



# УЧЕБНА КНИГА

текстове за продължаващо  
медицинско обучение

# 2017



## ПРЕДИКТИВНИ БИОМАРКЕРИ В ОНКОЛОГИЯТА

методи за изследване  
и клинично приложение

19–21 октомври 2017, Варна



AMGEN®

**W**  
Actavis

Shire

SANOFI 

# **ПРЕДИКТИВНИ БИОМАРКЕРИ В ОНКОЛОГИЯТА** **методи за изследване и клинично приложение**

---

ТЕКСТОВЕ ЗА ПРОДЪЛЖАВАЩО МЕДИЦИНСКО ОБУЧЕНИЕ







# УЧЕБНА КНИГА 2017

## **ПРЕДИКТИВНИ БИОМАРКЕРИ В ОНКОЛОГИЯТА**

**методи за изследване  
и клинично приложение**

---

ТЕКСТОВЕ ЗА ПРОДЪЛЖАВАЩО  
МЕДИЦИНСКО ОБУЧЕНИЕ

*Под редакцията на  
доц. д-р Димитър КАЛЕВ, дм  
и д-р Ася КОНСУЛОВА, дм*



**АРТ ТРЕЙСЪР**

Варна, 2017



*МОРЕ 2017 благодарни на AstraZeneca за подкрепата в издаването на  
тази учебна книга*

© Алексей Савов, Ася Консулова, Борис Петров, Галина Кирова, Георги Балаценко, Драга Тончева, Ирена Костадинова, Красимир Киров, Красимир Петров, Маргарита Генова, Мариела Василева, Милка Георгиева, Милчо Минчев, Полина Дамянова, Павел Бочев, Павел Станимиров, Радка Кънева, Радослава Въжарова, Савелина Поповска, Савина Хаджидекова, Соня Сергиева, Светлана Христова, Татяна Хаджиева – *автори, 2017*

© Димитър Калев – *съставител и редактор, 2017*

© Ася Консулова – *редактор, 2017*

© АРТ ТРЕЙСЪР – *издател, 2017*

ISBN 978-619-7094-33-6

[www.more-conference.com](http://www.more-conference.com) – официален сайт на *МОРЕ 2017*

Под егидата на  
Община Варна









## ВЪВЕДЕНИЕ

Тази книга е част от работата на Националния експертен борг за предиктивни биомаркери в онкологията, *MOPE 2017*. Замислена е като сборник от статии в стил *State of the Art*. Главната ѝ цел е да достигне до българските лекари, практикуващи онкология, и да послужи за тяхното продължаващо медицинско обучение (Continuing Medical Education).

Съдържанието на Учебната книга включва 18 статии върху най-съвременните предиктивни модели при солидни тумори и хематологични неоплазии. Всички автори текстовете провеждат и налагат определен стил на онкологично мислене – медицина, основана на доказателства, с дефинирани степени на препоръчителност. Идеалният модел пред локалните възможности, експертното становище пред финансово-политическата конюнктура – това е кредо на авторите в тази книга. Освен образователна, текстовете притежават и възпитателна функция – да вложат в социалното съзнание и в организацията на здравеопазване респект към лидерската роля на националните експерти по онкология.

Учебната книга на Осмата национална конференция *MOPE 2017* е работена и се публикува паралелно с *Националното ръководство за предиктивни биомаркери в онкологията* и в известен смисъл обогатява неговото съдържание. И двата документа добавят към българската клинична онкология неща, които читателят може да приложи и провери в ежедневната клинична практика.

доц. д-р Димитър Калев

*Председател на Организационен комитет MOPE 2017*





---

**ПРЕДИКТИВНИ БИОМАРКЕРИ –  
НАДЕЖДИ И СКЕПСИС**

---

**д-р Ася Консулова, дм**

Българско онкологично научно сдружество



# ПРЕДИКТИВНИ БИОМАРКЕРИ – НАДЕЖДИ И СКЕПСИС

*д-р Ася Консулова, дм*

Българско онкологично научно сдружество

## ОБЗОР

*Цел на тази статия е описание и разграничаване на прогностични и предиктивни биомаркери въз основа на клинични данни и официални статистически тестове. Дефинира се понятието биомаркер като измервателна променлива, която е свързана с изход от болестта.*

*В клиничната терминология често има смесване на понятията предиктивен и прогностичен биомаркер. Направен е опит за характеризиране на видовете биомаркери, начините за тяхното валидиране, статистическо изследване и въвеждане в клиничната практика. Тази статия разглежда и сегашния концептуален статус на биомаркерите като клинични и диагностични инструменти и като крайни точки в клиничните изследвания с цел осигуряване на контекст за интерпретация на самите маркери, тяхната валидност и място им в клиничната практика. Обсъждат се трудностите в процеса на валидиране и някои „грешки“ при клиничната им интерпретация.*

## Увод

В научните изследвания, както и в клиничната практика широко се използват биомаркери и тяхното присъствие като първични крайни точки вече се приема за стандарт. Нуждата от предиктивни биомаркери се налага и от развитието на геномните технологии, които позволяват характеризиране на туморите на молекулярно ниво и откриване на таргети, към които потенциално да бъдат създадени нови прицелни молекули. След поставяне на диагнозата чрез тъкан от първичния тумор или неговите метастази, молекулярният профил и хетерогенността на тумора могат да бъдат

проследени и в динамика чрез значително по-нови и по-малко инвазивни техники като течната биопсия, позволяваща изследване на туморни клетки и ДНК многократно. Развитието на персонализираната медицина и необходимостта от създаване на критерии за избор на лечение поставят нови изисквания за идентифициране на биомаркери, които да дефинират група пациенти, които биха имали най-голяма потенциална полза от провежданото лечение.

Когато даден специфичен биомаркер е детайлно характеризиран и способността му за корелация със съответен клиничен резултат при определена група пациенти е

доказана, неговата употреба е напълно оправдана. В много случаи обаче „валидността“ на биомаркера се приема за факт, а в действителност тя трябва да продължи да бъде оценявана и характеризирана. Различните биомаркери могат да имат доказана прогностична или предиктивна стойност (или и двете), но употребата им да включва по-широки интерпретации, които са още недоведени или в ход на изследване.

## Дефиниции и термини

В българското ръководство на Националния експертен борд за „Предиктивни и прогностични биомаркери в онкологията – методи за изследване и клинично приложение“, *MOPE 2017*, са изведени няколко 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.<sup>1</sup> Те отразяват клинична крайна цел (преживяемост, отговор към лечение и др.) или сурогатна цел.

**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.<sup>1</sup> Туморните биомаркери биват прогностични, предиктивни, фармакодинамични и сурогатни. Всеки биомаркер може да служи за повече от една цел и да принадлежи към повече от една категория.

**1. Прогностични туморни биомаркери:** състояния или характеристики на пациента, които могат да бъдат използвани за оценка на шанса за възстановяване от болест или на риска от рецидив и за които е доказана сигнификантна връзка с показател

или резултат, независимо от приложеното лечение.<sup>2</sup> Прогностичният биомаркер е наличен в даден момент от време (при поставяне на диагноза, при откриване на рецидив и т.н.) и корелира с преживяемостта на пациента при липса на лечение (естествен ход на болестта) или при провеждане на стандартно лечение.<sup>3</sup> С други думи, ако даден биомаркер е прогностичен и се провежда ефективно лечение, лечебната полза е сходна и за биомаркер-позитивните, и за биомаркер-негативните пациенти; този биомаркер обаче ще се свързва с различна преживяемост в зависимост дали е експресиран или не. (*Фиг.1*). Допълнително, разликите в преживяемостта между изследваната група и стандартното лечение между пациентите в биомаркер-позитивната и биомаркер-негативната група са еднотипни. Важно е да се отбележи, че прогностичен биомаркер дава информация за естествения ход на болестта и нейната биология. Той разделя популацията на пациенти с добра и лоша прогноза, независимо от лечението, но не определя избора на конкретно лечение. Пример за това е нелекувания карцином на гърда с хормонални рецептори, който (ако остане нелекуван) е с по-добра прогноза от нелекуван карцином на гърда в същия стадий без хормонални рецептори.

Друг пример за прогностичен биомаркер е нивото на PSA при поставяне на диагноза простатен карцином. Такъв е и мутационният статус на *PIK3CA* при жени с HER2-позитивен метастатичен карцином на гърда, което е доказано в биомаркерния анализ на проучването CLEOPATRA.<sup>4</sup> Наличието на карцином на гърда с *PIK3CA* мутация е белег за по-лоша преживяемост без прогресия (ПБП) спрямо дивия тип тумори, независимо от вид провеждано лечение (*Фиг.1*). Средната ПБП при наличие на мутация в *PIK3CA* е 9.6 спрямо 13.8 месеца за съответно контролната група и за тази с

*pertuzumab*-съдържащо лечение; при *giv* тип *PIK3CA* е съответно 12.5 и 21.8 месеца.

**2. 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 и предсказват полза/липса на ефект от провеждано лечение (експериментално спрямо стандартно лечение). Така биомаркерът разделя популацията пациенти на две групи – биомаркер позитивна и негативна група, при които ефектът от лечение е различен. За да се приеме, че даден биомаркер е предиктивен, е необходимо да бъде доказан в клиничното проучване (за предпочитане 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.<sup>3</sup> Различават се количествено и качествено взаимодействие при предиктивните маркери.

Като пример за предиктивен биомаркер с количествено взаимодействие може да се посочи наличието на активираща мутация в *EGFR* при пациенти с недребноклетъчен карцином на бял дроб (НДКБД), които провеждат поддържащо лечение с *erlotinib*<sup>5</sup> (Фиг.2). Пациентите с активираща мутация в *EGFR* имат HR за ПБП 0.10 (95% CI, 0.04 до 0.25;  $p < 0.001$ ) при сравнение на *erlotinib* спрямо плацебо, докато пациентите с *giv* тип *EGFR* имат HR 0.78 (95% CI, 0.63 до 0.93;  $p = 0.019$ ). Това е пример, в който и двете групи (биомаркер позитивни и негативни) имат полза от прилаганото лечение с *erlotinib*, но ползата при наличие на мутация е значително по-висока (HR, 0.10) спрямо *giv* тип тумори (HR, 0.78). Това е пример за количествено взаимодействие, тъй като има полза и за двете групи пациенти.

При наличие на качествено взаимодействие, биомаркерът разделя популацията пациенти на две – биомаркер-позитивни и негативни като една от тези групи е със, а другата е без полза от съответното лечение. Такъв пример е ранният HER2-позитивен карцином на гърда, лекуван или не адювантно с *trastuzumab* – след проведен транскриптомен анализ като биомаркер се извежда наличието на панел от гени, свързани с имунната функция (Фиг. 3).<sup>6</sup> Пациенти с експресия на над 9 от 14 гена, регулиращи имунната функция, имат полза от лечение с *trastuzumab* (HR, 0.36; 95% CI, 0.23 до 0.56;  $p < 0.001$ ), докато при липса или ниска такава експресия – няма полза от адювантно лечение (HR, 0.98; 95% CI, 0.68 до 1.41;  $p = 0.91$ ). Така биомаркерът разделя популацията на две спрямо качеството на полза – налична или не.

**3. Фармакодинамичните биомаркери** измерват краткосрочния ефект от лечение върху тумора (или приемника при малигнените хемопатии) и могат теоретично да бъдат използвани за избор на доза на лечение в ранните етапи на клинични проучвания на противораковите терапии. При цитотоксична терапия дозата, която определя противотуморната активност във фаза II клинични проучвания, обикновено е максимално поносимата, изведена от предхождащите фаза I проучвания за ескалиране на дозата. При таргетна терапия ситуацията може да е различна и определянето на подходяща доза става чрез измерване на влиянието, което съответната молекула оказва върху тумора. Като пример за фармакодинамичен биомаркер може да се даде приложението на *imatinib* при хронична миелоидна левкемия, който блокира протезинкиназната активност на BCR-ABL в туморните клетки и индуцира клинична ремисия; това се постига в дози, които са доста по-ниски от токсичните.<sup>7</sup> Степента на блокиране на киназната

активност BCR-ABL корелира с преживяемостта, което потенциално би могло да доведе до персонализирано определяне на дозата на тирозинкиназния инхибитор.<sup>8</sup>

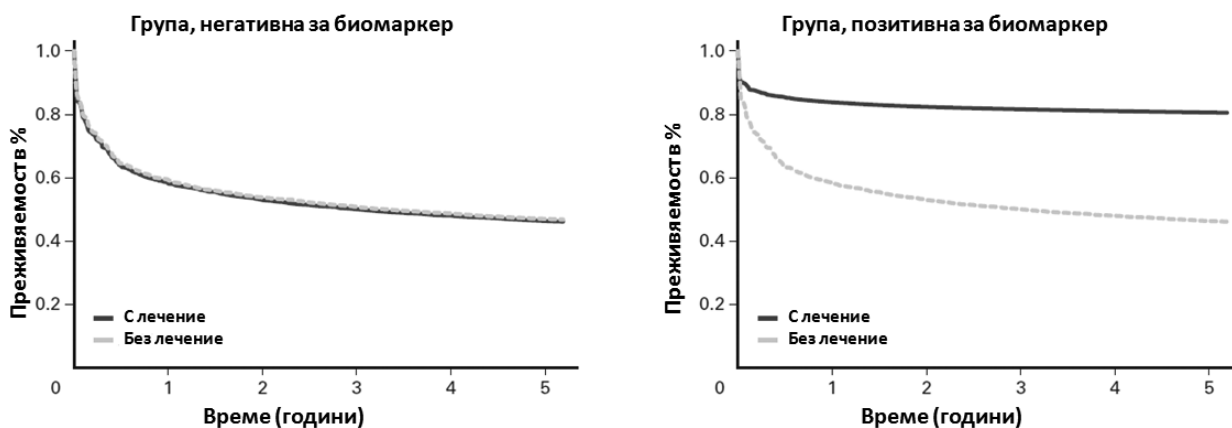
**4. Сурогатните биомаркери** имат значителна роля в процеса на разработване на лекарства. Разходите за лечение в онкологията постоянно нарастват и затова става все по-необходимо да се следи биологична активност, да се подбират и стратифицират пациенти, които най-вероятно биха имали полза от дадено лечение с определена оптимална биологична доза.<sup>9</sup> В допълнение, когато се използва като цел във фаза II скринингови клинични изпитвания, сурогатните биомаркери могат да предоставят насоки за изследване на биологични пътища за последващо по-големи фаза III проучвания. Сурогатните крайни точки имат потенциала да предоставят информация по-бързо и с по-малко усилия в сравнение с традиционните крайни точки в големи проучвания, при които изискване е участниците да бъдат проследявани за дълъг период от време, често с години. Те могат да предоставят доказателства, когато се използват в клинични проучвания фаза III в корелативна връзка с установени клинични параметри и преживяемост. Ако

се валидират, тези биомаркери могат да бъдат в последствие използвани в клиничната практика за помагане измерването на отговор от приложено лечение.

В три фигури (Фиг.1, 2 и 3) са представени идеализирани варианти за чисто прогностичен биомаркер (Фиг.1), чисто предиктивен (Фиг.2) и за биомаркер с предиктивна и прогностична стойност (Фиг.3).

### Надежди или скепсис

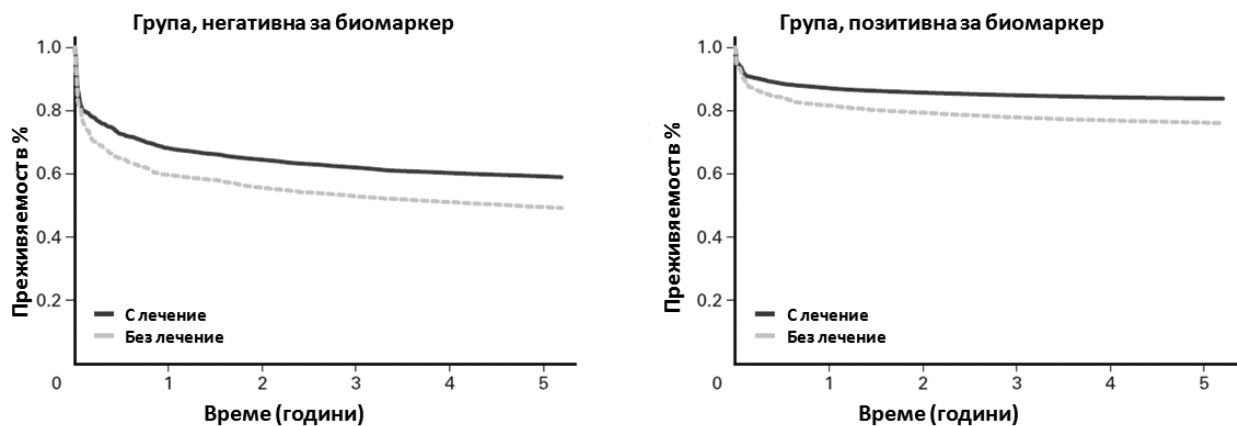
Биомаркерите са различни видове и включват биохимични, ензимни, спектрометрични, имунологични или молекулярни промени и други. Предпоставка за използване на биомаркери в медицината е, че наличието или измерването на маркера могат да са индикатор за наличие на специфична болест или биологичен процес. Най-новите публикации за биомаркери в онкологията охватват успешно валидиране, а всъщност невъзможността за валидиране на множество биомаркери в клиничната практика. Ползността на даден маркер зависи от много фактори, включително възможността за повторяемостта му осъществяване на пациенти в реалния живот, удобството на получаване



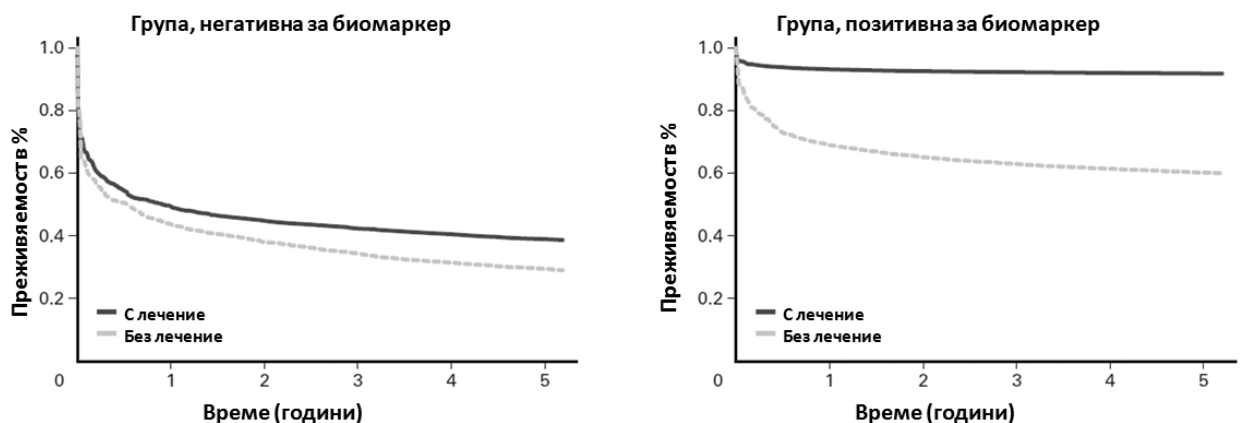
**Фигура 1.** Идеализиран пример за чисто прогностичен биомаркер. Положителните за биомаркера пациенти имат по-добра преживяемост, отколкото биомаркер-отрицателната група, независимо дали се провежда лечение. Фактът, че ефектът от лечението е еднакъв за биомаркер-негативни и биомаркер-позитивни пациенти, показва, че биомаркерът няма предиктивно значение.



## ПРЕДИКТИВНИ БИОМАРКЕРИ – НАДЕЖДИ И СКЕПСИС



**Фигура 2.** Идеализиран пример за чисто предиктивен биомаркер. Терапевтичен ефект има само за групата пациенти, позитивна за биомаркер; липсва ефект от лечение при групата, негативна за биомаркер. Следователно ефектът от лечение се различава в качеството между групите. Освен това биомаркерът не е прогностичен, тъй като при липса на лечение и двете групи имат сходна преживяемост, независимо от биомаркера. Това е пример за качествено взаимодействие.



**Фигура 3.** Идеализиран пример за биомаркер, който е и предиктивен, и прогностичен. Предиктивността се изразява в различен ефект от лечение в двете групи (има по-голям ефект от лечение в групата, позитивна за биомаркера). Биомаркерът е и прогностичен, тъй като групата, позитивна за биомаркера, е с по-добра преживяемост в сравнение с биомаркер-негативните пациенти, независимо от проведено или не лечение. Това е пример за количествено взаимодействие.

напроби или тяхното разчитане и разбира се – способността за проследяване на развитието на болестта или оценка на ефекта от провеждано лечение в условията на реалната клинична практика. Съществуват и биомаркери, които имат както предиктивни, така и прогностични корелации.<sup>3</sup>

За да е удачен за употреба в клиничната онкологична практика, биомаркерът трябва да притежава много качества. Да се експе-

сира в организма в количества, които да се откриват лесно (примерно в кръвна проба) още преди клиничната изява на туморна болест. Това е почти невъзможно, поради което голямата част от биомаркерите добре откриват наличие на болест в напреднал стадий, но не и в ранните етапи. Биомаркерът трябва да е и тъканно или органно специфичен и неговите нива да са значително променени при наличие на туморна болест,

за да може да отдиференцира малигнената трансформация. И още – други бенигнени състояния (хиперплазия, възпаление и др.) на тази тъкан или орган да могат да бъдат отдиференцирани от малигнена болест според стойностите на този биомаркер. Тези характеристики липсват при по-голямата част от биомаркерите (вкл. PSA, CA 125 и др.), използвани в онкологията и по тази причина е трудно откриване на нови.

Възникват много проблеми и в хода на откриване и валидиране на биомаркерите. Най-общо могат да се класифицират като пре-, аналитични и постаналитични.

**Преаналитична фаза.** В нея се включват всички моменти преди получаване на пробата и факторите, които биха повлияли крайния резултат. Важно да се изследва дали различни индивидуални характеристики на пациента (като възраст, диета, пол, етническа принадлежност, начин на живот, прием на лекарства и др.) и/или съхранение на тъканната проба могат самостоятелно да повлияят нивата на биомаркера. В допълнение, възможно е молекулата бързо да се изчисти от кръвообращението чрез метаболизъм в бърбреди, черен дроб или примерно серумни протеази. След събирането на пробата, биомаркерът може да се освобождава от кръвни клетки (напр. при лиза на еритроцити или еозинофили) или при съсирване или центрофугиране, което да променя първоначалната му концентрация.

**Аналитична фаза.** Тя включва аспекти, които могат да повлияят анализа на маркера или да са от значение след това за интерпретацията на данните. В аналитичната фаза трябва да има наличен количествен и валидиран аналитичен метод, който да е силно специфичен, чувствителен и точен, за да се избегнат вариации или отклонения в измерването (т.е. измерване на различна от реалната концентрация) или артефакти. Трябва да има достатъчно голям брой висо-

кокачествени тъканни проби за валидиране, за да може да се изведат статистически значими резултати недвусмислено.

**Постаналитична фаза.** Тя е от съществено значение стабилното тълкуване на данните, така че резултатите да могат да бъдат обобщени към други серии от образци или общо население. Статистическите и биоинформативните анализи, които се подбират за интерпретация на данните, не трябва да позволяват възникване на артефакти или отклонения, които да идентифицират „многообещаващи“ или „интерпретируеми“ данни.<sup>10</sup>

Употребата на прогностичните маркери цели получаване на информация за преживяемостта при пациенти с онкологична болест; така се улеснява диагностичният процес и се дава основание за последващи поинвазивни диагностични или терапевтични процедури. Оптимизирането на последващите терапевтични процедури е предпоставка за търсене и развитие на предиктивни биомаркери. Възможно е дадена молекула да има както прогностична, така и предиктивна стойност, което прави разграничаването на двете функции трудно и може да внесе нежелание за употребата му. Такъв пример е метилационният статус на промотора на *O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA-methyltransferase* или MGMT при пациенти с мултиформен глиобластом. Този ген кодира важен белтък, който извършва репаративни промени върху ДНК – премахва алкилиращи продукти от *O<sup>6</sup>*-мястото на гуанин и така поддържа клетъчната цялост. Епигенетичното хиперметиране на промоторния регион води до заглушаване на гена и загуба на неговата транскрипция и белтък.<sup>11</sup> Така ДНК репарацията се затруднява и се нарушават алкилиращи групи при лечение с алкилираща химиотерапия с *carmustine* (BCNU), *lomustine* (CCNU) или *temozolomide* – активността на тези медикаменти нараства. Този пример потвърж-



дава как известен прогностичен фактор чрез възможностите на фармакогеномиката развива и предиктивно значение, което е потвърдено и в метаанализ върху 44 проучвания с 4097 пациенти; потвърждава се, че наличието на метилиран *MGMT* промотор е прогностичен фактор при пациентис мултиформен глиобластом, тъй като те имат по-дълга ОП спрямо пациентите с тумори с неметилиран промотор (pooled HRs, 0.494; 95% CI 0.412-0.591;  $p = 0.001$ ). Тази зависимост, обаче, не се потвърждава за ПБП (pooled HRs, 0.653; 95%CI 0.414-1.030;  $p = 0.067$ ).<sup>12</sup> Допълнително обръкване обаче внася и фактът, че прогностичната или предиктивна роля на този биомаркер зависи и от друг фактор – наличие или не на мутация в IDH1.<sup>13</sup> Мутация в IDH1 е спрогностична-стойност, тъй като пациентите с тумори с метилиран *MGMT* промотор са с удължена ПБП, независимо от провежданото лечение – химиотерапия ± лъчелечение. При липса на мутация в IDH1, удължаване на ПБП е налична само при пациентите, лекувани с химиотерапия, но не и при тези, които са лекувани само с лъчелечение.<sup>13</sup> Така е възможно комбинираното изследване на IDH1/*MGMT* да улесни клиничното решение при тази трудна за лечение туморна локализация.

Предиктивните биомаркери все повече се изследват едновременно с откриването и фармацевтичното разработване на дадена молекула и цялостно персонализиране на лечението. При все това, все още е малък броят на валидните биомаркери, които могат да предскажат полза или липса на ефект от лечение. Много биомаркери се цитират и често се надценява стойността им – това се описва в метаанализи. Изпитванията за доказване на хипотезата често са с относително малък брой пациенти и така предоставят първите сигнали за възможно наличие на взаимодействие на биомаркера с преживяемост или ефект от лечение. Налична е

тенденция за над- или подценяване на истинската взаимовръзка. *Ioannidis* и *Panagiotou*<sup>14</sup> разкриват, че са необходими доказателства от множество(при това големи) проучвания, за да се оцени способността за дискриминиране на тези развиващи сепотенциални биомаркери; бързото одобрение и въвеждане в клиничната практика при липса на такива доказателства може да бъде подвеждащо. Развитието на биомаркерите се провежда паралелно на терапевтичните изследвания и има едни и същи потенциални влияния и отклонения. Поради това е изключително важно изследванията на биомаркерите да се придържат към статистическите принципи и да следват солидна статистическа методология, за да се сведе до минимум отклонението и да се постигне максимална точност.

### Насоки за развитие на биомаркерите

Откриването на предиктивни/прогностични биомаркери, както и тяхното валидиране в рандомизирани клинични изпитвания доведе до създаването на предиктивни модели. Като предиктивен модел се дефинира математическа връзка между независими помежду си променливи и изходна (зависима) променлива с цел предикция на бъдещ резултат въз основа на стойностите на независимите променливи. Пример за такъв предиктивен модел е създаването на номограма, предсказваща вероятността пациент да не умре от простатен карцином (зависима променлива) в рамките на 10 години след радикална простатектомия.<sup>16</sup> Независимите променливи (биомаркери) на този модел са възраст, нива на PSA, оценка по *Gleason*, клиничен стадий на карцинома и броя позитивни и отрицателни кор-биопсични проби при поставяне на диагноза. Независимите променливи в предиктивните модели често са прогностични сами по себе

си, но статистиките се отнасят към тях като предиктивни променливи, което може да доведе до объркване в тълкуването.

При все това, подобни модели не са от полза за определяне на отговор към конкретно лечение, тъй като включват данни от момента на поставяне на диагноза. Предиктивност към дадено лечение често е необходимо при напреднала/метастатична болест или многократно при следващи прогресии предвид променящите се геномни характеристики на туморите. По тази причина генотипизиране на туморна ДНК се оказва много полезно за предсказване на отговор към лечение и това може да се осъществи чрез течна биопсия. Определянето на мутационния статус на конкретни гени има значение примерно при недребноклетъчен белодробен карцином<sup>12</sup>, мултиформен глиобластом<sup>18</sup>, ХМЛ<sup>8</sup> и др. Допълнително, откриването на вторични мутации, водещи до загуба на ефект от лечение, допълват ролята на тези техники в динамика в хода на развитие и прогресия на болестта и развитието на вторична резистентност към провеждано лечение.

Много от противотуморните медикаменти таргетираат специфични молекулярни пътища. Потенциален вариант за търсене на предиктивност към даден медикамент би бил откриване на специфични за конкретния път биомаркери. Активността на даден път може да бъде определена чрез антители, които разпознават субстрат от този път, което означава, че той е активен и функционира. Типичен пример са фосфо-специфичните антители, които разпознават фосфорилираните субстрати на различни протеин-кинази. Такива антители се използват и в клинични изпитвания.<sup>12</sup> До сега използване на активни сигнални пътища е изследвано само в контекста на известна генетична лезия. По-широкомащабен подход чрез използване примерно на спектроме-

трия може да служи за начална „скринираща“ стъпка за откриване на определени секвенции, които да идентифицират подобна генетична лезия. Откриване на пост-транслационни модификации като ацетилирани или убиквитирани протеоми могат да установят интересни модификации. Тези подходи са свързани с директно измерване на субстратите на сигналните пътища, но подлежащата концепция е активиране на генетичен път, свързан с определена генетична сигнатура. Така са създадени клетъчни линии, които експресират специфични онкогени, което се използва при тумори със специфични промени в сигналните пътища както примерно загубата на *PTEN*.<sup>19-21</sup>

## Статистически съображения

### *Клинична полза и доказателственост.*

За клинично доказан биомаркер се приема такъв, който е изследван в проспективно клинично проучване, в чийто дизайн е включено тестване на биомаркер или съвместими резултати от  $\geq 2$  сходни проспективни клинични проучвания, в чийто дизайн не е включено тестване на биомаркер.<sup>4</sup>

***Валидиране и статистическо тестване.*** За да се определи дали даден биомаркер е потенциално предиктивен или прогностичен, трябва да се проведе официален тест за взаимодействието му с лечебната група. За променливата време до възникване на събитие (като ОП, ПБП и др.) се използва пропорционален модел на *Cox*, който съдържа минимум лечебната група, биомаркера и определяне на взаимодействието при лечение според биомаркера.<sup>22</sup> Чрез такъв анализ се изследва взаимодействието между лечебната група, биомаркера и преживяемостта; тази връзка трябва да е статистически значима. При предиктивен биомаркер, стойността на *P* за лечение според биомаркера при този модел трябва да е по-малка от 0.05

(или предварително определеното ниво на статистическа значимост). Значима връзка при лечение спрямо биомаркера показва, че ефектът от лечението се различава според биомаркерната стойност. И обратно: ако тестът за взаимодействие не е значим (и проучването е с достатъчна сила за изследване на взаимодействие), биомаркът е прогностичен, ако стойността  $P$  на биомаркера е статистически значимо свързана с преживяемостта в модела (независимо от проведеното лечение).<sup>22,23</sup>

В примерите по-горе *PIK3CA* не е предиктивен, тъй като взаимодействието на лечението (*pertuzumab*-съдържаща схема срещу контролна група на стандартно лечение) според биомаркера (статус на *PIK3CA*) не е статистически значимо ( $p > .05$ ). Това означава, че наличието на мутирал или *wt* тип *PIK3CA* не е предиктивен биомаркер за отговор към *pertuzumab*-съдържащо лечение. Обратно, *EGFR* мутационният статус е предиктивен биомаркер, тъй като взаимодействието на лечението (*erlotinib* срещу плацебо) с *EGFR* мутационния статус е статистически значимо ( $p < .001$ ). И накрая, състоянието на наличие на панел от имуно-активиращи гени е също предиктивно, тъй като взаимодействието на лечението (химиотерапия плюс *trastuzumab* срещу самостоятелно химиотерапия) и наличието на панел от имуно-активиращи гени е статистически значимо ( $p < .001$ ). Подробности по отношение на начина на извършване на тестовете за взаимодействие не са детайлизирани тук.

### Потенциални проблеми и грешки

Често има припокриване между различните видове биомаркери или погрешно смесване на терминологията. Като пример за това е прогностичния маркер PSA, за който предсказва риск от рецидив на простатния

карцином. Така може да се приеме, че PSA е предиктивен маркер, а всъщност не е, тъй като той предсказва преживяемост, независимо от провежданото лечение.

Друга често срещана грешка е анализиране само на групата пациенти, получили дадено изследвано лечение (примерно фаза II проучване с едно рамо): В случай, че положителната група за биомаркера (или биомаркер-отрицателната група) има по-добри резултати в сравнение с биомаркер-отрицателната група (или съотв. биомаркер-положителната група). В този случай няма сравнителна група (напр. съставена от нелекувани пациенти или пациенти, лекувани различно в две рамена на рандомизирано изпитване) и така не може да се извърши формален статистически анализ за взаимодействие между лечение и биомаркер.

Подобна грешка е и анализ, който се състои само от група пациенти с позитивен биомаркер (или негативен), при която има ефект на провежданото лечение (т.е. лекуваните пациенти преживяват повече от нелекуваните пациенти). Отново липсва група за сравняване (т.е. пациенти с отрицателен биомаркер и нелекувани пациенти). Може да се окаже, че биомаркърът е или предиктивен, или прогностичен, но това не може да бъде определено при такъв модел.

Непровеждане на статистически анализ за избор на лечение спрямо дадения биомаркер е неправилно, тъй като субективната оценка на кривите на преживяемост се считат за достатъчно доказателство за предсказване на ефект. Така ефектът от лечение може да изглежда различен за биомаркер-положителна и биомаркер-негативната група, изборът на лечение спрямо биомаркера трябва да бъде официално изпитан, за да се гарантира, че наблюдаваният ефект на лечение между групите не е случайно явление или резултат от произволна вариация.<sup>22-24</sup>

## Заклучение

За да се докаже предиктивна стойност на даден биомаркер, той трябва да бъде изследван в клинично изпитване като всички пациенти, лекувани или не с лечение, за което се търси предиктивната му стойност, трябва да бъдат изследвани за биомаркера. Трябва да се прведе статистически анализ за връзката между изследвания биомаркер и лечението и той да бъде статистически значим.

За да се установи прогностична стойност на биомаркер, трябва да се докаже статистически значима връзка между неговите нива и преживяемост при група пациенти като това няма връзка с провеждано лечение; ефектите от дадено провеждано лечение не зависят от стойностите на този прогностичен биомаркер.

Възможно е и даден биомаркер да има както предиктивна, така и прогностична стойност.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Biomarkers Definition Working Group. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Therapeutics* 2001;69: 89-95
2. NCI Dictionary of Cancer terms, National Cancer Institute, 2017, available at: <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms>
3. 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
4. Baselga J, Cortés J, Im SA , et al. Biomarker analyses in CLEOPATRA: A phase III, placebo-controlled study of pertuzumab in human epidermal growth factor receptor 2-positive, first-line metastatic breast cancer. *J Clin Oncol*2014; 32: 3753-3761
5. Brugger W, Triller N, Blasinska-MorawiecM, et al. Prospective molecular marker analyses of EGFR and KRAS from a randomized, placebo-controlled study of erlotinib maintenance therapy in advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2011;29: 4113-4120
6. Perez EA, Thompson EA, Ballman KV, et al. Genomic analysis reveals that immune function genes are strongly linked to clinical outcome in the North Central Cancer Treatment Group n9831 Adjuvant Trastuzumab Trial. *J Clin Oncol*2015; 33: 701-708
7. Sweet K, Zhang L, Pinilla-Ibarz J. Biomarkers for determining the prognosis in chronic myelogenous leukemia. *J Hematol Oncol* 2013; 6:54
8. Shah NP, Kim DW, Hochhaus A, et al. Potent, transient inhibition of BCR-ABL with dasatinib 100 mg daily achieves rapid and durable cytogenetic responses and high transformation-free survival rates in chronic phase chronic myeloid leukemia patients with resistance, suboptimal response or intolerance to imatinib. *Haematologica* 2010; 95(2):232-240
9. Fleming TR, DeMets DL. Surrogate end points in clinical trials: are we being misled? *Ann Intern Med* 1996; 125:605-613
10. Diamandis PE. Cancer Biomarkers: Can We Turn Recent Failures into Success?. *J Natl Cancer Inst* 2010; 102(19): 1462-1467
11. Esteller M, Herman JG. Generating mutations but providing chemosensitivity: the role of O6-methylguanine DNA methyltransferase in human cancer. *Oncogene* 2004; 23(1):1-8
12. Binabaj MM, Bahrami A, ShahidSales S, et al. The prognostic value of MGMT promoter methylation in glioblastoma: A meta-analysis of clinical trials. *J Cell Physiol* 2017; doi: 10.1002/jcp.25896. [Epub ahead of print]
13. 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
14. Ioannidis JP, Panagiotou OA. Comparison of effect sizes associated with biomarkers reported in highly cited individual articles and in subsequent meta-analyses. *J Am Med Assoc*2011;305: 2200-2210
15. Gosho M, Nagashima K, Sato Y. Study Designs and Statistical Analyses for Biomarker Research. *Sensors (Basel)* 2012; 12(7): 8966-8986
16. Stephenson AJ , Scardino PT, Eastham JA , et al. Preoperative nomogram predicting the 10-year probability of prostate cancer recurrence after radical prostatectomy. *J Natl CancerInst*2006; 98: 715-717



## ПРЕДИКТИВНИ БИОМАРКЕРИ – НАДЕЖДИ И СКЕПСИС

---

17. Sharma SV, Bell DW, Settleman J, Haber DA. Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *Nat Rev Cancer* 2007;7(3):169-181
18. Cloughesy TF, Yoshimoto K, Nghiemphu P, et al. Antitumor activity of rapamycin in a Phase I trial for patients with recurrent PTEN-deficient glioblastoma. *PLoS Med.* 2008;5(1):e8. doi: 10.1371/journal.pmed.0050008.
19. Mehrian-Shai R, Chen CD, Shi T, et al. Insulin growth factor-binding protein 2 is a candidate biomarker for PTEN status and PI3K/Akt pathway activation in glioblastoma and prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104(13):5563-5568
20. Saal LH, Johansson P, Holm K, et al. Poor prognosis in carcinoma is associated with a gene expression signature of aberrant PTEN tumor suppressor pathway activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104(18): 7564–7569
21. Bild AH, Guang Yao G. Chang JT, et al. Oncogenic pathway signatures in human cancers as a guide to targeted therapies. *Nature* 2006; 439:353-357
22. Polley MY, Freidlin B, Korn EL, et al. Statistical and practical considerations for clinical evaluation of predictive biomarkers. *J Natl Cancer Inst* 2013; 105: 1677-1683
23. Peterson B, George SL. Sample size requirements and length of study for testing interaction in a  $2 \times k$  factorial design when time-to-failure is the outcome [corrected]. *Control Clin Trials* 1993;14: 511-522
24. Simon RM, Paik S, Hayes DF. Use of archived specimens in evaluation of prognostic and predictive biomarkers. *J Natl Cancer Inst* 2009;101: 1446-1452



////////////////////////////////////  
**ТРИТЕ ВЪПРОСА НА "СФИНКСА" НА ОНКОЛОГИЧНАТА  
ПРЕДИКЦИЯ – КОГА, КАК, ЗАЩО**  
////////////////////////////////////

**г-р Мариела Василева, гм**

*УМБАЛ Александровска, София*





# ТРИТЕ ВЪПРОСА НА "СФИНКСА" НА ОНКОЛОГИЧНАТА ПРЕДИКЦИЯ – КОГА, КАК, ЗАЩО

*д-р Мариела Василева, дм*

УМБАЛ Александровска, София

## ОБЗОР

*Статията представлява съвременен обзор на принципите, върху които клиничната онкология индицира тестване на биомаркери (Кога?), валидира технологии за изследването им (Как?) и определя влиянието им върху отговора към провежданото лечение (Защо?).*

### Увод

Терминът „биомаркер“ е многократно дефиниран. Той е съкращение на „биологичен маркер“, което се отнася до широка подгрупа от медицински признаци – обективни индикатори на медицински състояния, наблюдавани извън пациента, които могат да бъдат измервани точно многократно.<sup>1</sup> През 1998 г. работна група, дефинираща здравните биомаркери (National Institutes of Health Biomarkers Definitions Working Group), определя биомаркерите като обективно измерими характеристики, използвани като индикатори на нормални биологични процеси, на патологични процеси или на фармакологичен отговор към терапевтична интервенция.<sup>2</sup> Това определение е прието и от работната група за транслационни изследвания и персонализирана медицина на Европейската Асоциация по Медицинска Онкология (ESMO Translational Research and Personalised Medicine Working Group).<sup>3</sup> Това е и определението, използвано в настоящо-

то ръководство „Предиктивни биомаркери в онкологията“. Световната здравна организация (СЗО) определя като биомаркер почти всяка променлива, отразяваща взаимодействието между биологична система и химичен, физичен или биологичен агент на заобикалящата я среда. Като биомаркер може да бъде използвано всичко – от пулс и кръвно налягане до сложни лабораторни тестове на кръв или тъкани.<sup>1</sup> Биомаркер може да бъде и промяната в дадена молекула или процес – например вариация във вида на тъканите; наличие на доброкачествен процес сред злокачествена тъкан – например неоваскуларизация.<sup>4</sup> Според определението на Националния Раков Институт (National Cancer Institute) на САЩ биомаркер е биологична молекула, намерена в кръвта ли друга телесна течност или тъкан, която е признак за нормален или патологичен процес, състояние или болест. Нарича се още молекулен маркер.<sup>5</sup> Идеалният туморен маркер трябва да отговаря на следните условия: да се произвежда само от туморните клетки;

да зависи от разпространението и биологията на тумора; да се намира в измеримо, статистически значимо по-голямо количество при пациенти с онкологична болест отколкото при здрави контроли; да се измерва лесно в малки количества с висока (близо до 100%) чувствителност и специфичност.<sup>6</sup>

Използването на биомаркери лежи в основата на персонализираната медицина. Тя представлява използването на комбинирано познание (генетично или друго) за човека за предсказване на чувствителността на болестта, прогнозата или отговора към дадена терапия като по този начин се подобрява здравето на индивид.<sup>7</sup>

### Кога клиничната онкология индицира тестване на биомаркери?

Биомаркерите се изследват, когато могат да повлияят на лечебно-диагностичния процес в клиничната онкология като предоставят информация за: i) оценка на риска; ii) ранна диагноза; iii) прогноза; iv) прецизност; v) проследяване и vi) терапевтична мишена

**Биомаркери за оценка на риска.** Биомаркерите за оценка на риска представляват субстанции, свързани с повишен или намален шанс за развитие на болест или състояние в индивид, който от клинична гледна точка няма описаната болест или състояние. Пример за биомаркер за оценка на риска е генетичен биомаркер, който показва дали при даден индивид има повишена вероятност от развитие на онкологична болест в някакъв момент в бъдещето. Тези биомаркери могат да се открият дори десетки години преди появата на клинични симптоми, свързани с болестта. Рисков фактор е например наличието на *BRCA 1/2* мутация за развитието на карцином на гърдата и яйчниците.<sup>8</sup> Продуктите на *BRCA1* гена са отговор-

ни за тъкан-специфична и клинично значима супресия на туморите. Те са основни участници в клетъчния отговор на увреждането на ДНК. Ако *BRCA1* изгуби функциите си в резултат на мутация, това води до покачване на риска за появата на тумор.<sup>9</sup> Освен това, тези мутации могат да се предават в поколенията. Американската ракова асоциация определя, че в нормалната популация доживотният риск за развитие на карцином на гърда е 12.32%, а на овариален карцином – 1.31%.<sup>10</sup> Метаанализ от 2007 г. установява, че сред носителите на *BRCA1* мутация, средният риск за развитие на карцином на гърда е 57%, а за овариален карцином съответно 40% (до 70 годишна възраст). При носителите на мутация в *BRCA2* този риск е съответно 49% и 18%.<sup>11</sup> В случай на носителство на мутации в *BRCA 1/2* гените съществуват интервенции, които да повлияят на риска, а именно профилактичната билатерална мастектомия и профилактичната билатерална аднексектомия.<sup>12</sup> Тези интервенции няма да променят биомаркера, но ще предотвратят появата на тумор.

Друг пример за биомаркер за оценка на риска е наличието на серумни антигени за *Helicobacter pylori*. Доказано е, че наличието на *Helicobacter pylori* увеличава многократно риска от развитие на карцином на стомаха, докато неговата ерадикация намалява риска при инфектирани пациенти, които не са развили преанцерози.<sup>13,14</sup>

Едно проучване от 2013 г. изследва серумните нива на антителата TFF (TFF1, TFF2 и TFF3) на *H. pylori*. Установява се, че серумните нива на тези антитела са значително по-високи при пациенти, позитивни за *H. pylori*, а нивата на TFF1, TFF2 намаляват 2 месеца след ерадикацията. Когато съществуват интервенции, които могат да повлияят на риска, съответните биомаркери могат да се използват и за контрол на превенцията – промяна на стила на живот,

## ТРИТЕ ВЪПРОСА НА "СФИНКСА" НА ОНКОЛОГИЧНАТА ПРЕДИКЦИЯ

храненето и т.н. В описания случай ерадикацията на *H. pylori* представлява интервенцията, която намалява риска от развитие на карцином на стомаха, а TFF1, TFF2 могат да се използват като биомаркери за контрол на превенцията.<sup>15</sup>

**Биомаркери за ранна диагноза.** Маркерите за ранна диагноза представляват друг клас биомаркери, които се използват, за да потвърдят присъствието на заболяване или състояние или за да идентифицират индивиди с определен субтип на болестта.<sup>8</sup> Нуждата от откриване на нови биомаркери за ранна диагноза е голяма за целите на скрининговите програми. Така през 2014 г. Американската агенция за контрол на храните и лекарствата (US Food and drug administration, FDA) одобрява приложението на *Cologuard* – фекален тест за ранна диагноза на колоректален карцином. Този тест представлява съвкупност от 11 молекулни биомаркера във фекалната проба, включително седем мутации в ДНК, два биомаркера за метилиране на ДНК, хемоглобин и  $\beta$ -actin (последното като контрола за човешко ДНК).<sup>16,17</sup> През 2016 г. FDA одобрява и *Epi pro Colon* – единственият наличен кръвен тест за ранна диагностика и скрининг на пациенти над 50 години за колоректален карцином.<sup>18</sup> *Epi pro Colon* представлява метилиран Септин 9 (mSEPT9) – нов туморен маркер, който кодира Septin-9 протейн. Този белтък участва в процесите на апоптоза, ремоделиране на клетъчния цитоскелет и клетъчното делене. Той се освобождава от туморните клетки в кръвта и може да се открие в плазмата. Мета-анализ от 14 проучвания, обхващащи 9870 пациенти от 2016 г., показва, че неговата чувствителност е по-добра от тази на тестовете върху фекални проби.<sup>19</sup>

**Прогностични биомаркери.** В клиничната медицина терминът прогноза се отнася до вероятността от бъдещ резултат

при пациенти с дадена болест или състояние. Изследването на прогнозата представлява проучване на връзката между бъдещия резултат (крайна точка) сред хора с даден здравен статус (начална точка), имащо за цел да подобри здравето.<sup>20</sup> Европейската Асоциация по Медицинска Онкология (European Society of Medical Oncology, ESMO) дефинира като прогностичен фактор или тест всяка величина, налична в момента на диагнозата, свързана с времето без болест, общата преживяемост и с естественото развитие на болестта в отсъствие на терапия. Прогностичните фактори или тестове се разделят на *свързани с пациента* и *свързани с тумора*. Туморен маркер от своя страна е субстанция или процес, който е обективно измерим и оценен като индикатор на туморен процес или фармакологичен отговор на терапевтична интервенция. Туморните маркери могат да бъдат прогностични и предиктивни.<sup>21</sup>

През 2016 г. в *New England Journal of Medicine* се публикуват резултати от проучването MINDACT – първото проспективно клинично проучване, изследващо клиничното значение на генетичен тест, подпомагащ взимане на решения за лечение.<sup>22</sup> С помощта на *MammaPrint*, широко разпространен генетичен тест, който оценява риска от локален рецидив при пациенти с карцином на гърдата, пациентите са разделени в ниско-рискова и високо-рискова група (според техния геномен риск). Освен това пациентите са разделени в групи според очакваната 10-годишна специфична преживяемост без системна терапия, с помощта на модифицирана версия на онлайн инструмента за прогноза *Adjuvant!Online* (с който е определен техният клиничен риск). Общо 1550 пациенти или 23.2% от изследваните са били с висок клиничен, но нисък геномен риск. Част от тези пациенти не са получили химиотерапия и тяхната 5 годишна преживяемост

без далечни метастази (ПБМ) е била 94.7% (95% confidence interval, 92.5 до 96.2). Абсолютната разлика в ПБМ между тези пациенти и пациентите, получили химиотерапия, е 1.5% в полза на химиотерапията. На базата на резултатите от това проучване авторите смятат, че 46% от жените с висок клиничен риск може да не се нуждаят от химиотерапия.<sup>23</sup>

Друг пример за прогностичен фактор е наличието и количеството на циркулиращите туморни клетки. Тяхната роля е оценена в мета-анализ, извършен в проучването *IMENEO*. Събрана е информация от 2156 пациенти от 21 проучвания, проведени в 16 центъра по света. Циркулиращите туморни клетки са изследвани при пациенти с карцином на гърдата, провеждащи неоадювантна терапия: 5 до 0 седмици преди началото на терапията, 1-8 седмици след началото, 5 до 0 седмици преди операцията и 1 до 52 седмици след операцията. В мултивариантни анализи количеството на циркулиращите туморни клетки е независим прогностичен фактор за общата преживяемост и преживяемостта без локален рецидив и далечни метастази при пациенти с ранен карцином на гърда, получаващи неоадювантна терапия.<sup>24</sup>

**Предиктивни биомаркери.** Предиктивните биомаркери носят информация относно отговора към дадена терапия. Те могат да бъдат само предиктивни или едновременно прогностични и предиктивни. Пример за предиктивен биомаркер е преекспресията на HER2 при карцином на стомах. Той е валидиран в проспективното фаза 3 рандомизирано контролирано проучване *ToGA*, което сравнява приложението на *trastuzumab* и стандартната химиотерапия, със самостоятелното приложение на химиотерапия при пациенти с авансирал HER2 позитивен карцином на стомаха и гастро-езофагеалната връзка. В резултат на това проучване *trastuzumab* в комбинация с химиотерапия се приема като нова

стандартна възможност за пациентите с HER2-позитивен авансирал карцином на стомаха или на гастро-езофагеалната връзка.<sup>25</sup> Неясно остава значението на HER2 за прогнозата на пациентите с карцином на стомаха<sup>26</sup>, за това можем да приемем, че за сега той е само предиктивен фактор.

Друг е случаят с HER2 преекспресията при карцинома на гърдата, където този биомаркер се е доказал както като прогностичен<sup>27</sup>, така и като предиктивен за терапия с *trastuzumab*<sup>28,29</sup>, *lapatinib*<sup>30</sup> и *pertuzumab*<sup>31</sup> и по-лош отговор към хормонална терапия.<sup>32</sup>

Предиктивните маркери могат да се разделят на фактори за чувствителност и фактори за резистентност. Пример за предиктивен фактор за резистентност представляват мутациите в гена за естрогенния рецептор *ESR1*. Около 70% от карциномите на гърда експресират естрогенен рецептор  $\alpha$  ( $ER\alpha$ ), което ги прави чувствителни на хормонална блокада. Ендокринна терапия е често препоръчваната първа линия за лечениена ER-позитивен първичен<sup>33</sup> или метастатичен карцином на гърдата.<sup>34</sup> Ароматазните инхибитори (АИи) са гръбнак на ендокринната терапия при много пациенти. В основата на действието им стои инхибиране на естрогенната синтеза в периферни тъкани, водещо допълна липса на активация на ER. Съществуват няколко механизма на резистентност към АИи, за които ключова роля имат мутациите в *ESR1*.<sup>35</sup>

Друг пример за предиктори на резистентност са мутациите в *RAS* гените, които са толкова убедителен фактор за резистентност към терапия с *cetuximab*, че Европейската асоциация по медицинска онкология препоръчва задължителното изследване на *RAS* статуса преди прилагане на анти-EGFR лечение с *cetuximab* и *panitumumab*.<sup>36</sup>

Тук влиза и една специална подгрупа биомаркери – биомаркери за оценка на риска от



## ТРИТЕ ВЪПРОСА НА "СФИНКСА" НА ОНКОЛОГИЧНАТА ПРЕДИКЦИЯ

терапията/оценка на токсичността. Такъв е примера с *DPYD* гена, който кодира ензим – дихидрипиримидин дехидрогеназа (PDP). Този ензим има значение за разграждането на пиримидините и деактивира повече от 80% от стандартната доза на *5-Fluorouracil* (съответно и на *capecitabine*). Истинският дефицит в PDP засяга 5% от населението. При тези пациенти липсата на ензимна активност повишава полуживота на лекарството, което води до повишена токсичност. Други 3-5% от населението имат частична PDP недостатъчност, заради вариации в гена, което също има за резултат повишена токсичност.<sup>37</sup> Метаанализ от 2014 свързва няколко полиморфизма в *DPYD* с повишена токсичност при лечение с *5-FU*.<sup>38</sup>

**Биомаркери за проследяване на терапевтичния отговор.** Броят на циркулиращите туморни клетки (ЦТК) е най-широко изследваният биомаркер за проследяване на терапевтичния отговор. Метаанализ на 50 проучвания, публикуван през 2017 г., показва значително намаляване на броя на ЦТК след провеждане на лечение (адювантна или неoadювантна химиотерапия, но не и хирургия) при пациенти с карцином на гърда. Намаляване на ЦТК се свързва с по-малка вероятност от прогресия на болестта и по-добра обща преживяемост.<sup>39</sup> Отново през 2017 г. е публикувано и едно малко проучване, изследващо значението на ЦТК след радикална операция на недребноклетъчен карцином на бял дроб. Установява се, че наличието на ЦТК след операция е значително свързано с появата на по-ранен рецидив.<sup>40</sup> Много други серумни маркери са използвани за мониторинг на терапията при карциноми с различна локализация (СЕА-колоректален карцином, АФР-хепатоцелуларен карцином, СА19-9- карцином на панкреас, Са 125 – карцином на яйчници, Са15-3 – карцином на гърда и т.н.). Тяхното изследване преди начало на терапия (неoadювантна или хирургична) е задължително,

за да може да се проследи специфичния отговор.<sup>41,42</sup>

Биомаркери като терапевтични мишени. Много малка част от откритите до сега биомаркери могат да се използват като терапевтични мишени. Това се дължи най-вече на факта, че повечето биомаркери не са директно свързани с туморния растеж. Най-добрият пример за биомаркер като терапевтична мишена е HER2. Моноклоналното антитяло *trastuzumab*, свързвайки се с извънклетъчния домейн на HER2, може да потисне растежа, пролиферацията и оцеляването на раковите клетки, както по индиректни, така и по директни механизми.<sup>43</sup> Терапията с *trastuzumab* при пациенти с преекспресия на HER2 подобрява значително общата преживяемост при пациенти с карцином на гърдата, което е доказано в метаанализ на проспективни проучвания<sup>44</sup> и при карцином на стомаха, което е доказано в рандомизирано фаза 3 проучване.<sup>25</sup>

Подобен пробив в клиничната онкология е блокирането на механизма на програмираната клетъчна смърт. Микросредата около тумора е първото място, на което тумора и имунната система си взаимодействат. При това взаимодействие туморът успява да избегне имунния отговор, в резултат на което туморните клетки се разпространяват, рецидивират и метастазират. Висока експресия на рецептора за програмирана клетъчна смърт (PD-1) е наблюдавана при тумор-асоциирани антиген представящи клетки, макрофаги, фибробласти и Т-клетки. Този рецептор има два лиганда – PD-L1 и PD-L2. Тумор асоциираните Т-клетки с висока експресия на PD-1 са с увредени функции и не могат да унищожат туморните клетки. Дори напротив, свързването им с лигандите може да доведе до апоптоза или анергия на Т-клетките. В този случай PD-L1, експресиран на повърхността на туморните клетки, играе роля-

та на щит. При инхибиране на рецептора на повърхността на Т-клетките те могат частично да възстановят функциите си.<sup>45</sup>

*Pembrolizumab* е моноклонално антитяло, което се свързва с рецепторите за програмирана клетъчна смърт (PD-1) на Т-клетките и блокира взаимодействието им с лигандите PD-L1 и PD-L2. Това свързване има за резултат активиране на Т-клетъчния медиран имунен отговор срещу туморните клетки.<sup>46</sup>

През 2015 г. FDA одобрява *pembrolizumab* за лечение на пациенти с метастатичен недребноклетъчен карцином на бял гроб, чиито тумори експресират PD-L1.<sup>47</sup> През 2017 г. след като *pembrolizumab* е одобрен за лечение на метастатичен меланом, метастатичен недребноклетъчен карцином на бял гроб, метастатичен или рецидивен карцином на глава и шия, резистентен на терапия Ходжкинов лимфом и уротелни карциноми, FDA за първи път одобрява приложението на онкологична терапия, на базата на туморен биомаркер, а не на първична локализация на тумора.<sup>48</sup>

### Как клиничната онкология валидира технологии за изследване на биомаркери?

Тестът за туморен биомаркер се използва, за да се установи или измери промяна в процесите, които туморният маркер отразява. Възможно е няколко анализа или теста да определят статуса на един биомаркер. Тези анализи може да измерват една и съща или различни характеристики на маркера. Добър пример за това е *erbB2* гена, който кодира HER2 протеина. Съществуват поне 3 анализа за ин ситу хибридизация за определяне амплификацията на гена (хромогенна ин ситу хибридизация, CISH; сребърна ин ситу хибридизация, SISH; флуоресцентна ин ситу хибридизация, FISH).<sup>49</sup> Съществуват и имунохистохимични анализи за количествена оценка на експресията на HER2 проте-

ина в туморната тъкан.<sup>50</sup> Откриването на активиращи мутации в гена също се свързва с постоянно активиране на рецептора. Всеки един от тези тестове носи информация за активността на HER2, но и всички те са много различни и информацията, която носят, има различен клиничен смисъл.<sup>4</sup>

За да се развият и валидират тестовете за туморни маркери, първо и най-важно те трябва да имат конкретно клинично приложение (за оценка на риска от болест, ранна диагноза, определяне на прогноза, отговор към лечение, проследяване на резултатите от лечението или като мишена за терапия). Усилия за развитието на даден туморен биомаркер трябва да се полагат само и единствено, ако той би променил клиничната практика. Често одобрението на тестовете за биомаркери от FDA не значи, че той трябва да се използва. От друга страна тестовете, разработени в дадена сертифицирана лаборатория, могат да навлизат в клиничната практика и без одобрение от FDA.<sup>4</sup>

След откриването на даден биомаркер, което обикновено включва вътрешно валидиране, кандидатите за биомаркери се включват в клинично приложими платформи и се подлагат на два типа валидиране. Аналитичното валидиране показва дали даденият тест за туморен биомаркер точно и надеждно измерва субстрата на интерес в съответната проба от пациента.<sup>4</sup> Аналитичното валидиране обикновено се извършва с помощта на теста, използван при откриването на биомаркера, и клинична платформа, която проверява устойчивостта и възпроизводимостта на измерванията. Често и широко използвани технологии за анализ биомаркери са PCR, ин ситу хибридизацията и имунохистохимията.<sup>51</sup>

Клиничното валидиране показва дали тестът за даден биомаркер точно и надеждно оценява клинично или биологично нарушение или разделя популацията на две или пове-

че групи с различни клинични или биологични характеристики.<sup>4</sup>

След като аналитичната валидация е приключила се оценява и клиничното приложение на теста за даден биомаркер, за да се потвърди неговото значение за диагнозата, прогнозата или отговора към терапията. В идеалния случай биомаркерът трябва да бъде оценен в проспективни проучвания с голяма статистическа сила.<sup>51</sup> Такъв е примерът с проучването *TransATAC*. То е проспективно проучване, имащо за цел да определи прогностичната стойност на сигнатура от 21 гена; включва 1372 пациенти с хормон-позитивен първичен карцином на гърда. Гените са изследвани с помощта на PCR, а стойността за прогнозата на генната сигнатура, заедно с някои клинични променливи (възраст, размер на тумора, лечение) е изследвана с кохортна регресионна анализ.<sup>52</sup> Прилагането на този подход при въвеждане на всички биомаркери в клиничната практика е нереалистично поради финансови причини и/или ограничение в броя на пациентите. За това често се прилагат методи, близки до тези на откриването на биомаркерите. Проспективно-ретроспективните проучвания и биобанкирането са приемливи алтернативи.<sup>51</sup> Накрая се изследва клиничната приложимост на биомаркера. Тя показва има ли достатъчно доказателства, че използването на дадения тест за биомаркер като инструмент за взимане на клинични решения води до измеримо по-добри резултати за пациентите, в сравнение с резултатите при пациенти, при които този тест не е взет под внимание.<sup>4</sup>

### **Как клиничната онкология определя влиянието на биомаркерите върху отговора на терапиите?**

Системата за оценката на полезността на туморните маркери е първоначално

въведена от Американската Асоциация по Клинична Онкология и се базира на публикуваната до тогава информация.<sup>53</sup> Маркерите са характеризирани според нивото на доказателственост и точността на публикуваните проучвания. Тази система за оценка е приета и от Европейската Асоциация по Медицинска Онкология.<sup>21</sup> Тя включва ниво на доказателственост и степен на препоръка. Според нея клиничните проучвания се разделят в категории според дизайн, начина на събиране на пробите и крайната цел.

