

Miejsce patomorfologa w diagnostyce molekularnej nowotworów litych

Anna Nasierowska-Guttmejer

Zakład Patomorfologii

CSK MSW w Warszawie

I część

- rola patomorfologa w erze terapii celowanej molekularnie
- zasady postępowania z materiałem tkankowym w przypadkach wymagających zbadania czynników prognostycznych i predykcyjnych metodami immunohistochemicznymi i molekularnymi

Wynik leczenia ukierunkowanego molekularnie



Immunohistochemiczne
czynniki predykcyjne



Molekularne czynniki
predykcyjne

**Laboratorium
biologii molekularnej**

```
graph TD; A[Laboratorium biologii molekularnej] --> B[Przychodnia genetyki klinicznej]; A --> C[Zakład patomorfologii];
```

The diagram consists of three white ovals with blue outlines on a light green background. The top oval is centered and contains the text 'Laboratorium biologii molekularnej'. Below it are two ovals, one on the left and one on the right. Two blue arrows point from the bottom of the top oval to the top of each of the bottom ovals. The left oval contains the text 'Przychodnia genetyki klinicznej' and the right oval contains the text 'Zakład patomorfologii'.

Przychodnia
genetyki
klinicznej

Zakład
patomorfologii

**Zakład patomorfologii w erze
terapii ukierunkowanej
molekularnie**

*postępowanie z materiałem
tkankowym*

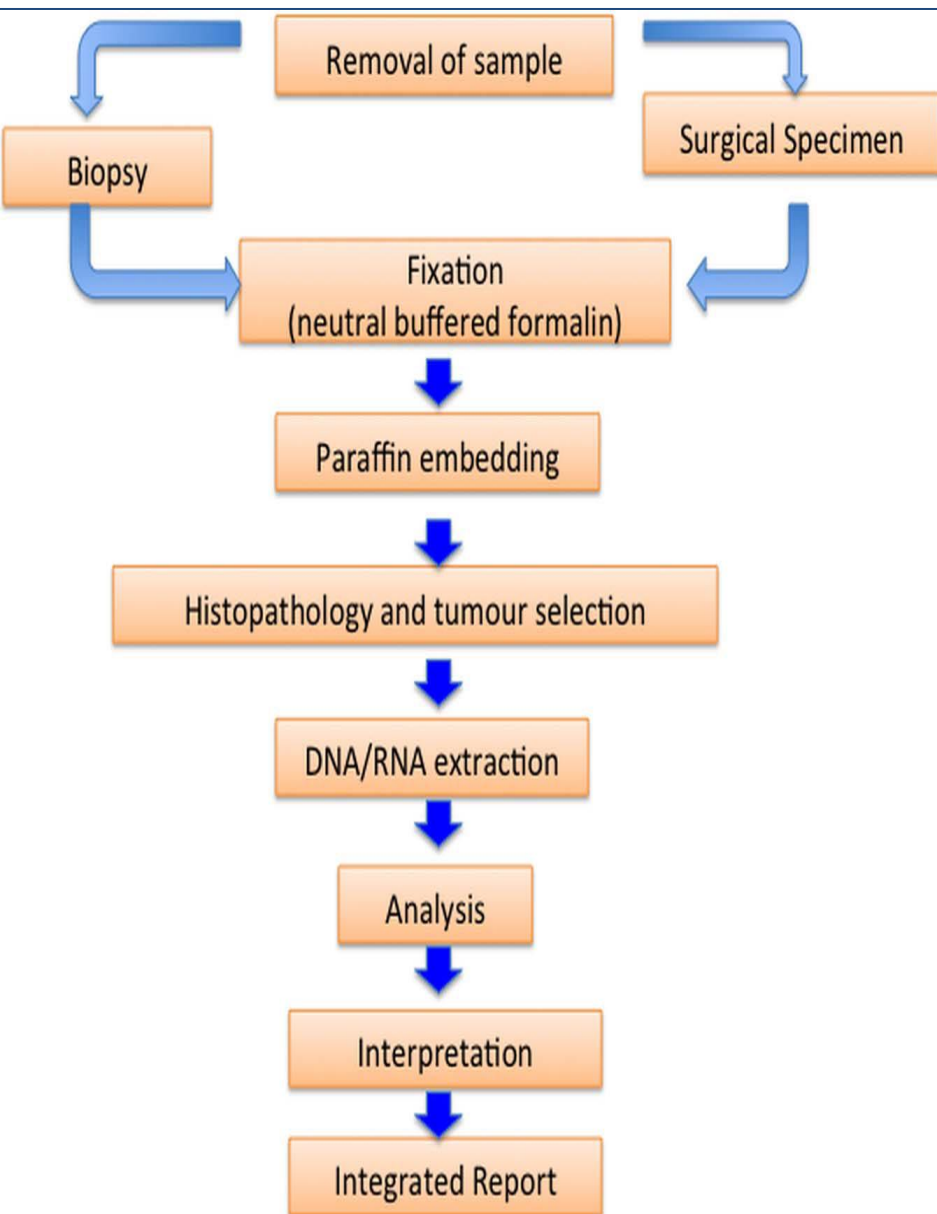


OPEN ACCESS

Guidance for laboratories performing molecular pathology for cancer patients

Ian A Cree,^{1,2} Zandra Deans,³ Marjolijn J L Ligtenberg,⁴ Nicola Normanno,⁵ Anders Edsjö,⁶ Etienne Rouleau,⁷ Francesc Solé,⁸ Erik Thunnissen,⁹ Wim Timens,¹⁰ Ed Schuurin,¹⁰ Elisabeth Dequeker,¹¹ Samuel Murray,¹² Manfred Dietel,¹³ Patricia Groenen,⁴ J Han Van Krieken,⁴ for the European Society of Pathology Task Force on Quality Assurance in Molecular Pathology and the Royal College of Pathologists

Cree IA, et al. J Clin Pathol 2014;67:923–931



1. zabezpieczenie pobranego materiału, utwalenie
2. pobieranie wycinków z materiału operacyjnego
3. zatopienie materiału biopsyjnego i wycinków z materiału pooperacyjnego w parafinie
4. rozpoznanie patomorfologiczne z preparatu H&E
- 5. zbadanie czynników predykcyjnych**
 - badanie immunohistochemiczne
 - wybór reprezentatywnego materiału tkankowego z boczka parafinowego do badań molekularnych

Etap preanalityczny

Raport etapu przed badaniem (preanalityczny)

