-resistant growth. *Cancer Res* 2009; 69: 2305-2313
10. Sun S, Sprenger CC, Vessella RL, et al. Castration resistance in human prostate cancer is conferred by a frequently occurring androgen receptor splice variant. *J Clin Invest* 2010; 120: 2715-2730
11. William C. Krause, Ayesha A, et al. Androgen receptor and its splice variant, AR-V7, differentially regulate FOXA1 sensitive genes in LNCaP prostate cancer cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2014; 54: 49-59
12. Jin Xu, Yun Qiu. Role of androgen receptor splice variants in prostate cancer metastasis. *Asian Journal of Urology* 2016; 3: 177e184
13. Qu Y, Dai B, Ye D, et al. Constitutively active AR-V7 plays an essential role in the development and progression of castration-resistant prostate cancer. *Sci Rep* 2015; 5: 7654
14. Antonarakis ES, Lu C, Wang H, et al. AR-V7 and resistance to enzalutamide and abiraterone in prostate cancer. *N Engl J Med* 2014; 371: 1028-1038
15. Steinestel J, Luedeke M, Arndt A, et al. Detecting predictive androgen receptor modifications in circulating prostate cancer cells. *Oncotarget* 2015; [Epub ahead of print].
16. Antonarakis ES, Lu C, Lubner B, et al. Androgen receptor splice variant 7 and efficacy of taxane chemotherapy in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer. *JAMA Oncol* 2015; 1: 582-591
17. Li Y, Chan S, Brand L, Hwang T, et al. Androgen receptor splice variants mediate enzalutamide resistance in castration-resistant prostate cancer cell lines. *Cancer Res* 2013; 73: 483e9
18. Antonarakis ES, Lu C, Lubner B, et al. AR-V7 and efficacy of abiraterone (Abi) and enzalutamide (Enza) in castration-resistant prostate cancer (CRPC): Expanded analysis of the Johns Hopkins cohort. *J Clin Oncol* 2016; 34 (Suppl; Abstr 5012)

1.16.4. Циркулиращи туморни клетки

Милчо Минчев, Борис Петров

Молекулярна биология. Циркулиращи туморни клетки (ЦТК), освободени от туморното ложе, се откриват в периферна кръв на пациенти със солидни неоплазии, включително простатен карцином (ПК). Въпреки ниска честота, броят на ЦТК преди и след лечение се оказва важен прогностичен белег за развитие на болестта.^{1,2} Освен това, ЦТК се считат като сурогат за метастазиращи клетки, като характеризирането им се определя като „течна биопсия“, подпомагаща проследяване на лечението.^{3,4} По правило ЦТК са основен начин на хематогенна дисеминация при ПК.⁵ Те предоставят възможност да се проучи хематогенната дисеминация на карцинома, а при напреднала метастатична болест броят им в периферна кръв е точен метод за мониторинг на протичането и се използва като краен маркер в клинични проучвания. Така ЦТК предоставят платформа за многократно неинвазивно проучване на молекулярното поведение на раковите клетки, създавайки по този начин възможности за персонализиран подход на лечение.

Аналитични методи за изследване. Биологията и клиничното значение на ЦТК зависи от начина на изолиране. Всяка отделна технология има силни и слаби страни отнестно чувствителност, специфичност и възможност за извършване на допълнително тестване след изолация.⁶ Засега CellSearch⁷ е единствен метод за детекция на ЦТК при ПК, одобрен от Американската Агенция за храни и лекарства (FDA). Основен недостатък на този метод е зависимостта му от експресия на повърхностни маркери, а експресията на ЕрСАМ е силно намалена при 29% от пробите от ПК.⁷ Това е особено важно за ЦТК, които са претърпяли епителално-мезенхимен преход (ЕМП), което ги прави неоткриваеми чрез този метод.⁸

Доказателства за предиктивно значение. Засега анализ на ЦТК при ПК е правен при пациенти с напреднала болест. При хормонорезистентен ПК (ХРПК) простатоспецифичният антиген (PSA) е неточен показател за туморен товар и не може да се използва като краен маркер в клинични проучвания.⁹ Анализът на ЦТК е подходящ маркер и може да се прилага в различни интервали по време на лечение. Друго възможно приложение на ЦТК, макар и все още неразработено, е възможността да се отличава локализирана от начална дисеминирана болест, тъй като образните изследвания не са точни при микрометастази.¹⁰ Засега най-достоверен метод за търсене на микрометастази е лимфна дисекция, която не отчита наличие на хематогенна разсейка.¹¹ При анализ на ЦТК все по-често простото изброяване се заменя с молекулярно охарактеризиране. Различни техники за изолиране на ЦТК водят до селекция на различни субпопулации от клетки – факт, който пречи на молекулярното им характеризизиране. В клинично проучване при ХРПК се установява, че по-висок начален брой на ЦТК (> от 5 ЦТК в 7.5 mL периферна кръв) се свързва с по-лоша прогноза и статистически значимо по-ниска обща преживяемост (ОП).¹² Пациенти, чиито брой на ЦТК намалява на < 5 по време на лечение, са със статистически значимо по-висока ОП.² Нивото на ЦТК в това проучване е по-добър прогностичен маркер за преживяемост от PSA. Няколко малки проучвания при хормоночувствителен ПК (ХЧПК) показват, че броят на ЦТК също може да има прогностична стойност; наличието на > 3 ЦТК след хормонално лечение предполага прогресия към хормонорезистентност, а при мултивариационен анализ нивото на ЦТК се оказва маркер за големина и продължителност на отговора към хормонално лечение.¹³

Откриването на ЦТК при локализиран ПК зависи от използвания метод. Смята се, че използване на платформа CellSearch генерира противоречиви резултати и няма пре-

диктивна стойност.^{14,15} При технология CTC-chip намирането на повече от 14 ЦТК се смята за положителна находка, без да има съществено прогностично значение.¹⁶ Периоперативно откриване чрез количествена RT-PCR на PSA- и PSMA-mRNA в периферна кръв се свързва с развитие на рецидив след радикална простатектомия.¹⁷ По правило ЦТК се депозират в костен мозък като дисеминирани туморни клетки (ДТК).¹⁸ Нали-

чието на ДТК преди дефинитивно лъчелечение се свързва с по-лоша оценка по Gleason и повишен риск от метастазиране.¹⁹ При мултивариационен анализ откриването на ДТК преди лечение на локализиран ПК е единствен независим показател по отношение на преживяемост без болест (ПББ) и ОП.²⁰⁻²⁴

С

- Циркулиращи туморни клетки при простатен карцином не са предиктивен биомаркер извън клинични проучвания.
- Циркулиращи туморни клетки при простатен карцином може да се обсъждат за оценка на прогноза и мониторинг на отговор към терапия.

ЛИТЕРАТУРА

1. Allard WJ, et al. Tumor cells circulate in the peripheral blood of all major carcinomas but not in healthy subjects or patients with nonmalignant diseases. *Clin Cancer Res* 2004; 10 (20): 6897-6904
2. de Bono JS, et al. Circulating tumor cells predict survival benefit from treatment in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2008; 14 (19): 6302-6309
3. Alix-Panabieres C, K Pantel. Circulating tumor cells: liquid biopsy of cancer. *Clin Chem* 2013; 59 (1): 110-118
4. Alix-Panabieres C, K Pantel. Challenges in circulating tumour cell research. *Nat Rev Cancer* 2014; 14 (9): 623-631
5. Arya M, et al. The metastatic cascade in prostate cancer. *Surg Oncol* 2006; 15 (3): 117-128
6. Joosse SA, K Pantel. Biologic challenges in the detection of circulating tumor cells. *Cancer Res* 2013; 73 (1): 8-11
7. Went PT, et al. Frequent EpCam protein expression in human carcinomas. *Hum Pathol* 2004; 35 (1): 122-128
8. Gorges TM, et al. Circulating tumour cells escape from EpCAM-based detection due to epithelial-to-mesenchymal transition. *BMC Cancer* 2012; 12: 178
9. Fleming MT, et al. Post-therapy changes in PSA as an outcome measure in prostate cancer clinical trials. *Nat Clin Pract Oncol* 2006; 3 (12): 658-667
10. Hovels AM, et al. The diagnostic accuracy of CT and MRI in the staging of pelvic lymph nodes in patients with prostate cancer: a meta-analysis. *Clin Radiol* 2008; 63 (4): 387-395
11. Saitoh H, et al. Two different lymph node metastatic patterns of a prostatic cancer. *Cancer* 1990; 65 (8): 1843-1846
12. Danila DC, et al. Circulating tumor cell number and prognosis in progressive castration-resistant prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2007; 13 (23): 7053-7058
13. Goodman OB, Jr, et al. Circulating tumor cells as a predictive biomarker in patients with hormone-sensitive prostate cancer. *Clin Genitourin Cancer* 2011; 9 (1): 31-38
14. Davis JW, et al. Circulating tumor cells in peripheral blood samples from patients with increased serum prostate specific antigen: initial results in early prostate cancer. *J Urol* 2008; 179 (6): 2187-2191

15. Thalgott M, et al. Detection of circulating tumor cells in different stages of prostate cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 2013; 139 (5): 755-763
16. Stott SL, et al. Isolation and characterization of circulating tumor cells from patients with localized and metastatic prostate cancer. *Sci Transl Med* 2010; 2(25): 25ra23
17. Yates DR, et al. Quantitative RT-PCR analysis of PSA and prostate-specific membrane antigen mRNA to detect circulating tumor cells improves recurrence-free survival nomogram prediction after radical prostatectomy. *Prostate* 2012; 72 (12): 1382-1388
18. Riethdorf S, et al. Detection and HER2 expression of circulating tumor cells: prospective monitoring in breast cancer patients treated in the neoadjuvant GeparQuattro trial. *Clin Cancer Res* 2010; 16 (9): 2634-2645
19. Berg A, et al. Impact of disseminated tumor cells in bone marrow at diagnosis in patients with non-metastatic prostate cancer treated by definitive radiotherapy. *Int J Cancer* 2007; 120 (8): 1603-1609
20. Lilleby W, et al. Disseminated tumor cells and their prognostic significance in nonmetastatic prostate cancer patients. *Int J Cancer* 2013; 133 (1): 149-155
21. Kollermann J, et al. Prognostic significance of disseminated tumor cells in the bone marrow of prostate cancer patients treated with neoadjuvant hormone treatment. *J Clin Oncol* 2008; 26 (30): 4928-4933
22. Cann GM, et al. mRNA-Seq of single prostate cancer circulating tumor cells reveals recapitulation of gene expression and pathways found in prostate cancer. *PLoS ONE* 2012; 7 (11): e49144
23. Welty CJ, et al. Single cell transcriptomic analysis of prostate cancer cells. *BMC Mol Biol* 2013; 14: 6
24. Tsuchiya N, et al. Distinct cancer-specific survival in metastatic prostate cancer patients classified by a panel of single nucleotide polymorphisms of cancer-associated genes. *Genes Cancer* 2013; 4 (1-2): 54-60

1.16.5. ПЕТ/КТ

Ирена Костадинова, Татяна Хаджиева

Метаболитни принципи и биология. Освен ранна диагноза, при простатен карцином (ПК) важен проблем е ранна детекция и визуализация на рецидиви след простатектомия, лъчелечение или друго локално лечение, при стойности на простатноспецифичния антиген (PSA) над 0.2 ng/mL.¹ Понастоящем методи на избор за онагледяване на рецидиви са магнитнорезонансна томография (МРТ) и компютър-томография (КТ) с контраст, но те не винаги са с достатъчна чувствителност и специфичност, особено при ниски стойности на туморния маркер.² С въвеждането на хибридният образен метод на позитронноemisсионна томография с компютър-томография (ПЕТ/КТ) е възможно комбинирано функционално и анатомоморфологично изображение на изследвания орган и получаване на ранна функционална информация за развитие на болестта. Най-често използваният радиофармацевтик ¹⁸F-FDG не се прилага рутинно за визуализация на простатни метастази и рецидиви, но би могъл да се използва при определени пациенти с по-агресивни форми и с повишаващи се нива на PSA. Налице са данни за корелация на натрупването на FDG със степента на туморната диференциация (по-висока при недиференцирани варианти), както и при тези с по-високи нива на PSA, но методът е с ниска предиктивна стойност и без влияние върху терапевтичния подход.³ През 2005 г. бе предложен ¹⁸F/¹¹C-Choline, чието натрупване в туморните клетки се базира на повишен синтез на фосфолипиди.⁴ Тестът се препоръчва при определяне на стадия, при неясни и несигурни находки от други образни методи, както и при рестадиране, ако PSA е ≥ 2-4 ng/ml, с чувствителност – 70.3-95% и специфичност до 85%.^{1,5} При 30% от пациентите се постига и по-детайлна диагностична находка и оптимизиране на терапията.⁶ Методът обаче не притежава достатъчна чувствителност

и специфичност при нисък и интермедиерен риск (оценка по Gleason под 7 и по-ниски нива на PSA)⁴, като при стойности под 1 ng/mL рецидивът се визуализира при не повече от 25% от случаите, а при стойности над 4 ng/mL – при над 75%.⁷ През последните няколко години се съобщиха първите резултати за нов радиофармацевтик, който се свързва с молекулна мишена-рецептори, свързекспресирани по повърхността на раковите клетки в простатния карцином – простатоспецифичен мембранен антиген (PSMA), маркиран с позитронния източник ⁶⁸Ga, с възможност за използването с хибридната технология ПЕТ/КТ.⁸⁻¹⁰ Въпреки че PSMA нормално се намира и в клетки на слюнчени жлези, тънки черва и бъбреци, неговата експресия е най-изразена при първичен ПК и лимфните му метастази. В тези структури той е в много по-големи количества, отколкото са холинните рецептори и така се създава възможност за получаване на по-контрастен образ за разпределение и концентрация на антигена. Неговото количествено измерване със стандартизирано отношение на натрупване (SUVmax) предполага по-висока чувствителност на изследването и има предиктивна стойност за успеха на последващото лечение, ако таргет е същият рецептор.¹

Индикации и доказателства за предиктивно значение. Първите обобщени резултати за диагностична значимост от приложение на ⁶⁸Ga-PSMA при рецидиви и хормонална резистентност показват по-добри резултати (при едни и същи стойности на PSA) от тези с ¹⁸F-Choline с чувствителност съотв. 86.5% и 70.3%, при максимална специфичност и позитивна предикативна стойност от 100% и негативна предикативна стойност от 91.4%.^{11,12} Метаанализ на *Perera et al.* обобщава, че методът се препоръчва при биохимичен рецидив при ниски стойности на PSA между 0.2 и 10 ng/mL, когато другите образни методи са с ниска чувствителност, както и при пациенти с висок риск (оценка по Gleason > 7, PSA > 20 ng/mL, стадий cT2c-3a), преди оперативно или лъчелечение.¹³ Той е с предимства при визуализация на радиоогично окултни лимфни и костни ме-

тастази, което може значимо да повлияе вида на прилаганата терапия. Започнаха проучванията за приложение на ^{68}Ga -PSMA с нова хибридна образна технология – ПЕТ, комбиниран с МРТ (ПЕТ/МРТ), с което се постига още по-висока чувствителност.¹⁴

При маркиране с източници на бета-лъчение, като ^{177}Lu , PSMA може да бъде използван като успешна терапевтична алтернатива при метастази и прогресия на болестта при кастраци-рефрактерен ПК (КРПК).¹⁵ Прилагане на комбинация от ^{68}Ga -PSMA и ^{177}Lu -PSMA се утвърждава като нова концепция – тераностика, с която е възможна точна специфична диагностика и прицелно ефективно лечение.¹⁷ Литературните данни показват спад в нивата на PSA до 80% след две апликации на терапевтичния лиганден комплекс.¹⁸ Появиха се първи мултицентрови проучвания за ефекта от терапията с ^{177}Lu -PSMA, с които се демонстрира високата ѝ сигурност и ефективност, надвишавайки тази на трета линия системна терапия.¹⁸

Напоследък се появиха изследвания за планиране и прецизиране на лъчелечебен мишенен обем на базата на функционално-морфологично ПЕТ/КТ-изследване с прилага-

не на ^{68}Ga -PSMA или $^{11}\text{C}/^{18}\text{F}$ -choline. Изследвания на *Bluemel Ch, et al.* при болни с персистиращи стойности на PSA или рецидив с ^{68}Ga -PSMA след простатектомия показват, че се променя лъчелечебният план при 40-53% от болните, свързано с повишаване на дозата в 80%, намаление в 13.3% и облъчване на допълнителни обеми в 25%; бъдещи проспективни проучвания ще покажат ефекта върху преживяемостта.^{19, 20} Изследванията с $^{11}\text{C}/^{18}\text{F}$ -choline позволяват планиране не само на базата на морфологичен (с КТ), но и на биологичен мишенен обем (с ^{11}C -choline).²¹ Проучва се възможност да се направи т.нар. едновременно свръхдозирание при дефинитивно лъчелечение, прилагано с хипофракционирание при рецидив в лимфни възли, с много добра токсичност за нормалните тъкани и с промяна на лъчелечебният план при 30% от болните.²²

Предстоят и първи клинични проучвания на теорията на радиомиката като наука за генотипно характеризирание на ПК на базата на ПЕТ/КТ-изследване и индивидуализиране на терапията чрез създаване на виртуални модели за диференциация на агресивните му подструктури, с предиктивна стойност за ефекта от терапия и прогноза.²³

В	Позитивен резултат при ^{68}Ga-PSMA ПЕТ/КТ се препоръчва като предиктивен маркер за прилагане на специфична радионуклидна терапия с ^{177}Lu-PSMA при болни с хормонорезистентен простатен карцином.
С	<ul style="list-style-type: none"> ■ ПЕТ/КТ с ^{68}Ga-PSMA или с $^{11}\text{C}/^{18}\text{F}$-холин се препоръчват за планиране на спасително лъчелечение при болни с персистиращи стойности на PSA или рецидив след оперативна интервенция. ■ ^{68}Ga-PSMA ПЕТ/КТ е образен метод на избор за визуализация при биохимичен рецидив, вкл. при ниски стойности на PSA.



- **⁶⁸Ga-PSMA ПЕТ/КТ е образен метод на избор преди прилагане на радионуклидна терапия с ¹⁷⁷Li-PSMA за постигане на индивидуализиран терапевтичен подход при болни с хормонорезистентен простатен карцином.**
- **ПЕТ/КТ с ⁶⁸Ga-PSMA или с ¹¹C/¹⁸F-холин, като най-чувствителни образни методи, могат да се приложат при определяне на стадий, рестадиране и планиране на лъчелечение.**
- **¹⁷⁷Li-PSMA може да бъде използван като успешна терапевтична алтернатива при пациенти с метастази и прогресия на болестта, с кастрация- и химиорезистентност и с позитивна находка от рецепторна сцинтиграфия с ⁶⁸Ga-PSMA.**

ЛИТЕРАТУРА

1. Afshar-Oromieh A, Hetzheim H, Kratochwil C, et al. The theranostic PSMA ligand PSMA-617 in the diagnosis of prostate cancer by PET/CT: Biodistribution in humans, radiation dosimetry, and first evaluation of tumor lesions. *J Nucl Med* 2015; 56: 1697-705
2. Костадинова И, П. Бочев, Е. Пиперкова, А. Клисарова. Роля на ПЕТ-КТ при стадиране и терапията при простатен карцином. В: Клинично поведение при простатен карцином, MOPE 2012, стр. 71-75. Арт Трейсър, Варна, 2012
3. Jadvar H. FDG PET in prostate cancer. *PET Clin* 2009; 4 (2): 155-161
4. Schmid DT, John H, Zweifel R, et al. Fluorocholine PET/CT in patients with prostate cancer: initial experience. *Radiology* 2005; 235: 623-628
5. Giovacchini G, et al. [11C] choline positron emission tomography/computerized tomography to restage prostate cancer cases with biochemical failure after radical prostatectomy and no disease evidence on conventional imaging. *J Urol* 2010; 184 (3): 938-943
6. Weckesser M, Juergens K. Prostatic carcinoma, in PET-CT hybrid imaging. Thieme, New York, 2010, 169-177
7. Lowe V, Kuon E. PET in prostate cancer: A focus on C-11 choline. *SNMMI* 2015; 1: 1-4
8. Banerjee SR, Pullambhatla M, Byun Y, et al. 68Ga-labeled inhibitors of prostate-specific membrane antigen (PSMA) for imaging prostate cancer. *J Med Chem* 2010; 53: 5333-5341
9. Eder M, Schafer M, Bauder-Wust U, et al. 68Ga-complex lipophilicity and the targeting property of a urea-based PSMA inhibitor for PET imaging. *Bioconjug Chem* 2012; 23: 688-697
10. Демирев А, И. Костадинова. Нови насоки за приложение на нуклеарномедицинските методи при простатния карцином. *Мед. онкология* 2016; 2
11. Afshar-Oromieh A, et al. Comparison of PET imaging with a 68Ga-PSMA ligand and 18F-choline based PET/CT for the diagnosis of recurrent prostate cancer. *Eur JNM* 2014; 41 (1): 11-20
12. 68Ga-PSMA PET-CT: Joint EANM and SNMMI procedure guidance for prostate cancer imaging: version 1.0, Draft, 2017
13. Perera M, Papa N, Christidis D, et al. Sensitivity, specificity, and predictors of positive 68Ga-prostate-specific membrane antigen positron emission tomography in advanced prostate cancer: A systematic review and meta-analysis. *Eur Urol* 2016; doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.eururo.2016.06.021>
14. Roethke M, et al. Hybrid positron emission tomography-magnetic resonance imaging with Gallium 68 prostate-specific membrane antigen tracer: A next step for imaging of recurrent prostate cancer-preliminary results. *Eur Urol* 2014; 64 (2): 28-36

