

Wojciech P. Olszewski, Włodzimierz T. Olszewski

Zakład Patologii, Centrum Onkologii — Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie w Warszawie

Rola patomorfologa w doborze terapii ukierunkowanej na receptor czynnika wzrostu naskórka (EGFR) u chorych na nowotwory

The role of pathologist in cancer patients selection for EGFR-targeted therapy

Adres do korespondencji:

Dr med. Wojciech P. Olszewski
Zakład Patologii Centrum Onkologii
— Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie
ul. Roentgena 5, 02-781 Warszawa
e-mail: wppo@o2.pl

STRESZCZENIE

Leczenie celowane stało się w ostatniej dekadzie ważnym sposobem terapii chorych na raka. Potwierdzono skuteczność leków skierowanych przeciw receptorowi czynnika wzrostu naskórka (EGFR) i HER2, takich jak erlotynib, cetuksymab czy trastuzumab, a ich stosowanie obejmuje leczenie nowotworów płuca, przewodu pokarmowego i piersi. Wartość leków celowanych jest wypadkową działania leku i selekcji pacjentów do terapii. Leki celowane, jak wykazują wyniki badań, są skuteczne jedynie u części chorych na nowotwory danego typu histologicznego. Określenie czynnika predykcyjnego — informującego o potencjalnej odpowiedzi na leczenie — jest niezbędne w prawidłowym leczeniu celowanym. Selekcja pacjentów do tego typu terapii odbywa się w większości z wykorzystaniem metod patomorfologicznych wspomaganych technikami biologii molekularnej. Metody selekcji chorych i kryteria oceny czynników predykcyjnych oraz powiązanie ich z tradycyjnymi parametrami nowotworów (takimi jak typ histologiczny, stopień zaawansowania) są ciągle przedmiotem badań. W ostatnich latach, również dla chemioterapeutyków niezaliczanych do leków celowanych, próbuje się określić czynniki predykcyjne. Istotny wpływ na wartość poszczególnych czynników predykcyjnych ma wybór techniki ich określania.

Słowa kluczowe: czynniki predykcyjne, terapia celowana, patologia, biologia molekularna

ABSTRACT

Targeted therapy has become an important modality of cancer treatment in the last decade. Drugs against EGFR and HER2 e.g. erlotinib, cetuximab or trastuzumab proved its role in therapy. They are managed as registered and recommended modalities of lung, alimentary tract and breast carcinoma. Significance of targeted treatment is a common effect of drug action and patient selection. Only a part of patients with tumors belonging to a specific histological type of cancer can benefit from targeted therapy. Determining predictive factor — informing on potential response to therapy — is essential for proper treatment in targeted therapy. Patients' selection is accomplished by pathological methods with help of molecular biology techniques. Patient selection for targeted treatment and predictive factors evaluation criteria as well as establishing connections with traditional tumor characteristics (e.g. histological type, grade, stage) are continuously under research. Predictive factors are also investigated for traditional chemotherapeutics in recent years. Value of particular predictive factor depends on choice of evaluation method.

Key words: predictive factors, targeted therapy, pathology, molecular biology

Wstęp

Leczenie celowane stało się w ostatniej dekadzie ważnym sposobem terapii chorych na raka. Dotychczas najważniejszą rolę wśród terapii celowanej odgrywały leki skierowane przeciw czynnikom wzrostu naskórka (HER, *human epidermal receptors*). Zalicza się do nich zarówno receptory czynnika wzrostu naskórka (EGFR, *epidermal growth factor receptor*) (HER1), jak i HER2. Potwierdzono skuteczność leków skierowanych przeciw EGFR i HER2, takich jak erlotynib, cetuksymab czy trastuzumab, a ich stosowanie zarejestrowano do terapii nowotworów płuca, przewodu pokarmowego i piersi. Wartość leków celowanych jest wypadkową działania leku i selekcji pacjentów do leczenia. Tęgo typu leki, jak wykazują wyniki badań, są skuteczne jedynie u części chorych na nowotwory danego typu histologicznego. Określenie czynnika predykcyjnego — informującego o potencjalnej odpowiedzi na leczenie — jest niezbędne w prawidłowej terapii celowanej. Istnieją leki celowane, w przypadku których nie udało się ustalić czynnika predykcyjnego, np. bewacyzumab. Uważa się jednak, że znalezienie takiego czynnika zwiększyłoby skuteczność tego leku. Selekcja pacjentów do terapii celowanej odbywa się w większości z wykorzystaniem metod patomorfologicznych wspomaganych technikami biologii molekularnej. Metody selekcji chorych i kryteria oceny czynników predykcyjnych oraz powiązanie ich z tradycyjnymi parametrami nowotworów (takimi jak typ histologiczny, stopień zaawansowania) są ciągle przedmiotem badań. Istnieją dwie strategie selekcji do leczenia celowanego. Pierwsza, w której określa się czynnik związany z celem działania leku: białko receptorowe (receptory steroidowe, HER2, EGFR) lub gen kodujący to białko (geny *HER2*, *EGFR*). W ten sposób można wybrać pacjentów, którzy prawdopodobnie odniosą korzyść z leczenia. Druga strategia polega na wskazaniu tych chorych, którzy najprawdopodobniej nie odniosą korzyści z leczenia. Przykładem tego jest ocena obecności mutacji w genie *KRAS*, która dyskwalifikuje pacjentów z leczenia anty-EGFR.