1. Dane pacjenta

2. Data i godzina operacji

3. Rodzaj badanego materiału, miejsce pobrania

4. Warunki transportu: czas i temperatura

5. Rodzaj utrwalacza

6. Data i godzina włożenia (przeciętego) materiału do formaliny (jelito grube, pierś)

7. Czas utrwalania

8. Data pobrania wycinków

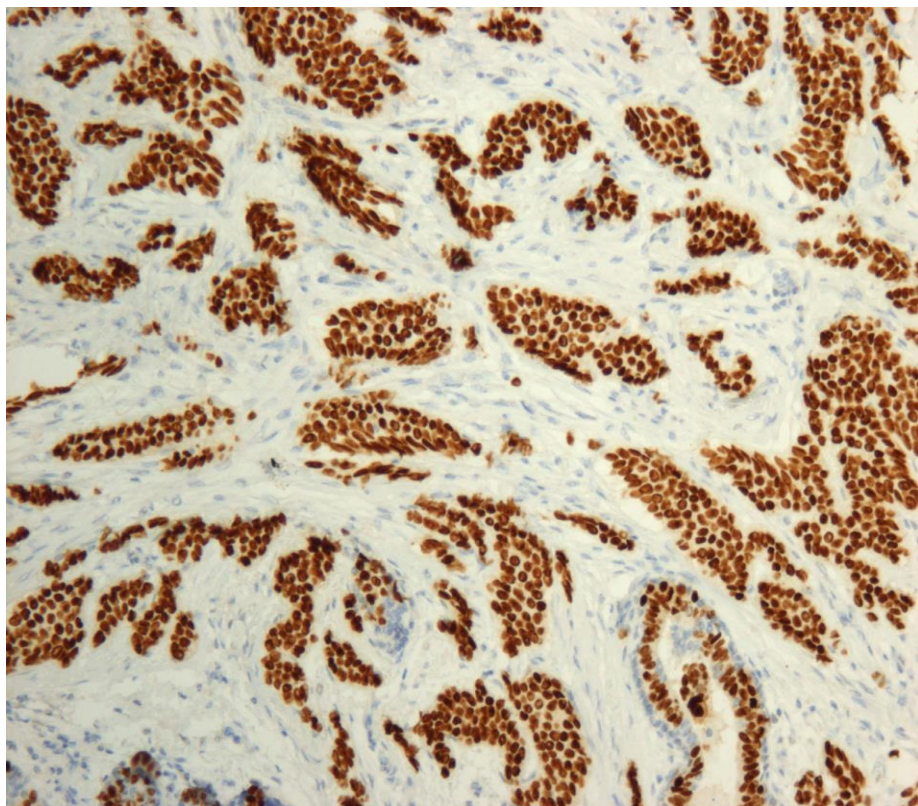
Utrwalenie tkanek, kluczowa zmienna etapu preanalitycznego

- Małe wycinki, materiał operacyjny
- Utrwalacz: 10% zbuforowana formalina (4% formaldehyd)
Formalina penetruje 1 mm/godz
- Kontrola czasu utrwalania i temperatury –
rekomendowane przy ocenie białka HER2 i
analizie molekularnej genu *HER2*

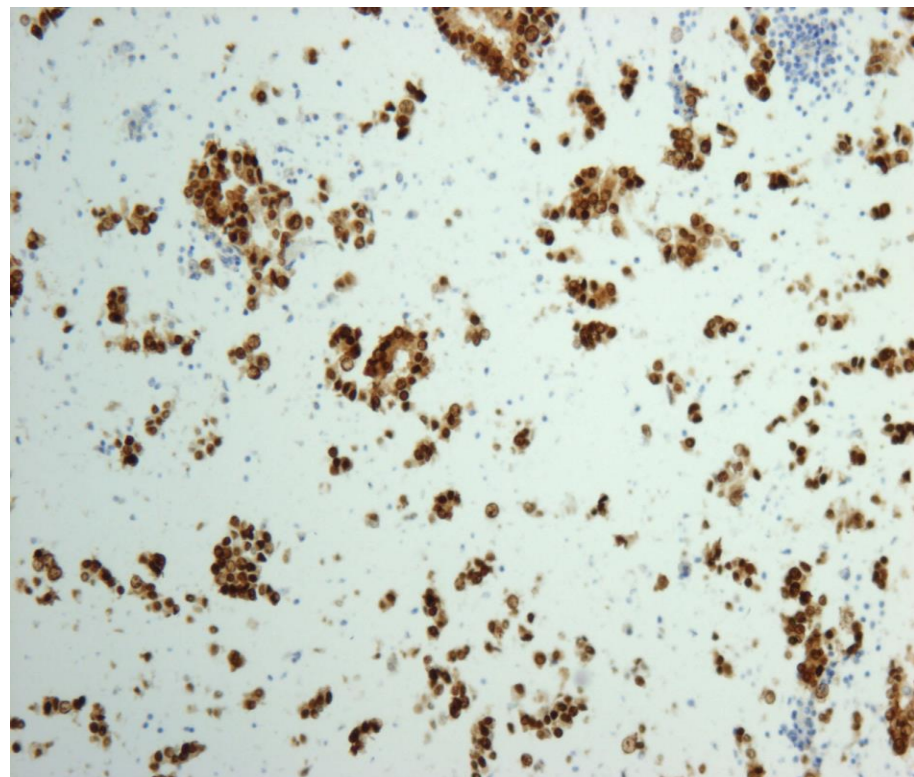
UWAGA: STALE AKTUALNY PROBLEM

**PRAWIDŁOWY ETAP PREANALITYCZNY –
UTRWALENIE MATERIAŁU TKANKOWEGO –
GWARANCJĄ PRAWIDŁOWEGO WYNIKU
BADANIA IHC I MOLEKULARNEGO
BIOMARKERÓW PREDYKCYJNYCH**

Badanie IHC receptorów estrogenowych



materiał dobrze utrwalony



materiał źle utrwalony

Pobieranie materiału do badań molekularnych

- Ocena histopatologiczna: skrawki 4 – 6 μm
- Dyssekcja materiału przez patomorfologa:
 - Zaznaczenie w czasie diagnozy na preparacie H&E obszaru nowotworu do makro- mikrodissekcji
 - Oznaczenie martwicy
 - Określenie procentu komórek nowotworowych i wpisanie do raportu

1. Dane pacjenta

2. Raport

3. Interpretacja

4. Zintegrowany raport: patomorfologodzy,
biolodzy molekularni, onkolodzy, chirurgdzy

- Standaryzacja
- Walidacja metod
- Podnoszenie kwalifikacji patomorfologów i techników
- Prawidłowe raportowanie badań z datą i godziną
- Kontrola jakości
- Określony czas badania
- Współpraca interdyscyplinarna:
patolog, biolog molekularny,
chirurg, onkolog

Akredytacja zakładów patomorfologii

standaryzacja i walidacja

- są nieodzownym elementem akredytacji laboratorium, zakładu diagnostycznego
- oznaczają proces potwierdzenia, że wybrane metody spełniają wymagania dotyczące ich zastosowania oraz są w stanie wykryć badany czynnik z odpowiednią precyzją i dokładnością

PROGRAMY KONTROLI JAKOŚCI

Europejski Program Kontroli Jakości prowadzony przez Europejskie Towarzystwo Patologów dotyczy niedrobnokomórkowego raka płuca i raka jelita grubego

1. ESP Lung EQA (*External Quality Assessment Scheme*): non-small cell lung carcinoma (NSCLC)

markery:

- **EGFR, KRAS** (analiza mutacji materiału utrwalonego w formalinie i zatopionego w parafinie)
- **ALK** (FISH, IHC i/lub RT-PCR)