15. Ahmadzadehfar H, Rahbar K, Kurpig S, et al. Early side effects and first results of radioligand therapy with (177)Lu-DKFZ-617 PSMA of castrate-resistant metastatic prostate cancer: a two-centre study. *EJNMMI Res* 2015; 5: 114
16. Baum RP, Kulkarni HR, Schuchardt C, et al. Lutetium-177 PSMA radioligand therapy of metastatic castration-resistant prostate cancer: Safety and efficacy. *J Nucl Med* 2016; pii: jnumed.115.168443
17. Yadav M, et al. 177Lu-DKFZ-PSMA-617 therapy in metastatic castration resistant prostate cancer: safety, efficacy, and quality of life assessment. *Eur JNMMI* 2017; 44 (1): 81-91
18. Rahbar K, et al. Study investigating 177Lu-PSMA 617 radioligand therapy in advanced prostate cancer patients. *JNM* 2017; 58 (1): 85-90
19. Bluemel Ch, et al. Impact of 68Ga-PSMA PET/CT on salvage radiotherapy planning in patients with prostate cancer and persisting PSA values or biochemical relapse after prostatectomy. *EJNMMI Research* 2016; 6: 6-8
20. Dewes S, et al. Integration of 68Ga-PSMA-PET imaging in planning of primary definitive radiotherapy in prostate cancer: a retrospective study. *Radiation Oncology* 2016; 11: 73
21. Picchio M, Berardi G, Fodor A, et al. Choline PET/CT as a guide to radiation treatment planning of lymph-node relapses in prostate cancer patients. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2014; 41: 1270-1279
22. Jerezek-Fossa BA, Rodari M, Bonora M, et al. (11)C Choline PET/CT impacts treatment decision making in patients with prostate cancer referred for radiotherapy. *Clin Genitourin Cancer* 2014; 12 (3): 155-159
23. Larue RT, Defraene G, De Ruyscher D, et al. Quantitative radiomics studies for tissue characterization: a review of technology and methodological procedures. *Br J Radiol* 2017; 90: 2016066524

1.16.5. Радиомикс-базирано прицелно лъчелечебно планиране

Галина Кирова, Татяна Хаджиева

Радиологични принципи. Терминът *радиомикс* може да се дефинира най-просто като модел за детектиране или фенотипно характеризирание на болестен процес с помощта на автоматизирана компютърна система. Той е създаден с цел подобряване и ускоряване на процеса на диагностициране, характеризирание, стадиране и прогнозиране на резултатите от лечение на тумори с различна локализация.¹ Радиомикс-моделите се основават на анализиране и математическа обработка на голям масив от данни, като крайна цел е създаване на модели на базата на количествена, а не само на качествена, оценка на комбинация от отделни образни белези. Прогностичната сила на радиомикс е в процес на доказване за целите на установяване на белодробен карцином, карцином на гърда, както и за прецизиране на терапевтичния отговор при тумори на глава и шия и простатен карцином (ПК), като част от методите на персонализираната и предиктивната медицина.²

Радиомикс-моделите при ПК се основават на компилиране на белези от отделни магнитнорезонансни серии – анатомични и функционални, като T2WI, Diffusion Weighted и динамично контрастно усилване. Мануалната обработка на образите е времеемка и често субективна поради влиянието на индивидуалната компетентност на рентгенолога. С цел намаляване на разликата между отделните изследователи Европейската асоциация по урогенитална радиология (ESUR) въведе система за изобразяване и рапортуване на ПК (PI-RADS) на базата на групирани класифицирани критерии.³ Независимо от PI-RADS и постигнатите резултати в определяне на граници и характер на тумора, все още нивото на субективност е високо, което предопределя надеждите, че с

помощта на радиомикс ще се подобри процесът на ранна диагностика и планиране на лъчелечение (ЛЛ) при пациенти с ПК.⁴

Аналитични методи за изследване. Съвременните радиомикс-ориентирани методи за диагностициране и стадиране на ПК се базират на мануално дефинирани количествени параметри, изведени от мултипараметрични магнитнорезонансни (МРТ) изследвания на простатна жлеза и обработени математически.⁵ Радиомикс-моделите позволяват не само диференциране на туморна тъкан в жлезата, но и характеризирание на отделни зони на хетерогенност на тумора на базата на съвкупност от количествено оценени белези. Доказано е, че комбинация от резултати от мултипараметрична МРТ, комбинирана с таргетна биопсия, показва най-висока специфичност и чувствителност при разграничаване на високорисков ПК с оценка по *Gliason* > 7.^{6,7} Повечето автори използват едновременно данни от анатомични секвенции – сигнала интензитет, хомогенност, очертания, симетрия, отношение към околните тъкани, както и от фармакокинетични и дифузионни серии, оценяващи една и съща част от простатната жлеза. Така например, T2-натоварени МРТ-образи характеризират различната спин-спин или трансверзална релаксация на тъканите при дефинирана сила на магнитното поле. Те се използват още като анатомични или локализационни секвенции поради факта, че нормалната простатна и туморна тъкан имат различна сигнална характеристика. Дифузионно натоварените образи, от друга страна, отразяват тъканната чувствителност към Брауновото движение на водните молекули при определена сила на магнитното поле и градиентна последователност. Контрастно усилените динамично получени образи позволяват изграждане на криви сигнал-време, чиято характеристика е специфична при тъкани с различно кръвоснабдяване, плътност на новоформиращи патологични съдове (неоангиогенеза) и обем на екстрацелуларна тъкан.¹ Тези данни се

използват при сегментиране на жлезата, като на тяхна база се генерират карти, позволяващи разграничаване на доброкачествени и злокачествени състояния. Едновременно с това ПК се характеризира с белези като мултифокалност и локална хетерогенност, което е установено чрез хистограми, получени при анализа на T2-секвентни образи от МРТ. Предложената радиомикс-рамка за установяване и генотипно характеризиране на ПК се структурира по следния път⁸: (1) стандартизиране на мултипараметрични МРТ-протоколи на базата на радиологично-патологична корелация на образи от доказани ПК; (2) попълване на радиомикс-секвенатори, които генерират образни последователности, отнасящи се до фенотипно проявен ПК⁹; (3) изготвяне на персонален радиомикс-секвенатор за отделен пациент на база на негови резултати от мултипараметрично МРТ-изследване с оглед определяне на агресивност на тумора. Тази поредица от белези носи информация за адекватно диагностициране и определяне на прогнозата при индивидуалния пациент.

Доказателства за предиктивно значение. Лъчелечението (ЛЛ) е един от основните методи за дефинитивна терапия на ПК при относително млади пациенти с нискатурморна степен. Най-общо казано, приети са два основни типа ЛЛ на ПК – перкутанно ЛЛ и брахитерапия. Облъчвайки цялата жлеза, честотата на усложнения при засягане на околните тъкани (пикочен мехур, ректум, черва) е сравнително голяма, което резултира в редица постлъчелечебни усложнения. Фокалното облъчване се основава на по-висока доза фокусирано лъчение, чийто таргет е локален карцином, което значително намалява възникването на постлъчелечебни усложнения. За разлика от компютър-томографията (КТ), МРТ има по-добра тъканна разделителна способност и позволява по-добро отграничаване както на простатна жлеза, така и на туморни лезии. За целите на прецизното планиране на ЛЛ се използват резултати от оценка на простатни тумо-

ри, получени на базата на мултипараметрична МРТ. Доказано е, че анализът на образите от мултипараметричен МРТ-протокол има висока специфичност и чувствителност. Последни проучвания показват, че класификатори, базирани на радиомикс, могат да увеличат допълнително точността и възпроизводимостта при планиране на ЛЛ при ПК.^{10,11,13} Ето защо възможността за транслиране на образи, добити с МРТ върху планиращи КТ образи, би позволило по-прецизно очертаване на мишенни обеми, особено при прилагане на високи дози над 70 Gy, които са над толерантните за околните здрави тъкани. Подобно суперпониране може да се получи и с образи от ендоректално ултразвуково изследване (УЗ) и КТ или МРТ. В процеса на наслагване на образите от отделните изследвания с цел “използване” на специфични качествени характеристики, които всяко от тях носи, възникват няколко проблема. Това е “напасване” на полетата на изобразяване и деформация на жлезата от различната степен на изпълване на пикочния мехур и ректума, както и от различната позиция на пациента по време на добиване на образите. За преодоляване на тези проблеми някои автори предлагат методи за обемни КТ-МРТ-образи сливания, вземащи под внимание радиомикс-моделите и тъканната деформация.

Предложени са различни алгоритми за индивидуализирано планиране на ЛЛ, базирани на радиомикс. Един от тях е Rad-TraP, създаден от две институции (University Hospitals Cleveland and Alpha 3T MRI and Diagnostic Imaging Center, New York).¹³ Той се състои от три модула: (1) радиомна детекция чрез МРТ и класификационен обучаващ се четец; (2) предаване на образа от МРТ на КТ с очертана зона на интерес (мишенен обем за ЛЛ) чрез мултимодална деформируема корегистрация; (3) генериране на образ за свръхдоизобразяване с брахитерапия и перкутанно ЛЛ. Изследванията са ретроспективни върху образи от 100 пациенти с нисък и междинен риск за периферно разположен кар-

цином. Крайна цел на модела е възможност за облъчване на области на простата с канцерицидна доза, докато в останалата част да се постигне редукция до 43%. Резултатите показват несигурност, свързана с планиране върху така генерирани образи. Авторите заключават, че са нужни много данни за връзка между образи и хистологична характеристика на тумора. Засега върху единични болни са извлечени 11 характеристики, като интезивност на сигнала, градиент на *Sobel*, корелация по *Haralik* и др. В литера-

турата се четат много експресивни заглавия, но почти всички са адресирани с големи очаквания към бъдещето. Осъществени са върху ретроспективни данни, тъй като при наличие на стандарти за ЛЛ е неетично без валидиране да се поеме риск за облъчване само на част от простата. Бъдеща оптимална цел е да се намалят дозите в нормалните органи около тумора, като се организират т.нар. изотоксични проучвания. Засега всички модели са на ниво на научни изследвания.

C

Радиомикс-базираните протоколи за лъчелечебно планиране при простатен карцином засега са експериментални и се препоръчват само в рамките на клинични проучвания.



- **Радиомикс-базираната класификация на тумори на простатна жлеза се основава на автоматизиран процес на компютърно екстрахиране на различни образни/тъканни характеристики, количествено оценяващи болестния процес. Една от целите е да се изготви персонализирана пространствена тъканна карта, която да определи стадий и респективно – най-ефективно лечение.**
- **Магнитнорезонансните образи успешно се прилагат в практиката като помощно средство при планиране на лъчелечение.**

ЛИТЕРАТУРА

1. Larue RTHM, Defraene G, De Ruyscher D, Lambin P, Van Elmpt W. Quantitative radiomics studies for tissue characterization: a review of technology and methodological procedures. *Br J Radiol* 2017; 90: 2016-2065
2. Aerts GT, ER Velazquez, RT Leijenaar, et al. Decoding tumour phenotype by noninvasive imaging using a quantitative radiomics approach. *Nature Communications* 2014; 5
3. Barentsz JO, J Richenberg, R Clements, et al. Esur prostate mr guidelines 2012. *European radiology* 2012; 22 (4): 746-757
4. Rothke M, D Blondin, H-P Schlemmer, T Franiel. Pi-rads classification: structured reporting for mri of the prostate. *RoFo: Fortschritte auf dem Gebiete der Rontgenstrahlen und der Nuklearmedizin* 2013; 185 (3): 253-261
5. Lemaitre G, R Marti, J Freixenet, et al. Computer-aided detection and diagnosis for prostate cancer based on mono and multi-parametric mri: A review. *Computers in biology and medicine* 2015; 60: 8-31
6. Isebaert S, Van den Bergh L, Haustermans K, et al. Multiparametric MRI for prostate cancer localiza-

- tion in correlation to whole-mount histopathology. *J Magn Reson Imaging* 2013; 37: 1392-1401
7. Fütterer JJ, Briganti A, De Visschere P, et al. Can clinically significant prostate cancer be detected with multiparametric magnetic resonance imaging? A systematic review of the literature. *Eur Urol* 2015; 68: 1045-1053
 8. Chung AG, Shafiee MG, Kumar D, et al. Discovery radiomics for multi-parametric MRI; Available at: arXiv:1509.00111
 9. Stoyanova R, Takhar M, Tschudi Y, et al. Prostate cancer radiomics and the promise of radiogenomics. *Transl Cancer Res* 2016; 5 (4): 432-447
 10. Litjens GJS, Elliott R, Shih NNC, et al. Computer-extracted features can distinguish noncancerous confounding disease from prostatic adenocarcinoma at multiparametric mr imaging. *Radiology* 2016; 278 (1): 135-145
 11. Niaf E, Rouvière O, Mège-Lechevallier F, et al. Computer-aided diagnosis of prostate cancer in the peripheral zone using multiparametric mri. *Phys Med Biol* 2012; 57 (12): 3833
 12. Viswanath SE, Bloch BN, Chappelw J, et al. Central gland and peripheral zone prostate tumors have significantly different quantitative imaging signatures on 3 tesla endorectal, in vivo t2-weighted mr imagery. *J Magn Reson Imaging* 2012; 36: 213-214
 13. Shiradkar R, Podder TK, Algohary A, et al. Radiomics based targeted radiotherapy planning (Rad-TRaP): a computational framework for prostate cancer treatment planning with MRI. *Radiation Oncology* 2016; 11:148

1.17. ПРЕДИКТИВНИ БИОМАРКЕРИ ПРИ КАРЦИНОМ НА ПЕНИС

1.17.1. HPV- и p16-експресия

Светлана Христова

Молекулярна биология. През 1995 г. инфекцията с човешки папиломавирус (HPV) е доказана като рисков фактор за развитие на някои видове плоскоклетъчен карцином на penis (ПКП).¹ Бимодалната етиопатогенеза определя морфологичното субкласифициране на ПКП като HPV-позитивни или негативни. Върху тъканни биопсии наличие на HPV-ДНК се идентифицира в 70-100% от интраепителни неоплазии (PeIN) и 30-50% от инвазивни карциноми.^{1, 2} В групата на HPV-асоцииран ПКП се включват хистологични варианти като базалоиден (76% HPV+), смесен брадавицовиден (кондиломатозен) плюс базалоиден (в 82% HPV+) и кондиломатозен (в 39% HPV+). Най-често доказвани HPV-типове при ПКП са p16 и p18.³⁻⁵ По данни на Европейската асоциация по урология обаче честотата се разпределя в 72% за HPV16, в 9% за HPV6 и в 6% за HPV8.²

Молекулярната патогенеза на HPV инициран ПКП е равнозначна на тази при другите таргетни органи и е свързана с два механизма на взаимодействие между вирусни E1, E2, E6, E7 онкопротеини и TP53- и RB-гени. Мутации в тумор-супресорния TP53-ген не са характерни за ПКП. Изключване на неговата апоптозна функция за възстановяване на нормална клетъчна ДНК е свързана с алелна загуба и се осъществява чрез E6 посредством формиране на протеинов комплекс между p53, E6 и E6AP. Вторият и основен молекулярно-генетичен механизъм на HPV-онкогенен ефект се опосредства от E7 за подтискане и загуба на контрол върху CDKN2A- и RB-зависими циклин-киназни инхибитори на клетъчния цикъл, водещо до неконтролирана клетъчна пролиферация.⁸⁻¹¹ Функцията на CDKN2A се регулира от два тумор-супресорни протеина – p16INK4A и p14ARF.¹² В проучване на M.

Poetsch et al. 62% от инвазивните ПКП са с алелна загуба на p16 и в 42% са с промоторна хиперметилация. Имунохистохимична негативност за p16 при ПКП се дължи на хиперметилация във/или LOH-геномния регион в близост до 16INK4A-локуса.^{13, 14}

По правило HPV-позитивен ПКП има различна прогноза, сравнено с HPV-негативен. Публикувани са данни че петгодишна преживяемост при HPV+ тумори е по-висока и достига 93% срещу 78% при HPV-негативен ПКП.^{6, 7}

Аналитични методи за изследване. Рутинна диагностика за определяне на HPV-статус при ПКП не е приета като стандарт, но се използва в рамките на клинични проучвания или за прилижение на специфични анти-HPV-ваксини. Подобно на други локализации, като най-добър и сигурен верифициращ метод е PCR-базиран анализ за доказване на HPV-генотип.^{15, 16} Налични са множество платформи за молекулярно-генетично доказване на вирусни онкопротеини или техни продукти, които подлежат на общо стандартизиране (Табл. 1).^{11, 17-19} Имунохистохимично изследване чрез p16INK4-антитяло върху биопсични материали би могло да бъде допълнителен морфологичен метод за прецизна идентификация на прекурсорни лезии (PeIN).^{15, 16, 20}

Доказателства за предиктивно значение. Засага HPV-статус при ПКП не е определен с предиктивно значение при избор на конвенционално химиолечение.² Намира частично приложение за използване на анти-HPV-ваксини Gardasil и Cervarix при рискови пациенти и патоморфологично доказани прекурсорни лезии (PeIN). В процес на клинично изследване са HPV-ДНК-ваксини: GTL001 фаза II на рандомизирано проучване в Европа и комбинация на ваксина VGX-3100 с анти-PD1/PD-L1-терапевтични таргетни лекарствени форми.²¹⁻²⁴

C

Молекулярен ДНК-анализ и/или имунохистохимично тестване за p16INK4a-онкопротеин се препоръчват като допълнителен метод за верификация на HPV-асоциирани плоскоклетъчни интраепителни лезии и преканцерози на penis.



- Молекулярно-генетична и/или имунохистохимична верификация при HPV-свързани преканцерози и карцином на penis не се изисква като рутинен допълнителен диагностичен метод за откриване на морфологични промени върху биопсии от penis.
- Имунохистохимично изследване на p16 би трябвало да се използва при несъответствие в професионална хистологична интерпретация на нискостепенни/високостепенни интраепителни неоплазии (PeIN).