Należy również podkreślić, że w ostatnich latach próbuje się określić czynniki predykcyjne także dla chemioterapeutyków niezaliczanych do leków celowanych.

Wydaje się, że wraz z poznawaniem nowych czynników predykcyjnych podział na tradycyjną chemioterapię i leczenie celowane będzie się zacierał.

Istotny wpływ na wartość poszczególnych czynników predykcyjnych ma wybór techniki ich określania. W przypadku raków płuca EGFR można określić immunohistochemicznie (IHC, *immunohistochemistry*), za pomocą technik hybrydyzacji *in situ* czy metody reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR, *polymerase chain reaction*). Każdy z tych sposobów, w tym konkretnym przykładzie, ma jednak inną wartość predykcyjną.

Ocena czynników predykcyjnych w raku płuca

Wprowadzenie

Przez wiele lat zadaniem patomorfologa w zakresie diagnostyki guzów płuca było mikroskopowe rozpoznanie raka płuca na podstawie biopsji (np. pobranej w czasie bronchoskopii) lub oceny materiału cytologicznego uzyskanego głównie drogą biopsji aspiracyjnej cienkoigłowej albo wymazu z oskrzela. W ocenie stopnia zaawansowania nowotworu i wyborze dalszego postępowania terapeutycznego wystarczające było określenie, czy jest to rak drobnokomórkowy czy niedrobnokomórkowy. Do raków niedrobnokomórkowych zaliczano gruczolakoraka, raka płaskonabłonkowego i wielkomórkowego, a także inne, rzadziej występujące typy histologiczne. Standardowym postępowaniem było odmienne określanie stopniowania zaawansowania i możliwości zastosowania chemioterapii w raku drobnokomórkowym oraz ewentualne leczenie operacyjne z następową radioterapią i chemioterapią w raku niedrobnokomórkowym (niezależnie od podtypu histologicznego).

Wprowadzenie nowych leków — terapii celowanej — stworzyło konieczność dokładnego określenia typu histologicznego i oznaczania markerów umożliwiających właściwy dobór chorych do leczenia.

Określenie typu histologicznego

W dotychczasowych, kolejnych klasyfikacjach Światowej Organizacji Zdrowia (WHO, *World Health Organization*) podstawą ustalenia rozpoznania, określania typu histologicznego nowotworu był obraz histologiczny i cytologiczny stwierdzany w barwieniu hematoksyliną i eozyną. Dodatkowo zalecano badanie histochemiczne na obecność śluzu (potwierdzenie litej postaci gruczolakoraka). Ustalenie typu histologicznego jest w pełni miarodajne w przypadkach badania histologicznego materiału pooperacyjnego. W około 30% raków płuca stwierdza się wielokierunkowe różnicowanie w obrębie guza. Z tego powodu ocena typu histologicznego na podstawie wycinka, a tym bardziej materiału cytologicznego, może być nieprecyzyjna.

Stosując dotychczasowe kryteria, można z prawie 100-procentową trafnością rozpoznać zarówno cytologicznie, jak i histologicznie raka drobnokomórkowego. Trafne rozpoznanie podtypów raka niedrobnokomórkowego w takim materiale jest utrudnione i jego częstość waha się w granicach 40–60%.

W ostatnim okresie zaleca się wprowadzanie do diagnostyki raka płuca badań immunohistochemicznych, które w wielu przypadkach mniej dojrzałych guzów pozwalają na określenie typu histologicznego, a czasem

również na potwierdzenie występowania pierwotnego raka płuca, a nie przerzutu. Do takiego badania można wykorzystać zarówno materiał tkankowy (wycinki pobrane w czasie bronchoskopii), jak też materiał cytologiczny, głównie aspiraty cienkoigłowe i wymazy z oskrzela. Podstawowy panel przeciwciał obejmuje: tarczycowy czynnik transkrypcyjny 1 (TTF1, *thyroid transcription factor 1*) (gruczolakorak) i p63 (rak płaskonabłonkowy). Panel uzupełniający to: CK 5/6, CK 7 i CK34β12.