2. ESP Colon EQA (*External Quality Assessment Scheme*)

- markery: **KRAS, NRAS i BRAF**

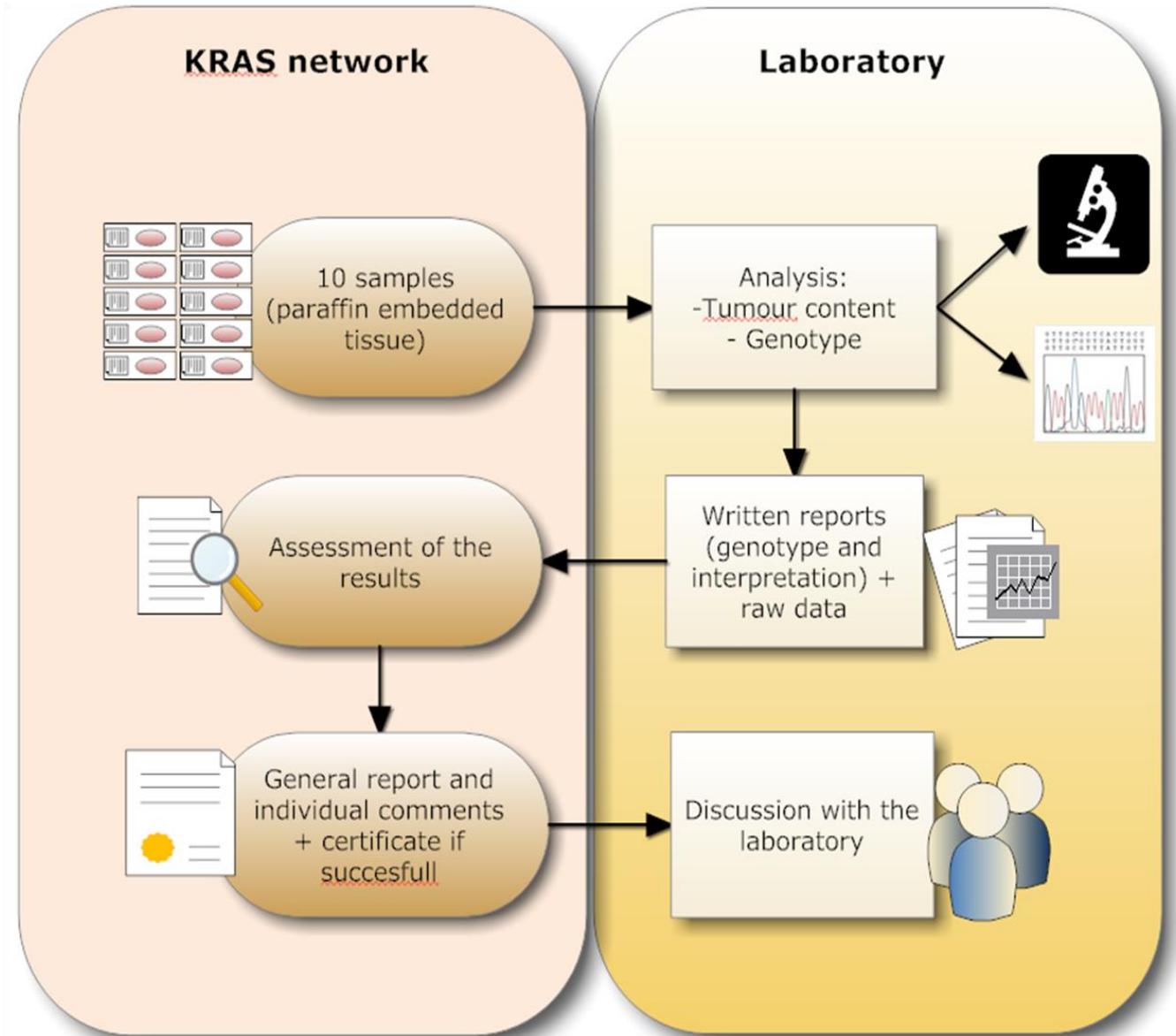
Europejski Program Kontroli Jakości Europejskiego Towarzystwa Patologów (ESP) dotyczący markerów molekularnych raka jelita grubego

J. H. J. M. van Krieken, A. Jung, T. Kirchner, F. Carneiro, R. Seruca, F. T. Bosman, P. Quirke, J. F. Fléjou, T. Plato Hansen, G. de Hertogh, P. Jares, C. Langner, G. Hoefler, M. Ligtenberg, D. Tiniakos, S. Tejpar, G. Bevilacqua, A. Ensari

KRAS mutation testing for predicting response to anti-EGFR therapy for colorectal carcinoma: proposal for an European quality assurance program

Virchows Arch (2008) 453:417–431

Colon External Quality Assessment Scheme, ESP



Patrick L. Fitzgibbons, David G. Hicks. Progress in Implementing HER2 Testing Guidelines. Arch Pathol Lab Med—Vol 138, July 2014

- 2006 roku - 175 laboratoriów
- 2007 rok - 508 laboratoriów: 7% laboratoriów stosuje inny utrwalacz niż 10% buforowaną formalinę
- 2013 rok - 1269 laboratoriów: 2,3% laboratoriów używa innych utrwalaczy niż 10% NBF

Podsumowanie 1

- Badania immunohistochemiczne i molekularne czynników predykcyjnych stają się ważną częścią diagnostyki chorych na nowotwory
- Proces badania winien być oparty o zwalidowane aktualne metody
- Należy uwzględniać aktualne rekomendacje opracowane przez interdyscyplinarny zespół: patolog, onkolog, biolog molekularny
- Etap preanalizy jest ważny, przestrzeganie wytycznych jest gwarancją prawidłowo przygotowanego materiału do badań molekularnych

- Akredytacja laboratorium, kontrola wewnętrzna i zewnętrzna gwarantują prawidłowy przebieg oraz wynik badania
- Raport z badania biologii molekularnej powinien być zintegrowany z raportem histopatologicznym
- Zintegrowany raport histopatologiczny z molekularnym powinien być dyskutowany w czasie spotkań zespołu interdyscyplinarnego patologa i onkologa oraz także z pacjentem

II część

czynniki prognostyczne i
predykcyjne w wybranych
nowotworach

Terapia celowana molekularnie

- leki skierowane przeciw
 - receptorom kinaz tyrozynowych (*CKIT*)
 - receptorom czynnika wzrostu naskórka (HER, *human epidermal receptors*) HER1, HER2
- potwierdzono skuteczność leków skierowanych przeciw tym receptorom jak imatinib, erlotynib, cetuxymab czy trastuzumab
- ich stosowanie zarejestrowano do terapii nowotworów przewodu pokarmowego, piersi, płuca, czerniaka

Dwie strategie wyboru chorych do leczenia ukierunkowanego molekularnie

I: Określenie czynnika związanego z działaniem leku:

- białko receptorowe (receptory steroidowe ER i PgR, HER2, EGFR): metody immunohistochemiczne
- gen kodujący to białko (geny *CKIT*, *PDGFRA*, *HER2*, *EGFR*): badania molekularne technikami hybrydyzacji *in situ* (*ISH*, *FISH*) czy metodą reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR, *polymerase chain reaction*).

identyfikacja pacjentów, którzy prawdopodobnie odniosą korzyść z leczenia

Dwie strategie wyboru chorych do leczenia ukierunkowanego molekularnie

- II strategia: wskazanie tych chorych, którzy najprawdopodobniej nie odniosą korzyści z leczenia.
- Ocena obecności mutacji w genie *KRAS*, która dyskwalifikuje pacjentów z leczenia anty-EGFR.