Таблица I. Молекулярна диагностика – видове методи.^{11, 17-19}

Метод	Диагностична платформа
Polymerase chain reaction (PCR)	11 праймера: PGMY09/11, GP5+/6+ и SPF10.за доказване на вирусния капсид L1 ген
PCR – Amplicor human papilloma virus	Идентифицира 13 високорискови HPV-типове
Linear array human papilloma virus genotyping test	Количествен тест за 37 високо/нискорискови HPV-онкогенни типове
Papillo check (сертифициран в EU)	За <i>in vitro</i> диагностика и идентификация на 24 HPV-типове: 18 високорискови и 6 нискорискови с доказана специфичност 98%
APTIMA human papilloma virus assays (одобрен от FDA)	ДНК-базиран тест за доказване на свръхекспресия на E6 и E7 онкоген-асоциирана mRNA
Cervista (одобрен от FDA)	Верифицира 14 високорискови HPV-типове посредством сигнална амплификационна техника въз основа на две паралелни изотермални реакции

ЛИТЕРАТУРА

1. Gregoire L, Cubilla AL, Reuter VE et al. Preferential association of human papillomavirus with high-grade histologic variants of penile-invasive squamous cell carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87: 1705-1709
2. Hakenberg O.W, Compérat E, S. Minhas S, et al. Guidelines on penile cancer. European Association of Urology, 2014; 7-9. Available at: www.uroweb.org/guidelines/online-guidelines/
3. Nordenvall C, Chang ET, Adami HO, et al. Cancer risk among patients with condylomata acuminata. *Int J Cancer* 2006; 119 (4): 888-893
4. Muñoz N, Castelisague X, de Gonzalez AB, et al. HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine* 2006; 24 (Suppl. 3): S1-10
5. Cubilla A., Amin MB, Ayala A, et al. Tumours of the penis. Malignant epithelial tumours. In WHO classification of tumours of the urinary system and male genital organs. Eds. Most H. et al, 4th ed., IARC: Lyon 2016; pp. 272-280
6. Bezerra AL, Lopes A, Santiago GH, et al. Human papillomavirus as a prognostic factor in carcinoma of the penis: analysis of 82 patients reated with amputation and bilateral lymphadenectomy. *Cancer* 2001; 91 (12): 5-21
7. Lont AP, Kroon BK, Horenblas S, et al. Presence of high risk human papillomavirus DNA in penile carcinoma predicts favorable outcome in survival. *Int J Cancer* 2006; 119 (5): 1078-1081
8. Stankiewicz E, Prowse DM, Ktori E, et al. The retinoblastoma protein/p16INK4A pathway but not p53 is disrupted by humanpapillomavirus in penile squamous cell carcinoma. *Histopathol* 2011; 58: 433-439
9. de Sanjosé S, Diaz M, Castellsagué X, et al. Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: A meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 2007; 7: 453-459
10. Wiest T, Schwarz E, Enders C, et al. Involvement of intact HPV16 E6/E7 gene expression in head and neck cancers with unaltered p53 status and perturbed pRb cell cycle control. *Oncogene* 2002; 21: 1510-1517
11. Bansal A, Singh MP, Rai B. Human papillomavirus-associated cancers: A growing global problem. *Int J Appl Basic Med Res* 2016; 6 (2): 84-89
12. Gunia S, Erbersdobler A, Hakenberg OW, et al. P16(INK4a) is a marker of good prognosis for primary-invasive penile squamous cell carcinoma: a multi-institutional study. *J Urol* 2012; 187: (3): 899-907
13. Poetsch M, Hemmerich M, Kakies C, et al. Alterations in the tumor suppressor gene p16(INK4A) areassociated with aggressive behavior of penile carcinomas. *Virchows Arch* 2011; 458 (2): 221-229
14. Rubin MA, Kleter B, Zhou M, et al. Detection and typing of papillomavirus DNA in penile carcinoma evidence for multiple independent pathways of penile cancerogenesis. *Am J Pathol* 2001; 159: 1211-1218
15. Fernandes-Nestosa M, Guimera N, Sanchez D, et al. Detection of HPV genotypes according the subtypes of penile intraepithelial neoplasia (PeIN). A study of 126 lesions in 43 patients using lazer capture microdissection (LCM) PCR. *Mod Pathol* 2015; 90: 6-12
16. Cubilla AL, Sanchez DE, Cañete S, Fernandez-Nestosa MJ. The variegated morphology of HPV-related neoplasms of the penis. *Oncology J* 2016; 30 (3): 253-256
17. Van Hamont D, van Ham MA, Bakkers JM, et al. Evaluation of the SPF10-INNO LiPA human papillomavirus (HPV) genotyping test and the roche linear array HPV genotyping test. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 3122-3129
18. Rebolj M, Preisler S, Ejegod DM, et al. Prevalence of human papillomavirus infection in unselected SurePath samples using the APTIMA HPV mRNA assay. *J Mol Diagn* 2013; 15: 670-677
19. Wiwanitkit V. Cervista HPV HR test kit in cervical cancer screening. *J Low Genit Tract Dis* 2013; 17:99

20. Stratton KL, Culkin DJ. A contemporary review of HPV and penile cancer. *Oncology J* 2016; 30: 245-249
21. Rodney S, Muneer A. HPV and penile cancer: perspectives on the future management of HPV-positive disease. *Oncology J* 2016; 30 (3): 250-252
22. Buonerba C, Pagliuca M, Vitrone FM, et al. Immunotherapy for penile cancer. *Future Sci OA* 2017; doi: 0.4155/fsoa-2017-0031
23. Bagarazzi ML, Yan J, Morrow MP, et al. Immunotherapy against HPV16/18 generates potent TH1 and cytotoxic cellular immune responses. *Sci Transl Med* 2012; 4 (155): 138
24. Trimble CL, Morrow MP, Kravnyak KA, et al. Safety, efficacy, and immunogenicity of VGX-3100, a therapeutic synthetic DNA vaccine targeting human papillomavirus 16 and 18 E6 and E7 proteins for cervical intraepithelial neoplasia 2/3: a randomised, double-blind, placebo-controlled phase IIb trial. *Lancet* 2015; 386: 2078-2088

1.18. ПРЕДИКТИВНИ БИОМАРКЕРИ ПРИ ГАСТРОИНТЕСТИНАЛЕН СТРОМАЛЕН ТУМОР (GIST)

1.18.1. Митотичен брой и Ki-67-пролиферативен индекс

Иван Иванов, Тихомир Диков, Савелина Поповска

Молекулярна биология. Гастроинтестинален стромален тумор (ГИСТ) е рядка неоплазма. В отсъствието на метастази все още не са налични критерии за разграничаване на случайни стромални пролиферации от малигнени тумори със сериозни рискове от неблагоприятно клинично протичане. Вероятно възприемането на ГИСТ като биологичен и морфологичен континуум без резки граници между бенигнен/малигнен процес отразява по-пълно характеристиките на неоплазията. Въпреки това, опити за прогностично групиране са налични в съвременната практика на хирургичната патология и тяхното еволютивно развитие е в ход и към момента.¹ До отделянето на ГИСТ в отделна класификационна група те са причислявани към групата на мезенхимните тумори и са определяни като гладкомускулни тумори или тумори на периферни нервни обвивки.² Понастоящем за тези тумори се смята, че произхождат от клетките на *Cajal* или от прогениторни мезенхимни клетки.³ За възникването и развитието на ГИСТ е от съществено значение наличието на мутация в протоонкогена *c-KIT*.³ За ГИСТ е характерна и диагностично значима имунохистохимично установената експресия на *c-KIT*, CD34 и в различна степен (дифузно или фокално) на α SMA.^{2,3}

Предсказването на клиничното поведение и наличието на малигнен потенциал при ГИСТ е относително трудно. Смята се, че приблизително половината от ГИСТ се проявяват с малигнено поведение и половината от тези случаи са с ранно разпространение в черен дроб, перитонеум и регионален лимфен басейн при първоначална диагноза.⁴

Процентът малигнен ГИСТ варира според различни едноцентрови проучвания и вероятно е селекционен bias, но почти неизменно надхвърля 60% при включване на прогресия и рецидив в болестта.³

Най-ранната и вероятно най-популярна система за рискова стратификация е предложена от NIH⁵ през 2002 г. и е базирана на личен опит на експертен панел и спонсорирана от NCI конференция. Тази система инкорпорира туморен размер и митотични фигури/50 на поле на голямо увеличение (ПВУ), което пък не е определено като размер, а съчетанието им разграничава седем категории с четири етикета: много нисък (1), нисък (1), междинен (2) и висок (4). Подобна система, обаче, може да повиши риска при голям тумор без митози и да го понижи при малки тумори с определени локализации с характерна висока честота на митотични фигури – дуоденум, ректум.

Аналитични методи за изследване. Първата базирана на доказателства система за риск-стратификация е кредитирана на *Miettinen and Lasota*⁴ и е генератор на фундаментален модел за всички по-късни системи. При описаната от авторите система митотичните фигури остават източник на прогностична информация, но дефиницията е леко надградена с оразмеряване на полето с необходимост от изчисления върху 5 mm². Преимуществовата на предложената система остават въвеждането на анатомична локализация и рафиниране на размери на туморната тъкан. В отговор на екипа от AFIP първоначалните автори на идеята за ГИСТ-стратификация от NIH⁶ предлагат нова модификация през 2008 г., но въвеждат допълнителни патологични параметри, без да ревизират митотичния брой. Редица съвременни ръководства, в това число ръководството на AJCC⁷, 4-та ревизия на WHO класификация на тумори на меки тъкани⁸ и 3-та ревизия на WHO класификация на тумори на гастроинтестинален тракт⁹

посочват митотичния брой като съществен фактор при субстратифициране на ГИСТ. Последната 4-та ревизия на WHO в частта за тумори на меки тъкани⁸ и тумори на гастроинтестинален тракт⁹ отчита размер на тумора, анатомична локализация и брой митотични фигури на 50 ПБУ, които неизменно са или $\leq 5/50$ ПГУ, или $> 5/50$ ПГУ. Находката следва да фигурира във всеки биопсичен отговор за целите на разпределяне в шест рискови категории, обозначени като прогностични групи и базирани на прогресия на болестта при дългосрочно проследяване на около 1800 пациенти (виж *Раздел 1.11.1*). При хистологично верифицирана метастаза в орган извън гастроинтестинален тракт и категорични данни за ангажирана серозизирана равнина в биопсичния доклад е задължително документиране на тези събития, формално отчитане на митози и не е необходимо приписване на определена рискова категория. Към момента броенето на митотични фигури не се счита за заменяемо с отчитане на положително маркирани с Ki-67-ядра. В клиничната практика са предложени разнообразни номограми и горещи карти, третиращи митотичен брой и размер на тумора, като продължителни, линейни величини, базирани на големи пациентски кохорти, преминали само хирургия.¹⁰ Като цяло, липсва единен консенсус, касаещ определяне на митотичен индекс при ГИСТ. Въпреки че най-често е определян на 50 зрителни полета, площта, на която се препоръчва изследването, варира между 5 mm^2 (по WHO) и 10 mm^2 (по ESMO 2010).¹

Доказателства за предиктивно значение. Като фактор, определящ туморите към групата с ниска малигненост, е наличието на < 5 митози на 50 зрителни полета при голямо

увеличение, а с висока – наличието на > 5 митози на 50 зрителни полета при голямо увеличение (на площ, възлизаща на 5 mm^2).⁸ Според резултати от проучване (SSGXVIII/AIO), сравняващо ползата от адювантно приложение на *imatinib* за период от 12 и 36 месеца при пациенти с операбилен ГИСТ с висок риск от рецидив (на база NIH класификация), приложението на лекарствения продукт за 36 месеца показва повишена преживяемост без метастази и обща преживяемост (ОП).¹¹ Факторите, повишаващи риска от рецидив при пациенти, лекувани с адювантен *imatinib*, са негастричен ГИСТ с висок брой митози.¹²

Редица проучвания показват, че Ki-67-пролиферативният индекс притежава прогностична роля при ГИСТ. Съществува известно вариране в определянето на прагова стойност (cut-off) и получените конкретни резултати при отделните автори.³ Прогностичната роля на Ki-67 и начините за оценка на пролиферативния индекс, използвани/препоръчвани от някои автори, са представени на *Табл. 1*. При ГИСТ (на стомах) с мултибуларен строеж е възможно наличие на значителен вътретуморен хетерогенитет в експресията на Ki-67; това налага изследване на повече проби от тумора за по-точно определяне на туморния грейдинг (G).¹³ Данните в литературата, касаещи Ki-67-индекса, като предиктивен фактор към адювантна терапия, са оскъдни. Според *Wen-Yi Zhao et al.* Ki-67 $> 8\%$ може да служи като независим негативен фактор за отговор към адювантна терапия с *imatinib*.¹⁴


A	За степенуване на ГИСТ се препоръчва задължително определяне на митотичен индекс; намерената абсолютна стойност следва да присъства в биопсичния доклад.
B	<ul style="list-style-type: none"> ■ Препоръчително е морфологично-базирано стратифициране на ГИСТ в рискови групи/прогностични категории според който и да е от наличните модели при изрично цитиране на използваната класификационна структура. ■ При ГИСТ с висок риск от рецидив се препоръчва генотипизиране за <i>c-KIT</i> и <i>PDGFRA</i>-мутации и при наличие на <i>c-KIT</i> мутации, се препоръчва тригодишна адювантна терапия с <i>imatinib</i>.
C	<ul style="list-style-type: none"> ■ Препоръчва се използване на Ki-67-пролиферативен индекс като прогностичен фактор при ГИСТ (прагова стойност за повишена пролиферативна активност – 6-8% от 500 преброени клетки в hotspot). ■ При мутилобулиран строеж на ГИСТ се препоръчва изследване на Ki-67-индекс в повече от един тъканен материал.
	<ul style="list-style-type: none"> ■ Задължително е съблюдаване на критериите за определяне на степен на малигненост при ГИСТ чрез митотичен индекс. ■ В случаи на граничен митотичен индекс възможно е използване на Ki-67-индекс като допълнителен прогностичен фактор.

Таблица 1. Прогностична роля и начини на отчитане на пролиферативен индекс при ГИСТ.

Автори	Използвано първично анти тяло	Начин на определяне	Прогностична стойност
<i>Ohdaira H, et al.</i> ²	Не е конкретизирано	Ki-67-индекс, определен като брой позитивни клетки на 1 mm ²	Туморен размер > 50 mm и Ki-67 ≥ 40/mm ² са свързани със значимо по-лоша прогноза
<i>Belev B, et al.</i> ³	MIB-5 (DAKO)	Ki-67-индекс, определен като брой позитивни клетки на 100 туморни клетки	Ki-67-индекс > 6%, свързан с: - повишен риск от рецидив при ограничена болест - намалена обща преживяемост (без значение от приложено лечение)

<i>Zhao W-Y, et al.</i> ¹⁴	MIB-1 (DAKO)	Ki-67-индекс, определен като брой позитивни клетки на 500 туморни клетки, отчетени в зона с най-висока активност “hotspot”	Ki-67-индекс > 8%, свързан с: - по-лоша прогноза - липса на ефект при адювантна терапия с <i>imatinib</i>
<i>Imamura M, et al.</i> ¹⁵	MIB-1 (DAKO)	Не е конкретизирано	Ki-67-индекс > 4.6%, свързан със значимо намален период без болест

ЛИТЕРАТУРА

1. Agaimy A. Gastrointestinal stromal tumors (GIST) from risk stratification systems to the new TNM proposal: more questions than answers? A review emphasizing the need for a standardized GIST reporting. *Int J Clin Exp Pathol* 2010; 3 (5): 461-471
2. Ohdaira H, Ohya S, Yamaguchi T, et al. Ki67 and tumor size as prognostic factors of gastrointestinal stromal tumors. *JMAJ* 2005; 48 (12): 586-592
3. Belev B, Brčić I, Prejac J, et al. Role of Ki-67 as a prognostic factor in gastrointestinal stromal tumors. *World J Gastroenterol* 2013; 19 (4): 523-527
4. Miettinen M, Lasota J. Gastrointestinal stromal tumors: pathology and prognosis at different sites. *Semin Diagn Pathol* 2006; 23: 70e83
5. Rutkowski P, Nowecki ZI, Michej W, et al. Risk criteria and prognostic factors for predicting recurrence after resection of primary gastrointestinal stromal tumor. *Ann Surg Oncol* 2007; 14: 2018e27
6. Joensuu H. Risk stratification of patients diagnosed with gastrointestinal stromal tumor. *Hum Pathol* 2008; 39: 1411e9
7. Amin MB, Edge S, Greene F, et al. (Eds.) AJCC Cancer Staging Manual. (8th Edition). New York: Springer-Verlag, Nov 2016
8. Miettinen M, Fletcher CDM, Kindblom LG, Tsui WHS. Mesenchymal tumours of the stomach. In WHO Classification of tumours of the digestive system. Bosman FT, Carneiro F, Hruban RH, Theise ND Ed. 4th ed. IARC, Lyon, 2010: 74-79
9. Gastrointestinal stromal tumors. In: Fletcher CDM, Bridge JA, Hogedoorn PCW, Mertens F (Eds.) WHO Classification of tumors of soft tissue and bone IARC: Lyon 2013
10. Rossi S, Miceli R, Messerini L, et al. Natural history of imatinib-naive GISTs: a retrospective analysis of 929 cases with long-term follow-up and development of a survival nomogram based on mitotic index and size as continuous variables. *Am J Surg Pathol* 2011; 35: 1646e56
11. Eisenberg BL. The SSG XVIII/AIO trial: results change the current adjuvant treatment recommendations for gastrointestinal stromal tumors. *Am J Clin Oncol* 2013; 36 (1): 89-90
12. Joensuu H, Eriksson M, Hall KS, et al. Risk factors for gastrointestinal stromal tumor recurrence in patients treated with adjuvant imatinib. *Cancer* 2014; 120 (15): 2325-2333
13. Yasui H, Konishi E, Urasaki K, et al. Intratumoral heterogeneity of MIB-1 labelling index in gastric gastrointestinal stromal tumor (GIST). *Gastric Cancer* 2006; 9: 223-228
14. Zhao W-Y, Xu J, Wang M, et al. Prognostic value of Ki67 index in gastrointestinal stromal tumors. *Int J Clin Exp Pathol* 2014; 7 (5): 2298-2304
15. Imamura M, Yamamoto H, Nakamura N, et al. Prognostic significance of angiogenesis in gastrointestinal stromal tumor. *Modern Pathology* 2007; 20: 529-537

1.18.2. *c-KIT/CD117*- и *PDGFRA*-мутации

Радка Кънева, Борис Петров

Молекулярна биология. Гастроинтестиналните стромални тумори (ГИСТ) са сред най-честите мезенхимални тумори на гастроинтестиналния тракт. Публикуваните данни за заболяемост от ГИСТ в Европа и САЩ показват честота от 10-15/1 000 000 за периода 2005-2008 г.^{1,3,4} Смята се, че ГИСТ произлиза от интерстициалните клетки на *Cajal* или техни предшественици, експресиращи тирозинкиназния рецептор *KIT* и рецептора за тромбоцитния растежен фактор-алфа (*PDGFRα*).⁵ Двата белтъка, *KIT* и *PDGFRα*, представяват тирозинкиназни рецептори на растежни фактори със сходна структура, които в нормалните клетки се активират чрез свързване на съответния лиганд към екстрацелуларната част на рецептора и димеризирането на два еднакви рецептора. В резултат на това вътреклетъчните части на рецептора се активират с последващо активиране на клетъчните пътища, регулиращи клетъчната пролиферация, апоптоза, клетъчна диференциация, адхезия и т.н. Мутациите в гени *KIT* и *PDGFRA* водят до лиганд-независимо конститутивно активиране на рецептора. Резултатът е неконтролиран клетъчен растеж и развитие на тумор.⁶ *KIT*- и *PDGFRA*-мутации се откриват преди началото на терапия и се счита че са свързани с патогенезата на ГИСТ. Откриват се и вторични мутации, които са свързани с резистентност на лечение и прогресия на болестта. Най-чести мутации в *KIT*-гена се откриват в екзон 11 (66-71%), екзон 9 (10-13%), екзон 13, 14, 17 (1% всеки). От друга страна, *PDGFRA*-мутации (8%) са описани в екзони 18 (5-6%), 12 (1%) и 14 (1%). Не се откриват мутации при 5-10% от туморите и тези субтипове се наричат “див” тип ГИСТ, но са хетерогенна група и могат да се характеризират с други молекулни характеристики, като мутации в *BRAF*, *RAS*, *NF1*, *SDH* и др.⁷

Активиращи мутации в *PDGFRA* и *KIT* са взаимно изключващи се, тъй като представляват алтернативни събития, водещи до еднакви последствия. По правило ГИСТ с мутации в *PDGFRA* са подгрупа, която почти изключително се среща в стомашните локализации. Повечето от туморите показват епителоидна морфология, с ниска митотична активност и следват по-пасивен клиничен ход. Микроскопски тези тумори обичайно се откриват поради слабо или негативно *KIT* (*CD117*)-оцветяване на туморните препарати. По правило *DOG1* и *CD34* могат да са полезни за диагноза на *KIT*-негативни случаи на ГИСТ, включително такива с *PDGFRA*-мутации.⁹ В допълнение, генно експресионните профили на *PDGFRA*-мутирани тумори се различават от тези при *KIT*-мутирани. Инхибиране на *PDGFRA* намалява пролиферацията на ГИСТ с мутантни *KIT* чрез ефекта на *KIT*-зависим транскрипционен фактор *ETV1*.⁸ Инхибитор на *PDGFRA* *crenolanib* може да бъде използван за лечение на пациенти с *imatinib*-резистентен *KIT*-мутирал ГИСТ. Заболяването на малка част от пациентите (15%), при които няма наличие на мутация в *KIT*- и *PDGFRα*-гените, се свързва с наличие на тумор-инициираща мутация в *BRAF*.¹⁰ Протеинът *BRAF* е серин-треонин киназа, която активира *MAPK*-сигналния път: *RAS/RAF/MEK/ERK*. Това е един от пътищата, активирани от *KIT* и *PDGFRα*, наред с други рецептори, но *BRAF* активира по-късен етап, без това да е свързано с *KIT*- или *PDGFRα*-активация. Мутации в *BRAF* са локализиран основно в екзон 15 (нуклеотид 1799), водещи до замяна с *V600E*. Тази модификация имитира фосфорилиране на киназния домейн, провокираща постоянната активация на киназата. Пациентите с ГИСТ без наличие на мутации в гени *KIT*, *PDGFRα* и *BRAF* представляват 10-15% от всички. Смята се, че болестта е възникнала в резултат на други онкогенни механизми. Скорешни изследвания доведоха до откриването на мутации, засягаща гени, кодиращи изоформи на сукцинат-дехидрогеназа (*SDH*), и по конкретно – *SDHB* или *SDHA*.¹¹

Проспективно популационно базирано изследване на ГИСТ във Франция сравнява локализираните и авансиралите тумори от предходни клинични изследвания и показва разлики в разпределението на мутациите в *KIT* и *PDGFRA*. Мутации в екзон 18 на *PDGFRA* (D842V и др.), както и *KIT* екзон 11-замены (W557R и V559D), се срещат често при пациенти с локализиран ГИСТ, докато *KIT* екзон 9, 502_503dup и *KIT* екзон 11 557_559del са по-чести при метастатичен ГИСТ. Тези данни предполагат, че *KIT*- и *PDGFRA*-мутациите и митотичният индекс следва да се изследват, за да се оцени рискът за рецидив.¹² Съгласно действащите национални препоръки, както и тези на NCCN и ESMO, генетично изследване на мутации в *KIT* и *PDGFRA* при ГИСТ се препоръчва при прилагане на селективни тирозинкиназни инхибитори (ТКИи).¹³ Такъв е *imatinib*, селективен инхибитор на *KIT* и *PDGFRA*, с анти-тирозинкиназна активност, който се използва при авансирал или метастатичен ГИСТ, както и за адювантен режим след пълна резекция. Чувствителността към препаратите е различна според носителството на различни мутации.^{14,15} При резистентност към *imatinib* се прилага втора линия ТКИи – *sunitinib*.¹⁶ При пациенти, резистентни и на двата препарата, е подходящо прилагане на друг ТКИ – *regorafenib*.¹⁷

Аналитични методи за изследване. Основна техника за определяне на мутационен статус на *KIT* и *PDGFRA* при ГИСТ е RT-PCR. Използват се алел-специфични праймери за идентифициране на соматични мутации. Съществуват разработени китове за изследване на четирите екзона за *KIT* и два екзона в *PDGFRA*, включващи най-честите мутации. При някои от тях може да се наложи предварително обогатяване на пробата. Процедурата включва изолиране на ДНК от туморни проби, амплификация на съответните райони от гена и анализ на получените криви. Други методи са директно секвениране по метода на *Sanger*, който позволява пълно изследване на целите гени и

високорезолутивен анализ за топене на ДНК (HRM-анализ), насочен към определени мутации. Напоследък се предлага и секвениране от ново поколение (NGS) на панел от гени. Друг метод за анализ е ДНПЛС (течна хроматография) – доста чувствителен, бърз и относително евтин, но не е масово достъпен в клиничната практика.