**Категория А:** Биомаркерът е доказан в проспективно контролирано проучване (проспективно включвани пациенти, проспективно събирани проби, дизайнът на проучването е насочен към оценка на значимостта на туморните маркери);

**Категория В:** Биомаркерът е доказан в проспективно проучване, което не е създадено специално, за да го оценява (пациентите са проспективно включвани, пробите са архивни, дизайнът на проучването не е насочен към оценка на значимостта на туморните маркери). Планът за анализ на значението на биомаркера е направен преди да са извършени тестовете.

**Категория С:** Биомаркерът е доказан в проспективно или наблюдателно проучване. Пациентите са проспективно включени в регистър (пробите са събрани, анализирани и архивирани по стандартен начин); част от ретроспективно проучване; планът за анализ на значението на биомаркера е направен преди да са извършени тестовете.

**Категория D:** Проучването няма проспективен елемент. Информацията за пациентите е получена от ретроспективен обзор на картоните им. Пробите са събрани, анализирани и архивирани по стандартен начин. Планът за анализ на значението на биомаркера е направен преди да са извършени тестовете.

На Табл. 1 са представени категориите на клиничните проучвания за оценка на биомаркерите, съответните допълнителни проучвания, необходими за да се приравнят

категориите към даденото ниво на доказателственост и съответното ниво на доказателственост за приложение на биомаркерите в клиничната практика.

Таблица 1. Ниво на доказателственост за определяне на приложимостта на туморните маркери<sup>53</sup>

| Ниво | Категория | Налични проучвания за валидиране            |
|------|-----------|---|
| I    | A         | Не се изискват                              |
| I    | B         | Едно или повече, с еднозначни резултати     |
| II   | B         | Нито едно или разнозначни резултати         |
| II   | C         | 2 или повече с еднозначни резултати         |
| III  | C         | Нито едно или едно, независимо от резултата |
| IV-V | D         | Не е приложимо*                             |

\*Не е приложимо, защото нива на доказателственост IV и V никога няма да бъдат достатъчни за определяне на клинична значимост на даден биомаркер.

## Заклучение

Навлизайки в ерата на персонализираната медицина, биомаркерите са все по-необходими. Към създаването и изследването им обаче трябва да се подхожда отговорно. Процесът на доказване и въвеждане на биомаркер в клиничната практика е дълъг и скъп. За това усилия трябва да се полагат, ако биомаркерът би повлиял вземането на решения в клиниката, ако би осигурил повече информация от стандартните прогностични фактори, ако изследването му би било от клинична полза за пациента. Дали той отговаря на тези условия може да се установи само чрез правилно създадени клинични проучвания, които да осигурят неговото аналитично и клинично валидиране. Накрая, тези проучвания трябва да бъдат представени унифицирано и достъпно. Така например за оценка на проучванията на прогностичните фактори са създадени препоръките *REMARK* (Reporting Recommendations for

Tumor Marker Prognostic Studies). Те включват насоки за описание на изследователските цели, хипотези, обект на изследването, методи, статистически анализ, дизайн и резултати.<sup>54</sup> Последна стъпка за въвеждане на биомаркера в клиничната практика е установяването и на неговата клинична приложимост. Трябва да имаме предвид, че „лошият“ биомаркер е точно толкова лош, колкото лошо лекарство.<sup>55</sup>

## ЛИТЕРАТУРА

1. Strimbu K, Tavel JA. What are Biomarkers? *Current opinion in HIV and AIDS*. 2010; 5(6):463-466
2. Biomarkers Definitions Working Group (2001), Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther* 2001; 69: 89-95
3. Oncologypro.esmo.org. (2017). ESMO Factsheets on Biomarkers | *OncologyPRO*. [online] Available at: <http://oncologypro.esmo.org/Education-Library/Factsheets-on-Biomarkers> [Accessed 11 Aug 2017].



## ТРИТЕ ВЪПРОСА НА "СФИНКСА" НА ОНКОЛОГИЧНАТА ПРЕДИКЦИЯ

---

4. Hayes D. Biomarker validation and testing. *Mol Oncol* 2015;9(5):960-966
5. NCI Dictionary of Cancer Terms.(n.d.). Retrieved August 11, 2017, from <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms?cdrid=45618>
6. Mordente A, Meucci E, Martorana GE, Silvestrini A. Cancer Biomarkers Discovery and Validation: State of the Art, Problems and Future Perspectives. *Adv Exp Med Biol* 2015;867:9-26
7. Redekop W, Mladsi D. The Faces of Personalized Medicine: A Framework for Understanding Its Meaning and Scope. *Value Health* 2013; 16(6):4-9
8. FDA-NIH Biomarker Working Group. BEST (Biomarkers, EndpointS, and other Tools) Resource [Internet]. Silver Spring (MD): Food and Drug Administration (US); 2016
9. Silver D, Livingston M. Mechanisms of BRCA1 Tumor Suppression. *Cancer discovery* 2012;2(8):679-684
10. Lifetime Risk of Developing or Dying From Cancer. (n.d.). Retrieved July 01, 2017, from <https://www.cancer.org/cancer/cancer-basics/lifetime-probability-of-developing-or-dying-from-cancer.html>
11. Chen S, Parmigiani G. Meta-Analysis of BRCA1 and BRCA2 Penetrance. *J Clin Oncol* 2007; 25(11): 1329-1333
12. Li X, YouR, Wang X, Liu C. Effectiveness of Prophylactic Surgeries in BRCA1 or BRCA2 Mutation Carriers: A Meta-analysis and Systematic Review. *Clin Cancer Res* 2016; 22(15):3971-3981
13. Lydia E. Wroblewski, Richard M. et al. Helicobacter pylori and Gastric Cancer: Factors That Modulate Disease Risk. *Clin Microbiol Rev* 2010; 23(4): 713-739
14. Lee Y, Chiang T, Chou C, et al. Association Between Helicobacter pylori Eradication and Gastric Cancer Incidence: A Systematic Review and Meta-analysis. *Gastroenterology* 2016;150(5):1113-1124.e5.
15. Kaise M, Miwa J, Fujimoto A, et al. Influence of *Helicobacter pylori* status and eradication on the serum levels of trefoil factors and pepsinogen test: serum trefoil factor 3 is a stable biomarker. *Gastric Cancer* 2013;16 (3):329-337
16. Willyard C. Screening: Early alert. *Nature* 2015;S4-S5,521
17. Pickhardt, P. Emerging stool-based and blood-based non-invasive DNA tests for colorectal cancer screening: the importance of cancer prevention in addition to cancer detection. *Abdominal Radiology* 2016, Vol.41; (8); 1441-1444
18. Song LL, Li YM. Current noninvasive tests for colorectal cancer screening: An overview of colorectal cancer screening tests. *World J Gastrointest Oncol* 2016;8(11):793-800
19. Yan S, Liu Z, Yu S, Bao Y. Diagnostic Value of Methylated Septin 9 for Colorectal Cancer Screening: A Meta-Analysis. *Medical Science Monitor. Int Med J Exp Clin Res* 2016; 22:3409-3418
20. Hemingway H, Croft P, Perel P, et al. For the PROGRESS Group Prognosis research strategy (PROGRESS) 1: A framework for researching clinical outcomes. *BMJ* 2013; 346 e5595
21. Schmoll HJ. European Society for Medical Oncology Handbook of Cancer Diagnosis and Treatment Evaluation. 2015; Second edition, 41
22. Suppan C, Balic M. Early stage breast cancer treatment and prognostic factors: Post San Antonio Breast Cancer Symposium 2016. *Memo* 2017;10(2):82-85
23. Cardoso F, van't Veer LJ, Bogaerts J. Gene Signature as an Aid to Treatment Decisions in Early-Stage Breast Cancer. *N Engl J Med* 2016;375(8):717-729
24. Bidard FC, Michiels S, Mueller V, et al. IMENEO: International MEta-analysis of circulating tumor cell detection in early breast cancer patients treated by neoadjuvant chemotherapy. *Cancer Res* 2016; 77(4):S3-01-S3-01
25. JueBangY, Cutsem E, Feyereislova A, et al. 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. *The Lancet* 2010; 376(9742):687-697
26. Nagaraja V, Eslick G. HER2 expression in gastric and oesophageal cancer: a meta-analytic review. *J Gastroint Oncol* 2015;6(2):143-154
27. Chia S, Norris B, Speers C, et al. Human epidermal growth factor receptor 2 overexpression as a prognostic factor in a large tissue microarray series of node-negative breast cancers. *J Clin Oncol* 2008; 26(35):5697-5704
28. Nahta R. Molecular Mechanisms of Trastuzumab-Based Treatment in HER2-Overexpressing Breast Cancer. *ISRN Oncol* 2012; 428062
29. Slamon D, Leyland-Jones B, Shak S, et al. Use of Chemotherapy plus a Monoclonal Antibody against HER2 for Metastatic Breast Cancer That Overexpresses HER2. *N Engl J Med* 2001;344:783-799

30. Blackwell K, Burstein H, Storniolo A, et al. Randomized study of Lapatinib alone or in combination with trastuzumab in women with ErbB2-positive, trastuzumab-refractory metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 2010; 28(7):1124-1130
31. Baselga J, Cortés J, Kim S, et al. Pertuzumab plus trastuzumab plus docetaxel for metastatic breast cancer. *N Engl J Med* 2012;366(2):109-119
32. Patani N, Martin L, Dowsett M. Biomarkers for the clinical management of breast cancer: international perspective. *Int J Cancer* 2013;133(1):1-13
33. Senkus E, Kyriakides S, Ohno S, et al. Primary Breast Cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines. *Ann Oncol* 2015; 26 (5): v8-v30
34. Cardoso F, Costa A, Senkus E, et al. 3rd ESO-ESMO international consensus guidelines for Advanced Breast Cancer. *The Breast*. 2017;31:244-259
35. Robinson D, Wu Y, Vats P, et al. Activating ESR1 mutations in hormone-resistant metastatic breast cancer. *Nature Genetics* 2013;45, 1446-1451
36. Van Cutsem E, Cervantes A, Adam R, et al. ESMO consensus guidelines for the management of patients with metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol* 2016 (8):1386-1422
37. Gross E, Busse B, Riemenschneider M, et al. Strong Association of a Common Dihydropyrimidine Dehydrogenase Gene Polymorphism with Fluoropyrimidine-Related Toxicity in Cancer Patients. *PLoS ONE* 2008;3(12):e4003
38. Leung H, Chan A. Association and prediction of severe 5-fluorouracil toxicity with dihydropyrimidine dehydrogenase gene polymorphisms: A meta-analysis. *Biomedical Reports* 2015;3(6):879-883
39. Yan W, Cui X, Chen Q. Circulating tumor cell status monitors the treatment responses in breast cancer patients: a meta-analysis. *Sci Rep* 2017; 7: 43464
40. Bayarri-Lara C, Ortega F, Cueto Ladrón de Guevara A, et al. Circulating Tumor Cells Identify Early Recurrence in Patients with Non-Small Cell Lung Cancer Undergoing Radical Resection. *PLoS ONE* 2016; 11(2): e0148659
41. Duffy M. Tumor Markers in Clinical Practice: A Review Focusing on Common Solid Cancers. *Med Princ Pract* 2013; 22:4-11
42. Locker G, Hamilton S, Harris J. ASCO 2006 Update of Recommendations for the Use of Tumor Markers in Gastrointestinal Cancer. *J Clin Oncol* 2006; 24:33, 5313-5327
43. Vu T, Claret F. Trastuzumab: Updated Mechanisms of Action and Resistance in Breast Cancer. *Front Oncol* 2012; 2:62
44. O'Sullivan C, Bradbury I, Campbell Ch, 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; 33:24, 2600-2608
45. Zou W, Wolchok J, Chen L. PD-L1 (B7-H1) and PD-1 Pathway Blockade for Cancer Therapy: Mechanisms, Response Biomarkers and Combinations. *Science transl med* 2016; 8(328):328rv4.
46. Raedler L. Keytruda (Pembrolizumab): First PD-1 Inhibitor Approved for Previously Treated Unresectable or Metastatic Melanoma. *American Health Drug Benefits* 2015;8(Spec Feature):96-100
47. Sul J, Blumenthal G, Jiang X, et al. FDA Approval Summary: Pembrolizumab for the Treatment of Patients With Metastatic Non-Small Cell Lung Cancer Whose Tumors Express Programmed Death-Ligand 1. *The Oncologist* 2016; 21(5):643-650
48. Fda.gov. (2017). FDA approves first cancer treatment for any solid tumor with a specific genetic feature. [online] Available at: <https://www.fda.gov/newsevents/newsroom/pressannouncements/ucm560167.htm> [Accessed 17 Aug. 2017].
49. 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 Pathol* 2012; 25.5: 675-682
50. Wolff A, Hammond M, Hicks D, 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. *J Clin Oncol* 2013; 1;31(31):3997-4013
51. Goossens N, Nakagawa S, Sun X, Hoshida Y. Cancer biomarker discovery and validation. *Transl cancer res* 2015;4(3):256-269
52. Dowsett M, Cuzick J, Wale C, et al. Prediction of risk of distant recurrence using the 21-gene recurrence score in node-negative and node-positive postmenopausal patients with breast cancer treated with anastrozole or tamoxifen: a TransATAC study. *J Clin Oncol* 2010;28(11):1829-1834

## ТРИТЕ ВЪПРОСА НА "СФИНКСА" НА ОНКОЛОГИЧНАТА ПРЕДИКЦИЯ

---

53. Simon R, Paik S, Hayes D. Use of archived specimens in evaluation of prognostic and predictive biomarkers. *J Natl Cancer Inst* 2009; 101: 1446-1452
54. Altman DG, McShane LM, Sauerbrei W, Taube SE. Reporting Recommendations for Tumor Marker Prognostic Studies (REMARK): Explanation and Elaboration. *PLoS Medicine*. 2012;9(5):e1001216.
55. Viale G. A bad tumor biomarker is as bad as a bad drug: The gap between genomics data and phenotype to predict response. *Breast* 2015;24(2):23-25



---

# **КАК ПРЕЦИЗИРАНАТА ОНКОЛОГИЯ ВАЛИДИРА ПРЕДИКТИВНИ БИОМАРКЕРИ**

---

**проф. Алексей Савов, гбн**

Национална генетична лаборатория, София



# КАК ПРЕЦИЗИРАНАТА ОНКОЛОГИЯ ВАЛИДИРА ПРЕДИКТИВНИ БИОМАРКЕРИ

*проф. Алексей Савов, дбн*

Национална генетична лаборатория, София

## ОБЗОР

*В съвременната медицинска практика ежедневно се срещаме с нови генетични тестове, разработени за решаването на конкретен проблем. Почти няма медицинска специалност, която наред с класическите диагностични изследвания да не се изправя пред необходимостта от използване на генетични тестове. В повечето случаи те са валидирани за извършване на *in vitro* диагностика и на медицинските специалисти не им се налага да познават в детайли холистичните познания, довели до създаването на крайния продукт. Същото се отнася и за предиктивните биомаркери, ставащи все по-популярни като инструмент на персонализираната медицина.*

*Валидирането на един биомаркер минава през няколко основни етапа: откриване на подходящ кандидат, проучване и окачествяване, потвърдителни анализи, оптимизиране на методите за изследване, валидиране като предиктивен биомаркер, комерсиализация. В следващата статия са представени основни етапи от историята на един от генетичните маркери, широко използван в онкологията – генът, кодиращ рецептора на епидермалния растежен фактор (EGFR, OMIM 131550).*

## Увод

Биомаркерите са биологични индикатори, чиито измерени стойности носят определена информация и могат да служат за различни цели. Наред с концентрацията на даден белтък, метаболит или ензимна активност в биологична проба, роля на биомаркер също може да играе определянето на специфични генетични характеристики. Биомаркерът може да се определя еднократно или да подлежи на повтарящи се измерва-

ния. От своя страна, биомаркерите, които се измерват само веднъж, се подразделят на две групи – прогностични и предиктивни. Като обща дефиниция: прогностичният биомаркер дава информация за това как ще се развие болестта при даден пациент при липса на лечение или при назначаване на стандартно такова. Предиктивните маркери позволяват да се идентифицират пациенти, които ще са подходящи или не за съответна специфична терапия.

## Генетични биомаркери

Поради голямото разнообразие и различните сфери на приложение, генетичните биомаркери трудно могат да бъдат подредени в универсална класификация. Генетичните тестове целят да установят промени на хромозомно ниво (например цитогенетичен анализ за бройни и структурни нарушения), субхромозомно ниво (например сравнителна геномна хибридизация CGH), гени (или свързани с гените последователности) или техните белтъчни продукти. Първоначално в клиничната практика генетичните изследвания служеха основно за: i) поставяне на диагноза – пример за това са множеството описани генетични болести; ii) изследване на носителство – обект може да бъде отделен индивид, фамилия или гагена популация; iii) превенция на болестта – чрез провеждане на пренатална или предимплантационна диагностика.

Нагрупването на информация и познания даде началото на нови насоки за приложение на генетичните биомаркери, а именно търсене на по-добри терапевтични резултати. Безусловно, използването на генетична информация за разработване на нови медикаменти се нуждае от сериозни научни проекти, защото стандартните генетични анализи не следват идеята за индивидуализирана терапия, не могат да определят вариационността на клиничния отговор и ограничават използването на комплексни биомаркери, предоставящи по-богата информация.

Така съвременната концепция за генетичен биомаркер трябва да включва характеристики на ниво ДНК или РНК, които са индикатор за нормален или патологичен биологичен процес или отговор за терапевтична или друга интервенция. Това предполага, че валидирането на гаген биомаркер трябва да включва значително по-голям спектър от анализи като определяне на експресията

и функцията на гаген ген, регулацията му; изследване на динамични ДНК мутации; епигенетични промени и други.

В днешно време са разработени хиляди тестове. Новите насоки са ранното поставяне на диагноза и разработване на нови лекарства, основани на генетичен биомаркер. Могат да бъдат определени шест взаимно свързани етапа при проучванията на генетичните биомаркери (Novelli *at al.*, 2008): i) откриване на подходящ кандидат, ii) проучване и окачествяване, iii) потвърдителни анализи, iv) оптимизиране на методите за изследване, v) валидиране като предиктивен биомаркер и vi) комерсиализация.

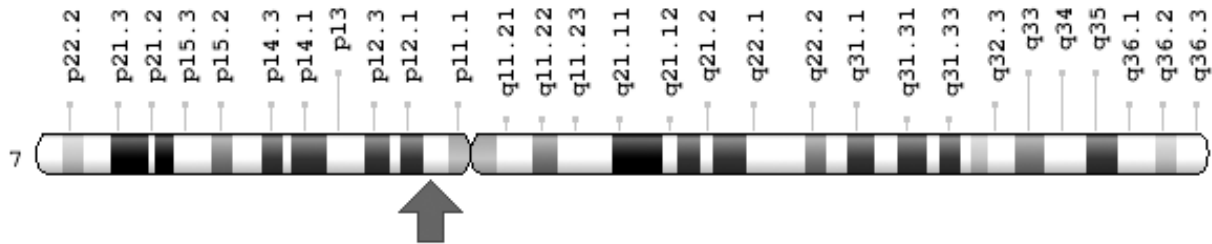
Тези етапи са застъпени в различна степен в отделните фази на клинични проучвания. В голяма степен първите четири стъпки касаят предклиничната фаза, в която се извършват определяне на генетичните характеристики на маркера, подбран за кандидат и се оценява фармакокинетична информация, събрана от моделни системи – например клетъчни линии или експериментарни животни. Така проученият генетичен биомаркер бива анализиран с цел валидиране в следващите фази (първа до четвърта) на клинично проучване.

### *Откриване на подходящ кандидат.*

Ако изберем като пример генетичният маркер *EGFR* (Epidermal growth factor receptor), ще отбележим дългия път от неговото откриване от Станли Коен през 1979 г., редица трудове, изучаващи неговата функция през 80-те години, определянето на неговата генетична структура през 90-те години и накрая – последната декада, свързана с неговото определяне като предиктивен биологичен маркер. Обобщено можем да определим, че *EGFR* и неговите лиганди са сигнални молекули, регулиращи клетъчната пролиферация, диференциация, оцеляване, както и развитието на тъканите.



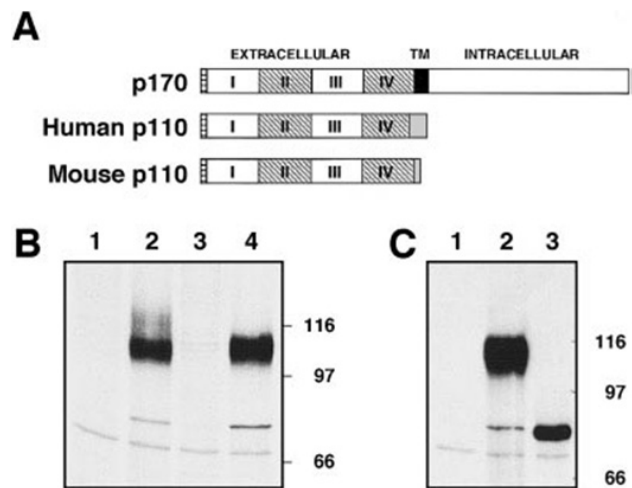
## КАК ПРЕЦИЗИРАНАТА ОНКОЛОГИЯ ВАЛИДИРА ПРЕДИКТИВНИ БИОМАРКЕРИ



**Фигура 1.** Хромозомна локализация на *EGFR* гена. По база данни на NCBI той е разположен между нуклеотидни двойки 55,019,032 до 55,207,338 на хромозома 7.

Хромозомната локализацията на *EGFR* е посочена от два отделни научни екипа<sup>2,3</sup> върху 7-ма хромозома в областта 7p13-q22. Използвани са хибридни клетъчни линии между мишка и човек и експресионен анализ, който насочва към конкретния хромозомен локус (Фиг.1).

Цялостната му структура е описана от Reiter *et al.*<sup>4</sup> и има 28 кодиращи последователности. Характерно за гена е, че съдържа няколко повторени последователности от типа на SINEs и LINEs, а също така тринуклеотиден микросателит (TGG/A) в интрон 15, и две динуклеотидни последователности в интрон 27. За целта са използвани клетъчни линии, съдържащи клонове на човешка геномна библиотека, а генетичните последователности са определени с директно секвениране по Sanger. Паралелно за извършване на междувидов анализ и определяне на консервативните и полиморфни локуси са изследвани и клонове от миши геном, съдържащи *EGFR*. Междувидовите анализи стоят в основата на съвременните програми „предиктори“, които позволяват без да се извършват функционални и експресионни анализи да се определи ефекта върху генната функция на конкретна мутация. По-известните програми „предиктори“, които се ползват днес, са *I-mutant*, *SIFT*, *POLYPHEN*. Допълнително чрез експресионни анализи са проучени алтернативните форми на снаждане (Фиг.2), които показват, че от гена могат да се синтезират белтъчни продукти с различна дължина.



**Фигура 2.** Алтернативни *EGFR* транскрипти. (А) Схематично представяне на пълния транскрипт (p170), човешки 3.0 килобазов транскрипт (p110) и миши 2.8 килобазов транскрипт. (В) и (С) Имунопреципитати на клетъчни лизати на трансфектирани човешки и миши линии.<sup>4</sup>

По данни на *Guillaudeau et al.* и нормалните, и туморните клетки продуцират изоформи, при които липсва интрацелуларен домейн и определени аминокиселинни последователности.<sup>6</sup>

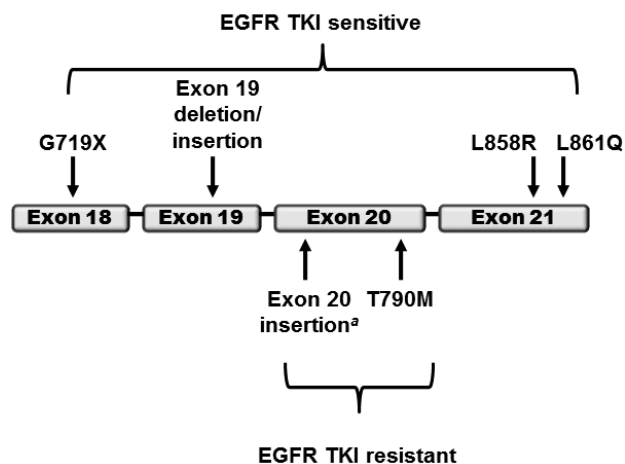
**Проучване и оценка.** Точното описание на структурата и организацията на един ген позволява провеждане на системни изследвания на неговата функция в норма и патология. Тук е мястото да насочим внимание към мутациите като един естествен източник на генетично разнообразие. Промените на генетичната функция най-често се дължат на мутации, които водят до замяна на една аминокиселина с друга преждевремен-

|    |   |   |        |          |     |       |        |       |
|----|---|---|--------|----------|-----|-------|--------|-------|
| 18 | 0 |   | ccccag | CTTGTGGA | 123 | ATAAG | gtaagg | 678   |
|    |   | H | ccccag | CTTGTGGA | 123 | ATAAG | gtaaca | 1705  |
|    |   | M | tctcag | CTCGTGGA | 123 | ATAAG | gtaaga |       |
|    |   | R | tctcag | CTCGTGGA | 123 | ATAAG | gtaaga |       |
|    |   | C | caccag | CTTGTGGA | 123 | ATAAG | gtaaga |       |
| 19 | 0 |   | tcatag | GGACTCTG | 99  | TCGAT | gtgagt | 6472  |
|    |   | H | tcatag | GGACTCTG | 99  | TCGAT | gtgagt | 3780  |
|    |   | M | tctcag | GGTCTCTG | 99  | TTGAC | gtgagt |       |
|    |   | R | tctcag | GGTCTCTG | 99  | TTGAC | gtgagt |       |
|    |   | C | tgatag | GGACTTTG | 99  | TTGAT | gtaagt |       |
| 20 | 0 |   | ctccag | GAAGCCTA | 186 | CAAAG | gtaatc | 10240 |
|    |   | H | ctccag | GAAGCCTA | 186 | CAAAG | gtaatc | 7207  |
|    |   | M | ttgtag | GAAGCCTA | 186 | CAAAG | gtaagc |       |
|    |   | R | ttgtag | GAAGCCTA | 186 | CAAAG | gtaagc |       |
|    |   | C | tctcag | GAAGCCTA | 186 | CAAAG | gtaagc |       |
| 21 | 0 |   | tttcag | GGCATGAA | 156 | GCAAA | gtaagg | 891   |
|    |   | H | tttcag | GGCATGAA | 156 | GCAAA | gtaagt | 879   |
|    |   | M | tttcag | GGCATGAA | 156 | GCAAA | gtaagt |       |
|    |   | R | tttcag | GGCATGAA | 156 | GCAAA | gtaagt |       |
|    |   | C | ttgcag | GGAATGAA | 156 | GCAAG | gtacaa |       |
| 22 | 0 |   | ccccag | GTGCSTAT | 76  | CTACG | gtgagt | 5873  |
|    |   | H | ccccag | GTGCSTAT | 76  | CTACG | gtgagt | 1311  |
|    |   | M | ccccag | GTGCSTAT | 76  | CTATG | gtgagt |       |
|    |   | R | ccccag | GTGCSTAT | 76  | CTATG | gtgagt |       |
|    |   | C | tctcag | GTGCSTAT | 76  | CTATG | gtgagt |       |

**Фигура 3.** Екзон–интронна организација на *EGFR* гена. Показани са последователностите при човек (H), мишка (M), пљх (R) и пиле (C). Наблюдава се конзервативната организација на донорното (gt) и акцепторното (ag) място за снајждане.<sup>4</sup>

на појава на герминиращ кодон или засягат регулацијата на гена, нарушавајќи високонсервативните донорни и акцепторни места за снајждане. На *Фиг. 3* е представена организацијата на тези последователности на част од *EGFR* гена, кдегто са локализираны молекулните дефекти, сврзани с туморогенеза.

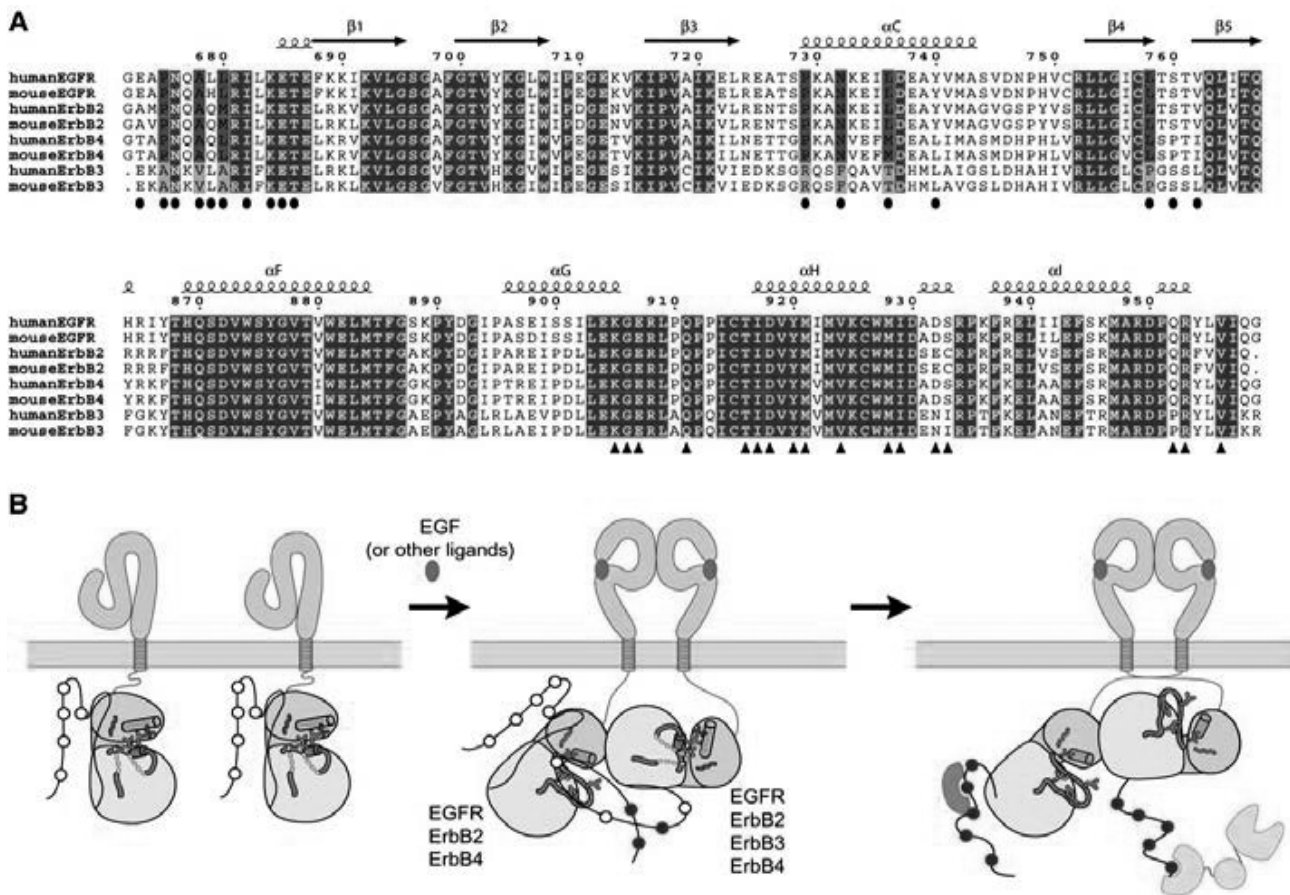
Врзката междy мутациите в *EGFR*-гена и недребноклетъчни карцином на бял гроб (НДКБД) е безспорна. Екзоните 18 до 21 кодираат част од киназниот домейн (*Фиг. 4*). С најголема честота се среќаат делециите в екзон 19 или еднонуклеотидната замена в екзон 21 L858R. Ролята им върху функцијата на гена се изразява в увеличение на киназната активност на *EGFR*, водеща до хиперактивација на последващи сигнални пџтища. По принцип не всички промени на ДНК ниво следва да бџдат сврзани и с промяна на функцијата на гена, затова тяхната роля трябва да бџде внимателно изяснена. В една од наличните бази с данни за генетичните варианти в *EGFR* (<http://bcs.ee.cityu.edu.hk/data/EGFR.html>) може да се видят описаны 112 молекулни дефекта, както



**Фигура 4.** Локализација и роля на *EGFR* мутации. Молекулните дефекти, описаны над схемата, са сврзани с чувствителност към тирозинкиназни инхибитори. Мутациите под схемата са сврзани с тирозин киназна резистентност. Повечето инсерции в екзон 20 са сврзани с понижена тирозинкиназна чувствителност, докато A763, Y764insFQEA-мутациите правят изключение и са сврзани с увеличение на тирозинкиназната чувствителност.<sup>7</sup>

и триизмерни модели на техните белтџчни продукти. Друг екип од изследователи<sup>5</sup> създава база данни, описваща 809 мутации. Камо

## КАК ПРЕЦИЗИРАНАТА ОНКОЛОГИЯ ВАЛИДИРА ПРЕДИКТИВНИ БИОМАРКЕРИ



**Фигура 5.** Основен модел за активацията на представители от групата на EGFR.<sup>8</sup> (A) Сравнителен анализ на аминокиселинни последователности при човек и мишка. Два панела показват остатъци, включени в азотния (отбелязани с кръгове) и въглеродния (отбелязани с триъгълници) край на интерфейса на димера. (B) Основен модел за активацията на представители от групата на EGFR тирозинкинази. Всичките могат да работят като циклин-подобни активатори за киназно активни представители (EGFR, ErbB2 и ErbB4) след лигандно-индуцирана хомо- или хетеродимеризация.

обобщена характеристика на тези молекулни дефекти може да се посочи, че четири горещи точки представят 70% от мутациите, докато две трети от 131 уникални мутации (11% от всички) са описвани само в единични случаи. Микроделеции или микро индел с големина от 1 до 50 нуклеотида са характерни за екзон 19.

Наред с описването на нуклеотидните последователности на един ген и изясняване на неговата експресия и регулация една съществена част от проучванията са насочени към неговата белтъчна структура. Именно тя дава отговор за характеристиката и вариабилността на клиничния фенотип. През

2006 г. Zhang et al. предлагат модел, според който киназния домейн на човешкия EGFR може да бъде активиран посредством увеличаване на неговата локална концентрация или ако мутация промени кодона за левцин на 834 позиция, намиращ се в активационната бримка с аргинин.<sup>8</sup> Това предполага, че киназният домейн вътрешно се автоинхибира. Използвайки мутационни и кристалографски анализи е установено, че автоинхибираната конформация на EGFR-киназния домейн прилича на този на циклин-зависимите кинази. Така активирането на EGFR води до формиране на асиметричен EGFR димер, в който въглеродният

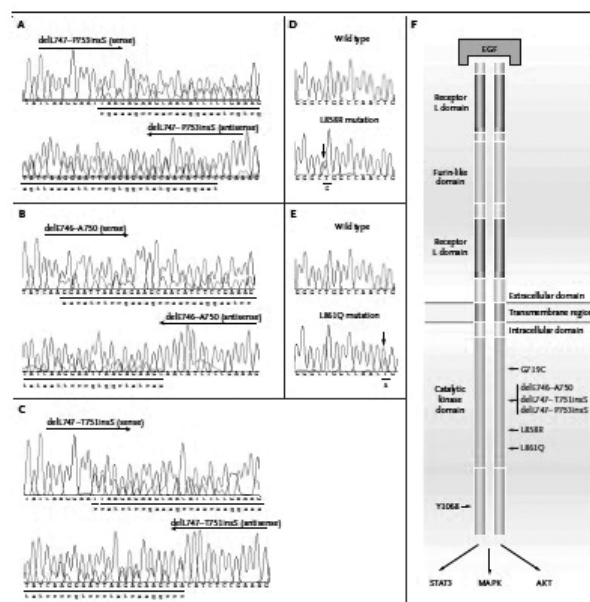


край на киназа 1 домейна има аналогична роля на циклина в активираните циклин-циклин зависима киназни комплекси (Фиг. 5).

**Потвърдителни анализи.** Трудно може да се систематизират единадесетте хиляди публикации, свързани с генната функция на *EGFR*. Някои от насоките на проучванията са: динамика на димеризацията, механизми на инхибиране, спецификация на белтъчни молекули, участващи в сигналия път, възможното участие в механизми на импринтинг, експресия в различни тъкани и много други. В методологично отношение са използвани широк спектър от молекулярно-генетични, биохимични и ензимни анализи, модифицирани клетъчни линии и компютърни модели. Специално място заслужават изследванията, насочени към отговора при лечение с *EGFR*-тирозинкиназни инхибитори. Повечето пациенти с НД-КБД не отговарят при лечение с *gefitinib*. На практика само при около 10% се регистрира такъв. През 2004 г. *Lynch et al.* идентифицират активиращи соматични мутации в тирозинкиназния домейн на *EGFR* при пациенти с отговор към терапията.<sup>9</sup> Мутациите са от различно естество – малки делеции, не нарушаващи рамката на четене или субституции, локализирани около АТФ-свързващото място на тирозинкиназния домейн (Фиг. 6).

Ефектът на мутациите върху гена може да бъде определен като придобиване на функция; при *in vitro* изследвания се установява усилена тирозинкиназна активност като отговор и засилена чувствителност към инхибиране на епидермален растежен фактор от *gefitinib*.

Надрупаната през години информация за молекулните дефекти показва и други интересни характеристики, които са от значение при дизайнирането на клинични проучвания: мутациите са по-чести при аденокарциноми, отколкото при други недребноклетъчни белодробни карциноми; мутациите са по-чести в азиатските популации,



**Фигура 6.** Мутации в *EGFR* гена при тумори, даващи отговор на терапия с *gefitinib*.<sup>9</sup> А, В и С – нуклеотидни последователности на *EGFR* с хетерозиготни делеции в областта на тирозинкиназния домейн. D и E – нуклеотидни последователности на *EGFR* с еднонуклеотидни замени, водещи до аминокиселинна субституция в областта на тирозинкиназния домейн. F – схема на димеризирани *EGFR* молекули, свързани с *EGF* лиганд. Показани са екстрацелуларният домейн, съдържащ два рецепторни лигандни домейна и фурин-подобен домейн, трансмембраният регион и цитоплазмения домейн, съдържащ каталитичния киназен домейн. Тирозиновият кодон (Y1068) и мястото за автофосфорилиране като маркер за активацията на рецептора са отбелязани наред с последващите пътища на активиране на *STAT3*, *MAP* киназа и *AKT*. Точните позиции на тумор-асоцираните мутации в тирозинкиназния домейн са представени в червено.

отколкото в Европа и Америка; мутациите са по-чести при жени отколкото при мъже.

**Оптимизиране на методите за изследване.** Когато след комплексни проучвания един генетичен маркер бъде определен като предиктивен, възниква необходимостта да бъдат подбрани подходящи методи за рутинното му изследване, които да осигуряват аналитична надеждност, възпроизводи-

## КАК ПРЕЦИЗИРАНАТА ОНКОЛОГИЯ ВАЛИДИРА ПРЕДИКТИВНИ БИОМАРКЕРИ

мост и чувствителност. В зависимост от природата на молекулните дефекти, алелната хетерогенност и естеството на биологичната проба, аналитичният подход може да има множество решения. Допустимо е използване както на комерсиални набори за *in vitro* диагностика, така и на разработени от конкретната лаборатория методи. През последните години все повече навлязоха автоматизирани системи с унифицирани нива на контрол, с което значително се редуцира нивото на субективни грешки както при провеждане на анализа, така и при интерпретация на резултатите. Безусловно изискване, когато определянето на предиктивния маркер е утвърдена част от дадена медицинска дейност, е изследванията да се извършват от акредитирана по съответната специалност лаборатория.

**Валидиране на биомаркер.** Валидирането на един предиктивен генетичен маркер е свързано основно с провеждане на клинични проучвания, които могат да имат различен дизайн. Според това те се разделят в две групи: i) ретроспективни, използващи данни от предварително проведени рандомизирани контролирани проучвания и ii) проспективни, използващи обогатяване, неселектиран, хибриден или адаптивен анализ.

**Ретроспективен дизайн.** Проспективно планираните клинични изпитвания са златният стандартен подход към валидиране на предиктивни маркери.<sup>10</sup> С цел намаляване на времето и разходите, необходими за проспективните опити, за да се определи предиктивната способност на даден маркер е по-често и по-лесно използване на данни от проведени преди това рандомизирани контролирани проучвания и сравняващи терапии, за които този маркер е предложен.

Основните елементи, които са критични за проучвания за ретроспективна

валидация, са: наличие на данни от добре проведено рандомизирано контролирано проучване; наличие на проби за голяма част от пациентите, за да се избегнат отклонения заради селекцията; проспективно определена хипотеза, избор на техники за анализ и група от пациенти; предварително дефинирана и стандартизирана система за анализ и оценка; размер на извадката и обосновка на силата.

Златен стандарт за валидиране на предиктивни маркери остава проспективно рандомизирано контролно проучване, независимо че ретроспективното валидиране е приемливо при определени обстоятелства. Няколко различни модела за валидиране на генетични биомаркери са използвани в областта на онкологията. Според *Mandrekar SJ et al.* те могат да се обособят в три категории.<sup>10</sup>

**Целеви или обогатен дизайн (Targeted or Enrichment Designs).** Този дизайн се основава на парадигмата (при убедителни предварителни доказателства), че не всички пациенти ще се повлияят от разглежданото лечение, а по-скоро ползата ще бъде за ограничена подгрупа пациенти, които имат или нямат определена молекулна характеристика по даден маркер. Следователно, всички пациенти се подлагат на скрининг за наличието или отсъствието на маркер или панел от маркери и само тези, които са с (или без) определени молекулни характеристики, се включват в проучването. Използването на този дизайн води до стратификация на изследваната популация с цел разбиране на безопасността, поносимостта и клиничната полза от лечението в селектирана подгрупа на популацията пациенти, определени по специфичен статус на маркера.

**Неселектиран дизайн (All-Comers Designs).** При този дизайн всички пациенти, отговарящи на критериите за допустимост (който не включва статуса на биомаркерната

характеристика), се допускат до проучването. От своя страна неселектираният дизайн се разделя на стратегия за последователно тестване и на основан на маркера дизайн.

*Стратегия за последователно тестване.* Подобно на рандомизирано контролирано проучване с една основна хипотеза, която се тества най-напред в цялата популация и след това в проспективно планирана подгрупа; или обратното – първо в определената от маркера подгрупа, а след това – тестване в цялата популация, при условие, че резултатите от анализа в подгрупата не показват статистическа достоверност.

*Основан на маркера дизайн.* Показва връзката между определен биомаркер и терапия. Дизайнът на взаимодействие с маркери по терапия използва статуса на маркера като фактор на стратификацията (т.е. предполага, че общата популация може да бъде разделена на дефинирани от маркера подгрупи) и произволно насочва пациентите, подлежащи на терапия, в рамките на всяка маркерна подгрупа.

## Заклучение

Представеният материал няма претенции да налага утвърден алгоритъм, който може да се използва при валидиране на генетични предиктивни маркери. Важно е да се отбележи, че са необходими комплексни проучвания и познания, обхващащи не само генетичните характеристики, но и всички взаимодействия на ниво клетки, тъкани и органи, определящи многопластовия облик на клиничния фенотип. Развитието на технологиите (особено секвенирането от ново поколение (NGS – next generation sequencing), приложението на експресионни анализи, изследването на РНК интерференцията и много други съвременни разработки) помагат за значително по-бързото натрупване на информация. Всички тези предпоставки дават реални възможности за валидиране

и навлизане на нови предиктивни маркери, както и по-прецизна преценка на терапевтичния ефект. Това става във все по-кратки срокове и е приложимо към все по-широк спектър от медицински проблеми.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Carpenter G, Cohen S. Epidermal Growth Factor. *Ann Rev Biochem* 1979; 48: 193-216
2. Carlin CR, Aden DP, Knowles BB. S6 is the human receptor for epidermal growth factor (EGF). (HGM6). *Cytogenet Cell Genet* 1982; 32:256
3. Kondo I, Shimizu N. Mapping of the human gene for epidermal growth factor receptor (EGFR) on the p13-q22 region of chromosome 7. *Cytogenet Cell Genet* 1983;35:9-14
4. Reiter JL, Threadgill DW, Eley GD, et al. Comparative genomic sequence analysis and isolation of human and mouse alternative EGFR transcripts encoding truncated receptor isoforms. *Genomics* 2001; 71(1):1-20
5. Gu D, Scaringe WA, LiK, et al. Database of somatic mutations in EGFR with analyses revealing indel hotspots but no smoking-associated signature. *Hum Mutat* 2007;28:760-770
6. Guillaudeau A, Durand K, Bessette B, et al. EGFR Soluble Isoforms and Their Transcripts Are Expressed in Meningiomas. *PLoS ONE* 2012; 7(5):e0037204
7. 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(216):216ra177
8. Zhang X, Gureasko J, Shen K, et al. An allosteric mechanism for activation of the kinase domain of epidermal growth factor receptor. *Cell* 2006; 125: 1137-1149
9. 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. *New Eng J Med* 2004; 350(21): 2129-2139
10. Mandrekar SJ, Sargent DJ. Clinical trial designs for predictive biomarker validation: theoretical considerations and practical challenges. *J Clin Oncol* 2009;27(24):4027-4034

---

**МУЛТИГЕННИ СИГНАТУРИ И ДЕЕСКАЛАЦИЯ НА  
АДЮВАНТНИТЕ ИНТЕРВЕНЦИИ  
ПРИ КАРЦИНОМ НА ГЪРДА**

---

**доц. Милка Георгиева, гбн**

Българско дружество по патология





# МУЛТИГЕННИ СИГНАТУРИ И ДЕЕСКАЛАЦИЯ НА АДЮВАНТНИТЕ ИНТЕРВЕНЦИИ ПРИ КАРЦИНОМ НА ГЪРДА

доц. Милка Георгиева, дбн

Българско дружество по патология

## ОБЗОР

*Карциномът на гърда (КГ) е хетерогенна група от различни болестни под-типове, всеки с характерни биологични и клинични характеристики. Напредъкът в разбирането на молекулярните сигнални пътища доведе до нови методологии за определяне риска от рецидив. В статията се обсъжда ролята на генно-експресионното профилиране за идентифициране на генни сигнатури с прогностично и предиктивно значение за полза от адювантна терапия, както и възможността за ескалиране или деескалиране на провежданото лечение.*

## Увод

Карциномът на гърда (КГ) е хетерогенна болест с различни биологични характеристики и клинично протичане. В клиничната практика, при определени субтипове ранен КГ (с наличие на експресия на естрогенни и прогестеронови рецептори, липса на HER 2 експресия) все по-широко навлиза изследването на панели от гени, определящи риска от рецидив и необходимостта от адювантна химиотерапия. Разработването на мултигенните тестове доведе до подобро предсказване на риск от рецидив при пациенти с КГ в ранен стадий, позитивен естроген рецептор (ER) и негативен HER2, в сравнение с използването на стандартни прогностични критерии.

## Мултигенни сигнатури

Няколко мултигенни теста вече са въведени в клиничната практика: *Oncotype DX*,

*Prosigna*, *MammaPrint*, *EndoPredict*, *Breast cancer index (BCI)*. Тези тестове спомагат за изчисляване на индивидуалния риск от рецидивна пациента и дават прогностична информация независима от стандартните клинични и патологични параметри.<sup>1</sup>

**21-гена сигнатура (Oncotype DX, Recurrence Score).** Тестът измерва генна експресия на 21 гена чрез количествен qRT-PCR на РНК, изолирана от парафинови блокчета. Дава точкова оценка за рецидив при жени с ранен стадий на КГ, с налична експресия на естрогенен рецептор, без метастатично засягане на регионални лимфни възли. Анализират се 16 гена, отговорни за пролиферация и регулация на естрогеновия рецептор (ER), на HER2-сигналния път и инвазия, заедно с пет контролни гена. Резултатът от теста се изразява като оценка за рецидив (RS) от 1 до 100. Туморите се класифицират в три рискови категории, базирани на

техния RS: нисък (RS < 18), умерен (RS 18-30) и висок риск (RS ≥ 31).<sup>3</sup> Тестът може да бъде използван при новодиагностицирани пациенти от всички възрасти с ER+, стадий I или II. Притежава и предиктивна стойност за ползи от ендокринна терапия (*tamoxifen* и/или ароматазни инхибитори) и от адювантна химиотерапия.<sup>2</sup>

**70-генна сигнатура (MammaPrint).** Тестът е базиран на ДНК-микроарей технология. Наскоро е валидиран за работа с тъкани, включени в парафин. Дава резултат, определящ две групи с геномно нисък риск и геномно висок риск.<sup>3</sup>

**EndoPredict.** Тестът комбинира експресията на три пролиферативни гена, пет гена, свързани с ER-сигнален път и диференциация, както и 3 контролни гена. Чрез количествен RT-PCR се измерва в РНК, изолирана от парафинови срези и може да се прави в децентрализирани лаборатории. *EndoPredict* е мултигенен тест, предиктивен за вероятността от развитие на метастази за 10 години от началната диагноза при жени с ER+ и негативен HER2. Тестът комбинира измервания на генна експресия (*EndoPredict* [EP] score 0-15) с нодален статус и размер на тумора, генерирайки пълен резултат за риск (*EPclin*) за идентифициране на туморни типове, които няма да имат полза от химиотерапия.<sup>4</sup>

**Prosigna (PAM50).** Тестът (Nanostring Technologies, Seattle, USA) е базиран на оригиналните молекулярни субтипове КГ и позволява тяхното определяне чрез ползване на сигнатурата от включена в парафин тъкан. Друг резултат е риск от рецидив (ROR Score) със стойност между 0 и 100; изчислява се на базата на 46 гена плюс референтни гени, пролиферационен резултат и размер на тумора. Пациентите се класифицират в групи с нисък, умерен и висок риск.<sup>5</sup> ROR Score за клинична практика включва клинична информация за размер на тумора и

нодален статус. *Prosigna* е валидиран за децентрализирано тестване чрез Nanostringn Counter технология.<sup>6</sup>

**Breast Cancer Index (BCI).** Тестът (bioTheragnostics Inc, SanDiego, CA, USA) е алгоритъм, базиран на генна експресия, включваща две генни сигнатури, отношението HOXB13:IL17BR (H/I) и Molecular Grade Index (MGI). По правило *BCI* е RT-PCR тест, който измерва експресията на H/I, MGI и четири контролни гена. *BCI* прогностичната скала (*BCI* 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. *BCI* предиктивната оценка (*BCI* Predictive) дава вероятност за полза от угължена над пет години адювантна ендокринна терапия.<sup>7</sup>

## Клинична употреба на мултигенни сигнатури

На конференцията *St. Gallen 2017* експерти от всички континенти разгледаха публикациите от последните две години и дискутираха дали новите диагностични или терапевтични методи са готови за рутинната клинична практика. Основна тема бе възможността за ескалиране и деескалиране на лечението и традиционните гласувания изясниха голям брой въпроси в това отношение.<sup>8</sup>

Голям брой жени с ранен стадий КГ получават агресивни лечения, включително химиотерапия, която подобрява преживяемостта на популационно ниво, но може да не е от полза за всеки индивидуален пациент. Освен това, тези лечения могат да причинят значителни дълготрайни ефекти и да повлияят негативно качеството на живот. Така, адекватната оценка на прогнозата на пациентите е решаваща за избягване на свръхлечението и за оптимизиране на техните адювантни стратегии.

## МУЛТИГЕННИ СИГНАТУРИ И ДЕЕСКАЛАЦИЯ НА АДЮВАНТНИТЕ...

В последното десетилетие са въведени няколко мултигенни сигнатури, които показват молекулярната основа и хетерогенност на КГ и помагат за усъвършенстване на прогностиката и стратификацията на терапията. Голям брой групи публикуваха препоръки и ръководства, признаващи увеличаващите се доказателства за използване на някои от мултигенните сигнатури за предикция на прогноза, специално в подгрупата на жени с нодално негативен луминален А КГ. Ниво на доказателственост 1В има за 4 теста (*EndoPredict*, *Genomic Grade Index*, *PAM50* и *Breast Cancer Index*), изследвани досега при повече от 6000 пациента и ниво на доказателственост 1А са доказани за *OncotypeDx* и *MammaPrint* в *TAILORx* и *MINDACT* проспективните фаза 3 проучвания.<sup>9</sup>

Резултатите от клиничното проучване *MINDACT* (*Microarray In Node-negative and 1 to 3 positive lymph node Disease may Avoid ChemoTherapy*) дават проспективни данни, които показват, че *Mamma Print* е геномен тест за КГ, който селективно идентифицира пациенти в ранен стадий КГ със свойства за висок риск (1-3 позитивни лимфни възли (LN+ 1-3), степен на диференциация G 2 или 3, размер на тумора > 2 см) като нисък риск без клинично значима полза от химиотерапия.<sup>10</sup>

Нови данни са публикувани през юни 2017 в *JAMA Oncology*. След ретроспективен анализ (652 пациентски проби, анализирани с *MammaPrint* и 58% класифицирани като нисък риск; от тях 26% установени с нисък риск за късен рецидив, показващи отличен профил на преживяемост след 20 години) и данните от 20-годишно проследяване от проспективното проучване *Stockholm Tamoxifen* е демонстрирана способността на *MammaPrint* да идентифицира подгрупа пациенти с извънредно нисък риск за метастазизиране 20 години след диагностицирането им. Тези пациенти, повечето от които са получили само ендокринна терапия за две го-

дини, имат 20-годишна специфична КГ преживяемост от 97%.<sup>11</sup>

*David Dabbs et al.* сравняват стратифицирането на риска от КГ чрез *MammaPrint* и *OncotypeDx* в голям многоцентров анализ, който е представен на годишната среща на Американското общество по клинична онкология (*ASCO*) в Чикаго през юни 2017 г. Резултатите показват, че 70-генната сигнатура идентифицира 30% повече нисък риск пациенти, отколкото 21-генната сигнатура с отличен 5-годишен интервал без далечни метастази от 98.5%. Освен това *MammaPrint* открива и 30% повече пациенти с висок риск.<sup>12</sup>

Изследване на *Lau et al.* подкрепя клиничната полза на 21-гена *OncotypeDX* при КГ с позитивни естрогенни рецептори и липса на експресия на HER2: при повече от 12 години клинично използване заключението е, че този тест има доказателства от >80000 нодално-негативни и нодално-позитивни пациента. Данните потвърждават, че тестът идентифицира пациенти с ниски RS резултати, които могат да бъдат третирани ефективно само с ендокринна терапия като им бъде спестена химиотерапията.

Тестът предоставя информация, която лекарите/пациентите използват за персонализиране на терапията и намаляване на химиотерапията и съответно на разходите за здравеопазване. Така клиничната полза на RS теста е подкрепена от внушителен брой доказателства.<sup>13</sup>

Въпреки многото данни, подкрепящи клиничната валидност/полза на мултигенните сигнатури, остават много сиви зони без отговори. При сравняване на прогностичната информация от различните мултигенни сигнатури изглежда, че въпреки предоставянето на в общи линии на равностойна информация за риск при жени с луминални КГ, на индивидуално ниво тези тестове могат да дават различна информация за категории риск и субтип. Това

поставя въпроса кои мултигенни сигнатури трябва да се предпочетат. Още повече, че мултигенните сигнатури са разработени повече като прогностични инструменти за подобряване и усъвършенстване оценката на риск от рецидив, отколкото като предиктивни маркери за полза от химиотерапия.<sup>9</sup>

## Заклучение

Мултигенните сигнатури могат да се използват за определяне на прогноза при пациенти с КГ и да подпомогнат решението за избор на лечение при подгрупата, класифицирани като несигурни случаи според класическите клиничко-патологични характеристики (като КГ с позитивна експресия на естрогенов рецептор и негативна на HER2, междинна степен на диференциация 2, Ki67 между 10 и 20% и без засягане на аксиларните лимфни възли). Интегрирането на тези маркери с клиничко-патологичните параметри (размер на тумор и нодален статус) остава критично за подобряване прогностичната точност; при вземане на терапевтични решения трябва да се вземат предвид и предпочитанията на пациентите. Неопходими са още данни за по-добро дефиниране ролята на мултигенните сигнатури при предикция на ползата от адювантна химиотерапия и от угължана ендокринна терапия.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Kwa M, Makris A, Esteva FJ. Clinical utility of gene-expression signatures in early stage breast cancer; Nature reviews Clinical Oncology; published online 31 May 2017 doi:10.1038/nrclinonc.2017.74
2. 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
3. Sapino A, Roepman P, Linn SC, et al. MammaPrint molecular diagnostics on formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. *J Mol Diagn* 2013;16:190-197
4. Dubsy P, Filipits M, Jakesz R, et al. Austrian Breast and Colorectal Cancer Study Group (ABCSCG). 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
5. Wallden B, Storhoff J, Nielsen T, et al. Development and verification of the PAM50-based Prosigna breast cancer genesignature assay. *BMC Med Genomics* 2015;22(8): 54;1-14
6. Nielsen T, Wallden B, Schaper C, et al. Analytical validation of the PAM50-based Prosigna Breast Cancer Prognostic GeneSignature Assay and nCounter Analysis System using formalin-fixed paraffin-embedded breast tumor specimens. *BMC Cancer* 2014;13(14): 177; 1-14
7. Zhang Y, Schnabel CA, Schroeder BE, et al. Breast cancer index identifies early-stage estrogen receptor-positive breast cancer patients at risk for early- and late-distant recurrence. *Clin Cancer Res* 2013;19(15): 4196-4205
8. Gnant M, Harbeck N, Thomssen C. A Brief Summary of the Consensus Discussion about Escalation and De-Escalation of Primary Breast Cancer Treatment Breast Care. St. Gallen/Vienna 2017 2017;12:102-107 DOI: 10.1159/000475698
9. Sotiriou C, Lambertini M. Integrating multigene signatures in the management of primary breast cancer: when do we need it? 15th St. Gallen International Breast Cancer Conference / The Breast 32S1 (2017) S1-S21 Speakers' Abstracts S2 / The Breast 32S1 (2017) S1-S21
10. Cardoso F, van't Veer, LI, Bogaerts J, et al. 70-gene signature as an aid to treatment decisions in early stage breast cancer. *NEJM* 2016; 375; 717-729
11. Esserman L, et al. MammaPrint® Late Recurrence (20yr) Low Risk result identifies breast cancer patients with 97% survival at 20-years with limited endocrine therapy treatment. *JAMA Oncology*. doi 10.1001/jamaoncol.2017.126 published online June 29, 2017
12. Dabbs DJ, Cox CE, Shivers S, et al. Multi-institutional comparison of breast cancer risk stratification by 70-gene signature and 21-gene assay. Poster presented at the ASCO Annual Meeting. June 2017, Chicago, Illinois.
13. Lau A, Miller D, Davison D, et al. Clinical utility of the 21-gene Oncotype DX® Recurrence Score® (RS) assay in hormone receptor-positive, HER2-negative breast cancer (BC); 15th St. Gallen Vienna 2017 International Breast Cancer Conference. Poster abstracts

////////////////////////////////////

**ТЕЧНА БИОПСИЯ И ЦИРКУЛИРАЩИ ТУМОРНИ  
КЛЕТКИ – ВЪЗМОЖНОСТИ И ГРАНИЦИ  
НА УПОТРЕБА**

////////////////////////////////////

**д-р Борис Петров**

*МЦ Трансхеликс, София*





# ТЕЧНА БИОПСИЯ И ЦИРКУЛИРАЩИ ТУМОРНИ КЛЕТКИ – ВЪЗМОЖНОСТИ И ГРАНИЦИ НА УПОТРЕБА

*д-р Борис Петров*

МЦ Трансхеликс, София

## ОБЗОР

*Провеждането на биопсия от първичния тумор или неговите метастази е една от първите стъпки в диагностично-лечебния процес в онкологията. Постановяне на онкологична диагноза отдавна не е единствената цел на туморната биопсия; понастоящем изходната биопсия дава информация както за туморния геном, така и за потенциални таргети, които биха определили последващото лечение. Предвид хетерогенността на тумора (както в самата първична формация, така и в метастазите), единична проба може да не отразява реално молекулярния профил на тумора. Течната биопсия може да обхване тази хетерогенност на болестта, като позволява проследяване в хода на лечение, оценка на нейната ефективност и използването ѝ в клиничната практика като предиктивен и прогностичен маркер.*

*В статията се обсъждат видовете течна биопсия, клиничното им значение и бъдещите насоки на развитие.*

## Увод

Течната биопсия е съвременна неинвазивна техника, използвана за диагностика при различни онкологични болести. При нея се анализират туморни клетки или туморна ДНК в кръвна плазма от пациенти.

Концентрацията на циркулиращи туморни клетки (CTCs) и циркулираща, освободена от тумора ДНК (ctDNA) в кръвта, обикновено е много по-висока при пациенти с авансирани метастатични карциноми, отколкото при пациенти с ранни стадии на болестта. Тези факти са довели до използване на CTCs и ctDNA като диагностични биомаркери при метастатична болест. Ма-

териали с произход от мозъчни тумори са слабо представени в периферна кръв, което може да е в резултат на наличието на кръвно-мозъчната бариера. Освен това, асоцирането на CTCs с туморния стадий е довело до хипотезата, че анализът на тези клетки може да разкрие ключови механизми на прогресията и разпространението на карцинома. Днес е известно, че концентрациите на CTCs, ctDNA и екзозоми (мембранно-свързани фосфолипидни везикули с диаметър от 30–150 nm, активно секретирани от клетки на бозайници, опосредстващи комуникацията между клетките) от течни биопсии на пациенти отразяват не само разликите в

общия туморен товар, но също и разнообразието на още нехарактеризирани клетъчни популации, които са присъщи за стадия на болестта. Технологии с висока чувствителност и селективност, които намират малки количества от CTCs и ctDNA в кръв, се очаква да дадат значима диагностична стойност.<sup>1</sup>

### Циркулиращи туморни клетки

Първичните туморни лезии и метастазите освобождават групи от CTCs в циркулацията. Тези клетки са типично инвазивни (като са „избягали“ от мястото на произход им“) и са резистентни към апоптоза (апоптоза), свойства които по презумпция им позволяват да се развиват в органи, извън първичния тумор (напр. черен дроб, кости, бели дробове и мозък).