Obecnie powinno się unikać określenia „rak niedrobnokomórkowy” i podać dokładny typ raka, a jeżeli nie jest to możliwe, wskazać prawdopodobny typ lub użyć określenia NOS (*not otherwise specified*).

Przeciwciało TTF1 jest ponadto pomocne w różnicowaniu nowotworu pierwotnego płuca i przerzutowego [1, 2].

Należy podkreślić, że badania immunohistochemiczne nie mają 100-procentowej czułości i specyficzności i wyniki tych testów nie zastępują standardowej oceny mikroskopowej, a jedynie ją uzupełniają.

Ocena markerów biologicznych z zastosowaniem technik immunohistochemicznych

Do terapii raków niedrobnokomórkowych wprowadzono leki, które blokują szlak sygnałowy receptora czynnika wzrostu EGFR. Zaistniała konieczność oceny, w którym typie nowotworu występuje zwiększona ilość receptora EGFR, wskazując jako potencjalnego beneficjenta takiej terapii. Zastosowano immunohistochemiczną ocenę ekspresji białka EGFR. Nie wypracowano jednak szczegółowej skali odczynu i ocenia się obecność ekspresji, a nie stopień nadekspresji, jak to się dzieje w ocenie immunohistochemicznej (IHC) receptora HER2 w raku piersi i raku żołądka. W wyniku takiej oceny każdy rak płuca, w którym stwierdzono ekspresję białka EGFR, uznawano klinicznie jako dodatni, a więc kwalifikujący się do leczenia przeciwciałami monoklonalnymi lub inhibitorami kinazy tyrozynowej. Tylko u nieznacznego odsetka tak wybranych pacjentów uzyskano odpowiedź na zastosowane leczenie. Dotychczasowe wyniki obserwacji klinicznych wskazują, że należy zaniechać rutynowego stosowania tego testu [3].

Ocena markerów biologicznych z zastosowaniem technik biologii molekularnej

Zdaniem wielu autorów w przypadku określenia stanu receptora HER2 w raku piersi oprócz oceny ekspresji białka HER2 — w celu doboru chorych do leczenia trastuzumabem lub lapatynibem — bardziej wiarygodnym testem jest badanie amplifikacji genu *HER2* metodą fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ*

(FISH, *fluorescent in situ hybridization*). Podjęto takie badania również u chorych na raka płuca, oceniając amplifikację genu *EGFR*, a ściślej polisomię tego genu. U pacjentów, u których stwierdzano polisomię genu *EGFR*, częściej uzyskiwano odpowiedź na stosowane leczenie blokujące receptor EGFR/HER1. Odsetek chorych, u których uzyskano efekt terapeutyczny, nie był jednak zadowalający [3].

Ocena mutacji genu *EGFR*

W badaniach klinicznych wykazano, że spośród chorych na raka płuca na leczenie inhibitorami kinazy tyrozynowej odpowiedź przede wszystkim występuje u pacjentów, którzy: nie palili tytoniu, rozpoznano u nich gruczolakoraka (głównie typ *bronchio-alveolar carcinoma-like*), a także u kobiet oraz osób rasy żółtej. U tych chorych stwierdzano często w komórkach nowotworowych mutacje genu *EGFR*. Spośród wielu mutacji występujących w gruczolakorakach płuca w genie *EGFR* najczęściej obserwuje się mutacje w genie 19. (delecja) i 21. (mutacja punktowa). W badaniach klinicznych wykazano, że takie mutacje są obecne w około 10% raków płuca w Europie i Stanach Zjednoczonych (na Dalekim Wschodzie w ok. 25–30%). Należy podkreślić, że odpowiedź na leczenie stwierdza się u takich osób aż w 70–80% przypadków. Podstawą wiarygodnej oceny mutacji genu jest uzyskanie odpowiedniego materiału do izolacji DNA. Może to być materiał z wycinków tkankowych lub cytologiczny. Warunkiem otrzymania wiarygodnego wyniku jest obecność odpowiedniej zawartości nowotworowego DNA w materiale. Wykorzystując materiał histologiczny, należy wybrać odpowiedni preparat histologiczny i pod kontrolą obrazu mikroskopowego wyizolować fragmenty tkanki zawierające odpowiedni procent komórek nowotworowych (technika mikrodysekcji). Spośród materiałów cytologicznych najodpowiedniejszy jest aspirat cienkoigłowy zawierający zwykle ponad 50% komórek nowotworowych. Mutacje *EGFR* należy ocenić w przypadkach gruczolakoraków oraz raków niedrobnokomórkowych (NOS). Takiej oceny nie przeprowadza się w rakach niedrobnokomórkowych wykazujących różnicowanie płaskonabłonkowe [3].