Wyłączenie chorych, którzy nie odniosą korzyści z terapii celowanej

Kwalifikacja chorych do leczenia celowanego
na podstawie czynników predykcyjnych
badanych metodami
immunohistochemicznymi i molekularnymi
hybrydyzacji in situ (ISH), PCR

Typ nowotworu	Czynnik predykcyjny badanie immunohistochemiczne	Czynnik predykcyjny badanie molekularne
GIST	CD117	<i>KIT, PDGFRA</i>
Rak piersi	ER, PgR, HER2, Ki67	<i>HER2</i>
Rak jelita grubego	MLH1, PMS2, MSH2, MSH6	<i>KRAS, NRAS BRAF, MRI</i>
Niedrobnokomórkowy rak płuca		<i>EGFR, KRAS, ALK</i>
Czerniak	BRAF	<i>BRAF</i>
Neuroblastoma		<i>MYC</i>
Nowotwory neuroendokrynne	Synaptofizyna, Chromogranina A, Ki67	

Metody badania czynników predykcyjnych GIST

immunohistochemiczne

- KIT (CD117)

molekularne

- *KIT, PDGFRA*

Miejsce mutacji w genie *KIT* i *PDGFRA* jest czynnikiem predykcyjnym

Mutacje genu KIT	80-85% GIST
Ekson 11	Najczęstsza mutacja w sporadycznym GIST (ok. 60% przypadków) z najlepszą odpowiedzią na imatynib Obserwowana również w rodzinnych GIST
Ekson 9	Mutacja częściej występująca w GIST jelita cienkiego, gorsza odpowiedź na imatynib, dobra odpowiedź na sunitynib
Ekson 13 i 17	Bardzo rzadkie mutacje Opisywane w rodzinnych GIST Obserwowano odpowiedzi kliniczne na leczenie imatynibem
Mutacje genu PDGFRA	5-7% GIST
Ekson 12	Obserwowano odpowiedzi kliniczne na imatynib
Ekson 14	Opisano kilka przypadków
Ekson 18	Większość przypadków z żołądka

Rak piersi

czynniki prognostyczne

stopień zaawansowania, pTNM

typ histologiczny raka

stopień dojrzałości, G

czynniki predykcyjne

stan receptorów estrogenowych, ER

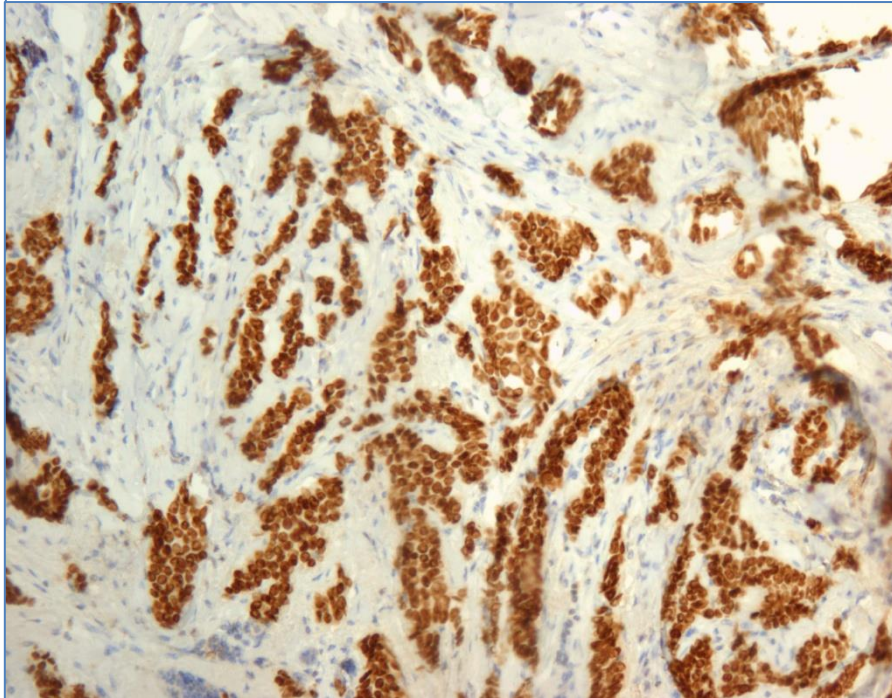
stan receptorów progesteronowych, PgR

HER2

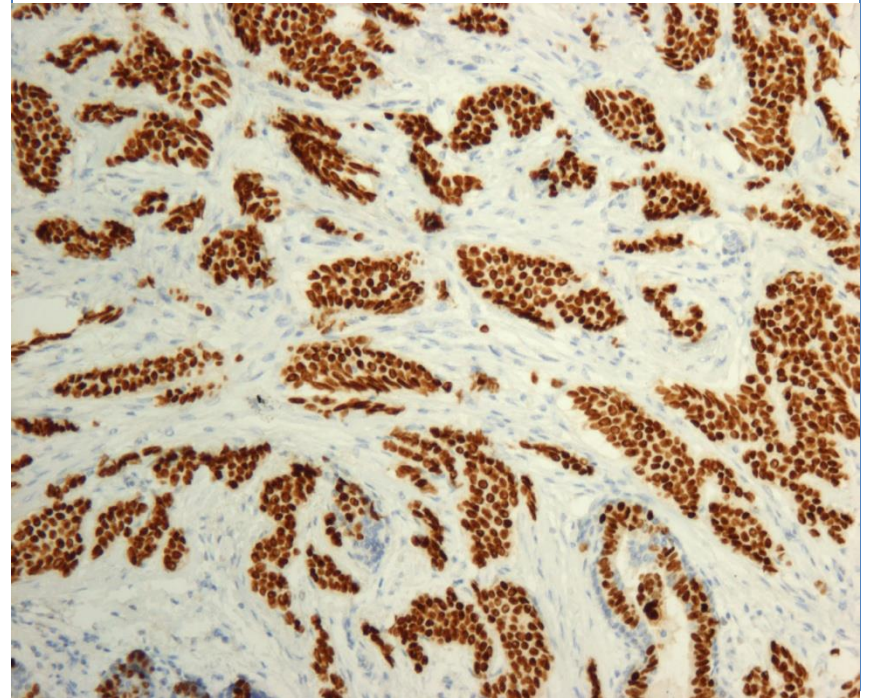
Ki67

Stan receptorów estrogenowych i progesteronowych

- ER, badanie IHC (100% komórek)



- PgR, badanie IHC (100% komórek)