Въпреки слабото разбиране на механизмите, чрез които клетките се разпространяват, те вероятно са зависими от хемокинни градиенти (както се предполага в експерименти за мотилитет в предклинични проучвания) и от експресията на специфични мембранни рецептори в човешките CTCs. При пациенти с карцином, дисеминираните туморни клетки (ДТК) излизат от съдовете и преминават в тъканите – процес, известен като екстравазация. Така те могат да останат спящи като единични клетки или като малки микрометастази с години преди да пролиферират до идентифицируеми метастази. Експериментите са показали, че напусналите първичния тумор и/или метастаза туморни клетки придобиват миграционен и инвазивен фенотип, който наподобява този на стволовите клетки като претърпяват епително-мезенхимна трансформация (ЕМТ). Въпреки това, не всички стъпки на ЕМТ са необходими за интравазация на туморните клетки – дори и частична ЕМТ може да е достатъчна, за

да се повиши броят на тумор-иницииращи клетки.<sup>2</sup> Тази трансформация прави туморните клетки много по-пластични и податливи на мезенхимно-епителна трансформация (МЕТ) – процес, определен като критичен за колонизация на място с ДТК. Все още моделът на ЕМТ/МЕТ се нуждае от щателно валидиране при пациенти преди да се определи неговата важност за клинично значими клетъчни фенотипове.

Клинични проучвания са показали, че преживяемостта на CTCs е кратка (1–2.4 часа). Въпреки това, клонове от CTCs, самостоятелно или в клъстери, могат да придобият възможността да преживеят за по-дълги периоди. Например, въпреки че CTCs са податливи на атаки от имунни клетки, „маскираните“ CTCs, експресирани протеина *programmed death-ligand 1* (PD-L1) на повърхността си могат да деактивират имунната система.<sup>3</sup> CTCs, обградени от тромбоцити, също могат да покажат повишена защита срещу имуно-медирана лиза. Всъщност, поради техния размер, клетъчните агрегати е по-вероятно да бъдат обхванати от микросъдове, което да улесни процеса на екстравазация. Големи клинични проучвания за прогностичната стойност на CTCs доказват, че дори кратковременно, тяхното транзитно преминаване през кръвта е критична детерминанта за развитието на метастази.<sup>1</sup>

Прогресът в намирането и валидирането на биомаркери в CTCs позволи изолирането на тумор-позитивни клетки от кръвни проби на пациенти, въпреки че установяването на малък брой CTCs в общия обем кръв е основнопредизвикателство. Изолиранечрез позитивно обогатяване на CTCs може да се извърши на базата на клетъчно-повърхностни маркери, например чрез използването на антитела, специфични към епителната клетъчно-адхезивна молекула (ЕрCAM), експресирана на повърхността

## ТЕЧНА БИОПСИЯ И ЦИРКУЛИРАЩИ ТУМОРНИ КЛЕТКИ

на епителните CTCs и чрез чипове, които отделят кръвните клетки от по-големите туморни клетки.<sup>1</sup> Негативна селекция се прави на базата на размера или групи биофизични свойства на CTCs. След обогатяване от CTCs може да бъде изолирана ДНК и те да бъдат характеризирани чрез използването на имунологични, молекулярни или функционални тестове. Данните по отношение на асоциацията между броя на CTCs, клиничния стадий и наличието на далечни метастази все още са противоречиви. През последното десетилетие епителният имуноспот (EPISPOT) тест позволи намирането на жизнени CTCs от различни карциномни типове. Освен това, функционални тестове с дълготрайни култури от CTCs или с известни ксенографски клетъчни линии от имунодефицитни мишки позволиха да се изследва лекарствена чувствителност при пациенти с карцином на бял дроб<sup>4</sup> и помогнаха да се създаде молекулярния профил на метастазно-компетентните CTCs.<sup>5</sup> От основно значение е идентифицирането на биомаркерите на CTCs, които причиняват метастазите и рецидивите при карциномно болните пациенти.<sup>5</sup>

CTCs са изследвани в множество проучвания за стратификация на пациентите за планиране на лечение, за мониториране на лечебната ефикасност в реално време, за идентифициране на терапевтични таргети, за идентифициране на механизми на резистентност и за оценка на риска от метастазиране.<sup>1</sup> Първото пилотно проучване за ранно откриване на карцином на бял дроб при пациенти с ХОББ установи наличието на CTCs при 5 от 168 пациенти.<sup>6</sup> Тези 5 пациента впоследствие са диагностицирани с карцином на белия дроб. Тези предварителни данни за специфичността на CTCs за откриване на белодробен карцином трябва да се валидират в по-големи кохорти от пациенти. Въпреки че клиничната значимост

на CTCs е извън съмнение, например за предсказване на ранен отговор към лечение при карцином на гърда и простата, оценката за тяхната широка клинична употреба е все още в ход. Примери за интервенционални клинични проучвания са: STIC CTCs при карцином на гърда (NCT01710605), което използва CTCs за определяне на типа на първа линия терапия при метастатичен хормон рецептор-позитивен карцином на гърда; *DETECT III* (NCT01619111), при което пациентки с HER2-негативен метастатичен карцином на гърда са стратифицирани да получат HER2-таргетна терапия (*lapatinib*) на базата на статуса на HER2 в техните CTCs и проучването *TACTIK* (Персонализирано лечение на пациенти с метастатичен кастрационно-рефрактерен простатен карцином според кинетиката на CTCs по време на химиотерапия – GETUG-AFU-28, започващо да набира пациенти през 2017), при което анализът на CTCs ще информира клиницистите дали да приложат химиотерапия на пациенти с кастрационно-рефрактерен карцином на простата.

### Циркулираща туморна ДНК (ctDNA)

Свободната от клетки ДНК (cfDNA) се появява в кръвта от апоптотични и некротични клетки. Тумор-свързаните мутации в cfDNA отразяват хетерогенността, установена в първичните и метастатичните лезии и поради това са предиктивни за отговор към лечение и резистентност. Циркулиращата туморна ДНК е обещаващ биомаркер с широко приложение за откриване на рецидив сред безсимптомни пациенти. Например, определянето на мутации в *EGFR* гена в cfDNA при пациенти с карцином на бял дроб е одобрено от FDA през 2016 г. с диагностичен тест. Тестът се базира на амплификация чрез верижно-полимерна реакция и намира специфични мутации

при НДКБД, каквито са екзон-19 делеции или точкова субституционна мутация L858R в екзон 21. Установено е и високо съвпадение между тъканна и cfDNA при пациенти с колоректален карцином в мутационния статус на *KRAS*, *NRAS* и *BRAF*. Въпреки това, в няколко случая са намерени мутации в *KRAS* при течната биопсия, които не са установени в тъканната биопсия<sup>7</sup>, което може да отразява биологична хетерогенност, липсваща в тъканния материал. Това още повече илюстрира предизвикателствата за евентуалното приемане на течната биопсия като клиничен златен стандарт. Тези „интервенционални“ тестове, базирани на течна биопсия, пуснати на пазара и достигнали клиничната практика, могат да се използват за определяне на анти-EGFR лечение при EGFR-мутирани пациенти с НДКБД, когато липсва или е труден достъпът до тъкан. Проведени са множество изследвания, които показват клиничната значимост на ctDNA. Въпреки това са необходими допълнителни интервенционални проучвания, за да демонстрират клиничната ѝ приложимост, т.е. възможността им да доведат до решение за приемане или отхвърляна терапевтично действие в специфичен клиничен контекст.

Анализът на cfDNA също се използва за ранно откриване на минимално остатъчна болест (MRD) при пациенти с отстранени първични тумори. Например, проследяване след хирургично лечение и MRD е позволило да се изследва клоналната еволюция при пациенти с колоректален карцином.<sup>7,8</sup> Ранното установяване на MRD дава важна прогностична информация, позволяваща идентифициране на пациенти с висок риск от рецидив, което позволява ранни терапевтични интервенции.

Търсенето на ctDNA при пациенти с карцином в ранен стадий също може да доведе до нови подходи за карциномен скрининг. Чувствителността и специфичността,

както и биологичната сложност, представляват сериозно предизвикателство към по-широкото използване на единичен биомаркер. Например, туморен протеин P53 (TP53) мутации в cfDNA са установени при по-малко от 40% от проби от ранен карцином на бял дроб. Използване на чувствителната дигитална PCR-базирана технология намира ctDNA при 48-73% от пациентите с локализиран карцином от различен произход, което може да се обясни с вариации в биологичните механизми.<sup>9</sup> Свързани с карцинома мутации не се намират само при пациенти с карцином<sup>10</sup>, но и при доброкачествени състояния.<sup>11</sup> Наличието на карциномно-свързани мутации в cfDNA не означава задължително, че изследваният индивид има или ще развие карцином, поради което рискът от стрес за пациента и ненужни медицински изследвания ще бъде голям. Това подкрепя необходимостта от демонстриране на клинична полза в специфичен контекст.

Постигането на приемливи нива на чувствителност и специфичност при търсене на ранни карциноми изисква клиничните екипи да определят изискванията за идващите технически новости. Екстензивни изследвания трябва да идентифицират възможни комбинации от карциномно-специфични мутации и да определят количествени прагове, за да се избегне свръхдиагностика. На базата на информацията до днес се предлага ДНК секвенирането да бъде широко (да има отношение към значителната туморна хетерогенност) и дълбоко (да намира малки количества от ctDNA фрагменти в среда на генетично нормална cfDNA). Високо чувствителни технологии, които позволяват да се установява по-малко от 0.1% от ctDNA в кръвна плазма (каквито са ddPCR методите или карциномното персонализирано профилиране чрез дълбоко секвениране), се прилагат за анализи на cfDNA от пациенти с различни



форми на карцином. При все това, едно от ограниченията може да е броят на геномните еквиваленти, които са налични в кръвните проби на пациенти с ранни карциноми. Друго ограничение е, че незлокачествени състояния, които причиняват смърт на нормални клетки, може да доведат до разреждане на ctDNA молекулите и да компрометират количествената оценка.

### Екзозоми

Както CTCs, екзозомите носят различни клетъчни съставки от клетките, от които произхождат, вкл. протеини, иРНК (mRNAs), микроРНК (miRNAs) и вероятно ДНК.<sup>12</sup> Предполага се, че те играят активна роля в прогресията на карцинома. Участват в модулирането на туморната микросреда, което улеснява формирането на пре-метастатична ниша за идващите CTCs.<sup>13</sup> Екзозомното изолиране чрез ултрацентрифугиране или чрез антитела-базираны методи позволяват характеризирането на карциномно-свързаните екзозоми.<sup>14</sup> Понастоящем е възможно намиране и на не-маркирани екзозоми посредством повърхностно-плазмен резонанс чрез микрофлуидни технологии.<sup>15</sup>

Сравнителен протеинов анализ на циркулиращите екзозоми, открити в кръв и други биофлуиди, е идентифицирал специфични за болестта белтъчни таргети за солидните тумори.<sup>12</sup> При серумни екзозоми от пациенти с глиобластом е открито, че съдържат miRNA и характерна мутирала иРНК (EGFRvIII mRNA16). Екзозомни miRNA маркери също са идентифицирани за поредица болести, вкл. карцином на бял дроб, простата, панкреас и яйчници. Все още екзозомите и тяхното съдържимо остават слабо проучени. Необходими са подобрени стратегии за екзозомно изолиране, обогатяване и идентификация за изучаване на екзозомната биология и клиничната трансляция на екзозомите като биомаркери на болестта.

Сегашните клинични проучвания за установяване на клиничната полза от CTCs или cfDNA, екстрахирани от течни биопсии, се фокусират върху стратификация на пациентите и върху персонализираното мониториране на лечението на пациентите с карцином. Например, рандомизираното фаза III проучване *STIC CTCs* оценява дали броя на CTCs е полезен за установяване на лечебни стратегии за първа линия и избор между химиотерапия или по-малко агресивната ендокринна терапия при метастатичен хормон-рецептор позитивен дуктален карцином на гърда. При метастатичен кастрационно-рефрактерен простатен карцином рандомизираното фаза IV проучване *CARD* оценява ползите от трета линия химиотерапия (*cabazitaxel* – таксан, разработен да преодолява резистентността към *docetaxel*) при пациенти, лекувани с андроген-рецептор таргетна терапия и при които преди това е прилаган *docetaxel*, фенотипният анализ на CTCs ще включва експресия и локализация на андроген-рецепторните изоформи. Относно използването на cfDNA за диагноза на ранен карцином се изискват огромни ресурси, за да се идентифицират специфични геномни аберации в проучвания с големи кохорти. Обратно, използването на мутационен анализ на cfDNA за стратификация на пациенти за таргетна терапия постигна клинична използваемост при белодробен карцином и дава също важна информация за молекулярната еволюция на карцинома по време на лечение. Използването на течна биопсия отговаря на нуждите на отделните пациенти с карцином чрез мониториране и адаптиране на лекарствената ефикасност в реално време. Като се има предвид, че CTCs и cfDNA могат да се изследват за различни молекули, клиничната полза се очаква да е в резултат на тяхната комплементарност. Например, експресията на протеинни таргети, както е PD-L1 или РНК сплайс варианти, водещи

щи до резистентност, както е андроген-рецепторния сплайс вариант 7<sup>17</sup>, не могат да бъдат оценявани на ДНК ниво. Също така, последният напредък в екзозомната биология ще добави ценна клинична информация.<sup>18</sup>

Течната биопсия е иновативна, бърза и неинвазивна алтернатива на традиционните тъканни инвазивни биопсии. В комбинация със съвременните техники за молекулярен анализ може да се прилага като нов, лесен и чувствителен подход за диагностика. Болестта може да се наблюдава от първоначалната диагноза, през проследяване при ремисия и до установяване на рецидив. Генетичният скрининг на проби от течни биопсии може по-ефективно да установи туморна хетерогенност, промяна в чувствителността и резистентността към лечение. Лесната достъпност на пробите от течна биопсия позволява рутинното проследяване на пациенти, диагностицирани с карцином, по време на ремисия или ранно установяване на рецидив.

За момента в практиката се изследват CTCs и cfDNA. Анализът на екзозоми все още не е приложим в диагностиката. За разлика от CTCs, методиката за изолиране на cfDNA е лесна и бърза. Изолираната ДНК е годна за анализ и след дългосрочно съхранение. Процесът на обогатяване на CTCs е от изключително значение за последващите анализи. Стъпките на обогатяване и детекция изискват високо чувствителна и скъпа технология. Повечето от методите за обогатяване имат проблем със специфичността и чувствителността. Изследването на генетични маркери в cfDNA показва по-високо ниво на специфичност при туморно профилиране в сравнение с CTCs. Постоянните трудности при улавянето и диференцирането на хетерогенни CTC води до все по-голям интерес към cfDNA. В съчетание със секвенирането, течната биопсия с изолиране на cfDNA се оказва богат аналитичен ресурс

за диагностика на карцинома. В момента в диагностиката се използват няколко IVD-маркирани PCR-базирани китове с висока чувствителност и специфичност. Анализът от вземане на кръвта до получаване на резултат е изключително кратък – около 3-4 ч. За диагностика се използват и няколко панела за NGS. За момента клиничното тестване на ctDNA се прилага при вече диагностицирани пациенти. Има няколко проучвания при НКБД за ранно приложение на ctDNA тестването.<sup>19</sup> Все още се провеждат изследвания за подобряване на чувствителността на наличните техники за детекция на тумор преди клинична изява. Циркулираща туморна ДНК се счита за относителен индикатор за обема на тумора, особено по време на ремисия. Наблюдават се по-високи честоти на рецидив при пациенти с откриваема ctDNA след операция. Изследването на ctDNA е подходящо средство за първоначална диагноза при безсимптомни пациенти. На този етап все още критериите за поставяне на диагноза не са достатъчно добре определени.

## **Заклучение**

Поради наличието на определени мутации и при здрави индивиди, прилагането на течна биопсия за ранно диагностициране все още е в етап на разработване. Предполага се едновременното прилагане на CTC и ctDNA за ранна диагностика. Детекция при безсимптомни пациенти и първоначалното профилиране ще се осъществява чрез по-лесния и евтин метод за анализ на ctDNA. За по-точното определяне на стадия на болестта вероятно ще се прилага анализ на CTC, cfDNA или CTCs могат да се използват за профилиране на тумори, като CTCs представляват по-изчерпателен аналитичен ресурс за определяне на вътрешноклетъчните карциномни механизми. Циркулиращата туморна ДНК има по-голямо приложение в диагностиката

## ТЕЧНА БИОПСИЯ И ЦИРКУЛИРАЩИ ТУМОРНИ КЛЕТКИ

---

като може да се използва за рутинно проследяване на пациентите, като относителното му ниво и мутационен статус се наблюдават, за да се определи прогресията или ремисията на болестта.<sup>20</sup> Течна биопсия се използва рутинно в стотици настоящи клинични проучвания. С напредването на технологиите се очаква и скорошно рутинно въвеждане в клиничната практика.

### ЛИТЕРАТУРА

---

1. Alix-Panabieres C, Pantel K. Clinical Applications of Circulating Tumor Cells and Circulating Tumor DNA as Liquid Biopsy. *Cancer Discov* 2016;6(5):479-491
2. Alix-Panabieres C, Mader S, Pantel K. Epithelial-mesenchymal plasticity in circulating tumor cells. *MolMed* 2017; 95(2):133-142
3. Mazel M, Jacot W, Alix-Panabieres C, et al. Frequent expression of PD-L1 on circulating breast cancer cells. *Mol Oncol* 2015;9(9):1773-1782
4. Hodgkinson CL, Morrow CJ, Dive C, et al. Tumorigenicity and genetic profiling of circulating tumor cells in small-cell lung cancer. *Nat Med* 2014; 20(8):897-903
5. Alix-Panabieres C, Cayrefourcq L, Assou S, et al. Molecular Portrait of Metastasis-Competent Circulating Tumor Cells in Colon Cancer Reveals the Crucial Role of Genes Regulating Energy Metabolism and DNA Repair. *Clin Chem* 2017; 63:700-713
6. Ilie M, Hofman V, Hofman P, et al. "Sentinel" Circulating Tumor Cells Allow Early Diagnosis of Lung Cancer in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *PLoS ONE* 2014; 9(10): e111597
7. Siravegna G, Mussoiln B, Marsoni S, et al. Clonal evolution and resistance to EGFR blockade in the blood of colorectal cancer patients. *Nat Med* 2015; 21:795-801
8. Tie J, Wang Y, Gibbs P, et al. Circulating tumor DNA analysis detects minimal residual disease and predicts recurrence in patients with stage II colon cancer. *Sci Transl Med* 2016;8:(346) 346ra92
9. Bettgowda C, Sausen M, Diaz LA Jr, et al. Detection of Circulating Tumor DNA in Early- and Late-Stage Human Malignancies. *Sci Transl Med* 2014;6:(224)224ra24
10. Krimmel JD, Schmitt MW, Risques RA, et al. Ultra-deep sequencing detects ovarian cancer cells in peritoneal fluid and reveals somatic *TP53* mutations in noncancerous tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 2016;113(21):6005-6010
11. Kato S, Lippman SM, Flaherty KT, Kurzrock R. The Conundrum of Genetic "Drivers" in Benign Conditions. *J Natl Cancer Inst* 2016;108(8)pii: djw036. doi: 10.1093/jnci/djw036.
12. Shao H, Chung J, Issadore D. Diagnostic technologies for circulating tumour cells and exosomes. *BiosciRep* 2015; 36(1): e00292
13. Hoshino A, Costa-Silva B, Kramer K, et al. Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature* 2015; 527:329-335
14. Melo SA, Luecke LB, Kalluri R, et al. Glypican-1 identifies cancer exosomes and detects early pancreatic cancer. *Nature* 2015; 523(7559):177-182
15. Im H, Shao H, Lee H, et al. Label-free detection and molecular profiling of exosomes with a nanoplasmonic sensor. *Nat Biotechnol* 2014; 32(5):490-495
16. Skog J, Wurdinger T, Breakefield XO, et al. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat Cell Biol* 2008; 10(12):1470-1476
17. Scher HI, Lu D, Dittamore R, et al. Association of AR-V7 on Circulating Tumor Cells as a Treatment-Specific Biomarker With Outcomes and Survival in Castration-Resistant Prostate Cancer. *JAMA Oncol* 2016; 2(11):1441-1449
18. Alix-Panabieres C, Pantel K. Challenges in circulating tumour cell research. *Nat Rev Cancer* 2014;14(9):623-631
19. Lowes LE, Marchetti D, Allan AL, et al. Circulating Tumor Cells (CTC) and Cell-Free DNA (cfDNA) Workshop 2016: Scientific Opportunities and Logistics for Cancer Clinical Trial Incorporation. *Int J Mol Sci* 2016;17(9): 1505. doi:10.3390/ijms17091505.
20. Calabuig-Fariñas S, Jantus-Lewintre E, Herreros-Pomares A, Camps C. Circulating tumor cells versus circulating tumor DNA in lung cancer – which one will win? *Transl Lung Cancer Res* 2016;5(5):466-482





////////////////////////////////////

**РАДИОМНО И РАДИОГЕНОМНО ЛЪЧЕЛЕЧЕНИЕ –  
НАСТОЯЩЕ И БЪДЕЩЕ**

////////////////////////////////////

**проф. д-р Татяна Хаджиева, дмн<sup>1</sup>  
проф. д-р Галина Кирова, дм<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Клиника по лъчелечение, УМБАЛ *Св. Иван Рилски*, София

<sup>2</sup>Клиника по образна диагностика, *Аджибадем Сити Клиник*, Болница *Токуда*, София



# РАДИОМНО И РАДИОГЕНОМНО ЛЪЧЕЛЕЧЕНИЕ – НАСТОЯЩЕ И БЪДЕЩЕ

*проф. д-р Татяна Хаджиева, дмн<sup>1</sup>  
проф. д-р Галина Кирова, дм<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>Клиника по лъчелечение, УМБАЛ Св. Иван Рилски, София

<sup>2</sup>Клиника по образна диагностика, Аджибадем Сити Клиник, Болница Токуга, София

## ОБЗОР

*Солидните тумори са хетерогенна маса от клетки и строма с различни биологични характеристики (кръвоснабденост, пермеабилитет на кръвоносните си съдове, клетъчна пролиферация, клетъчна смърт и други). Туморната хетерогенност е генетичен феномен, но тя се изразява в различна стромна архитектура, консумация на кислород, глюкозен метаболизъм, експресия на растежни фактори. Това обуславя различната лъчечувствителност на туморите. Съществува туморна хетерогенност между индивидите и интратуморна хетерогенност в един и същ тумор. В опит да се идентифицират тумори или отделни зони на различна радиочувствителност/резистентност се събира и обработва огромна база данни от образните методи (КТ, МРТ и ПЕТ/КТ и др.) в хода на диагноза, лечение и проследяване на пациента. Науката радиомика създава и разработва модели за анализ на тези образи чрез автоматизирани компютърни системи, които да обработват, структурират, класифицират и насочват към индивидуализирано лечение. Радиогеномиката съпоставя тези радиомни образи с геномните характеристики на отделния тумор и прави опит да създаде на предиктивни радиогеномни сигнатури. Тяхното приложение би могло да се използва за индивидуализирано лъчелечение (ЛЛ). Съхраняване на нормалните тъкани около тумора също са предизвикателство в ЛЛ. Техните геномни характеристики са обект на множество проучвания за откриване на молекулярни маркери за лъчечувствителност на ниво ДНК, РНК и протеоми.*

*В статията се дискутират новостите в радиомиката и радиогеномиката, тяхното място в клиничната практика и лъчелечението, както и прогностичните и предиктивните им влияния при различни карциномни локализации. Отбелязва се, че все още изследванията на радиомиката и радиогеномиката са в детската си възраст и не са достигнали до рутинно клинично приложение.*

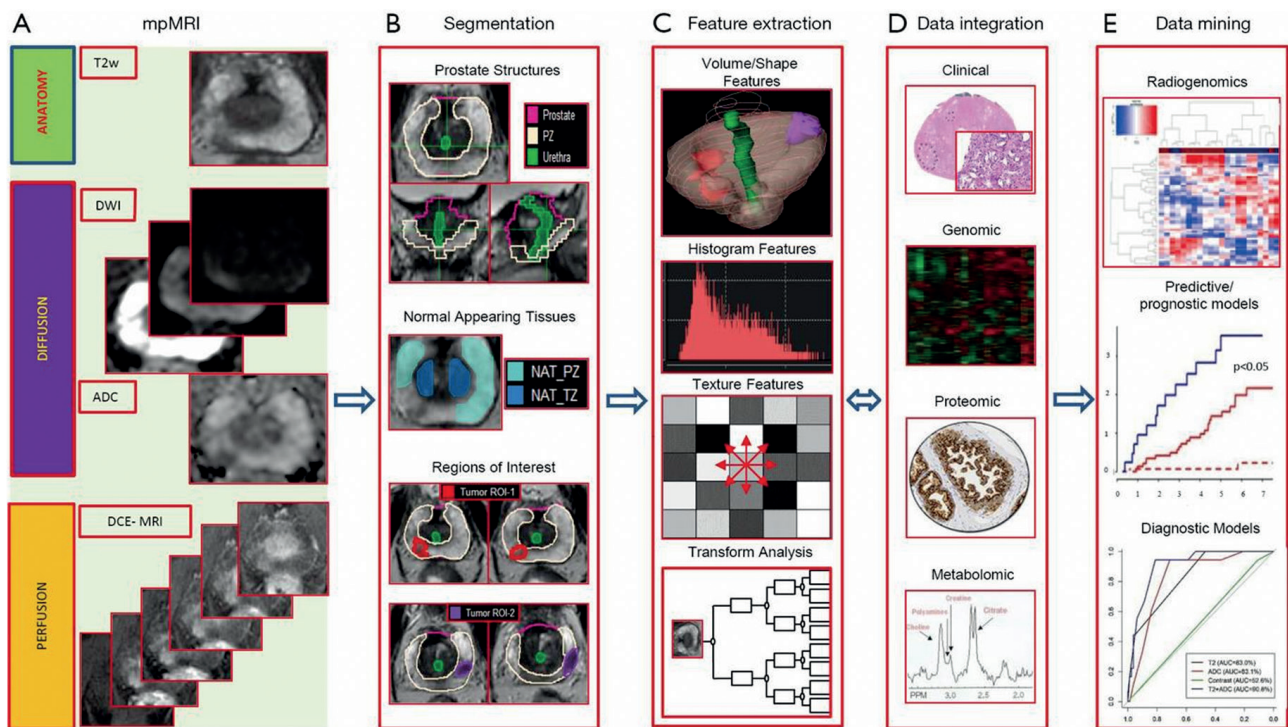
## Увод

Терминът *радиомика* може да се дефинира най-просто като модел за откриване или фенотипно характеризиране на болестен процес с помощта на автоматизирана компютърна система.

Радиомиката изучава количествени и качествени характеристики на образите, събрани през целия онкологичен път на пациента. Тя екстрахира и анализира огромно количество количествени и морфологични образи по време на диагностика, лечение и проследяване на пациента чрез 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 и анализирани в хода на стандартна диагностика, лечение и проследяване. Важно

е, че те изобразяват целия тумор, а не само негова част, като при геномен анализ. Преимство на този подход е възможността за оценка и на туморната строма, както и възможността за продължително проследяване в хода на болестта; при поставяне на диагноза и последващото определяне на плана за индивидуализирано лечение, поради отчитане на вътретуморната хетерогенност, може да бъде по-прецизно избрано мястото на биопсия.<sup>1</sup>

Радиогеномиката прави опит да създаде модели за оценка на риск чрез създаване на връзка между човешката геномна вариативност и клинични показатели като вероятност за туморен контрол и токсични радиогенни ефекти след лъчелечение. Нейна задача е съпоставяне на образите от КТ, МРТ и ПЕТ/КТ с геномните изследвания като така се създават прогностични ради-



Фигура 1. Принципи стъпки в разработване на модели на радиомика и радиогеномика. (По Larue C. et al. Публикувано с любезното разрешение на Br J Radiol, 2017).<sup>1</sup>

омни сигнатури въз основа на туморната хетерогенност, асоциирана със съпроводена генна експресия. Крайна, но все още много далечна цел, е изграждане на модели за предикция на туморния отговор към различни лечебни методи и по-специално – към лъчелечение (ЛЛ) и определяне на прогноза (Фиг.1).

Изследвани са много онкологични нозологии, но все още само някои от тях служат за модел и са най-близко до прилагане в лъчелечебната практика. Ние ще дадем няколко примера за карцином на бял дроб, на глава и шия и на простата.

### Радиомика чрез КТ и МРТ

При използването на КТ за целите на радиомиката 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. екстрахиране на тези характеристики и 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.<sup>2</sup> Счита се, че е настъпило време, когато радиомиката следва да излезе от сферата на бутиковите изследвания и да премине в транслационна технология. Известни дружества (като *American College of Radiology*, *Radiological Society of North America*, *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 влияния на радиомиката при карцином на бял дроб.* *Aerts et al.* провеждат първото широко мащабно радиомно проучване върху три кохорти от пациенти с белодробен карцином (БК) и две групи с тумори на глава и шия с общ брой около 1000 пациенти. Авторите оценяват прогностичната стойност на 200 показателя, екстрахиран от КТ преди лечение. Намерени са радиомни характеристики, които описват туморната хетерогенност и могат да бъдат полезни при предсказване на преживяемостта.<sup>2</sup> Проучва се възможността радиомиката да прогнозира риск от далечни метастази при белодробен аденокарцином върху КТ-образи. Фенотипните туморни разлики (неправилна форма, инфилтрация, хетерогенност и некрози) могат да бъдат количествено определяни след анализ на огромно количество характеризиращи образите алгоритми. В това проучване на *Aerts et al.* 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 радиомни сигнатури – 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.<sup>3</sup> Определят се зони на интерес в тумора или неговите части (хабилитати), разглеждани като триизмерни 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 хетерогенност на КТ-образите, изразяващи се в спикули и градиент на ентропия. *Grove et al.* считат тези показа-



тели за надежни прогностични индикатори при ранен БК.<sup>4</sup> Проведени са и други изследвания върху недребноклетъчен белодробен карцином (Фиг. 7), но са използвани различни параметри и друга методология за анализ, така че сравненията са затруднени.<sup>5</sup> Туморната хетерогенност е генетичен феномен, но тя се изразява в различна стромна архитектура, консумация на кислород, глюкозен метаболизъм, експресия на растежни фактори, така че отделни части на тумора да имат различна кръвоснабденост, пермеабилитет на кръвоносните си съдове, клетъчна пролиферация, клетъчна смърт и други биологични характеристики. Наблюдавана е както туморна хетерогенност между индивидите, така и интратуморна хетерогенност в един тумор.<sup>6</sup> Установени са различни показатели на хетерогенност във вид на количествено разпределение на параметрите. Създадени са хистограми, изследвани в над 200 публикации, но все още не са валидирани и нямат принос (Фиг. 7).

**Радиомни модели при простатен карцином.** Радиомните модели при простатния карцином се основават на компилиране на белези от отделните магнитнорезонансни серии – анатомични и функционални като T2WI, с отчитане на дифузия (Diffusion Weighted) и динамично контрастно усилване. Ръчната обработка на образите е времеемка и често субективна, поради влиянието на индивидуалната компетентност на рентгенолога. С цел намаляване на разликата между отделните изследователи European Society of Urogenital Radiology (ESUR) въведе система за изобразяване и докладване на простатния карцином – Reporting And Diagnosis System (PI-RADS) на база на групирани класифицирани критерии.<sup>7</sup> Независимо от PI-RADS и постигнатите резултати в определяне на граници и характера на тумора, все още нивото на субективност е високо, което предопределя надеждите, че

с помощта на радиомиката ще се подобри процесът на ранна диагностика и планиране на лъчелечение при пациентите с карцином на простатна жлеза.<sup>8</sup>

Съвременните радиомно ориентирани методи за диагностициране и стадирание на карцином на простата се базират на мануално дефинирани количествени параметри, изведени от мултипараметричните МРТ изследвания на простатна жлеза и тяхната последваща математическа обработка.<sup>9</sup> Те позволяват не само диференциране на туморната тъкан в жлезата, но и характеризиране на отделните зони на хетерогенност на тумора на базата на съвкупност от количествено оценени белези. Доказано е, че комбинацията от резултатите от мултипараметричната МРТ, комбинирана с таргетна биопсия, показват най-висока специфичност и чувствителност при разграничаване на високо-рискови простатни карциноми с оценка по *Gleason* > 7.<sup>10</sup> Повечето автори използват едновременно данни от анатомичните секвенции – сигнален интензитет, хомогенност, очертания, симетрия, отношение към околните тъкани, както и от фармакокинетичните и дифузионни серии, оценяващи една и съща част от простатната жлеза. Така например магнитнорезонансните T2-натоварени 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 туморната 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 изграждането на криви сигнал-време, чиято

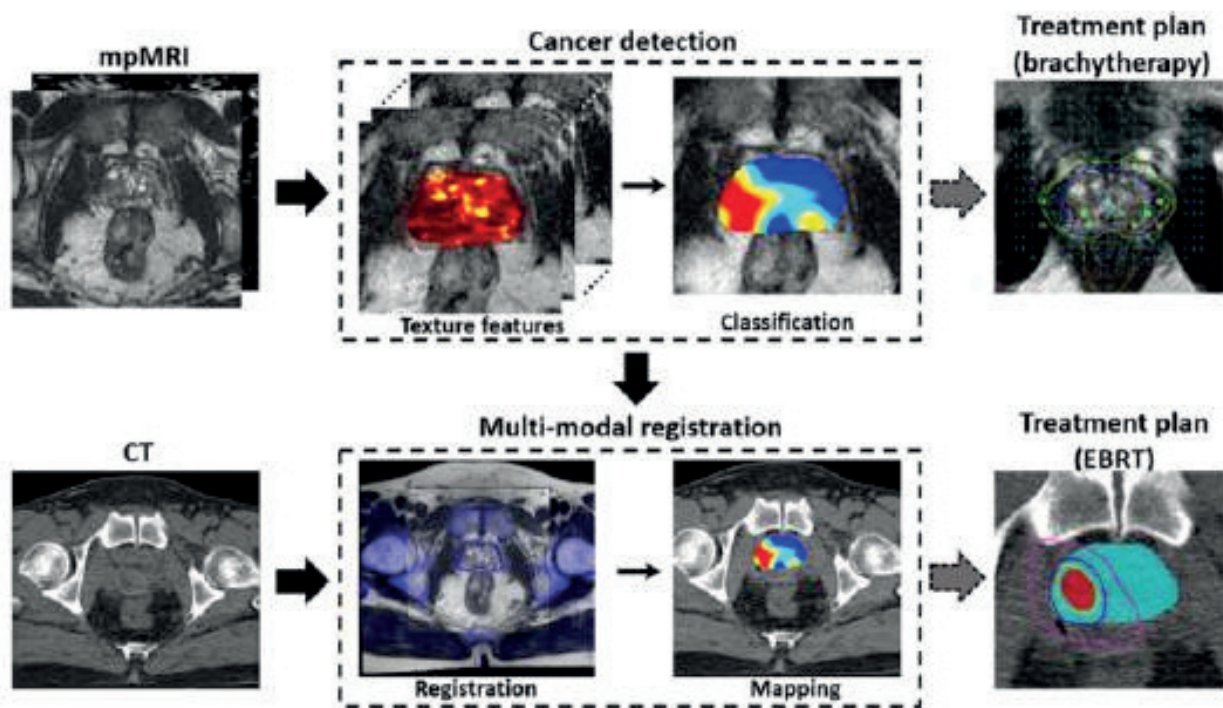


характеристика е специфична при тъкани с различно кръвоснабдяване, плътност на новоформирани патологични съдове (неоангиогенеза) и обем екстрацелуларна тъкан. Тези данни се използват при сегментиране на жлезата като на базата на тях се генерират карти, които позволяват разграничаване на доброкачествени и злокачествени състояния. Едновременно с това простатният карцином се характеризира с белези като мултифокалност и локална хетерогенност, което е установено на базата на хистограмите, получени при анализа на T2-секвентни образи от МРТ. Предложената радиомикс рамка за установяване и генотипно характеризиране на простатния карцином се структурира по следния път<sup>11</sup>: стандартизиране на мулти-параметрични МРТ протоколи на базата на радиологично-патологична корелация на образи от доказани простатни карциноми; попълване на радиомикс секвенатори, които генерират образни последователности, отнасящи се до фенотипно проявен простатен карцином; изготвяне на персонален радиомикс секвенатор за отделния пациент на базата на неговите резултати от мулти-параметрично МРТ изследване с оглед определяне на агресивността на тумора. Тази поредица от белези носи информация за адекватно диагностициране и определяне на прогнозата при индивидуалния пациент.

По правило МРТ има по-добра тъканна разделителна способност и позволява по-добро отграничаване както на простатната жлеза, така и на туморните лезии. За целите на прецизното планиране на ЛЛ се използват резултатите от оценката на простатните тумори, получени на базата на мултипараметрична МРТ. Доказано е, че анализът на образите от мултипараметричен МРТ протокол има висока специфичност и чувствителност. Последните проучвания показват, че класификатори, базирани на радиомика, могат да увеличат допълнител-

но точността и възпроизводимостта при планиране на ЛЛ при пациенти с простатен карцином.<sup>12-14</sup> Ето защо възможността за транслиране на образите, получени с помощта на МРТ, върху планиращите КТ образи, би позволило по-прецизно очертаване на мишенните обеми при различните режими на фракциониране на ЛЛ. Подобно суперпозиране може да се получи и с образи от ендоректално УЗ изследване и КТ или МРТ.<sup>13</sup> В процеса на наслагване на образите от отделните изследвания с цел “използване” на специфичните качествени характеристики, които всяко от тях носи, възникват няколко проблема. Това е “напасването” на полетата на изобразяване и деформацията на жлезата от различната степен на изпъване на пикочния мехур и ректума, както и различната позиция на пациента по време на добиване на образите. За преодоляване на тези проблеми някои автори предлагат методи за обемни КТ-МРТ образни сливания, вземащи под внимание радиомните модели и тъканната деформация.<sup>14</sup>

Предложени са различни алгоритми за целите на индивидуализирано планиране на ЛЛ, базирани на радиомикс. Един от тях е *RadTraP*, създаден от 2 институции – *University Hospitals Cleveland* и *Alpha 3T MRI & Diagnostic Imaging Center, New York*.<sup>14</sup> Той се състои от 3 модула: 1. Радиомна детекция чрез МРТ и класификационен обучаващ се четец. 2. Предаване на образа от МРТ на КТ с очертаната зона на интерес (мишенен обем за ЛЛ) чрез *multi-modal deformable co-registration*. 3. Генериране на образ за свръхдозирание с брахитерапия и перкутанно ЛЛ. Изследванията са ретроспективни на база образи на 100 болни с нисък и междинен риск за периферно разположен карцином. Крайната цел на модела е възможност за облъчване на области на простата с канцерцидна доза, докато в останалата част да се постигне редукция на дозата до 43% (Фиг.2). Резултатите по-



**Фигура 2.** Радиомика при ЛЛ на простатен карцином. Повишаване на дозата в високо-рискови области при перкутанно лъчелечение и брахитерапия. По Shiradkar, et al. С лобезното разрешение на. *Radiation Oncology* 2016.<sup>14</sup>

казват несигурност, свързана с планиране въз основа на така генерирани образи. Авторите заключават, че са нужни много данни за връзка между образите и хистологичната характеристика на тумора. Извлечени са 11 характеристики като интезивност на сигнала, градиент на Собел, корелация по Харалик и гр. върху единични болни.

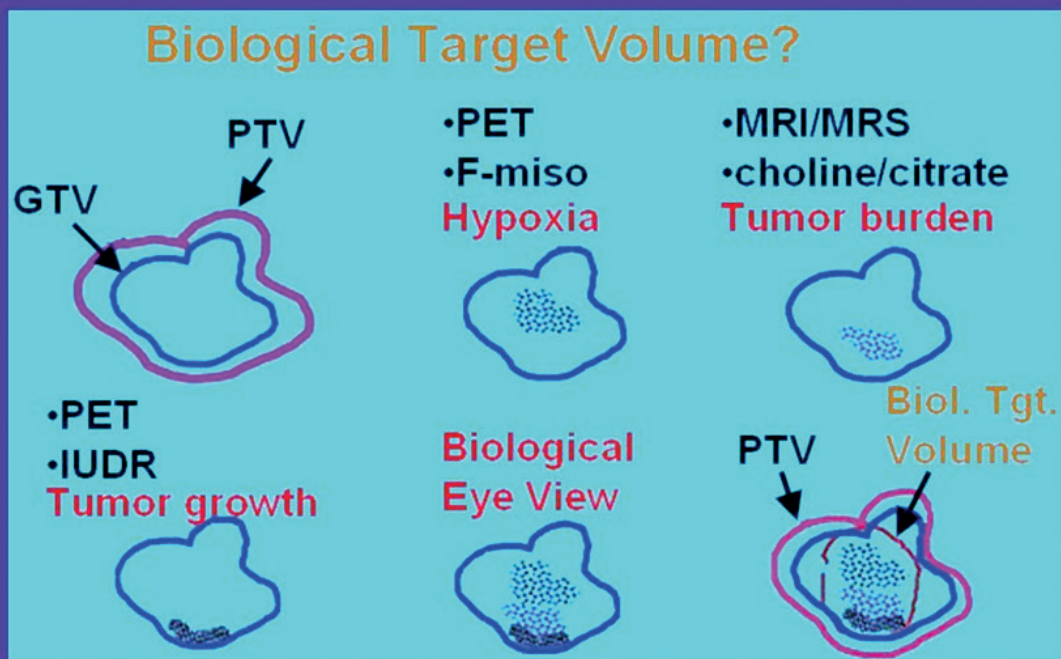
В литературата се четат много експресивни заглавия, като почти всички са адресирани в бъдещето с големи очаквания. Направени са върху ретроспективни данни, тъй като етично е невъзможно да се пренебрегнат стандартите за ЛЛ без валидиране и да се поеме риск за облъчване само на част от простатната жлеза. Оптималната цел е да се намалят дозите в нормалните органи около тумора като се организират т.нар. изотоксични проучвания. За съжаление, всички модели са на ниво научни изследвания.

## Радиомика чрез ПЕТ/КТ. Прилагане на ПЕТ/КТ за целите на биологично планиране на ЛЛ

**ПЕТ/КТ при лъчелечение на карцином на простата.** Стремежът е подобни модели с биомаркери да се създават върху ПЕТ/КТ образи – така освен морфологично очертаване на мишенния обем, може да се включи и биологичният мишенен обем (Фиг.3).

Въз основа на клинични данни и simple simulated ПЕТ образи са изведени т.нар. текстурални критерии (*textural features – TF*). Те се базират на хетерогенното натрупване на 18-флуорорезозоксиглюкоза (FDG) подобно на анализите от МРТ и КТ.<sup>16-17</sup> Проучва се въпроса доколко ПЕТ/КТ

## Biological target volume (BTV)



CC Ling, J Humm, S Larson *et al.*

*Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2000;47:551-60.

**Фигура 3.** Класическа схема за включване на образните морфологични и функционални методи за планиране на т.н. биологичен мишенен обем чрез използване на образи от МРТ, дифузионна МРТ, определяние на пролиферацията, ПЕТ/КТ *miso* за изобразяване на хипоксичните клетки. По JJ Ling, *et al.* С любезното разрешение на I J Rad On Biol Phys 2010.

може да служи за определяне на биологичния мишенен обем в ЛЛ. Естествено, първите изследвания са направени с  $^{11}\text{C}$ -*choline* ПЕТ/КТ. Успяхме да намерим 2 проучвания общо върху около 200 болни. Италианско изследване проучва възможността да се направи едновременно свърхдозирание при дефинитивно ЛЛ, прилагано с хипофракционирание, при 83 болни с рецидив в лимфни възли; проучването показва много добра токсичност за нормалните тъкани.<sup>17</sup> *Jerezek-Fossa* докладва 22 пациенти от 74 случая, при които  $^{11}\text{C}$ -*choline* ПЕТ/КТ променя вида на плануваното ЛЛ.<sup>18</sup>

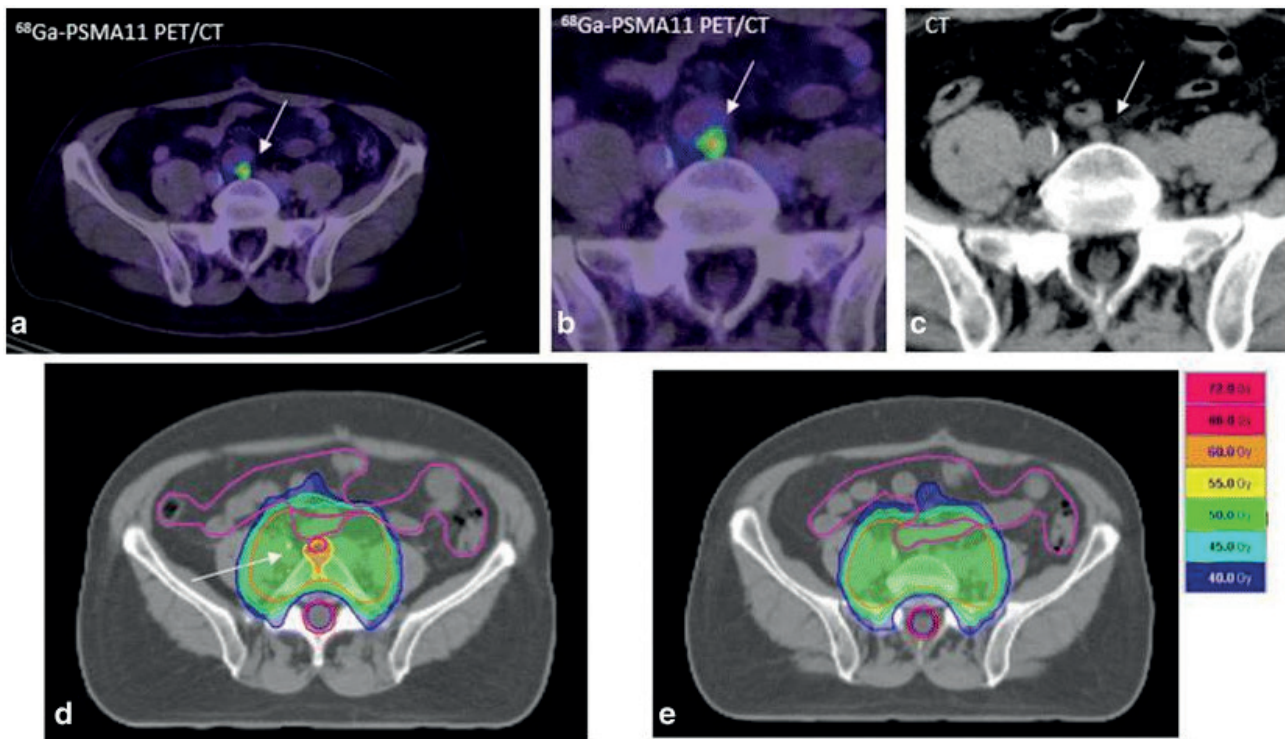
Основният проблем е, че  $^{11}\text{C}$ -*choline* ПЕТ/КТ трудно открива малки лимфни метастази в таза. Публикувани са системни анализи на прилагането на нехолиновите радиофармацевтици в ПЕТ/КТ за прецизиране на ЛЛ.<sup>19</sup> 19 публикации върху 629 болни показват, че при 483 болни (77%, 95% [CI 74% – 80%]) може да се използва позитивен  $^{11}\text{C}$ -*Acetate* ПЕТ/КТ сканиране. 5 публикации са посветени на  $^{18}\text{F}$ -*FAСВС* ПЕТ/КТ върху 174 болни, от които 127 (73%, 95% [CI 68% – 78%]) имат позитивен скан в първичния тумор, лимфни метастази и органни метастази. 10 публикации



описват възможностите на  $^{18}\text{F}$ -NaF ПЕТ/КТ при 1289 от 3918 болни (33%) за визуализиране на костни метастази. Шест публикации откриват възможности за доминантни интрапростатни области при 178 пациенти, при които при облъчване на цялата простата може да се провежда едновременно свръхдозирание в тези области.<sup>19</sup> Предстоят клинични проучвания за оценка на радиомика с ПЕТ/КТ при ЛЛ и оценка на преживяемост. Големи надежди се възлагат на новия маркер PSMA, белязан с  $^{68}\text{Ga}$ . Все още обаче, няма достатъчно данни за чувствителност и специфичност на метода. Установена е висока позитивна предсказваща стойност (Positive predictive value, PPV). Публикацията на *Blumet al.* от Германия върху 45 пациента изследва възможността ПЕТ/КТ да визуализира морфологичен или да намери източника на биохимичен рецидив при повишен

PSA след простатектомия.<sup>20</sup> Установява се натрупване в 24 от 45-те пациента. При 62.5% е намерен източника на биохимичния рецидив. Това променя вида на лечение при 19 от 45-те пациента (42.2%), при които е извършена радиохирургия (РХ) на метастазите.<sup>20</sup> При установяване на морфологичния рецидив, зоната допълнително се свръхдозира до 66 Gy (Фиг. 4).

В друго ретроспективно проучване на *Sabrina Dewes et al.* върху само 15 болни в 53.3%  $^{68}\text{Ga}$ -PSMA-ПЕТ/КТ води до промяна в стадирането чрез TNM и последващата лъчетерапевтична стратегия. Това е свързано с повишаване на дозата в 80%, намаляване на дозата в 13.3% и облъчване на допълнителни обеми в 25%.<sup>21</sup> Изводът е върху малък брой пациенти и нуждата от проспективни изследвания е значителна. Проведени са и други малки ретроспектив-



**Фигура 4.** а: пациент с ПК и рецидив; б: PSMA PET/CT с позитивен пресакрален лимфен възел с неясен резултат на КТ; с, д: Лъчетерапевтичният план, базиран на ПЕТ/КТ, е от 34 фракции и 51 Gy и boost към метастатичния ЛВ от 61.2 Gy; е: за сравнение – лъчетерапевтичният план без ПЕТ/КТ-информация.<sup>22</sup>

ни проучвания като това на *F. Sterzing et al.* върху 57 болни – 15 с първоначална диагноза и 42 с биохимичен рецидив. При 50% е сменен видът на лечение.<sup>22</sup> За съжаление проучванията са върху малък брой пациенти и всички завършват с потвърждаване на необходимостта от бъдещи рандомизирани проучвания. Нова надежда за индивидуализация на мишенните обеми в ЛЛ се възлагат на нови радиофармацевтични маркери като *fluciclovine* (fluorine-18; F-18). Той е приложен в *Emory University, Atlanta, Georgia*, САЩ върху 96 болни след простатектомия. Направена е КТ и МРТ и с помощта на F-18-*fluciclovine* ПЕТ/КТ при 45 пациента е променен плана за ЛЛ. Резултатът е повисока доза в булбус пенис, но намаляване на дозата в пикочен мехур и ректум, съответно и на лъчевите реакции в урогениталния и гастроинтестиналния тракт.<sup>23</sup>

**Радиомни констелации чрез <sup>18</sup>F fluoro-2-deoxy-D-glucose (FDG) ПЕТ/КТ при карциноми на глава и шия.** Проведени са изследвания за възможността за установяване на предиктивни характеристики, базирани на метаболитния обем, при карциноми на глава и шия. При 120 пациента се установява, че показателят *SUV* и *метаболитната туморна скорост* (MTVelocity) предсказват по-лош резултат след лъчелечение и/или операция.<sup>24</sup> За съжаление, други изследвания не потвърждават тези изводи.<sup>25,26</sup>

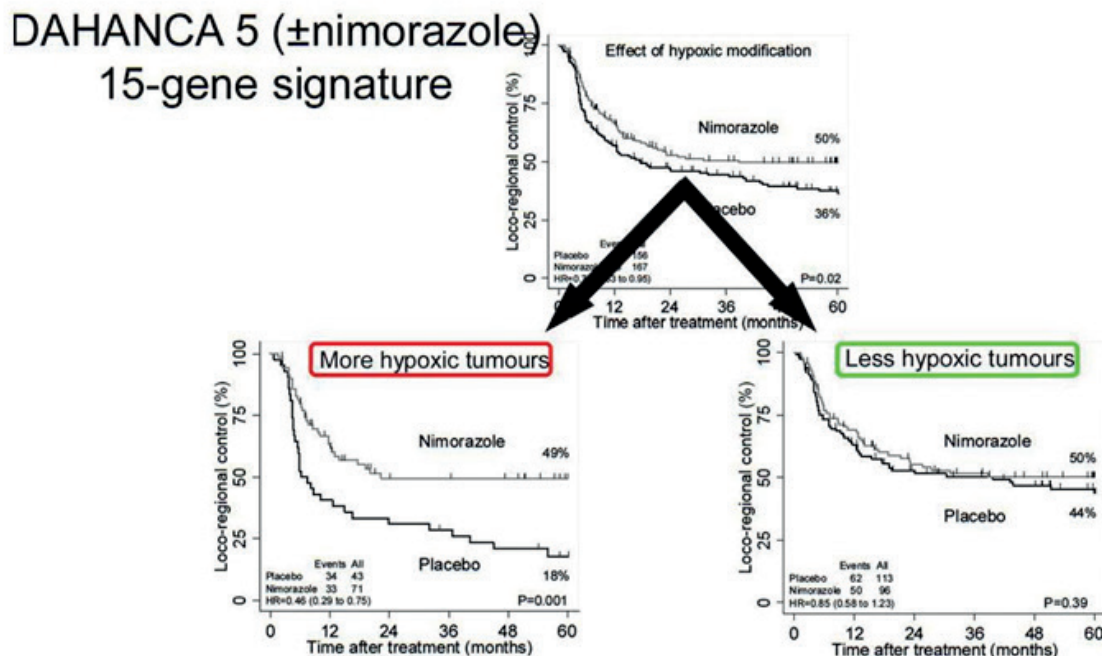
Други проучвания върху 72 болни показват, че няколко параметъра могат да се използват за анализ на ефекта от ЛЛ. Това са *SUV*, *обемът на метаболитно визуализираща се тумор* (MTV) и *глоколизата в целия обем* (TLG), като последният се оказва най-добрият прогностичен индикатор.<sup>26</sup> Скорошно проучване на *Zschaecck et al.* върху 76 пациента след лъчехимиолечение изследва натрупването на FDG в меките тъкани на мукозата (показател MST). Установява се, че този показател е прогностичен за тумор-

рен контрол ( $p = 0.025$ ) и за обща преживяемост ( $p = 0.003$ ) като предиктор за отговор към ЛХЛ.<sup>27</sup>

Радиомни констелации чрез F-MISO ПЕТ при карциноми на глава и шия. Множество проучвания преди 30 години се опитаха да докажат ефекта на радиосенсибилизатора на хипоксичните клетки мизонидазол в големи карциноми на глава и шия. За съжаление, той и подобни съединения се оказаха токсични и не намериха приложение в практиката. Тези познания преминаха в опити за визуализация на тумора и неговата хипоксия чрез радиофармацевтици. Така F-MISO ПЕТ/КТ се оказа метод за изобразяване на туморната хипоксия (Фиг.3).

Съществуват центрове, специализирани върху подобни изследвания. Проучване върху 40 болни показва, че туморите, които показват области на туморна хипоксия чрез F-MISO ПЕТ/КТ, имат статистически достоверно по-нисък туморен контрол (60%) в сравнение с тези, които не визуализират хипоксични зони (93%) въз основа на показателя 30-месечна преживяемост без болест.<sup>28</sup> Някои проучвания се опитват да използват подобни данни за свръхдозирание в хипоксичната област до 77Gy – доза, която е непоносима от целия облъчван обем. Това се реализира чрез новите методи на модулирано по интензитет ЛЛ по примера на простатния карцином.

Туморната хипоксия е един от класическите параметри в радиобиологията, присъстващ в голям процент в карциномите на глава и шия; тя е доказала своя негативен ефект. Множество от датските проучвания *DAHANSA* от години доказват това влияние. Проучването *DAHANSA 5* показва, че добавянето на Ниморазол (сенсибилизатор на хипоксичните клетки) подобрява преживяемостта на пациентите с карциноми на глава и шия.<sup>29</sup> Този метод е влязъл в стандарта за лечение на авансиралия карцином на



Toustrup K et al, 2011 Cancer Res 71(17):5923-31  
Toustrup K et al, 2012 Radiother Oncol; 102; 122-129

**Фигура 5.** Резултати от проучването DAHANCA 5 за полза от добавяне на радиосенсibiliзатора на хипоксични клетки Nimorazole при плоскоклетъчни карциноми на глава и шия. С любезното разрешение на проф. Овергаард – лични контакти.

глава и шия в Дания (Фиг.5). Проблем остава идентификацията на пациентите с тези карциноми.

Открит е т.нар. генен хипоксичен профил (сигнатура), състоящ се от 15 отговорни за хипоксията гени, определени чрез туморни биопсии.<sup>30</sup> Този профил е валидиран върху кохорта от независимо избрани пациенти, изследвани в предишни DAHANCA 5, 18, 24 проучвания (514 болни) (Фиг.6). Така е установено, че при болни, които нямат този генетичен профил, добавянето на Ниморазол няма полза.<sup>30</sup>

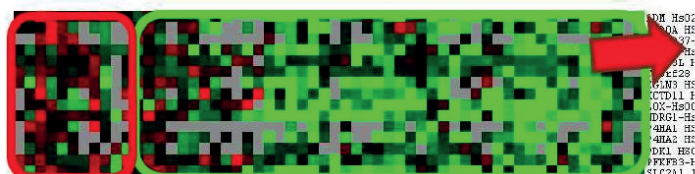
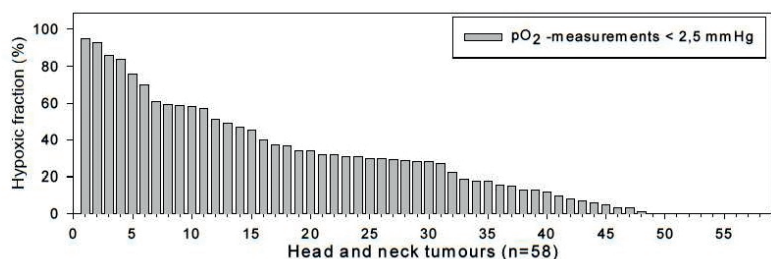
В ход е проучване DAHANCA30, което цели да верифицира липсата на ефект на Ниморазол при пациенти с по-ниска степен на туморна хипоксия и да се изключи добавянето на препарата, за да се намалят страничните му ефекти.<sup>31</sup>

Паралелно с това се провежда съвместно проучване DAHANCA и EORTC от 2014, което цели да валидира 15-генната хипоксична сигнатура при HPV/p16 негативни пациенти (Intergroup Study EORTC-1219-ROG-HNCG/DAHANCA-29).<sup>32</sup>

## Радиоеномика в лъчелечението. Молекулярни предиктивни маркери

Терминът *радиоеномика* в ЛЛ се използва за определяне на геномни сигнатури, имащи отношение към лъчечувствителността на туморите и нормалните тъкани. Тя представлява цялостен геномен анализ за определяне на генетичните причини в разликите в лъчечувствителността на тумора и здравите тъкани. За съжаление съществува





15 genes that were able to distinguish between hypoxic and not hypoxic samples



Sørensen et al, 2010, Acta Oncol; 49(7): 895-905  
Toustrup K et al, Cancer Res; 71(17); 5923-31, 2011



**Фигура 6.** Генен хипоксичен профил, създаден в Дания върху кохорта от пациенти с хипоксични клетки, включени в старо проучване DAHANCA 5. С алобезното разрешение на проф. Овергаард – лични контакти.

огромно количество база данни, но ние ще изберем само някои онкологични нозологии, при които има начални позитивни резултати.

**Човешки папиломавирус (HPV) при лечение на орофарингеален карцином.** Наличието на човешки папиломавирус (HPV) при плоскоклетъчни карциноми на орофаринкс характеризира отделна форма карцином, която се отличава с по-висока преживяемост в сравнение с HPV-негативните тумори. Множество проучвания бяха в основата на разделянето му като отделен субтип в 8-ма версия на TNM. Изследване на p16 е включено като препоръка в NCCN<sup>33</sup>, CAP, Royal College of Pathologists<sup>34</sup> и Cancer Care Ontario<sup>35</sup> като част от стандартната патологична оценка на орофарингеалния плоскоклетъчен карцином. Все още обаче, установяването на HPV p16 тумори не е прието като стандарт за намаляване интензивността на класическото лечение в зависимост от TNM.

**Радиогеномни констелации при недробенклетъчен белодробен карцином (НДКБК).** От практиката на лъчетерапе-

втите е известно, че НДКБК проявява широк спектър от терапевтичен отговор към ЛЛ. При някои пациенти се получава отличен ефект от ЛЛ с дълготраен локален туморен контрол (ЛТК), докато при други, туморът рецидивира дори след високи дози ЛЛ. Разлики се наблюдават и в лъчевите реакции на нормалните тъкани около тумора, понякога като тежки лъчеви увреждания, а в други случаи като минимални. Ясно е, че научните търсения са в посока откриване на методи, идентифициращи тази хетерогенност на отговора, което представлява персонализирана медицина.

Научните проучвания са главно в две посоки: Предиктивни биомаркери за лъчечувствителност на туморите и лъчечувствителност на органите около тумора (т.н. органи под риск).