За извършване на анализа е необходим материал от туморна тъкан, отстранена по време на операцията. Материалът се съхранява под формата на парафинови блокче в центровете по патология към болничното заведение. Оценката на качеството и количеството на туморната тъкан се извършва от квалифициран лекар-патолог. Необходимият минимум на туморно клетъчно съдържание в парафиново блокче за надеждно извършване на последващите анализи е > 70%.

Доказателства за предиктивно значение. Одобрението на Американската Агенция за храна и лекарства (FDA) за адювантно лечение задължава да се прави колкото е възможно по-точно генотипиране на оперирани пациенти с ГИСТ. В двугодишно проспективно проучване приблизително 85% от ГИСТ са с локализирана лезия²; поради това въпросът дали да се използва адювантно лечение стои пред повечето от новодиагностицираните пациенти. Повечето пациенти с мутации в *KIT*-екзон 11 или 13 се повлияват от *imatinib*. Мутации в *KIT* екзон 9 се свързват с нестомашна локализация, клинкопатологично по-агресивно протичане и умерена чувствителност към *imatinib*.¹⁸ Средната обща преживяемост (ОП) на пациенти с авансирала болест, лекувани с *imatinib* на първа линия, е 5 години, а 34% от пациентите преживяват повече от 9 години. Метаанализ на фаза III проучвания доказва, че пациенти с екзон 9-мутирал ГИСТ имат значително по-дълга преживяемост без прогресия (ПБП), ако са лекувани с 800 mg *imatinib* дневно (препоръчителна доза за тези пациенти). За лечение на паци-

енти с екзон 11-мутирали тумори са необходими 400 mg.² Вероятността за първична резистентност към *imatinib* за *KIT*-екзон 11, *KIT*-екзон 9 и “див” тип е съотв. 5%, 16% и 23%.²⁶ Пациенти с мутации в екзон 9 имат склонност да отговорят по-добре на втора линия терапия със *sunitinib* в сравнение с пациенти с други *KIT/PDGFR*A-мутации.¹⁹ При по-високорисковата група пациенти, имащи мутация в екзон 9, прилагането на адювантна терапия с *imatinib* се свързва с увеличено подобрене от терапията до 3 години в сравнение с едногодишен прием. Въпреки това, броят на пациентите в проучванията е недостатъчен, за да се направи окончателно заключение за адювантното лечение с *imatinib*.²⁰ Мутации в екзон 13 и 17 са идентифицирани като първични мутации в малък процент от пациентите, показали отговор към лечението. Въпреки че са анализирани малък брой пациенти с мутации в екзон 13, данните сочат, че отговорът им към лечението е сходен с тези, имащи мутации в екзон 11.¹⁸

Резистентност към *imatinib* може да се появи в рамките на 2-3 години като резултат на вторична мутация в *KIT*. Във фаза II проучване на *imatinib* при авансирал ГИСТ 67% от пациентите, чийто тумор показва резистентност към *imatinib*, имат нови или вторични мутации в *KIT*. Те са чести в тумори с първична мутация в екзон 11, но липсват при ГИСТ “див” тип.¹⁸ За разлика от първичните мутации, които активират *KIT* и се намират в екзони 9 и 11, вторичните са концентрирани в два региона на *KIT*-киназия домен: единият е АТФ-свързващ участък, кодиран от екзони 13 и 14, и мутации в него директно са свързани с лекарствено взаимодействие; вторият е активационна примка (екзони 17 и 18), където мутациите могат да стабилизират *KIT* в активната му форма и да възпрепятстват лекарственото взаимодействие. *In vitro* изследвания показват наличие на инхибиране със *sunitinib* на двойните *KIT*-мутанти, съдържащи мутации в екзон 13, за разлика от *imatinib*.¹⁸ Според преклинични изследвания както *imatinib*, така и

sunitinib не са ефективни в случай на мутация в екзон 17 на *KIT*-мутации. При тези пациенти е подходящо прилагане на *regorafenib*.¹⁷ Последният значимо удължава ПБП при пациенти с авансирал ГИСТ и с вторична мутация в екзон 17 на *KIT*.²¹

Анализ на соматичните туморни мутации дават както прогностична, така и предиктивна информация при обсъждане на адювантна терапия.²² По правило ГИСТ с *KIT*-екзон 9-мутация или екзон 11 мутации, свързана с делеция на кодони 557 и 558, се асоциират с неблагоприятна прогноза, ако се лекуват само хирургично, докато пациенти с *PDGFRA* екзон 18 мутация *D842V* обичайно имат добър изход.^{23,24} Почти всички *KIT*-екзон 9-мутации са дупликации на кодони 502-503, водещи до дупликации на аланин и тирозин, докато делециите, включващи *KIT*-екзон 11 кодони 557-558, имат варираща дължина и могат да представляват делеция, комбинирана с инсерция. Някои изследвания на ГИСТ показват, че тези с делеции в екзон 11 *KIT* имат по-неблагоприятен ход, сравнени с еднунуклеотидните замени в същия екзон.^{18,25} Други изследвания показват, че освен разликите между мутации в различните екзони, видът на мутацията (еднунуклеотидна или засягаща няколко кодона) може да носи различна прогностична информация. Делеции в *KIT*-екзон 11 се асоциират с риск за метастазизиране, докато тези, засягащи кодони 557-558, показват по-висок риск от прогресия.^{23,24,27,28} Освен това единични замени в *KIT*-екзон 11 корелират с по-дълги ПБП и ОП.^{23,27,28} Дупликации в *KIT*-екзон 9, които се наблюдават основно при интестинални форми, се асоциират с по-агресивно поведение.^{27,28}

Въпреки че недостатъчен брой пациенти са включени в детайлно изучаване на отговора към *imatinib* или *sunitinib*, има данни, показващи тенденция за значително подобряване на ПБП при пациенти с мутации в *PDGFRA*, различни от *D842V*, една година след адювантна терапия с *imatinib* и имат по-добра прогноза.²⁹ *D842V*-мутацията, намираща

се в екзон 18, води до замяната на аспарагинова киселина (D) с валин (V) в позиция 842. Открива се в отделна подгрупа от ГИСТ, най-често локализирани в стомах. Установено е, че *D842V*-мутацията се свързва с резистентността към ТКИИ. Най-общо, *D842V* се открива до 10% от случаите с ГИСТ и е една от най-честите единични мутации. Свързана е с нечувствителност към *imatinib in vitro*¹⁵ и при 31 пациенти с *D842V*-мутация не е постигнат отговор към *imatinib* при авансирал ГИСТ.³⁰ Повечето от другите мутации, които рядко се наблюдават в *PDGFRA* локус D842, като *RD841-842KI*, *DI842-843IM*, *D842Y*, *D842I* и делеция *I843*, са също свързани с резистентност на *imatinib*.¹⁵

Макар мутациите в *KIT* и *PDGFRA* да имат прогностично значение, те не са включени в настоящите схеми за стратифициране на риска, защото са идентифицирани многобройни техни варианти при ГИСТ и не е ясно дали носят допълнителна информация, независимо от останалите прогностични фактори. Мутационният анализ може да допринесе за прогностична информация при някои специфични подтипове, а откритите мутации са критичен предиктивен биомаркер, определящ активността на ТКИИ.

А

- Определяне на мутационен *KIT/PDGFRA*-статус се препоръчва чрез алел-специфичен PCR и/или секвениране като предиктивен маркер при локализирана и метастатична болест на ГИСТ.
- При ГИСТ се препоръчва генотипизиране в следните случаи: (i) за потвърждаване на нетипични случаи; (ii) за предсказване на полза от *imatinib* при авансирала болест; (iii) за решение за използване на адювантен *imatinib*; (iv) за избор на удвоена доза *imatinib* – 800 mg (при *KIT*-мутации в екзон 9); (v) за идентифициране на резистентност към всички тирозинкиназни инхибитори.
- При високорисков ГИСТ адювантно лечение с *imatinib* не се препоръчва при пациенти с предсказваща резистентност от мутация *PDGFRA* – *D842V*.
- Имунохистохимична експресия на CD117 при ГИСТ не се препоръчва за предсказване на отговор към *imatinib*.

В

- Изследване на мутации в *KIT* и *PDGFRA* се препоръчва с цел получаване на прогностична информация, свързана с протичане на болестта и с поява на резистентност към тирозинкиназни инхибитори.
- При отсъствие на *KIT*- и *PDGFRA*-мутации се препоръчва обсъждане за изследване на *BRAF*-мутация и за имунохистохимично изследване на експресия на SDHB-белтък.
- При липса на SDHB-експресия се препоръчва генетична консултация и изследване на герминативна *SDH*-мутация.



- Изследване за мутации в *KIT* и *PDGFRA* се извършва в утвърдени генетични лаборатории с валидирани методи и китове.
- Препоръчва се скриниране на екзони 9, 11, 13, 17 в *KIT* и 12, 14, 18 в *PDGFRA* преди класифициране на ГИСТ като “див” тип.
- Препоръчва се използване на HGVS-номенклатура при оформяне на резултати и цитиране на съответни референтни секвенции.

ЛИТЕРАТУРА

1. Nilsson et al. 2005, Nilsson B, Bümning P, et al. Gastrointestinal stromal tumors: the incidence, prevalence, clinical course, and prognostication in the preimatinib mesylate era—a population-based study in western Sweden. *Cancer* 2005; 103 (4): 821-829
2. Gastrointestinal Stromal Tumor Meta-Analysis Group (MetaGIST). Comparison of two doses of imatinib for the treatment of unresectable or metastatic gastrointestinal stromal tumors: a meta-analysis of 1,640 patients. *J Clin Oncol* 2010; 28 (7): 1247-1253
3. Blanke C, Eisenberg BL, Heinrich M. Epidemiology of GIST. *Am J Gastroenterol* 2005; 100 (10): 2366
4. Tryggvason G, Gíslason HG, Magnússon MK, Jónasson JG. Gastrointestinal stromal tumors in Iceland, 1990-2003: the icelandic GIST study, a population-based incidence and pathologic risk stratification study. *Int J Cancer* 2005; 117 (2): 289-293
5. Hirota S, Isozaki K, Moriyama Y, et al. Gain-of-function mutations of c kit in human gastrointestinal stromal tumors. *Science* 1998; 279 (5350): 577-580
6. Lasota J, Miettinen M. KIT and PDGFRA mutations in gastrointestinal stromal tumors (GISTs). *Semin Diagn Pathol* 2006; 23 (2): 91-102
7. Pantaleo MA, Biasco G. Gastrointestinal cancer: Management of GIST--go beyond imatinib: treat resistant subtypes. *Nat Rev Clin Oncol* 2015; 12 (8): 440-442
8. Hayashi Y, Bardsley MR, Toyomasu Y, et al. Platelet-derived growth factor receptor- α regulates proliferation of gastrointestinal stromal tumor cells with mutations in KIT by stabilizing ETV1. *Gastroenterology* 2015; 149 (2): 420-432
9. Rubin BP, Heinrich MC. Genotyping and immunohistochemistry of gastrointestinal stromal tumors: An update. *Semin Diagn Pathol* 2015; 32(5): 392-399
10. Patil DT, Rubin BP. Genetics of gastrointestinal stromal tumors: A heterogeneous family of tumors? *Surg Pathol Clin* 2015; 8 (3): 515-524
11. Janeway KA, Kim SY, Lodish M, et al. Defects in succinate dehydrogenase in gastrointestinal stromal tumors lacking KIT and PDGFRA mutations. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2011. 108(1): 314-318
12. Emile JF, Brahimi S, Coindre JM, et al. Frequencies of KIT and PDGFRA mutations in the Molec-GIST prospective population-based study differ from those of advanced GISTs. *Med Oncol* 2012; 29 (3): 1765-1772
13. Nishida, Blay JY, Hirota S, Kitagawa Y, Kang YK. The standard diagnosis, treatment, and follow-up of gastrointestinal stromal tumors based on guidelines. *Gastric Cancer* 2016; 19 (1): 3-14
14. Heinrich MC, Corless CL, Demetri GD, et al. Kinase mutations and imatinib response in patients with metastatic gastrointestinal stromal tumor. *J Clin Oncol* 2003; 21 (23): 4342-4349
15. Corless CL, Schroeder A, Griffith D, et al. PDGFRA mutations in gastrointestinal stromal tumors: Frequency, spectrum and in vitro sensitivity to Imatinib. *J Clin Oncol* 2005; 23 (23): 5357-5364
16. Younus J, Verma S, Franek J, Coakley N. Sarcoma disease site group of cancer care Ontario's program in evidence-based care. Sunitinib malate for gastrointestinal stromal tumour in imatinib mesylate-resistant patients: recommendations and evidence. *Curr Oncol* 2010; 17 (4): 4-10

17. Ferraro D, Zalcberg J. Regorafenib in gastrointestinal stromal tumors: clinical evidence and place in therapy. *Ther Adv Med Oncol* 2014; 6 (5): 222-228
18. Heinrich MC, Owzar K, Corless CL, et al. Correlation of kinase genotype and clinical outcome in the North American Intergroup phase III trial of Imatinib mesylate for treatment of advanced gastrointestinal stromal tumor: CALGB 150105 study by Cancer and Leukemia Group B and Southwest Oncology Group. *J Clin Oncol* 2008; 26 (33): 5360-5367
19. Van Glabbeke M, Verweij J, Casali PG, et al. Predicting toxicities for patients with advanced gastrointestinal stromal tumours treated with imatinib: a study of the European Organisation for Research and Treatment of Cancer, the Italian Sarcoma Group, and the Australasian Gastro-Intestinal Trials Group (EORTC-ISG-AGITG). *Eur J Cancer* 2006; 42 (14): 2277-2285
20. Corless CL, Barnett CM, Heinrich MC. Gastrointestinal stromal tumours: origin and molecular oncology. *Nat Rev Cancer* 2011; 11 (12): 865-878
21. Yeh CN, Chen MH, Chen YY, et al. A phase II trial of regorafenib in patients with metastatic and/or a unresectable gastrointestinal stromal tumor harboring secondary mutations of exon 17. *Oncotarget* 2017, Apr 21
22. Capelli L, Petracci E, Quagliuolo V, et al. Italian Gastric Cancer Research Group (GIRCG). Gastric GISTs: Analysis of c-Kit, PDGFRA and BRAF mutations in relation to prognosis and clinical pathological characteristics of patients – A GIRCG study. *Eur J Surg Oncol* 2016; 42 (8): 1206-1214
23. Wardelmann E, Losen I, Hans V, et al. Deletion of Trp-557 and Lys-558 in the juxtamembrane domain of the c-kit protooncogene is associated with metastatic behavior of gastrointestinal stromal tumors. *Intern J Cancer* 2003; 106 (6): 887-895
24. Martín J, Poveda A, Llombart-Bosch A, et al. Deletions affecting codons 557-558 of the c-KIT gene indicate a poor prognosis in patients with completely resected gastrointestinal stromal tumors: A study by the Spanish Group for Sarcoma Research (GEIS). *J Clin Oncol* 2005; 23 (25): 6190-6198
25. Andersson J, Bümming P, Meis-Kindblom JM, et al. Gastrointestinal stromal tumors with KITExon 11 deletions are associated with poor prognosis. *Gastroenterology* 2006; 130 (6): 1573-1581
26. Heinrich MC, Corless CL, Demetri GD, et al. Kinase mutations and imatinib response in patients with metastatic gastrointestinal stromal tumor. *J Clin Oncol* 2003; 21 (23): 4342-4349
27. Wozniak A, Rutkowski P, Piskorz A, et al. Polish Clinical GIST Registry. Prognostic value of KIT/PDGFRA mutations in gastrointestinal stromal tumours (GIST): Polish Clinical GIST Registry experience. *Ann Oncol* 2012; 23 (2): 353-360
28. Dematteo RP, Gold JS, Saran L, et al. Tumor mitotic rate, size, and location independently predict recurrence after resection of primary gastrointestinal stromal tumor(GIST). *Cancer* 2008; 112 (3): 608-615
29. Lasota J, Dansonka-Mieszkowska A, Sobin LH, Miettinen M. A great majority of GISTs with PDGFRA mutations represent gastric tumors of low or no malignant potential. *Lab Invest* 2004; 84 (7): 874-883
30. Cassier PA, Fumagalli E, Rutkowski P, et al. Outcome of patients with platelet-derived growth factor receptor alpha-mutated gastrointestinal stromal tumors in the tyrosine kinase inhibitor era. *Clinical Cancer Research* 2012; 18(16): 4458-4464

1.19. ПРЕДИКТИВНИ БИОМАРКЕРИ ПРИ КОЖНИ МАЛИГНЕНИ ТУМОРИ

1.19.1. Предиктивни биомаркери при меланом

1.19.1.1. Туморна дебелина по *Breslow* и хистологична улцерация

Красимир Киров

Патологични принципи. Туморна дебелина и улцерация са два основни независими фактори, определящи прогнозата на първичния тумор и се използват в TNM-класификация на кожен меланом (КМ). Те предопределят както поява на регионални метастази (микрометастази при биопсия на сентинелни лимфни възли – N1a-2a или клинични макрометастази – N1b-2b), така и за хематогенни метастази (M1a-d).

Туморна дебелина. Тя е специфичен независим прогностичен фактор при КМ с висока статистическа значимост ($p < 0.0001$). През 1969 г. *W. Clark* въвежда петстепенни нива на микроинвазия до отделните анатомични слоеве на кожата: I – епидермис, II – папиларна дерма, III – преминаване на границата папиларна/ретикуларна дерма, IV – ретикуларна дерма и V – хиподерма.¹ През 1970 г. *A. Breslow* сравнява прогностичното значение на диаметъра на тумор, микроинвазия по *Clark* и дебелина на тумор, измерена с микроокуляр в mm, от гранулозен слой до най-дълбоко проникнала част на тумора и установява, че най-голямо значение има туморната дебелина. Определя и пет точки на прогностично пречупване (cut-offs) на 0.75 mm, 1.5 mm, 2.25 mm, 3 mm и > 3 mm.² В последствие стадирането по *Breslow* е променено на четиристепенно: 0.76, 1.5, 4 и > 4 mm, като заедно с нивата по *Clark* определя Т-категорията в TNM-класификацията до Шеста версия от 2002 г., когато прогностичните точки са променени на 1, 2, 4 и > 4 mm.

Улцерация на тумора. Тя е специфичен независим прогностичен фактор при КМ с висока статистическа значимост ($p < 0.0001$) и участва в определяне на Т-категория: T1a-4a (без улцерация) и T1b-4b (със улцерация).³⁻⁹ По-честа е при спорадични меланоми, при които няма зависимост от ултравиолетови лъчи – акрални, субунгвални и мукозни.

Аналитични методи за изследване. Потвърждение за наличие на улцерация е хистологично изследване с Н&Е и имунохистохимия (ИХХ). Хистологичните картини на улцерации са три вида: инфилтративна (причиняваща инвазия и ерозия на епитела), туморогенна (изтъняваща епитела) и травматична, която няма прогностично значение. Улцерацията с епидермална инвазия е най-честа при повърхностно разпространяващи се меланоми, като туморните клетки разкъсват адхезионните връзки между кератиноцитите. Туморогенната (attenuative) улцерация е предимно при нодуларни меланоми, без епидермална инвазия, но нарастващият туморен обем изтънява и разкъсва епитела. Прогностично значение при улцерация има размерът ѝ. Петгодишната преживяемост при пациенти с минимална и умерена големина на улцерация (< 70% от площта на тумора или < 5 mm диаметър) е съотв. 80.4% и 82.7%, а при обширни улцерации (> 70% и > 5 mm) – 66.4% и 59.3%.¹³ Освен размер, предшестващата епидермална реакция, изконсумирането на епитела (СОЕ) и реактивната епидермална хиперплазия (реепителизация след възпалителна реакция) имат също прогностично значение. При ИХХ с Melan-A/Ki67 за меланомни клетки, CD66b за неутрофили и CD163 за макрофаги се установява, че тумори с СОЕ имат в 37% повече пролифериращи клетки ($p = 0.0046$), но не и инфламаторни клетки, докато те са с 18% повече при тумори с хиперплазия или реепителизация ($p = 0.0021$). Затова предложението за дефиниция на улцерация е “загуба на епидермиса над тумора с инфилтрация от неутрофили или фибринови отлагания, изтъняване, заличаване или реактивна хиперплазия на околния епител”.¹⁴

Доказателства за предиктивно значение. Десетгодишната преживяемост при пациенти с T1 е 92%, с T2 – 80%, с T3 – 63% и с T4 – 50% ($p < 0.0001$).⁴ За микроинвазия по Clark се установява, че има прогностично значение само за тумори до 1 mm (T1) и то само за петгодишна преживяемост ($p = 0.37$). Затова в Седма редакция на TNM-класификацията (2010 г.) е заменена с брой на митози в T1в $\geq 1/\text{mm}^2$, а в Осма редакция (2017 г.) T-категорията се определя само от дебелина и улцерация.³⁻⁸ Петгодишната преживяемост при пациенти без улцерация на КМ е 91% (80% от пациентите в проучването са T1-2), а при тези с улцерация – 77.5%.^{9,10} При КМ в стадий IIв-III единственото регистрирано адювантно лечение е с *IFN-alfa*. Подгрупови анализи на проучвания на EORTC 18952 и 18991 установяват, че улцерация на първичен меланом е единствен предиктивен фактор за ефект от терапията със статистическа значимост ($p < 0.001$).^{15,16} Проучване на причините на молекулярно ниво установи, че меланоми с

улцерация имат различен генотип от тези без улцерация. Десет гена (*FGFR2, FGFR3, HLF, DSP, EGFR, CEBPA, PTGS1, KCNK6*) са свързани с улцерация.^{17,18} Промени има и в сигналния път JAK-STAT, който регулира антипролиферативния, имунния, антиангиогенезния и проапоптичния ефект на интерфероните. При улцерирани меланоми има повишен синтез на STAT5, който действа антагонистично на STAT1, част от JAK-STAT, и този сигнален път е подтиснат. Ефектът от адювантна терапия с *IFN-alfa* най-вероятно се дължи на възстановяване на функцията на JAK-STAT.^{17,18} Особеностите в биологичното поведение на улцерирани меланоми и техните молекулярни характеристики повдигат въпрос дали не трябва да се разглеждат като отделна нозологична подгрупа.¹⁹ При биопсия на сентинелни лимфни възли процентът на метастатични лимфни възли (N1a-2a) нараства с дебелината на тумора и наличието на улцерация (T1b-4b).²⁰

A

Хистологична детекция на улцерация при кожен меланом се препоръчва като предиктивен фактор за ефективност на адювантна терапия с *IFN-alfa*.