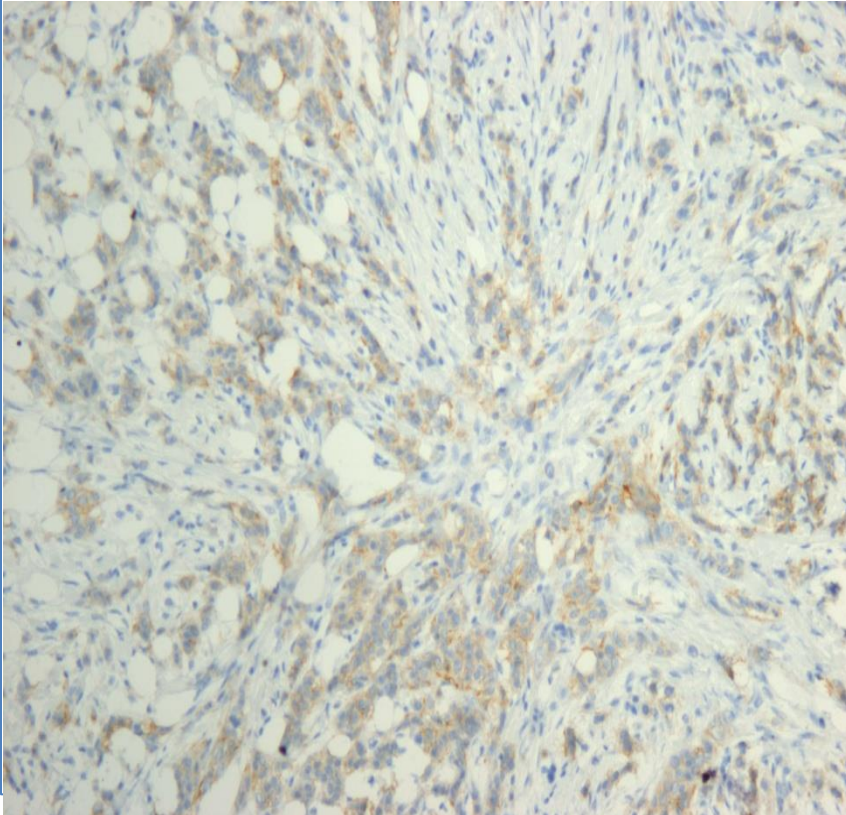


- Nadmierna ekspresja HER2 jest
- Źle rokującym czynnikiem prognostycznym w raku piersi
- Czynnikiem predykcyjnym w terapii celowanej

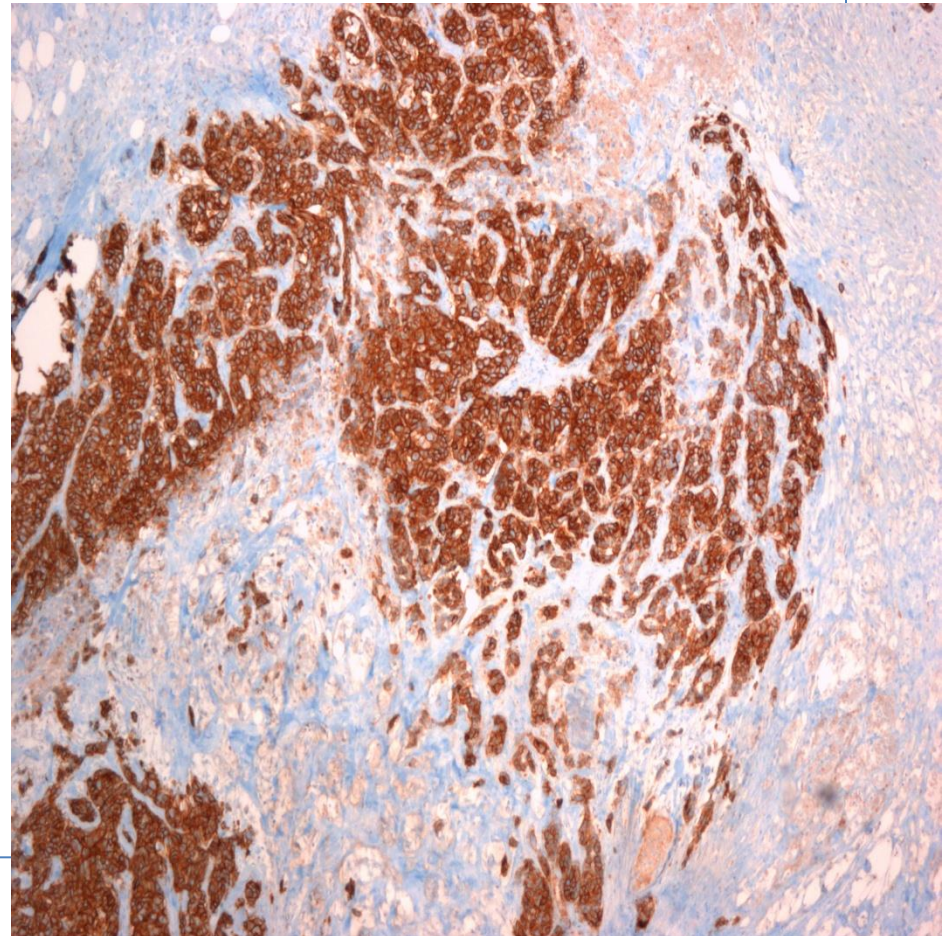
Interpretacja badania IHC oceny HER2

0, 1+, 2+, 3+

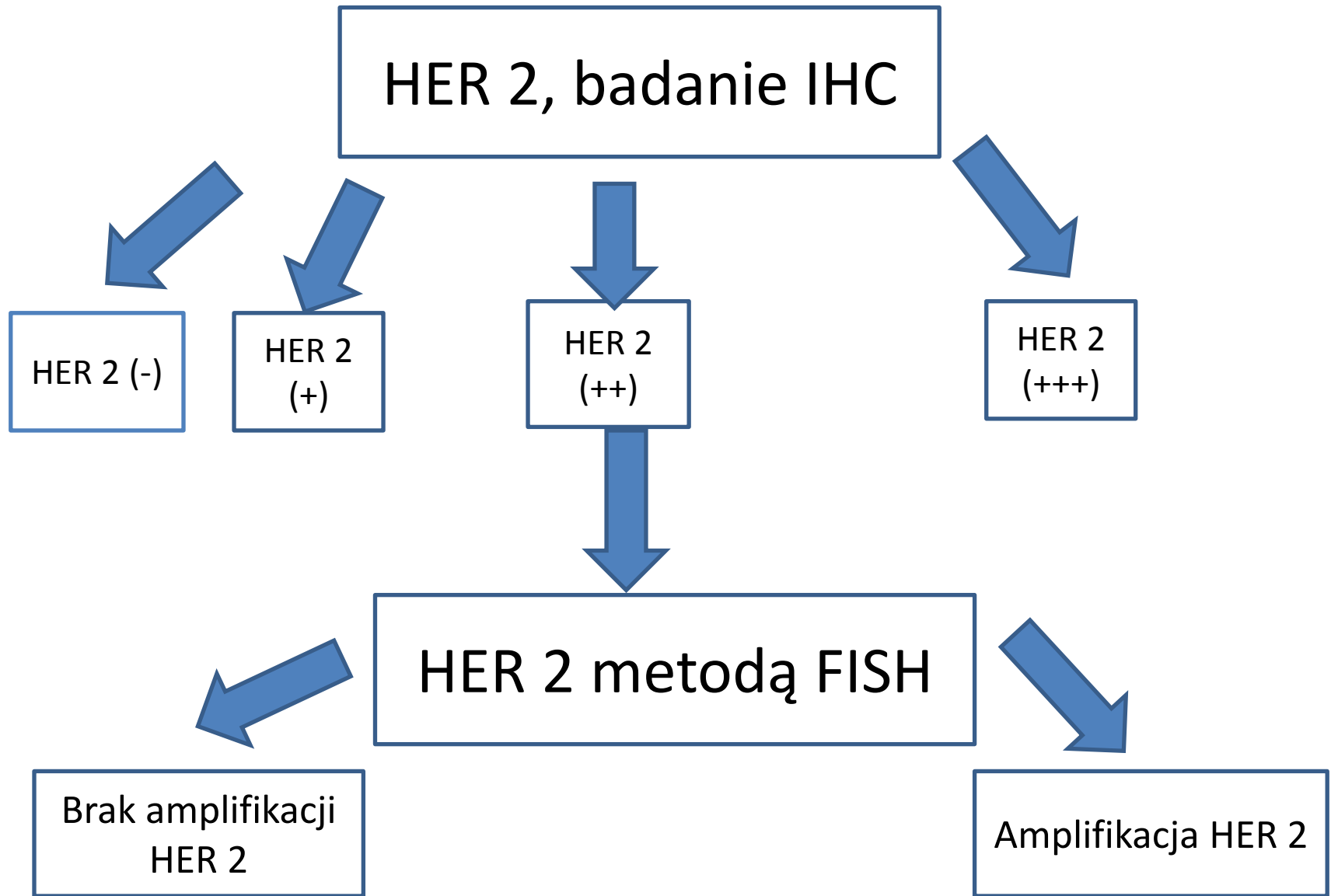
- HER2, badanie IHC (2+)