Ocena mutacji genu *KRAS*

W analizie badań klinicznych wykazano, że podobnie jak w raku jelita grubego, stwierdzenie mutacji *KRAS* w raku płuca jest negatywnym czynnikiem predykcijnym dla terapii inhibitorami kinazy tyrozynowej. Mutacje genu *KRAS* u chorych na raka płuca stwierdza się w przypadku gruczolakoraków i, co istotne, mutacje genów *EGFR* i *KRAS* nie występują jednocześnie. Z tego powodu logiczne jest określenie tylko stanu

genu *EGFR*. Brak mutacji tego genu wskazuje na brak wskazań do terapii celowanej i to niezależnie od faktu, czy stwierdza się mutacje genu *KRAS*. Wykazanie braku mutacji *KRAS* wymagałoby i tak oznaczenia mutacji genu *EGFR* [3].

Wnioski

Dokonując właściwego wyboru leczenia chorych na niedrobnokomórkowego raka płuca, należy dokładnie określić typ histologiczny nowotworu i w przypadkach niewykazujących różnicowania płaskonabłonkowego ocenić mutację genu *EGFR*. Stanowi to obecnie podstawę algorytmu diagnostyczno-terapeutycznego.

Określanie czynników predykcyjnych w raku piersi

Wprowadzenie

U chorych z naciekającym rakiem piersi istnieje możliwość indywidualizacji leczenia systemowego w wyniku analizy czynników predykcyjnych. Ocena stanu receptorów steroidowych [estrogenowego (ER, *estrogen receptor*) i progesteronowego (PgR, *progesterone receptor*)] w przypadku hormonoterapii i stanu HER2 w przypadku leczenia celowanego anty-HER2 jest zalecanym postępowaniem u wszystkich chorych z naciekającym rakiem piersi niezależnie od rozpoznanego typu histologicznego raka i jego stopnia złośliwości histologicznej. Oceny wymienionych czynników predykcyjnych dokonuje się we współpracy patologów i biologów molekularnych w materiale rutynowo przygotowywanym do diagnostyki patomorfologicznej. W tym celu stosuje się techniki immunopatologiczne (przede wszystkim IHC), jak również techniki hybrydyzacji *in situ* (ISH, *in situ hybridization*); w Polsce najczęściej jest to fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ* (FISH).

W leczeniu systemowym raka piersi korzysta się również z innych sposobów selekcji do leczenia przy użyciu tradycyjnych chemioterapeutyków, jednak z uwzględnieniem selekcji wynikającej ze szczegółowego poznania sposobu ich działania — przykładem może być kwalifikacja pacjentów do leczenia antracyklinami za pomocą określenia stanu topoizomazy 2 (immunopatologicznie lub techniką ISH). U chorych na raka piersi jest również możliwa terapia anty-EGFR — techniczne możliwości selekcji do tego typu leczenia są analogiczne jak w raku płuca czy raku przewodu pokarmowego. Możliwe jest także stosowanie terapii celowanej z wykorzystaniem leków skierowanych przeciw angiogenezie. Dla tego typu leczenia nie ma jednak jeszcze uznanych pojedynczych czynników predykcyjnych, które można by określić przy jego wyborze. Selekcja do leczenia an-

tyangiogenne u chorych na raka piersi ma charakter indywidualny na podstawie danych dotyczących charakterystyki biologicznej nowotworu (np. trójjemne raki piersi) i cech klinicznych [4].

Poniżej przedstawiono uznane i zalecane sposoby selekcji do hormonoterapii i terapii celowanej anty-HER2 [wytyczne z St Gallen 2009; wytyczne *American Society of Clinical Oncology* (ASCO) 2010].

Ocena receptora HER2

Określenie stanu receptora HER2 należy do rutynowego postępowania przy opracowaniu patomorfologicznym naciekającego raka piersi i ma znaczenie predykcyjne, podobnie jak określenie stanu receptorów steroidowych. Zgodnie z wytycznymi praktyka postępowania przy ustalaniu statusu HER2 jest bardziej złożona niż przy ocenie receptorów steroidowych i uwzględnia ocenę immunopatologiczną we wszystkich przypadkach naciekającego raka piersi, a także ocenę przy wykorzystaniu metod ISH, najczęściej FISH lub chromogenicznej hybrydyzacji *in situ* (CISH, *chromogenic in situ hybridization*) w wyselekcjonowanych immunopatologicznie sytuacjach (ok. 15–20% wszystkich raków naciekających).