Туморна дебелина и улцерация са основни прогностични фактори на първичен кожен меланом и е необходимо да бъдат точно определени и дефинирани от патолога.

ЛИТЕРАТУРА

- Clark WH, Jr, From L, Bernardino EA, Mihm MC. The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanomas of the skin. *Cancer Res* 1969; 29: 705-727
- Breslow A. Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous

melanoma. *Ann Surg* 1970; 172: 902-908

- Buzaid AC, Ross MI, Balch CM, et al. Critical analysis of the current American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma and proposal of a new staging system. *J Clin Oncol* 1997; 15: 1039-1051

4. Balch CM, Soong SJ, Gershenwald JE, et al. Prognostic factors analysis of 17,600 melanoma patients: validation of the American Joint Committee on Cancer melanoma staging system. *J Clin Oncol* 2001; 19: 3622-3634
5. Balch CM, Buzaid AC, Soong SJ, et al. Final version of the American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma. *J Clin Oncol* 2001; 19: 3635-3648
6. Balch CM, Gershenwald JE, Soong SJ, et al. Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. *J Clin Oncol* 2009; 27: 6199-6206
7. VIII-th TNM classification, Spriger Verlag, Dec. 2016
8. Ophuis SO, M Louwman, D Grunhagen, et al. Implementation of the 7th edition AJCC staging system: effects on staging and survival for pT1 melanoma. A Dutch population based study. 1204A, ECCO 2017
9. Balch CM, Wilkerson JA, Murad TM, et al. The prognostic significance of ulceration of cutaneous melanoma. *Cancer* 1980; 45: 3012-3017
10. Weissel S. Revisiting determinants of prognosis in cutaneous melanoma. *Cancer* 2015; 121 (23): 4108-4123
11. Bedogni B, Powell M. Hypoxia, melanocytes and melanoma – survival and tumor development in the permissive microenvironment of the skin. *Pigment Cell Melanoma Res* 2009; 22 (2): 166-174
12. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011;144 (5): 646-674
13. In't Hout FE, Haydu LE, Murali R, et al. Prognostic importance of the extent of ulceration in patients with clinically localized cutaneous melanoma. *Ann Surg* 2012; 255 (6): 1165-1170
14. Bonnelykke-Behrndtz LM, Schmidt H, Damsgaard TE. Consumption of the epidermis: a suggested precursor of ulceration associated with increased proliferation of melanoma cells. *Am J Dermatopathol* 2015; 37 (11): 841-845
15. Eggermontetal. Post-surgery adjuvant therapy with intermediate doses of interferon alfa 2b versus observation in patients with stage IIb/III melanoma (EORTC 18952): randomised controlled trial. *Lancet* 2005; 366: 1189-1196
16. Eggermontetal. Ulceration and stage are predictive of interferon efficacy in melanoma: results of the phase III adjuvant trials EORTC 18952 and EORTC 18991. *Eur J Cancer* 2012; 48: 218-225
17. Jewell R, et al. The clinico-pathological and gene expression patterns associated with ulceration of primary melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res* 2015; 28 (1): 94-104
18. Rakoszy Z, et al. Integrative genomics identifies gene signature associated with melanoma ulceration. *PLoS ONE* 2013; 8: e54958
19. Eggermont AM, Spatz A, Lazar V, Robert C. Is ulceration in cutaneous melanoma just a prognostic and predictive factor or is ulcerated melanoma a distinct biologic entity? *Curr Opin Oncol* 2012; 24 (2): 137-140
20. Pet D, al. Mitotic rate is a more reliable unfavorable prognosticator than ulceration for early cutaneous melanoma: a 5-year survival analysis. *Oncol Rep* 201; 32 (6): 2735-2743

1.19.1.2. Първичен туморен митотичен брой

Красимир Киров

Патологични принципи. Броят на митози (количествено измерване на меланомна пролиферация) е най-важният прогностичен фактор за туморна прогресия и обща преживяемост (ОП) след дебелина при първичен кожен меланом (КМ).¹ Десетгодишната преживяемост варира от 93% при 0 митози/mm² до 48% при > 20 митози/mm² ($p < 0.001$). Средният брой митози се увеличава с туморната дебелина: при ≤ 1 mm – 1/mm², 1-2 mm – 3.5/mm², 3-4 mm – 7.3/mm² и > 8 mm – 9.6/mm². Броят митози се увеличава и при наличие на улцерация – 59% от тумори с улцерация имат > 5/mm² в сравнение с 16% при тумори без улцерация ($p < 0.001$).¹ Първото съобщение за по-лоша ОП според брой на митози е от *Allen and Spitz* от 1953 г.², но 50 години по-късно броят на митозите е определен като независим прогностичен фактор и е включен в Седма редакция на TNM-класификацията (2010 г.) при определяне на T1:T1a – 0 митози/mm² и T1b ≥ 1 /mm².⁵⁻⁷ В някои проучвания броят на митози е с по-голяма значимост от улцерация.⁸

Аналитични методи за изследване. За определянето на наличие на митоза в туморна клетка срезове с дебелина 5 μ m се оцветяват с H&E. Трябва да са налице влакнести удължения на кондензираната маса хроматин и трябва да отговаря на картина на метали телофаза. Съществуват два протокола за определяне на брой на митози: от 1972 г.³, приет на International Pigment Cell Conference, и от 1982 г. на International Pathology Workshop⁴. В протокола от 1972 г. (метод на средни стойности) се определят митозите в 10 полета на голямо увеличение (400x) и крайният резултат е средноаритметична стойност на брой за пет полета (отговарящи на 1 mm²). В протокола от 1982 г. се оп-

ределя поле с най-много митози (гореща точка) и четири съседни и крайният резултат е общият сбор на 1 mm². При сравняване на резултати преди и след 1982 г. се установяват значими разлики⁸ и затова при въвеждане на брой митози в Седма редакция на TNM-класификацията се прие да се използва само протокола на „горещата точка“ от 1982 г.⁷ Най-голямо прогностично значение броят митози има в T1 ($p = 0.001$) и T2 ($p = 0.006$), като при T3 и T4 намалява.⁸

Доказателства за предиктивно значение. Позитивните сентинелни лимфни възли (СЛВ) са прогностичен фактор с най-висока значимост за първичен КМ – категоричен признак за метастатичен потенциал ($p < 0.0001$). При биопсия на СЛВ се откриват метастатични възли в около 20%. Предиктивните фактори за позитивен СЛВ са туморна дебелина и улцерация⁹, но с най-голямо значение е броят на митози¹⁰. Спорна беше целесъобразността от биопсия на СЛВ при пациенти с T1, тъй като метастази се откриват в 2-5%; установи се обаче, че докато при пациенти с T1a честота е почти 0%, то при T1b (дебелина 0.75-1 mm, улцерация, наличие на митози или *Clark IV* и *V* степен) честотата е 10% и провеждането на биопсия при T1b е препоръчително. При сравнение на резултати в T1b от Шеста и Седма редакции на TNM-класификацията (замяна на степени по *Clark* с брой на митози) броят пациенти с T1b се увеличава от 10.1% на 21.5%. Процентът на пациенти с проведена биопсия на СЛВ се е увеличил от 4.5% на 13%, обаче процентът с позитивен СЛВ е спаднал от 10.5% на 8.8%. Това налага преосмисляне на индикацията за биопсия при T1b, още повече, че петгодишната преживяемост при T1a е 100%, а при T1b – 98%.^{11,12} В Осма редакция на TNM класификацията се предлага броят на митози да отпадне при определяне на T1 a/в.¹³

C

Хистологично определяне на първичен туморен митотичен брой при кожен меланом се препоръчва като предиктивен фактор за наличие на метастатични сентинелни лимфни възли.



- При определяне на брой на митози сега се използва протокола от 1982 г. (за „горещата точка“).
- Хистологично определяне на първичен туморен митотичен брой при кожен меланом не се препоръчва като прогностичен фактор.

ЛИТЕРАТУРА

1. Thompson JF, et al. Prognostic significance of mitotic rate in localized primary cutaneous melanoma: An analysis of patients in the Multi-Institutional American Joint Committee on Cancer Melanoma Staging Database. *J Clin Oncol* 2011; 29 (16): 2199-2205
2. Allen AC, Spitz S. Malignant melanoma: A clinicopathological analysis of the criteria for diagnosis and prognosis. *Cancer* 1953; 6: 1-45
3. McGovern VJ, Mihm MC, Jr, Bailly C, et al. The classification of malignant melanoma and its histologic reporting. *Cancer* 1973; 32: 1446-1457
4. McGovern VJ, Cochran AJ, Van der Esch EP, et al. The classification of malignant melanoma, its histological reporting and registration: A revision of the 1972 Sydney classification. *Pathol* 1986; 18: 12-21
5. Attis MG, Vollmer RT. Mitotic rate in melanoma: A reexamination. *Am J Clin Pathol* 2007; 127: 380-384
6. Gimotty PA, Elder DE, Fraker DL, et al. Identification of high-risk patients among those diagnosed with thin cutaneous melanomas. *J Clin Oncol* 2007; 25: 1129-1134
7. Balch CM, Gershenwald JE, Soong SJ, et al. Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. *J Clin Oncol* 2009; 27: 6199-6206
8. Azzola MF, Shaw HM, Thompson JF, et al. Tumor mitotic rate is a more powerful prognostic indicator than ulceration in patients with primary cutaneous melanoma: An analysis of 3,661 patients from a single center. *Cancer* 2003; 97: 1488-1498
9. Pet D, et al. Mitotic rate is a more reliable unfavorable prognosticator than ulceration for early cutaneous melanoma: a 5-year survival analysis. *Oncol Rep* 2014; 32 (6): 2735-2743
10. Paek SC, Griffith KA, Johnson TM, et al. The impact of factors beyond Breslow depth on predicting sentinel lymph node positivity in melanoma. *Cancer* 2007; 109: 100-108
11. Caudle AS, Ross MI, Prieto VG, et al. Mitotic rate predicts sentinel lymph node involvement in melanoma: Impact of the 7th edition AJCC Melanoma Staging System. *Ann Surg Oncol* 2010; 17 (1): S8
12. Ophuis OCM, Louwman MW, Grünhagen DJ, et al. Implementation of the 7th edition AJCC staging system: Effects on staging and survival for pT1 melanoma. A Dutch population based study. *Int J Cancer* 2017; 140 (8): 1802-1808
13. VIII-th TNM classification, Spriger Verlag, Dec. 2016

1.19.1.3. BRAF-активиращи мутации

Красимир Киров, Милка Георгиева

Молекулярна биология. Киназите RAF са компоненти от MAPK-сигналния път; активността им изисква формиране на димери, като това се подпомага от активирането на RAS. Активираните RAF-кинази фосфорилират и активират MEK1/2, които, на свой ред, фосфорилират и активират ERK1/2, резултирайки в клетъчна пролиферация, диференциация и автоинхибиторна обратна връзка към горните (upstream) компоненти на сигналния път.¹ Онкогенното BRAF-сигнализиране води до прогресия на меланом чрез активиране на гени, свързани с туморната прогресия, които са след BRAF (downstream). Допълнително BRAF индуцира автокринна секреция на рецептора на съдовия растежен фактор, водеща до ангиогенеза и подпомагаща растежа на тумора.^{2,3} Около 50% от меланомите имат активиращи мутации в BRAF-гена, които увеличават киназната активност и я правят конститутивна. Около 90% от тези мутации са на кодон 600, като най-разпространената е BRAFV600E-точкова мутация. Други мутации на кодон 600 са BRAFV600K, V600D и V600M.^{4,5} По правило BRAF V600E-мутации са свързани с лезии, възникващи на фона на бенигнени невуси и са по-разпространени при по-млади пациенти на средно изложени на слънце повърхности. В допълнение, BRAF V600E-мутации са по-характерни при по-възрастни пациенти на хронично изложени на слънце повърхности, свързани с меланоми, възникващи на фона на междинни лезии.⁶


Аналитични методи за изследване. Няколко метода има за откриване на BRAF-мутации: секвениране по Sanger, мутационно-специфични real-time (RT) PCR, пиросеквениране и др.¹³⁻¹⁵ Двата одобрени FDA/CE-IVD придружаващи теста за BRAF-мутации

(Cobas⁴800 BRAF V600 мутационен тест и BioMerieux (bMx)ThxID¹-BRAF) са RT-PCR-тестове. Известно е вече, че тестът Cobas открива 70% от V600K и 100% от V600E.¹⁶ Според препоръки на ESMO туморни тъкани, за предпочитане метастатични лезии, трябва да бъдат тествани за BRAF V600-мутации. Ако са негативни, се продължава молекулярното тестване за NRAS, c-Kit (мукозни и акролентигинозни първични), GNA11 или GNAQ (увеални първични); това помага пациентът да се насочи към подходяща таргетна терапия или клинично проучване.

Доказателства за предиктивно значение. Препоръките за първа линия терапия се дебатирали. Подходящи методи са анти-PD1-терапии, а за BRAF-мутирани меланоми – комбинации от BRAF- с MEK-инхибитори.¹⁷ В ръководството на NCCN се включва BRAFV600-мутационен анализ, защото V600E-или V600K-мутации в BRAF-гена насочват за таргетна терапия с BRAF-инхибитори. През 2011 г. Американската Агенция за храна и лекарства (FDA) одобри vemurafenib за терапия на неоперабилен метастатичен меланом с BRAF p.V600E-мутация. Клиничната детекция на BRAF p.V600E е стандарт за пациенти с авансирал и метастатичен меланом като предиктивна за отговор към vemurafenib, dabrafenib и trametinib.⁷⁻⁹

От друга страна, BRAF V600-мутацията активира нисходящи MEK/ERK-ефектори и корелира с по-високи нива на PD-L1-експресия, като подпомага туморните клетки при избягване на апоптоза и инициране на метастази.^{10,11} Пациенти, считани за PD-L1-позитивни, показват по-благоприятен отговор към nivolumab, отколкото тези с по-ниски нива на PD-L1. През септември 2015 г. индикациите на nivolumab бяха разширени (в комбинация с ipilimumab) при пациенти с BRAF V600 “див” тип меланом, а при BRAF V600-позитивни пациенти – в комбинация с BRAF-инхибитор.¹²

A	Тестване за <i>BRAF V600</i> -мутации в първичен тумор или метастаза (за предпочитане) от неоперабилен или метастатичен меланом се препоръчва за селектиране на пациенти за таргетна терапия с BRAF- и MEK-инхибитори, а при <i>BRAF</i> “див” тип се препоръчва лечение с имунни чекпойнт-инхибитори (<i>pembrolizumab, nivolumab, ipilimumab</i>).
B	<ul style="list-style-type: none"> ■ При метастатичен меланом се препоръчва да бъдат изследвани (преференциално) метастази или първичен тумор за детекция на <i>BRAF V600</i>-мутация. Терапевтични опции за първа и втора линия включва анти-PD1-антитела (<i>pembrolizumab, nivolumab</i>) и анти-CTLA4-антитяло (<i>ipilimumab</i>) за всички пациенти и комбинация BRAF/MEK-инхибитори за пациенти с <i>BRAF</i>-мутирал меланом. ■ Като методи за анализ на <i>BRAF V600</i>-мутации се препоръчват аел-специфична PCR или секвениране.
C	<ul style="list-style-type: none"> ■ При меланоми с <i>BRAF V600</i>-мутации с бавно развитие и очаквана продължителност на живот над 3 месеца може да се обсъжда първа линия лечение с чекпойнт-инхибитори (<i>pembrolizumab, nivolumab, ipilimumab</i>). ■ Препоръчва се материалите за биомаркерно изследване да се оценяват от патолози за адекватност на пробата (качество и количество на тъканта, съдържание на туморни клетки) с последващо изготвяне на срезове за изолиране на ДНК.

	<ul style="list-style-type: none"> ■ Хистоморфологична верификация, преценка на адекватност на пробите (определяне количество и качество на тъканта), определяне съдържанието на туморни клетки, изготвяне на срезове и молекулярно-патологично тестване трябва да се извършват в един център. Хистопатологичната оценка на пробите е критична за достоверност на резултатите, предпазва от фалшиво негативни резултати и неуспешни тестове. Това предполага задължително включване на правила за молекулярно-патологично тестване като част от стандарта по патология. ■ За повече от 90% от пробите времето на извършване на <i>BRAF</i>-тестване трябва да е ≤ 7 работни дни от дата на получаване в тестващата лаборатория до време за даване на резултата. ■ Лабораториите трябва да използват валидирани методи за биомаркерно тестване на меланом, които да изпълняват стандартите за клинични молекулярно-патологични тестове.
---	---



- **Трябва да се организира и изгради система от мерки за бързо пренасяне на тъканни проби от референтни центрове до тестващи лаборатории, за да се минимизира времето за тестване и да се избегне забавяне на информацията за пациентите с метастатичен меланом.**
- **При тестване на биомаркери трябва да се следват сходни качествен контрол, политики и процедури за осигуряване на качество, както при останалите клинични лабораторни тестове.**

ЛИТЕРАТУРА

1. Lito P, Rosen N, Solit DB. Tumor adaptation and resistance to RAF inhibitors. *Nat Med* 2013; 19 (11): 1401-1409
2. Dhomen N, Marais R. BRAF signaling and targeted therapies in melanoma. *Hematol Oncol Clin North Am* 2009; 23: 52945
3. Lee JH, Choi JW, Kim YS. Frequencies of BRAF and NRAS mutations are different in histological types and sites of origin of cutaneous melanoma: a meta-analysis. *Br J Dermatol* 2011;164:77684
4. Tan YH, Liu Y, Eu KW, et al. Detection of BRAF V600E mutation by pyrosequencing. *Pathol* 2008; 40 (3): 295-298
5. Willmore-Payne C, Holden JA, Tripp S, Layfi eld LJ. Human malignant melanoma: detection of BRAF- and c-kit-activating mutations by high-resolution amplicon melting analysis. *Hum Pathol* 2005; 36 (5): 486-493
6. Shain AH, Yeh I, Kovalyshyn I, et al. The genetic evolution of melanoma from precursor lesions. *N Engl J Med* 2015; 373: 192636
7. Wan PT, Garnett MJ, Roe SM, et al. Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. *Cell* 2004; 116: 85567
8. Sosman JA, Kim KB, Schuchter L, et al. Survival in BRAF V600- mutant advanced melanoma treated with vemurafenib. *N Engl J Med* 2012; 366: 70714
9. Flaherty KT, Robert C, Hersey P, et al. Improved survival with MEK inhibition in BRAF-mutated melanoma. *N Engl J Med* 2012; 367: 10714
10. Ascierto PA, Kirkwood JM, Grob J-J, et al. The role of BRAF V600 mutation in melanoma. *J Transl Med* 2012; 10: 1-9
11. Brauner E, Gunda V, Borre PV, et al. Combining BRAF inhibitor and anti PD-L1 antibody dramatically improves tumor regression and antitumor immunity in an immunocompetent murine model of anaplastic thyroid cancer. *Oncotarget* 2016; 7: 17194-17211
12. Postow MA, Chesney J, Pavlick AC, et al. Nivolumab and ipilimumab versus ipilimumab in untreated melanoma. *New Engl J Med* 2015; 372: 2006-2017
13. Spittle C, Ward MR, Nathanson KL, et al. Application of a BRAF pyrosequencing assay for mutation detection and copy number analysis in malignant melanoma. *J Mol Diagn* 2007; 9 (4): 464-471
14. Jarry A, Masson D, Cassagnau E, et al. Real-time allele-specific amplification for sensitive detection of the BRAF mutation V600E. *Mol Cell Probes* 2004; 18 (5): 349-352
15. Thomas RK, Baker AC, DeBiasi RM, et al. High-throughput oncogene mutation profiling in human cancer. *Nat Genet* 2007; 39 (3): 347-351
16. Anderson S, Bloom KJ, Vallera DU, et al. Multisite analytic performance studies of a real-time polymerase chain reaction assay for the detection of BRAF V600E mutations in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue specimens of malignant melanoma. *Arch Pathol Lab Med* 2012; 136 (11): 1385-1391
17. Dummer R, Hauschild A, Lindenblatt N, et al. Cutaneous melanoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2015; 26 (Suppl. 5): v126-v132

1.19.1.4. *c-KIT*-активиращи мутации

Красимир Киров, Милка Георгиева

Молекулярна биология. Протеинът *c-KIT* (SCFR или CD117) е трансмембранен рецептор, кодиран от *c-KIT*-ген. Има специфичен лиганд – SCF (стволовоклетъчен фактор, *c-KIT*-лиганд или мастоцитен растежен фактор). Лигандът се състои от две алтернативни форми. Едната е разтворима, която веднага стимулира протеинкиназната активност при меланоцити, гоноцити, тъканни мастоцити, епителни клетки на гърда, мастни жлези и базален слой на кожа; активира сигналните пътища MAPK, PI3K и JAK/STAT. Втората е свързана с мембраната и стабилизира рецептора, като го предпазва от преждевременно разпадане.¹ При меланом мутациите на протоонкогена *c-KIT* са най-чести при мукозни, акрални и меланоми, свързани с хронично излагане на слънчева светлина, съотв. в 29-39%, 18-36% и 23-28%.^{2,3}

Аналитични методи за изследване. Диагностиката на *c-KIT* се извършва имунохистохимично (ИХХ) върху тъканен срез (a tissue microarray, TMA) с платформа Ventana Benchmark[®] (Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, Arizona). Използва се заешко поликлонално анти тяло срещу *cKIT* (DAKO[®] A4502) в разреждане 1:100. Локализацията на мутациите се определят чрез секвениране.