- HER2, Badanie IHC (3+)



HER 2, badanie IHC i metodą FISH



Rak jelita grubego

czynniki prognostyczne

a. typ histologiczny i stopień dojrzałości (G)

b. stopień zaawansowania pTNM

c. marginesy chirurgiczne:

proksymalny, dystalny oraz

radialny i ocena wycięcia mezorektum (odbytnica)

d. specjalne typy morfologiczne raka, w tym raki z MSI-H:

cechy morfologiczne i IHC

czynniki predykcyjne

immunohistochemiczne: MSI-H, EGFR

molekularne: *APC, MRI, KRAS, NRAS*

poszukiwanie
czynników predykcyjnych
w terapii ukierunkowanej
molekularnie w raku jelita grubego

ASCO/CAP

(Amerykańskie Towarzystwo Patologów)

październik 2013

- **Wytyczne raportowania biomarkerów metodami immunohistochemiczna i molekularną raka jelita grubego**
- **MSI: MLH1, MSH2, MSH6, PMS**
- **Hypermetylacja promotora *MLH1* i analiza mutacji *BRAF***
- ***KRAS* analiza mutacji**
- ***PIK3CA* analiza mutacji**
- ***PTEN* analiza mutacji**

http://www.cap.org/apps/docs/committees/cancer/cancer_protocols/2013/ColoRectalBiomarker_13Template_1100.pdf

1.ASCO/CAP (2014) niestabilność mikrosatelitarna

czynnik prognostyczny i predykcyjny

- **MSI-H**

zespół Lynch'a *versus*
rak sporadyczny

- Zespół Lynch:

germinalne mutacje genów
naprawy DNA:

*MLH1, MSH2, MSH6, PMS2,
MLH3*

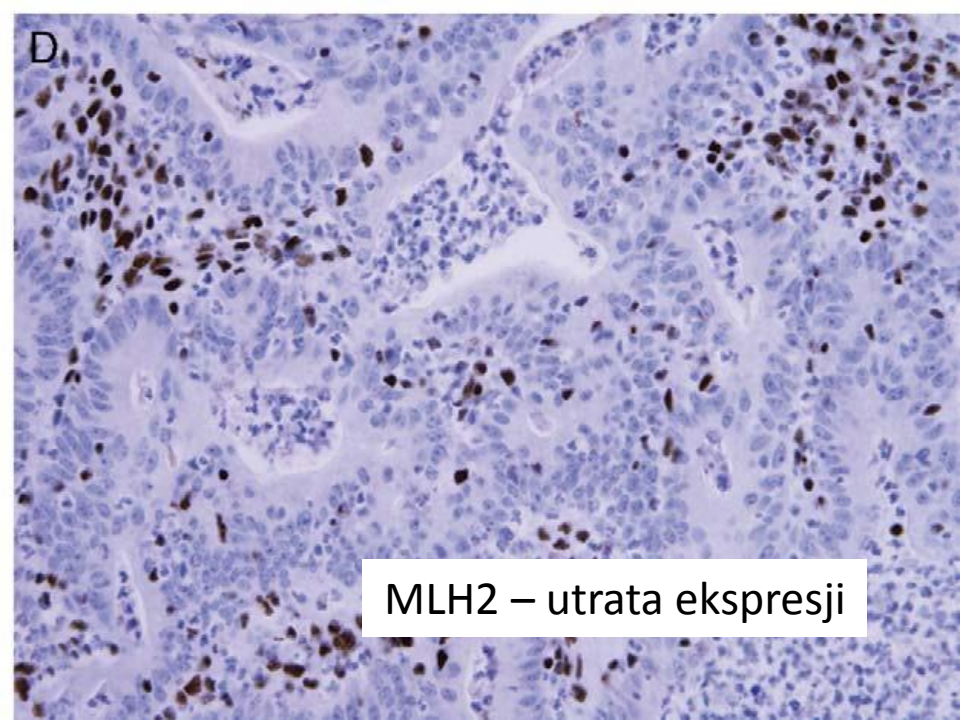
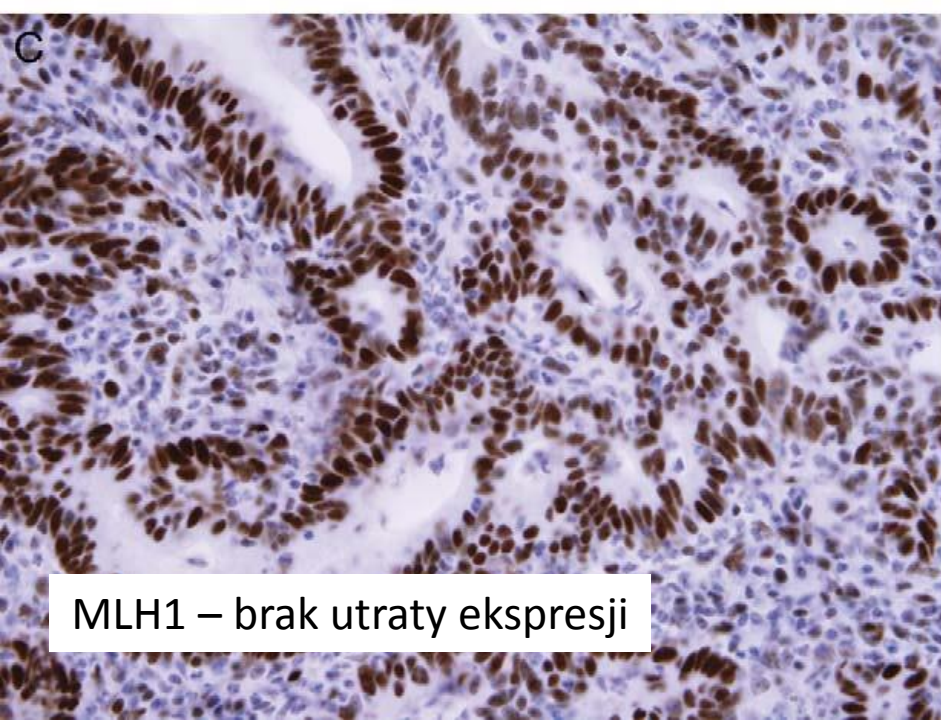
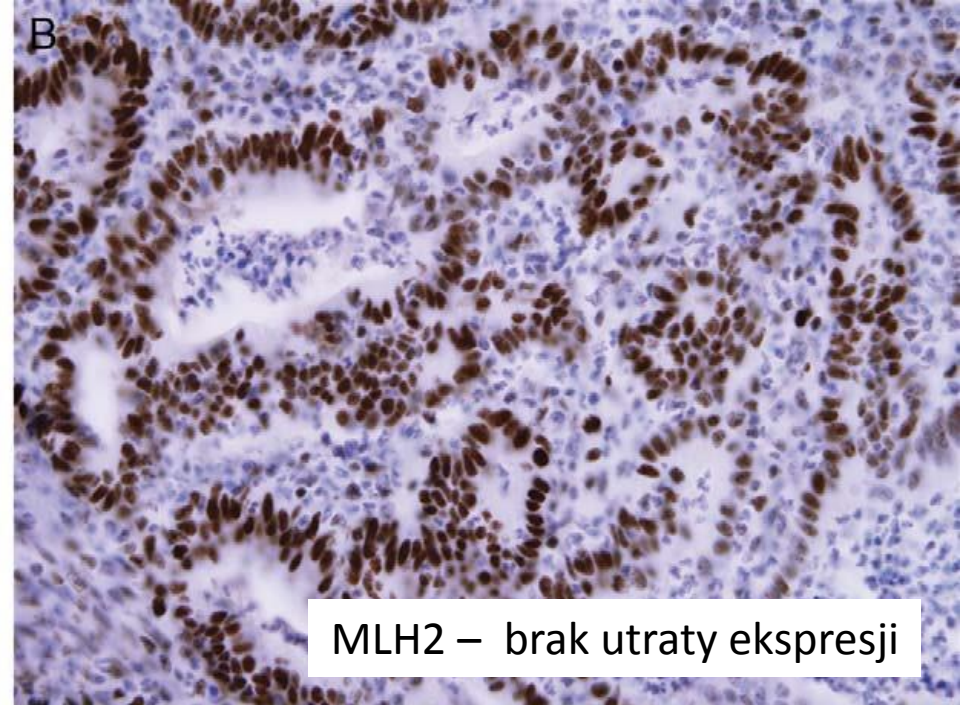
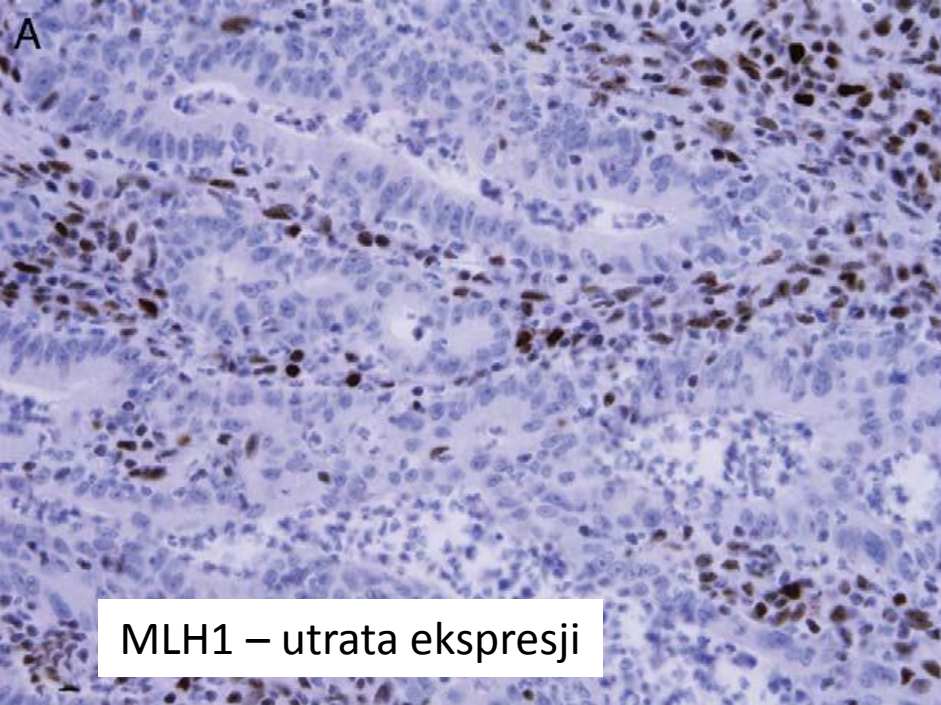
- Rak sporadyczny:

metylacja promotora *MLH1*,
mutacja *BRAF* (70% przyp)

- Model histopatologiczny MSI-H
- Lokalizacja prawostronna
- Komponenta śluzowa
- Nacieki limfocytarne w tkance guza (*tumor-infiltrating lymphocytes - TILs*)
- W pościelisku wzrost nacieków z komórek plazmatycznych
- Nacieki limfocytarne wokół guza (*Crohn-like response*)
- Podtypy raka i stopień dojrzałości:
 - wysokodojrzały: śluzowy,
 - niskodojrzały: rdzeniasty, niskozróżnicowany

MSI - badanie immunohistochemiczne

- Ekspresja MLH1, MSH2, MSH6 i PMS2 przy pomocy panelu przeciwciał dostępnych komercyjnie przy morfologii MSI-H
- Dodatnia kontrola wewnętrzna: nienowotworowe komórki limfocytarne+
- Interpretacja badania:
- **Utrata ekspresji MLH1** –metylacja promotora MLH1 w raku sporadycznym, mutacja *BRAF*
- **Utrata ekspresji MSH2, MSH6** – wskazuje na zespół Lynch'a



MSI – czynnik prognostyczny i predykcyjny

- Niestabilność mikrosatelitarna jest markerem lepszego rokowania szczególnie w stadium II i III raka jelita grubego
- Status MSI jest uważany za **marker predykcyjny dla terapii 5-fluorouracylem**
 - gorsza odpowiedź na 5-Fu
 - lepsza odpowiedź na terapię irynotekaniem

BRAF

- ***BRAF*** - cytoplazmatyczna niereceptorowa kinaza serynowo-treoninowa
- Mutacje w genie *BRAF* korelują z molekularnym typem raka jelita grubego, który charakteryzuje się MSI i fenotypem zmutowanych wysp CpG (*CpG-island methylator phenotype – CIMP*)
- ***BRAF* jako składnik szlaku RAS/RAF/MAPK oceniano jako czynnik prognostyczny i predykcyjny**
- Mutacje w *BRAF* w raku jelita grubego są związane z niekorzystnym przebiegiem choroby,