Immunopatologiczną ocenę receptorów steroidowych można przeprowadzić w każdym typie materiału diagnostycznego:

- biopsji gruboigłowej;
- biopsji gruboigłowej wspomaganej próżnią;
- biopsji chirurgicznej;
- materiale pooperacyjnym.

Mniejszą wartość ma ocena immunopatologiczna receptora HER2 w materiale cytologicznym. Reakcja barwna występuje w błonie komórkowej, która w materiale cytologicznym ulega łatwemu uszkodzeniu, co utrudnia interpretację mikroskopową.

Powszechnie stosuje się czterostopniową skalę oceny reakcji barwnej (tab. 1). Interpretację wyników przedstawiono w tabeli 2 [4].

Dalsze postępowanie diagnostyczne w przypadkach statusu granicznego HER2

W sytuacji statusu granicznego receptora HER2 (2+) zaleca się ocenę metodą hybrydyzacji *in situ* (np. FISH) w celu rozstrzygnięcia statusu receptora. U około 15–20% chorych z naciekającym rakiem piersi stwierdza się stan graniczny HER2 oceniany z zastosowaniem metody immunohistochemicznej. Z tej grupy w badaniu metodą hybrydyzacji *in situ* około 10–15% przypadków wykazuje amplifikację, co jest interpretowane jako stan pozytywny receptora HER2. W pozostałych 85–90% nie stwierdza się amplifikacji genu *HER2*, co interpretuje się jako stan negatywny receptora HER2.

Tabela 1. Skala oceny barwienia immunopatologicznego receptora HER2 i jej kryteria

Table 1. Criteria for immunohistochemical stain evaluation of HER2

Wynik	Kryteria oceny
0	Brak odczynu lub reakcja barwna w mniej niż 10% komórek raka naciekającego
1+	Wybarwienie o charakterze nieciągłym (punktowe i odcinkowe) Całkowite wybarwienie błonowe w mniej niż 10% komórek raka naciekającego
2+	Słabe lub średnie całkowite wybarwienie błonowe w 10% lub więcej komórek raka naciekającego
3+	Silne całkowite wybarwienie błonowe w 30% lub więcej komórek raka naciekającego

Tabela 2. Skala oceny barwienia immunopatologicznego receptora HER2 i jej interpretacja

Table 2. Interpretation for immunohistochemical stain evaluation of HER2

Wynik	Interpretacja
0	Stan negatywny
1+	
2+	Stan graniczny (wymaga dalszego postępowania diagnostycznego — ocena metodą hybrydyzacji <i>in situ</i>)
3+	Stan pozytywny

Tabela 3. Ocena amplifikacji genu *HER2* i jej interpretacjaTable 1. *HER2* gene amplification: validation and interpretation

Wskaźnik	Obecność amplifikacji	Interpretacja
≤ 1,8	Brak amplifikacji genu <i>HER2</i>	Stan negatywny
> 1,8 i < 2,2	Amplifikacja wątpliwa	Stan graniczny (wymaga powtórzenia oceny amplifikacji)
> 2,2	Amplifikacja genu <i>HER2</i>	Stan pozytywny
W badaniu powtórным przeprowadzonym metodą FISH > 2,0	Amplifikacja genu <i>HER2</i>	Stan pozytywny

FISH (fluorescent *in situ* hybridization) — fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ*

Istotą oceny amplifikacji w badaniu przeprowadzonym metodą FISH jest policzenie kopii genu *HER2* i liczby centromerów chromosomu 17., na którym jest położony gen *HER2*. Proporcja pomiędzy tymi liczbami — wskaźnik — decyduje o obecności amplifikacji genu *HER2* lub jej braku. Sposób interpretacji przedstawiono w tabeli 3 [4].