Доказателства за предиктивно значение. За разлика от *BRAF* и *NRAS*, които имат лоша прогноза при поява на метастази, при *c-KIT* няма установена такава зависимост. Дори обратно, при *in vitro* и *in vivo* проучвания с меланомни клетки се

установи, че експозиция на *c-KIT*-позитивни клетки на SCF активира апоптозата, което не се наблюдава при *c-KIT*-отрицателни меланомни клетки или нормални меланоци. Тъй като SCF нормално се секретира от кератиноцити и други дермални клетки, загубата на експресия на *c-KIT* може да доведе до загуба на *c-KIT*/SCF-медирана апоптоза и до туморен растеж и пролиферация.^{4,5} При таргетиране на *c-KIT* не се постигат резултати, сравними с инхибицията на BRAF V600. Причината е, че мутациите са различни. Като водещи се очертават само тези на екзон 11 и 13 (“hotspots”) и само при тях се постига добър терапевтичен ефект (степен на обективен отговор – 50%). Те имат предиктивно значение, докато останалите мутации са съпътстващи (passenger mutations) (амплификация на *c-KIT*, често съчетана с мутации на *NRAS*) и не подлежат на таргетна терапия, т.е. имат негативно предиктивно значение.⁶ Проведени са проучвания до фаза II с *imatinib*, *sunitinib*, *sorafenib*, *nilotinib*, *dasatinib* и *masatinib*; резултати са сходни за различните препарати – туморен отговор в 16-28%.²¹⁻²³ Резултатите от медианно време до прогресия (мВДП) и обща преживяемост (ОП) са незадоволителни – съотв. 2.7 и 11.8 месеца. Поради трудно намиране на пациенти засега таргетната терапия при *c-KIT*-мутации остават във фаза II (NCT00470470). През 2010 г. беше стартирано фаза III проучване с *nilotinib*, но пак поради недостиг на пациенти премина във фаза II (TEAM Trial). Засега няма предстояща регистрация на *c-KIT*-инхибитор.⁷⁻¹⁴ Като най-перспективна се очертава имунотерапия с анти-PD1- ± CTLA4-антитела. В проучване CheckMate 067 туморният отговор при мукозен меланом е 23.1% с анти-PD1- и 37.2% с анти-PD1- + CTLA4-антитела.^{15, 16}

В

- Препоръчва се тестване за *c-KIT*-мутации само при пациенти с акрални и мукозни меланоми.
- При метастатични акрални и мукозни меланоми се препоръчва тестване за *c-KIT*-мутации с цел селекция на пациенти за таргетна терапия със *c-KIT*-инхибитори (*imatinib*) (при екзон 11- и 13-мутации).
- За тестване на *c-KIT*-мутации се препоръчва директно секвениране и не се препоръчва имунохистохимично изследване.



Засага при меланоми със *c-KIT*-мутации няма регистрирана успешна таргетна терапия; ефективна е имунотерапия с анти-*PD-1*-антитела.

ЛИТЕРАТУРА

1. Tsuura Y, Hiraki H, Watanabe K. Preferential localization of c-KIT product in tissue mast cells, basal cells of skin, epithelial cells of breast, small cell lung carcinoma and seminoma/dysgerminoma in human: immunohistochemical study on formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Virchows Arch* 1994; 424: 135-141
2. di Paola RS, Kuczynski WI, Onodera K. Evidence for a functional kit receptor in melanoma, breast, and lung carcinoma cells. *Cancer Gene Ther* 1997; 4: 176-182
3. Curtin JA, Busam K, Pinkel D, et al. Somatic activation of KIT in distinct subtypes of melanoma. *J Clin Oncol* 2006; 24: 4340-4346
4. Huang S, Luca M, Gutman M. Enforced c-KIT expression renders highly metastatic human melanoma cells susceptible to stem cell factor-induced apoptosis and inhibits their tumorigenic and metastatic potential. *Oncogene* 1996; 13: 2339-2347
5. deMelo B, Maia B, et al. Prognostic significance of c-KIT in vulvar cancer: bringing this molecular marker from bench to bedside. *J Transl Med* 2012; 10: 150
6. Chandra PK. KIT genetic mutation in a melanoma patient. *The Biomarker*
7. Hodi FS, Friedlander P, Corless CL, et al. Major response to imatinib mesylate in KIT-mutated melanoma. *J Clin Oncol* 2008; 26: 2046-2051
8. Lutzky J, Bauer J, Bastian BC. Dose-dependent, complete response to imatinib of a metastatic mucosal melanoma with a K642E KIT mutation. *Pigment Cell Melanoma Res* 2008; 21: 492-493
9. Woodman SE, Trent JC, Stemke-Hale K, et al. Activity of dasatinib against L576P KIT mutant melanoma: molecular, cellular, and clinical correlates. *Mol Cancer Ther* 2009; 8: 2079-2085
10. Carvajal RD, Antonescu CR, Wolchok JD, et al. KIT as a therapeutic target in metastatic melanoma. *JAMA* 2011; 305: 2327-2334
11. Guo J, Si L, Kong Y, et al. Phase II, open-label, single-arm trial of imatinib mesylate in patients with metastatic melanoma harboring c-KIT mutation or amplification. *J Clin Oncol* 2011; 29: 2904-2909
12. Hodi FS, Corless CL, Giobbie-Hurder A, et al. Imatinib for melanomas harboring mutationally activated or amplified KIT arising on mucosal, acral, and chronically sun-damaged skin. *J Clin Oncol* 2013; 31: 3182-3190

13. Postow MA, Carvajal RD. Therapeutic implications of KIT in melanoma. *Cancer J* 2012; 18: 137-141
14. Dai J, Kong Y, Si L, et al. Large-scale analysis of PDGFRA mutations in melanomas and evaluation of their sensitivity to tyrosine kinase inhibitors imatinib and crenolanib. *Clin Cancer Res* 2013; 19: 6935-6942
15. JeddD. Wolchok updated results from a phase III trial of nivolumab (NIVO) combined with ipilimumab (IPI) in treatment-naive patients (pts) with advanced melanoma (MEL) (CheckMate 067). *J Clin Oncol* 2016; 34 (Suppl.; Abstr. 9505)
16. Larkin J, et al. Combined nivolumab and ipilimumab or monotherapy in untreated melanoma. *N Engl J Med* 2015; 373: 23-34

1.19.1.5. Изходен чревен микробиом

Красимир Киров

Биология. Чревната микрофлора влияе върху много физиологични процеси и нарушаването ѝ (дисбиоза) може да причини редица патологични състояния. От 60-те години на XX в. започват проучвания за влиянието на микроорганизмите върху метаболизма на медикаментите¹ и върху значението им за риска в канцерогенезата на някои тумори (онкомикробиом) като колоректален карцином и др.²⁻⁶. През последните 20 години се установиха много *in vitro* и *in vivo* доказателства за влиянието на чревната микрофлора върху метаболизма и ефекта от лечението с цитостатици (*5-fluorouracil*, *cyclophosphamide*, *irinotecan*, *oxaliplatin*, *gemcitabine*, *methotrexate*), а напоследък – и с блокажни имунни инхибитори, главно при лечението на меланом.

Чревната микрофлора (микробиота) модулира терапевтичните агенти чрез ключови механизми, обединени в акронима TIMER (Translocation, Immunomodulation, Metabolism, Enzymatic degradation, Reduced diversity). При транслокация коменсалните бактерии (*Lactobacillus jonsonii* и *Enterococcus hirae*) прекосяват чревната бариера и се установяват в слезка и регионални лимфни възли, променяйки терапевтичната ефективност на *cyclophosphamide*.⁷ От друга страна, имуномодулацията е главен механизъм на въздействието им при блокажните имунни чекпойнт-инхибитори.

Аналитични методи за изследване. Методологията включва микробиологично изследване на фекални проби и генетично изследване на бактериалните популации. Геномната ДНК се екстрахира от фекални проби и се извършва метагеномно “shotgun”

секвениране (MSS) на IlluminaHiSeq 2500 PE-100. Таксономен (MetaPhlAn) и функционален (HUMAnN) анализ се извършва на данните от MSS.¹¹

Доказателства за предиктивно значение. При опити с мишки без чревна флора (*germ-free*) не е установено никакво повлияване на тумора при лечение с анти-CTLA4-антигела. *Bacteroidales* са негативен терапевтичен предиктор за ефективността на *Ipilimumab*, понижавайки активността на ефекторните CD4+ клетки от слезката и на тумор-инфилтриращите лимфоцити.⁸⁻⁹ При терапия с анти PD-L1-антигела високата концентрация на *Bifidobacterium* е позитивен предиктор като активира дендритните клетки, индуцира тумор-специфични Т-лимфоцити, увеличава концентрацията им в туморната среда и засилва ефекта от терапията.¹⁰ На ASCO 2017 бяха съобщени данни за четири микроорганизми, които се откриват най-често и статистически значимо при пациенти, повлияли се от терапията: *Methanobrevibacter smithii* ($p = 0.03$), *Bacteroides thetaiotamicron* ($p = 0.03$), *Lactobacillus plantarum* ($p = 0.04$) и *Eubacterium limosum* ($p = 0.01$).¹¹ Промени в метаболизма, причинени от бактерии, оказват влияние при появата на колит като най-драматично странично действие на *Ipilimumab*. Понижаването на броя на *Bacteroidetes* води до дефицит на продукцията на витамин В и транспорта на полиамин, което увеличава риска от индуциран колит при блокада на CTLA-4.¹²

От друга страна, ензимният разпад и пониженото разнообразие на микробиома понижават активността на цитостатиците *5-fluorouracil*, *irinotecan*, *gemcitabine* и *methotrexate*. В процес на проучване е възможността да се модулира чревния микробиом чрез подходящи антибиотици (онкомикробиотици), про- и пребиотици, дори и чрез използването на фекални екстракти за подготовка за последващата химио- или имунотерапия.

D

- Чревният микробиом може да бъде таргет, моделиращ ефективността и токсичността на цитостатична и имунотерапия.
- Чревният микробиом може да бъде използван в разработка на прецизни терапевтични стратегии с антитуморни агенти от ново поколение.

ЛИТЕРАТУРА

1. Scheline RR. Drug metabolism by intestinal microorganisms. *J Pharm Sci* 1968; 57: 2021-2037
2. Holmes E, Li JV, Marchesi JR, Nicholson JK. Gut microbiota composition and activity in relation to host metabolic phenotype and disease risk. *Cell Metab* 2012; 16: 559-564
3. Kostic AD, Gevers D, Pedamallu CS, et al. Genomic analysis identifies association of *Fusobacterium* with colorectal carcinoma. *Genome Res* 2012; 22: 292-298
4. Rowland IR. The role of the gastrointestinal microbiota in colorectal cancer. *Curr Pharm Des* 2009; 15: 1524-1527
5. Zhu Q, Gao R, Wu W, Qin H. The role of gut microbiota in the pathogenesis of colorectal cancer. *Tumor Biology* 2013; 1285-1300
6. Wu S, Rhee K-J, Albesiano E, et al. A human colonic commensal promotes colon tumorigenesis via activation of T helper type 17 T cell responses. *Nat Med* 2009; 15: 1016-1022
7. Viaud S, et al. The intestinal microbiota modulates the anticancer immune effects of cyclophosphamide. *Science* 2013; 342: 971-976
8. Vétizou M, Pitt JM, Daillere R, Lepage P, et al. Anticancer immunotherapy by CTLA-4 blockade relies on the gut microbiota. *Science* 2015; 80 (350): 1079-1084
9. Pitt JM, Vétizou M, Waldschmitt N, et al. Fine-tuning cancer immunotherapy: Optimizing the gut microbiome. *Cancer Res* 2016; 76 (16): 4602-4607
10. Sivan A, Corrales L, Hubert N, et al. Commensal *Bifidobacterium* promotes antitumor immunity and facilitates anti-PD-L1 efficacy. *Science* 2015; 80 (350): 1084-1089
11. Frankel A, et al. Metagenomic shotgun sequencing to identify specific human gut microbes associated with immune checkpoint therapy efficacy in melanoma patients. ASCO 2017, Abstr. 9516
12. Dubin K, Callahan MK, Ren B, et al. Intestinal microbiome analyses identify melanoma patients at risk for check-point blockade-induced colitis. *Nat Commun* 2016;7:10391. doi: 10.1038/ncomms10391

1.19.2. Предикивни биомаркери при немеланомни малигнени кожни тумори

1.19.2.1. *Hedgehog*-мутации

Красимир Киров, Мариела Василева

Молекулярна биология. От злокачествените немеланомни кожни тумори най-чести са базоцелуларен (БЦК) и плоскоклетъчен (ПКК).¹ Патогенезата на ПКК е свързана както с кумулативен ефект на ултравиолетови лъчи (УВА) и причинени от тях преканцерози, така и от имуносупресивни състояния и болести, HPV-инфекции, генетични болести и синдроми – xeroderma pigmentosum (XP), epidermolysis bullosa и др.^{2, 3, 13} Ранните генетични промени са загуба на функция на туморния супресор p53, докато активиране на онкоген може да бъде различно – аберантно активиране на рецептора на епидермалния растежен фактор (EGFR), RAS, Fyn (член на Src-тирозинкиназна фамилия, SFK) или на p16INK4a-сигналния път, нарушения на ДНК-репарация при XP.³ С въвеждане на c-KIT- и BRAF-инхибитори се установи като странично действие на лечението хиперпролиферация на BRAF “див” тип (WT)-кератиноцити, резултат на „парадоксална” активация на RAS и поява на кератоакантоми и ПКК.⁴

При БЦК патогенезата включва значимо влияние на УВА. Ако то е интермитентно, както при меланом^{5, 6}, използването на фотозащитни кремове е с много по-малък ефект, отколкото при ПКК и лъчеви преканцерози⁷⁻⁹. Ранни генетични промени са загуба на функция на туморния супресор p53 и патологична активация на сигналния път (Sonic) Hedgehog (SHH) (в 90%). По правило SHH е активен през ембрионалното развитие, а постнатално се активира физиологично в диференцирани тъкани стволови

клетки.¹⁰ Пренаталното му блокиране води до тежки малформации, а постнаталното патологично активиране участва в патогенезата на над 30 вида тумори. Сигналният път се състои от няколко медиатора. Най-важните са Patched (PTCH1), Smoothened (SMO), Suppression of fusion (SUFU) и Glioma (Gli), които подържат пътя в неактивно състояние чрез последователна супресия.¹¹⁻¹⁴ Активирането му настъпва физиологично или патологично при авто- или паракринна секреция на лиганд SHH, който блокира PTCH1 и води до неговото разграждане в лизозомите. При загуба на супресия (най-вероятно чрез понижаване на метаболизма на оксистерола) SMO се активира (има ролята на онкоген при патологични състояния), като се прекратява супресията на Gli и се активират транскрипционни фактори в клетъчното ядро. Процесът води до неконтролируема пролиферация и супресия на апоптоза.¹³ Такава е патогенезата на повечето тумори и те се определят като лиганд-зависими. При БЦК, медулобластом и рабдомиосарком патологичното активиране на Hedgehog-сигналния път е лиганд-независимо, т.е. не се дължи на повишена секреция на SHH, а на мутации на PTCH1 (загуба на функция на супресор) или SMO (активиране на онкоген). При спорадичен БЦК в 90% от случаите с SHH-активиране има мутация на PTCH1, а в 5% – на SMO.¹³ От генетичните наследствени болести от най-голямо значение са базалноклетъчен невоиден синдром (BCNS) и XP. Синдромът на Gorlin-Goltz (BCNS) е автозомно-доминантно унаследяване на мутация в единия аел на PTCH1 на хромозома 9q22-31.¹⁵⁻¹⁷ Проявява се с множествени БЦКи, одонтогенни кисти, калцификация на falx cerebri, трапчинки по длани и ходила и рядко – кисти в мозък и други органи, както и риск от поява на медулобластом в детска възраст. При XP се появяват както ПККи, така и БЦКи.¹⁸ Разработени са инхибитори на Hedgehog сигналния път (HH-инхибитори или SMO-антагонисти), които алостерично блокират SMO-сигналния път, независимо от мутация.^{19, 20}

Аналитични методи за изследване. Лабораторното установяване на мутациите става чрез цялостно генетично секвениране или секвениране от ново поколение (NGS).

Доказателства за предиктивно значение. Тъй като 90% от БЦКи имат НН-мутация, тя не е от прогностично значение. Изключение е BCNS поради съпътстващите усложнения. Мутациите имат висока предиктивност за успешното таргетиране с НН-инхибитори. След лабораторни опити с циклопамин (растителен алкалоид, причиняващ тежки малформации на плода поради блокиране на Hedgehog-сигналния път) бяха разработени няколко НН-инхибитора, два от които са вече с регистрация (FDA и EMA) като SMO-антагонисти: *vismodegib* и *sonidegib* на база на фаза II проучвания (Erivance и Bolt). Ефикасността, безопасността и поносимостта на двата агента са сходни: обек-

тивна степен на отговор (OCO) – 47.6% при авансирал БЦК и 33.3% – за метастатичен. Медианната продължителност на отговора е 9.5 месеца. При BCNS туморното повлияване е над 85%.^{19, 20} В България е регистриран само *vismodegib*. Контрол над болестта се постига в над 80% от случаите. Причина за липса на туморно повлияване е поява на резистентност, първична или придобита, която най-често се дължи на SMO-мутации, които възпрепятсват блокажа на SMO-антагонисти, или амплификация на Gli.²¹ При постигане на най-добър отговор се проучва ефикасността от оперативно лечение, т.е. таргетната терапия има неоадювантен характер (Vismoneotrial).²² При резистентност се разработват нови комбинации с *Itraconazole*, арсениев оксид, както и комбинация на *vismodegib* с анти-PD-1-антитела.²³

В

При нерезектабилен или метастатичен базоцелуларен карцином, включително и при синдром на *Gorlin-Goltz*, невъзможен за хирургичен контрол (BCNS), се препоръчва лечение със SMO-антагонисти (*vismodegib*, *sonidegib*), независимо от вида на мутации в *Hedgehog*-сигналния път.



- При нерезектабилен и метастатичен базоцелуларен карцином не се налага рутинно изследване на мутации на *PTCH1* и SMO.
- Тъй като почти при всички пациенти, повлияли се от SMO-антагонисти, се появява рецидив на болестта, трябва предварително да се обмисли оперативно лечение при постигане на най-добър отговор или при първа поява на рецидив.