2. ASCO/CAP (2014)

Utrata ekspresji MLH1 i analiza mutacji *BRAF*

- 70% raków jg z hypermetylacją MLH1 ma mutację genu *BRAF*
- Mutacja *BRAF* – czynnik predykcyjny w odniesieniu do terapii anty-EGFR (cetuximabem i panitumumabem)
- **Czynnik predykcyjny w rakach z MSI-H:**
- Badanie IHC hypermetylacji MLH1 i analiza mutacji *BRAF* V600E lepszą metodą i mniej kosztowną od analizy mutacji germinalnych genów *MRI* (zespół Lynch'a) i raka sporadycznego MSI-H

3. ASCO/CAP (2014)

analiza molekularna statusu genów *KRAS*, *NRAS*

- Mutacja *KRAS*, *NRAS* czynnikiem predykcyjnym braku odpowiedzi na terapię anty-EGFR
- wg ASCO chorzy w IV stopniu zaawansowania rjg są kandydatami do terapii anty-EGFR,

ALE

- przed leczeniem: analiza mutacji *KRAS*
- mutacje w kodonach 12, 13, 61, 146 genu *KRAS* – brak odpowiedzi na leczenie cetuximabem
- brak mutacji *KRAS*, *NRAS* - chory z rjg z przerzutami może być leczony cetuximabem

ASCO/Aмерыkańskie Towarzystwo Patologów (CAP), październik 2013

- **Wytyczne raportowania biomarkerów w niedrobnokomórkowym raku płuca**
- ***EGFR***
- ***KRAS***
- ***ALK***

http://www.cap.org/apps/docs/committees/cancer/cancer_protocols/2013/LungBiomarker_13Template_1100.pdf

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

Neal I. Lindeman, MD; Philip T. Cagle, MD; Mary Beth Beasley, MD; Dhananjay Arun Chitale, MD; Sanja Dacic, MD, PhD; Giuseppe Giaccone, MD, PhD; Robert Brian Jenkins, MD, PhD; David J. Kwiatkowski, MD, PhD; Juan-Sebastian Saldivar, MD; Jeremy Squire, PhD; Erik Thunnissen, MD, PhD; Marc Ladanyi, MD

• **Objective.**—To establish evidence-based recommendations for the molecular analysis of lung cancers that are required to guide *EGFR*- and *ALK*-directed therapies, addressing which patients and samples should be tested, and when and how testing should be performed.

Participants.—Three cochairs without conflicts of interest were selected, one from each of the 3 sponsoring professional societies: College of American Pathologists, International

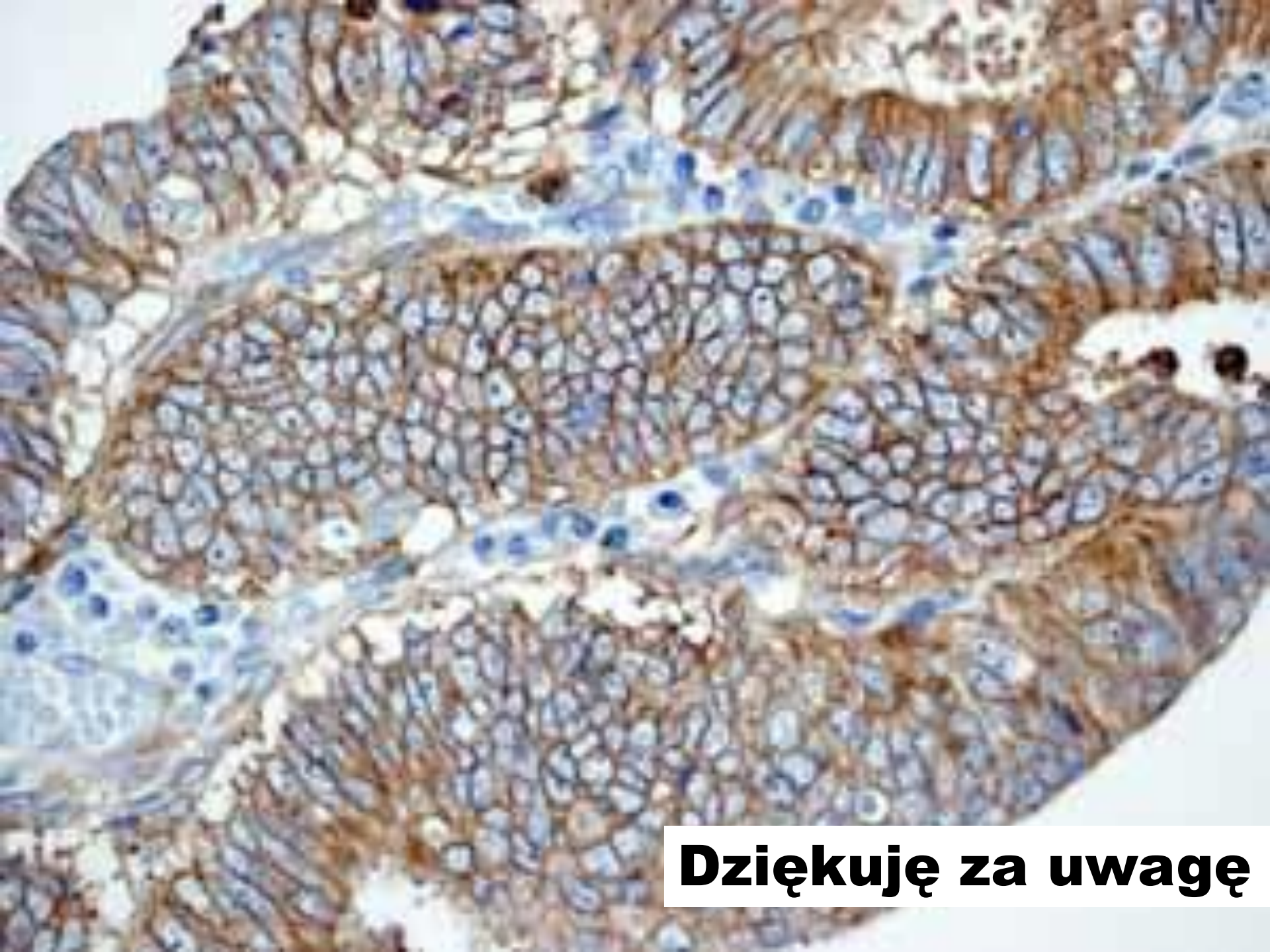
Association for the Study of Lung Cancer, and Association for Molecular Pathology. Writing and advisory panels were constituted from additional experts from these societies.

Evidence.—Three unbiased literature searches of electronic databases were performed to capture articles published from January 2004 through February 2012, yielding 1533 articles whose abstracts were screened to identify 521 pertinent articles that were then reviewed in detail for their relevance to the recommendations. Evidence was formally graded for each recommendation.

Consensus Process.—Initial recommendations were for-

Accepted for publication February 12, 2013.

(*Arch Pathol Lab Med.* 2013;137:828–860;



Dziękuję za uwagę