Problemy dotyczące oceny czynników predykcyjnych w raku piersi

Należy podkreślić, że przy ocenie receptorów steroidowych i *HER2* przeprowadzenie zarówno badania immunopatologicznego, jak i badania metodami hybrydyzacji *in situ* (FISH lub CISH) wymaga przygotowania skrawków tkankowych z bloków (kostek) parafinowych zawierających rutynowo opracowaną tkankę nowotwo-

rową. Przygotowanie materiału do tych badań odbywa się w sposób analogiczny do rutynowego barwienia histopatologicznego. Badanie immunopatologiczne od momentu zlecenia do oceny mikroskopowej w dobrze zorganizowanym zakładzie patologii może być przeprowadzone w ciągu 1–2 dni roboczych, badanie metodami ISH trwa o 1 dzień dłużej (2–3 dni). Podstawowym warunkiem jest dostępność bloków parafinowych bądź dostarczonych niebarwionych skrawków parafinowych. Oceny immunopatologicznej dokonuje się przy użyciu zwykłego mikroskopu optycznego. Powinien to zrobić patomorfolog lub pracownik nadzorowany przez patomorfologa, ze względu na konieczność powiązania reakcji barwnej z utkaniem raka.

Oceny metodą FISH dokonuje się przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego. Powinien to zrobić patomorfolog lub pracownik nadzorowany przez pa-

tomorfologa ze względu na konieczność powiązania zwizualizowanych genów z jądrami komórek raka. Ponieważ w metodach hybrydizacji *in situ* konieczne jest enzymatyczne usunięcie cytoplazmy, interpretacja obrazu mikroskopowego jest w niektórych przypadkach szczególnie trudna.

W kilku procentach przypadków ocena immunopatologiczna lub z zastosowaniem metod ISH nie pozwala na wiarygodną interpretację. Przyczyną może być brak tkanki nowotworowej w bloku parafinowym — każde kolejne skrojenie zmniejsza jej zawartość. Również różnice w przygotowaniu i opracowaniu materiału tkankowego, a także czas jego przechowywania niekiedy uniemożliwiają wiarygodną interpretację obrazów mikroskopowych.

Różnice w technice wykonania badań immunopatologicznych i ISH oraz użycie różnych przeciwciał, sond lub filtrów barwnych w mikroskopach fluorescencyjnych, a w końcu subiektywny aspekt końcowej interpretacji przez diagnostę mogą być przyczyną rozbieżnych wyników w tym samym przypadku.

Miedzy innymi z tych przyczyn w raporcie wskazane jest uwzględnienie informacji o typie przeciwciała lub użytej sondy [4, 5].

Określanie czynników predykcyjnych w raku jelita grubego

Wprowadzenie

W systemowym leczeniu chorych na raka jelita grubego stosuje się zarówno chemioterapeutyki wykorzystywane od dziesięcioleci, takie jak 5-fluorouracyl

(5-FU), jak i nowe preparaty wykorzystywane w leczeniu celowanym anty-EGFR. Leczenie systemowe chorych na raka jelita grubego traktowano jako mało skuteczne w porównaniu z efektami terapii systemowej chorych na raka piersi, gruczołu krokowego czy narządów rozrodczych (np. jajnika). Korzysta się z dwóch sposobów zwiększenia skuteczności tego typu terapii. Oba wiążą się z wykryciem czynników predykcyjnych zarówno dla leków systemowych stosowanych już uprzednio w onkologii, jak i dla leków opracowanych w ostatniej dekadzie — celowanych.

Pierwszym sposobem jest określanie pojedynczych parametrów związanych z celem działania leku (np. irynotecan) lub cech pacjenta dotyczących enzymów związanych z metabolizmem terapeutycznym (np. 5-FU). W ten sposób teoretycznie można wyselekcjonować grupę chorych podatnych na leczenie lub wyeliminować tych, dla których będzie ono zbyt toksyczne. Zestawienie proponowanych czynników predykcyjnych przedstawiono w tabeli 4.

Drugim sposobem jest wprowadzenie leczenia celowanego do terapii chorych na raka jelita grubego. Obecnie praktyczne zastosowanie ma terapia anty-EGFR (np. cetuksymab, panitumumab) oraz leczenie antyangiogenne (bewacyzumab) [6].

Ocena czynników predykcyjnych dla leczenia anty-EGFR

Pomimo że celem działania leków celowanych, takich jak cetuksymab czy panitumumab, jest EGFR, ocena immunopatologiczna ekspresji tego receptora nie ma związku z efektami leczenia tymi terapeutycznymi zarówno w mono-, jak i w politerapii. Według części

Tabela 4. Chemioterapeutyki stosowane w leczeniu raka jelita grubego, ich cele działania i możliwe czynniki predykcyjne

Table 4. Targets of chemotherapeutics for colorectal cancer and predictive factors for response