**Предиктивни биомаркери за лъчечувствителност/лъчерезистентност на НДКБК.** Клетъчни линии от карцином на бял дроб (КБА), изследвани в експериментални проучвания, показват различни фенотипни реакции. В 14 клетъчни линии на НДКБК



са установени криви на фракция на преживяване след облъчване с 2 Gy (т.н SF2), показваща по-ниска лъчечувствителност от гребноклетъчния КБД.<sup>36</sup> Това е известно и в лъчелечебната практика. За съжаление, клиничното приложение е затруднено заради разликите и взаимодействието с факторите 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 копията, промени в микроРНК (miRNA), в протеиновата експресия, както и промени в туморната среда (ангиогенеза), разкриващи потенциални детерминанти и сигнални пътища за прогресия и туморогенеза на белодробния карцином. Проучване показва, че туморната експресия на *ERCC1*, важен фактор в репарационната система на ДНК, е предиктор на преживяемост при пациенти, лекувани с лъчехимиолечение с платина.<sup>37,38</sup>

Откритите мутации в *EGFR* като делеция в екзон 19 (ΔE746-E750) или в L858R замяна в 21<sup>а</sup> екзон на *EGFR* също се изследват в търсене на лъчечувствителност.<sup>39</sup> Установена е повишена лъчечувствителност, свързана с промяна на мутантния *EGFR*, което затруднява взаимодействието на ДНК-зависимата протеин киназа, ключов фактор при възстановяването на двойно-верижните разкъсвания, причинени от ЛЛ. Така клетъчни линии от НДКБД, носещи мутирал домейн на ТК в *EGFR*, са няколко пъти по-лъчечувствителни в сравнение с туморите, носещи дивия тип *EGFR*. Доказано е, че ЛЛ, комбинирано с инхибитори на VEGF и EGF рецепторите, повишава антитуморния ефект.<sup>39</sup> Проучване показва, че прилагането на *EGFR* инхибитора *erlotinib* повишава лъчевата чувствителност при тумор с див тип *EGFR*.<sup>40</sup> Проучванията показват, че ЛХЛ с *erlotinib* увеличава многократно фистулите на хранопровода, поради което те

са прекратени. По тази причина *erlotinib* се прилага като индукционна терапия, а не едновременно с ЛЛ.<sup>40</sup>

*Torres-Roca et al.* се опитват да изработят радиационен класификатор, предсказващ лъчечувствителността на клетъчни линии чрез предсказване стойностите на фракцията 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 лъчечувствителността. За съжаление изводите са разноразлични.<sup>41</sup> Друго направление на изследване е установяване влияние на родоначалните клетки на тумора върху лъчечувствителността. Изследват се и mRNA сигналните, с голяма амбиция в следващите 3-5 години *NextGen DNA sequencing* да предложи приложими в практиката биомаркери за целия тумор.

**Предиктивни биомаркери за лъчечувствителност на здравите тъкани около тумора – т.нар. органи под риск (ОПР).** За белодробния карцином основните органи под риск (ОПР) са бял дроб и сърце. Голяма база данни е създадена за установяване на полиморфизъм на гени (основно *XRCC1*, *XRCC2*, *XRCC3*, *XRCC4*, *XRCC5*), свързани с лъчевите реакции по механизъм на затрудняване на ДНК репарацията на лъчевите промени (Фиг. 7).<sup>42</sup>

Осемнадесет гена са свързани с лъчерезистентността, но само три са валидирани – *MDM2*, *Livin α* и *TP54I3*.<sup>42</sup> Данните за НДКБД показват, че полиморфизъм на *XRCC1* rs25487 (G > A) може да повлияе върху лъчечувствителността на нормалния бял дроб и спомага за развитие на 2-ра степен радиационен пулмонит. За съжаление, противоречиви са резултатите за склоност към пулмонит при пациенти с друг SNP – *XRCC2* rs3218536 (G > A).<sup>43</sup> Търсят се различни комбинации от показатели. Комбинация от съотношението над 1 на TGF-β и средната доза в белия



**Фигура 7.** База данни, изследвани при различни тумори относно лъчечувствителност на нормални тъкани (органи под риск).

дроб над 20 Gy категоризират пациентите в три рискови категории – без риск за пулмонит < 5%; умерен риск – 50% и висок риск – 66%.<sup>45</sup> При 164 болни с НДКБД са потърсени SNPs в *TGF-β* ген. Установено е, че СТ/СС генотиповете *rs1982073:T869C TGFβ1* алели имат нисък риск за риск за пулмонит, независимо от дозиметричните ограничения за средна доза на белия дроб V20. Предлага се това да се изследва преди ЛЛ, което да позволи преминаване към персонализирано ЛЛ.<sup>44-45</sup> За съжаление, токсичността на сърце също е свързана с ЛЛ, но досега тези биомаркери не са изследвани за токсичност на сърцето. В ранни фази на рандомизирани проучвания се обмисляше едновременно хиперфракционизирано ЛХЛ с *erlotinib* (NCT00983307) и ZD1839 (NCT00328562). Предвид данните за повишена токсичност по отношение на езофагеални фистули дизайнът им е променен, като е решено таргетната терапия да се прилага индукционно.<sup>40</sup> Всички тези изследвания са основно на предклинично ниво върху експериментални клетъчни линии *in vitro* с различни показатели, от които най-надеждна е връзката между статуса на *EGFR* (qiv

или мутирал тип) и лъчечувствителността. Това обаче следва да бъде потвърдено и в проспективни рандомизирани проучвания.

### Радиогеномни констелации при карцином на простата

Установено бе, че тумори с идентична оценка по *Gleason* могат да имат различна генетична хетерогенност в една простатна жлеза.<sup>46</sup> Не е ясно дали фокусите, които рецидивират, са свързани с радиорезистентност или притежават летален метастатичен клон. *Weber et al.* въз основа на ИХХ установяват, че *HIF-1α*, *VEGF* и *OPN* след хирургия и *HIF-1α* и *VEGF* след ЛЛ са по-добри предиктори на биохимичен рецидив от оценката по *Gleason*, PSA и радиационната доза.<sup>47</sup> *Milosevic* провежда изследване на парциалното налягане като поставя трансректално в тумора електроди за неговото измерване преди лечение при 247 болни. Той доказва зависимост между тумори с висока степен на хипоксия и ранни рецидиви на 2-та година.<sup>48</sup> Това изисква прилагане на по-високи от обичайните дози ЛЛ за постигане на туморен контрол. За съжаление, проучване на *Ann Arbor et al.* от Мичиганския университет, използвайки аналог PET-fluoroazomycin-araboside (FAZA) като маркер за хипоксия, не показва, че натрупването на радиофармацевтика FAZA има полза за определяне на прогнозата.<sup>28</sup> Все още няма категорични доказателства, че използването на сенсibiliзатори на хипоксичните клетки би имало полза за контрол на простатния карцином, както бе доказано при плоскоклетъчните карциноми на глава и шия.<sup>29-30</sup>

Анроген-потискащата терапия подобрява оксигенацията на хипоксичните клетки, което е един от механизмите за обяснение защо хормоналната блокада се прилага преди ЛЛ след постигане на ниски стойности на PSA до 0.01 ng/ml. Следва да се установи дали след биопсия, а не ретроспективно след

простатектомия, извършването на генетичен анализ на ДНК, месинджър РНК, мкРНК с оценка на туморната хипоксия ще селектира болни за индивидуализирано лечение.<sup>50</sup>

Загубата на копия на тумор-супресорния ген *NKX3.1*, на фосфатазния и тензинов хомолог, на простатноспецифичния *PTEN*, както и на регулаторния протеин *StAR* и *HSD17B2* хидроксистероид (17-beta) дехидрогеназа 2, са нови и независими прогностични фактори, които намаляват успеха на локалното лечение 2-4 пъти. При пациенти със загуба на протоонкогените *cMYC* и *NKX3.1* са открити данни за лъчерезистентност.<sup>51</sup>

МикроРНК (MiR) са обещаващ клас биомаркери, поради по-удобното им идентифициране в сравнение с целия геномен анализ, където се търси само 1.5% последователности; за сравнение при ДНК и РНК месинджър анализи трябва да се трасират 3 млн копия. Макар и още в началото, търсенето на предиктивни маркери чрез мкРНК показва надежни данни за предиктивния им потенциал в ЛЛ. MiR-96 сигнатури, свързани с биохимичен рецидив, са доказани при 155 радикални простатектомии.<sup>52</sup> Установени са и други мРНК – miR-191, miR-145, miR-100 и miR-122 в геномен клъстер, показващи зависимост, независимо от основните прогностични характеристики: Т-класификатор, оценка по *Gleason* и PSA. За съжаление това са ретроспективни проучвания.

Основни усилия са положени за намиране на прогностични генно-експресионни MiR сигнатури, разграничаващи ниско-рисковите ПК, при които да се прилага брахитерапия, вместо перкутанно лъчелечение. Обсъжда се също подход и разграничаване на пациенти, които подлежат на активно наблюдение без лечение. Върху материал от 413 простатектомии е селектирана 31 mRNA-сигнатура, предказваща, че туморът има склоност към прогресиране (cell-cycle progression – ССР

genes). Установени са предиктивни стойности за биохимичен рецидив след операция, както и след ЛЛ.<sup>53</sup> Преди валидирането ѝ от *Cooperberg*, тя е била установена и при пациенти от клиника *Scott and White* в САЩ и Великобритания, оставени под наблюдение.<sup>54</sup> ССР индексът е показал дискриминационна сила и при прилагане върху ниско-рискова група, селектирана чрез CAPRA-S индекс, използван предоперативно. CAPRA-S се използва широко в САЩ със стойности от 0–12, които разделят пациентите на нисък (0–2), междинен (3 – 5) и висок CAPRA-S (6), валидиран също от *M. Cooperberg et al.* през 2011 г.<sup>55</sup> Той включва базови доказани прогностични показатели като предоперативен PSA, оценка по *Gleason*, екстракапсуларна инвазия, инвазия на семенни мехурчета, наличие на лимфни метастази и R1 резекция. Въз основа на тези проучвания е изработен комерсиално разпространяван генно-експресионен тест *Prolaris<sup>R</sup> (Myriad)*.

22-мРНК генна сигнатура е също валидирана в други проучвания върху материал от 545 болни от клиниката Майо след простатектомия, проследявани 16.9 години.<sup>56</sup> На тази база е създаден *Decifer (GenomeDx)*.

Прогностична сигнатура, базирана на 32-гена, включваща гени от различни функционални семейства за транскрипционни фактори, гени на клетъчния цикъл, свързани с метаболитните процеси и гени с неизвестна функция, формира индекс за непрекъснат риск, валидиран върху оперативен материал от 270 болни.<sup>58</sup> Авторите от *Massachusetts General Hospital, Harvard Medical School, Boston* съобщават за селекция на пациенти с висок риск в 45% от ниско рисковите групи.<sup>57</sup>

Всички проучвания имат своите недостатъци, основно, поради липса на мулти-институционални проучвания, както и че голямата част за направени върху материали не от биопсия, а от простатектомия.

Увеличават се данните, че циркулиращите туморни клетки и циркулиращите свободни ДНК, РНК и мкРНК, след усъвършенстване на методите на изследване и увеличаване на изследваните кохорти, биха могли да служат като течна биопсия за определяне на стадирание, прогноза и предикция за лечение.<sup>58</sup>

### Заклучение

Създадена е огромна база данни в областта на радиомиката и радиогеномиката в помощ на лъчелечебната практика. Все още обаче, данните са върху експериментален материал и ретроспективни проучвания при пациенти, провели лъчелечение или друг вид онкологично лечение. В ход са проспективни проучвания за определяне мястото на радиомиката при индивидуализирано планиране на лъчелечението. Очаква се завършването на проспективните проучвания за валидиране на геномните сигнатури като биологични маркери за оценка на лъчевия ефект върху тумори и нормални тъкани. Крайната, макар и далечна цел, е индивидуализиране на лъчелечението чрез валидиране на критериите на радиомиката и радиогеномиката.

Сегашно състояние на проблема:

#### *Радиомика*

Радиомно-базираните протоколи (на КТ, МРТ и ПЕТ/КТ) за лъчелечебно планиране при простатен карцином засега са експериментални и се препоръчват само в рамките на клинични проучвания.

*NCCN, ESTRO, IAEA* и *Swedish National Board of Health and Welfare* препоръчват обсъждане на FDG ПЕТ/КТ за подпомагане при планиране на туморния обем при НДКБД и при карциноми на глава и шия.

<sup>68</sup>Ga-PSMA ПЕТ/КТ може да бъде дискутиран като помощен метод при индивидуализиране на лъчелечението при простатен карцином.

#### *Радиогеномика*

Засега не съществуват валидирани радиогеномни сигнатури, оценяващи фенотипен лъчев отговор на тумор и нормални тъкани.

Съществуват комерсиални пакети, базирани на мултигенни мРНК сигнатури, за оценка на риск от рецидив и метастази при простатен карцином, които не са навлезли в стандартната европейска практика.

Липсват доказателства за съчетание на клинична интерпретация, терапевтични прогнози и предсказване на лъчевата чувствителност на тумор или околните му здрави тъкани. Създават се въпросници, които да уеднаквят показателите за фенотипна оценка.

### ЛИТЕРАТУРА

---

1. Larue RTHM, Defraene G, De Ruyscher D, et al. Quantitative radiomics studies for tissue characterization: a review of technology and methodological procedures. *Br J Radiol* 2017; 90:2016-2065
2. Aerts HJWL, Velazquez ER, Leijenaar RTH, et al. Decoding tumour phenotype by noninvasive imaging using a quantitative radiomics approach. *Nat Commun* 2014; 5:4006 doi: 10.1038/ncomms5006 (2014).
3. 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
4. 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): e0118261. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118261>
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 Biol Phys* 2014; 90(4):834-842
6. Ganeshan B, Panayiotou E, Burnand K, et al. Tumour heterogeneity in non-small cell lung carcinoma assessed by CT texture analysis: a potential marker of survival. *Eur Radiol* 2012; 22:796-802



7. Barentsz JO, Richenberg J, Clements R, et al. ESUR prostate MR guidelines 2012. *Eur Radiol* 2012; 22(4):746-757
8. Rothke M, Blondin D, Schlemmer HP, et al. Pi-rads classification: structured reporting for MRI of the prostate. *Fortschritte auf dem Gebiete der Rontgenstrahlen und der Nuklearmedizin* 2013; (185)3: 253-261
9. Isebaert S, Van den Bergh L, Haustermans K, et al. Multiparametric MRI for prostate cancer localization in correlation to whole-mount histopathology. *J Magn Reson Imag* 2013;37:1392-401
10. Larue RTHM, Defraene G, De Ruyscher D, et al. Quantitative radiomics studies for tissue characterization: a review of technology and methodological procedures. *Br J Radiol* 2017; 90:20160665
11. 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
12. 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):3833-3851
13. Viswanath SE, Bloch BN, Chappelow 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(1):213-224
14. Shiradkar R, Podder TK, Madabhushi A, et al. Radiomics based targeted radiotherapy planning (Rad-TRaP): a computational framework for prostate cancer treatment planning with MRI. *Rad Oncol* 2016; 11(1):148
15. Hatt M, Tixier F, Visvik D, et al. Radiomics in PET/CT: more than meets the eye? *J Nucl Med* 2016; doi:10.2967/jnumed.116.184655
16. Hatt M, Tixier F, Pierce L, et al. Characterization of PET images using texture analysis: the past, the present any future? *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2016;44(1):151-165
17. 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
18. Jereczek-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
19. Evangelista L, Zattoni F, Guttilla A, et al. Choline PET or PET/CT and Biochemical Relapse of Prostate Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Clin Nucl Med* 2013;38(5); 305-314
20. Bluemel C, Linke F, Herrmann K, 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 Res* 2016; 6:78
21. Sabrina D, Schiller K, Sauter K, et al. Integration of 68Ga-PSMA-PET imaging in planning of primary definitive radiotherapy in prostate cancer: a retrospective study. *Rad Oncol* 2016;11:73
22. Sterzing F, Kratochwil C, Fiedler H, et al. (68) Ga-PSMA-11 PET/CT: a new technique with high potential for the radiotherapeutic management of prostate cancer patients. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2016; 43:34-41
23. Jani AB, Schreiber E, Rossi P, Shelton J, et al. Impact of Fluciclovine (18F) PET on Target Volume Definition for Post-Prostatectomy Salvage Radiotherapy: Initial Findings from a Randomized Trial. *J Nucl Med* 2016;58(3):412-418
24. Begg AC. Predicting recurrence after radiotherapy in head and neck cancer. *Semin Radiat Oncol* 2012;22(2):108-118
25. Kikuchi M, Koyasu S, Shinohara S, et al. Prognostic value of pretreatment 18F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography/CT volume-based parameters in patients with oropharyngeal squamous cell carcinoma with known p16 and p53 status. *Head Neck* 2015; 37(10): 1524-1531
26. Chu KP, Murphy JD, La TH, et al. Prognostic value of metabolic tumor volume and velocity in predicting head-and-neck cancer outcomes. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2012;83(5):1521-1527
27. Zschaek S, Loeck S, Leger S, et al. FDG uptake in normal tissues assessed by PET during treatment has prognostic value for treatment results in head and neck squamous cell carcinomas undergoing radiochemotherapy. *Radiother Oncol* 2017; 122(3):437-444

28. Mortensen LS, Johansen J, Kallehauge J, et al. FAZA PET/CT hypoxia imaging in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck treated with radiotherapy: results from the DAHANCA 24 trial. *Radiother Oncol* 2012; 105(1):14-20
29. Overgaard J, Hansen HS, Overgaard M, et al. A randomized double-blind phase III study of nimorazole as a hypoxic radiosensitizer of primary radiotherapy in supraglottic larynx and pharynx carcinoma. Results of the Danish Head and Neck Cancer Study (DAHANCA) Protocol 5-85. *Radiother Oncol* 1998;46:135-146
30. Toustrup K, Sorensen BS, Lassen P, et al. Gene expression classifier predicts for hypoxic modification of radiotherapy with nimorazole in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Radiother Oncol* 2012;102(1):122-129
31. DAHANCA 30: A Randomized Non-inferiority Trial of Hypoxia-profile Guided Hypoxic Modification of Radiotherapy of HNSCC. (DAHANCA 30) <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02661152>
32. /Intergroup Study (EORTC-1219-ROG-HNCG/ DAHANCA-29 [https://www.dahanca.oncology.dk/.../Dahanca29\\_v1\\_1\\_20140](https://www.dahanca.oncology.dk/.../Dahanca29_v1_1_20140)
33. NCCN clinical practice guidelines in oncology. Head and neck cancers. Version 1.2016. Available at: [www.nccn.org/professionals/physician\\_gls/pdf/head-and-neck.pdf](http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/head-and-neck.pdf)
34. College of American Pathologists. Protocol for the examination of specimens from patients with carcinomas of the pharynx [updated 2015 Oct 1]. Available at: [www.cap.org/apps/docs/committees/cancer/cancer\\_protocols/2013/Pharynx\\_13protocol\\_3300.pdf](http://www.cap.org/apps/docs/committees/cancer/cancer_protocols/2013/Pharynx_13protocol_3300.pdf)
35. Lacchetti CJ, Waldron J, Gilbert R, et al. Routine HPV testing in head and neck squamous cell carcinoma. Toronto (ON): *Cancer Care Ontario* 2013. 58: Program in Evidence-based Care Evidence-based Series No 5-9
36. Carmichael J, Degraff WG, Gamson J. Radiation sensitivity of human lung cancer cell lines. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1989;25(3):527-534
37. 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
38. 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
39. 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):1534-1543
40. Chinnaiyan P, Huang S, Vallabhaneni G, et al. Mechanisms of enhanced radiation response following epidermal growth factor receptor signaling inhibition by erlotinib (Tarceva). *Cancer Res* 2005;65(8):3328-3335
41. Torres-Roca JF, Eschrich S, Zhao H, et al. Prediction of radiation sensitivity using a gene expression classifier. *Cancer Res* 2005;65(16):7169-7176
42. Arechaga-Ocampo E, Villegas-Sepulveda N, Lopez-Urrutia E, et al. 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.) 2013. DOI: 10.5772/53426
43. Li T, Kung HJ, Mack PC, et al. Genotyping and genomic profiling of non small- cell lung cancer: implications for current and future therapies. *JCO* 2013;31:1039-1049
44. 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-smallcell lung cancer: a combined analysis from Beijing and Michigan. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2009;74:1385-1390
45. Yuan X, Liao Z, Liu Z, et al. Single nucleotide polymorphism at rs1982073: 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. *JCO* 2009;27:3370-3378
46. Bristow RG, Berlin A, Dal Pra A. An arranged marriage for precision medicine: hypoxia and genomic assays in localized prostate cancer radiotherapy. *Br J Radiol* 2014;87:20130753
47. Weber DC, Tille JC, Combescure C, et al. The prognostic value of expression of HIF1alpha, EGFR and VEGF-A, in localized prostate cancer for intermediate- and high-risk patients treated with radiation therapy with or without androgen deprivation therapy. *Radiat Oncol* 2012; 7: 66

48. Milosevic M, Warde P, Menard C, et al. Tumor hypoxia predicts biochemical failure following radiotherapy for clinically localized prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2012; 18: 2108-2114
49. Garcia-Parra R, Wood D, Shah R, et al. Investigation of tumor hypoxia in resectable primary prostate cancer as demonstrated by 18F-FAZA PET/CT utilizing multimodality fusion techniques. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2011; 38:1816-1823
50. Vergis R, Corbishley CM, Norman AR, et al. Intrinsic markers of tumour hypoxia and angiogenesis in localised prostate cancer and outcome of radical treatment: a retrospective analysis of two randomised radiotherapy trials and one surgical cohort study. *Lancet Oncol* 2008; 9: 342-351
51. Zafarana G, Ishkanian AS, Malloff CA, et al. Copy number alterations of c-MYC and PTEN are prognostic factors for relapse after prostate cancer radiotherapy. *Cancer* 2012; 118: 4053-4062
52. Martens-Uzunova ES, Jalava SE, Dits NF, et al. Diagnostic and prognostic signatures from the small non-coding RNA transcriptome in prostate cancer. *Oncogene* 2012; 31: 978-991
53. Cooperberg MR, Simko JP, Cowan JE, et al. Validation of a Cell-Cycle Progression Gene Panel to Improve Risk Stratification in a Contemporary Prostatectomy Cohort. *JCO* 2013; 31(11):1428-1434
54. Cuzick J, Swanson GP, Fisher G, et al. Prognostic value of an RNA expression signature derived from cell cycle proliferation genes in patients with prostate cancer: a retrospective study. *Lancet Oncol* 2011; 12: 245-255
55. Cooperberg MR, Hilton JF, Carroll PR. The CAPRA-S score: A straight forward tool for improved prediction of outcomes after radical prostatectomy. *Cancer* 2011; 117(22):5039-5046
56. Erho N, Crisan A, Vergara IA, et al. Discovery and validation of a prostate cancer genomic classifier that predicts early metastasis following radical prostatectomy. *PLoS One* 2013; 8(6):e66855
57. Wu CL, Schroeder BE, Ma XJ, et al. Development and validation of a 32-gene prognostic index for prostate cancer progression. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013; 110(15):6121-6126
58. Sita-Lumsden A, Fletcher CE, Dart DA, et al. Circulating nucleic acids as biomarkers of prostate cancer. *Biomark Med* 2013; 7: 867-877







# ПЕТ/КТ-ПРЕДИКЦИЯ ПРИ ПРОСТАТЕН КАРЦИНОМ

*проф. д-р Ирена Костадинова, дмн<sup>1</sup>*

*проф. д-р Татяна Хаджиева, дмн<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>Клиника по нуклеарна медицина, *Аджибадем Сити Клиник*, София

<sup>2</sup>Клиника по лъчелечение, УМБАЛ *Св. Иван Рилски*, София

## ОБЗОР

*За успешно лечение на простатния карцином (ПК) освен ранната диагноза, от съществено значение е откриването на рецидиви след простатектомия, лъчелечение или друго локално лечение при стойности на простатноспецифичния антиген (PSA) над 0.2 ng/ml. Рутинните образни методи за визуализация са магнитнорезонансна томография (МРТ) и компютърна томография (КТ) с венозен контраст; те обаче невинаги са с достатъчна чувствителност. След въвеждане в клиничната практика на позитронноемисионната томография с компютър томография (ПЕТ/КТ) той стана метод на избор, особено с прилагане на <sup>68</sup>Ga-PSMA (простатноспецифичен мембранен антиген), поради възможността за онагледяване на рецидиви и при нива на туморния маркер около биохимичния рецидив. Методът е и с предиктивна стойност при вземане на решение за приложение на радионуклидна терапия с <sup>177</sup>Lu-PSMA и при лъчетерапевтичното планиране.*

## Увод

Простатният карцином (ПК) е вторият по честота карцином при мъжете с тенденция за нарастване през последните години и шестият по смъртност.<sup>1</sup> Освен ранната диагноза на ПК, предизвикателство към съвременните образни методи е и ранното откриване и визуализация на рецидивите след простатектомия, лъчелечение или друго локално лечение, при стойности на простатно специфичния антиген (PSA) над 0.2 ng/ml. Понастоящем за онагледяване на рецидивите, методи на избор са магнитнорезонансната томография (МРТ) и компютърната томография (КТ) с контраст,

но тези методи не винаги са с достатъчна чувствителност и специфичност, особено при ниски стойности на PSA.<sup>2</sup> С въвеждането в онкологичната практика на хибридният образен метод позитронно-емисионна томография с компютър томография (ПЕТ/КТ) стана възможно комбинирано функционално и анатомо-морфологично изображение на изследвания орган и получаване на ранна функционална информация за потенциално развитие на болестта.

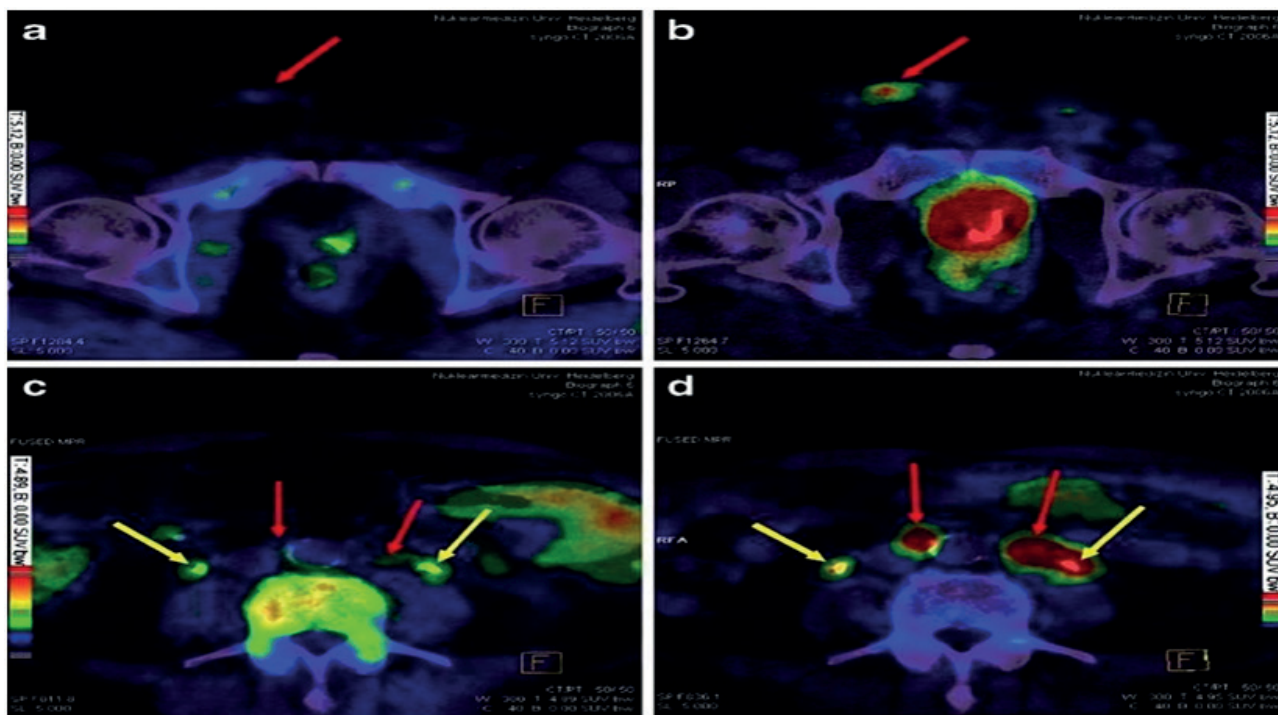
## Радиофармацевтици при простатен карцином

За визуализация на ПК с ПЕТ/КТ като

предиктивни биомаркери с различна степен на значимост се използват следните радиофармацевтици:  $^{18}\text{F}$ -FDG (флуорорезоксиглюкоза),  $^{18}\text{F}/^{11}\text{C}$ -Choline,  $^{68}\text{Ga}$ -PSMA (простатноспецифичен мембранен антиген).

**$^{18}\text{F}$ -FDG.** Най-често използваният радиофармацевтик за ПЕТ/КТ –  $^{18}\text{F}$ -FDG не се прилага рутинно за визуализация на простатните метастази и рецидиви, но би могъл да се използва при определени пациенти с по-агресивни форми, с повишаващи се нива на PSA, които представляват около 30% от случаите. Налице са данни за корелация на натрупването на  $^{18}\text{F}$ -FDG със степента на туморната диференциация (по-висока при недиференцираните варианти), както и при тези с по-високите нива на PSA, но методът е с ниска предиктивна стойност и без съществено влияние върху терапевтичния подход.<sup>3</sup>

**$^{18}\text{F}/^{11}\text{C}$  – Choline.** През 2005 г. като по-приемлив радиофармацевтик бе въведен  $^{18}\text{F}/^{11}\text{C}$  – Choline, чието натрупване в туморните клетки се базира на повишен синтез на фосфолипиди.<sup>4</sup> Тестът се препоръчва за определяне на стадий, при неясни и несигурни находки от други образни методи, както и за рестадиране на болестта, ако PSA  $\geq 2$ -4 ng/ml при чувствителност 70.3 – 95% и специфичност до 85%.<sup>1,5</sup> При 30% от пациентите се постига и по-детайлна диагностична находка спрямо рутинните образни методи, което води до оптимизиране на терапията.<sup>6</sup> Редица други изследвания обаче показват, че методът не притежава достатъчна чувствителност и специфичност при болни с нисък и интермедиерен риск – оценка по Gleason пог 7 и по-ниски нива на PSA<sup>4</sup> като при стойности пог 1 ng/ml, рецидив се визуализира при не повече от 25% от



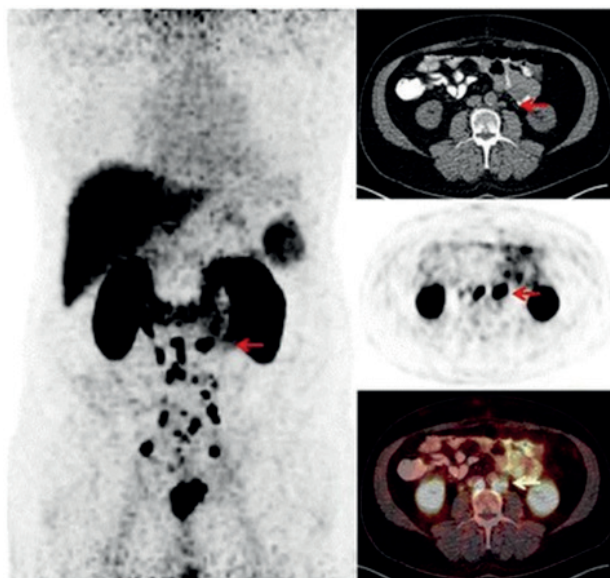
**Фигура 1.** ПЕТ/КТ при болен с карцином на простата и метастази в илиачните и ингвинален лимфен възел – сравнение на образите от  $^{18}\text{F}$ -choline (ляво) и  $^{68}\text{Ga}$ -PSMA (дясно). Визуализира се по-добро качество на образите с  $^{68}\text{Ga}$ -PSMA и се откриват повече обхванати от болестта лимфни възли.

## ПЕТ/КТ-ПРЕДИКЦИЯ ПРИ ПРОСТАТЕН КАРЦИНОМ

случаите, докато при стойности над 4 ng/ml – при над 75%.<sup>7</sup>

<sup>68</sup>Ga –PSMA. Учени от Университетите *John Hopkins* и *Хайделберг* последователно през последните няколко години съобщиха първите обнадеждаващи резултати за приложение на нов радиофармацевтик, който се свързва с молекулна мишена-рецептори, свърхекспресирани по повърхността на туморните клетки от ПК: простатният специфичен мембранен антиген – PSMA, маркиран с позитронен източник <sup>68</sup>Ga с възможност за използване с хибридна технология ПЕТ/КТ.<sup>8-10</sup> В първичен ПК с лимфните метастази PSMA е в много по-големи количества, отколкото са холинните рецептори; така се създава възможност за получаване на по-контрастен образ за разпределението на антигена в сравнение с <sup>18</sup>F/<sup>11</sup>C-Choline (Фиг.1).

Първите обобщени резултати през 2015 за диагностичната значимост на този маркиран с позитронен емитер <sup>68</sup>Ga-PSMA лиганд при пациенти с рецидиви и хормонална резистентност показаха по-добро изобразяване (при едни и същи стойности на PSA), от тези с <sup>18</sup>F-Choline, с чувствителност съответно 86.5% и 70.3%<sup>1</sup>, при достигане на максимална специфичност и позитивна предиктивна стойност от 100% и негативна предиктивна стойност от 91.4%, което е предпоставка за по-успешна индивидуализирана терапия.<sup>11,12</sup> Въпреки че понастоящем няма все още данни от обобщени проспективни проучвания<sup>13</sup>, *Perera et al.* с метаанализ на литературата обобщават, 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. ПЕТ/КТ с <sup>68</sup>Ga-PSMA е метод на избор за стадирание преди оперативно или лъчелечение и при пациенти с висок риск (оценка по *Gleason* > 7, PSA > 20 ng/ml, cT2c-3a) (Фиг.2).<sup>13</sup> Той е с предимства

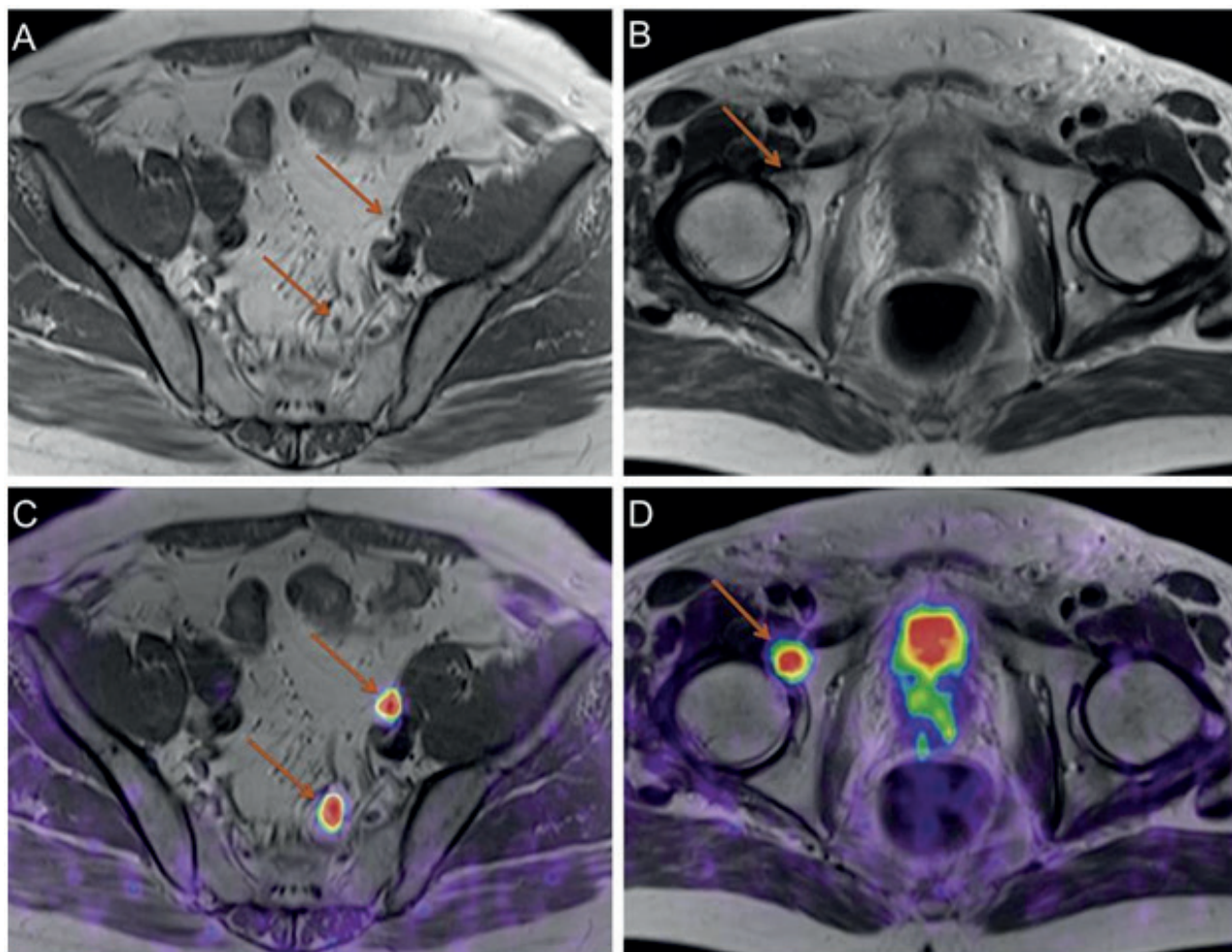


**Фигура 2.** <sup>68</sup>Ga-PSMA при пациент с простатен карцином и биохимичен рецидив (PSA – 0.7 ng/ml) след радикална простатектомия. Визуализират се множество тазови лимфни възли, което променя терапевтичната стратегия – вместо спасителна радиотерапия се назначава системно лечение.

при визуализация на радиологично окултни лимфни и костни метастази, което може значимо да повлияе избора на последваща терапия. МРТ обаче остава метод на избор за определяне регионалното разпространение на болестта.

Установява се, че честотата на откриване на рецидиви или метастази от простатен карцином е в зависимост от нивата на туморния маркер и надвишава 90% при ниски нива > 1 ng/ml; при нива < 1 ng/ml е 67% и < 0.5 ng/ml – 58%.<sup>1</sup> Получените данни са от проучвания с голям брой пациенти и категорично утвърждават мястото на <sup>68</sup>Ga-PSMA ПЕТ/КТ като една от най-надеждните и точни образни диагностични процедури за рестадирание на пациенти с рецидив на простатен карцином.<sup>14</sup> Започнаха проучванията за приложение на <sup>68</sup>Ga-PSMA и с новата хибридна образна технология – ПЕТ, комбинирана с магнитнорезонансна томография – ПЕТ/МРТ, с която се постига





**Фигура 3.** ПЕТ-МРТ и  $^{68}\text{Ga}$ -PSMA при пациент с простатен карцином и метастази в лимфни възли-регистра се много добър мекотъканен контраст и се постига висока чувствителност и специфичност на изследването.

още по-висока чувствителност, благодарение на комбинираното молекулярно сцинтиграфско изображение и висок мекотъканен контраст. Предстои да бъдат обобщени първите резултати (Фиг.3).<sup>14</sup>

### Приложение на тераностика с $^{68}\text{Ga}$ -PSMA/ $^{177}\text{Lu}$ -PSMA

Приложението на ПЕТ/КТ с  $^{68}\text{Ga}$ -PSMA понастоящем е не само като диагностичен метод; след маркиране с източници на бета-лъчение като  $^{177}\text{Lu}$ , той вече се използва и като успешна терапевтична алтернатива

при пациенти с метастази и прогресия към резистентна на хормонална кастрация и химиотерапия болест.<sup>15</sup> Така комбинацията  $^{68}\text{Ga}$ -PSMA и  $^{177}\text{Lu}$ -PSMA вече се утвърждава като нова концепция – *тераностика*, с която се постига едновременно много точна специфична диагностика и прицелно ефективно лечение.<sup>16</sup> Литературните данни до момента показват спад в нивата на PSA до 80% след две апликации на терапевтичния лиганден комплекс като малък процент пациенти, които вече са рефрактерни на друг вид терапия, показват прогресия на



болестта.<sup>17</sup> През настоящата година вече се появиха първите мултицентрови проучвания за ефект от лечение със <sup>177</sup>Lu-PSMA, с които се демонстрира висока сигурност и ефективност, надвишавайки тази на трета линия системна терапия.<sup>18</sup> Предвижда се да се проучи и потенциалното влияние от лечение със <sup>177</sup>Lu-PSMA върху преживяемостта.

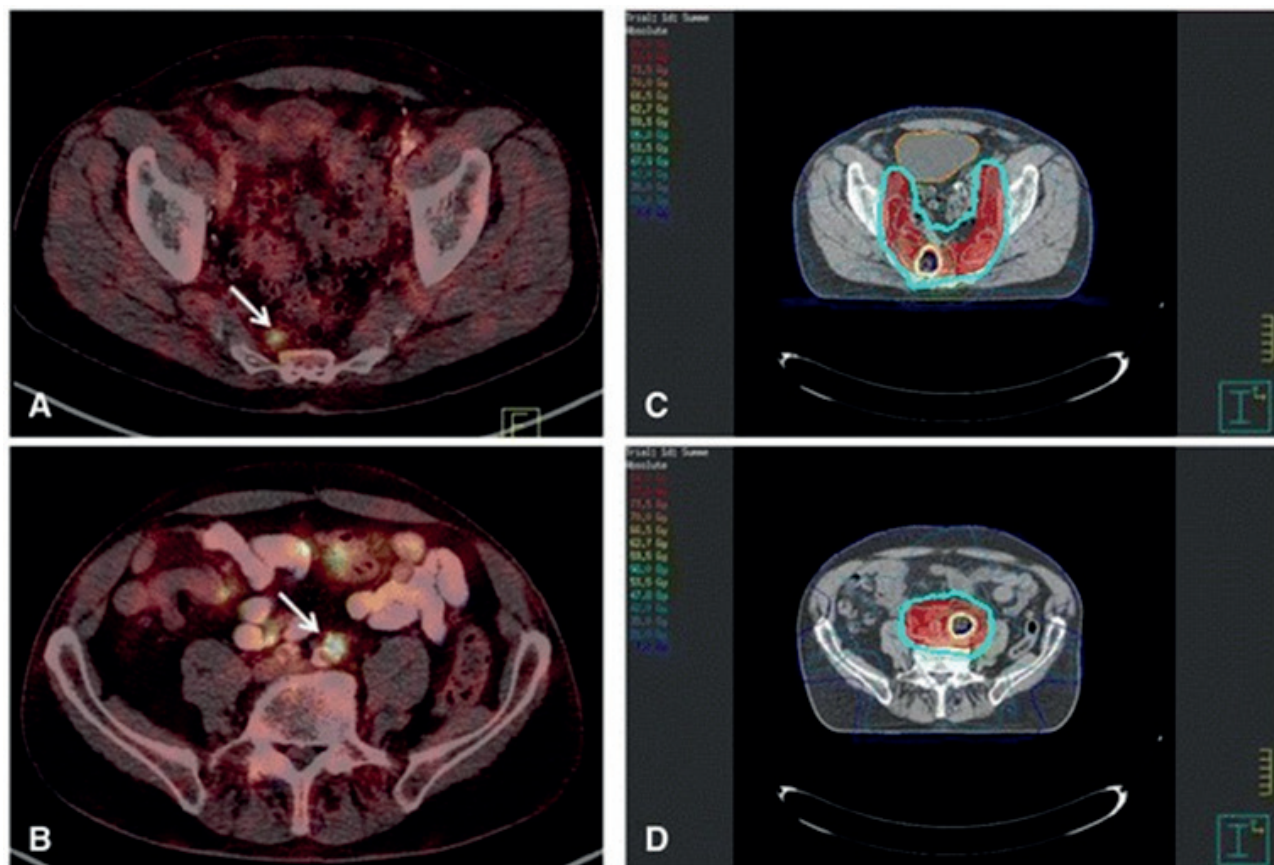
### Роля на ПЕТ/КТ при лъчетерапевтично планиране

Лъчелечението е основен метод за дефинитивно лечение на простатния карцином като съобразно рисковите фактори се прилагат или съчетават два основни типа лъчелечение – перкутанно лъчелечение и брахитерапия. Дори и с най-високо технологичните методи на ЛЛ, пикочният мехур, червата и ректумът получават определени дози, които са индивидуални в зависимост от лъчечувствителността на пациента. С ескалиране на дозата и нейното фракциониране от нормално фракционирано ЛЛ (2 Gy дневно до 78-80 Gy) през умерено хипофракциониране (2.3-3.0 Gy дневно) и ултрафракциониране тип радиохирургия (1-3 фракции от 9-24 Gy), проблемът с късните лъчеви реакции се засилва. Целта е оптимизация чрез селектиране на области в простатата при нискорисковите групи, които могат да не се облъчват, а при високорисковите групи – да получат възможно най-високи дози и обеми. Понастоящем усилията са насочени към създаване на биомодели върху ПЕТ/КТ образи, подобно на радиомните проучвания с МРТ или КТ така, че освен морфологично очертаване на мишенния обем, върху планиращата КТ да се включи и биологичния мишенен обем.<sup>19</sup> Въз основа на клинични данни и ПЕТ-образи са изведени т.нар. *текстурални критерии (textural features)*, които се базират на хетерогенното натрупване

на <sup>18</sup>F-FDG в зависимост от агресивността на тумора.<sup>21</sup> Предстоят проучвания за въздействие върху преживяемостта. Първите виртуални модели са направени с <sup>11</sup>C-*choline* ПЕТ/КТ за проучване на възможността да се направи едновременно свръхдозирание при дефинитивно лъчелечение при болни с рецидив в лимфни възли – установява се ниска токсичност за нормалните тъкани.<sup>21,22</sup>

При прилагане на ЛЛ е известно, че основните причини за получаване на незадоволителен резултат по отношение на локалния туморен контрол и риска от развитие на далечни метастази са хипоксията, активната пролиферация на туморните клетки и лъчезустойчивостта. Така с прилагането на нови радиомаркери стана възможно получаване на по-добри резултати чрез очертаване на биологичния туморен обем в контурите на същинския туморен обем (GTV) и планиране на по-високи хиперфракционни дози.<sup>23</sup> Най-често прилагани са <sup>18</sup>F-FMISO (за визуализация на биологичния хипоксичен мишенен обем) и <sup>18</sup>F-FLT (за активната туморна пролиферация без визуализация на съпътстващо възпаление).

Големи надежди за по-прецизно планиране на ЛЛ при простатен карцином напоследък се възлагат на новия маркер <sup>68</sup>Ga-PSMA. В публикация на *Bluemel et al.* от 2016 г. авторите описват, че приложението на този радиофармацевтик визуализира източника на биохимичния рецидив в 62.5%, като при 42.2% се променя последващото лечение и се провежда радиохирургия на метастазите<sup>20</sup>, с допълнително свръхдозирание до 66 Gy (Фиг.4). В друго ретроспективно проучване на *Dewes et al.* предварителните данни показват промяна на стадия при 53.3% от болните, което е довело до промяна и в лъчетерапевтичната стратегия: повишаване на дозата при 80% от болните, намаляване на дозата в 13.3% и облъчване на допълнителни обеми в 25%.<sup>24</sup>



Фигура 4. Радиотерапевтично планиране с  $^{68}\text{Ga}$  PSMA ПЕТ/КТ, с което се цели едновременно свърхдозирание в пресакрална и параортална лимфна метастаза.

## Заклучения

$^{68}\text{Ga}$ -PSMA ПЕТ/КТ е много надежден предиктивен маркер за специфична радионуклидна терапия с  $^{177}\text{Lu}$  PSMA при болни с хормонално-резистентен простатен карцином.

ПЕТ/КТ с  $^{68}\text{Ga}$ -PSMA или с  $^{11}\text{C}/^{18}\text{F}$  холин се прилагат като предиктивни маркери при планиране на спасителна радиотерапия при болни с персистиращи стойности на PSA или рецидив след оперативна интервенция.

$^{68}\text{Ga}$ -PSMA ПЕТ/КТ е образен метод на избор при визуализация на рецидиви и при ниски стойности на PSA и може да се прилага като допълнителен метод за оценка на локалното туморно стадироване към МРТ.

## 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(11):1697-1705
2. Костадинова И, Бочев П, Пиперкова Е, Клисарова А. Роля на ПЕТ/КТ при стадиране и терапията при простатен карцином. Учебна книга, МОРЕ 2012; 71-75
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

## ПЕТ/КТ-ПРЕДИКЦИЯ ПРИ ПРОСТАТЕН КАРЦИНОМ

---

- Giovacchini G, Picchio M, Messa C, 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
- Weckesser M, Juergens K. Prostatic carcinoma in PET-CT hybrid imaging, Thieme, New York, 2010, 169-177
- Lowe JV, Kuon ED. PET in Prostate Cancer: A Focus on C-11 Choline. *SNMMI* 2015;1:1-4
- Banerjee SR, Pullambhatla M, Byun Y, et al. <sup>68</sup>Ga-labeled inhibitors of prostate-specific membrane antigen (PSMA) for imaging prostate cancer. *J MedChem* 2010;53:5333-5341
- Eder M, Schafer M, Bauder-Wust U, et al. <sup>68</sup>Ga-complex lipophilicity and the targeting property of a urea-based PSMA inhibitor for PET imaging. *Bioconjug Chem* 2012;23:688-697
- Демирев Ан, Костадинова И. Нови насоки за приложение на нуклеарномедицинските методи при простатния карцином. *Мед. онкология* 2016; 2-4
- Afshar-Oromieh A, Zechmann CM, Haberkorn U, et al. Comparison of PET imaging with a <sup>68</sup>Ga-PSMA ligand and <sup>18</sup>F-choline based PET/CT for the diagnosis of recurrent prostate cancer. *EJNMMI* 2014;41(1):11-20
- Wolfgang PF, Eiber M, Wan S, et al. <sup>68</sup>Ga-PSMA PET-CT: Joint EANM and SNMMI procedure guidance for prostate cancer imaging. *EJNMMI* 2017;44(6):1014-1024
- Perera M, Papa N, Christidis D, et al. Sensitivity, Specificity, and Predictors of Positive <sup>68</sup>Ga-Prostate-specific Membrane Antigen Positron Emission Tomography in Advanced Prostate Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis. *Eur Urol* 2016; 70(6):926-937
- Roethke M, Kuru TH, Fenchel M, et al. Hybrid Positron Emission Tomography-Magnetic Resonance Imaging with Gallium <sup>68</sup> Prostate-specific Membrane Antigen Tracer: A Next Step for Imaging of Recurrent Prostate Cancer-Preliminary Results. *Eur Urol* 2013;64(5):862-864
- Ahmadzadehfar H, Rahbar K, Kurpig S, et al. Early side effects and first results of radioligand therapy with (<sup>177</sup>Lu-DKFZ-617 PSMA of castrate-resistant metastatic prostate cancer: a two-centre study. *EJNMMI Res* 2015;5(1): 114
- 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; 57(7):1006-1013
- Yadav M, Ballal S, Tripathi M, et al. <sup>177</sup>Lu-DKFZ-PSMA-617 therapy in metastatic castration resistant prostate cancer: safety, efficacy, and quality of life assessment. *Eur JNM* 2017; 44(1):81-91
- Rahbar K, Ahmadzadehfar H, Krause BJ, et al. German multicenter study investigating <sup>177</sup>Lu-PSMA 617 Radioligand Therapy in advanced Prostate Cancer Patients. *JNM* 2017; 58(1):85-90
- Bluemel C, Linke F, Becker A, et al. Impact of <sup>68</sup>Ga-PSMA PET/CT on salvage radiotherapy planning in patients with prostate cancer and persisting PSA values or biochemical relapse after prostatectomy. *EJNMMI Res* 2016;6: 6-8
- Larue RTHM, 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(1070):2016066524
- 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
- Jereczek-Fossa BA, Rodari M, Bonora M, et al. (<sup>11</sup>C) Choline PET/CT impacts treatment decision making in patients with prostate cancer referred for radiotherapy. *Clin Genitourin Cancer* 2014;12(3):155-159
- Сергиева С, Михайлова И, Първанова В, и съавт. Клинично приложение на хибридите нуклеарно-медицински методи при лъчетерапевтичното планиране на тумори на глава и шия. Учебна книга МОРЕ 2016; 65-80
- Dewes S, Schiller K, Hahl G, et al. Integration of <sup>68</sup>Ga-PSMA-PET imaging in planning of primary definitive radiotherapy in prostate cancer: a retrospective study. *RadOncol* 2016;11:73. doi: 10.1186/s13014-016-0646-2



////////////////////////////////////  
**ПРЕДИКТИВНА СТОЙНОСТ НА МОЛЕКУЛЯРНИЯ  
МОНИТОРИНГ ПРИ ХРОНИЧНА МИЕЛОИДНА  
ЛЕВКЕМИЯ**  
////////////////////////////////////

**проф. д-р Георги Балаценко, дм**

СБАЛХЗ, София





# ПРЕДИКТИВНА СТОЙНОСТ НА МОЛЕКУЛЯРНИЯ МОНИТОРИНГ ПРИ ХРОНИЧНА МИЕЛОИДНА ЛЕВКЕМИЯ

*проф. д-р Георги Балаценко, дм*

СБААХЗ, София

## ОБЗОР

*Хроничната миелоидна левкемия (ХМЛ) е клонална миелопролиферативна неоплазия, чиято патогенеза се свързва с появата на Филадельфийска хромозома (Ph) и фузионен ген BCR-ABL1, резултат на транслокацията t(9;22)(q34;q11), в резултат на което се синтезира онкопротеин с трайно повишена тирозинкиназна активност. Съвременната терапевтична стратегия при ХМЛ се основава на таргетно лечение с тирозинкиназни инхибитори (ТКИ), чиято основна цел е прекъсване на основния патогенетичен механизъм на болестта и постигане на преживяемост и качество на живота, сходни с тези при лица без левкемия. Отговорът към терапията се изразява във възстановяване на нормалната хемопоеза, нормализиране на хематологичните показатели и големината на слезката (хематологичен отговор); намаляване до пълното изчезване на метафазите с Ph-хромозома (цитогенетичен отговор) и/или на броя на BCR-ABL1 транскриптите (молекулярен отговор, МО). Концепцията за МО се основава на идеята, че постигането на определени нива на BCR-ABL1 в конкретни моменти в хода на лечение позволява прогнозиране на хода на болестта в дългосрочен план. Непостигането на тези нива или ако са били постигнати, но впоследствие загубени, налага преосмисляне на терапевтичното поведение и смяна на използвания ТКИ с друг. Практическата реализация на тази идея се постига чрез провеждане на редовен контрол на нивото на фузионните транскрипти през строго определени интервали посредством стандартизирана чувствителна и възпроизводима методология, основаваща се на полимеразно-верижна реакция след обратна транскрипция.*

*В текста са разгледани подробно молекулярните изследвания, които се провеждат към диагнозата и в хода на болестта, като и информацията с предиктивна значимост, която те предоставят.*

## Увод

Хроничната миелогенна левкемия (ХМЛ) е клонална миелопролиферативна неоплазия, характеризираща се с повишена пролиферация на миелоидни клетъчни елементи, представени с всичките си фази на развитие, както и със специфични цитогенетични и молекулярни промени. Болестта е резултат на малигнена трансформация на ранната хемопоетична стволова клетка, свързана с появата в нея на транслокацията  $t(9;22)(q34;q11)$  и съответно – формиране на дериватна хромозома  $22q^-$ , означавана като Филаделфийска (Ph) хромозома. На молекулярно ниво при транслокацията се формира качествено нов патологичен фузионен ген, включващ почти целия протоонкоген на *Abelson 1 (ABL1)* [9q34] и част *Breakpoint Cluster Region (BCR)* гена [22q11], означаван като *BCR-ABL1*[22q-], който кодира синтез на хибриден онкопротеин Bcr-Abl.<sup>1</sup> За разлика от нормалния Abl протеин, онкопротеинът се характеризира с трайно повишена тирозинкиназна активност, с променена клетъчна локализация, както и със способността да взаимодейства с многобройни протеини, включително и с нехарактерни такива. Благодарение на тези си свойства, онкопротеинът чрез директно фиксиране на медиатори към специфичните си домейни или чрез образуване на многокомпонентни комплекси с участието на “адапторни” молекули, предизвиква трайно активиране на множество различни сигнални пътища, което от своя страна води до неконтролируема пролиферация на цитокин-зависими хемопоетични клетки при намалена концентрация или отсъствие на цитокини, нарушаване на клетъчната адхезия към костномозъчната строма и към компонентите на екстрацелуларния матрикс, инхибиране на апоптозата, а в напреднали стадии – и блокиране на клетъчната матурация.<sup>2</sup>

## Роля на генетичните изследвания при ХМЛ

В около 5% от пациентите с ХМЛ липсва видима Ph-хромозома, независимо че на молекулярно ниво се доказва генното преустройство и фузия между *BCR* и *ABL1* гените – това са т.н. криптични форми на транслокацията.<sup>3</sup> От друга страна, в около 3.7-5% от случаите вместо класическата хромозома  $t(9;22)(q34;q11)$  се описват по-сложни преустройства, при които освен хромозоми 9 и 22, в преустройството са ангажирани допълнително и други хромозоми – вариантни форми на транслокацията. Смята се, че наличието на криптични или вариантни транслокации няма значение за клиничния ход или терапевтичния отговор.<sup>4</sup>

Точката на счупване в *ABL1* гена е почти винаги разположена във втори и много рядко – в трети интрон на гена, докато прекъсванията в *BCR* гена са хетерогенни и могат да варират. В преобладаващия брой от случаите с ХМЛ счупването е разположено в средната част на гена в т.н. *M-bcr* (Major) област, обхващаща интрони 13 и 14, при което се формират съответно  $e13a2$  ( $b2a2$ ) и/или  $e14a2$  ( $b3a2$ ) транскрипти и се синтезира онкопротеин с молекулно тегло 210 kd ( $p210$ ).<sup>5</sup> В около 2% от случаите се наблюдават и атипични форма на пренареждане<sup>6</sup>, при които счупването в *BCR* е разположено в други места – в 5' края, в т.нар. *m-bcr* (*minor*) област, обхващаща първи интрон, при което се образуват  $e1a2$  транскрипти и онкопротеин с молекулно тегло 190 kd ( $p190$ ) – аномалия, характерна за *BCR-ABL1*-положителните остри левкемии; счупването може да е в *μ-bcr* (*micro*) областта, разположена в 3' края на гена, при което се синтезират  $e19a2$  транскрипти и онкопротеин с молекулно тегло 230 kd ( $p230$ ) и много др.<sup>5,7</sup>

При пациенти без лечение, както и при резистентност към провежданата тера-

ния, ХМЛ има характерно трифазно клинично протичане – разграничават се три еволютивни стадия: хронична фаза (средно 5-6 години); стадий на изостряне (акцелерирана фаза) (средно 6-9 месеца) и стадий на бластна трансформация (бластна криза) (средно 3-6 месеца), последният от които по правило завършва фатално.<sup>8,9</sup>

Изясняването на ключовото значение на трайно повишената тирозинкиназна активност на хибридният Bcr-Abl1 онкопротеин за развитието на ХМЛ е в основата на съвременната терапевтична стратегия – прилагане на таргетно лечение с тирозинкиназни инхибитори (ТКИ), чиято цел е прекъсване на основния патогенетичен механизъм на болестта. Понастоящем за клинична употреба при ХМЛ са одобрени пет различни ТКИ: *imatinib*, *nilotinib*, *dasatinib*, *bosutinib* и *ponatinib*.<sup>10</sup> Изборът на оптимален препарат се определя от прогностичния скор към момента на диагноза на съответния пациент [прогностичен модел на *Sokal*, на *Hasford* (Euro), на *EUTOS*, *The EUTOS long-term survival (ELTS) score* и др.], неговото общо състояние и профила на очакваните странични явления при отделните препарати.<sup>11</sup>

Генетичните изследвания са задължителен елемент от комплексния диагностичен подход при пациенти с клинични и лабораторни данни за ХМЛ (левкоцитоза с олевяване, тромбоцитоза, базофилия, спленомегалия), имащ за цел поставяне на диагноза, определяне на риск, избор на оптимален терапевтичен подход и мониториране на лечението с оглед оптимизирането му съобразно нуждите на конкретния пациент.<sup>12,13</sup> Генетичните изследвания при ХМЛ следва да се разглеждат в няколко различни контекста: (1) изследвания към момента на диагноза; (2) изследвания за оценка на терапевтичен отговор и (3) изследвания при резистентност към лечение или при клинична прогресия.