ЛИТЕРАТУРА

1. Валерианова З. и сътр. Заболеваемост от рак в България – 2013. София, 2015
2. Grossman D, Leffell DJ. Squamous cell carcinoma. In: Freedberg IM, Eisen AZ, Wolff K, Austen KE, Goldsmith LA, Katz SI, editors. Fitzpatrick's dermatology in general medicine, sixth edition. New York, McGraw Hill, 2004: pp. 737-747
3. Emmert S, Schön MP, Haenssle HA. Molecular biology of basal and squamous cell carcinomas. *Adv Exp Med Biol* 2014; 810: 234-252
4. Gibney GT, et al. Paradoxical oncogenesis and the long term consequences of BRAF inhibition in melanoma. *Nat Rev Clin Oncol* 2013; 10 (7): 390-399
5. Rosso S, et al. The multicentre south European study 'Helios'. II: Different sun exposure patterns in

- the aetiology of basal cell and squamous cell carcinomas of the skin. *Br J Cancer* 1996; 73: 1447-1454
6. Kricker A, Armstrong BK, English DR, Heenan PJ. Does intermittent sun exposure cause basal cell carcinoma? A case-control study in Western Australia. *Int J Cancer* 1995; 60: 489-494
 7. Thompson SC, Jolley D, Marks R. Reduction of solar keratoses by regular sunscreen use. *N Engl J Med* 1993; 329: 1147-1151
 8. Pandeya N, Purdie DM, Green A, Williams G. Repeated occurrence of basal cell carcinoma of the skin and multifailure survival analysis: follow-up data from the Nambour Skin Cancer Prevention Trial. *Am J Epidemiol* 2005; 161: 748-754
 9. van der Pols JC, Williams GM, Pandeya N, et al. Prolonged prevention of squamous cell carcinoma of the skin by regular sunscreen use. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006; 15: 2546-2548
 10. Elia D, Madhala D, Ardon E, et al. Sonic hedgehog promotes proliferation and differentiation of adult muscle cells: involvement of MAPK/ERK and PI3K/Akt pathways. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1773: 1438-1446
 11. Gailani M, Stahle-Backdahl M, Leffell D, et al. The role of the human homologue of *Drosophila* patched in sporadic basal cell carcinomas. *Nat Genet* 1996; 14: 78-81
 12. Xie J, et al. Activating Smoothed mutations in sporadic basal-cell carcinoma. *Nature* 1998; 391: 90-92
 13. Reifemberger J, et al. Somatic mutations in the PTCH, SMOH, SUFUH and TP53 genes in sporadic basal cell carcinomas. *Br J Dermatol* 2005; 152: 43-51
 14. Lindstrom E, Shimokawa T, Toftgard R, Zaphiropoulos PG. PTCH mutations: distribution and analyses. *Hum Mutat* 2006; 27: 215-219
 15. Johnson RL, et al. Human homolog of patched, a candidate gene for the basal cell nevus syndrome. *Science* 1996; 272: 1668-1671
 16. Nikolaou V, et al. Hereditary nonmelanoma skin cancer. *Semin Cutan Med Surg* 2012; 31 (4): 204-210
 17. Klein RD, Dykas DJ, Bale AE. Clinical testing for the nevoid basal cell carcinoma syndrome in a DNA diagnostic laboratory. *Genet Med* 2005; 7: 611-619
 18. Bodak N, et al. High levels of patched gene mutations in basal-cell carcinomas from patients with xeroderma pigmentosum. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 5117-5122.
 19. Sekulic A, Migden MR, Oro AE. Efficacy and safety of vismodegib in advanced basal-cell carcinoma. *N Engl J Med* 2012; 366: 2171-2179
 20. Migden MR, et al. Treatment with two different doses of sonidegib in patients with locally advanced or metastatic basal cell carcinoma (BOLT): a multicentre, randomised, double-blind phase 2 trial. *Lancet Oncol* 2015; 16 (6): 716-728
 21. Wahid M, Jawed A, Dar SA, et al. Differential pharmacology and clinical utility of sonidegib in advanced basal cell carcinoma. *Oncol Targets Ther* 2017; 10: 515-520
 22. Leiterer U, et al. A phase II, single-armed, multicenter trial of neoadjuvant vismodegib in patients with large and/or recurrent basal cell carcinoma: NICCI. *J Clin Oncol* 2014; 32: 5s (Suppl; Abstr. TPS9116)
 23. Peris K. Hedgehog inhibitors in advanced BCC. 13-th EADO Congress, Athens 3-6th May 2017

1.19.2.2. МСРyV-експресия

Красимир Киров, Мариела Василева

Молекулярна биология. *Merkel*-клетъчният карцином (МКК) е рядка злокачествена болест с бързо увеличаваща се заболяемост. Въпреки че се приема за невроендокринен тумор, произходът на туморните клетки е спорен, като се предполага, че може да произхождат от епидермални стволови клетки.¹⁻⁶ През 2008 г. се установи, че в Европа, Сащ и Япония 80% от случаите се причиняват от полиома вирус (МСРyV-позитивни), докато в Австралия вирус-позитивни са само 40%, а и за останалите МСРyV-негативни се приема, че основен етиологичен агент са ултравиолетови лъчи (УВА).⁷ При МКК с МСРyV-позитивност се установява висок титър на антитела срещу вируса и по-добра прогноза на болестта – с по-дълъг период до прогресия.⁸ Вирусът не е трансмисионен, което се дължи на неговото интегриране в генома на клетката по моноклонален начин; вирусният голям Т-антиген (LTA) има мутации, които възпрепятстват неговата репликация и играе роля на супресор.⁹ Напоследък МСРyV е класифициран от IACR като карциноген клас 2а.¹⁰ Вирусният малък Т-антиген (STA) е необходим за туморна пролиферация чрез повишена експресия на *PDGFR*-alfa и *KIT* и активиране на сигналния път РТI3/mTOR/AKT.^{11, 12, 14} От *in vitro* модели се предполага, че експресията на цялата дължина на LTA е способна да прекъсне стабилността на клетъчния геном и да активира мутагенния ензим АРОВЕСЗВ, както при други онкогенни вируси като HPV.¹³ По отношение на мутацион-

ния статус се установи, че МКК МСРyV-негативен (УВА-индуциран) има многократно повече мутации (1124 на екзом), предимно с УВ-сигнатура, отколкото МСРyV-позитивен (12 на екзом).¹⁵ Въпреки малкият брой мутации, те са достатъчно имуногенни, за да предизвикат имунен отговор и да бъдат обект на имунотерапия.¹⁶

Аналитични методи за изследване. Вирусният причинител на МКК – МСРyV се открива с RT-PCR.⁷

Доказателства за предиктивно значение. В нерезектабилен стадий III и IV при пациентис МКК все още основно системно лечение е платина-базирана химиотерапия. За съжаление, след 2-3 цикъла болестта прогресира и не се установява промяна в преживяемостта.¹⁸ Поради повишена експресията на *PDGFR* и *KIT* се изпробва таргетна терапия с *imatinib*, при която са описани успехи¹⁹, но те не се потвърждават в клинични проучвания²⁰. Най-голям успех засега е постигнат чрез имунотерапията с анти-PD-1/PD-L1-антитела. През март 2017 г. Американската Агенция за храни и лекарства (FDA) регистрира *avelumab* за втора линия след химиотерапия при дисеминирана болест на база на резултатите от фаза II проучване.²¹ Постигнат е туморен отговор в 33% както при PD-L1-позитивни, така и при PD-L1-негативни, както при МСРyV-позитивни, така и при МСРyV-негативни, въпреки че резултатите са най-добри при PD-L-позитивни/МСРyV-позитивни. С първа линия *pemrolizumab* има фаза II проучване и резултатите са още по-добри – туморен отговор в 56%.²²

C

- При метастатичен *Merkel*-клетъчен карцином засега не се препоръчва рутинно тестване на МСРγV-статус за избор на системна терапия.
- След прогресия на платина-базирана химиотерапия за втора линия системна терапия се препоръчва анти-PD-1-имунотерапия с *avelumab*, независимо от PD-L1/МСРγV-статус.

D

При авансирал *Merkel*-клетъчен карцином като първа линия може се обсъжда имунотерапия с *pembrolizumab*.



Засега системното лечение на *Merkel*-клетъчния карцином е платина-базирана химиотерапия.

ЛИТЕРАТУРА

1. Becker JC. Merkel cell carcinoma. *Ann Oncol* 2010; 21 (Suppl. 7): vii81-85
2. Akhtar S, Oza KK, Wright J. Merkel cell carcinoma: report of 10 cases and review of the literature. *J Am Acad Dermatol* 2000; 43 (5 Pt 1): 755-767
3. NCCN Guidelines. Merkel cell carcinoma, 2017, Version 1.0. Available at: www.nccn.org
4. Agelli M, Clegg LX. Epidemiology of primary Merkel cell carcinoma in the United States. *J Am Acad Dermatol* 2003; 49 (5): 832-834
5. Heath M, Jaimes N, Lemos B, et al. Clinical characteristics of Merkel cell carcinoma at diagnosis in 195 patients: the AEIOU features. *J Am Acad Dermatol* 2008; 58: 375-381
6. Andea AA, Coit DG, Amin B, Busam KJ. Merkel cell carcinoma: histologic features and prognosis. *Cancer* 2008; 113 (9): 2549-2558
7. Feng H, Shuda M, Chang Y, Moore PS. Clonal integration of a polyomavirus in human Merkel cell carcinoma. *Science* 2008; 319 (5866): 1096-1100
8. Touzé A, Le Bidre E, Laude H. High levels of antibodies against merkel cell polyomavirus identify a subset of patients with merkel cell carcinoma with better clinical outcome. *J Clin Oncol* 2011; 29 (12): 1612-1619
9. Shuda M, Feng H, Kwun HJ, et al. T antigen mutations are a human tumor-specific signature for Merkel cell polyomavirus. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2008; 105 (42): 16272-16277
10. Agents Classified by the IARC Monographs, Volumes 1-118
11. Houben R, Shuda M, Weinkam R, et al. Merkel cell polyomavirus-infected Merkel cell carcinoma cells require expression of viral T antigens. *J Virol* 2010; 84: 7064-7072
12. Starrett GJ. Merkel cell polyomavirus exhibits dominant control of the tumor genome and transcriptome in virus-associated merkel cell carcinoma. *Bio* 2017; 8(1): e02079-16
13. Li J, Wang X, Diaz J, et al. Merkel cell polyomavirus large T antigen disrupts host genomic integrity and inhibits cellular proliferation. *J Virol* 2013; 87: 9173-9188

14. Swick BL, Srikantha R, Messingham KN. Specific analysis of KIT and PDGFR-alpha expression and mutational status in Merkel cell carcinoma. *J Cutan Pathol* 2013; 40 (7): 623-630
15. Gohetal G. Mutational landscape of MCPyV-positive and MCPyV-negative Merkel cell carcinomas with implications for immunotherapy. *Oncotarget* 2016; 7 (3): 3403-3415
16. Cohen PR, Tomson BN, Elkin SK, et al. Genomic portfolio of Merkel cell carcinoma as determined by comprehensive genomic profiling: implications for targeted therapeutics. *Oncotarget* 2016; 7: 23454-23467
17. Merkel cell carcinoma. NCCN guidelines Version 1.0 2017. Available at: www.nccn.org
18. Bhatia S, et al. Adjuvant radiation therapy and chemotherapy in Merkel cell carcinoma: Survival analyses of 6908 cases from the National Cancer Data Base. *J Natl Cancer Inst* 2016; 108 (9). doi: 10.1093/jnci/djw042
19. Loader DE, Feldmann R, Baumgartner M, et al. Clinical remission of Merkel cell carcinoma after treatment with imatinib. *J Am Acad Dermatol* 2013; 69 (4): e181-183
20. Samlowski WE, Moon J, Tuthill RJ, et al. A phase II trial of imatinib mesylate in merkel cell carcinoma (neuroendocrine carcinoma of the skin): A Southwest Oncology Group study (S0331) *Am J Clin Oncol* 2010; 33 (5): 495-499
21. Kaufman HL, et al. Avelumab in patients with chemotherapy-refractory metastatic Merkel cell carcinoma: a multicentre, single-group, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol* 2016; 17 (10): 1374-1385
22. Nghiem PT, et al. PD-1 Blockade with pembrolizumab in advanced Merkel-cell carcinoma. *N Engl J Med* 2016; 374: 2542-2552

1.20. ПРЕДИКТИВНИ БИОМАРКЕРИ ПРИ САРКОМ НА EWING

1.20.1. EWSR1-ETS-транслокация

Драга Тончева

Молекулярна биология. Хромозомната транслокация t(11;22)(q24;q12) е водещо генетично нарушение при 85% от саркомите на *Ewing*. Тя засяга два гена: *EWSR1* и *FLI1*, които образуват фузионен ген. Генът *EWSR1* е локализиран върху хромозома 22q12.2, структурата му включва 17 екзони и произвежда 20 транскрипти (сплайс варианти) в резултат на алтернативен сплайсинг.^{1,2} Идентифицирани са псевдогени, локализирани на хромозоми 1 и 14. Първите седем екзони на *EWSR1* кодират N-терминален домейн, а екзони 11, 12 и 13 кодират RNA-свързващ домейн. N-терминалният домейн на gena участва в хромозомна транслокация, специфично регулира активното свързване на РНК и транскрипционната активност на химерния протеин. Протоонкоген *FLI1* е локализиран на 11q24.3 хромозомен район; генът кодира транскрипционен фактор, съдържащ ДНК-свързващ домейн, и играе съществена роля в ембриогенезата, развитието на кръвоносните съдове и мегакариопоезата. В резултат на хромозомно преустройство t(11;22)(q24;q12) генът *EWS* се транслоцира от 22 върху 11 хромозома; това води до образуване на фузионен онкоген *EWS-FLI1*, съдържащ в 5'-края части от gena *EWSR1*, а в 3'-края – част от *FLI1*. Фузионният ген кодира абнормен онкогенен транскрипционен фактор *EWS-FLI1*, който представлява водеща мутация за малигнена трансформация на клетките, тъй като регулира експресия на много таргетни гени. Той се открива при 80-90% от случаите със сарком на *Ewing*. Линиите на прекъсване най-често засягат интроните на двата гена и варират по локализация. В ген *EWSR1* районът с най-много прекъсвания (BCR, breakpoint cluster region) е малък (около 5 kb), но е локализиран в

интрони 7 или 8 и рядко – в 10.^{9,10} В *FLI1*-ген BCR е по-голям (над 30 kb) и се намира в екзони 4-9. В зависимост от линията на прекъсване *EWS/FLI1*-генът има два типа: (i) тип 1 фузионен ген (известен като 7/6), състоящ се от екзони 1-7 на *EWSR1*, свързани с екзони 6-9 на *FLI1*-ген; среща се при 60% от случаите; (ii) тип 2 фузионен ген (известен като 7/5), който е рядък и съдържа екзони 1-7 на *EWSR1*, скачени с екзони 5-9 на *FLI1*-ген, и е идентифициран при 25% от случаите. По-нови проучвания показват, че хромозомната транслокация генерира, освен основния фузионен ген *EWS-FLI-1*, и допълнителен ген *FLI-1-EWS*, който може впоследствие да се загуби. Фузионният ген тип 1 асоциира с много по-добра прогноза от другите типове, вероятно поради по-слаба активност на химерния транскрипционен фактор 21. Онкогенният потенциал на фузионния ген *EWS-FLI-1* се дължи на ролята му да индуцира или подтиска таргетни гени (*DAX-1*, *GLI1*, *CCK*, *FOX*, *LOX*), които се явяват интересни мишени за разработване на нови таргетни терапии. Все още молекулярната патогенеза на саркома на *Ewing* не е задълбочено проучена и новостите в тази област биха могли да доведат до по-специфична и по-малко токсична терапия.

Освен най-честата транслокация t(11;22)(q24;q12), срещат се и други транслокации, при които *EWSR1* се свързва с много други партниращи гени от фамилията ETS (E-twenty-six) на транскрипционни фактори.³⁻¹⁰

Аналитични методи за изследване. Хромозомната транслокация t(11;22)(q24;q12) се диагностицира чрез цитогенетичен анализ. Други две техники – RT-PCR и FISH – се използват за откриване на транслокации при тумори, включително при саркоми. Те са допълващи и лабораториите следва да използват и двете технологии, тъй като всяка от тях има ограничения. Специфичните FISH-тестове не идентифицират генния парт-

нър в транслокацията и с тях не може да се постави окончателна диагноза. Тестване чрез RT-PCR може да идентифицира генния партньор и да осигури диагнозата, но тази техника също има недостатъци.¹¹

Доказателства за предиктивно значение. Много туморни клетки експресират тумор-специфични антигени, като EWS-FLI-1-протеин: при сарком на *Ewing*, примитивен невроектодермален тумор (PNET), естезионевробластом и тумор на *Askin*. Те са известни като тумори от фамилия на сарком на *Ewing* (ESFTs) и за тях е характерна транслокация *EWS-FLI1*. По правило ESFTs са сред най-агресивните тумори в детска

възраст. Имуноterapiaта е обещаващ подход за лечение, насочено срещу атрактивна мишена EWS-FLI-1. Направени са първи опити за таргетна терапия във фаза II рандомизирано клинично проучване на терапия с *ganitumab* (IGF-1R-човешко моноклонално антитяло) в комбинация с химиотерапия (*vincristine*, *doxorubicin*, *cyclophosphamide*, *ifosfamide* и *etoposide*) при пациенти с новодиагностициран метастатичен сарком на *Ewing* (AEWS1221/NCT02306161).¹² Допуска се, че комбинацията от таргетни агенти (IGF-1R) и конвенционална химиотерапия може да понижи ефективната доза на лечение и химиотерапия и да минимизира страничните ефекти.

C

- При сарком на *Ewing* се препоръчва изследване на хромозомна транслокация $t(11;22)(q24;q12)$ и на образувания специфичен фузионен ген *EWS-FLI1* при необичайна кликопатологична изява или затруднения в хистологичната диагноза.
- За изследване на $t(11;22)(q24;q12)$ може да се използва цитогенетичен анализ, а за специфичния фузионния ген *EWS-FLI1* – RT-PCR или FISH.



При пациенти с тумори от фамилията на сарком на *Ewing* фузионният ген *EWS-FLI1* не е предиктивен маркер.

ЛИТЕРАТУРА

1. Noujaim J, Jones R, Swansbury J, et al. The spectrum of EWSR1-rearranged neoplasms at a tertiary sarcoma centre; assessing 772 tumour specimens and the value of current ancillary molecular diagnostic modalities. *Br J Cancer* 2017; 116 (5): 669–678.
2. Brohl AS, Solomon DA, Chang W, et al. The genomic landscape of the Ewing Sarcoma family of tumors reveals recurrent STAG2 mutation. *PLoS Genet* 2014; 10 (7): e1004475. doi: 10.1371/journal.pgen.1004475. eCollection 2014 Jul.
3. hulman SC, Katzenstein H, Bridge J, et al. Ewing sarcoma with 7;22 translocation: three new cases and clinicopathological characterization. *Fetal Pediatr Pathol* 2012; 31 (6): 341-348
4. Delattre O. Ewing's tumours, genetic and cellular aspects. *Pathol Biol (Paris)*. 2008 Jul;56(5):257-9. doi: 10.1016/j.patbio.2008.03.005. *Epub* 2008 May 15. French.
5. Ng TL, O'Sullivan MJ, Pallen CJ, et al. Ewing sarcoma with novel translocation $t(2;16)$ producing an in-frame fusion of FUS and FEV. *J Mol Diagn* 2007; 9 (4): 459-463

6. Lewis TB, Coffin CM, Bernard PS. Differentiating Ewing's sarcoma from other round blue cell tumors using a RT-PCR translocation panel on formalin-fixed paraffin-embedded tissues. *Mod Pathol* 2007; 20 (3): 397-404
7. Braunreiter CL, Hancock JD, Coffin CM, et al. Expression of EWS-ETS fusions in NIH3T3 cells reveals significant differences to Ewing's sarcoma. *Cell Cycle* 2006; 5 (23): 2753-2759
8. Fuchs B, Inwards CY, Janknecht R. Diagnostic significance and clinical applications of chimeric genes in Ewing's sarcoma. *Biol Pharm Bull* 2003; 26 (5): 585-588
9. Kojima T, Asami S, Chin M et al. Detection of chimeric genes in Ewing's sarcoma and its clinical applications. *Biol Pharm Bull* 2002; 25 (8): 991-994
10. Im YH, Kim HT, Lee C, et al. EWS-FLI1, EWS-ERG, and EWS-ETV1 oncoproteins of Ewing tumor family all suppress transcription of transforming growth factor beta type II receptor gene. *Cancer Res* 2000; 60 (6): 1536-1540
11. Urano F, Umezawa A, Yabe H, et al. Molecular analysis of Ewing's sarcoma: another fusion gene, EWS-E1AF, available for diagnosis. *Jpn J Cancer Res* 1998; 89 (7): 703-711
12. Desmaze C, Brizard F, Turc-Carel C, et al. Multiple chromosomal mechanisms generate an EWS/FLI1 or an EWS/ERG fusion gene in Ewing tumors. *Cancer Genet Cytogenet* 1997; 97 (1): 12-9.