Terapeutyk	Cel działania	Proponowany czynnik predykcyjny
5-fluorouracyl	Syntetaza tymidylowa (TS)	Stan: syntetazy tymidylowej (TS), dehydrogenazy dihydropirydynowej (DPD), fosforylasy tymidynowej (TP)
Kapecytabina	Syntetaza tymidylowa (TS)	Ekspresja: syntetazy tymidylowej (TS), dehydrogenazy dihydropirydynowej (DPD), fosforylasy tymidynowej (TP)
Oksaliplatyna	Nukleotydy	Stan XRCC1 i ERCC1
Irynotekan	Topo-1	Stan Topo-1
Bewacyzumab	VEGF	Niezidentyfikowany
Cetuksymab	EGFR	Stan EGFR, mutacja <i>KRAS</i>
Panitumumab	EGFR	Stan EGFR, mutacja <i>KRAS</i>

VEGF (*vascular endothelial growth factor*) — czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego; EGFR (*epidermal growth factor receptor*) — receptor czynnika wzrostu naskórka; Topo-1 — topoisomeraza 1

autorów określenie stanu EGFR metodą hybrydyzacji *in situ* (amplifikacja) ma znaczenie predykcyjne w leczeniu anty-EGFR. Obecnie za istotną dla selekcji do terapii anty-EGFR chorych na raka jelita grubego uważa się ocenę mutacji w protoonkogenie *KRAS*. W przypadkach ze zmutowanym genem *KRAS* nie wykazano skuteczności leczenia anty-EGFR ani za pomocą cetuksymabu ani panitumumabu. Uzasadnieniem tych obserwacji jest fakt, że białko *KRAS* znajduje się niżej w szlaku przekazywania sygnału EGFR. Zmutowany *KRAS* nie podlega kontroli receptora EGFR i stosowanie leczenia anty-EGFR w takich przypadkach nie przynosi zakładanego efektu terapeutycznego. Mutacja *KRAS*, która prowadzi do stałej aktywacji szlaku sygnałowego (RAS/RAF/kinaza MAP i PTEN/PI3K/AKT) prawidłowo kontrolowanego przez EGFR, występuje w 30–50% przypadków raka jelita grubego. Większość mutacji znajduje się w egzonie 2. genu *KRAS*.

Oceny obecności mutacji w genie *KRAS* można dokonać w tkance pochodzącej z rutynowo wykonywanych bloków (kostek) parafinowych służących do tradycyjnej diagnostyki histopatologicznej. Konieczne jest wybranie przez patomorfologa odpowiedniego blozka parafinowego zawierającego zachowaną (nie martwiczą) tkankę raka. Z blozka skrawa się kilkudziesięciomikrometrowe skrawki, które następnie są opracowywane i stanowią materiał do oceny techniką biologii molekularnej (np. PCR) przez biologa molekularnego. Wynik powinien zawierać informację o obecności lub braku mutacji w obrębie genu *KRAS* [6].

Ocena czynników predykcyjnych dla leczenia antyangiogennego

Bewacyzumab jest przeciwciałem monoklonalnym skierowanym przeciw cząsteczce VEGF — czynnikowi, który jest ligandem receptora VEGFR odgrywającego rolę w angiogenezie. Lek ten, jako część politerapii (z irynotekaniem i 5-FU/leukoworyną), wpływa na poprawę całkowitego przeżycia w zaawansowanym raku jelita grubego (52). Mimo że istnieje możliwość oceny celu działania bewacyzumabu, np. immunopatologicznie, dotychczas nie ustalono czynnika predykcyjnego dla leczenia antyangiogennego i to zarówno w tkance nowotworu, osoczku, jak i komórkach śródbłonnkach.

Ocena czynników predykcyjnych w raku żołądka

Wstęp

Mimo że rak żołądka jest jednym z najczęstszych nowotworów (ponad 1,5 miliona zachorowań rocznie na świecie i ponad 5000 w Polsce), możliwości terapie-

tyczne, szczególnie w przypadku nowotworów zaawansowanych, są ograniczone. U chorych z nieoperacyjnymi rakami żołądka lub wznowami podejmowano próby zastosowania chemioterapii. Uzyskiwane wyniki nie były zadowalające.

Skuteczność leczenia trastuzumabem w raku piersi skłoniła do podjęcia prób zastosowania tego leku w raku żołądka. Uzyskane wyniki były zadowalające i zaistniała konieczność właściwego oznaczania statusu receptora HER2 w raku żołądka w celu doboru chorych do terapii trastuzumabem.

W badaniach klinicznych wykazano, że nie można przenieść doświadczenia zdobytego w ocenie stanu receptora HER2 w raku piersi bezpośrednio na ocenę w raku żołądka.