### Изследвания към момента на диагнозата

Основната цел на генетичните изследвания при пациент с предполагаема ХМЛ е да се докаже наличието на патогномоничната  $t(9;22)(q34;q11)/BCR-ABL1$ , което е задължително условие за поставяне на диагноза ХМЛ и ограничаване на болестта от други миелопролиферативни неоплазии или реактивни състояния, свързани с левкоцитоза<sup>14</sup>; тези изследвания са и абсолютно необходима предпоставка за започване на таргетно лечение с ТКИ. За целта могат да се използват различни диагностични подходи, които целят да докажат специфичната  $t(9;22)$  на различни нива, съответно: (1) конвенционален цитогенетичен анализ – за установяване на Филаделфийска хромозома, (2) молекулярно-цитогенетичен анализ чрез флуоресцентна *in situ* хибридизация (FISH) на фузионния ген *BCR-ABL1* (ДНК), (3) молекулярен анализ чрез полимеразно-верижна реакция след обратна транскрипция (RT-PCR) на фузионните транскрипти *BCR-ABL1* (РНК)<sup>12,13</sup>, имунологичен анализ чрез флоуцитометрия – на хибридният онкопротеин Bcr-ABL (протеин).<sup>15</sup> В рутинната практика съгласно актуалните препоръки от водещи експерти в областта към момента за диагноза приложение намират само 2 от тези методи – цитогенетичен анализ и RT-PCR.<sup>12,13</sup> Двамата подхода не са алтернативи и следва да се използват успоредно, тъй като позволяват данните от едното изследване да валидират резултатите от другото. Най-честата причина за несъответствие в резултатите от двата подхода са криптични форма на транслокацията [Ph(-)/*BCR-ABL1*(+)] или атипични форми на фузионния ген [Ph(+)/*BCR-ABL1*(-)]. В тези случаи за изясняване на резултата метод на избор е FISH.<sup>16</sup>

## Клинична значимост на цитогенетичните изследвания

Конвенционалният хромозомен лентов анализ позволява не само да се докаже наличието на Ph-хромозома, но и да се установи наличие на други допълнителни аномалии, които се срещат в 9.4% от пациентите.<sup>6</sup> Някои от тези аномалии имат важна диагностична и прогностично значима информация. Така например установяване на аберации, отнасящи се към т.н. голям път на цитогенетична клонална еволюция (като втора Ph-хромозома, тризомия 8, изохромозома 17q, и тризомия 19)<sup>17</sup>, както и наличието на комплексен кариотип или аномалии, засягащи хромозома 3q26.2, е достатъчно условие за класифициране на ХМА във фаза на изостряне, независимо от резултатите от останалите изследвания, съгласно класификацията на СЗО (2016).<sup>14</sup> Тези пациенти са с повишен риск и с по-висока честота на резистентност към използваните ТКИ.

## Клинична значимост на молекулярните изследвания

Съгласно актуалните препоръки, използването на RT-PCR е другият задължителен елемент на диагностичния панел.<sup>12,13</sup> Използването на RT-PCR е предпочитан скриниращ подход в рутинната практика, позволяващ бързо определяне на *BCR-ABL1* статуса и съответно ограничаване на пациентите, които носят аномалията. Основна причина за това е възможността изследването да се проведе върху периферна кръв за разлика от конвенционалния цитогенетичен анализ, при който се изисква материал от костно-мозъчен аспират. Друго съществено преимущество на RT-PCR е, че позволява установяване на *BCR-ABL1* и при пациенти с криптични форми на транслокацията, които са отрицателни за Ph-хромозома при ци-

тогенетичното изследване. И не на последно място, определяне на наличие и форма на фузионните транскрипти е абсолютно условие за приложимост на методите за целите на молекулярния мониторинг за оценка на минимална резидуална болест в хода на лечение.

Понастоящем съществуват известни противоречия по отношение на конкретния вариант на реакцията, който следва да се използва за изследванията за диагноза: качествена RT-PCR (*ELN*, 2013)<sup>12</sup> или количествена RT-PCR (*NCCN*, 2017).<sup>13</sup>

**Информация, получавана при използване на качествена RT-PCR.** Основно преимущество на този подход и възможността да се определи не само наличието, но формата на фузионния ген по вида на намерените *BCR-ABL1* транскрипти. Това е изключително важно в няколко аспекта:

**Значение на конкретната форма на типичните *BCR-ABL1* транскрипти.** Според редица наблюдения, вариациите във вида на типичните p210 *BCR-ABL1* транскрипти могат да има съществено предиктивно значение при лечение с тирозинкиназния инхибитор *imatinib*. Така например, *Castagnetti et al.* през 2017 съобщават значимо по-висока честота и по-бързо постигане на голям молекулярен отговор при пациенти с e14a2 (b3a2) транскрипти спрямо тези с e13a2 (b2a2), както и значимо по-добри 7-годишна преживяемост (90% спрямо 83%, преживяемост без прогресия (89% спрямо 81%) и преживяемост без неуспех (71% спрямо 54%).<sup>18</sup> Сходни резултати съобщават и *Jain et al.* през 2016 г. – при пациенти с e13a2, e14a2 и e14a2+e13a2 транскрипти голям молекулярен отговор се установява на 3-ия месец съответно при 27%, 49%, и 50%, а на 6-ия – при 42%, 67%, и 70%. И тук видът на транскриптите корелира в преживяемостта без събития, която е по-дълга при пациенти с e14a2 (независимо дали е единствено форма



или в комбинация с e13a2).<sup>19</sup> E14a2 формата се съобщава да е асоциирана и с по-висока честота на ремисия без лечение при пациенти с ХМЛ със спряно лечение.<sup>20</sup> Същевременно според други автори, независимо от по-добрия отговор при e14a2 не се доказват значими различия в общата преживяемост и преживяемостта без прогресия в дългосрочен план.<sup>21,22</sup>

*Значение на доказване на атипични форми на фузионните транскрипти.* В част от пациентите се доказват атипични форми на фузионния ген, различни от класическите p210 *BCR-ABL1*. Установяването им е с изразена практическа значимост в 3 основни аспекта:

- i. при някои от тях клиничното протичане и отговор към лечение при пациенти с ХМЛ може да се различава от очакваните при класическите форми на аномалията. Така например наличие на характерните за остри левкемии p190 *BCR-ABL1* транскрипти (e1a2) при пациенти в хронична фаза, вместо p210 *BCR-ABL1*, в повечето случаи корелира с влошен отговор към лечението с ТКИ и с по-неблагоприятно протичане на болестта като цяло<sup>23</sup>;
- ii. установяване на p190 *BCR-ABL1* транскрипти позволява отграничаване на *de novo* Ph(+) остри левкемии от първична бластна криза ХМЛ, които по всички други характерни особености могат да бъдат идентични<sup>24</sup>;
- iii. рутинно използваните китове за количествено определяне на ниво на p210 *BCR-ABL1* не са пригодени за мониториране на атипичните транскрипти. При тези пациенти е невъзможно да се оцени точно терапевтичния отговор и при необходимост своевременно да се промени терапевтичното поведение. При тези пациенти не могат да бъдат предприемани опити за спиране на лечението, неза-

висимо че отговарят на всички останали критерии, тъй като честото и редовно мониториране е задължителна предпоставка за това.<sup>13</sup>

*Информация, получавана при използване на количествена RT-PCR.* При този подход могат да се пропуснат някои атипични пренареждания, докато други могат да останат неидентифицирани. Същевременно, той предоставя информация за базисната експресия на фузионния ген, за която се смята че може да има важно прогностично значение. Редица наблюдения показват, че бързината и кривата на редуцията в нивото на фузионните транскрипти в хода на лечение спрямо индивидуално определеното изходно ниво при конкретния пациент могат да имат по-важно прогностично значение от намерената абсолютна стойност на даден етап от проследяването.<sup>25,26</sup>

### Изследвания за оценка на терапевтичния отговор

Преди навлизане на лечението с ТКИ в клиничната практика, ХМЛ неизбежно завършваше фатално 4-6 години от диагнозата; единствена опция с потенциал за излекуване беше аlogenната трансплантация на хемопоеични стволови клетки. С навлизането на таргетното лечение прогнозата коренно се промени и понастоящем 10-годишната преживяемост при ХМЛ надвишава 80%<sup>27</sup>, като относителната преживяемост на пациентите е едва 3 години по-кратка от тази на общата популация.<sup>28</sup> От друга страна, при около 50% пациентите с неустановими *BCR-ABL1* в продължителен период от време, спирането на лечение води до трайна преживяемост без лечение и без рецидив<sup>29</sup>, което предполага, че е възможно излекуване в тези случаи. Това понастоящем е и основната цел при лечението с ТКИ – да се постигне преживяемост и качество на

живот, сходни с тези на лица без левкемия.<sup>30</sup> За постигане на тази цел е важно да се осигури максимална редукция на левкемичната популация и не се допусне прогресия на болестта и/или развитие на резистентност.

В около 6% от случаите ХМА се ди-агностицира в напреднал стадий (изострена фаза или бластна криза)<sup>6</sup>, което често е свързано с отсъствие на адекватен терапевтичен отговор. В допълнение, 10-15% от пациентите с ХМА имат по-кратка преживяемост от останалите поради прогресия, независимо от провежданото лечение или поради субоптимална терапия или непридържане към терапевтичния протокол.<sup>31</sup> Своевременното идентифициране на пациенти, при които не се постига очаквания терапевтичен отговор или настъпва загуба на постигнат преди това терапевтичен отговор, позволява ранна промяна в терапевтичното поведение и евентуално подобряване на прогнозата в дългосрочен план. В този смисъл, контролът на терапевтичния отговор има ключово място при оптимизиране на лечението на отделния пациент и постигане на по-добра прогноза.

Степента на редукцията на туморния обем в резултат на провежданото лечение е един от най-важните прогностични маркери при всички злокачествени болести, вкл. и при ХМА.<sup>32</sup> При ХМА отговорът към лечение се изразява във: (i) възстановяване на големината на слезката, (ii) нормализиране на хематологичните нарушения, (iii) изчезване на Ph-хромозома и отново поява на нормален кариотип, и (iv) редуциране на броя на *BCR-ABL* транскриптите в кръвта и костния мозък до много ниски нива, вкл. и до пълното им изчезване. По правило, тези процеси настъпват последователно във времето, което до голяма степен определя различните подходи за оценка на терапевтичен отговор и имат различно клинично значение през различните моменти от лечение в хода на болестта.

**Хематологичен отговор (ХО).** Като ХО се разбира подобряване на кръвните показатели, намаляване на големината на слезката и изчезване на всички симптоми и прояви на болестта, съществуващи към диагноза – левкоцити  $< 10 \times 10^9/\text{л}$  с нормална диференциална кръвна картина (без незрели гранулоцити и  $< 5\%$  базофили), тромбоцити  $< 450 \times 10^9/\text{л}$  и изчезване на спленомегалията.<sup>12</sup> В миналото се използваше и понятието *частичен ХО* – левкоцити  $< 10 \times 10^9/\text{л}$ , но с наличие на незрели форми, намаляване на броя на тромбоцитите и размера на слезката с  $\geq 50\%$ . Понастоящем се смята, че този отговор няма изразена клинична значимост и е равностоеен на отсъствие на отговор. Нормализиране на кръвните показатели е първият отговор към лечение и обикновено настъпва през първите 4 седмици.<sup>33</sup>

**Цитогенетичен отговор (ЦО).** Като ЦО се разбира намаляване до пълно изчезване на метафазите, носещи Ph-хромозома при цитогенетичен анализ, както и възстановяване на нормален кариотип. Разграничават се: пълнен ЦО (0% Ph), парциален ЦО (1-35% Ph), голям ЦО (пълнен + частичен: 0-35% Ph), малък ЦО (36-65% Ph), минимален ЦО (66-95% Ph) и отсъствие на ЦО ( $> 95\%$  Ph).<sup>12</sup> На 12 месец от лечение, пълнен ЦО се постига при 65-73% от пациентите, лекувани с *imatinib* и в 80-85% от тези, лекувани с второ поколение ТКИ.<sup>34</sup> Чувствителността на изследването е 1-5%. В клиничното проучване *IRIS*, пациенти без пълнен ЦО имат риск от прогресия около 25% спрямо  $< 10\%$  при пациенти с постигнат ЦО.<sup>35</sup> Данните от интерфазен FISH не могат да бъдат използвани за дефиниране на цитогенетичните категории на отговор.<sup>36</sup>

**Молекулярен отговор (МО).** Молекулярният мониторинг е най-чувствителният подход оценка на терапевтичен отговор с чувствителност до 0.001%. Друго съществено преимущество на метода е, че



## ПРЕДИКТИВНА СТОЙНОСТ НА МОЛЕКУЛЯРНИЯ МОНИТОРИНГ...

изследването е неинвазивно и се толерира от пациентите.

Молекулярният мониторинг е средство на избор при пациенти с постигнат пълен ЦО. През последните години се натрупва убедителни данни, че съществува добра корелация между терапевтичния отговор, определен чрез оценка на резидуалните Ph (+) метафази и нивото на *BCR-ABL1/ABL1*, което е основание за разширяване на индикациите за прилагане на RT-PCR при всички пациенти, а не само при тези с пълен ЦО.<sup>12</sup> Използването на цитогенетичния анализ се ограничава само до случаите, когато не може да се проведе молекулярен мониторинг при отсъствие на оптимален молекулярен отговор на 12<sup>и</sup> месец от лечение или при загуба на голям молекулярен отговор.<sup>12,13,36</sup>

**Методологични изисквания.** Оценката на молекулярния отговор следва да се провежда посредством стандартизирана количествена RT-PCR с използване на *Taqman* сонди, позволяваща доказване на нива на *BCR-ABL1*  $\leq 0.0032\%$ .<sup>12,13</sup> За целта с най-широко приложение е стандартизираната мануална количествена RT-PCR с готови, комерсиално разработени диагностични китове или приготвени на място, съгласно препоръките на Европейската програма *Europe Against Cancer*.<sup>37,38</sup> Принципно нов подход в молекулярния мониторинг са напълно автоматизираната технология, елиминираща техническите вариации, свързани с човешкия фактор и подходите, базиращи се на използване на дигитален RT-PCR.<sup>39</sup> Резултатите трябва да се съобщават като съотношение фузионни транскрипти към контролни нормални транскрипти (най-често *ABL1*, и по-рядко *BCR*, *GUSB* или друг международно признат ген) в проценти; получената стойност на *BCR-ABL1/ABL1* се умножава с локален фактор на конверсия съгласно международната скала (*International Scale, IS*)<sup>40</sup>, което позволява сравнимост на резултати-

те, получени в различни лаборатории. Като *IS* се разбира намалението на *BCR-ABL1* транскриптите спрямо стандартизирано базисно ниво от 100%, изчислена въз основа на средното ниво на *BCR-ABL1*, определено в 30 проби от пациенти, взети преди започване на лечение в проучването *IRIS*.<sup>41</sup> Освен като процент, МО може да бъде представен и като логове редукция, където 1 лог е 10-кратно намаление в нивото на фузионни транскрипти, 2 логa – 100-кратно намаление и т.н.

**Дефиниции на МО.** Трите основни понятия, използвани при молекулярния мониторинг при ХМЛ, включват: (1) *голям МО*, (2) *дълбок МО* и (3) *ранен МО*.<sup>12</sup> В някои препоръки (NCCN, 2017) се използва и понятието пълен МО – неустановими *BCR-ABL1* при чувствителност на реакцията не по-малка от 0,0032% (4.5 логa)<sup>13</sup>, докато според другото понятие следва да не се използва в практиката.<sup>12</sup>

*Голям МО* се дефинира като намаление на нивото на фузионни транскрипти до ниво *BCR-ABL1/ABL1*  $\leq 0.1\%$  (редукция 3 логa).

*Дълбок МО* дефинира подгрупа от пациенти с голям МО с по-изразено намаление в нивото на фузионни транскрипти, при които *BCR-ABL1/ABL1* са  $\leq 0.01\%$ . Разграничават се 3 различни нива на *дълбок МО* като при дефинирането им не се прави разлика дали има установени фузионни транскрипти [*BCR-ABL1(+)*] или не [*BCR-ABL1(-)*]; при негативна реакция задължително се прецизирана броят на нормални *ABL1* копия в изследваната проба или чувствителността на реакцията. Нивата на *дълбок МО* са:

- МО 4.0 логa: RT-PCR(+) с *BCR-ABL1/ABL1*  $< 0.01\%$  или RT-PCR(-) при наличие на  $> 10\,000$  *ABL1* транскрипта;
- МО 4.5 логa: RT-PCR(+) с *BCR-ABL1/ABL1*  $< 0.0032\%$  или RT-PCR(-) при наличие на  $> 32\,000$  *ABL1* транскрипта;

- МО 5.0 лоза: RT-PCR(+) с *BCR-ABL1/ABL1* < 0.001% или RT-PCR(-) при наличие на > 100 000 *ABL1* транскрипта.<sup>40</sup>

*Ранен МО* – нивото на фузионни транскрипти [*BCR-ABL1/ABL1*] на 3-ия и 6-и месец от началото на лечение с ТКИ.<sup>13</sup>

Понятието *молекулярен рецидив* обикновено се използва при пациенти, при които е спряно лечение и се дефинира като наличие на 2 последователни положителни резултата при изследване с количествена RT-PCR в рамките на един месец, при които е установено значимо нарастване на нивото на *BCR-ABL1* ( $\geq 1$  лоз).<sup>42</sup>

**Честота на молекулярния мониторинг.** След започване на лечение, молекулярният мониторинг следва да се провежда през 3 месеца до постигане на *голям МО* (*BCR-ABL1/ABL1*  $\leq 0.1\%$ ), след което през 3-6 месеца.<sup>12,13</sup> При нарастване на нивото на фузионни транскрипти с 1 лоз (10 пъти) изследването следва да се повтори след 1-3 месеца.

**Молекулярен мониторинг при пациенти, при които е спряно лечението с ТКИ.** При пациенти, при които е спряно лечението, молекулярното изследване следва да се провежда значително по-често: ежемесечно през първите 6 месеца, през месец през следващите 7-24 месеца, след което през 3 месеца за пациентите, които остават в *голям МО* (NCCN, 2017). Според препоръките на ESMO мониторирането трябва да се провежда всеки 4-6 седмици през първата година след спиране на лечение.<sup>36</sup>

**Клинична значимост на установеното ниво на *BCR-ABL1*.** Най-общо, намаляващи до много ниски нива на *BCR-ABL1*, включително до пълното им изчезване, са свързани с добра прогноза, докато персистиращи трайно високи нива или постоянно нарастващи, особено ако са свързани със загуба на *голям МО* са свързани с риск от прогресия на болестта и влошена прогноза.

В рутинната практика са разработени критерии за терапевтичен отговор, включващи оптималното ниво на фузионни транскрипти за конкретен момент от лечението. Въз основа на тези критерии се разграничават 3 вида отговор:

(1) *оптимален терапевтичен отговор* – постигнато е желаното ниво на редукция на *BCR-ABL1* за конкретния момент от лечение; това корелира с добра прогноза в дългосрочен план, поради което ефективността на прилагания ТКИ е оптимална и не се налага смяната му с друг ТКИ;

(2) *неуспех от лечение* (отсъствие на отговор) – не е постигнато желаното ниво на редукция на *BCR-ABL1* за съответния момент от лечение, поради което продължаване на лечението със същия ТКИ не е подходящо и е необходима смяна с друг препарат;

(3) *субоптимален отговор* (отговор, изискващ повишено внимание) – наблюдава се известен отговор, но той не покрива критериите за оптимален; поради това, независимо че пациентът все още може да има известно полза от използвания ТКИ, но в дългосрочен план прогнозата е неясна, се налага по-стриктен контрол и готовност за промяна на терапията.<sup>12,13</sup>

Критериите за терапевтичен отговор в различните препоръки се припокриват в значителна степен, независимо че съществуват някои различия. Съгласно ELN 2013, оптимален отговор към първа линия на лечение с ТКИ се приема ако:

- на 3-и месец *BCR-ABL1/ABL1* е  $\leq 10\%$ ; ако не може да проведе молекулярно изследване следва да се проведе цитогенетично изследване, като Ph(+) метафази трябва да са < 35%;
- на 6-и месец *BCR-ABL1/ABL1* е  $\leq 1\%$  [респективно пълн ЦО];
- на 12-и месец *BCR-ABL1/ABL1* е  $\leq 0,1\%$ ; (или по което и да е време).<sup>12</sup>

Съгласно NCCN 2017, оптимален отговор към първа линия на лечение с ТКИ се приема ако:

- на 3-и и 6-и месец  $BCR-ABL1/ABL1$  е 1-10%;
- на 12-и месец  $BCR-ABL1/ABL1$  е 0.1-1% и > 12 месеца  $BCR-ABL1/ABL1$  е < 0.1%.<sup>13</sup> Като неуспех се приема ако:
- на 3-и месец отсъства пълнен ХО или Ph(+) метафази са над 95%;
- на 6-и месец  $BCR-ABL1/ABL1$  е > 10% (респ. > 35% Ph(+));
- на 12-и месец  $BCR-ABL1/ABL1$  е > 1% [респ. > 0 Ph(+)];
- > 12 месеца – загуба на пълнен ХО или пълнен ЦО, доказана загуба на голям М, поява на нови, допълнителни хромозомни аномалии, поява на мутации в  $BCR-ABL1$ .

Като субоптимален отговор, изискващ повишено внимание се приема:

- на 3-и месец  $BCR-ABL1/ABL1$  е > 10% [респ. 1-35% Ph(+)];
- на 6-и месец  $BCR-ABL1/ABL1$  е 1-10% [респ. 1-35 Ph(+)];
- на 12-и месец  $BCR-ABL1/ABL1$  е 0.1-1%;
- > 12 месеца – Ph(-) клонална еволюция с поява на -7/7q-.<sup>12</sup>

Изследването предоставя клинично значима информация в няколко различни аспекта: (1) ранно идентифициране (3-6 месеца след стартиране на лечение) на пациенти с висок риск от прогресия, (2) идентифициране на пациенти, загубили молекулярен отговор, респ. развили вторична резистентност, с висок риск от прогресия преди всякакви други клинични данни, (3) идентифициране на пациенти с неустановима болест, при които може да се предприеме спиране на лечение.

### Ранно идентифициране на пациенти с висок риск от прогресия: оценка на ранен молекулярен отговор

Един от най-важните предиктивни фактори при пациенти, лекувани с ТКИ, е оценката на т.н. ранен молекулярен отговор – ниво на  $BCR-ABL1$  на 3-и и 6-и месец от началото на лечение.<sup>43</sup>

Съгласно сега възприетите критерии, установяването на ниво на  $BCR-ABL1/ABL1 \leq 10\%$  на 3-и месец от лечение е белег на оптимален терапевтичен отговор, корелиращ с всички прогностични индекси – вероятност за постигане на пълнен ЦО, голям МО, дълбок МО, преживяемост без прогресия (ПБП), преживяемост без трансформация и обща преживяемост.<sup>44</sup> Непостигането на това ниво ( $BCR-ABL1/ABL1 > 10\%$ ) се приема като субоптимален отговор, изискващ повишено внимание. Относителният дял на тези пациенти варира от зависимост от използвания ТКИ, като той е по-висок при *imatinib* (24-35%) спрямо този при ТКИ от второ поколение [*dasatinib* (16%), *nilotinib* (10%), *bosutinib* (14%)]<sup>45</sup>. При пациентите с  $BCR-ABL1/ABL1 > 10\%$  се постига значително по-рядко пълнен ЦО (48-59% спрямо 81-96%) и голям МО (14-27% спрямо 62-80%). Това от своя страна се транслира и в скъсени ПБП и обща преживяемост (ОП), съответно: 57% и 93% (5-годишна ПБП / ОП – *imatinib*), 83% и 97% (4-годишна ПБП / ОП – *nilotinib*), 68%/86% и 96% (3-годишна ПБП / ОП – *dasatinib*), 83%/88% и 99% (2-годишна ПБП / ОП – *bosutinib*), и 61% и 85% (3-годишна ПБП / ОП – различни ТКИ).<sup>45,46</sup> Независимо от всички тези данни, съгласно препоръките на ELN 2013, молекулярния статус на 3-и месец при едно единствено определяне на терапевтичния отговор не е достатъчно условие за промяна на лечение.<sup>12</sup> Според NCCN интерпретацията зависи от конкретната кли-

нична ситуация като терапията може да не се променя на 3-и месец само при пациенти с редукция > 50% от базисното ниво или със стойности малко над 10%.<sup>13</sup>

Изследването на нивото на *BCR-ABL1* на 6-и месец добавя допълнителна клинично значима информация, особено важна при пациенти с *BCR-ABL1/ABL1* > 10% на 3-и месец. Съгласно препоръките на ELN, като оптимален молекулярен отговор на 6-и месец е установяването на нива на *BCR-ABL1/ABL1* < 1%.<sup>12</sup> Смята се, че при тези, при които е постигнат този отговор, протичането на болестта, последващия отговор към терапията и цялостната прогноза е идентична, независимо от определения статус на 3-и месец, вкл. и при тези при тези, които са били с нива > 10% предходното изследване.<sup>47</sup> При пациенти, при които не е постигнат оптимален отговор както на 3-и, така и на 6-и месец, по правило се наблюдават скъсени ПБП и ОП, поради което е показание за смяна на използвания ТКИ.

### **Идентифициране на пациенти, загубили молекулярен отговор с висок риск от прогресия**

Постигане на *голям МО* (*BCR-ABL1/ABL1* ≤ 0.1% или 3 лога редукция) на 12-и месец от лечението или по което и да е време е маркер за оптимален отговор.<sup>12,13</sup> При част от тези пациенти се наблюдава отново нарастване на *BCR-ABL1/ABL1*, което често е белег на прогресия на болестта, като тази находка може предхожда значително във времето появата на клинично изявен рецидив. Така например, 10% от пациентите с *пълен ЦО*, които са загубили *големия МО* и/или са имали > 1-лог нарастване на нивото на *BCR-ABL1* впоследствие са развили прогресия на болестта<sup>48</sup>, а в друго проучване, при около една трета от пациентите с *го-*

*лям МО*, които са го загубили, е наблюдаван рецидив средно 14 месеца по-късно.<sup>49</sup> Тези данни подчертават клиничната и предиктивна значимост на редовния молекулярен контрол за идентифициране на пациенти с постигнат *МО* и с повишен риск от прогресия. Същевременно нарастването повторно на нивото на фузионните транскрипти може да бъде свързано както с развитие на резистентност към успешно до преди това лечение, така и с непридържане към терапията.<sup>50</sup> Когато еднократно е установено нарастване на нивото на фузионните транскрипти > 5 пъти, при което е загубен *големия МО* или при нарастване 10 пъти (1 лог) при пациенти без загуба на *големия МО*, изследването следва да се повтори през пократък интервал.<sup>12,13</sup> При потвърждаване на находката и изключване непридържане към терапията като причина, в случаите когато нарастването е съпроводено със загуба на *голям МО* следва да се проведе цитогенетично изследване върху костно-мозъчен аспират, за да се оцени качеството на цитогенетичния отговор и евентуално – на появата на допълнителни цитогенетични аномалии. Допълнително следва да се извърши скрининг за мутации с цел да се избере оптималния ТКИ инхибитор при превключване на лечение.

### **Идентифициране на пациенти с неустановима болест, при които може да се предприеме спиране на лечение**

Постигането на *голям ГО* корелира с благоприятна прогноза и удължена преживяемост без прогресия. В проучването *IRIS* на 54 месец от проследяването, пациентите с постигнат *голям МО* на 12-ия месец имат 97% ПБП спрямо 89% при тези, с *пълен цитогенетичен отговор*, но без *голям*



## ПРЕДИКТИВНА СТОЙНОСТ НА МОЛЕКУЛЯРНИЯ МОНИТОРИНГ...

МО (< 3 лога редукция).<sup>51</sup> В друго проучване, при нито един от пациентите с голям МО на 18-и месец не е наблюдавана прогресия на болестта.<sup>52</sup> Задълбочаването на молекулярния отговор допълнително намалява риска от прогресия.<sup>53,54</sup>

Понастоящем, като най-добър МО се приема МО4,5/МО5,0 с неустановими *BCR-ABL1* транскрипти. Честотата на пациенти с неустановими транскрипти на 36-и месец е 18.1% (*imatinib* 400 mg) и е значително по-висока при използване на високи дози *imatinib* – 30.6% (*imatinib* 800 mg) или ТКИ второ поколение – 29.2% (*nilotinib*) и 28.6% (*dasatinib*). Анализът на тези пациенти показва, че в случаите с неустановими *BCR-ABL1* транскрипти се установяват значимо по-добри преживяемост без трансформация и обща преживяемост само спрямо пациенти с голям МО, но не и спрямо тези пациенти с други нива на дълбок МО (МО4, МО4.5).<sup>55</sup> В друго проучване не се наблюдава значими различия в ОП при пациенти с голям МО и тези с неустановими *BCR-ABL1* транскрипти.<sup>56</sup> Същевременно, постигането на дълбок МО (МО4.5 и МО5.0), с неустановими *BCR-ABL1* транскрипти е абсолютно условие за предприемане на опит за спиране на лечение при пациенти, отговарящи на строго определени критерии.<sup>57</sup>

През последните години, данните от над 10 различни клинични проучвания представят убедителни доказателства, че при някои пациенти с продължителен дълбок МО лечението с ТКИ може да бъде спряно безопасно, като при около 50-60% от тях постигнатият МО се запазва при продължително проследяване.<sup>42</sup> В останалите случаи се наблюдава нова поява на *BCR-ABL1* с/или без постепенно нарастваща експресия, което настъпва обикновено през първите 6 месеца след спиране на лечение.<sup>58</sup> По-добри резултати се съобщават при пациенти, лекувани с ТКИ в продължение на  $\geq 5$  годи-

ни, с трайно неустановими *BCR-ABL1* или с МО 4.5 за не по-малко от 2 години. По-голяма вероятност пациентите да останат без възвръщане на болестта е установена в случаите с по-висок брой НК-клетки при спирането на лечение и по-ниска експресия на T-cell inhibitory receptor-ligand CD86 върху плазмоцитогенно-гендритните клетки.<sup>59</sup> При почти всички от тях, ново започване на лечение позволява да се възстанови нивото на МО отпреди спиране на лечение.

За да се постигне максимална ефективност с минимален риск от възвръщане на болестта, са разработени стриктни критерии, на които трябва да отговоря всеки пациент, при който се предприема опит за спиране на лечение. Към тях се отнасят:

*Клинични критерии:* възраст > 18 години; хронична фаза на ХМА без данни за предхождащи изострена фаза или бластна криза; лечение при последните 3 години с одобрени за клинична употреба ТКИ; отсъствие на анамнеза за резистентност към ТКИ;

*Молекулярни критерии:* предхождащи доказателства за *BCR-ABL1* транскрипти, които могат да бъдат характеризирани количествено чрез RT-PCR; траен молекулярен отговор [МО4.0,  $\geq 0.01\%$ IS в продължение на  $\geq 2$  години, потвърдено при най-малко 4 изследвания с интервал помежду им минимум 3 месеца; достъп до стандартизирана количествена RT-PCR с чувствителност  $\geq 4.5$  лога, съобщаване на резултатите съгласно IS не по-късно от 2 седмици от вземане на пробата; възможност за провеждане на молекулярен мониторинг ежесечно през първите 6 месеца от спирането на ТКИ, след което през месец от 7-ия до 24-ия месец, след което през 3 месеца за винаги за пациентите с голям МО.<sup>13</sup>

Препоръчват се критерии и по отношение на болницата, която трябва да осигури безопасно проследяване на тези пациенти: (1) наличие на международно стан-

гартизирана лаборатория, провеждаща молекулярния мониторинг с високо качество и чувствителност; (2) възможност за изготвяне на резултат в рамките на 4 седмици; (3) капацитет да осигури RT-PCR изследване всеки 4-6 седмици, според необходимостта; (4) изградена система за проследяване на нивото на фузионни транскрипти, позволяваща бърза намеса ако нивото на *BCR-ABL1* нараства.<sup>35</sup>

В случаите със загуба на *голям МО* се препоръчва бързо стартиране отново на лечение с ТКИ с ежемесечен молекулярен контрол през първите 6 месеца, след което през 3 месеца до живот.<sup>13</sup> При пациенти, при които не постигнат *голям МО* в рамките на 6 месеца от стартирането отново на лечението с ТКИ, следва да се проведе търсене на мутации в киназния домейн на *BCR-ABL1* и да се продължи ежемесечния молекулярен контрол още 6 месеца.

### Генетични изследвания при резистентност и прогресия на болестта

Независимо от изключително високата ефективност на таргетното лечение с ТКИ, при някои пациенти се наблюдават прояви на резистентност – не се постига желаната оптимална терапевтична отговор или болестта прогресира, въпреки проведеното лечение. При други се наблюдава загуба на вече постигнат оптимален отговор. Тази резистентност до известна степен корелира с фазата на болестта, като тя е с най-нисък относителен дял при новодиагностицирани пациенти с нисък риск и най-висок – при бластна криза.<sup>60</sup> Същевременно, прояви на резистентност се срещат и при новодиагностицирани пациенти в хронична фаза, при които използваният като първа линия лечение ТКИ не осигурява желаната отговор, което налага смяна с друг.

Съгласно данните от регистъра на *European Treatment and Outcome Study (EUTOS)*, обхващащ 2904 пациенти, лекувани с първо и второ поколение ТКИ, отсъствие на пълнен ЦО и голям МО на 12-и месец се съобщава съответно в 43% и 59% от пациентите.<sup>61</sup> Относителният дял на пациентите с резистентност е по-висок при използване на *imatinib* спрямо тези, при които са използвани ТКИ от второ поколение. Така например данните от *ENESTnd (nilotinib)* и *DASISION (dasatinib)* при новодиагностицирани пациенти с хронична фаза на ХМЛ показват значително по-изразена ефективност спрямо *imatinib*, но независимо от това, в края на първата година при 17-20% от пациентите не се постига голям ЦО, а при 54-57% голям МО, спрямо съответно – 34-35% и 72-78% при *imatinib*.<sup>62,63</sup> Съгласно актуалните препоръки, всички пациенти, при които липсва оптимален отговор, са с повишен риск от прогресия на болестта и са с неблагоприятна прогноза.<sup>12,13</sup>

Най-общо, резистентността към проведената терапия с ТКИ при ХМЛ се разделя на 2 основни форми: (1) *първична* – дефинирана като невъзможност да се постигне оптимален отговор, и (2) *вторична* – загуба на вече постигнат оптимален отговор.<sup>64</sup>

Механизмите, обуславящи развитие на резистентност към ТКИ, са хетерогенни, като най-общо се разделят на 2 основни групи:

[1] *BCR-ABL1-зависими*, към които основно се отнасят: (i) появата на мутации в киназния домейн на *BCR-ABL1*, (ii) амплификация на фузионния ген или (iii) свръхекспресия на *BCR-ABL1*;

[2] *BCR-ABL1-независими*, към които се отнасят:

- i. дерегулация на някои клетъчни транспортни молекули: ABCB1 и ABCG2 (повишен ефлукс) и OST1 (намален инфлукс);



## ПРЕДИКТИВНА СТОЙНОСТ НА МОЛЕКУЛЯРНИЯ МОНИТОРИНГ...

- ii. вариации в плазмените нива на  $\alpha 1$ -acid glycoprotein;
- iii. активиране на алтернативни пътища на сигнална трансдукция, които поддържат пролиферацията и жизнеспособността на левкемичните клетки, въпреки подтиснатата тирозин-киназна активност на онкопротеина – свързани с JAK/STAT, PI3K, Wnt/ $\beta$ -catenin, SHP-1<sup>65</sup>;
- iv. мутации в групи гени – TP53, KMT2D (MLL2), и TET2<sup>66</sup>;
- v. наследствен полиморфизъм с делеции в *VIM* гена.<sup>67</sup>

Генетичните изследвания в тези случаи целят да се изяснят механизмите, причиняващи тази резистентност, както и да подпомогнат избора на оптимална терапевтична стратегия. Смята се, че развитието на първична резистентност предимно е свързано с *BCR-ABL1*-независими механизми<sup>67</sup>, докато вторичната резистентност – с мутации в *BCR-ABL1*<sup>68</sup>, независимо че и в двата случая е възможно участието на различни механизми при един и същ болен. Разнообразието на механизмите, участващи в *BCR-ABL1*-независимата резистентност, затруднява диагностиката им; все още липсват и възможности за терапевтичното повлияване на тези състояния.<sup>69</sup> В допълнение, клиничната значимост на някои от механизми все още предстои да бъде потвърдена. Поради тези причини в рутинната практика при пациенти с вторична резистентност, освен търсене на прояви на клонална еволюция и поява на нови допълнителни хромозомни аномалии чрез конвенционален цитогенетичен анализ, единственото молекулярно изследване, което се препоръчва за изясняване на резистентността, е търсене на мутации в *ABL1* частта на фузионния ген *BCR-ABL1*.<sup>12,13</sup>

Понастоящем са описани над 100 различни мутации<sup>70</sup>, които могат да засегнат

адеинозин-трифосфат-свързващия домейн (означаван като *P-loop*), каталитичния домейн, активиращата бримка и аминокиселините, които осигуряват директния контакт с ТКИ.<sup>71</sup> Значимостта на различните мутации може да варира – при някои в известна степен се запазва чувствителността към съответния препарат, докато при други се наблюдава пълна резистентност към повечето ТКИ (като например мутацията T315I).<sup>72</sup> Повечето клинично значими мутации засягат *P-loop* (G250E, Y253F/H, и E255K/V), контактната зона (T315I), или каталитичния домейн (M351T и F359V)<sup>73</sup>. Според някои наблюдения, наличието на *P-loop* мутации е свързано с повишен риск от бърза бластна трансформация и кратка приживяемост.<sup>74</sup>

Препоръчван метод за изследване на мутации в тирозинкиназния домейн е директното секвениране по *Sanger*<sup>75</sup>, като освен него в практиката приложение намират и някои PCR-базираны подходи аел-специфична PCR, amplification-refractory mutation system PCR<sup>76</sup>, както и секвениране от ново поколение (Next Generation Sequencing, NGS).<sup>77</sup>

Директното секвениране по *Sanger* може да докаже единствено мутации, които се срещат в > 20% от общата *BCR-ABL1*(+) популация.<sup>75</sup> Имайки предвид тези данни е очевидно, че поради ниската чувствителност на този подход, трудно могат да се установяват мутации на ранните етапи от лечение, които се срещат в малък брой клетки. В някои проучвания е правен опит за използване на методи със значително по-висока чувствителност, както е флуоресцентната аел-специфична PCR, но се съобщава, че установените по този начин мутации в редки *BCR-ABL1*-положителни клетки не винаги са свързани с клонална селекция и не е задължително да доведат до неуспех в лечението.<sup>78</sup> Имайки предвид не-

възможността да се прогнозира в кои случаи находката идентифицира клон, способен да поддържа дългосрочна хемопоеза, както и поради ниската честота на доказване на мутации към момента на диагнозата, преобладава становището, че при новодиагностицирани пациенти изследването на мутации не е необходимо; единствено изключение от това правило са пациентите, при които болестта е диагностицирана в изострена фаза или бластна криза.<sup>12</sup>

В рутинната практика, индикациите за провеждане на мутационен анализ в хода на терапията включват: (1) непостигане на очаквания терапевтичен отговор, (2) 10-кратно нарастване нивото на BCR-ABL1 транскриптите, съпроводено със загуба на голям МО, (3) загуба на хематологичен и/или цитогенетичен отговор; (4) прогресия на болестта с трансформиране в изострена фаза или бластна криза.<sup>12,13,36</sup> Данните от мутационното изследване има клинична значимост в 3 различни аспекта:

1. доказване на 2 или повече мутации в BCR-ABL1 в хода на лечение с ТКИ се предлага като условен критерий, дефиниращ изострена фаза на болестта, съгласно последната ревизия на миелопролиферативните неоплазии на Световната здравна организация (2016)<sup>14</sup>;
2. пациенти с доказана една мутация имат голяма вероятност да развият допълнителни такива, поради което следва да бъдат проследявани по-внимателно. Освен това, по правило наличието на множество мутации е асоциирано с значително по-изразена резистентност;
3. прогнозиране на отговор към различните ТКИ и избор на оптимален такъв при отделния пациент съобразно вида на устанювената мутация.

Прецизиране на конкретния вариант на мутацията е изключително важно, тъй

като клиничната значимост може да варира в зависимост от вида на използвания ТКИ, като в повечето случаи мутациите, независимо, че обуславят резистентност или понижена чувствителност към един ТКИ препарат, могат да запазят чувствителността на левкемичните клетки към действието на друг. Тези наблюдения позволяват да се направи оптималния избор за последващата линия на терапия с ТКИ в случаите с неуспех за постигане на оптимален отговор при използвания като първа линия препарат или след загуба от вече постигнат такъв, независимо дали това е съпроводено или не с клинична прогресия.<sup>12</sup>

Така например, при наличие на мутациите T315A, F317L/V/I/C за предпочитане са *nilotinib* или *bosutinib*, отколкото *dasatinib*; при Y253H, F359V/C/L, E255K/V – на *dasatinib* или *bosutinib*, отколкото *nilotinib*; а при V299L – на *nilotinib*, отколкото на *dasatinib* или *bosutinib*. Мутацията T315I е свързана с резистентност към *imatinib*, *nilotinib*, *dasatinib* и *bosutinib*, поради което е показание за насочване към алогенна трансплантация на хемопоетични стволови клетки, *ponatinib* или включване в клинични проучвания. При всички останали мутации, вкл. и при тези с неизяснена клинична значимост се прилага покачване на дозата, алтернативен ТКИ, алогенна трансплантация на хемопоетични стволови клетки или клинични проучвания.<sup>13</sup>

## Заклучение

През последните години се отбелязва безпрецедентен успех при лечението на ХМЛ. Този успех е свързан както с наличието на високо ефективни таргетни препарати, така и с възможността да се използват сигурни, стандартизирани и възпроизводими молекулярни методи за прецизна начална диагноза на болестта, проследяване с висока чувствителност на ефекта от прилагана-

та терапия и прогнозиране на хода на болестта, ранно отграничаване на пациентите, които не се придържат към лечението или които се нуждаят от промяна в терапията, изясняване в част от случаите на причините за отсъствие на отговор и избор на най-подходящ препарат за конкретния пациент и не последно място – подбор на пациенти, които би могло безопасно да се спре лечението и тези, при които то трябва да се стартира отново. Всичко това е свързано с отчетливо с по-добри клинични резултати в реалната клинична практика, извън клиничните проучвания, като самият факт, че се провежда редовен молекулярен контрол се приема като важен предиктивен фактор, тъй като отразява по-добро качество на медицинските грижи при пациентите с ХМЛ.<sup>79</sup> От друга страна, редовният молекулярен мониторинг, включващ 3-4 изследвания годишно, има и ясно изразени икономически въздействия<sup>80</sup>, дължащи се на по-ниски разходи за медицински грижи основно за сметка на намаляване на средствата, свързани с лечението на случаите с прогресия на болестта<sup>81</sup>.

### ЛИТЕРАТУРА

---

- Quintás-Cardama A, Cortes J. Molecular biology of bcr-abl1-positive chronic myeloid leukemia. *Blood* 2009;113(8):1619-1630
- Salesse S, Verfaillie CM. BCR/ABL: from molecular mechanisms of leukemia induction to treatment of chronic myelogenous leukemia. *Oncogene* 2002;21(56):8547-8559
- Luatti S, Baldazzi C, Marzocchi G, et al. Cryptic BCR-ABL fusion gene as variant rearrangement in chronic myeloid leukemia: molecular cytogenetic characterization and influence on TKIs therapy. *Oncotarget* 2017;8(18):29906-29913
- Marzocchi G, Castagnetti F, Luatti S, et al., Variant Philadelphia translocations: molecular-cytogenetic characterization and prognostic influence on frontline imatinib therapy, a GIMEMA Working Party on CML analysis. *Blood* 2011 Jun 23;117(25):6793-800
- Advani AS, Pendergast AM. Bcr-Abl variants: biological and clinical aspects. *LeukRes* 2002;26(8):713-720
- Hoffmann VS, Baccarani M, Hasford J, et al. The EUTOS population-based registry: incidence and clinical characteristics of 2904 CML patients in 20 European Countries. *Leukemia* 2015;29(6):1336-1343
- Chiarella P, Summa V, De Santis S, et al. BCR/ABL1 fusion transcripts generated from alternative splicing: implications for future targeted therapies in Ph+ leukaemias. *Curr Mol Med* 2012;12(5):547-565
- Garcia-Manero G, Faderl S, O'Brien S, et al. Chronic myelogenous leukemia: 5a review and update of therapeutic strategies. *Cancer* 2003;98(3):437-57
- Schiffer CA1, Hehlmann R, Larson R. Perspectives on the treatment of chronic phase and advanced phase CML and Philadelphia chromosome positive ALL. *Leukemia* 2003;17(4):691-699
- Schmidt S. Short overview on the current treatment of chronic myeloid leukemia in chronic phase. *Memo* 2016; 9(4): 157-162
- Jabbour E. Chronic myeloid leukemia: First-line drug of choice. *Am J Hematol* 2016;91(1):59-66
- Baccarani M, Deininger MW, Rosti G, et al., European LeukemiaNet recommendations for the management of chronic myeloid leukemia. *Blood* 2013;122(6):872-884
- Radich JP, Deininger M, Abboud CN, et al., NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines): Chronic Myelogenous Leukemia, Version 2.2017
- Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* 2016;127:2391-2405
- Weerkamp F, Dekking E, Ng YY, et al. Flow cytometric immunobead assay for the detection of BCR-ABL fusion proteins in leukemia patients. *Leukemia* 2009;23(6):1106-1117
- Khoriaty RN, Talpaz M. Chronic Myeloid Leukemia. In: Tumor Board Review: Guideline and Case Reviews in Oncology 1st Edition. 2011;322
- Mitelman F. The cytogenetic scenario of chronic myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma* 1993;11 (1):11-15
- Castagnetti F, Gugliotta G, Breccia M, et al. The BCR-ABL1 transcript type influences response and outcome in Philadelphia chromosome-positive chronic myeloid leukemia patients treated frontline with imatinib. *Am J Hematol* 2017; 92(8):797-805

24. Jain P, Kantarjian H, Patel KP, et al. Impact of BCR-ABL transcript type on outcome in patients with chronic-phase CML treated with tyrosine kinase inhibitors. *Blood* 2016;127(10):1269-1275
25. Claudiani S, Apperley J, Gale RP, et al., E14a2 BCR-ABL1 transcript is associated with a higher rate of treatment-free remission in persons with chronic myeloid leukemia after stopping tyrosine kinase-inhibitor therapy. *Haematologica* 2017. pii: haematol.2017.168740
26. Pfirrmann M, Evtimova D, Saussele S, et al. No influence of BCR-ABL1 transcript types e13a2 and e14a2 on long-term survival: results in 1494 patients with chronic myeloid leukemia treated with imatinib. *J Cancer Res Clin Oncol* 2017;143(5):843-850
27. Hanfstein B, Lauseker M, Hehlmann R, et al. Distinct characteristics of e13a2 versus e14a2 BCR-ABL1 driven chronic myeloid leukemia under first-line therapy with imatinib. *Haematologica* 2014;99(9):1441-1447
28. Verma D, Kantarjian HM, Jones D, et al. Chronic myeloid leukemia (CML) with P190 BCR-ABL: analysis of characteristics, outcomes, and prognostic significance. *Blood* 2009;114(11):2232-2235
29. Pastoret C, Houot R. "Chronic myelogenous leukemia in primary blast crisis" rather than "de novo BCR-ABL1-positive acute myeloid leukemia" *Clin Case Rep.* 2017 Jun; 5(6): 757-760
30. Huet S, Cony-Makhoul P, Heiblig M, et al. Major Molecular Response Achievement in CML Patients Can Be Predicted by BCR-ABL1/ABL1 or BCR-ABL1/GUS Ratio at an Earlier Time Point of Follow-Up than Currently Recommended. *PLoS One* 2014; 9(9): e106250
31. Iriyama N, Fujisawa S, Yoshida C, et al. Shorter halving time of BCR-ABL1 transcripts is a novel predictor for achievement of molecular responses in newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia treated with dasatinib: Results of the D-first study of Kanto CML study group. *Am J Hematol* 2015; 90(4):282-287
32. Hehlmann R. CML--Where do we stand in 2015? *Ann Hematol* 2015; 94 (2):103-105
33. Bower H, Björkholm M, Dickman PW, et al. Life Expectancy of Patients With Chronic Myeloid Leukemia Approaches the Life Expectancy of the General Population. *J Clin Oncol* 2016;34(24):2851-2857
34. Mauro MJ. Can any patients with chronic myeloid leukemia outside of a clinical trial have their tyrosine kinase inhibitor discontinued? *Curr Opin Hematol* 2017;24(2):125-131
35. Baccarani M, Castagnetti F, Gugliotta G, et al. Treatment recommendations for chronic myeloid leukemia. *Mediterr J Hematol Infect Dis* 2014; 6(1):e2014005
36. Hehlmann, R. Introduction: Chronic Myeloid Leukemia (CML ) in the Era of Tyrosine KinaseInhibition. In: Chronic Myeloid Leukemia. Hehlmann, R (Ed.), 2016,VII-VIII
37. Goldman JM. Chronic myeloid leukemia: a historical perspective. *Semin Hematol* 2010; 47(4):302-311
38. Galinsky I, Buchanan S, Guide to Interpreting Disease Responses in Chronic Myeloid Leukemia. *J AdvPract Oncol* 2012; 3(4): 225-236
39. Yilmaz M, Abaza Y, Jabbour E. Selecting the best frontlinetreatment inchronicmyeloid leukemia. *CurrHematol Malig Rep* 2015;10(2):145-157
40. O'Brien SG, Deininger MW. Imatinib in patients with newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *Semin Hematol* 2003;40(2):26-30
41. Hochhaus A, Saussele S, Rosti G, et al., Chronic Myeloid Leukemia: ESMO Clinical PracticeGuidelines. *Ann Oncol* 2017; 28(4): 41-51
42. Gabert J, Beillard E, van der Velden VH, et al., Standardization and quality control studies of ,real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia – a Europe Against Cancer program. *Leukemia* 2003;17(12):2318-2357
43. Beillard E, Pallisgaard N, van der Velden VH, et al., Evaluation of candidate control genes for diagnosis and residual disease detection in leukemic patients using ,real-time' quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RQ-PCR) – a Europe against cancer program. *Leukemia* 2003;17(12):2474-2486
44. Marum JE, Branford S. Current developments in molecular monitoring in chronic myeloid leukemia. *Ther Adv Hematol* 2016; 7(5): 237-251
45. Cross NC, White HE, Colomer D, et al. Laboratory recommendations for scoring deep molecular responses following treatment for chronic myeloid leukemia. *Leukemia* 2015;29(5):999-1003



## ПРЕДИКТИВНА СТОЙНОСТ НА МОЛЕКУЛЯРНИЯ МОНИТОРИНГ...

---

46. Müller MC, Cross NC, Erben P, et al., Harmonization of molecular monitoring of CML therapy in Europe. *Leukemia* 2009;23(11):1957-1963
47. Saußele S, Richter J, Hochhaus A, et al. The concept of treatment-free remission in chronic myeloid leukemia. *Leukemia* 2016;30(8):1638-1647
48. Cortes JE. Not only response but early response to tyrosine kinase inhibitors in chronic myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 2012;30(3):223-224
49. Harrington P, Kizilors A, de Lavallade H. The Role of Early Molecular Response in the Management of Chronic Phase CML. *Curr Hematol Malig Rep* 2017;12(2):79-84
50. Baccarani M, Soverini S, De Benedittis C. Molecular monitoring and mutations in chronic myeloid leukemia: how to get the most out of your tyrosine kinase inhibitor. *Am Soc Clin Oncol EducBook* 2014:167-175.
51. Jabbour E, Kantarjian H. Chronic myeloid leukemia: 2016 update on diagnosis, therapy, and monitoring. *Am J Hematol* 2016;91(2):252-265
52. Kim DD, Hamad N, Lee HG, et al. BCR/ABL level at 6 months identifies good risk CML subgroup after failing early molecular response at 3 months following imatinib therapy for CML in chronic phase. *Am J Hematol* 2014; 89(6):626-632
53. Kantarjian HM, Shan J, Jones D, et al. Significance of increasing levels of minimal residual disease in patients with Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia in complete cytogenetic response. *J Clin Oncol* 2009; 27(22):3659-3663
54. Press RD, Galderisi C, Yang R, et al. A half-log increase in BCR-ABL RNA predicts a higher risk of relapse in patients with chronic myeloid leukemia with an imatinib-induced complete cytogenetic response. *Clin Cancer Res* 2007;13(20):6136-6143
55. Ibrahim AR, Eliasson L, Apperley JF, et al. Poor adherence is the main reason for loss of CCyR and imatinib failure for chronic myeloid leukemia patients on long-term therapy. *Blood* 2011;117:3733-3736
56. Hughes TP, Kaeda J, Branford S, et al. Frequency of major molecular responses to imatinib or interferon alfa plus cytarabine in newly diagnosed chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2003; 349(15):1423-1432
57. Hughes TP, Hochhaus A, Branford S, et al. Long-term prognostic significance of early molecular response to imatinib in newly diagnosed chronic myeloid leukemia: an analysis from the International Randomized Study of Interferon and STI571 (IRIS). *Blood* 2010; 116(19): 3758-3765
58. Etienne G, Dulucq S, Nicolini FE, et al. Achieving deeper molecular response is associated with a better clinical outcome in chronic myeloid leukemia patients on imatinib front-line therapy. *Haematologica* 2014;99(3):458-464
59. Marin D, Kaeda J, Szydlo R, et al., Monitoring patients in complete cytogenetic remission after treatment of CML in chronic phase with imatinib: patterns of residual leukaemia and prognostic factors for cytogenetic relapse. *Leukemia* 2005;19(4):507-512
60. Falchi L, Kantarjian HM, Wang X, et al. Significance of deeper molecular responses in patients with chronic myeloid leukemia in early chronic phase treated with tyrosine kinase inhibitors. *Am J Hematol* 2013;88(12):1024-1029
61. Kaygusuz Atagunduz I, Toptas T, et al. Effects of Deeper Molecular Responses on Outcomes in Chronic Myeloid Leukemia Patients in Chronic Phase Treated With Imatinib Mesylate. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 2017;17(2):120-125
62. Campiotti L, Suter MB, Guasti L, et al. Imatinib discontinuation in chronic myeloid leukaemia patients with undetectable BCR-ABL transcript level: A systematic review and a meta-analysis. *Eur J Cancer* 2017;77:48-56.
63. Khoury HJ, Williams LA, Atallah E, et al. Chronic Myeloid Leukemia: What Every Practitioner Needs to Know in 2017. *Am Soc Clin Oncol Educ Book* 2017;37:468-479
64. Hughes A, Yong ASM. Immune Effector Recovery in Chronic Myeloid Leukemia and Treatment-Free Remission. *Front Immunol* 2017;8:469
65. Jabbour EJ, Hughes TP, Cortés JE, et al. Potential mechanisms of disease progression and management of advanced-phase chronic myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma* 2014;55(7):1451-1462
66. Hoffmann VS, Baccarani M, Hasford J, et al. Treatment and outcome of 2904 CML patients from the EUTOS population-based registry. *Leukemia* 2017;31(3):593-601
67. Kantarjian H, Shah NP, Hochhaus A, et al. Dasatinib versus imatinib in newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2010; 362(24):2260-2270

68. Saglio G, Kim DW, Issaragrisil S, et al. Nilotinib versus imatinib for newly diagnosed chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2010; 362(24):2251-2259
69. Quintás-Cardama A, Kantarjian HM, Cortes JE. Mechanisms of primary and secondary resistance to imatinib in chronic myeloid leukemia. *Cancer Control* 2009;16(2):122-131
70. Jabbour EJ, Cortes JE, Kantarjian HM. Resistance to Tyrosine Kinase Inhibition Therapy for Chronic Myelogenous Leukemia: A Clinical Perspective and Emerging Treatment Options. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 2013; 13(5): 515-529
71. Kim T, Tyndel MS, Kim HJ, et al. Spectrum of somatic mutation dynamics in chronic myeloid leukemia following tyrosine kinase inhibitor therapy. *Blood* 2017;129(1):38-47
72. Radich JP, Shah NP, Mauro MJ. Integrating current treatment options for TKI-resistant chronic myeloid leukemia. *Clin Adv Hematol Oncol* 2014;12(7 Suppl 13):3-17, 1
73. Wiecek A, Uharek L. Management of Chronic Myeloid Leukemia Patients Resistant to Tyrosine Kinase Inhibitors Treatment. *Biomark Insights* 2015; 10(3): 49-54
74. Patel AB, O'Hare T, Deininger MW. Mechanisms of Resistance to ABL Kinase Inhibition in Chronic Myeloid Leukemia and the Development of Next Generation ABL Kinase Inhibitors. *Hematol Oncol Clin North Am* 2017;31(4):589-612
75. Gibbons DL, Prichard S, Posocco P, et al. Molecular dynamics reveal BCR-ABL1 polymutants as a unique mechanism of resistance to PAN-BCR-ABL1 kinase inhibitor therapy. *Proc Natl Acad Sci* 2014; 111(9):3550-3555
76. Kimura S, Ando T, Kojima K. BCR-ABL Point Mutations and TKI Treatment in CML Patients. *J Hematol Transfus* 2014;2(3):1022
77. Corbin AS, La Rosee P, Stoffregen EP, et al. Several Bcr-Abl kinase domain mutants associated with imatinib mesylate resistance remain sensitive to imatinib. *Blood* 2003; 101:4611-4614
78. Soverini S, Colarossi S, Gnani A, et al. Contribution of ABL kinase domain mutations to imatinib resistance in different subsets of Philadelphia-positive patients: by the GIMEMA Working Party on Chronic Myeloid Leukemia. *Clin Cancer Res* 2006;12:7374-7379
79. Branford S, Rudzki Z, Walsh S, et al. Detection of BCR-ABL mutations in patients with CML treated with imatinib is virtually always accompanied by clinical resistance, and mutations in the ATP phosphate-binding loop (P-loop) are associated with a poor prognosis. *Blood* 2003;102:276-283
80. Soverini S, Hochhaus A, Nicolini FE, et al. BCR-ABL kinase domain mutation analysis in chronic myeloid leukemia patients treated with tyrosine kinase inhibitors: recommendations from an expert panel on behalf of European LeukemiaNet. *Blood* 2011;118(5): 1208-1215
81. Yin L, Dittman D, Chenn A. Rapid quantitative detection of the T315I mutation in patients with chronic myelogenous leukemia. *Diagn Mol Pathol* 2012;21(1):34-39
82. Deininger MW, Hodgson JG, Shah NP, et al. Compound mutations in BCR-ABL1 are not major drivers of primary or secondary resistance to ponatinib in CP-CML patients. *Blood* 2016;127(6):703-712
83. Traulsen A, Pacheco JM, Luzzatto L, et al. Somatic mutations and the hierarchy of hematopoiesis. *Bioessays* 2010;32(11):1003-1008
84. Goldberg SL, Chen L, Wu EQ, et al. Association between molecular monitoring and long-term outcomes in chronic myelogenous leukemia patients treated with first line imatinib. *Curr Med Res Opin* 2013; 29(9):1075-1082
85. Latremouille-Viau D, Guerin A, Gagnon-Sanschagrin P, et al. Health Care Resource Utilization and Costs in Patients with Chronic Myeloid Leukemia with Better Adherence to Tyrosine Kinase Inhibitors and increased Molecular Monitoring Frequency. *J Manag Care Spec Pharm* 2017;23(2):214-224
86. Guérin A, Chen L, Dea K, et al. Economic benefits of adequate molecular monitoring in patients with chronic myelogenous leukemia. *J Med Econ* 2014;17(2):89-98



////////////////////////////////////  
**ПРЕДИКТИВНИ ДЕФИНИЦИИ ПРИ ДИФУЗЕН  
В-ЕДРОКЛЕТЪЧЕН ЛИМФОМ**  
////////////////////////////////////

**проф. д-р Маргарита Генова, дм**

СБАЛХЗ, София



# ПРЕДИКТИВНИ ДЕФИНИЦИИ ПРИ ДИФУЗЕН В-ЕДРОКЛЕТЪЧЕН ЛИМФОМ

*проф. д-р Маргарита Генова, дм*

СБАЛХЗ, София

## ОБЗОР

*Дифузният В-едроклетъчен лимфом (ДВЕЛ) е най-честа форма на лимфом в западния свят и съставлява средно 37% от неходжкиновите лимфоми при възрастни. Болестта показва значителни вариации по отношение на морфология, клинично представяне, подлежащи молекулярни механизми и биология, което неизменно се отразява в широк спектър от клинични резултати. Оптимизирането на терапевтичния отговор може да се постигне единствено чрез отчитане на молекулярната хетерогенност на болестта и прилагане на специфично насочени медикаменти и схеми в биологично обособените подгрупи. Ревизираната класификация на хемоепителните и лимфоидни неоплазии на Световната здравна организация от 2016 включва отграничаване на субтипове ДВЕЛ на базата на клетъчния произход на малигнената популация - субтип, съответстващ на В-клетки на герминативния център (GCB) и субтип с профил, съответстващ на активирани В-клетки (ABC). В допълнение към прецизиране на клетъчния произход, по-задълбочено изясняване на генетичната сложност на отделните лимфоми е предпоставка за избор на оптимална терапевтична комбинация. Понастоящем пациенти с двойно-експресиращи MYC и BCL2 лимфоми или с двойни/тройни генетични нарушения представляват подгрупи с висок риск, изискващи проучване на алтернативни стратегии. Подобрената прогноза и изследването на доказани предиктивни биомаркери са от решаващо значение за формиране на индивидуализирано лечение, адаптирано към риска.*

## Увод

Дифузният В-едроклетъчен лимфом (ДВЕЛ) е най-честа форма на лимфом в западния свят и съставлява средно 37% от неходжкиновите лимфоми при възрастни. По определение включва неоплазии, съставени от средни и големи по размер В-лимфоидни клетки с дифузен растеж и размери, равни

или по-големи от тези на нормални зрели лимфоцити. Клинично болестта се представя като бързо нарастваща туморна маса с една или повече нодални или екстранодални локализации. Съгласно стандартните схеми за стадиране, по-голяма част от пациентите са в I-II клиничен стадий; с рутинното въвеждане на ПЕТ/КТ се оказва обаче, че разпространеността на неопластичния процес

към момента на поставяне на диагноза е по-голяма. Значителна част от пациентите са асимптомни при диагностициране на болестта. При наличие на симптоматика, тя включва както класическите В-симптоми, така и симптоматика в зависимост от конкретната локализация.<sup>1,2</sup>

Болестта показва значителна хетерогенност по отношение на морфология, клинично представяне, биология и отговор към лечение. Това предопределя обособяване на редица нозологични субтипове въз основа на клетъчна морфология (напр. центробластна

или имунобластна), място на първично засягане (нодално или екстранодално) или според клиничния фон, от който възниква (например нормален или компрометиран имунитет); в случаите, за които няма ясни и общоприети критерии за субкласифициране, се определят като ДВЕЛ, неспецифициран по друг начин (Табл. 1). Важно е да се отбележи, че тази хетерогенност неизменно се отразява в широк спектър от клинични резултати и вариации в отговора към лечение, което поставя остро необходимостта от разработване на нови прецизирани терапевтични стратегии.