2

Предиктивни биомаркери при тумори без значение за хистогенеза/локализация (агностични тъкан/място)



ПРЕДИКТИВНИ БИОМАРКЕРИ ПРИ ТУМОРИ БЕЗ ЗНАЧЕНИЕ
ЗА ХИСТОГЕНЕЗА/ЛОКАЛИЗАЦИЯ (АГНОСТИЧНИ ТЪКАН/
МЯСТО)

2.1. MSI/MMR

Савелина Поповска

Молекулярна биология. Някои екзогенни агенти увреждат ДНК, променяйки химичната ѝ структура и поотискайки активността на ДНК-полимеразата. Мутациите могат да възникнат и спонтанно чрез деаминиране на бази или увреди от активни кислородни радикали, нарушаващи целостта на ДНК. Съществуват различни механизми за възстановяване на ДНК-увреди, настъпили в резултат от грешки на репликация или външни въздействия. Малка част от ДНК-мутациите се дължат на грешки при репликация. В основата на точността на този процес стои специфичното сдвояване на нуклеотидни бази чрез ДНК-полимераза и корекция на погрешно инкорпорирани бази. Точността е опосредствана от специализирани белтъци и пострепликационен контрол, извършвани чрез механизъм за възстановяване на несъответствията в ДНК (DNA mismatch repair -MMR). Репликацията на увредена ДНК се извършва чрез „избягване“ на увредените участъци (damage avoidance) или чрез транслезионен синтез (translesion synthesis-TLS). Процесът на „избягване“ на увредените участъци има за цел да осигури репликация от повреден шаблон, като същевременно полимеразата избягва репликация на увредени участъци и извършва пострепликационно рекомбинантно възстановяване или прекъсване на увредените ДНК-вериги с последващо възстановяване на

ДНК. Транслезионният синтез изисква полимеразата да „прочете“ повредените бази за сметка на репликационната точност, като често този механизъм стои в основата на репликационни грешки.¹

Механизми за възстановяване на ДНК. Поддържането на генетичната стабилност на клетката изисква едновременното действие на няколко различни механизма на възстановяване на увредената ДНК: (1) възстановяване с изрязване на бази (BER); (2) възстановяване на несъответствията в ДНК (DNA mismatch repair, MMR). Системата за поправка на неправилно сдвоени бази на ДНК (MMR) е механизъм за възстановяване на ДНК-последователността след настъпване на грешки при ДНК-репликация, рекомбинация или ятрогенни увреди.^{2,3} Този процес подобрява точността на ДНК-синтезата 100-1000 пъти и допълва репаративните свойства на репликативните ДНК-полимерази, намалявайки общата мутационна честота до една грешка на 1010 синтезирани нуклеотиди.¹ В процеса на коригиране на несъответстваща ДНК участват и различни MMR протеини: MLH1, PMS2, MSH2, MSH6, MLH3, MSH3, PMS1 и Exo1.⁴ За разпознаване на несъответствията MSH2-протеинът образува хетеродимер с MSH6 или MSH3 (Mut S) – MSH2/MSH6 и MSH2/MSH3 – според вида на лезията, която трябва да бъде поправена. MSH6 е необходим за корекция на единични базови грешки, докато MSH3 и MSH6 участват в корекции на грешки от типа инсерции-делеции (IDLs). Хетеродимерът на MLH1 и PMS2 [(Mut L)-MLH1/PMS2] координира взаимодействието между комплекса за разпознаване на несъответствията и други протеини, необходими за MMR, които включват екзонуклеаза 1 (Exo1), хеликаза, ядрен антиген на пролифериращи клетки (PCNA), едноверижна ДНК (RPA) и ДНК-полимерази δ и ε. MLH1 може да хетеродимеризира с два допълнителни протеина – MLH3 и PMS1 (MLH1/MLH3 и MLH1/PMS1). PMS2-протеинът е необходим за коригиране на еднобазови несъот-

ветствия, PMS2 и MLH3 допринасят за коригиране на IDLs, докато ролята на PMS1 в MMR изисква по-нататъшни проучвания.

След първоначалното откриване на грешки на репликация от хетеродимерите MSH2/MSH6 (Mut α) и MSH2/MSH3 (Mut β) MLH1/PMS2-комплексът разкъсва селектирания сегмент и инициира ресинтез на ДНК. Обикновено MSH6-експресията е 10 пъти по-висока от тази на MSH3, което води до съотношение Mut α :Mut β около 10:1. Системата на MMR участва и в регулация на клетъчното делене и p53-зависимия апоптотичен отговор на различни ДНК-увреждания.⁵ По този начин дефицитът на MMR (dMMR) води до невъзможност за елиминиране на увредени клетки, а дефектите в механизма на MMR рефлектират в увеличаване на мутационната честота (мутантен фенотип)⁶ и участват в патогенезата на наследствен и спорадичен карцином с различна локализация.¹ Четири гена кодират белтъците, които регулират MMR-механизма: mutL хомолог 1 (MLH1), mutS хомолог 2 (MSH2), mutS хомолог 6 (MSH6) и PMS2. Биалелното инактивиране на един от тези гени (поради соматична или герминативна мутация или епигенетично подтискане на експресията им) водят до дефицит в MMR-системата за възстановяване (dMMR), свързан с повишено натрупване на мутации в генома на клетките.⁷

Микросателити и микросателитна нестабилност (MSI). Микросателитите са къси повторени ДНК-последователности с дължина, варираща от 1 до 6 бази, които се срещат като би- или мононуклеотиди (~3% от генома)⁸ както в кодиращи, така и в некодиращи региони⁷. Те са високо полиморфни в популацията, но стабилни в рамките на индивида.⁹ Поради своя състав от повтарящи се бази и широко разпространение тези ДНК-секвенции са особено чувствителни на грешки поради неправилно

сдвояване на бази. Дефицитът на MMR системата (dMMR) води до промяна в дължината на микросателитите, което се приема като мутации.^{10,11} Тумори с MSI в следствие на dMMR могат да се проявят с високо нестабилен MSI-H (high) фенотип^{10,11}, който „подслонява“ множество мутации и от своя страна, стимулира имунната система^{12,13}. Микросателитните маркери показват генетична нестабилност (MSI), която може на се дължи на герминативна или соматична инактивация на MMR-гените. Морфологично MSI-H-туморите съдържат високи нива на лимфоцитни инфилтрати и експресия на имунни чекпойнт-протеини PD-1 и PD-L1.¹³ При колоректален MSI-H-карцином (КРК) доминиращ източник на PD-L1 могат да бъдат макрофаги или други тумор-инфилтриращи лимфоцити и миелоидни клетки, а не туморни клетки.¹³ По правило dMMR/MSI-H се среща при редица карциноми в стадии I-IV: според публикувани изследвания се идентифицира при КРК в 13% от популацията, при карцином на ендометриум – от 22% до 33%, в 5% или по-малко – при карцином на пикочен мехур, гърда, панкреас, простата, бъбречноклетъчен карцином, сарком и с неуточнена честота – при други типове карциноми (билиарен, езофагеален, стомашен и т.н.).¹³ Съвременните препоръки за диагностика на карциноми на дебело черво, ректум и ендометриум препоръчват рутинно изследване за dMMR/MSI-H.¹⁴

Аналитични методи за изследване. С метода на имунохистохимията (ИХХ) се изследва ядрена експресия на четири MMR-протеина – MLH1, PMS2, MSH2 и MSH6, които *in vivo* формират хетеродимерите MLH1/PMS2 и MSH2/MSH6. При мутация на MLH1 или MSH2 съответно настъпва разграждане на протеиновия продукт и липса на имунооцветяване на техните двойки (PMS2 и MSH6). Абнормното ИХХ-изследване с комерсиални антитела и валидирани системи е в строга корелация с PCR-базираното изследване на MSI статус (> 90%).¹⁵ По правило ИХХ-изследване се извършва на мате-

риали от фиксирани в 10% буфериран формалин и включени в парафин тъкани от карцином. При липса на едновременна експресия на четирите протеина в туморната тъкан и във вътрешната контрола би следвало да се подозират проблеми в преданалитичната фаза – фиксация и загуба на имуногенност на антигена. За правилна интерпретация на резултатите е необходимо в изследваните тъкани да е налична нормална и туморна компонента. Чувствителността на IXX-техника за изследване на протеини на MMR е > 90% за MSI-H-тумори и по-ниска при MSI-L-тумори. Специфичността е висока за MSH2- и MSH6-мутации и по-ниска за MLH1 (хиперметилация) и PMS2.¹⁶⁻¹⁹

Интерпретацията на резултатите от IXX-изследване на протеини на MMR се извършва по следния алгоритъм: (i) отчита се ядрена експресия на съответните протеини; (ii) препоръчително е резултатите да се интерпретират като: нормална и абнормна находка; (iii) резултатите се интерпретират само при позитивна вътрешна контрола – ядрена експресия в нормален епител, лимфоцити, стромални клетки или външна контрола от тонзила; (iv) за нормална се приема ядрена експресия в над 5% от туморните клетки, дори и при наличие на хетерогенно имунооцветяване; (v) за абнормна се приема липсата на ядрена експресия в туморните клетки при позитивна вътрешна контрола; (vi) за dMMR се приемат тумори с абнормна експресия – липсващо имунооцветяване на един или повече от MMR-протеините; (vii) при абнормна експресия на MLH1 и PMS2 при пациенти с колоректален карцином се препоръчва изследване на *BRAF V600E* с оглед изключване на хиперметилация на MLH1 при спорадичен колоректален карцином.^{20,4} Метаанализ показва, че честотата на *BRAF*-мутации при спорадичен MLH1 MSI-колоректален карцином е 63.50%²¹, докато честотата им при карциноми, асоциирани със синдром на *Lynch*, е ($\leq 1\%$)²², което позволява прилагане на изследване за *BRAF*-мутации като скриниращ метод при MLH1 и MSI с цел избягване на излишно генетично

тестване при спорадичните КРК.⁵ По правило IXX-метод за доказване на експресия на MMR-протеини се използва паралелно с MSI PCR-изследване или самостоятелно с валидирани китове и участие във външен контрол. Молекулярно-генетично изследване на polyA-микросателити е най-подходящ избор на метод за директно откриване на MSI, което е доказателство за dMMR в даден тумор. От друга страна, IXX може да се използва като индиректен тест за dMMR, когато не е налична молекулярна лаборатория или като скриниращ тест за микросателитна нестабилност.

Молекулярните изследвания се извършват върху ДНК, изолирана от свежа, замразена или включена в парафин туморна тъкан с използване на PCR-базиран тест за откриване на MSI. Съществува референтен панел от микросателитни маркери, който включва два мононуклеотида (BAT25 и BAT26) и три динуклеотида (D2S123, D5S346 и D17S250), като статусът им трябва да бъде изследван и сравнен с ДНК, изолирана от нормална и туморна тъкан на пациента.²³ Най-висока специфичност и чувствителност се постига с използване на три или повече поли-А-мононуклеотидни маркери (BAT25, BAT26, NR-21, NR-22, NR-24, NR-27).⁷ Според резултатите се дефинират три различни субтипа: (i) MSI-high (MSI-H), ако два и повече микросателити показват нестабилност; (ii) MSI-low (MSI-L), ако само един маркер е нестабилен и (iii) MS-stable (MSS), ако всички изследвани маркери са стабилни.²³ Тези препоръки претърпяват развитие, като само MSI-H се смятат за истински MSI-тумори и само ако двата маркера са мононуклеотиди (поли-А-микросателити). Това довежда до използване на панел, включващ три или повече поли-А-маркери.²⁴ Промени в другите микросателити може да са свързани с по-генерализирана геномна нестабилност, а не с dMMR. Наличието на клинично-патологични разлики между MSI-L и MSS може да се дължи на вариабилни дефиниции и различни използвани MSI-маркери, така че често не може да се разграничи надеждно

MSI-L и хромозомна стабилност; това предполага, че тези тумори следва да се класифицират като един молекулен подтип – MSS-неоплазми.^{7, 24}

Доказателства за предиктивно значение. По правило ИХХ-тест е диагностична стратегия за изследване на експресията на MLH1-, MSH2-, MSH6- и PMS2-белтъци при пациенти със солидни авансирани тумори; определя се загуба на експресия на MLH1-, MSH2-, MSH6- и PMS2-белтъчните продукти. Ако и четирите маркера са позитивни, вероятността за dMMR-статус намалява, но не се редуцира напълно. Около 5% от туморите показват MSI при нормална белтъчна експресия на тези четири гена. Ефикасността на имунния чекпоинт-инхибитор *pembrolizumab* е оценена при пациенти със солидни тумори с доказана висока степен микросателитна нестабилност (MSI-H) или с дефицит в експресията на белтъци от системата на MMR (dMMR), участвали в едно от пет неконтролирани, отворени, мултикохортни, мултицентрични изпитвания с едно рамо.²⁵ MSI-H-типовете включват предимно КРК (n = 90) и други видове карциноми (n = 59) като ендометриален, билиарен, стомашен и карцином на гастроезофагеална връзка, на тънки черва, панкреас, гърда, простата, пикочен мехур, хранопровод, бъбрек, сарком, дребноклетъчен белодробен карцином и карцином на щитовидна жлеза. Идентификацията на MSI-H- или dMMR-туморен статус за повечето пациенти (135/149) е проспективно определен чрез използване на PCR-тестове в локални лабо-

ратории, за определяне на MSI-H-статус или ИХХ-тестове за dMMR.¹⁰ Четиринадесет от 149 пациенти са ретроспективно идентифицирани като MSI-H чрез тестване на туморни биопсии от общо 415 пациенти, използвайки PCR тест, извършен в централна лаборатория. Общо 47 пациенти са с dMMR-карцином, идентифициран с ИХХ, 60 са с MSI-H, идентифициран чрез PCR, и 42 са идентифицирани посредством двата теста. От 149 пациенти във всички изпитвания обективната степен на отговор (ОСО) е 39.6% (95% CI, 31.7-47.9), пълен отговор (ПО) е докладван при 7.4%, а частичен отговор (ЧО) – при 32.2% от пациентите.¹⁰ От 59 пациенти с потвърден ПО или ЧО средното потвърдено време до настъпване на отговора е 2.8 месеца.¹¹ Показателят ОСО е 36% (95% CI, 26-46) при подгрупа с авансирал MSI-H/dMMR КРК, а протичащата продължителност на отговора е 1.6+ до 22.7+ месеца. *Pembrolizumab* е одобрен от Американската Агенция за храни и лекарства (FDA) за лечение на възрастни и деца с нерезектабилни или метастатични (MSI-H) или dMMR-солидни тумори, прогресирали след предходно лечение и нямащи задоволителна терапевтична алтернатива, или КРК, прогресирал след лечение с флуоропиримидин, *oxaliplatin* и *irinotecan*. Тази индикация е одобрена от FDA по бърза процедура въз основа на туморния отговор и неговата продължителност. Безопасността и ефективността на *pembrolizumab* при педиатрична популация с MSI-H-карциноми на централната нервна система не е доказана.²⁵

В

- При авансирани солидни малигнени тумори на възрастни и деца, прогресирали след предходно лечение и без терапевтична алтернатива, независимо от хистогенеза/локализация на тумора, се препоръчва изследване на неоплазмата за микросателитна нестабилност MSI-H или дефицит в продуктите на MMR-системата (dMMR).
- При идентифициране на MSI-H- или dMMR-туморен статус, независимо от хистогенеза/локализация, се препоръчва обсъждане за последваща терапия с *pembrolizumab*.



- Имунохистохимията е достъпен, лесен и евтин метод за скрининг на dMMR, като интерпретирането на резултатите се извършва само при позитивна контрола: (i) отчита се строгото ядрено оцветяване на туморните клетки; (ii) за нормална се приема ядрена позитивност за всички четири MMR протеина над 5% от туморните клетки, т.е. туморът е MSS; (iii) за абнормна се приема липса на експресия най-малко на един MMR-протеин; (iv) липса на експресия на всички MMR-протеини насочва към евентуални грешки в преданалитична фаза.
- Стабилна (MSS), ниска MSI (MSI-L) и висока (MSI-H) микросателитна нестабилност (MSI) се дефинират като нестабилност съответно в 0, 1 или ≥ 2 маркери.

ЛИТЕРАТУРА

1. Shilpa V, Lakshmi K. Molecular mechanisms of mismatch repair genes in cancer – A brief review. *J Proteomics Genomics* 2014; 1 (1): 101
2. Sinicrope FA, Rego RL, Foster N, et al. Microsatellite instability accounts for tumor site-related differences in clinicopathologic variables and prognosis in human colon cancers. *Am J Gastroenterol* 2006; 101 (12): 2818-2825
3. Jass JR. Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features. *Histopathology* 2007; 50 (1): 113-130
4. Chen W, Swanson BJ, Frankel WL. Molecular genetics of microsatellite-unstable colorectal cancer for pathologists. *Diagn Pathol [Internet]* 2017; 12 (1). Available at: <http://diagnosticpathology.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13000-017-0613-8>
5. Ryan E, Sheahan K, Creavin B, Mohan HM, Winter DC. The current value of determining the mismatch repair status of colorectal cancer: A rationale for routine testing. *Crit Rev Oncol Hematol* 2017; 116: 38-57
6. Müller A, Fishel R. Mismatch repair and the hereditary non-polyposis colorectal cancer syndrome (HNPCC). *Cancer Invest* 2002; 20 (1): 102-109
7. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990; 61 (5): 759-767
8. Grenert J. Microsatellite Instability: The Basics for Pathologists.

9. Thibodeau SN, French AJ, Cunningham JM, et al. Microsatellite instability in colorectal cancer: different mutator phenotypes and the principal involvement of hMLH1. *Cancer Res* 1998; 58 (8): 1713-1718
10. Boland CR, Goel A. Microsatellite instability in colorectal cancer. *Gastroenterology* 2010; 138 (6): 2073-2087.e3
11. Li SKH, Martin A. Mismatch repair and colon cancer: Mechanisms and therapies explored. *Trends Mol Med* 201; 22 (4): 274-289
12. Le DT, Uram JN, Wang H, et al. PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency. *N Engl J Med* 2015; 372 (26): 2509-2520
13. Dudley JC, Lin M-T, Le DT, Eshleman JR. Microsatellite Instability as a Biomarker for PD-1 Blockade. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 2016; 22 (4): 813-820
14. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology 2017. In. Available at: https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/f_guidelines.asp
15. Rigau V, Sebbagh N, Olschwang S, et al. Microsatellite instability in colorectal carcinoma. The comparison of immunohistochemistry and molecular biology suggests a role for hMSH6 [correction of hMLH6] immunostaining. *Arch Pathol Lab Med* 2003; 127 (6): 694-700
16. Richman S. Deficient mismatch repair: Read all about it (Review). *Int J Oncol* 2015; 47 (4): 1189-1202
17. Funkhouser WK, Lubin IM, Monzon FA, et al. Relevance, pathogenesis, and testing algorithm for mismatch repair-defective colorectal carcinomas: a report of the association for molecular pathology. *J Mol Diagn JMD* 2012; 14 (2): 91-103
18. Lindor NM, Burgart LJ, Leontovich O, et al. Immunohistochemistry versus microsatellite instability testing in phenotyping colorectal tumors. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 2002; 20 (4): 1043-1048
19. Mills AM, Longacre TA. Lynch syndrome screening in the gynecologic tract: Current state of the art. *Am J Surg Pathol* 2016; 40 (4): e35-44
20. Hashmi AA, Ali R, Hussain ZF, et al. Mismatch repair deficiency screening in colorectal carcinoma by a four-antibody immunohistochemical panel in Pakistani population and its correlation with histopathological parameters. *World J Surg Oncol* 2017;15(1). Available at: <http://wjso.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12957-017-1158-8>
21. Parsons MT, Buchanan DD, Thompson B, et al. Correlation of tumour BRAF mutations and MLH1 methylation with germline mismatch repair (MMR) gene mutation status: a literature review assessing utility of tumour features for MMR variant classification. *J Med Genet* 2012; 49 (3): 151-157
22. Lagerstedt Robinson K, Liu T, Vandrovцова J, et al. Lynch Syndrome (Hereditary nonpolyposis colorectal cancer) diagnostics. *JNCI J Natl Cancer Inst* 2007; 99 (4): 291-299
23. Venderbosch S, Nagtegaal ID, Maughan TS, et al. Mismatch repair status and BRAF mutation status in metastatic colorectal cancer patients: a pooled analysis of the CAIRO, CAIRO2, COIN, and FOCUS studies. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 2014; 20 (20): 5322-53230
24. Plazzer JP, Sijmons RH, Woods MO, et al. The InSiGHT database: utilizing 100 years of insights into Lynch syndrome. *Fam Cancer* 2013; 12 (2): 175-180.
25. Keytruda® US Prescribing Information
26. Kopetz S, Lonardi S, McDermott RS, et al. Concordance of DNA mismatch repair deficient (dMMR)/microsatellite instability (MSI) assessment by local and central testing in patients with metastatic CRC (mCRC) receiving nivolumab (nivo) in CheckMate 142 study. *J Clin Oncol* 2017 May; 35 (Suppl. 15): 3548-3548
27. Andre T, Lonardi S, Wong KYM, et al. Combination of nivolumab (nivo) + ipilimumab (ipi) in the treatment of patients (pts) with deficient DNA mismatch repair (dMMR)/high microsatellite instability (MSI-H) metastatic colorectal cancer (mCRC): CheckMate 142 study. *J Clin Oncol* 2017; 35 (Suppl. 15): 3531-3531

© Алексей Савов, Асен Дудов, Борис Петров, Галина Кирова, Димитър Калев, Драга Тончева, Иван Иванов, Ирена Костадинова, Красимир Киров, Мариела Василева, Милка Георгиева, Милчо Минчев, Павел Бочев, Павел Станимиров, Радка Кънева, Савелина Поповска, Светлана Христов, Соня Сергиева, Татяна Хаджиева, Тихомир Диков, Яна Бочева – автори, 2017

© Димитър КАЛЕВ – редактор, 2017

© Арт Трейсър ООД – издател, 2017

© www.more-conference.com – официален сайт, МОРЕ 2017

ПРЕДИКТИВНИ БИОМАРКЕРИ В ОНКОЛОГИЯТА **методи за изследване и клинично приложение**

Том I – СОЛИДНИ ТУМОРИ

клинично ръководство, основано на доказателства

Графично оформление: *Петър Желев*

Издател: Арт Трейсър ООД, Варна, ул. Любен Каравелов 79

Варна, 2017

ISBN 978-619-7094-34-3



9 786197 109434 3

Lilly



Сканирай, за да прочетеш
на мобилното си устройство