Według danych z piśmiennictwa w przypadku raka żołądka nadekspresję HER2 stwierdza się w 6–27%, a zależy to od typu histologicznego raka i lokalizacji zmiany. W raku typu jelitowego nadekspresję wykazuje się w 16–37%, a w typie rozlanym w około 7% przypadków; w rakach zlokalizowanych w połączeniu przełykowo-żołądkowym (rak Barretta) w około 33%, a w raku żołądka w 21%. Nie wykazano zależności od stopnia zaawansowania nowotworu [7, 8].

Ocena HER2 w raku żołądka

W ocenie ekspresji HER2 oznaczonej metodą histochemiczną konieczne było zastosowanie innych kryteriów niż w przypadku raka piersi. Według standardowej klasyfikacji w raku piersi za odczyn klinicznie dodatni uważa się reakcję immunohistochemiczną błonową w całości otaczającą komórkę nowotworową i stwierdzaną w 30% komórek. W raku żołądka za odczyn dodatni uznaje się reakcję błonową obejmującą przede wszystkim boczno-podstawną (*baso-lateral*) część błony komórkowej, natomiast od strony światła gruczołów tworzonych przez komórki reakcja nie musi on występować.

Odrębnym zagadnieniem jest również próg ilościowy komórek, w których stwierdza się taki odczyn. W raku żołądka w wycinkach pobranych w celach diagnostycznych musi to być gniazdo co najmniej 5 komórek z takim odczynem, natomiast w materiale pooperacyjnym resektowanego nowotworu odczyn taki powinien występować w 10% komórek.

W przypadkach ocenianych immunohistochemicznie (IHC) jako wątpliwe lub o wartości granicznej — HER2 +2 — wskazana jest ocena amplifikacji genu *HER2* metodą FISH. W przypadku stwierdzenia amplifikacji genu nowotwór określa się jako klinicznie dodatni.

Należy jednak zwrócić uwagę na fakt, że o ile w raku piersi stwierdzono dużą zgodność nadekspresji białka HER2 z amplifikacją genu *HER2*, o tyle w raku żołądka takiej zgodności nie ma. W rakach żołądka ocenionych

metodą IHC jako HER2 0, a szczególnie HER2 +1, stwierdza się raki z amplifikacją genu *HER2*, natomiast w znacznym odsetku raków uznawanych za HER2 +3 nie wykazano amplifikacji genu.

Pod względem klinicznym doboru chorych na raka żołądka do leczenia trastuzumabem bardziej wiarygodny jest wynik testu immunohistochemicznego niż ocena amplifikacji genu. W przypadku raka żołądka zaleca się podobny algorytm postępowania jak w raku piersi z uwzględnieniem podanych modyfikacji dotyczących oceny immunohistochemicznej klasyfikacji odczynów [7, 8].

Wnioski

Do terapii trastuzumabem kwalifikują się chorzy z nowotworami uznanymi za HER2 +2 i FISH+ oraz HER2 +3, niezależnie od wyniku oceny amplifikacji genu.

Piśmiennictwo

1. Langfort R. Rozpoznanie mikroskopowe raka płuca na podstawie drobnego materiału biooptycznego. *Pol. J. Pathol.* 2010; 61, (supl. 1) (w druku).
2. Olszewski W.T. Diagnostyka cytologiczna raka płuca. *Pol. J. Pathol.* 2010; 61, (supl. 1) (w druku).
3. Szumera-Ciećkiewicz A., Olszewski W.T. Miejsce patomorfologii w terapii celowanej raka płuca. *Pol. J. Pathol.* 2010; 61, (supl. 1) (w druku).
4. Olszewski W.P. Molekularne wskaźniki rokownicze i predykcyjne. W: Jassem J., Krzakowski M. (red.) *Rak piersi — praktyczny przewodnik dla lekarzy*. Via Medica, Gdańsk 2009; 80–96.
5. Olszewski W.P. Patomorfologiczna selekcja chorych do terapii systemowej. *Pol. J. Pathol.* 2009; 3 (supl. 1): 28–33.
6. Hamilton S.R. Targeted therapy of cancer: new roles for pathologists in colorectal cancer. *Modern Pathology* 2008; 21: S23–S30.
7. Ruschoff J., Dietel M., Baretton G. i wsp. HER2 diagnostics in gastric cancer — guideline validation and development of standardized immunohistochemical testing. *Virchov. Arch.* 2010; 457: 2999–2307.
8. Van Cutsem E., Kang Y., Chung H. i wsp. Efficacy result from the ToGA trial: A phase III study of trastuzumab added to standard chemotherapy (CT) in the first-line human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) positive advanced gastric cancer (GC). *J. Clin. Oncol.* 2009; 27: 18S.