Таблица 1. Субтипове на дифузен В-егроклетъчен лимфом съгласно класификацията на СЗО-2016<sup>3</sup>.

|  |
|--|
| <p><b>Дифузен В-егроклетъчен лимфом, неспецифициран по друг начин</b></p> <p>Морфологични варианти</p> <p>Центробластен</p> <p>Имунобластен</p> <p>Анапластен</p> <p>Други редки варианти</p> <p>Молекулярни субтипове</p> <p>Субтип от В-клетки на герминативния център (GCB)</p> <p>субтипом активирани В-клетки (ABC)</p>   |
| <p><b>Други В-егроклетъчни лимфому</b></p> <p>Богат на Т-клетки/хистиоцити В-егроклетъчен лимфом</p> <p>Първичен дифузен В-егроклетъчен лимфом на ЦНС</p> <p>Първичен кожен дифузен В-егроклетъчен лимфом, тип “крак” (leg type)</p> <p>EBV-положителен дифузен В-егроклетъчен лимфом</p> <p>Дифузен В-егроклетъчен лимфом, асоцииран с хронично възпаление</p> <p>Лимфоматоидна грануломатоза</p> <p>В-егроклетъчен лимфом с пренареждания на <i>IRF4</i></p> <p>Първичен медиастинален (тимусен) В-егроклетъчен лимфом</p> <p>Интравакуларен дифузен В-егроклетъчен лимфом</p> <p>ALK-положителен дифузен В-егроклетъчен лимфом</p> <p>Плазмобластен лимфом</p> <p>HHV8-положителен дифузен В-егроклетъчен лимфом (временна, условна категория)</p> <p>Първичен ефузионен лимфом</p> |
| <p><b>В-клетъчни лимфому с висока степен</b></p> <p>В-клетъчни лимфому с висока степен, с пренареждания на <i>MYC</i>, <i>BCL2</i> и/или <i>BCL6</i></p> <p>В-клетъчни лимфому с висока степен, неспецифицирани по друг начин</p>  |
| <p><b>В-клетъчни лимфому, некласифицируеми</b></p> <p>В-клетъчни лимфому, некласифицируеми, с характеристики между дифузен В-егроклетъчен лимфом и класически Ходжкинов лимфом</p>   |

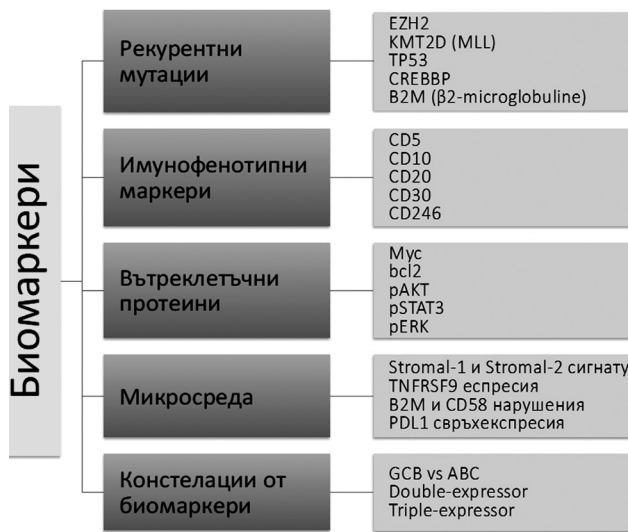
## Биомаркери за стратифициране на пациентите с ДВЕЛ

На молекулярно ниво, ДВЕЛ също е хетерогенна болест. Резултати от проучвания през последните години, основаващи се на генно-експресионното профилиране (GEP) и ДНК секвениране, показваха, че болестта може допълнително да бъде разделена на по-малки и по-хомогенни групи.<sup>4-6</sup> Това до голяма степен обяснява защо пациентите с ДВЕЛ реагират по различен начин на прилаганата терапия, но също така предоставят реална основа за разработване на нови специфични терапии, основаващи се на характеристиките на малигнения процес и търсенето на възпроизводим биомаркери, които да насочват терапевтичния процес в правилна ефективна насока при конкретния болен. Проучванията в тази насока показват трайна тенденция за развитие, инкорпорирайки достъпните и бързо развиващи се технологии.

Редица биомаркери както на генетично ниво, така и на белтъчно могат да бъдат използвани за по-прецизно диагностициране на пациентите с оглед оценка на новите терапевтични режими, съобразени с подлежащите молекулярни механизми, които поддържат туморния растеж и оцеляването на малигнените клетки (Фиг.1). Въпреки това, към настоящия момент все още не е идентифициран идеален биомаркер или констелация от биомаркери. От практическа гледна точка би било ефективно да се групират няколко биомаркера в една обособена категория, като напр. активиране на добре дефинирани онкогенни сигнални пътища.<sup>7</sup> Така стратегиите за лечение, базирани на определен биологичен механизъм, могат да бъдат оценени по степента на инхибиране на различни компоненти в този път, вместо да се насочват поотделно към всяка отделна генетична мутация. Вероятно една такава стратегия би позволила по-ефективно набиране на пациенти за конкретни клинични изпитания.

Таблица 2. Еволюция на проучванията при дифузен В-едроклетъчен лимфом с фокус върху биомаркери.

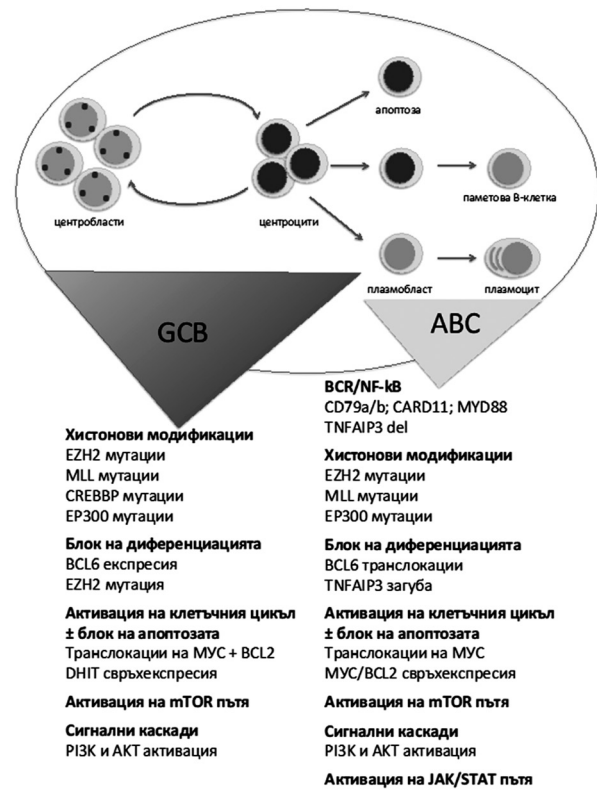
|        |  |
|--------|--|
| 2016   | Актуализирана класификация на лимфомите, СЗО 2016  |
| 2013-4 | Установяване на имунохистохимични (ИНС) биомаркери, свързани с онкогенните пътища, във фиксирани във формалин и включени в парафин материали (в т.ч. <i>MUC</i> , <i>BCL2</i> и др.) |
| 2006   | Дефиниране на прогностични групи на базата на клетъчен произход, определен чрез генна експресия във фиксирани във формалин и включени в парафин материали                            |
| 2002   | Установяване ролята на различни онкогенни пътища и избор на пациенти за допълнително секвениране от ново поколение (NGS) на базата на генно-експресионни профили (GEP)               |
| 2001   | Дениране на класификационна категория Дифузен В-едроклетъчен лимфом и субтипове, СЗО 2001  |
| 2000   | Дефиниране на прогностични групи на базата на определяне на клетъчен произход чрез GEP   |
| 2000   | Характеризиране на <i>MUM1</i> в нормални и малигнени лимфоидни клетки чрез имунохистохимия на фиксирани във формалин и включени в парафин материали                                 |
| 1997   | Клониране на <i>MUM1/IRF4</i> гена   |
| 1996   | Характеризиране на <i>BCL6</i> в нормални и малигнени лимфоидни клетки чрез имунохистохимия на фиксирани във формалин и включени в парафин материали                                 |
| 1993   | Клониране на <i>BCL6</i> ген   |
| 1974   | Съвременна хистологична класификация на лимфомите  |



Фигура 1. Потенциални биомаркери за стратифициране на пациентите с ДВЕЛ с оглед прилагане на нови терапевтични стратегии.

### Клетъчен произход при ДВЕЛ

Чрез прилагане на GEP са идентифицирани най-малко два основни молекулярни субтипа с различен клетъчен произход: субтип с GEP, съответстващ на В-клетки на герминативния център (GCB) и субтип с GEP, съответстващ на активирани В-клетки (ABC). Около 10-15% от случаите не могат да бъдат класифицирани по общоустановени критерии и остават като *неспецифицирани по друг начин* (NOS).<sup>8-13</sup> От генетична гледна точка обособените по генно-експресионен профил субтипове се различават по активация на различни молекулярни пътища, профили на генетични аберации и соматични мутации. Например случаите с GCB ДВЕЛ се характеризират с активация на PI3K-пътя и свръхекспресия на *bcl6*, докато при ABC ДВЕЛ е налице конститутивна активация на NFκB, която настъпва по различни механизми, в това число и активация на сигналния път на В-клетъчния рецептор (BCR) (Фиг.2). Влиянието на тези различия върху клинич-



Фигура 2. Основни засегнати онкогенни пътища при субтиповете ДВЕЛ.<sup>16</sup>

ния изход се потвърждава в редица проучвания<sup>14</sup>, голяма част от които демонстрират по-неблагоприятна прогноза при ABC ДВЕЛ в сравнение с GCB-субтип, независимо от включване на *rituximab* в терапевтичните схеми. С разработване на нови терапевтични подходи значимостта на разграничаване на субтиповете според *клетъчен произход* нараства и последната ревизирана версия на Класификацията на хематологичните неоплазии на Световната здравна организация от 2016 изисква дефиниране в клиничната практика на специфичен субтип според *клетъчния произход*. Съотношението между честота на GCB/ABC-типове показва вариации според географски фактори, средна възраст и използвана методология, но обичайно е около 60%/40%, като честотата на GCB-субтип е по-ниска в Азия.<sup>15</sup>



### Методични подходи за определяне на клетъчен произход при ДВЕЛ

Основополагащите проучвания върху клетъчния произход при ДВЕЛ използват изследване на GEP с висока производителност (high-through put GEP), което не е приложимо в рутинната лабораторно-диагностична практика по няколко причини: достъпност на технологията, необходимост от свеж материал от туморна тъкан, цена и др. Понастоящем практическо дефиниране на специфичен субтип ДВЕЛ според клетъчен произход може да се осъществи по два основни подхода: чрез имунохистохимично (ИХХ) маркиране на клетъчни маркери в определен алгоритъм или чрез GEP (високопроизводителен или нископроизводителен) на материали от туморни тъкани, фиксирани във формалин и включени в парафин (FFPE).

За осъществяване на генно-експресионно профилиране се използва РНК, изолирана от FFPE-туморна тъкан. Проучени са както техники с висока<sup>10,11</sup>, така и с ниска производителност.<sup>17-23</sup> Приложимостта и на двата подхода е потвърдена от мета-анализ на ретроспективни проучвания. В ход са две клинични проучвания във фаза III, в които се определя клетъчен произход посредством две платформи за GEP на FFPE-проби: *REMoDL-B* (NCT01324596), в което се използва платформа *Illumina DASL* (Illumina Inc., San Diego,

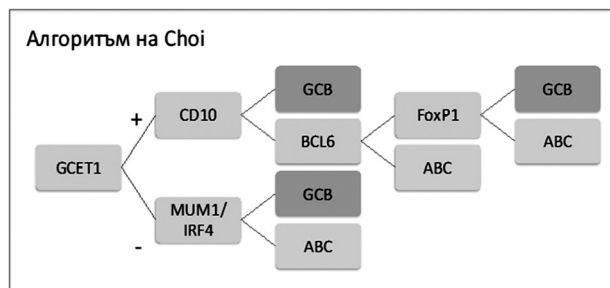
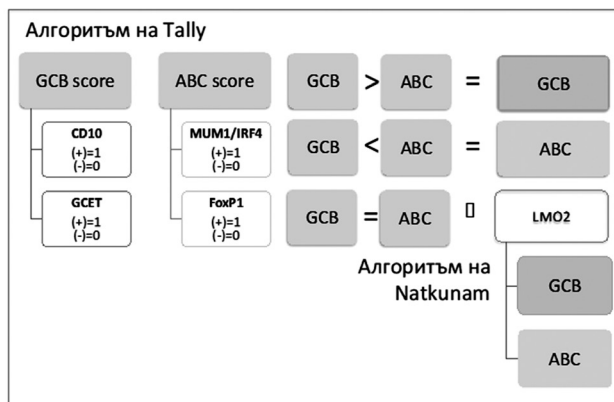
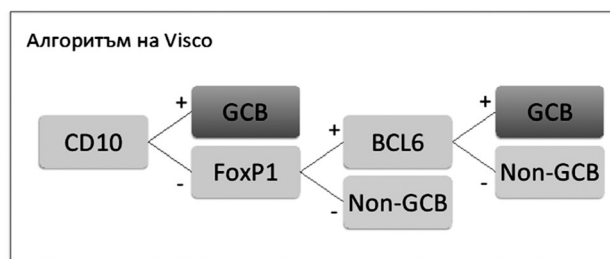
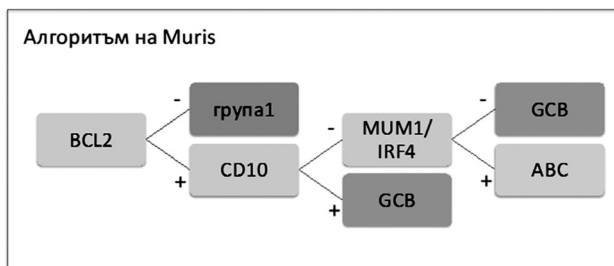
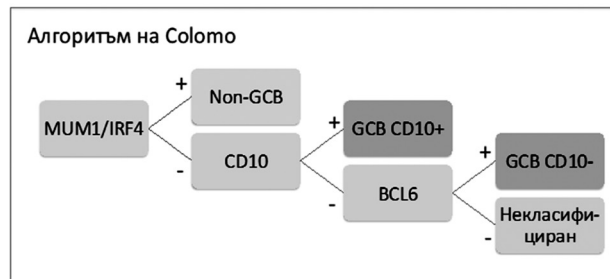
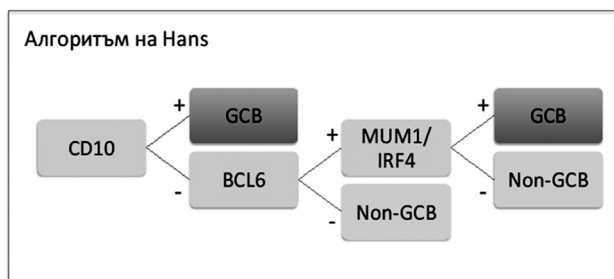
CA) и *ROBUST* (NCT02285062), в което се прилага платформа *Lymph2Cx*, базирана на *Nanostring nCounter* (NanoString Technologies, Seattle, USA).<sup>24</sup> Камо предимство на технологията може да се приеме и възможността за използване на комерсиални чипове, с което се осигурява точност на резултатите. Проблем представлява качеството на РНК, изолирана от FFPE-биопсични материали, но основно ограничение на GEP остава достъпността на технологията, която към момента е приложима предимно във високоспециализирани лаборатории. Проучена е възпроизводимост на изследванията чрез *Nanostring-based Lymph2Cx assay* с добри резултати както при последователни изследвания от няколко проби от един биопсичен материал, така и по отношение на междулабораторна възпроизводимост.<sup>20,23</sup>

В опит да се транслират резултати от GEP-субкласифициране в широкодостъпен подход, проложим в рутинната лабораторно-диагностична практика, са разработени няколко алгоритъма на изследване на панели от ИХХ-маркирани клетъчни антигени на материали от туморни тъкани, фиксирани във формалин и включени в парафин (FFPE). По-голямата част от алгоритмите са бинарни класификатори, т.е. предиктори от втори клас (Табл.3; Фиг. 3).

Основни предимства на ИХХ-алгоритмите са свързани с широка достъпност и приложимост на метода, който позволява

Таблица 3. Алгоритми за имунохистохимични панели за определяне на клетъчен произход.

| Автор   | Имунохистохимично определени антигени |
|---|---------------------------------------|
| Алгоритъм на <i>Colomo et al.</i> <sup>25</sup>                     | MUM1/IRF4, CD10, BCL6                 |
| Алгоритъм на <i>Muris et al.</i> <sup>26</sup>                      | CD10, MUM1/IRF4 + BCL2                |
| Алгоритъм на <i>Nutan et al.</i> <sup>27</sup>                      | CD10, BCL6, MUM1                      |
| Алгоритъм на <i>Meyer</i> (или 'Tally') <i>et al.</i> <sup>28</sup> | CD10, GCET1, MUM1/IRF4, FOXP1, LMO2   |
| Алгоритъм на <i>Hans et al.</i> <sup>29</sup>                       | CD10, BCL6, MUM1                      |
| Алгоритъм на <i>Choi et al.</i> <sup>30</sup>                       | GCET1, MUM1, CD10, BCL6, FOXP1        |
| Алгоритъм на <i>Natkunam et al.</i> <sup>31</sup>                   | LMO2                                  |
| Алгоритъм на <i>Visco et al.</i> <sup>32</sup>                      | CD10, FOXP1, BCL6                     |



Фигура 3. Основни имунохистохимични класификатори.

задоволителна възпроизводимост в рамките на отделен клиничен център. Подходът обаче страда от сериозни недостатъци, свързани с незадоволителна корелация между различните алгоритми и с ниска степен на междулабораторна възпроизводимост, потвърдена и от рандомизирано клинично проучване и метаанализ.<sup>33-37</sup>

Сравнителният анализ на ИХХ алгоритъм на Hans върху FFPE-проби и транскриптомния алгоритъм на Wright върху замразени проби, включени в клинично проучване LYSА LNН03-6В с пациенти, лекувани с R-СНОР,

показва висока степен на корелация между двата подхода (91%) и почти перфектна конкордантност според kappa test (0.81).<sup>38</sup> Клиничната интерпретация е пряко зависима от начина на формулиране на заключението от лабораторното изследване. В тази насока ИХХ алгоритми имат ясни предимства – резултатите са стандартизирани в значителна степен, ясно са определени алгоритмите и праговите стойности за всеки един от маркерите. Все още няма стандартизирана система за интерпретация и изготвяне на резултат от GEP-изследванията.

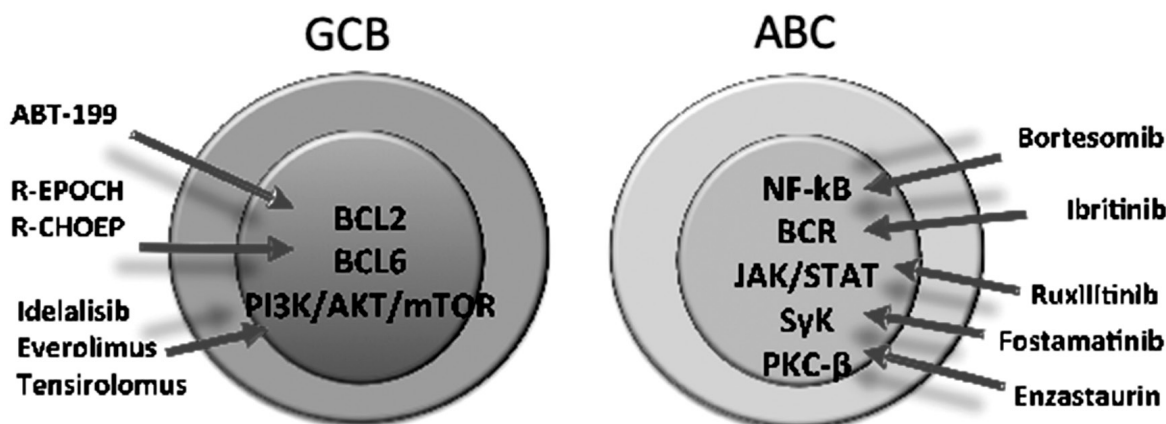
### Прогностична и предиктивна стойност на клетъчен произход

Клинични проучвания демонстрират значима и независима прогностична стойност на определянето на *клетъчен произход* при ДВЕЛ. Пациенти с GCB-фенотип имат висока обща преживяемост (ОП) в сравнение с пациенти с ABC-фенотип, независимо от методологичния подход – GEP или ИХХ. Експерти дават предимство на GEP-подходите поради изложените по-горе предимства. От друга страна, фаза III проспективното проучване *LYSA LNHO3-6B* потвърждава, че имунохистохимичното изследване при възрастни пациенти с ДВЕЛ, лекувани с R-CHOP, е полезно средство за предсказване на прогноза, когато се извършва под оптимизирани стандартизирани условия. Допълнително изследване на Bcl2-експресия може да помогне за идентифициране на пациенти, изложени на риск от рецидив, които потенциално биха могли да отговорят анти-Bcl2-терапии.<sup>37-39</sup>

Клинични проучвания доказват определянето на *клетъчен произход* и като

предиктивен фактор за избор на лечение. Ретроспективно проучване от Датския лимфобен регистър върху 245 млади пациенти с ДВЕЛ с висок риск, лекувани между 2004-2012, демонстрира, че лечение с R-CHOP дава значимо по-добри резултати за преживяемост без прогресия и ОП при пациенти с GCB-фенотип в сравнение с пациенти с не-GCB-фенотип. Тази зависимост не се наблюдава при пациенти, лекувани с R-CHOP. Ако резултатите бъдат потвърдени и в други проучвания, прилагането на R-CHOP следва да бъде ограничено до пациенти с GCB-фенотип.<sup>40</sup>

От друга страна, определянето на *клетъчен произход* е съществено при оценка на медикаменти, действието на които ангажира различни молекулярни механизми при GCB- и ABC-субтипа. BCL6 и EZH2 са обещаващи селективни таргети при GCB субтип.<sup>41,42</sup> Конститутивната активация на PI3K/AKT/mTOR пътя при GCB ДВЕЛ с делеция на *PTEN* е предпоставка за терапия с различни инхибитори, които понастоящем се разработват. Свъръхекспресията на антиапоптоичния протеин BCL2 може да се установи както при GCB, така



Фигура 4. Избор на терапевтични средства в зависимост от подлежащите молекулярни механизми при основните субтипове ДВЕЛ.

и при ABC субтипа, макар и по различни механизми. В GCB ДВЕЛ, свръхекспресията на BCL2 до голяма степен се дължи на t(14;18), докато при ABC ДВЕЛ преобладават други механизми, като транскрипция и амплификация.<sup>43</sup> Използването на BCL2 инхибитори е обещаваща стратегия, но вероятно с по-отчетлива полза при GCB поради наблюдаваното намаляване на BCL2-медираната експресия на NF-κB от приложения *rituximab* при ABC ДВЕЛ, лекувани с R-СНОР.<sup>44-45</sup>

Няколко фаза I/II проучвания демонстрират предимства на добавянето на *bortezomib*, *lenalidomide* и *ibrutinib* към R-СНОР изборително в ABC/не-GCB субтипа (NCT00057902, NCT01040871, Nowakowski, Leukemia 2011, NCT00849654, NCT01325701 и др.).

### Роля на MYC и BCL2

Данните показват, че комплексното клинично поведение при ДВЕЛ не може да бъде обяснено чрез субтипизиране на базата на клетъчния произход. Геномните проучвания предоставят масиви от информация за значително разнообразие от генетични и молекулярни промени при тази малигнена болест, а клиничното значение на тези находки все още не е добре разбрано. Налице е обаче сериозен обем данни за неблагоприятна прогностична стойност на свръхекспресията на BCL2 и MYC протеините, които са добре познати мощни биомаркери в лимфомната патология. Нарастващият интерес към тях се определя и от развитието на нови терапевтични молекули с потенциална клинична приложимост.

Свръхекспресия на MYC протеина, дължаща се на повишена регулация, може да бъде установена чрез ИХХ при 25-30% от пациентите с ДВЕЛ.<sup>46</sup> Лимфомите със свръхекспресия на MYC протеина се характеризират със силно активиран BCR сигнален

път и могат да представляват потенциален кандидат за лечение с BCR-инхибитори.<sup>47</sup> Интерес представлява фактът, че неблагоприятното прогностично въздействие на експресията на MYC протеин се наблюдава само при пациенти, които едновременно свръхекспресират и BCL2 протеин. Пациентите със свръхекспресия на двата протеина (MYC и BCL2) се определят като *двойно-експресиращи* (double expressors) и представляват ~25% от случаите на ДВЕЛ и имат значително по-лош изход от пациентите, които експресират само един или нито един протеин, с 5-годишна PFS в диапазон от 25% след R-СНОР.<sup>48,49</sup> Интересното е, че въпреки че MYC и BCL2 могат да играят роля както при GCB, така и при ABC подтипа, двойната експресия е по-честа в ABC подтипа и може до голяма степен да допринесе за по-неблагоприятния изход.<sup>50</sup>

В значително по-малка част от пациентите с ДВЕЛ (в до 5-15%) може да се установи наличието на хромозомни транслокации, deregулиращи MYC гена (8q24), по-често при GCB подтип.<sup>51</sup> Транслокацията, но не непременно наличието на допълнително копие на гена, е свързана с много лош клиничен изход.<sup>52</sup> Установява се подтип ДВЕЛ, който се характеризира с наличие на множество хромозомни транслокации, най-вече засягащи MYC, BCL2, BCL6 или CCND1 – така наречените *double-hit* или *triple-hit* лимфоми, които се срещат рядко – в до около 5% от пациентите. Най-често, в 87% от случаите, MYC транслокациите се съчетават с транслокации на BCL2; в 5% – с транслокации на BCL6 ген, а в 7% – с транслокации както на BCL6, така и на BCL2. Макар да имат обикновено GCB фенотип, *double-hit* или *triple-hit* лимфомите се отличават с много лоша прогноза, независимо дали са лекувани със стандартна или високодозова химиотерапия и са подходящи за трансплантация на стволови клетки.<sup>53</sup>



### Заклучение

Добавяне на *rituximab* към СНОР подобри граматично резултатите от лечението на пациенти с ДВЕЛ през последните години. Този режим остава и към момента стандартен протокол, но с незадоволителен ефект при пациенти с неуспех от стандартното лечение. Оптимизиране на терапевтичния отговор може да се постигне единствено чрез отчитане на молекулярната хетерогенност на болестта и прилагане на специфично насочени медикаменти и схеми в биологично обособените подгрупи. По тези причини ревизираната класификация на хемоепителните и лимфоидни неоплазии на Световната здравна организация от 2016 изисква отграничаване на GCB-срещу ABC/не-GCB-субтип при всеки ДВЕЛ при поставяне на диагноза по възможност с генно-експресионно профилиране; ако GEP-технологията не е достъпна, ИХХ се приема за приемлива алтернатива като използваният алгоритъм следва да бъде конкретно упоменат. В допълнение, към прецизиране клетъчния произход, по-задълбоченото изясняване на генетичната сложност на отделните лимфоми ще даде възможност за избор на оптимална терапевтична комбинация. Понастоящем пациентите с двойно-експресиращи MYC и BCL2 лимфоми или с двойни/тройни генетични нарушения представляват подгрупи с висок риск, изискващ проучване на алтернативни стратегии. Подобрената прогноза с откриване и валидиране на предиктивни биомаркери ще бъде от решаващо значение за провеждане на индивидуализирана, адаптирана към риска, терапия.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Stein H, Warnke R, Chan WC et al. WHO Classification of Tumours of Hematopoietic and Lymphoid Tissues. *Blood* 2011; 117(19): 5019-5032
2. Jaffe E, Campo E, Harris NL, et al. Introduction and overview of the classification of lymphoid neoplasms. In (eds) Swerdlow S, Campo E, Harris NL, et al. WHO Classification of tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissue, IARC, Lyon, 2017: 190-198
3. Swerdlow S, Campo E, Harris NL, et al. WHO Classification of tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissue, IARC, Lyon, 2017: 190-198
4. Campo E. Whole genome profiling and other high throughput technologies in lymphoid neoplasms – current contributions and future hopes. *Mod Pathol* 2013;26(1):97-110
5. Staudt LM. II. Therapy of DLBCL based on genomics. *Hematol Oncol* 2013;31(1):26-28
6. Slack GW, Gascoyne RD. Next-generation sequencing discoveries in lymphoma. *Adv Anat Pathol* 2013;20(2):110-116
7. Younes A, Berry DA. From drug discovery to biomarker-driven clinical trials in lymphoma. *Nat Rev Clin Oncol* 2012;9(11):643-653
8. Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 2000; 403:503-511
9. Monti S, Savage KJ, Kutok JL et al. Molecular profiling of diffuse large B-cell lymphoma identifies robust subtypes including one characterized by host inflammatory response. *Blood* 2005;105:1851-1861
10. Shipp MA, Ross KN, Tamayo P et al. Diffuse large B-cell lymphoma outcome prediction by gene-expression profiling and supervised machine learning. *Nat Med* 2002;8:68-74
11. Lenz G, Wright G, Dave SS, et al. Stromal gene signatures in large-B-cell lymphomas. *N Engl J Med* 2008; 359: 2313-2323
12. Rosenwald A, Wright G, Chan WC et al. The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med* 2002; 346: 1937-1947
13. Wright G, Tan B, Rosenwald A, et al. A gene expression-based method to diagnose clinically distinct subgroups of diffuse large B cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:9991-9996
14. Balagué O, Campo E. Refining the Prognostic Impact of the Cell Of Origin in Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Ann Oncol* 2017; [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2836845128\(5\):918-920](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2836845128(5):918-920)



15. Stein H, Gascoyne R, Chan WC, et al. Diffuse large B-cell lymphoma, not otherwise specified. In SH Swerdlow, E Campo, NL Harris et al. (eds), WHO Classification of Tumours of Hematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon: IARC 2016 [in press]
16. Sehn LH, Gascoyne RD. Diffuse large B-cell lymphoma: optimizing outcome in the context of clinical and biologic heterogeneity. *Blood* 2015;125(1):22-32
17. Collie AM, Nölling J, Divakar KM et al. Molecular subtype classification of formalin-fixed, paraffin-embedded diffuse large B-cell lymphoma samples on the ICEPlexVR system. *Br J Haematol* 2014;167:281-285
18. Masqué-Soler N, Szczepanowski M, Kohler CW et al. Molecular classification of mature aggressive B-cell lymphoma using digital multiplexed gene expression on formalin-fixed paraffin-embedded biopsy specimens. *Blood* 2013;122:1985-1986
19. Roberts RA, Sabalos CM, LeBlanc ML et al. Quantitative nuclease protection assay in paraffin-embedded tissue replicates prognostic microarray gene expression in diffuse large-B-cell lymphoma. *Lab Invest* 2007;87:979-997
20. Scott DW, Wright GW, Williams PM et al. Determining cell-of-origin subtypes of diffuse large B-cell lymphoma using gene expression in formalin-fixed paraffin-embedded tissue. *Blood* 2014;123:1214-1217
21. Veldman-Jones MH, Lai Z, Wappett M et al. Reproducible, quantitative, and flexible molecular subtyping of clinical DLBCL samples using the NanoString Counter System. *Clin Cancer Res* 2015;21:2367-2378
22. Xue X, Zeng N, Gao Z, Du MQ. Diffuse large B-cell lymphoma: sub-classification by massive parallel quantitative RT-PCR. *Lab Invest* 2015; 95:113-120
23. Scott DW, Mottok A, Ennishi D, et al. Prognostic significance of diffuse large B-cell lymphoma cell of origin determined by digital gene expression in formalin-fixed paraffin-embedded tissue biopsies. *J Clin Oncol* 2015; 33: 2848-2856
24. Scott DW. Cell-of-origin in diffuse large B-cell lymphoma: are the assays ready for the clinic? *Am Soc ClinOncol Educ Book* 2015; 35: e458-e466
25. Colomo L, Lopez-Guillermo A, Perales M, et al. Clinical impact of the differentiation profile assessed by immunophenotyping in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 2003; 101:78-84
26. Muris JJ, Meijer CJ, Vos W, et al. Immunohistochemical profiling based on Bcl-2, CD10 and MUM1 expression improves risk stratification in patients with primary nodal diffuse large B cell lymphoma. *J Pathol* 2006;208:714-723
27. Nyman H, Adde M, Karjalainen-Lindsberg ML, et al. Prognostic impact of immunohistochemically defined germinal center phenotype in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with immunochemotherapy. *Blood* 2007;109:4930-4935
28. Meyer PN, Fu K, Greiner TC, et al. Immunohistochemical methods for predicting cell of origin and survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab. *J Clin Oncol* 2011;29:200-207
29. Hans CP, Weisenburger DD, Greiner TC, et al. Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood* 2004;103:275-282
30. Choi WW, Weisenburger DD, Greiner TC, et al. A new immunostain algorithm classifies diffuse large B-cell lymphoma into molecular subtypes with high accuracy. *Clin Cancer Res* 2009; 15: 5494-5502
31. Natkunam Y, Farinha P, Hsi ED, et al. LMO2 protein expression predicts survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with anthracycline-based chemotherapy with and without rituximab. *J Clin Oncol* 2008;26:447-454
32. Visco C, Li Y, Xu-Monette ZY, et al. Comprehensive gene expression profiling and immunohistochemical studies support application of immunophenotypic algorithm for molecular subtype classification in diffuse large B-cell lymphoma: a report from the International DLBCL Rituximab-CHOP Consortium Program Study. *Leukemia* 2012;26:2103-2113
33. de Jong D, Rosenwald A, Chhanabhai M, et al. Immunohistochemical prognostic markers in diffuse large B-cell lymphoma: validation of tissue microarray as a prerequisite for broad clinical applications – a study from the Lunenburg Lymphoma Biomarker Consortium. *J Clin Oncol* 2007;25:805-812
34. Coutinho R, Clear AJ, Owen A, et al. Poor concordance among nine immunohistochemistry classifiers of cell-of-origin for diffuse large B-cell lymphoma: implications for therapeutic strategies. *Clin Cancer Res* 2013;19:6686-6695

## ПРЕДИКТИВНИ ДЕФИНИЦИИ ПРИ ДИФУЗЕН В-ЕДРОКЛАЕТЪЧЕН ЛИМФОМ

---

35. Gutierrez-Garcia G, Cardesa-Salzmann T, Climent F, et al. Gene-expression profiling and not immunophenotypic algorithms predicts prognosis in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with immunochemotherapy. *Blood* 2011; 117:4836-4843
36. Ott G, Ziepert M, Klapper W, et al. Immunoblastic morphology but not the immunohistochemical GCB/nonGCB classifier predicts outcome in diffuse large B-cell lymphoma in the RICOVER-60 trial of the DSHNHL. *Blood* 2010;116:4916-4925
37. Read JA, Koff JL, Nastoupil LJ, et al. Evaluating cell-of-origin subtype methods for predicting diffuse large B-cell lymphoma survival: a meta-analysis of gene expression profiling and immunohistochemistry algorithms. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 2014; 14: 460-467.e2
38. Petrella T, Copie-Bergman C, Brière J, et al. BCL2 expression but not MYC and BCL2 coexpression predicts survival in elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma independently of cell of origin in the phase 3 LNH03-6B trial. *Ann Oncol* 2017;28(5):1042-1049
39. Thieblemont C, Briere J, Mounier N, et al. The germinal center/activated B-cell subclassification has a prognostic impact for response to salvage therapy in relapsed/refractory diffuse large B-cell lymphoma: a bio-CORAL study. *J Clin Oncol* 2011;29(31):4079-4087
40. Gang AO, Pedersen MO, Knudsen H, et al. Cell of origin predicts outcome to treatment with etoposide-containing chemotherapy in young patients with high-risk diffuse large B-cell lymphoma. *Leuk Lymphoma* 2015;56(7):2039-2046
41. Cerchiatti LC, Ghetu AF, Zhu X, et al. A small-molecule inhibitor of BCL6 kills DLBCL cells in vitro and in vivo. *Cancer Cell* 2010;17(4):400-411
42. McCabe MT, Ott HM, Ganji G, et al. EZH2 inhibition as a therapeutic strategy for lymphoma with EZH2-activating mutations. *Nature* 2012;492(7427):108-112
43. Lenz G, Wright GW, Emre NC, et al. Molecular subtypes of diffuse large B-cell lymphoma arise by distinct genetic pathways. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105(36):13520-13525
44. Iqbal J, Meyer PN, Smith LM, et al. BCL2 predicts survival in germinal center B-cell-like diffuse large B-cell lymphoma treated with CHOP-like therapy and rituximab. *Clin Cancer Res* 2011;17(24):7785-7795
45. Souers AJ, Levenson JD, Boghaert ER, et al. ABT-199, a potent and selective BCL-2 inhibitor, achieves antitumor activity while sparing platelets. *Nat Med* 2013;19(2):202-208
46. Johnson NA, Slack GW, Savage KJ, et al. Concurrent expression of MYC and BCL2 in diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab plus cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone. *J Clin Oncol* 2012;30(28):3452-3459
47. Wang WG, Jiang XN, Liu ZB, et al. MYC Protein-positive Diffuse Large B-Cell Lymphoma Features an Activated B-Cell Receptor Signal Pathway. *Am J Surg Pathol* 2017;41(4):541-549
48. Staiger AM, Ziepert M, Horn H, et al. Clinical Impact of the Cell-of-Origin Classification and the MYC/ BCL2 Dual Expresser Status in Diffuse Large B-Cell Lymphoma Treated Within Prospective Clinical Trials of the German High-Grade Non-Hodgkin's Lymphoma Study Group. *J Clin Oncol* 2017;35(22):2515-2526
49. Johnson NA, Slack GW, Savage KJ, et al. Concurrent expression of MYC and BCL2 in diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab plus cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone. *J Clin Oncol* 2012;30(28):3452-3459
50. Hu S, Xu-Monette ZY, Tzankov A, et al. MYC/BCL2 protein coexpression contributes to the inferior survival of activated B-cell subtype of diffuse large B-cell lymphoma and demonstrates high-risk gene expression signatures: a report from The International DLBCL Rituximab-CHOP Consortium Program. *Blood* 2013;121(20):4021-4031
51. Copie-Bergman C, Cuillière-Dartigues P, Baia M, et al. MYC-IG rearrangements are negative predictors of survival in DLBCL patients treated with immunochemotherapy: a GELA/LYSA study. *Blood* 2015;126(22):2466-2474
52. Testoni M, Zucca E, Young KH, Bertoni F. Genetic lesions in diffuse large B-cell lymphomas. *Ann Oncol* 2015;26(6):1069-1080
53. Friedberg JW. How I treat double-hit lymphoma. *Blood* 2017;130(5):590-596



---

# **ПЕТ/КТ-ПРЕДИКЦИЯ В ТЕРАПЕВТИЧНИЯ МОНИТОРИНГ НА ЛИМФОМИ**

---

**доц. д-р Павел Бочев, дм<sup>1</sup>**  
**проф. д-р Ирена Костадинова, дмн<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Българско дружество по нуклеарна медицина

<sup>2</sup>Клиника по нуклеарна медицина, *Аджибадем Сити Клиник*, София





# ПЕТ/КТ-ПРЕДИКЦИЯ В ТЕРАПЕВТИЧНИЯ МОНИТОРИНГ НА ЛИМФОМИ

*доц. д-р Павел Бочев, дм<sup>1</sup>*

*проф. д-р Ирина Костадинова, дмн<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>Българско дружество по нуклеарна медицина

<sup>2</sup>Клиника по нуклеарна медицина, Аджибадем Сити Клиник, София

## ОБЗОР

*В статията се дискутира мястото на позитронно-емисионната томография с компютър томография (ПЕТ/КТ) в стадирането на лимфомите, както и за ранно определяне на отговора към провежданото лечение. Обсъжда се ролята на ПЕТ/КТ като предиктивен маркер за индивидуализиране на лечението с цел адаптиране на терапевтичния режим – ескалация или деескалация на терапията според резултатите от изследването.*

## Увод

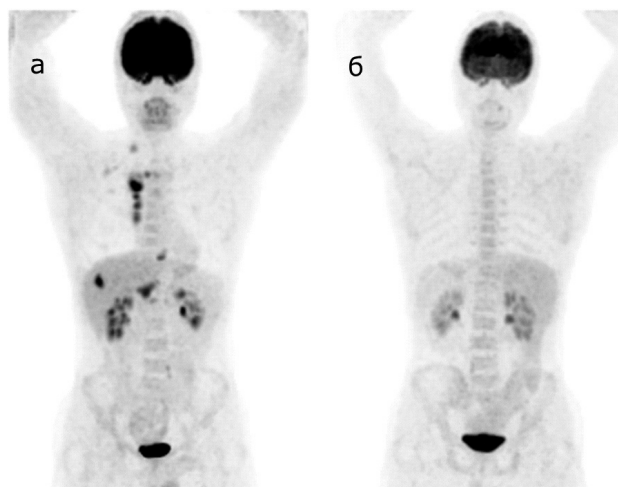
За разлика от лечението на солидни тумори, при лимфомите има по-специфична терапевтична стратегия, базираща се на системна терапия/химиотерапия с възможност за провеждане и на лъчелечение. Основният терапевтичен метод при солидни тумори – хирургичният рядко влиза в съображение при тези хемопатии. Провежданото лечение е свързано с лекарствена и лъчева токсичност и предвид сравнително дългата обща преживяемост при повечето субтипове лимфоми, от съществено значение е отчитане и при възможност намаляване както на ранната, така и на късната токсичност. Докато при неходжкиновите лимфоми на преден план е идентифицирането на пациенти, при които е необходима интензификация на лечението, то при лимфома на Hodgkin (ЛХ) се търси

баланс между постигане на ремисия и негативните ефекти от провежданото лечение, т.е да се отсеят както кандидатите за интензификация на лечение, така и тези, при които то може да не бъде проведено в максимален обем. По тези причини се търсят маркери, които рано в хода на системното лечение да разграничат пациентите с различна степен и посока на терапевтичен отговор. Като най-силен предиктор на терапевтичния отговор, поне при ЛХ и дифузния В едроклетъчен лимфом (ДВЕЛ), се утвърди ранната образна оценка с позитронно-емисионна томография с компютър томография с <sup>18</sup>F-FDG или флуородезоксиглюкоза (FDG ПЕТ/КТ), най-често след 2 курс системна терапия; това позволява диференциране на ранен етап на пациентите, които отговарят на провежданото лечение от тези, при които няма отговор и в комбинация с прете-

рапевтичната стратификация на риска дава възможност за адаптиране на лечебната тактика съобразно отговора (ПЕТ-адаптирани стратегии).

### FDG ПЕТ/КТ като предиктор на терапевтичния ефект при ЛХ

Диагнозата на лимфом на *Hodgkin* (ЛХ) или болест на Ходжкин се поставя на база на клинично изследване, лабораторни и специфични хематологични тестове и костномозъчна биопсия; образните методи обаче имат решаваща роля при определяне на стадий, визуализация на рецидиви, оценка на ефект от лечение и определяне на прогноза. Ултразвукова, компютър-томографска (КТ) и магнитнорезонансна (МРТ) диагностика се прилагат за оценка на обхванатите от болестта лимфни възли, както и за изобразяване на екстранодалното разпространение – черен дроб, слезка, костен мозък и бял дроб. Ролята на ПЕТ/КТ е не само при определяне на стадий на болестта, но и при оценка на виталността на тумора чрез количествено измерване на степента на натрупване на маркирана глюкоза ( $^{18}\text{F}$ -FDG) със стандартизираното отношение на натрупване – SUVmax. Интензивността на натрупване на радиомаркера е в пряка зависимост от пролиферативната активност на болестта.<sup>1</sup> Напоследък все повече се утвърждава ролята на ПЕТ/КТ и като предиктивен маркер за индивидуализиране на лечението с цел адаптиране на терапевтичния режим според резултатите от изследването. Така се постига намаляване на токсичността от приложената химиотерапия при благоприятен терапевтичен ефект и се постига по-добра прогноза при пациенти с недостатъчен ефект чрез промяна/интензифициране на лечението.<sup>2</sup> При оценка на терапевтичния отговор е много важно да се



**Фигура 1.** Оценка на терапевтичен отговор при пациент с лимфом а) нодално, костномозъчно и чернодробно ангажиране – клиничен стадий IV. б) iПЕТ – пълен терапевтичен отговор

определително степента на повлияване по време на и след химиотерапия. Необходимо е и ясно разграничаване на все още витален тумор от посттерапевтична съединителна тъкан с оглед определяне на по-нататъшната терапевтична стратегия, особено при пациенти без повлияване, при които е необходимо тя да бъде променена за постигане на по-добра прогноза (Фиг.1).<sup>3</sup>

### Доказателства за предиктивни влияния

В препоръките на NCCN и ESMO методът е утвърден като стандарт за оценка на терапевтичен отговор при ЛХ с висока предиктивна и прогностична стойност.<sup>4,5</sup> Основна цел е постигане на пълно терапевтично повлияване и излекуване с отлична прогноза. Пациенти без достатъчен терапевтичен отговор се подлагат на допълнително по-радикално лечение, при което се оптимизира балансът между полза и токсичност.<sup>6</sup> Изискването е ПЕТ/КТ да се проведе поне 3 седмици след приключване на химиотерапия и 12 седмици след лъчелечение, за да се избегне получаване на фалшиво-позитивен резултат.

## ПЕТ/КТ-ПРЕДИКЦИЯ В ТЕРАПЕВТИЧНИЯ МОНИТОРИНГ НА ЛИМФОМИ

тивен или негативен резултат. С междинна ПЕТ/КТ се прогнозира ефекта от лечение (предиктивна стойност), а с този, проведен след приключване на лечението – прогноза-та на преживяемост без прогресия (ПБП) и обща преживяемост (ОП).<sup>6</sup>

Много съществен момент в ранната оценка на терапевтичния отговор са критериите за отговор. Оценката на терапевтичния отговор при лимфоми еволюира значително през последните години – от началните препоръки, базирани изцяло на КТ<sup>7</sup> се премина през първично инкорпориране на FDG ПЕТ в т.нар. *International harmonization Project* (ИП) критерии<sup>8-9</sup>, приемащи медуастиналния кръвен пул като референтна активност (плюс някои КТ критерии), за да се достигне до т.нар. *Deauville* критерии<sup>10</sup> (пет-степенна скала, с референция – чернодробната активност, Табл. 1), които бяха допълнително въведени и като цялостна оценка при лимфоми въобще в т.нар. *Lugano* класификация<sup>11</sup>, която за момента се приема за стандарт в оценката на терапевтичния отговор при лимфоми. Следва обаче да се вземе предвид, че оценката, макар и опростена, изисква специализирана подготовка на разчитащия в областта на лимфомите. Полуколичествена оценка по стандартизираното отношение на натрупване (SUV) и други показатели, специално при ЛХ, на този

етап не се препоръчва, въпреки че съществуват софтуерни пакети, подпомагащи визуалната оценка на база полуколичествена оценка. Особен и все още недобре дефиниран момент е оценката на терапевтичния отговор при пациенти, провеждащи имунотерапия, при които бе предложена частична модификация на класическите *Lugano* критерии.<sup>23</sup>

Методът на междинна ПЕТ/КТ (iПЕТ) е с висока предиктивна и прогностична стойности след приключване на първа линия химиотерапия, като могат да се предвидят както ефекта от лечение, така и продължителността на ПБП и ОП с чувствителност и специфичност на изследването за ранен терапевтичен отговор 79% и 92%, а за късен – 84% и 90%.<sup>12</sup> Базовото изследване преди започване на терапия е полезно за избягване на фалшиво позитивни резултати. Висока е негативната предиктивна стойност на междинната ПЕТ/КТ (95%), поради което при отрицателен скан не е необходимо да се провежда изследване след завършване на терапия.<sup>13</sup> Намалената метаболитна активност в процеса на проследяване е добър предиктор за благоприятен терапевтичен отговор.<sup>14</sup> Пациенти с отрицателен скан имат двегодишна ПБП 95%, а тези с позитивен скан рецидивират с чувствителност 91%; негативната предиктивна стой-

Таблица 1. *Deauville* критерии за оценка на ЛХ при предикция на терапевтичния отговор.

| <i>Deauville score</i> | Визуална оценка на PET  |
|------------------------|---|
| 1                      | Без активност   |
| 2                      | Активност ≤ медуастиnum   |
| 3                      | Активност ≥ медуастиnum ≤ черен гроб                            |
| 4                      | Активност, умерено повишена над чернодробната                   |
| 5                      | Активност, силно повишена над чернодробната или нови лезии      |
| X                      | Новопоявила се активност в зони, необичайни за ангажиране от БХ |

ност на междинното изследване е 95%, а за изследване след приключване на терапията е близка до 100%.<sup>15</sup> С друго проучване също се доказва ролята на междинен скан, проведен след два курса химиотерапия<sup>16</sup>, за тригодишната ПБП (83%): при позитивна ПЕТ/КТ преживяемостта без прогресия е 28%, а при отрицателна – 95%. Трябва да се има предвид и възможност за фалшиво-позитивен резултат поради натрупване на <sup>18</sup>F-FDG във възпалителни огнища, вкл. и постлъчелатерапевтични (позитивна предиктивна стойност – 62-94% за междинно изследване и 25-100% след терапия)<sup>17-18</sup>; уместно е биопсично верифициране на находката. Не е нужно понататъшно проследяване на пациенти със стадий I и II и отрицателен резултат от ПЕТ/КТ, но е необходимо при проследяване на стадий III и IV, независимо от евентуален негативен скан при ремисия.

В съществуващите към момента препоръки има обаче известна разлика в приложението и интерпретирането на iPET като метод за ранна предикция. Докато последните ревизии на препоръките на NCCN фаворизират FDG ПЕТ/КТ като метод на първи диагностичен избор, за стадиране и оценка на терапевтичния отговор и са почти изцяло базирани на данните от проучвания с ПЕТ-адаптирани стратегии (промяна в терапевтичния план на база междинна ПЕТ/КТ оценка в посока ескалация/деескалация или продължаване на терапията в стандартен обем)<sup>4</sup>, то текущите препоръки на ESMO са значително по-консервативни.<sup>5</sup> Последните обаче са официално ревизирани през 2014 като повечето рандомизирани и големи проспективни проучвания, заложили в препоръките на NCCN, са отчетени като резултати след 2015 г. В по-нова публикация на ESMO от 2016, касаеща предиктивните маркери при неходжкинови лимфоми, се оспорва ролята на iPET като безусловен предиктор и методът не се препоръчва за

модификация на терапевтичните режими.<sup>19</sup> Учудващо е, че двата водещи експертни борда формулират крайно противоречащи си препоръки, които са базирани на резултати от приблизително едни и същи клинични проучвания. Следва да се отбележи, че текущите препоръки за междинна оценка с iPET и адаптиране на терапевтичната стратегия на тази база касаят основно пациенти с избор на първа линия химиотерапия по протокол ABVD с оценка след втори курс ХТ (iPET2). За разлика от оценката при провеждане на начално лечение по протокол ABVD, при алтернативните протоколи от първа линия, както при начален ЛХ с благоприятна прогноза, така и при авансиран болест или начален ЛХ с неблагоприятна прогноза, каквито са режимите *Stanford V* и *BEACOPP*, „ранната оценка“ е всъщност оценка на лечение след приключване на ХТ и методът се използва за селектор на кандидати за лъчелечение и дефиниране на пациентите с рефрактерна болест.<sup>20, 21</sup>

Напоследък са налице проучвания и за бъдещо приложение на нова високочувствителна образна технология (ПЕТ/МРТ)<sup>22</sup>, нови програми (метаболичен туморен обем като алтернативен биомаркер за обективен терапевтичен отговор), както и на по-нови радиофармацевтици за пролиферативна активност на тумора (<sup>18</sup>F-FLT) с възможност за диференциране на туморна тъкан от съпътстващи възпалителни процеси. Предстои обобщение на тези резултати в по-масабни проучвания.

### Предиктивна стойност на FDG ПЕТ/КТ при неходжкинови лимфоми

Докато при ЛХ ролята на FDG ПЕТ/КТ като предиктор на терапевтичния отговор може да се счита за утвърдена, при неходжкиновите лимфоми предикцията на от-



говора не е така праволинейна и е принципно полифакторно зависима. Голям интерес представлява приложението на FDG ПЕТ/КТ при пациенти с ДВЕЛ, който е най-честият НХЛ при възрастни. Ролята на FDG ПЕТ/КТ като прогностичен маркер след приключване на лечение (end of treatment/ЕОТ) е много категорична и негативният скан гарантира значително по-висока преживяемост и по-дълга ПБП. За разлика от прогностичната роля на метода като ЕОТ ПЕТ/КТ, предиктивната му стойност като маркер за ранна преценка на терапевтичния отговор (iПЕТ) е дискутабилна и въпреки по-добрите корелации с ПБП и ОП, на този етап модификации на системното лечение на база iПЕТ не се препоръчват.<sup>23</sup> Основен недостатък в случая е подценяването на постигнатия терапевтичен отговор. Методът обаче може да се използва надеждно като междинна оценка и като селектор за провеждане на лъчелечение, както и за дефиниране на рефрактерна болест.

Още по-несигурна изглежда ранната предикция при другите типове НХЛ. Спецификите на отделните субтипове обикновено позиционират изследването след приключване на предвидения обем ХТ, но вече не като предиктивен, а като прогностичен маркер. Оценката на терапевтичен отговор при неходжкинови лимфоми се извършва по *Lugano* критерийте, които включват и оценка чрез КТ с контраст в случаите на лимфоми с ниска начална утилизация на FDG. Следва обаче да се подчертае, че при FDG позитивни лимфоми приоритетна е метаболитната оценка. Тъй като при повечето НХЛ, извън ДВЕЛ, утилизацията на FDG е вариабилна и най-общо непредвидима, оценка на терапевтичен отговор следва да се прави само при пациенти, начално стадиранни с FDG ПЕТ/КТ и при които се отчита натрупване на радиофармацевтика.

### Заклучение

Към момента FDG ПЕТ/КТ при ЛХ и донякъде при ДВЕЛ се приема за най-мощният предиктор на терапевтичния отговор към системна химиотерапия. Резултатите от ранната оценка (iПЕТ) корелират в много голяма степен с изхода от лечението, времето до прогресия и преживяемостта. Вземането на решения за промяна в терапевтичната стратегия само на база резултат от ранната междинна оценка обаче е все още дискутабилно и нееднозначно тълкувано от различните експертни бордове. В този смисъл, приложението на т.нар ПЕТ-адаптирани стратегии (модификация на лечението на база iПЕТ) следва да се извършва внимателно и след цялостна преценка на конкретния клиничен сценарий.

### ЛИТЕРАТУРА

---

1. Elstrom R, Guan L, Baker G, et al. Utility of FDG PET/CT in lymphoma by WHO classification. *Blood* 2003; 101(10): 3875-3876
2. Meignan M, Itti E, Gallamini A, Younes A. FDG PET/CT imaging as a biomarker in lymphoma. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2015;42(4):623-633
3. Juergens K, Hermann S. Malignant lymphoma. In: PET and PET-CT in hybrid imaging, Thieme, New York, 2010; 177-200
4. National Comprehensive Cancer Network. Hodgkin lymphoma. Version 1.2017. NCCN. Available at: [www.nccn.org/professionals/physician\\_gls/pdf/hodgkins.pdf](http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/hodgkins.pdf).
5. Eichenauer D, Engert A, André M, et al. Hodgkin's lymphoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2014; 25 (3):iii70-75
6. Geus-Oei L, Oyen W. Predictive and prognostic value of FDG/PET. *Cancer Imaging* 2008; 8(1): 70-80
7. Cheson BD, Horning SJ, Coiffier B, et al. Report of an International Workshop to standardize response criteria for non-Hodgkin's lymphomas. *J Clin Oncol* 1999; 17:1244-1253
8. Cheson B, Pfistner B, Juweid ME, et al. Revised Response Criteria for Malignant Lymphoma. *J Clin Oncol* 2007; 25(5):579-586



9. Juweid ME, Stroobants S, Hoekstra OS, et al. Use of positron emission tomography for response assessment of lymphoma: Consensus recommendations of the Imaging Subcommittee of the International Harmonization Project in Lymphoma. *J Clin Oncol* 2007; 25(5) 571-578
10. Meignan M, Gallamini A, Meignan M, et al. Report on the first international workshop on interim-PET scan in lymphoma. *Leuk lymphoma* 2009;50:1257-1260
11. Cheson BD, Fisher RI, Barrington SF, et al. Recommendations for initial evaluation, staging, and response assessment of Hodgkin and non-Hodgkin lymphoma: the Lugano classification. *J Clin Oncol* 2014;32:3059-3067
12. Lin EC, Alavi A. Lymphoma. In: PET and PET-CT. A clinical guide. Thieme, 2009; 173-184
13. Strobel K, Schaefer NG, Renner C, et al. Cost-effective therapy assessment in lymphoma patients, using PET-CT: is an end of treatment exam necessary in all patients? *Ann Oncol* 2007; 18 (4): 721-728
14. Reske S. PET and restaging of malignant lymphoma including residual masses and relapse. *Eur JNMMI* 2003; 30(1): S89-96
15. Juergens K, Hermann S. Malignant lymphoma. In: PET-CT hybrid imaging, ed. by Schober O, W. Heindel. Thieme, New York, 2010, 177-190
16. Gallamini A, Barrington SF, Biggi A, et al. The predictive role of interim positron emission tomography for Hodgkin lymphoma treatment outcome is confirmed using the interpretation criteria of the Deauville five-point scale. *Haematologica* 2014; 99:1107-1113
17. Kasamon Y, Jones RJ, Wahl RL. Integrated PET-CT in risk adapted therapy in lymphoma. *JNM* 2007; 48(1): S19-27
18. Kostakoglu L, Evens A. FDG-PET imaging for Hodgkin lymphoma: current use and future applications. *Clin Adv Hematol Oncol* 2014; 12 (1): 35-41
19. Ladetto M, Buske C, Hutchings M, et al. ESMO consensus conference on malignant lymphoma: general perspectives and recommendations for prognostic tools in mature B-cell lymphomas and chronic lymphocytic leukaemia. *Ann Oncol* 2016; 27: 2149-2160
20. Advani RH, Hoppe RT, Baer D, et al. Efficacy of abbreviated Stanford V chemotherapy and involved-field radiotherapy in early-stage Hodgkin lymphoma: mature results of the G4 trial. *Ann Oncol* 2013;24:1044-1048
21. Engert A, Haverkamp H, Cobe C, et al. Reduced-intensity chemotherapy and PET-guided radiotherapy in patients with advanced stage Hodgkin's lymphoma (HD15 trial): a randomised, open-label, phase 3 non-inferiority trial. *Lancet* 2012; 379(9828):1791-1799
22. Carr R, Fanti S, Paez D, et al. Prospective international cohort study demonstrates inability of interim PET to predict treatment failure in diffuse large B-cell lymphoma. *J Nucl Med* 2014;55:1936-1944
23. Cheson B, Ansell S, Schwartz L, et al. Refinement of the Lugano classification response criteria for lymphoma in the era of immunomodulatory therapy. *Blood* 2016; 128:2489-2496





# CD20-МОДЕЛИРАНЕ НА НАЧАЛНА И СЛЕДРЕЦИДИВНА ТЕРАПИЯ ПРИ ЛИМФОИДНИ НЕОПЛАЗИИ

*проф. д-р Маргарита Генова, дм*

СБАЛХЗ, София

## ОБЗОР

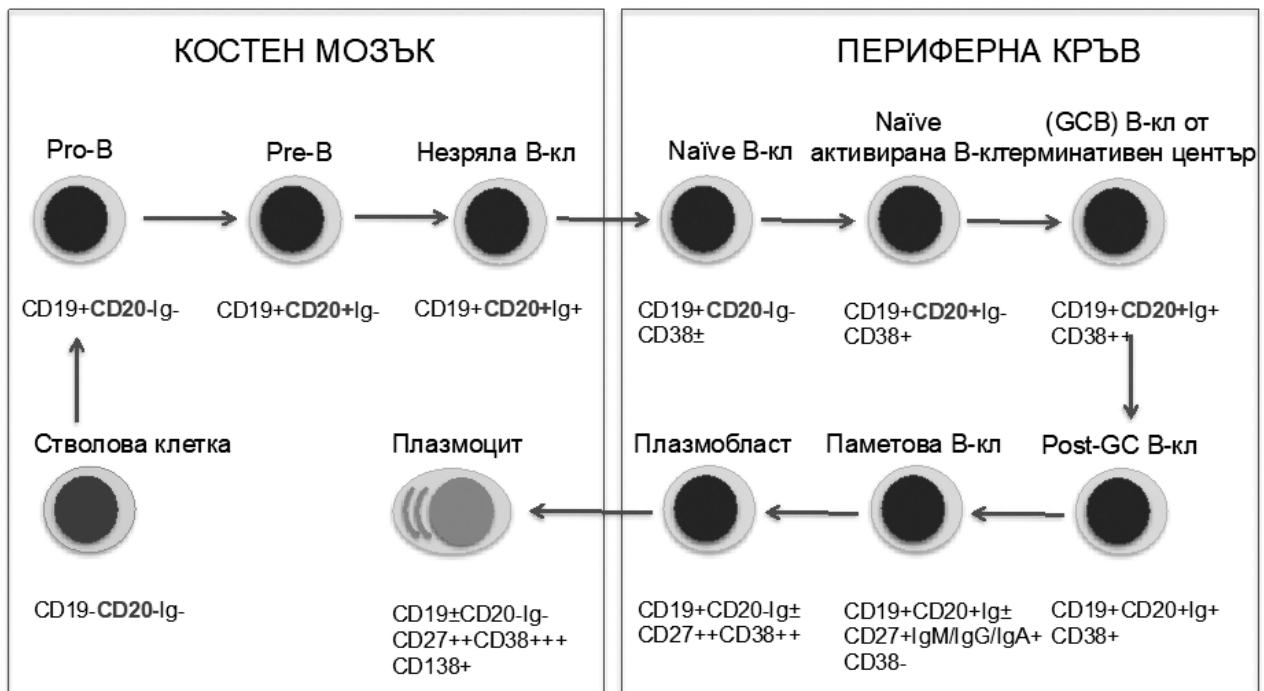
*CD20 е повърхностен антиген, който се експресира в определени стадии на диференциация на В-клетките, както и в значителна част от В-клетъчните неоплазии, което го прави подходящ таргет за терапевтично приложение на специфично насочени антители. Анти-CD20 моноклоналните антители се доказва като ефективна стратегия за лечение на хематологични злокачествени болести като неходжкинови лимфоми и хронична лимфоцитна левкемия. Първоначалният успех с rituximab насърчи създаването и развитието на нови поколения антители с повишен афинитет или подобрени антитуморни свойства. Имунотипното изследване е задължителен компонент от диагностичния процес на лимфоидните неоплазии и установяването на CD20 е основна предпоставка за включване на анти-CD20-моноклонално антитяло към химиотерапевтичния режим. Успешното прилагане на CD20 насочените терапевтици се основава както на теоретичните познания за имунологичните и молекулярни аспекти на механизма им на действие, така и на внимателна интерпретация на резултатите от изследване на маркера към момента на диагнозата и при рецидиви. Експресията може да варира както между различните В-клетъчни неоплазии, така и между отделни субтипове или пациенти, както и да бъде модулирана в хода на болестта и нейното лечение по различни механизми и това да повлияе на ефективността на лечението с антители.*

## Увод

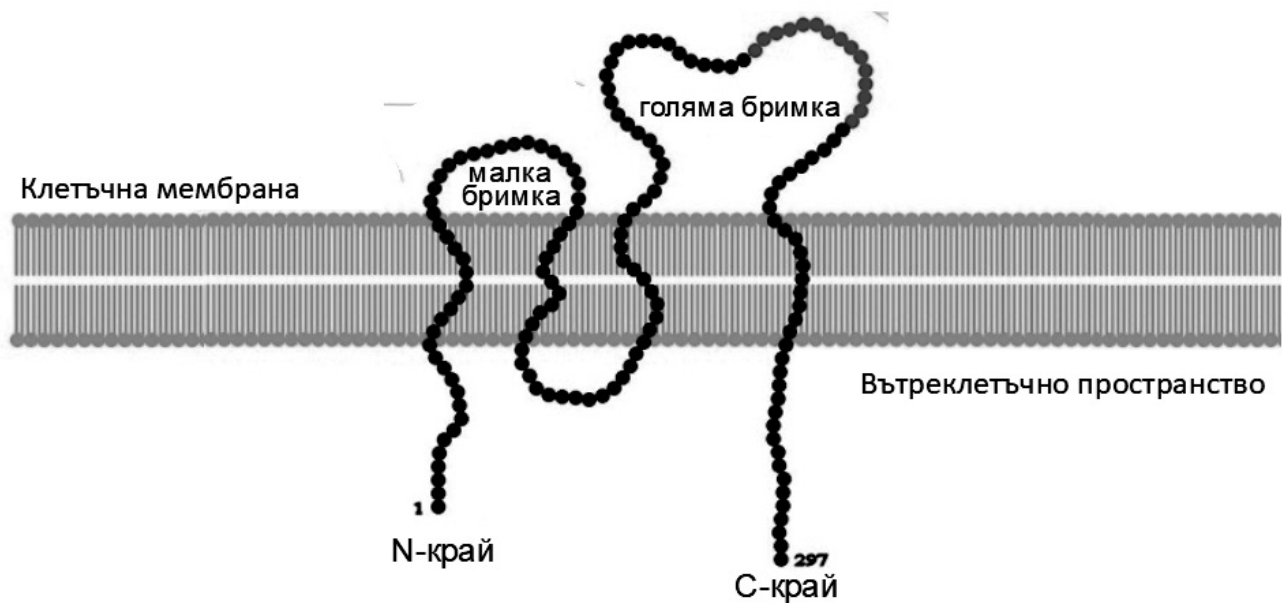
CD20 е тетра-трансмембарен гликолизиран фосфопротеин и представлява първият антиген, идентифициран в В-клетъчната линия на диференциация. По правило CD20 е силно експресиран от В-клетъчни лимфоцити през тяхното развитие, но отсъства върху хемопоеични стволови клетки, ранни про-В-клетки и плазмоцити (Фиг. 1).<sup>1</sup>

## Структура на CD20

CD20 протеинът преминава през клетъчната мембрана, като има 4 обособени мембранни области, аминокси краищата се намират вътреклетъчно в цитоплазмата (Фиг. 2), като се оформят една малка и една голяма екстрацелуларна примка (Фиг. 2).<sup>2</sup> Тази конфигурация предполага стабилно закрепване за мембраната и предпаз-



Фигура 1. В-клетъчно развитие и фенотип.



Фигура 2. Структура на CD20.



## CD20-МОДЕЛИРАНЕ НА НАЧАЛНА И СЛЕДРЕЦИДИВНА ТЕРАПИЯ...

ва от отделянето на антигена в нормални условия. Циркулиращи, т.нар. „разтворими форми“, на CD20 са открити в серума на пациенти с високобройна хронична лимфоцитна левкемия.<sup>3</sup> CD20 може да бъде намерен в комплекс с други молекули, като МНС клас I и клас II, CD53, CD81, CD82, CD40, р75/80 (Сбр) и вероятно BCR, много от които са включени в липидните рафтове и зависят от тях за предаването на сигнали.<sup>4-7</sup> Налице е значителна степен на епитопно разнообразие на CD 20, което може да обясни разнообразието от биохимични и биологични ефекти, настъпващи при свързване с различни анти-CD20 моноклонални антитела, наблюдавани *in vitro*. Най-общо се приема, че извънклетъчната част на протеина носи две групи от епитопи, едната от които се разпознава от по-голямата част от анти-CD20 моноклоналните антитела (в т.ч. B1, 2H7, *rituximab*), свързването на които индуцира инхибиторни ефекти върху пролиферацията на В-клетките. Другата, разпознатата от 1F5 моноклоналното антитяло, се свързва с процеси на стимулиране.<sup>4,8</sup>

### Генно кодиране и регулация

CD20 се кодира от MS4A1-ген, разположен на 11q12 хромозома.<sup>9</sup> Промоторът на гена съдържа потенциални места за няколко транскрипторни фактора като Oct-1 и Oct-2, свързани с интерфероновата регулация. Налице са данни, че някои цитокини като *interferon-α* (IFN- $\alpha$ ), *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF), *interleukin-4* (IL-4) и *tumor necrosis factor-α* (TNF- $\alpha$ ) могат да доведат до повишаване на експресията на CD20 върху лимфомни клетки *in vitro*, а вероятно и *in vivo*, без да е ясен механизъмът на този ефект.<sup>10</sup>

### Функции на CD20

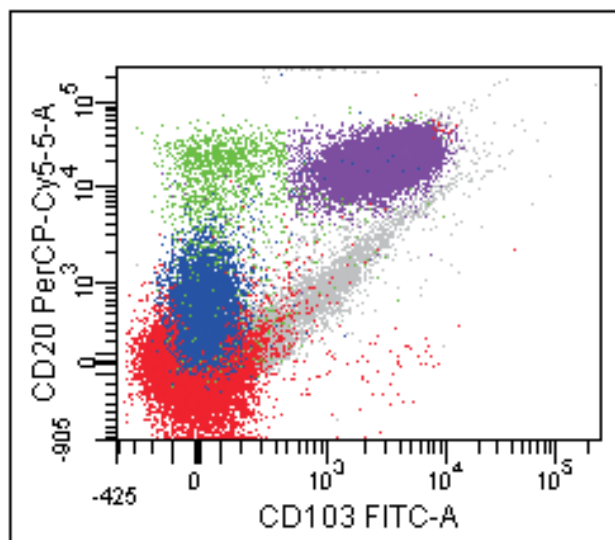
Независимо от значимия напредък в изследванията и познанието, биологичните

функции на CD20 са до голяма степен неизяснени. Смята се, че играе роля в диференциацията, съзряването и активирането на В-клетките. Протеинът няма познат естествен лиганд и функциите му са свързани с осигуряване на оптимален В-клетъчен имуноен отговор срещу Т-независими антигени. При свързване с анти-CD20-антитяло, молекулата CD20 остава върху мембраната на В-клетките без дисоциация или интернализация, т.е. без да се отделя от клетъчната повърхност, нито навлиза изцяло вътреклетъчно. Предполага се, че играе роля на калциев канал в клетъчната мембрана. Молекулата може да иницира вътреклетъчни сигнали, активирайки каскада на фосфорилиране на вътреклетъчни протеини чрез свързване към тирозинкинази от Src-семейството, като например Lyn, Fyn и Lck.<sup>11</sup> Има данни за ролята на CD20 при взаимодействие на В-клетките с микросредата. Експресията му се регулира от хемокинови сигнали чрез оста CXCR4/SDF1 и може да бъде нарушена от медикаменти, които се намесват във взаимодействия с микросредата.<sup>12</sup>

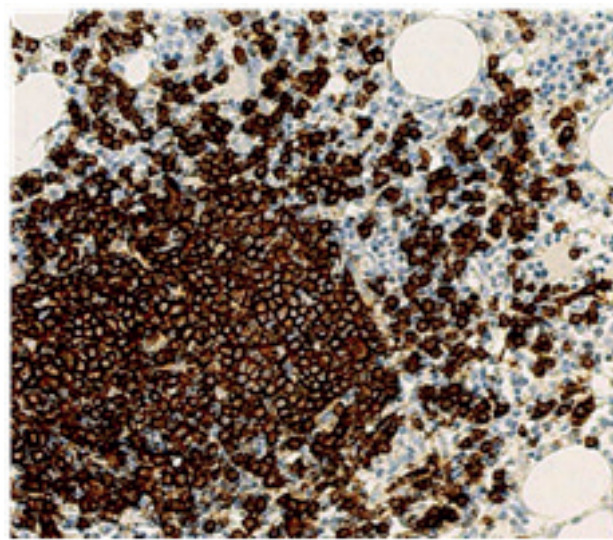
### Имунофенотипно доказване на CD20

Доказването на CD20 чрез имунофенотипни методи е задължителен компонент от диагностичния процес при лимфоидни неоплазии. В практиката се използват различни подходи: основно имунохистохимично изследване върху биопсични материали, флоуцитометрия в клетъчни суспензии (в т.ч. периферна кръв и костномозъчен аспират).

Имунофенотипизацията чрез флоуцитометрия е основен компонент в диагностичния процес на лимфоидни неоплазии с левкемияция. Флоуцитометрията позволява идентифициране на мембранни епитопи на CD20 и полуколичествено определяне на нивата на експресия на антигена в проби от свеж клиничен материал (най-често



А.



Б.

**Фигура 3.** (А) Флоуцитометрично изследване на CD20 (зелено – нормални В-лимфоцити; синьо – клетки с фенотип на хронична лимфоцитна левкемия и ниска експресия на CD20; лилаво – клетки с фенотип на трихоловкемия с висока експресия на CD20; червено – CD20-отрицателни Т-лимфоцити); (Б) Имунохистохимично маркиране на нодуларен инфилтрат на CD20-положителен лимфом в костен мозък.

периферна кръв) и дефиниране на прагови стойности на средна флуоресцентна интензивност (MFI), брой молекули на еквивалентен разтворим флуорохром (MESF) или количество на свързано антитяло/клетка (ABC), които да дискриминират групи пациенти със значими различия в клиничния изход и терапевтичен отговор.<sup>13,14,15,16</sup> Към момента са необходими допълнителни проучвания за клинична приложимост на количествените подходи. Според някои автори флоуцитометрията като цяло е по-чувствителна при идентифициране на CD20, но методът има сериозни недостатъци при тъканно представените лимфоми, при които няма левкемична изява, като напр. дифузен В-едроклетъчен лимфом – изисква свеж материал, както и рядко е на разположение към момента на диагноза, необходимо е специализирано оборудване и е със значимо по-висока цена.

Имунохистохимичното (ИХХ) изследване на имунофенотипа, включително и на CD20, е задължителен компонент в диаг-

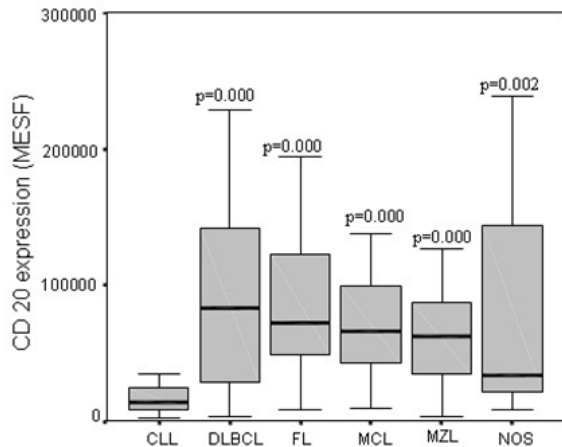
ностичния процес на лимфомите. Методът е широко достъпен, относително евтин, позволява маркиране на архивни проби. Най-често се използва клон L26 на CD20-моноклонално антитяло, който разпознава интрацелуларен епитоп и се отличава с висока специфичност при изследване на биопсични материали, фиксирани във формалин и включени в парафин. *Mason, et al.* препоръчват в резултата от изследването да бъде отбелязвано “CD20-положителен”, независимо от интензитета, поради относително ниска разделителна способност на имунохистохимията.<sup>17</sup> Прилагането на дигитализирано заснемане на ИХХ препарати и софтуерна обработка дава възможност за полуколичествена оценка на интензитета.<sup>18</sup>

Възможно е експресията на маркера да бъде оценена на ниво РНК чрез прилагане на полимеразно-верижна реакция след обратна транскрипция (RT-PCR), но методът няма практическо приложение. Проведените до момента изследвания показват, че нивата на CD20 mRNA, определени с полимеразна

верижна реакция в реално време (Q-RT-PCR), са нормални или близки до нормалните и не корелират добре с експресия на белтъчно ниво, вероятно поради посттранскрипционен дефект при ХЛЛ.<sup>19</sup>

### Експресия на CD20 при лимфоидни неоплазии

Експресия на CD20 се установява в широк спектър от лимфоидни неоплазии. Почти всички В-клетъчни лимфому са CD20-положителни, но експресията може да варира както между различните В-клетъчни неоплазии, така и между отделни субтипове или пациенти.<sup>20</sup>



**Фигура 4.** Експресия на CD20 при В-клетъчни лимфому (Превод: MESF (molecules of soluble fluorochrome) – брой молекули на разтворим флауорохром, CLL (chronic lymphocytic leukemia) – хронична лимфоцитна левкемия, DLBCL (diffuse large B-cell lymphoma) – дифузен В-ерокалетъчен лимфом, FL (follicular lymphoma) – фоликуларен лимфом, MCL (mantle cell lymphoma) – мантелноклетъчен лимфом, MZL (marginal zone lymphoma) – маргинално-зонов лимфом, NOSB-cell (B-клетъчен лимфом, неклаасифициран). От Prevodnik VK et al, 2011.<sup>21</sup>

### CD20 при В-клетъчна хронична лимфоцитна левкемия (ХЛЛ)/ гребноклетъчен лимфоцитен лимфом (ДЛЛ)

Като цяло, ХЛЛ се характеризира със значимо по-ниски нива на експресия на CD20 в сравнение с дифузен В-ерокалетъчен лимфом, фоликуларен лимфом и други В-клетъчни лимфому<sup>21</sup>, но нивата на експресия са хетерогенни при различни пациенти.<sup>22</sup> Налице са данни, че при ХЛЛ клетките, които непосредствено са напуснали микросредата на лимфни възли и са нахлули в периферна кръв (CXCR4dim CD5bright), имат по-високи нива на CD20 в сравнение с клетки, циркулиращи в кръвта от по-дълго време (CXCR4 bright CD5dim). Установено е, че CD20 се регулира директно от CXCR4-лиганд – стволово-клетъчен фактор 1 (SDF-1 $\alpha$ , CXCL12), продуциран от стромални клетки.<sup>12,23</sup> В допълнение, нивата на CD20-експресия при ХЛЛ корелират с цитогенетиката, като случаите с тризомия 12 се характеризират с по-високи нива и с по-добър терапевтичен отговор към rituximab.<sup>24</sup> От друга страна, NOTCH1-мутации са свързани с ниски нива на CD20 при ХЛЛ и са отговорни за deregulation на хистон-ацетилаза (HDAC)-медирана епигенетична репресия на експресията на CD20, което е един от възможните механизми за по-ниска чувствителност към имунохимо-терапия на пациенти с NOTCH1-мутации.<sup>25</sup>

### CD20 при дифузен В-ерокалетъчен лимфом (ДВЕЛ)

По правило дифузните В-ерокалетъчни лимфому са положителни за CD20, като нивата на CD20-експресията могат да варират в широк диапазон при различни пациенти. Клиничните резултати са достоверно

по-лоши при ниска интензивност на маркиране на CD20, независимо от метода – имунохистохимия или флоуцитометрия.<sup>16, 18</sup> Налице са данни за ниска експресия на CD20 при т.нар. „double-hit“ лимфому, отличаващи се с агресивен клиничен ход и лоши терапевтични резултати.<sup>26</sup> Съществуват съобщения за ДВБЛ, които показват специфичен CD20-положителен фенотип чрез имунохистохимия, но са отрицателни при флоуцитометрично изследване (ИНС+/FCM-) и се отличават с почти десет пъти по-ниска експресия на CD20-информационна РНК в сравнение с CD20 ИНС+/FCM+ контролни клетки. Данните за прогнозата при тази категория пациенти остават противоречиви.<sup>16,27</sup>

CD20-отрицателните лимфому съставляват около 1-2%. Като цяло, CD20-отрицателните ДВБЛ показват тенденция за екстраногално засягане, агресивен клиничен ход, резистентност към конвенционална химиотерапия и неблагоприятна прогноза. Използване на анти-CD20-моноклонални антитела не би било от полза в тези случаи. Най-честите CD20-отрицателни варианти включват плазмобластен лимфом, първичен ефузионен лимфом, дифузен В-едроклетъчен лимфом на базата Human herpes virus 8 (HHV-8)-асоцирана мултицентрична болест на *Castleman*, анапластен ALK-положителен ДВБЛ. Повечето от наличните данни за CD20-отрицателни ДВБЛ се състоят от клинични случаи и малки ретроспективни серии, което не позволява формулиране на стандарти за поведение.<sup>28</sup>

### **Анти-CD20 антитела в лечението на В-клетъчни неоплазии**

През последните години са разработени и одобрени за лечение моноклонални антитела, насочени срещу CD20 антигена. Очакваната висока ефективност при го-

бър профил на безопасност се определят от неговите характеристики. Стволовите клетки остават незасегнати поради липса на CD20 експресия и осигуряват възстановяване на В-клетъчните популации. Аналогично, плазмоцитите поддържат нивата на имуноглобулините. Липсата на антигена върху други нормални тъкани ограничава спектъра на токсичност, а липсата на разтворими форми в циркулацията осигурява оптимални нива на антителата и тяхното действие.

Смята се, че след свързване с CD20-позитивни клетки, анти-CD20 антителата предизвикват най-малко три различни ефекторни процеса: програмирана клетъчна смърт (апоптоза), антитяло-зависима клетъчна цитотоксичност (ADCC) или фагоцитоза- (ADCP) и комплемент-зависима цитотоксичност (CDC). Свързването на анти-CD20-моноклоналните антитела индуцира спиране на клетъчния цикъл, блок в диференциация или В-клетъчна активация чрез фосфорилиране на CD20, локализация на липидните рафтове и индуциране на вътреклетъчен инфлукс на калций в зависимост от използваното антитяло. В зависимост от начина на свързване и основния механизъм на елиминиране на CD20-положителните клетки, моноклоналните антитела се категоризират в два типа – тип I и тип II.

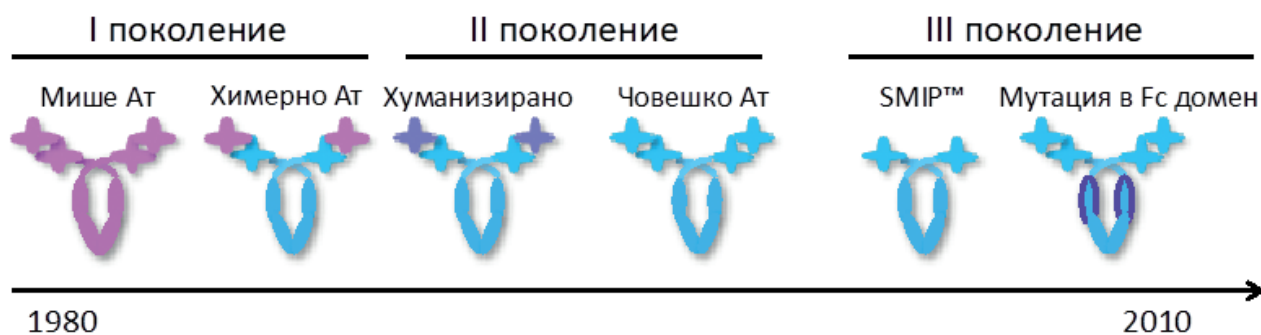
Първото химерно анти-CD20 моноклонално антитяло, одобрено за лечение на В-клетъчни злокачествени болести, е *rituximab*, който унищожава В-лимфоидни неоплазии чрез комплемент-зависима цитотоксичност (CDC) и антитяло-зависима клетъчна цитотоксичност (ADCC). Следващи поколения анти-CD20 антитела (*ofatumumab*, *ublrituximab*, *obinutuzumab*, *ocaratuzumab*) демонстрират значимо по-висока степен на медирана от макрофаги антитяло-зависима фагоцитоза (ADP), както и директно подтискане на клетъчния



## CD20-МОДЕЛИРАНЕ НА НАЧАЛНА И СЛЕДРЕЦИДИВНА ТЕРАПИЯ...

Таблица 1. Характеристика на тип I и тип II анти-CD20 антитела.

| тип I анти-CD20 антитела<br><i>rituximab, ocrelizumab (2H7), ofatumumab (2F2),<br/>veltuzumab (hA20), ocaratuzumab (AMe-133),<br/>ublrituximab (TG-1101)</i> | тип II анти-CD20 антитела<br><i>obinituzumab(GA101), tositumomab (B1)</i> |
|--|---|
| Свързват се с клас I епитоп  | Свързват се с клас II епитоп  |
| Локализиран CD20 в липидните рафтове   | Не локализиран CD20 в липидните рафтове                                   |
| Висока комплемент-зависима цитотоксичност  | Ниска комплемент-зависима цитотоксичност                                  |
| Антитяло-зависима клетъчна цитотоксичност  | Антитяло-зависима клетъчна цитотоксичност                                 |
| Пълен капацитет на свързване   | Частичен капацитет на свързване   |
| Слаба хомотипна агрегация  | Хомотипна агрегация   |
| Индуциране на клетъчна смърт   | Силно индуциране на клетъчна смърт  |



Фигура 5. Технологично развитие на производството на анти-CD20 антитела.

растеж и индуциране на апоптоза или т.нар. директна клетъчна смърт (DCD).<sup>29</sup>

### Анти-CD20 моноклонални антитела в лечението на В-клетъчните лимфоидни неоплазии

Въвеждането на анти-CD20 моноклоналните антитела коренно промени пейза-

жа на терапията за В-клетъчни лимфоидни неоплазии и значими ползи се наблюдават както при индолентни, така и при агресивни типове. Табл. 2 представя резултатите от някои основни клинични проучвания.

**Дифузният В-егроклетъчен лимфом (ДВЕЛ)** е най-разпространеният неходжкинов лимфом. Добавянето на *rituximab* (R) към *cyclophosphamide*, *doxorubicine*, *vincristine*, *prednisone* (CHOP) води до зна-



**Таблица 2.** Основни клинични проучвания с използване на анти-CD20 антитела при лечението на пациенти с В-клетъчни лимфоми.

| Тип лимфом                    | Проучване                    | Схема на лечение            | Пълен отговор                        | Обща преживяемост                                    |
|-------------------------------|------------------------------|-----------------------------|--------------------------------------|--|
| Дифузен В-едроклетъчен лимфом | LNH98-530                    | CHOP vs R-CHOP              | CHOP: 63%<br>R-CHOP: 76%             | CHOP: 45% 5-зод.<br>R-CHOP: 58% 5-зод.               |
|                               | NCT00064116 <sup>31</sup>    | CHOP/CHOEP vs R-CHO/R-CHOEP | CHOP/CHOEP: 68%<br>R-CHOR-CHOEP: 86% | CHOP/CHOEP: 84% 3-зод.<br>R-CHOP/R-CHOEP: 93% 3-зод. |
|                               | RICOVER-60 <sup>32</sup>     | CHOP-14 vs R-CHOP-14        | CHOP-14: 68%<br>R-CHOP-14: 78%       | CHOP-14: 67.7% 3-зод.<br>R-CHOP-14: 78.1% 3-зод.     |
| Фоликуларен лимфом            | GLSG-2004 <sup>33</sup>      | FCM vs R-FCM                | FCM: 13%<br>R-FCM: 33%               | FCM: 70% 2-зод.<br>R-FCM: 90% 2-зод.                 |
|                               | GLSG-2005 <sup>34</sup>      | CHOP vs R-CHOP              | CHOP: 17%<br>R-CHOP: 20%             | CHOP: 90% 2-зод.<br>R-CHOP: 96% 2-зод.               |
|                               | Marcus R et al <sup>35</sup> | CVP vs R-CVP                | CVP: 10%<br>R-CVP: 41%               | CVP: 77% 4-зод.<br>R-CVP: 83% 4-зод.                 |
| Мантелно-клетъчен             | GLSG-2005 <sup>36</sup>      | CHOP vs R-CHOP              | CHOP: 7%<br>R-CHOP: 34%              | CHOP: 84% 18 мес.<br>R-CHOP: 82% 18 мес.             |

Съкращения: CHOEP – cyclophosphamide, doxorubicine, vincristine, etoposide, prednisone; CHOP – cyclophosphamide, doxorubicine, vincristine, prednisone; CVP – cyclophosphamide, vincristine, prednisone; R – rituximab; FC – fludarabine, cyclophosphamide; FCM - fludarabine, cyclophosphamide, mitoxantrone.

чително подобряване на терапевтичните резултати при пациенти с ДВЕЛ и схемата R-CHOP се превръща в “златен” стандарт за лечение.<sup>37</sup> Установяват се статистически значими ползи за общата преживяемост както при по-възрастни, високорискови пациенти, така и при по-млади пациенти с по-нисък клиничен риск. В последствие са разработени второ и трето поколение антитела (*obinutuzumab, ibritumomab tiuxetan, tositumomab, ofatumumab, veltuzumab*), за които са в ход клинични проучвания при пациенти с ДВЕЛ (NCT00517530, NCT00440583, NCT00110071, NCT01481272, NCT01101581).

Имунофенотипното изследване на CD20 е задължителен компонент от диагностичния процес на ДВЕЛ. Установяването му е основна предпоставка за включване на анти-CD20-моноклонално антитяло към химиотерапевтичния режим, което достоверно подобрява терапевтичния отговор с по-дълга преживяемост без прогресия и обща преживяемост без допълнителна токсичност.<sup>38</sup> Оценката на степента на експресия чрез интензитета на имуномаркиране предоставя допълнителна предиктивна информация, но следва да се интерпретира с внимание на база на стандартизирани фло-

## CD20-МОДЕЛИРАНЕ НА НАЧАЛНА И СЛЕДРЕЦИДИВНА ТЕРАПИЯ...

Таблица 3. Основни клинични проучвания с използване на анти-CD20 антитела при лечението на нелекувани пациенти с хронична лимфоцитна левкемия.

| Проучване                 | Средна възраст | Брой пациенти | ORR                       | CR                        | PFS                               | OS                         |
|---------------------------|----------------|---------------|---------------------------|---------------------------|-----------------------------------|----------------------------|
| NCT00281918 <sup>39</sup> | 59.5 год.      | 810           | FCR: 90%<br>FC: 80%       | FCR: 44%<br>FC: 22%       | FCR: 52 мес.<br>FC: 33 мес.       | FCR: 87%<br>FC: 33%        |
| NCT01010061 <sup>41</sup> | 73 год.        | 356           | Ob-C: 73.3%<br>Chl: 31.3% | Ob-C: 17.2%<br>Chl: 0%    | Ob-C: 31мес.<br>Chl: 11мес.       | Ob-C: NR<br>Chl: 58.5 мес. |
| NCT00748189 <sup>42</sup> | 69 год.        | 447           | Of-C: 82.3%<br>Chl: 68.6% | Of-C: 12.2%<br>Chl: 1.33% | Of-C: 22.4 мес.<br>Chl: 13.1 мес. | Of-C: NR<br>Chl: NR        |

Съкращения: FCR – fludarabine, cyclophosphamide, rituximab, FC – fludarabine, cyclophosphamide; Ob-C – obinutuzumab, chlorambucil; Chl – chlorambucil; Of-C – ofatumumab, chlorambucil; ORR – overall response rate; CR – complete response; PFS – progression free survival; OS – overall survival

уцитомерични подходи или чрез използване на стандартизирана ИХХ с автоматизиранни системи, дигитализирана микроскопия и софтуерен анализ на образи за полуколичествена оценка.

Идентифицирането на CD20-отрицателни ДВЕЛ, при които прилагането на анти-CD20 антитела е безполезно, както при първоначална диагноза, така и при рецидив изисква внимателна интерпретация и оценка на качеството на имуномаркиране. За потвърждаване на В-клетъчна линия на диференциация се използват други В-клетъчни маркери, вкл. PAX-5, CD79a и CD22. Използването на вътрешни и/или външни контроли е задължително. Към момента няма установени стандарти за лечение на тази група пациенти. Новите средства, насочени към В-клетъчни сигнални пътища, например, инхибитори на *Bruton* тирозин-киназа (ВТК) и фосфоинозитол-3 киназа (PI3K), имат потенциал за ефективна терапия. От друга страна, PD-1-антитела и Vcl-2-инхибитори също могат да бъдат терапевтични опции, които следва да бъдат проучени.

**Хроничната лимфоцитна левкемия (ХЛЛ)**, от своя страна, има дълга естествена история и на практика е най-разпространената злокачествена В-клетъчна болест по показателя болестност. Въпреки ниската експресия на CD20 при ХЛЛ добавянето на *rituximab* към стандартната химиотерапия. *rituximab fludarabine/cyclophosphamide* (R-FC) води до значително подобряване на терапевтичните резултати и постигане на клинично значимо удължаване на преживяемост без прогресия и схемата R-FC се превръща в “златен” стандарт за лечение при пациенти с ХЛЛ.<sup>39,40</sup> В допълнение, R-FC индуцира по-често ремисии с отрицателна минимална резидуална болест под  $10^{-4}$  в костния мозък. Впоследствие са разработени и проучени второ и трето поколение антитела, в това число *obinutuzumab* и *ofatumumab*, които са одобрени за лечение на пациенти с ХЛЛ.<sup>41,42</sup> Понастоящем, за *veltuzumab*, *ocaratuzumab*, *ublituximab* и *HuMax-CD20* тежат клинични проучвания при ХЛЛ (NCT00546793, NCT00003874, NCT02301156 и NCT00093314).

В тази връзка, имунофенотипното изследване с включване на CD20 е задължителен компонент от диагностичния процес на ХЛЛ. Установяването на CD20 е основна предпоставка за включване на анти-CD20-моноклонално антитяло към химиотерапевтичния режим. Оценката на степента на експресия чрез определяне на интензитета на имуномаркиране предоставя допълнителна предиктивна информация, но следва да се интерпретира с внимание и на базата на стандартизирани флоуцитометрични подходи.

### Промени в експресията в хода на болестта и нейното лечение

Експресията на CD20 може да бъде модулирана в хода на болестта и нейното лечение по различни механизми и това да повлияе на ефективността на лечението с антитела. Познат е феноменът на транзиторно потискане на CD20-експресия след лечение с *rituximab*<sup>43</sup> и дори загуба върху левкемични клетки в до около 50% от случаите с хронична лимфоцитна левкемия и 37-60% от пациентите с ДВЕЛ.<sup>44,45</sup> Вероятни механизми на загуба на CD20 след лечение включват: епигенетично потискане на експресията на *MS4A1*-гена, интернализация на CD20-молекулата след прилагане на *rituximab*<sup>46</sup>, селекция на CD20-отрицателен клон и/или трогоцитоза (така нареченото “окосяване”) от клетъчната повърхност на комплекса CD20/*rituximab* посредством FcγR от моноцити/макрофаги, за която се смята, че настъпва по-бързо и има по-съществено значение.<sup>47</sup> Налице са данни за медираща роля на неутрофилите в процеса на трогоцитоза, която се индуцира в значително по-голяма степен от *rituximab* в сравнение с *obinutuzumab*<sup>48</sup>. Съществуват данни за намалена експресия на антигена и

след прилагане на други медикаменти, напр. *ibrutinib*, в резултат на инхибиране на фактори, свързани с NFκB и критични за експресия на CD20; *lenalidomide*, който може да доведе до интернализация на молекулата.<sup>49</sup> В допълнение, *bortezomib*, в резултат на което настъпва протеинова деградация; CXCR4-инхибиторът *plerixafor* блокират SDF-1α-медираната CD20-регулация.<sup>23</sup> Описани са мутации в *MS4A1* и *NOTCH1* гените, които са свързани с намалена експресия или конформационни промени, обуславящи резистентност към терапията с анти-CD20-антитела. В същото време съществуват възможности за възстановяване на експресията на CD20 чрез HDAC-инхибитори (*trichostatin*, *valproic acid*, *rhomidepsine*), деметилиращи агенти (DNMT-инхибиторите *azacitidine*, *decitabine*) и други медикаменти (инхибитори на фарнезил-трансфераза – L-744, 832 или на TGFβ – LY364947) главно чрез освобождаване на репресията на *MS4A1*-гена.<sup>50</sup>

### Заклучение

CD20-антигенът е силно експресиран от В-клетъчни лимфоцити почти на всички етапи от тяхното развитие, както и върху почти всички В-клетъчни левкемии и лимфоми, като представлява подходяща мишена за прилагане на високоспецифична имунотерапия. Анти-CD20 моноклоналните антитела са високо ефективни при В-клетъчните неоплазии, трайно преобразили терапевтичния им пейзаж. Първоначално изследвани при пациенти с рецидиви и рефрактерност, те се превърнаха в неразделна част от първоначалната терапия. Имунохимиотерапията понастоящем е стандарт за грижа във всички индукционни схеми за по-голямата част от злокачествените болести на В-клетките и са неотменна част в ръководства и препоръки за клинична практика. Установяването на CD20 е основна предпоставка

## CD20-МОДЕЛИРАНЕ НА НАЧАЛНА И СЛЕДРЕЦИДИВНА ТЕРАПИЯ...

за включване на анти-CD20-моноклонално антитяло към съответния химиотерапевтичния режим. В тази връзка, имунофенотипното изследване с включване на CD20, е задължителен компонент от диагностичния процес на лимфомите.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Stashenko P, Nadler LM, Hardy R, Schlossman SF. Characterization of a human B lymphocyte-specific antigen. *J Immunol* 1980;125(4):1678-1685
2. Einfeld DA, Brown JP, Valentine MA, et al. Molecular cloning of the human B cell CD20 receptor predicts a hydrophobic protein with multiple transmembrane domains. *EMBO J* 1987;7(3):711-717
3. Manshouri T, Do KA, Wang X, et al. Circulating CD20 is detectable in the plasma of patients with chronic lymphocytic leukemia and is of prognostic significance. *Blood* 2003;101(7):2507-2513
4. Polyak MJ, Li H, Shariat N, Deans JP. CD20 homooligomers physically associate with the B cell antigen receptor. Dissociation upon receptor engagement and recruitment of phosphoproteins and calmodulin-binding proteins. *J Biol Chem* 2008;283(27):18545-18552
5. Petrie RJ, Deans JP. Colocalization of the B cell receptor and CD20 followed by activation-dependent dissociation in distinct lipid rafts. *J Immunol* 2002;169(6):2886-2891
6. Léveillé C, AL-Daccak R, Mourad W. CD20 is physically and functionally coupled to MHC class II and CD40 on human B cell lines. *Eur J Immunol* 1999;29(1):65-74
7. Pers J, Hammadi M, Dalbies F, et al. Anti-CD20 antibody-mediated apoptosis of B cells is a lipid raft-dependent process. *Ann Rheum Dis* 2011;70:A73.
8. Teeling JL, Mackus WJ, Wiegman LJ, et al. The biological activity of human CD20 monoclonal antibodies is linked to unique epitopes on CD20. *J Immunol* 2006;177(1): 362-371
9. Tedder TF, Streuli M, Schlossman SF, Saito H. Isolation and structure of a cDNA encoding the B1 (CD20) cell-surface antigen of human B lymphocytes. *Proc Nat Acad Sci USA* 1988;85 (1):208-212
10. Venugopal P, Sivaraman S, Huang XK, et al. Effects of cytokines on CD20 antigen expression on tumor cells from patients with chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Res* 2000; 24(5):411-415
11. Popoff IJ, Savage JA, Blake J, et al. The association between CD20 and Src-family Tyrosine kinases requires an additional factor. *Mol Immunol* 1998;35(4):207-214
12. Pavlasova G, Seda V, Borsky M, et al. Microenvironmental Interactions up-Regulate CD20 Expression in CLL B Cells through the CXCR4/SDF-1 Axis: Implications for CD20-Targeting Antibodies and the Use of BCR-Inhibitors in Combination. *Blood* 2015; 126: 4124
13. Tembhare PR, Marti G, Wiestner A, et al. Quantification of expression of antigens targeted by antibody-based therapy in chronic lymphocytic leukemia. *Am J Clin Pathol* 2013;140(6):813-818
14. Wang L, Abbasi F, Gaigalas AK, et al. Comparison of fluorescein and phycoerythrin conjugates for quantifying CD20 expression on normal and leukemic B-cells. *Cytometry B Clin Cytom* 2006; 70(6):410-415
15. Horvat M, Prevodnik V, Lavrenčak J, et al. Predictive significance of the cut-off value of CD20 expression in patients with B-cell lymphoma. *Oncol Rep* 2010;24(4):1101-72-24
16. Johnson NA, Boyle M, Bashashati A, et al. Diffuse large B-cell lymphoma: reduced CD20 expression is associated with an inferior survival. *Blood* 2009;113(16):3773-3780
17. Mason DY, Comans-Bitter WM, Cordell JL, et al. Antibody L26 recognizes an intracellular epitope on the B-cell-associated CD20 antigen. *Am J Pathol* 1990;136(6):1215-1222
18. Choi CH, Park YH, Lim JH, et al. Prognostic Implication of Semi-quantitative Immunohistochemical Assessment of CD20 Expression in Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *J Pathol Transl Med* 2016;50(2):96-103
19. Sarro SM, Unruh TL, Zuccolo J, et al. Quantification of CD20 mRNA and protein levels in chronic lymphocytic leukemia suggests a post-transcriptional defect. *Leuk Res* 2010;34(12): 1670-1673
20. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, revised 4th edition No 2, IARC WHO Classification of Tumours, Lyon, 2017
21. Prevodnik VK, Lavrenčak J, Horvat M, Novakovič BJ. The predictive significance of CD20 expression in B-cell lymphomas. *Diagn Pathol* 2011;6:33



22. Tefferi A, Bartholmai BJ, Witzig TE, et al. Heterogeneity and clinical relevance of the intensity of CD20 and immunoglobulin light-chain expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Am J Clin Pathol* 1996;106(4):457-461
23. Pavlasova G, Borsky M, Seda V, et al. Ibrutinib inhibits CD20 upregulation on CLL B cells mediated by the CXCR4/SDF-1 axis. *Blood* 2016;128(12):1609-1613
24. Tam CS, Otero-Palacios J, Abruzzo LV, et al. Chronic lymphocytic leukaemia CD20 expression is dependent on the genetic subtype: a study of quantitative flow cytometry and fluorescent in-situ hybridization in 510 patients. *Br J Haematol* 2008;141(1):36-40
25. Pozzo F, Bittolo T, Arruga F, et al. NOTCH1 mutations associate with low CD20 level in chronic lymphocytic leukemia: evidence for a NOTCH1 mutation-driven epigenetic dysregulation. *Leukemia* 2016 Jan;30(1):182-189
26. Wu D, Wood BL, Dorer R, Fromm JR. „Double-Hit“ mature B-cell lymphomas show a common immunophenotype by flow cytometry that includes decreased CD20 expression. *Am J Clin Pathol* 2010;134(2):258-265
27. Tokunaga T, Tomita A, Sugimoto K, et al. De novo diffuse large B-cell lymphoma with a CD20 immunohistochemistry-positive and flow cytometry-negative phenotype: molecular mechanisms and correlation with rituximab sensitivity. *Cancer Sci* 2014;105:35-43
28. Castillo JJ, Chavez JC, Hernandez-Ilizaliturri FJ, Montes-Moreno S. CD20-negative diffuse large B-cell lymphomas: biology and emerging therapeutic options. *Expert Rev Hematol* 2015; 8(3):343-354
29. Boross P, Leusen JH. Mechanisms of action of CD20 antibodies. *Am J Cancer Res* 2012;2(6): 676-690
30. Feugier P, Van Hoof A, Sebban C, et al. Long-term results of the R-CHOP study in the treatment of elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma: a study by the Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte. *J Clin Oncol* 2005;23(18):4117-4126
31. Pfreundschuh M, Trümper L, Osterborg A, et al. CHOP-like chemotherapy plus rituximab versus CHOP-like chemotherapy alone in young patients with good-prognosis diffuse large-B-cell lymphoma: a randomised controlled trial by the MabThera International Trial (MINT) Group. *Lancet Oncol* 2006;7(5):379-391
32. Pfreundschuh M, Schubert J, Ziepert M, et al. Six versus eight cycles of bi-weekly CHOP-14 with or without rituximab in elderly patients with aggressive CD20+ B-cell lymphomas: a randomised controlled trial (RICOVER-60). *Lancet Oncol* 2008;9(2): 105-116
33. Forstpointner R, Dreyling M, Repp R, et al. The addition of rituximab to a combination of fludarabine, cyclophosphamide, mitoxantrone (FCM) significantly increases the response rate and prolongs survival as compared with FCM alone in patients with relapsed and refractory follicular and mantle cell lymphomas: results of a prospective randomized study of the German Low-Grade Lymphoma Study Group. *Blood* 2004;104(10):3064-3071
34. Hiddemann W, Kneba M, Dreyling M, et al. Frontline therapy with rituximab added to the combination of cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone (CHOP) significantly improves the outcome for patients with advanced-stage follicular lymphoma compared with therapy with CHOP alone: results of a prospective randomized study of the German Low-Grade Lymphoma Study Group. *Blood* 2005; 106(12): 3725-3732
35. Marcus R, Imrie K, Solal-Celigny P, et al. Phase III study of R-CVP compared with cyclophosphamide, vincristine, and prednisone alone in patients with previously untreated advanced follicular lymphoma. *J Clin Oncol* 2008;26(28):4579-4586
36. Lenz G, Dreyling M, Hoster E, et al. Immunochemotherapy with rituximab and cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone significantly improves response and time to treatment failure, but not long-term outcome in patients with previously untreated mantle cell lymphoma: results of a prospective randomized trial of the German Low Grade Lymphoma Study Group (GLSG). *J Clin Oncol* 2005;23(9): 1984-1992
37. Plosker GL, Figgitt DP. Rituximab: a review of its use in non-Hodgkin's lymphoma and chronic lymphocytic leukaemia. *Drugs* 2003; 63(8):803-843
38. Coiffier B, Lepage E, Briere J, et al. CHOP chemotherapy plus rituximab compared with CHOP alone in elderly patients with diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med* 2002;346(4):235-242
39. Hallek M, Fischer K, Fingerle-Rowson G, et al. Addition of rituximab to fludarabine and cyclophosphamide in patients with chronic lymphocytic leukaemia: a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet* 2010;376(9747):1164-1174



## CD20-МОДЕЛИРАНЕ НА НАЧАЛНА И СЛЕДРЕЦИДИВНА ТЕРАПИЯ...

---

40. Robak T, Dmoszynska A, Solal-Céligny P, et al. Rituximab plus fludarabine and cyclophosphamide prolongs progression-free survival compared with fludarabine and cyclophosphamide alone in previously treated chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 2010; 28(10):1756-1765
41. Goede V, Fischer K, Busch R, et al. Obinutuzumab plus chlorambucil in patients with CLL and coexisting conditions. *N Engl J Med* 2014;370(12):1101-1110
42. Hillmen P, Robak T, Janssens A, et al. Chlorambucil plus ofatumumab versus chlorambucil alone in previously untreated patients with chronic lymphocytic leukaemia (COMPLEMENT 1): a randomised, multicentre, open-label phase 3 trial. *Lancet* 2015;385(9980):1873-1883
43. Jilani I, O'Brien S, Manshuri T, et al. Transient down-modulation of CD20 by rituximab in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2003;102(10):3514-3520
44. Poirot B, Chedani H, Abbed K, et al. Loss of CD20 expression on CLL cells following treatment with rituximab. *Hématologie* 2010;16(1): 92-95
45. D'Auria F, Guariglia R, Villani O, et al. Modulation of CD20 antigen expression after rituximab treatment: a retrospective study in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Clin Ther* 2010; 32(11):1911-1916
46. Beum PV, Peek EM, Lindorfer MA, et al. Loss of CD20 and bound CD20 antibody from opsonized B cells occurs more rapidly because of trogocytosis mediated by Fc receptor-expressing effector cells than direct internalization by the B cells. *J Immunol* 2011;187(6): 3438-3447
47. Beum PV, Kennedy AD, Williams ME, et al. The shaving reaction: rituximab/CD20 complexes are removed from mantle cell lymphoma and chronic lymphocytic leukemia cells by THP-1 monocytes. *J Immunol* 2006;176(4):2600-2609
48. Valgardsdottir R, Cattaneo I, Klein C, et al. Human neutrophils mediate trogocytosis rather than phagocytosis of CLL B-cells opsonized with anti-CD20 antibodies. *Blood* 2017. pii: blood-2016-08-735605
49. Lapalombella R, Yu B, Triantafillou G, et al. Lenalidomide down-regulates the CD20 antigen and antagonizes direct and antibody-dependent cellular cytotoxicity of rituximab on primary chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood* 2008 ;112(13):5180-5189
50. Tomita A. Genetic and Epigenetic Modulation of CD20 Expression in B-Cell Malignancies: Molecular Mechanisms and Significance to Rituximab Resistance. *J Clin Exp Hematol* 2016; 56(2):89-99



---

**ПРОГНОСТИЧНИ И ПРЕДИКТИВНИ ФАКТОРИ  
ПРИ ОРАЛЕН КАРЦИНОМ**

---

**доц. д-р Павел Станимиров, дм**

*УМБАЛ Александровска, София*



# ПРОГНОСТИЧНИ И ПРЕДИКТИВНИ ФАКТОРИ ПРИ ОРАЛЕН КАРЦИНОМ

*доц. д-р Павел Станимиров, дм*

УМБАЛ Александровска, София

## ОБЗОР

*Плоскоклетъчният карцином на устна кухина е агресивна болест. Откриването на фактори, предсказващи повишен риск за рецидив или метастазиране, както и на предиктори на терапевтичния отговор, е от основно значение за избора на обем на лечение на първичния тумор. Прогнозата при умерено авансиралите и авансирани лезии е подчертано лоша с тенденция към локорегионално разпространение. В клиничната практика основен проблем се явява поведението към шията при ранните лезии. Високата честота на окулатни метастази при cT1, както и по-лошата прогноза при клинично проявени метастази често поставят въпроса за откриване на високорисковите случаи с цел провеждане на по-агресивно първоначално лечение. През изминалите десетилетия са направени изключителни усилия за намиране на хистопатологични и молекулярни прогностични маркери, както и на предиктори на отговор към терапевтични интервенции. В настоящата статия са разгледани фактори с общоприета прогностична стойност, отнасящи се до първичния тумор и шийните метастази. Статията акцентира върху значението на партньорството между хирурга и патолога, както и за необходимостта от стандартизиране на изследваните фактори.*

## Увод

Съвременното лечение на карциномите на глава и шия все повече изисква прецизно определяне на вид и обем на лечение, както и прогнозиране на очаквания резултат. Прогностичните фактори се разглеждат като: (i) отнасящи се до първичния тумор; (ii) отнасящи се до шийните лимфни метастази и (iii) отнасящи се до пациента (демографски фактори и общо състояние). В допълнение към клиничните и патологичните фактори, настоящите интереси са фоку-

сирани върху откриването на молекулярни фактори, които да предсказват клиничния изход от болестта или да бъдат използвани като предиктори за отговор към терапевтични интервенции. Тези молекулярни маркери не само предоставят прогностична информация, но също служат като таргети за съвременната фармакотерапия, противодействаща на клетъчната пролиферация чрез намесване в специфични клетъчни процеси. Молекулярните фактори, които оказват влияние върху туморното поведение, се включват в няколко широки категории като



протоонкогени, тумор супресорни гени, растежни фактори, имунно-свързани фактори, загубата на хетерозиготност на различни генетични локуси, параметри, свързани с кинетиката на *in vivo* туморния растеж. Предсказващата прогностична стойност на молекулярните и биологични маркери е противоречива. Различията в методиките, високата цена, малките групи пациенти са причина за ниската прогностична стойност на молекулярните и биологични маркери.<sup>1</sup>

В момента няма ясни индикатори за прогностичната стойност на молекулярните маркери. Независимо от големия брой доклади, те се разглеждат като научни изследвания, а не като рутинни прогностични инструменти.<sup>1</sup> Единствено биомаркери/индикатори, които са сигнификантно свързани с изхода след регресионен анализ, имат потенциал за използване в клиничната практика.<sup>2</sup>

### Прогностични фактори при карциноми на глава и шия

Когато се обсъждат прогностични фактори при карциноми на глава и шия, се вземат под внимание няколко специфични изхода, свързани с онкологичната болест. Освен преживяемостта без болест (обща и специфична), тук се отнасят локалните, регионалните и далечните рецидиви. Факторите, специфично свързани с локалните рецидиви, могат да окажат влияние при избор на широчина на резекционна линия, както и върху силата на лъчевата доза и промяна на фракционирането при провеждане на лъчелечение (ЛЛ). Факторите, специфично свързани с регионалните рецидиви, могат да окажат влияние върху избора дали да се проведе елективна шийна дисекция, респ. профилактична ЛЛ при cN0, както и върху вида на шийна дисекция при пациенти с шийни метастази. Факторите, предсказващи развитието на далечни метастази, могат да определят нужда от по-агресивно лечение.<sup>3</sup>

Лечението на плоскоклетъчния карцином на устната кухина (ПККУК) е базирано на стадирането според системата TNM. TNM-класификацията се основава на предположението, че „малките” тумори имат по-добра прогноза от „големите”. Независимо от това е известно, че туморите в една и съща T-категория имат различно биологично поведение и стадият по TNM не винаги е надежден прогностичен фактор.<sup>4</sup> Невъзможността за предсказване на биологичното поведение при ранните T1 лезии от десетилетия поставя въпроса за поведението към шията при cT1N0 пациентите. Откриването на предиктори за окултни метастази ще отговори на въпроса при кои пациенти в T1 ще се проведе елективна шийна дисекция (респ. Елективно ЛЛ) и кои ще бъдат оставени само на наблюдение. Проблемът с високата честота ( $\leq 20\%$ )<sup>5</sup> на окултни метастази при cT1 орален карцином, както и негативното прогностично значение на клинично проявените метастази, доведе до промяна в 8-ма ревизия на TNM (AJCC Cancer Staging Manual, 8<sup>th</sup> Edition) за карцинома на устна кухина: за T1-3 категорията, освен размера на първичния тумор, включващ критерий е и дълбочина на инвазията.<sup>7</sup> В 8-ма ревизия на TNM като допълнителни прогностични фактори са разглеждани дълбочината на инвазия на тумора, екстракапсулната инвазия при шийни метастази, резекционната линия, моделът на инвазия (worst pattern of invasion), периневралната инвазия, лимфоваскуларната инвазия, общо здравословно състояние, коморбидност, начин на живот и употреба на tobacco.<sup>7</sup>

### Прогностични фактори, отнасящи се до първичния тумор

В тази категория се отнасят туморна локализация, туморен размер, хистологично степенуване на конвенционалния плоскокле-

тъчен карцином, мултифакторни степенуващи малигнеността системи на тумора и на инвазивния фронт, лимфоваскуларна инвазия, перинеурална инвазия, костната инвазия, хистологичния подвариант на плоскоклетъчния карцином (ПКК), както и статус на резекционни линии.<sup>8</sup>

**Туморна локализация.** Продължава да съществува схващане, че туморите локализиран в задните отдели на устната кухина (УК) или орофаринкса, са с по-лоша прогноза. Това схващане е спорно.<sup>9</sup> Различията в агресивността на туморите при различните локализации в УК могат да се обяснят не само с анатомичните фактори, но и чрез големи биологични различия.<sup>10</sup> Особеностите на кръвоснабдяването и лимфния дренаж на различните локализации в УК са от значение за развитието на шийни лимфни метастази (ШЛМ). Рискът за метастазиране нараства с по-задната локализация като за долна устна метастази се установяват в 10%, за език в 25%, под на устната кухина – 40%, орофаринкс – 55% и 65% за хипофаринкс.<sup>11</sup>

**Туморен размер и стадий на болестта.** Туморният размер е прогностичен фактор за преживяемост<sup>12</sup>, статус на резекционни граници<sup>13</sup> и за локални рецидиви.<sup>14</sup> Прогностичното значение на TNM системата се оспорва като не е намерена връзка с преживяемостта.<sup>15,16</sup> Докладваната преживяемост според TNM за I, II, III, IV стадий е съответно: 75%, 65, 6%, 49% и 30%.<sup>17</sup> Докладвана е пет годишна преживяемост в 82% за ранните стадии и 49% за напредналите стадии.<sup>18</sup> Прогностично значение на диференциацията на тумора по Broders е противоречиво.<sup>19</sup> Пет- и 10-годишният период без рецидив за пациентите с ПКК на език е 59% и 36% за G1; 58% и 46% за G2 и 48% и 0% за G3.<sup>20</sup> Една от главните причини за ниската прогностична стойност на степента на хистологична диференциация (СХД) са хетерогенните клетъчни популации, наблюдавани при ПКК.<sup>21</sup>

**Многофакторни системи за степенуване на малигнеността.** В стремеж да се подобри системата за степенуване на диференциацията на ПКК Broders<sup>22</sup> въвежда многофакторна система за степенуване на малигнеността на базата на дефинирани критерии; така за първи път се оценява зоната на взаимодействие между тумора и гостоприемника. След редица модификации<sup>21</sup> M.Bryne et al.<sup>23</sup> разработват хипотеза, че клетките на инвазивния фронт (ИФ) са отговорни за биологичното туморно поведение. Авторът изследва туморната клетъчна популация и зоната на взаимодействие между тумора и гостоприемника. Той оценява степента на кератинизация, степента на ядрен полиморфизъм, модела на инвазия, брой митози и клетъчен отговор. Всички параметри са оценени от 1 до 4 и накрая се сумират в общ малигнен сбор.<sup>4</sup> Авторът намира, че степенуването на ИФ е с висока прогностична стойност за разлика от системата на Broders/WHO.<sup>4</sup> Също така установява, че ИФ е значим и независим предиктор на преживяемост и може да бъде важен прогностичен фактор (ПФ) при избор на лечение. Пациентите с общ малигнен сбор между 5 и 10 точки имат 5-годишна преживяемост в 57%, сравнена с 19% за случаите с малигнен сбор, по-голям от 10 точки.<sup>4</sup> Морфологичните и молекулярни характеристики на ИФ могат да предскажат по-добре прогнозата в сравнение с други участъци на тумора. Bryne et al. препоръчват да се оценяват 4-6 клетъчни слоя на най-дълбокия ИФ на поне три участъка на най-ниско диференцираните полета.<sup>24</sup> Степенуването на ИФ може да предскаже развитие на окултни метастази, както и развитие на шийни метастази с екстракапсулна инвазия (ЕКИ).<sup>25</sup>

**Лимфоваскуларна инвазия.** Проникването на туморни клетки в лимфните и кръвоносни съдове се приема за първата стъпка на метастазиране.<sup>26</sup> Инвазия в лимфни съдо-

ве се установява както в стромата на тумора, така и в периферните инфилтрирани зони.<sup>27</sup> Директна инвазия на кръвоносните съдове се установява в централните и периферните зони на тумора.<sup>27</sup> Най-често се наблюдава инвазия на венозни съдове. Инвазията на кръвоносни съдове може да бъде директна или под формата на шнурове от карциномни клетки.<sup>27</sup> Намерена е важна връзка между съдовата инвазия и туморна локализация, размер и дебелина, перинеурална инвазия, инвазивен фронт, начин на инвазия, шийни метастази, локални рецидиви и преживяемост.<sup>28,29</sup>

**Перинеурална/неурална инвазия.** Плоскоклетъчният карцином на устна кухина (ПККУК) проявява подчертан невротропизъм с честота на перинеурална инвазия (ПНИ) от 6% до 30%.<sup>30</sup> Хирургичната резекция се приема за лечебен метод с най-добри резултати като в случаи с ПНИ се препоръчва провеждане и на следоперативно ЛЛ.<sup>31</sup> ПНИ се свързва с локализация, туморен размер (ТР) и туморна дебелина (ТД), начин на инвазия (НИ), наличие на ШАМ, близки или инфилтрирани резекционни граници (РГ) и преживяемост, като е лош прогностичен белег.<sup>14,28,29</sup> ПНИ е важен предсказващ фактор за развитието на ШАМ.<sup>32</sup> Докладваната честота на ШАМ за случаите с и без ПНИ е респ. 73% и 46%.<sup>33</sup> Туморите, които инвазират перинеуралното пространство, са биологично по-агресивни като честотата на локалните рецидиви (ЛР) е много по-висока.<sup>32-34</sup> Пет годишната преживяемост без болест за случаите без ПНИ е 94,6% и 56,6% за случаите с ПНИ.<sup>34</sup> Смъртността за случаите с ПНИ е 54%, докато за случаите без е 25%.<sup>33</sup> ПНИ е маркер за по-агресивно биологично поведение и винаги трябва да се търси при хистологичното изследване.<sup>34</sup>

### Прогностични фактори, отнасящи се до рецидива

Рецидивът е повторно развитие на тумор след като е било проведено първично

лечение. Рецидивите биват локални, регионални (РР), локо-регионални (ЛРР) и далечни.<sup>21</sup> Независимо от агресивните хирургични и лъчетерапевтични методи се наблюдава висока честота на рецидиви, които представляват голям терапевтичен проблем. Докладвана е честота на ЛР от 42%, ЛРР са 8%, РР са 16%–41%.<sup>35</sup> Честотата на рецидивите в зоната на проведена шийна лимфна дисекция е между 15% и 50% от случаите.<sup>36</sup> Регионалните рецидиви са основна причина за смърт при пациентите с ПККУК. РР се развиват в резултат на растежа на ОКМ, развитие на вторични ШАМ извън полето на дисекцията или рецидиви (персистенции) в оперираното поле при ШЛД, както и развитие на контралатерален рецидив на шията.<sup>14,29,37</sup> Факторите, влияещи върху честотата на регионалните рецидиви, са: брой на метастатични АВ към момента на първичното оперативно лечение на шията; видна шийната дисекция; адювантна терапия<sup>38,39</sup>; напреднал туморен стадий; pN(+) статус; позитивни РГ<sup>35</sup>.

Локорегионалните рецидиви са свързани с нодалния статус, ПНИ, васкуларната инвазия, РГ, ШАМ и ЕКИ; тези фактори са *предиктори* и са индикатори за следоперативна ЛТ.<sup>40</sup>

**Прогностично значение на състоянието на резекционната граница.** Състоянието на РГ е независим ПФ за общата преживяемост (ОП) и преживяемостта без рецидив (ПБР).<sup>20,41</sup> Хистологичното ангажиране на РГ от туморния процес се свързва с ниска обща преживяемост, високи нива на локални рецидиви.<sup>20,28</sup> При ангажирани граници пет годишен период без болест са имали 11%, в сравнение с 47% за случаите с близки граници и 78% за тези – с чисти граници.<sup>28,29,37</sup> Пет и 10 годишната ОП за хистологично „чистите“ граници е 72% и 64%, докато за ангажираните е 21% и 0%.<sup>20</sup> При ангажирани граници, всички пациенти са раз-

били рецидив за по-малко от 5 години.<sup>20</sup> При мултивариантен анализ 5-годишната ПБР е 81% за случаите с „чисти“ РГ срещу 53% при ангажираните.<sup>41</sup> Докладвани са случаи на ЛР при „чисти“ РГ, което се обяснява с теорията за „поле на канцеризация“. Честотата на ЛР е 36% при позитивни граници и 18% при чисти.<sup>42</sup> При неблагоприятен модел на инвазия (разпръснати малки групи от клетки или острови от туморни клетки) микроскопска границата от 5 мм не може да се приеме за „чиста“.<sup>25</sup> Рискът от ЛР се повишава при интраоперативно пресичане на тумора от резекционната линия, независимо че в края на операцията може да се достигне до хистологично здрави граници.<sup>43</sup> В случаите с T1 и T2 лезии с хирургични микроскопски граници > 5 mm, ЛР са редки и не са във връзка с други хистопатологични параметри.<sup>44</sup> Ангажирането на резекционните линии при макроскопски „чиста“ екцизия може да се разглежда като хистологичен индикатор за агресивно поведение на болестта.<sup>28</sup>

### Прогностични и предиктивни фактори, отнасящи се до шийните метастази

**Окултни метастази.** Терминът „окултни“ метастази (ОКМ) характеризира лимфни метастази, които не са открити при щателното клинично и образно изследване или чрез аспирационна цитология и не трябва да се смесва с микрометастази (МИКМ).<sup>45</sup> Честотата на ОКМ при cN0 е от 24% до 42%.<sup>36,46</sup> Пациентите с ОКМ имат по-добра прогноза в сравнение с тези с клинично засегнати възли.<sup>6</sup> При T1 честота на ОКМ е ≤ 20%, при T2 е 20-30%. При T3 и T4 честотата на ОКМ е ≥ 30%.<sup>5</sup> При изследване на връзка между TP, TД и нивата на ОКМ се установява, че размер ≥ 2 cm е

неточен предиктивен фактор за туморното поведение, докато TД корелира по-добре с ОКМ и преживяемостта.<sup>47</sup> Локализацията на първичния тумор е свързана с риск от развитието на ОКМ. За карцином на език в T1N0 честотата на ОКМ е 30%, докато за пода на устната кухина е 20%.<sup>36,46,48</sup> Най-висока честота на ОКМ се наблюдава при плоскоклетъчен карцином на задна трета на език, където ОКМ са 61%.<sup>49</sup> Туморите на максиларна гингива, твърдо небце и устни имат ниски нива на ОКМ и при тях не се препоръчва елективна шийна дисекция (ЕЩД).<sup>48</sup> Други фактори, предсказващи развитиена ОКМ, са начин на инвазия, степен на лимфоплазмоцитна инфилтрация (ЛПИ), СХД, митотична активност.<sup>6</sup>

**Предиктивни фактори за окултни метастази.** Въпросът кои показатели предсказват развитие на окултни метастази на шията е обект на много изследвания. В идеалния случай тези предиктори трябва бъдат извлечени от проучвания, ограничени до пациенти с тумори T1/T2cN0. Предсказващи фактори за окултни метастази са дълбочина на инвазия (ДИ), туморна дебелина (TД) и моделът на инвазия (начин на инвазия). За карцином на език като предиктор за окултни метастази се приема туморната дълбочина на инвазия от 4 mm.<sup>50</sup> Не са установени окултни метастази при дълбочина на инвазия или туморна дебелина < 4 mm, докато честотата на окултните метастази е 41% при дълбочина на инвазия/туморна дебелина > 4 mm.<sup>51</sup> В научната литература туморната дълбочина на инвазия от 4 mm се посочва като предиктор за наличие на окултни метастази и се използва като основен критерий за провеждане на елективна шийна дисекция при T1N0 карцином на езика.

При карцином на под на устната кухина като критична за развитие на окултни метастази се посочва туморна дебелина от 1.5 mm.<sup>52</sup>



**Прогностично значение на дълбочината на инвазия и туморна дебелина.** Туморната дебелина се измерва като се реконструира въображаемо мукозната повърхност, за да се компенсират улцеративния или екзофитен растеж.<sup>32</sup> Начинът на растеж на тумора (екзофитен, ендофитен, улцеративен, инфилтративен) оказва влияние върху туморната дебелина и дълбочината на инвазия.<sup>53</sup>

ТД не винаги е еквивалент на дълбочината на инвазия, защото ТД зависи от начина на растеж на тумора и в случаите с улцерации не може да се оцени точно. В други случаи, туморът показва значителен екзофитен растеж с много малка дълбочина на инвазия и има биологично поведение на тумор с малка ТД.<sup>47</sup> Въпросът за ТД и дълбочината на инвазия остава отворен като двете понятия не са еквивалентни.<sup>54</sup>

Туморна дебелина > 3 mm е индикатор за лоша прогноза.<sup>55</sup> С нарастване на ТД директно се повишава рискът за развитие на ШЛМ.<sup>56</sup> При T1/T2N0 ПККУК се установява, че Т-категорията и ТД са статистически значими за развитие на ШЛМ. При ТД > 11 mm, 6-10 mm и ≤ 5 mm, честотата на ШЛМ е: 50%, 40% и съответно 30%.<sup>56</sup> Въпреки че ТД не е независим фактор, тя е ПФ за възникването на ШЛМ. ТД значително корелира с развитието на ШЛМ само в групата на Т1 и слабо за Т2 туморите.<sup>57</sup> ТД може да се използва като критерий за определяне на терапевтичния подход при Т1 и Т2 лезиите.<sup>57</sup>

### **Прогностично и предиктивно значение на биологични и молекулярни маркери при орален карцином**

**Ангиогенеза.** Малигнените тумори имат способността да индуцират растеж на нови кръвоносни съдове, които са ва-

жни за туморната прогресия, агресивност и метастазиране. *VEGF* – A,B,C,D (Vascular endothelial growth factor - A,B,C,D) играе решаваща роля за развитие на кръвоносни съдове и е ключов елемент в туморната ангиогенеза.<sup>58</sup> Намерена е корелация между експресията на подвидовете А и В с туморната ангиогенеза, както и между експресията на С и D и риска от нодално метастазиране.<sup>58</sup> Установена е значителна корелация между високата експресия на *VEGF* при ПККУК и лоша прогноза, но не е намерена никаква връзка между експресията на *VEGF* и шийното метастазиране.<sup>59</sup> Друго изследване открива връзка между експресията на *VEGF* и честотата на шийните метастази при орален карцином.<sup>60</sup> Приема се, че *VEGF* участва в процеса на ангиогенезата при орален карцином, но неговата предиктивна и прогностична стойност все още не е установена.<sup>61</sup>

**Туморна експресия на *cyclooxygenase-2* (COX-2).** Установена е силна връзка между COX-2 експресията и високи нива на метастазиране, рецидивирание и кратка преживяемост безболест.<sup>62</sup> COX-2 експресията при ПККУК се свързва с висока лъчерезистентност.<sup>63</sup>

**Молекулярни маркери.** Няколко генетични аберации са установени при ПККУК, най-често в хромозомите 3, 9, 11, 13, 17. Докладва се, че инактивирането на тумор-супресорни гени като p16 (9p21) и p53 (17p), свърхекспресията на онкогени като *PRAD-1* (11q) играят важна роля в канцерогенезата на оралния карцином.<sup>64</sup>

**Онкогени.** EGFR (Epidermal growth factor receptor) е гликопротеин и е един от *c-erbB* фамилия, включващи трансмембранни рецептори. Фамилията се състои от четири представителя EGFR (*c-erbB-1/HER-1*), *c-erbB-2* (HER-2/Neu), *c-erbB-3* (HER-3) and *c-erbB-4* (HER-4). EGFR се кодира от *EGFR* ген (*erbB1*), локализиран в хромозома 7 (7p13-



q22). Свърхекспресия на *EGFR* е наблюдавана в 30% от случаите с ПМКК. <sup>65</sup> Туморите на устната кухина, показващи свърхекспресия, отговарят по-добре на химиотерапия спрямо не-експресиращите тумори. Това е възможно, защото *EGFR*-експресиращите тумори показват висока пролиферативна активност. <sup>66</sup> Съвременни доклади съобщават, че анти-*EGFR*-антитела могат да бъдат полезни в лечението на тумори със свърхекспресия на *EGFR*. <sup>67</sup> Прогностичното значение на експресията на *EGFR* в ПМКК на устна кухина е противоречиво. Установена е значителна връзка между *EGFR*, *HER-2*, *HER-3* и *HER-4* и преживяемостта като *EGFR/HER-2/HER-3* са с най-голяма прогностична стойност за преживяемостта. <sup>68</sup> Приема се, че противоречивите резултати, докладвани в литературата, се дължат на липса на стандартизация на имунохистохимичните процедури.

**Cyclin D1.** Cyclin D1 заедно с cyclin-зависимите кинази (cyclin-dependent kinases; CDKs) са регулатори на прогресията на клетъчния цикъл. Продуктите на Cyclin D1 гена фосфорилират продуктите на гена на ретинобластома (*Rb*), индуциращи преминаването от G1 фаза в S фаза на клетъчния цикъл. Активността на Cyclin D1 се инхибира от различни тумор-супресорни гени, включващи *p16*, *p21* and *p27*. <sup>69</sup> Повишената експресия на Cyclin D1 в ПМКК корелира с по-напреднал стадий <sup>70</sup>, по-неблагоприятна прогноза (регионални метастази и ниска преживяемост). <sup>71</sup> Други не намират подобна връзка. <sup>72</sup>

**Тумор-супресорен ген: p53 ген.** Мутацията на тумор-супресорния ген *p53* е една от най-честата и най-изследваната геномна промяна при злокачествените неоплазми. <sup>73</sup> Генът *p53* е локализиран в късото рамо на хромозома 17 и кодира 53-kDa фосфопротеин, който регулира генната транскрипция, синтеза и репарацията на ДНК, както и

координацията на клетъчния цикъл и програмираната клетъчна смърт. <sup>74</sup> При оралния карцином, мутацията на *p53* гена възниква преди преминаване от неинвазивен към инвазивен карцином. <sup>75</sup> Диспластичните лезии, показващи свърхекспресия на *p53*, са с повишен риск от злокачествена трансформация. <sup>76</sup> Мутациите в *p53* при карциноми на глава и шия се свързват с висока туморна агресивност и лоша прогноза и в този смисъл експресията на *p53* е прогностичен маркер при орален карцином. <sup>77</sup>

**Тумор супресорен ген: p27 ген.** Генът *p27/KIP1* е локализиран в 12 хромозома (12p12-12p13.1) и има важна роля в задържане на G1 фазата. Регулира пролиферацията по пътя на инхибирана на G1 cyclin/CDK протеин киназата. Мутациите в *p27* са редки, но се описват при различни малигнени тумори. Намаление на силата на регулация на *p27* може да се свързва с повишена туморна агресивност и намалена преживяемост. <sup>78</sup> При нормален орален епител, клетките на спинозния и грануларния слой показват повишена ядрена експресия на *p27*. <sup>79</sup> Намаление на експресията на *p27* се установява при тежка епителна дисплазия; значително намаляване се описва при прогресия на лезията в ПМКК. <sup>80</sup> Тези изследвания внушават, че намаляването на експресията на *p27* възниква в ранните стадии на оралната канцерогенеза. Докладавано е по-агресивно туморно поведение, включващо повишен метастатичен потенциал и намалена преживяемост при намалена експресия на *p27*. <sup>81</sup>

**Клетъчнопролиферативни маркери. Ki-67 (MIB-1).** Антигенът Ki-67 е нехистотен нуклеарен протеин, експресиращ се във всички фази на клетъчния цикъл (G1, S, G2, M), но отсъства във фаза на клетъчен покой (G0). <sup>82</sup> Експресията на човешки Ki-67 протеин е строго свързана с клетъчната пролиферация. Ki-67 е биомаркер за определяне на фракцията на активно пролифе-

пиращи клетки в даден тумор. Ki-67 като биомаркер предоставя полезна информация за диференциране на по-агресивни неоплазми.<sup>83</sup> В научната литература съществуват противоречиви доклади относно прогностичното значение на Ki-67. Намерена е положителна корелация между интензивната Ki-67 експресия и хистологичната туморна степен, начина на инвазия, туморния размер и дълбочината на инвазия, нодалния статус и 5-годишната преживяемост.<sup>84</sup> Съществуват доклади, които не намират връзка между експресията на Ki-67 и преживяемостта при ПККУК.<sup>85</sup> По ново изследване установява, че ниските нива на Ki-67 в туморната тъкан при ПККУК са независим предиктор за дългосрочна преживяемост.<sup>86</sup>

**Маркери на апоптозата.** Протоонкогенът *Bcl-2*, локализиран в хромозома 18, е първият открит анти-апоптичен ген.<sup>64</sup> *Bcl-2* фамилията протеини се състои от промотори и инхибитори на апоптозата. Експресията на *Bcl-2*, *Bax* и *Bcl-X* може да се свърже с благоприятна прогноза при ПККУК.<sup>87</sup> По-високи нива на преживяемост се установява при пациенти, чиито тумори са негативни за *Bcl-2* и позитивни за *Bax*.<sup>88</sup>

**Маркери на инвазията и метастазизиране.** ПККУК се характеризира с агресивен инвазивен растеж и подчертана тенденция към метастазизиране.<sup>89</sup> Изследванията установяват, че патологична експресия на междуклетъчни адхезионни молекули като E-cadherin и клетъчно-извънклетъчни матрични адхезионни молекули като Laminin 5 са свързани с биологичното поведение на тумора. На този етап няма достатъчно доказателства за прогностичното значение на тези биомаркери.

## Заклучение

Въпреки че клиничните стадиращи системи не могат да оценят биологичното поведение на туморите и не могат да предскажат изхода, размерът на тумора и

нодалният статус към момента на диагноза остават най-важните прогностични фактори. От хистологичните показатели, дълбочината на инвазия/туморната дебелина, както и характеристиките на инвазивния туморен фронт имат най-голяма прогностична стойност. Като се има предвид, че карциногенезата е многофакторен и многостъпков процес изглежда, че много биологични маркери са свързани с прогнозата като на този етап няма единични биомаркери, които да са независими прогностични фактори.

Въпросът с намирането на прогностични фактори и предиктивни биологични маркери при оралния карцином продължава да е нерешен. Основната причина за това се крие в клиничната хетерогенност на болестта, малките и разпръснати изследвани групи, липсата на стандартизирани клинични, управленчески и лабораторни показатели. Комбинирането на традиционните хистологични показатели с биологичните и молекулярни маркери в ерата на базирана на доказателства медицина представлява предизвикателство за изследователите в стремежа за откриване на надеждни предиктори и прогностични фактори.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Bettendorf O, Piffko J, Bankfalvi A. Prognostic and predictive factors in oral squamous cell cancer: important tools for planning individual therapy? *Oral Oncol* 2004;40:110-119
2. Brandwein-Gensler M, Smith RV. Prognostic Indicators in Head and Neck Oncology Including the New 7th Edition of the AJCC Staging System. *Head and Neck Pathol* 2010; 4:53-61
3. de Bree R, Deurloo EE, Snow GB, et al. Screening for distant metastases in patients with head and neck cancer. *Laryngoscope* 2000;110:397-401
4. Bryne, M, Koppang HS, Lilleng R, Kjaerheim A. Malignancy grading of the deep invasive margins of oral squamous cell carcinomas has high prognostic value. *J Pathol* 1992; 166: 375-381

## ПРОГНОСТИЧНИ И ПРЕДИКТИВНИ ФАКТОРИ ПРИ ОРАЛЕН КАРЦИНОМ

---

5. Mendenhall WM, Million RR. Elective neck irradiation in squamous cell carcinoma of the head and neck: analysis of time-dose factors and causes of failure. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1986;12:741-746
6. Hiratsuka H, Miyakawa A, Nakamori K, et al. Multivariate analysis of occult lymph node metastasis as a prognostic indicator for patients with squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Cancer* 1997; 1;80(3):351-356
7. Amin MB. *AJCC Cancer Staging Manual 8<sup>th</sup> Edition*. Springer 2017.
8. Woolgar JA. Histopathological prognosticators in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2006;42:229-239
9. Leipzig B, Cummings CW, Chung CT, et al. Carcinoma of the anterior tongue. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1982; 91(1):94-97
10. Landis SH, Murray T, Bolden C, et al. Cancer statistics, 1999. *CA Cancer J Clin* 1999; 49(1): 8-31,1
11. Shah JP, Patel GP. *Head and neck surgery and oncology*. Mosby, New York 2003; 175-268
12. Pukander J, Karhuketo T, Penttila M, et al. Radical surgery for lingual cancer. *Clin Otolaryngol* 1990; 15:229-234
13. Woolgar JA, Triantafyllou A. A histopathological appraisal of surgical resection margins in oral and oropharyngeal cancer resection specimens. *Oral Oncol* 2005;41(10):1034-1043
14. Woolgar JA, Rogers S, West CR, et al. Survival and patterns of recurrence in 200 oral cancer patients treated by radical surgery and neck dissection. *Oral Oncol* 1999;35(3):257-265
15. Diniz FM, Garcia CT, Antunez LJ, et al. Pharmacodiagnostic evaluation of EGFR expression in oral squamous cell carcinoma. *Oral Dis* 2007; 13:285-290
16. O-charoenrat P, Pillai G, Patel S, et al. Tumour thickness predicts cervical nodal metastases and survival in early oral tongue cancer. *Oral Oncol* 2003;39(4):386-390
17. Lo WL, Kao SY, Chi LY, et al. Outcomes of oral squamous cell carcinoma in Taiwan after surgical therapy: factors affecting survival. *J Oral Maxillofac Surg* 2003;61:751-758
18. Guerra MFM, Gias LN, Campo FR, Perez JS. Marginal and segmental mandibulectomy in patients with oral cancer: a statistical analysis of 106 cases. *J Oral Maxillofac Surg* 2003; 61:1289-1296
19. Broders AC. The microscopic grading of cancer. *Surg Clin North Am* 1941; 21: 947
20. El-Husseiny G, Kandil A, Jamshed A, et al. Squamous cell carcinoma of the oral tongue: an analysis of prognostic factors. *Br J Oral Maxillofac Surg* 2000;38(3):193-199
21. Anneroth G, Batsakis J, Luna M. Review of the literature and a recommended system of malignancy grading in oral squamous cell carcinomas. *Scand J Dent Res* 1987;95(3):229-249
22. Jakobsson PA, Eneroth DM, Killander D, et al. Histologic classification and grading of malignancy in carcinoma of the larynx. *Acta Radiol Ther Phys Biol* 1973. 12: 1-8
23. Bryne M, Koppang HS, Lilleng R, et al. New malignancy grading is a better prognostic indicator than Broders' grading in oral squamous cell carcinomas. *J Oral Pathol Med* 1989;18:432-437
24. Bryne M, Jenssen N, Boysen M. Histological grading in the deep invasive front of T1 and T2 glottic squamous cell carcinomas has high prognostic value. *Virchows Arch* 1995; 427(3):277-281
25. Sawair FA, Irwin CR, Gordon DJ, et al. Invasive front grading: reliability and usefulness in the management of oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 2003;32:1-9
26. Constantinides P, Heiwitt D, Harkey M. Vessel invasion by tumour cells. An ultrastructural study. *Virch Arch A Pathol Anat Histopathol* 1989;415(4):335A16.
27. Kanae N, Michiko Y, Tamio N, et al. Vascular invasion in squamous cell carcinomas of human oral mucosa. *Oral Oncol* 2001; 37: 357-364
28. Sutton DN, Brown JS, Rogers SN, et al. The prognostic implications of the surgical margin in oral squamous cell carcinoma. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2003;32:30-34
29. Woolgar JA, Scott J, Vaughan ED, et al. Survival, metastasis and recurrence of oral cancer in relation to pathological features. *Ann R Coll Surg Engl* 1995;77:325-331
30. Soo KC, Carter RL, O'Brien CJ, et al. Prognostic implications of perineural spread in squamous carcinomas of the head and neck. *Laryngoscope* 1986; 96(10):1145-1148
31. McCregor AD, MacDonald DC. Patterns of spread of squamous cell carcinoma within the mandible. *Head Neck Surg* 1989; 11(5): 457-461
32. Woolgar JA, Scott J. Prediction of cervical lymph node

- metastasis in squamous cell carcinoma of the tongue/floor of mouth. *Head Neck* 1995;17(6):463-742
33. Fagan JJ, Collins B, Barnes L, D'Amico F, Myers EN, Johnson JT. Perineural invasion in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1998;124:637-640
  34. Shingaki S, Nagata M, et al. Prognostic significance of perineural invasion in oral and oropharyngeal carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2004;97:423-431
  35. Koo BS, Lim YC, Lee JS, Choi EC. Recurrence and salvage treatment of squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Oral Oncol* 2006; 42(8):789-794
  36. Byers RM, Wolf PF, Ballantyne AJ, et al. Rationale for elective modified neck dissection. *Head Neck Surg* 1988;10:160-167
  37. Woolgar JA, Rogers SN, Lowe D, Brown JS, Vaughan ED. Cervical lymph node metastasis in oral cancer: the importance of even microscopic extracapsular spread. *Oral Oncol* 2003; 39:130-137
  38. Greenberg JS, Fowler R, Gomez J, et al. Extent of extracapsular spread. A critical prognostic factor in oral tongue cancer. *Cancer* 2003;97:1464-1470
  39. Myers JN, Greenberg JS, Mo V, et al. Extracapsular spread. A significant predictor of treatment failure in patients with squamous cell carcinoma of the tongue. *Cancer* 2001; 92:3030-3036
  40. Hinerman RW, Mendenhall WM, Morris CG, et al. Postoperative irradiation for squamous cell carcinoma of the oral cavity: 35-year experience. *Head Neck* 2004;26:984-994
  41. Al-Rajhi N, Khafaga Y, El-Husseiny J, et al. Early stage carcinoma of oral tongue: prognostic factors for local control and survival. *Oral Oncol* 2000; 36(6):508-514
  42. Spiro RH, Guillaumondegui O Jr, Paulino AF. Pattern of invasion and margin assessment in patients with oral tongue cancer. *Head Neck* 1999; 21: 408-413
  43. Scholl P, Byers RM, Batsakis JG, et al. Microscopic cut-through of cancer in the surgical treatment of carcinoma of the tongue. Prognostic and therapeutic implications. *Am J Surg* 1986;152:354-360
  44. van Es RJ, van Nieuw Amerongen N, Slootweg PJ, et al. Resection margin as a predictor of recurrence at the primary site for T1 and T2 oral cancers. Evaluation of histopathologic variables. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1996; 122:521-525.
  45. Ferlito, AA, Shaha R, Rinaldo A. The incidence of lymph node micrometastases in patients pathologically staged N0 in cancer of oral cavity and oropharynx. *Oral Oncol* 2002; 38:35
  46. Kowalski LP, Magrin J, Waksman G, et al. Supraomohyoid neck dissection in the treatment of head and neck tumors. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1993;119:958-963
  47. Moore C, Flynn MB, Greenberg RA. Evaluation of size in prognosis of oral cancer. *Cancer* 1986;58:158-162
  48. Spiro RH, Huvos AG, Wong GY, et al. Predictive value of tumor thickness in squamous carcinoma confined to the tongue and floor of mouth. *Am J Surg* 1986; 152:345-350
  49. Gourin CG, Johnson JT. Surgical treatment of squamous cell carcinoma of the base of tongue. *Head Neck* 2001; 23(8):653-660
  50. Fakhri AR, Rao RS, Borges AM, Patel AR. Elective versus therapeutic neck dissection in squamous carcinoma of tongue: a prospective randomized trial. *Am J Surg* 1989;158:309-313
  51. Spornano A, Weinstein G, Chalian A, et al. Multivariate predictors of occult neck metastasis in early oral tongue cancer. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2004;131:472-476
  52. Mohit-Tabatabai MA, Sobel HJ, Rush BF, Mashberg A. Relation of thickness of floor of mouth stage I and II cancers to regional metastasis. *Am J Surg* 1986;152:351-353
  53. Platz H, Fries R, Hudec M, et al. The prognostic relevance of various factors at the first admission of the patient. Retrospective DOSAK study on carcinoma of the oral cavity. *J Maxillofac Surg* 1983; 11:3-12
  54. Jan GAM, de Visscher, Joris K, et al. Surgical Treatment of Squamous Cell Carcinoma of the Lower Lip: Evaluation of Long-Term Results and Prognostic Factors-A Retrospective Analysis of 184 Patients. *J Oral Maxillofac Surg* 1998;56(7):814-821
  55. Gonzalez-Moles M, Esteban F, Rodríguez-Archilla A, et al. Importance of tumour thickness measurement in prognosis of tongue cancer. *Oral Oncol* 2002; 38: 394-397
  56. Yamazaki H, Inoue T, Teshima T, et al. Tongue cancer treated with brachytherapy: is thickness of tongue cancer a prognostic factor for regional control? *Anticancer Res* 1998;18(2B):1261-1265



## ПРОГНОСТИЧНИ И ПРЕДИКТИВНИ ФАКТОРИ ПРИ ОРАЛЕН КАРЦИНОМ

---

57. O'Brien CJ, Laner CS. Tumor thickness influences prognosis at T1 and T2 oral cavity cancer-but what thickness? *Head Neck* 2003; 25:937-945
58. Shintani S, Li C, Ishikawa T, et al. Expression of vascular endothelial growth factor A,B, C, and D in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2004;40:13-20
59. Uehara M, Sano K, Ikeda H, et al. Expression of vascular endothelial growth factor and prognosis of oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2004;40:321-325
60. Moriyama M, Kumagai S, Kawashiri S, et al. Immunohistochemical study of tumor angiogenesis in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 1997; 33: 369-374
61. Schimming R, Reusch P, Kuschnierz J, Schmelzeisen R. Angiogenic factors in squamous cell carcinoma of the oral cavity: do they have prognostic relevance? *Int J Oral Maxillofac Surg* 2004; 32: 176-181
62. Itoh S, Matsui K, Furuta I, Takano Y. Immunohistochemical study on overexpression of cyclooxygenase-2 in squamous cell carcinoma of the oral cavity: its importance as a prognostic predictor. *Oral Oncol* 2003;39:829-835
63. Terakado N, Shintani S, Yano J, et al. Overexpression of cyclooxygenase-2 is associated with radioresistance in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2004;40:383-389
64. Scully C, Field JK, Tanzawa H. Genetic aberrations in oral or head and neck squamous cell carcinoma (SCCHN): 1. Carcinogen metabolism, DNA repair and cell cycle control. *Oral Oncol* 2000;36:256-263
65. Scully C. Oncogenes, tumor suppressor genes, and viruses in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 1993; 22: 337-347
66. Santini J, Formento JL, Francoual M, et al. Characterisation, quantification and potential clinical value of epidermal growth factor receptor in head and neck carcinomas. *Head Neck* 1991; 13: 132-139
67. Kutton NAA, Govard I, Bhak NM. Epidermal growth factor receptor (EGFR) in oral squamous cell carcinomas: over-expression, localization, and therapeutic implications. *Indian J Dent Res* 1997; 8: 9-18
68. Xia W, Lau YK, Zhang HZ, et al. Combination of EGFR, HER-2/neu, and HER-3 is a stronger predictor for the outcome of oral squamous cell carcinoma than any individual family members. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 4164-4174
69. Serrano M, Hannon GJ, Beach D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature* 1993; 366: 704-707
70. Angadi PV, Krishnapillai R. Cyclin D1 expression in oral squamous cell carcinoma and verrucous carcinoma: correlation with histological differentiation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2007;103:e30-35
71. Kuo MYP, Lin CY, Hahn LJ, et al. Expression of cyclin D1 is correlated with poor prognosis in patients with areca quid chewing related oral squamous cell carcinomas in Taiwan. *J Oral Pathol Med* 1999; 28: 165-169
72. Lam KY, Ng IOL, Yuen APW, et al. Cyclin D1 expression in oral squamous cell carcinomas: Clinicopathological relevance and correlation with p53 expression. *J Oral Pathol Med* 2000; 29:167-172
73. Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. p53 mutations in human cancers. *Science* 1991; 253: 249-253
74. Hardisson D. Molecular pathogenesis of head and neck squamous cell carcinoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2003; 260: 502-508
75. Sidransky D, Boyle J, Koch W. Molecular screening: Prospects for a new approach. *Arch Head Neck Surg* 1993; 119: 1187-1190
76. Cruz I, Napier SS, van der Waal I, et al. Suprabasal p53 immunoexpression is strongly associated with high grade dysplasia and risk for malignant transformation in potentially malignant oral lesions from Northern Ireland. *J Clin Pathol* 2002; 55: 98-104
77. Nylander K, Dalbasteen E, May PA. The p53 molecule and its prognostic role in squamous cell carcinomas of the head and neck. *J Oral Pathol Med* 2000; 29: 413-425
78. Kawamata N, Moresetti R, Miller CW, et al. Molecular analysis of the cyclin-dependent kinase inhibitor gene p27/kip1 in human malignancies. *Cancer Res* 1995; 55: 2266-2269
79. Kudo Y, Kitajima S, Ogawa I, et al. Down-regulation of Cdk inhibitor p27 in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2004; 41: 105-116
80. Shintani S, Mihara M, Nakahara Y, et al. Expression of cell cycle control proteins in normal epithelium, premalignant and malignant lesions of oral cavity. *Oral Oncol* 2002; 38: 235-243
81. Kudo Y, Takata T, Yasui W, et al. Reduced expression



- of cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 is an indicator of malignant behavior in oral squamous cell carcinoma. *Cancer* 1998; 83: 2447-2455
82. Bullwinkel J, Baron-Luhr B, Ludemann A, Wohlenberg C, Gerdes J, Scholzen T. Ki-67 protein is associated with ribosomal RNA transcription in quiescent and proliferating cells. *J Cell Physiol* 2006; 206: 624-635
83. Myoung H, Kim MJ, Lee JH, et al. Correlation of proliferative markers (Ki-67 and PCNA) with survival and lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma: a clinical and histopathological analysis of 113 patients. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2006; 35: 1005-1010
84. Bettendorf O, Herrmann G. Prognostic relevance of Ki-67 antigen expression in 329 cases of oral squamous cell carcinoma. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 2002; 64:200-205
85. Lee JI, Jin BH, Kim MA, et al. Prognostic significance of CXCR-4 expression in oral squamous cell carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2009; 107: 678-684
86. Klimowicz AC, Bose P, Nakoneshny SC, et al. Basal Ki67 expression measured by digital image analysis is optimal for prognostication in oral squamous cell carcinoma. *Eur J Cancer* 2012; 48: 2166-2174
87. Camisasca DR, Honorato J, Bernardo V, et al. Expression of Bcl-2 family proteins and associated clinicopathologic factors predict survival outcome in patients with oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2009; 45: 225-233
88. Zhang M, Zhang P, Zhang C, et al. Prognostic significance of Bcl-2 and Bax protein expression in the patients with oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 2009; 38: 307-313
89. Yamamoto E, Miyakawa A, Kohama G. Mode of invasion and lymph node metastasis in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Head Neck Surg* 1984; 6: 938-947

////////////////////////////////////  
**BRCA-МОДЕЛИРАНЕ НА РИСК И ЛЕЧЕНИЕ ПРИ  
КАРЦИНОМ НА ГЪРДА/ОВАРИАЛЕН КАРЦИНОМ**  
////////////////////////////////////

**чл. кор. проф. д-р Драга Тончева, дбн<sup>1,2</sup>**  
**д-р Радослава Въжарова, дм<sup>2</sup>**  
**доц. д-р Савина Хаджидекова, дм<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Катедра по медицинска генетика, Медицински университет, София

<sup>2</sup>СБАЛГАР Д-р *Малинов*, София



# BRCA-МОДЕЛИРАНЕ НА РИСК И ЛЕЧЕНИЕ ПРИ КАРЦИНОМ НА ГЪРДА/ОВАРИАЛЕН КАРЦИНОМ

*ил. кор. проф. д-р Драга Тончева, дбн<sup>1,2</sup>  
д-р Радослава Вържарова, дм<sup>2</sup>  
доц. д-р Савина Хаджидекова, дм<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Катедра по медицинска генетика, Медицински университет, София

<sup>2</sup>СБАЛГАР Д-р Малинов, София

## ОБЗОР

*Статията представя двата основни гена BRCA1 и BRCA2, свързани с развитие на наследствени и спорадични форми на карцином на гърда и яйчник. Анализирани са молекулните пътища, в които те функционират в норма в патология. Характеризирани са типа на вариантите в двата гена и тяхното значение за създаване на предразположеност към развитие на злокачествена клетъчна трансформация. Определен е рискът и поведението при носителство на генни мутации. Описани са нововъведените инхибитори на PolyADP-ribose полимеразни инхибитори – PARP, които са таргетни терапии за пациенти с овариален карцином с BRCA патогенни мутации. Накрая са представени резултати от собствени изследвания на български пациенти.*

## Увод

Нормалната функция на гените BRCA1 и BRCA2 гени може да бъде нарушена в резултат на герминативни/соматични мутации, ниска експресия или промоторно метилиране. Добре известна е ролята на герминативните мутации в един от двата гена за създаване на наследствена предразположеност към карциноми на гърда и яйчник.<sup>1</sup>

Голям брой проучвания показват, че карциномите на гърда сBRCA1/2 патогенни мутации имат по-агресивен фенотип от тези, които носят див тип гени: те често са естроген-рецептор-негативни,

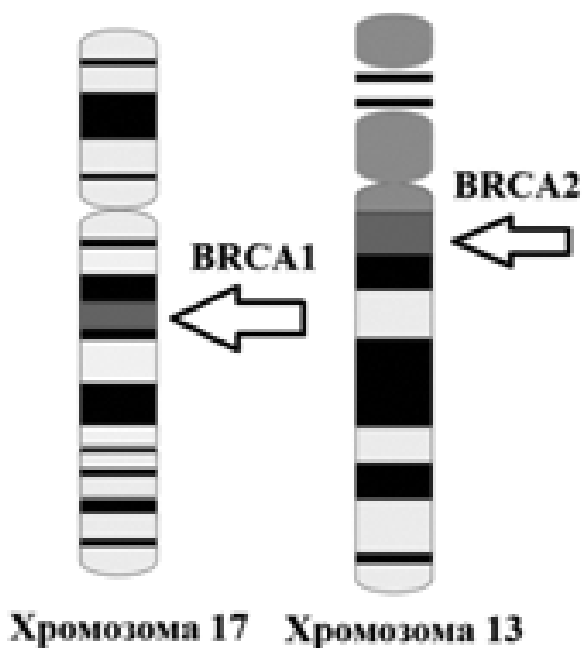
високостепенни и с по-висока честота на соматични мутации, определящи по-лоша прогноза и преживяемост. Получените резултати са противоречиви. При системен анализ на публикуваните литературни данни Alexandra Van der Broeket al. доказват, че носителството на BRCA1 мутации повлиява в умерена степен преживяемостта без прогресия.<sup>2</sup>

Продължават да са разнопосочни и данните за ролята на BRCA гени с нарушена функция за прогнозата при пациенти с епителен овариален карцином. Преобладават доказателства за по-добра преживяемост на пациентите, но тези данни трябва да бъ-

дат потвърдени. Възможно обяснение за позитивна връзка между мутационния статус на *BRCA1/2* гените, преживяемостта без прогресия (PFS) и общата преживяемост (OS) е, че клетките с патогенни мутации не могат да коригират двуберижни разкъсвания в ДНК молекулата по механизма на хомоложната рекомбинантност и са почувствителни към химиотерапия.<sup>3</sup> Пациенти с *BRCA* мутации са показани за таргетна терапия на овариални карциноми с PARP инхибитори – *olaparib*. Герминативните мутации в *BRCA* гените са само в 10-15% от епителните овариални карциноми, но тяхната честота е много по-висока – до 30% при високостепенни, серозни, платина-чувствителни карциноми. Соматичните мутации в овариалните карциноми също са индикация за провеждане на таргетна терапия.

### **BRCA гени**

*BRCA* гените са тумор-супресорни гени. Те са локализирани в хромозоми 17 и 13 (Фиг.1).



Фигура 1. Хромозомна алокализация на гените *BRCA1* и *BRCA2*.

При нормална активност, гените участват в процесите на поправка на двуберижни нарушения в структурата на ДНК и осигуряват стабилност на генетичния материал в клетките. Процесът на корекция се осъществява съвместно с други белтъци, които са продукти на гените *CHK2*, *FANCD2* и *ATM*. При мутация в един от двата *BRCA1* и *BRCA2* гена, водеща до синтез на функционално неактивен протеин, не може да се получи прецизна корекция на ДНК дефекта. Резултатът е натрупване на допълнителни структурни нарушения в ДНК молекулата, които насочват клетката по пътя на злокачествена трансформация.

Патогенните мутации в гените *BRCA1* или *BRCA2* се предават в потомството с риск 50% и създават предразположеност към карцином на гърда (5-10% от всички и 20-25% от наследствените карциноми на гърда), овариален карцином (15%) и към наследствен карцином на гърда-яйчник (*HBOC* – *Hereditary breast-ovarian cancer syndromes*) (40-50%).<sup>4</sup> По-рядко (10%) болните с *HBOC* имат мутации в групи гени: *TP53*, *PTEN*, *PALB2*, *CHEK2* и *STK11*, а в останалите случаи вероятно играят роля неизвестни гени.<sup>5</sup> Жени на възраст 70 г., носителки на герминативна патогенна *BRCA1* мутация имат висок риск за развитие на карцином на гърда (55-60%) или на яйчник (39%), а ако носят *BRCA2* мутация, рискът е съответно 45% и 11-17%.<sup>6,7</sup>

Карциномите на гърда и на яйчник, асоциирани с *BRCA* патогенни мутации, се развиват в по-млада възраст.

Патогенни мутации в *BRCA1* и *BRCA2* гените създават риск за развитие на други карциноми. При жени нефункционалният *BRCA1* протеин повишава риска за карцином на Фалопиеви тръби и перитонеален карцином. При мъже мутациите в един от двата гена се асоциират с карциноми на гърда и на простата. При мъже и жени мутациите по-



вишават риска за карцином на панкреаса. В хомозиготно състояние, *BRCA2* мутациите са свързани с анемия на Фанкони – подтип FA-D1, а *BRCA1* мутации – с Фанкони – подтип FANCS.

Рискът за носителство на *BRCA* мутация може да бъде лесно изчислен с калкулатор на Myriad ([www.myriadpro.com/brca-risk-calculator/calc.html](http://www.myriadpro.com/brca-risk-calculator/calc.html)). Честотата на патогенните мутации в двата гена при фамилна история на болестта (най-малко един родственик от първа или втора степен на родство) може да се вземе от таблица на интернет адрес (<https://s3.amazonaws.com/myriad-library/brac/brca-prevalence-tables.pdf>).

### **BRCA-моделiranje на риска при карцином на гърда/овариален карцином**

Наследените мутации в *BRCA1* и *BRCA2* повишават доживотния риск за развитие на карцином на гърдата и/или на яйчниците при *BRCA*-позитивни пациенти.

**BRCA-моделiranje на риска при позитивни жени.** Рискът за здрави жени, но носители на патогенни мутации, може да бъде редуциран със следните специфични профилактични мерки и с профилактична хирургия (NCCN Guidelines Version 2.2016; BRCA-Related Breast and/or Ovarian Cancer Syndrome; [www.tri-kobe.org/nccn/guideline/gynecological/english/genetic\\_familial.pdf](http://www.tri-kobe.org/nccn/guideline/gynecological/english/genetic_familial.pdf)):

- съобщаване на носителство на патологична мутация при навършване на 18 годишна възраст;
- клиничен преглед на гърдите на всеки 6-12 месеца с начало от 25-годишна възраст (няма рандомизирано проучване);
- скрининг на гърдите<sup>8</sup>:
  - на 25–29 години – ежегодно изследване на гърдите чрез магнитно-

зонансна томография (МРТ скрининг) или мамография; при жени с фамилна история и ранно начало на карциноми на гърда – към 30 годишна възраст;

- на 30–75 години – ежегодно изследване на гърдите с МРТ скрининг и мамография;
- на > 75 години проследяването се определя индивидуално;
- при жени с *BRCA* мутация, лекувани за карцином на гърдата, следва да се прави ежегодно изследване на гърдите с МРТ и мамография на остатъчната тъкан от гърдата;
- консултация и обсъждане на риск-редуцираща мастектомия – степен на протекция, възможности за реконструкция и риск;
- препоръки за риск-редуцираща салпинго-оофоректомия (RRSO) след приключване на репродукцията при пациентки на 35-40 години с *BRCA1* мутации и на 40–45 години с *BRCA2* мутации, преминали през превантивна билатерална мастектомия – (2015 College of American Pathologists, CAP).
  - консултация – обсъждане на степен на риск за карцином, степен на протекция, за карцином на гърда/яйчник, проследяване на менопаузални симптоми, кратка хормон-заместваща терапия и други медицински проблеми;
  - самостоятелната салпингектомия не е стандарт за редуция на риска, тъй като остава риск за развитие на карцином на яйчник. При пременопаузални жени оофоректомията редуцира риска за карцином на гърдата с до 50% в зависимост от възрастта на жената;

- обсъждане на физиологични/социални аспекти и качество на живот при жени с риск редуцираща мастектомия и/или салпинго-оофоректомия;
- не се препоръчва рутинен скрининг на яйчници при жени, които не приемат извършване на RRSO. Трансвагиналният ултразвук не се препоръчва, тъй като не е достатъчно чувствително изследване, но при 30–35 годишни жени може да се прави;
- серумният СА-125 е допълнителен скринингов тест за овариален карцином с условности, подобни на трансвагиналният ултразвук;
- обсъждане наобразни и скринингови изследвания в рамките на клинични проучвания при нови технологии и тестове<sup>9</sup>;
- обсъждане на ефекта на лекарства, редуциращи риска за карцином на гърда/яйчник ([www.tri-kobe.org/nccn/guideline/gynecological/english/genetic\\_familial.pdf](http://www.tri-kobe.org/nccn/guideline/gynecological/english/genetic_familial.pdf))

*Риск редуциращ ефект на tamoxifen, raloxifene*

- редуцират риска в постменопаузални жени;
- няма достатъчно данни, че редуцират специфично риска за развитие на контралатерален карцином на гърда при пациентки с *BRCA1/2* мутации, лекувани за карцином на гърда.<sup>10-15</sup> При *BRCA1* позитивни пациентки рискът за контралатерален тумор е 83%, а при *BRCA2* е 62%<sup>16</sup>;
- противоречиви са данните за протективен ефект при жени с *BRCA1/2* мутации, преминали през оофоректомия;
- няма данни за протективен ефект, свързан с туморния естроген-рецепторен статус.

При жени с *BRCA1* мутации, *tamoxifen* не редуцира риска за карцином на гърда, докато при *BRCA2* мутации редуцията на риска е 62%.<sup>17</sup>

Вероятно този факт може да се обясни с по-високата честота на патогенни мутации в *BRCA1* при естроген-рецептор-негативни тумори, в сравнение с естроген-рецептор-позитивни тумори, но данните трябва да бъдат потвърдени. Получени са резултати за полиморфизми в гените *ZNF423* и *CTSO*, които при носители на *BRCA1* мутации са свързани с протективен ефект на селективни естроген-рецепторни модулатори.<sup>18</sup>

*Риск редуциращ ефект на орални контрацептиви.* Данните от метаанализи доказват, че оралните контрацептиви намаляват риска за развитие на карцином на яйчник при носителство на *BRCA1* или *BRCA2*<sup>19-21</sup>; получени са противоречиви данни по отношение на техния протективен ефект срещу карцином на гърда при носители на *BRCA1/2* мутации, а при два метаанализа се доказва липса на свързаност.

***BRCA-моделиране на риска при позитивни мъже.*** Обучение за самостоятелно изследване на гърдите след 35 годишна възраст; клиничен преглед на гърдите на всеки 12 месеца с начало от 35 годишна възраст; на 40 години се препоръчва скрининг за карцином на простата при носители на *BRCA-2* патогенни мутации; обсъжда се скрининг за карцином на простата при носители на *BRCA1* патогенни мутации.

***BRCA-моделиране на риска при позитивни мъже и жени.*** Обучение за симптомите на карциноми, свързани с *BRCA* мутации. Няма специфични препоръки за скрининг за карцином на панкреас и меланом, но може да се обсъжда индивидуално според фамилната история.

***Риск за родственици на BRCA позитивни лица.*** Съвет за съществуващ 50%

риск за наследяване на *BRCA* патогенни мутации от родители, възможности за определяне на риска и поведение при носителство на мутация; препоръки за медико-генетично консултиране и обсъждане на генетичен тест за определяне на носителски статус при високо-рискови родственици.

**Възможности за репродукция *BRCA* позитивни лица.** Обсъждане на възможности за пренатална диагностика и за предимплантационна генетична диагностика – риск, ограничения и ползи от изследванията.

При пациенти с герминативна мутация съществува 50% риск за предаване на мутацията в потомството. Индивиди, носители на наследствени мутации, предразполагащи към злокачествени болести, могат да имат психологични проблеми относно последиците от генетичния им статус. Поради висок риск от 50% за предаване на мутацията на потомството някои двойки се въздържат от репродукция. Друга алтернатива е осигуряване или забременяване с донорски материал. Възможно е провеждане на пренатална диагностика за установяване на генетичния статус на плода и прекъсване на бременността по медицински показания при доказване на мутация. Това от една страна повдига етични проблеми, тъй като се касае за болест с късно начало, а от друга страна – инвазивните вътрематочни манипулации са свързани с риск за самата бременност.

**Предимплантационна генетична диагноза.** Понастоящем предимплантационната генетична диагноза (ПГД) предлага нов подход за превенция без да се разчита на случайността за забременяване със здраво бебе или травмиращ аборт при засегнат плод. ПГД дава възможност при провеждане на витро оплождане да се изберат за трансфер ембриони без мутация и жената да забременее с бебе без патологичната мутация.

ПГД представлява ранен метод за откриване на редица генетични аномалии в ем-

бриона преди той да се имплантира в матката, като по този начин се избягва прилагане на медицински аборт, ако ембрионът е засегнат. Осъществява се чрез изследване на I-вото или II полярно телце (прилага се, ако мутацията се носи от майката), бластомер след биопсия на тридневни ембриони или биопсия на трофектодермални клетки на пети ден след оплождането. След цялостното геномно амплифициране на ДНК от биопсичния материал се прилагат различни видове генетичен анализ в зависимост от търсената мутация.

Недостатъци на метода са: i) мутацията не е самата болест, а само рисков фактор за развитие на карциноми в по-късна възраст; има начини носителите на мутации значително да намалят болестния риск на по-късен етап от живота си; ii) диагностиката се ограничава само до конкретната патологична мутация и не отразява други генетични фактори, които може да водят до предразположение към злокачествена болест; iii) изборът на ембриони без мутации не е гаранция, че индивидът никога няма да развие карцином или други сериозни болести през живота си; iv) съществуват етични проблеми относно унищожаването на ембриони, носители на мутация; v) все още няма сигурни данни дали хормоналната стимулация на яйчниците води до по-голям риск при жени-носителки на наследствени мутации за злокачествени болести.

***BRCA*-моделiranje на лечението при карцином на гърда/овариален карцином**

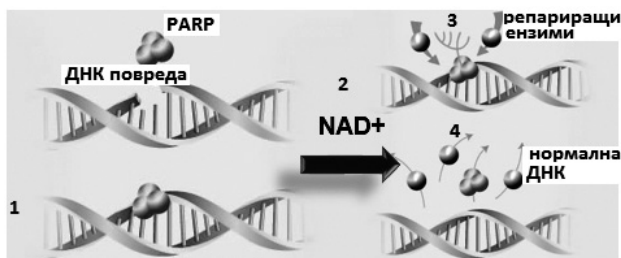
При авансирал овариален карцином се извършва хирургично отстраняване на тумора, но микронодули и туморни колонии в перитонеалната кухина остават нетретирани. Най-голямото клинично предизвикателство за лечение на овариалния карцином пред съвременните онколози е късната диагноза и бързото рецидивирание на болестта, ниската 5-годишна преживяемост на паци-

ентите и липсата до скоро на таргетна терапия.

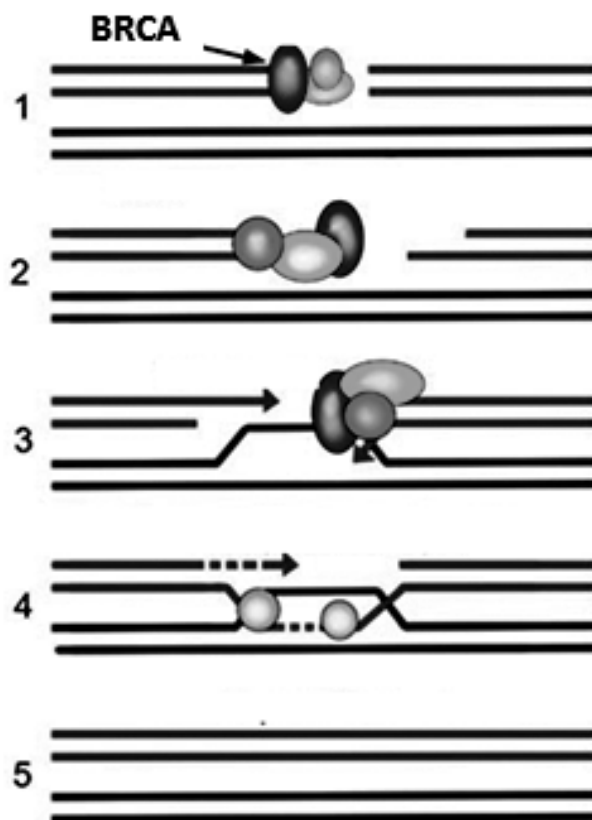
Човешкият геном е непрекъснато подложен на действието на йонизираща радиация, UV лъчи и химични агенти, които предизвикват структурни повреди в ДНК и репликационни грешки. Нарушенията в ДНК структурата се коригират при едноверижни разкъсвания от PARP протеина, а при двуверижни разкъсвания – от BRCA протеините.

PARP протеинът играе роля за възстановяване на едноверижни разкъсвания на ДНК молекулата (SSB) по механизма на замяна на дефектния нуклеотид с нормален (BER – механизъм) (Фиг.2). PARP се свързва директно с ДНК в мястото на нарушението (1), присъединява NAD (2), образува голяма разклонена верига от poly-ADP-рибоза, която свързва други ДНК репарирани ензими (3) и коригира нарушението (4). След това настъпва дисоциация на сборните протеини.

Двуверижните разкъсвания се коригират от BRCA протеини по механизма на хомоложна рекомбинация (Фиг.3). Двама протеина BRCA1 и BRCA2 се придвижват към мястото на ДНК нарушението (1), включват се в дефектната зона (2) и организират репаративни протеини (3). Те извършват резекция на ДНК. Интактното ДНК копие инвазира в нарушената верига и служи като матрица за поправка на нарушението в повредената верига чрез синтез на ДНК върху



Фигура 2. Корекция на едноверижни ДНК нарушения чрез изрязване и замяна на дефектен нуклеотид – BER.



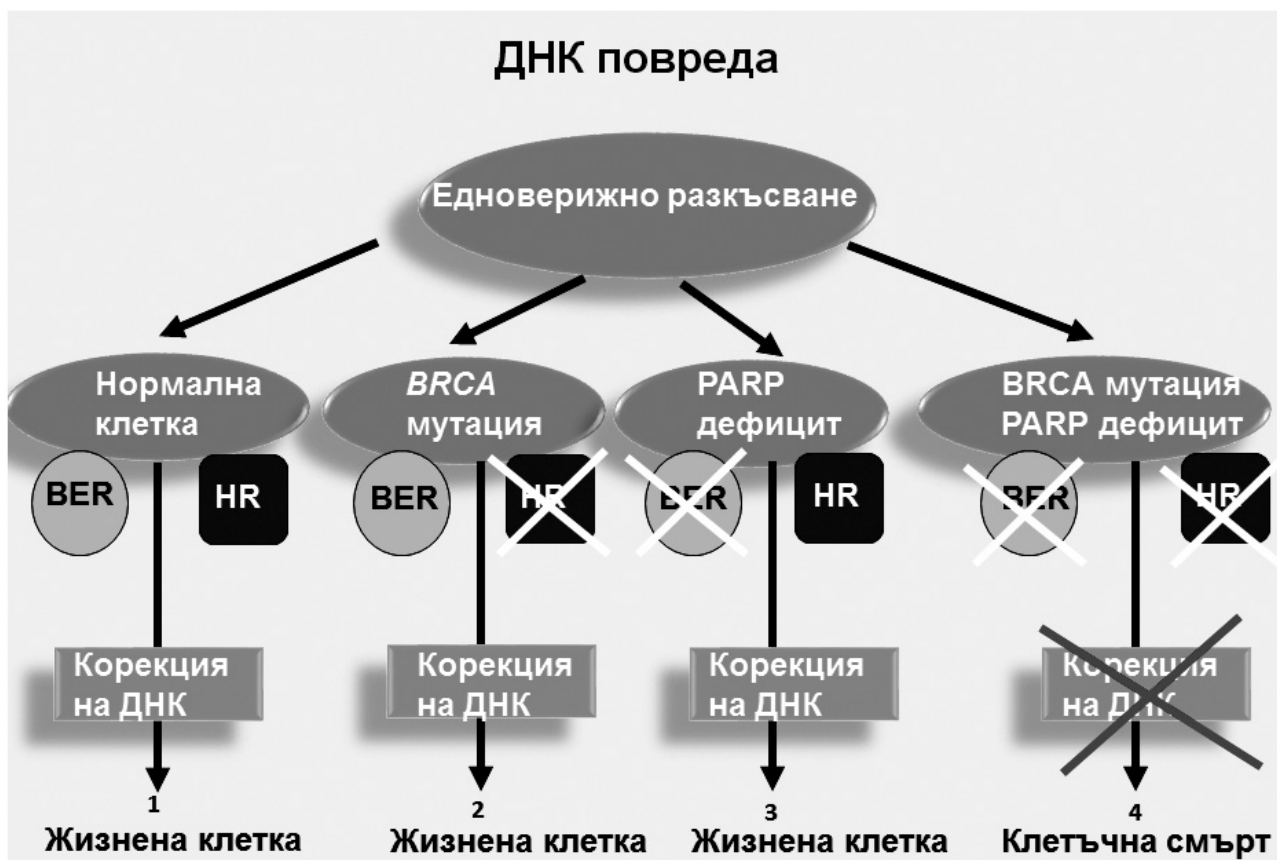
Фигура 3. Корекция на двуверижни ДНК нарушения чрез хомоложна рекомбинация (HR).

празнината (4). Получава се точна корекция на ДНК увредата (5).

Грешките в ДНК могат да бъдат коригирани (Фиг. 4) и клетките оцеляват при:

- Нормална функция на BRCA и PARP се справят със структурните нарушения (1).
- Патогенна мутация в BRCA гените, водеща до елиминиране на механизма на хомоложна рекомбинация (HR) и нормална активност на PARP протеина с нормално функциониращ BER механизъм (2).
- При премахване на BER механизма в резултат от намалена или липсваща активност на PARP протеина, но активен HR механизъм, при див тип BRCA гени (3).
- Грешките в ДНК не могат да бъдат ко-





Фигура 4. Молекулни механизми BER и HR за репарация на ДНК нарушения.

ризиран и клетките загиват при спиране на действието на BER и HR механизми (4).

**Таргетна терапия с Poly-ADP ribose polymerase (PARP) инхибитори.** PARP инхибиторите са модерна таргетна терапия на пациенти с високостепенен серозен, платина-чувствителен овариален карцином, позитивен за BRCA мутации. Те инхибират активността на PARP протеина като се свързват с каталитичния домейн, който е един от важните функционални райони на гена.

Грешките в ДНК не могат да бъдат коригирани при патогенна мутация в BRCA1 или BRCA2 гените и едновременно с това специфично подтисна функция на PARP от инхибитори (4). Присъствието на инхибитор прекъсва връзката на PARP с репараци-

онните ензими, едностранното разкъсване не може да се поправи, получава се колапс на ДНК и се формира двустранно разкъсване.<sup>22-24</sup> При нефункциониращи BRCA протеини не може да се извърши корекционна двустранното разкъсване по механизма на хомоложната рекомбинация и се натрупват допълнителни ДНК нарушения. Карциномни клетки с BRCA мутация загиват под действие на PARP-инхибитори.

**Таргетна терапия при карцином на яйчник.** Lynparza™ (Olaparib, AstraZeneca) е първият одобрен от FDA орален ADP-ribose polymerase (PARP) инхибитор за таргетна терапия на BRCA дефицитни, високостепенни платина-чувствителни карциноми на яйчник.<sup>25-28</sup> Медикаментът се прилага след генетично тестване при определена група



пациенти, които имат наследена или соматична мутация в *BRCA1* или *BRCA2* гени. Според препоръките на ESMO пациентки с високостепенен овариален карцином трябва да бъдат тествани за герминативна *BRCA*-мутация, а при липса – може да се обмисли изследване за соматична мутация, която се открива при 5-7% от случаите.

Клинично проучване 19 е проведено с цел да се оцени ефикасността и профила на безопасност на *olaparib* като поддържащо лечение на пациентки с чувствителен на платина рецидивирал *BRCAt+* карцином на яйчници. Дизайнът на проучването е рандомизирано двойно-сляпо плацебо-контролирано фаза II с първична крайна цел – преживяемост без прогресия на болестта. Резултатите от изследването показват, че *olaparib*<sup>29</sup>:

- подобрява с 6.9 месеца медианата на PFS и намалява риска от прогресия на болестта или смърт в 82% в сравнение с плацебо;
- забавя необходимостта от последваща терапия при *BRCAt+* пациентки (TSST е с 8.6 месеца по-дълго) в сравнение с плацебо;
- има дългосрочна ефикасност;
- добре поносима терапия без негативен ефект върху качеството на живот на пациентите;
- приемлив профил на безопасност и поносимост, подходящ за продължително поддържащо лечение.

**Таргетна терапия при карцином на гърда.** Резултатите от фаза III клинично проучване *OlympiAD* са представени на годишната среща на ASCO в Чикаго, 2017. В него са включени пациенти с наследствени *BRCA* мутации и метастатичен карцином на гърдата, който е хормон-рецептор-позитивен или тройно-негативен за естрогенен, прогестеронов и HER2 рецептор. Всички пациенти предварително са получили два курса химиотерапия за метас-

татична болест, а хормон-рецептор-позитивните пациенти са получили и ендокринно лечение. Пациентите на случаен принцип са получили *olaparib* – таблетки по 300 mg, два пъти дневно или стандартна химиотерапия (*capecitabine*, *vinorelbine* или *eribulin*).

Най-важните резултати от това клинично проучване са:

- туморният обем намалява при 60% от пациентите, лекувани с *olaparib* в сравнение с 29% от пациентите на химиотерапия;
- пациентите, лекувани с *olaparib* имат 42% по-нисък риск за прогресия на болестта в сравнение с тези на химиотерапия (средно 7.0 срещу 4.2 месеца);
- времето до втора прогресия е по-дълго при пациентите на *olaparib*, което показва, че при спиране на лекарственото действие карциномът не става по-агресивен;
- страничните ефекти при лечение с *olaparib* са по-малко (37% – предимно гадене и анемия) в сравнение с химиотерапията (50% – основно неутропения, анемия, умора, обриви). Само при 5% от пациентите се налага спиране на лечението с *olaparib* поради странични ефекти.

Тези оптимистични резултати са в подкрепа на терапията с *olaparib* и вероятно ще бъдат потвърдени и в последствие за лечение на метастатичен карцином на гърда.

## Собствен опит в генетични тествания със секвениране от ново поколение (NGS)

**Мутационен спектър на пациентки с овариален карцином.** Генетичното тестване е направено с *Illumina TruSight Cancer Panel*, с който са анализирани екзоните на 94 гени и 284 единични нуклеотидни замени,

## BRCA-МОДЕЛИРАНЕ НА РИСК И ЛЕЧЕНИЕ ПРИ КАРЦИНОМ НА ГЪРДА

Таблица 1. Патогенни мутации при пациенти с овариален карцином.

| Ген   | Мутация                         | rsID        |
|-------|---------------------------------|-------------|
| BRCA1 | NP_009231.2:p.Gln1777ProfsTer74 | rs80357906  |
| PPM1D | NP_003611.1:p.Leu484Ter         | -           |
| BRCA1 | NP_009231.2:p.Gln1777ProfsTer74 | rs80357906  |
| BRCA1 | NP_009231.2:p.Gln1777ProfsTer74 | rs80357906  |
| BRCA2 | NP_000050.2:p.Val2151PhefsTer17 | rs886038148 |
| BRCA1 | NP_009231.2:p.Lys653SerfsTer47  | rs397508923 |
| BRCA1 | NP_009231.2:p.Cys47Arg          | rs80357370  |
| BRCA1 | NP_009231.2:p.Gln1777ProfsTer74 | rs80357906  |

асоциирани с карциномни болести. Изследването е направено с секвениране от ново поколение (NGS) на *MiSeq* платформа в СБАЛ-ГАР „Д-р Малинов“. NGS технологията предлага големи възможности за мултигенноизследвания и определяне на мутационния спектър на голям брой гени, свързани с карциномна патология.

При секвениране на ДНК-и, получени от кръвни проби на 24 жени, са установени патогенни мутации в 8 от тях (33%) и варианти с неизвестно клинично значение в 8 (33%)<sup>30</sup> (Табл. 1).

Шест пациентки (25%) са носителки на патогенни мутации в *BRCA1* гена: четири имат една и съща мутация (rs80357906), инсерция на един нуклеотид, водеща до промяна на рамката на четене. След мястото на мутацията генният продукт – протеинът има напълно различна структура в сравнение с нормата. Две от изследваните пациентки имат съответно делеция на четири нуклеотиди и миссенс мутация в консервативен район: rs397508923 и rs80357370. Една пациентка носи патогенна мутация в *BRCA2* гена – rs886038148.

Пациентките с *BRCA* герминативни мутации са насочени за таргетна терапия с *olaparib*. В един от случаите е доказана рядка нонсенс мутация в гена *PPM1D* (NP\_003611.1:p.Leu484Ter), водеща до образуване на преждевременен стоп кодон. Генът

кодира протеина фостфатаза 2С изоформаделта. Той се експресира от p53 при стресови въздействия от околната среда – йонизираща радиация. Функционални проучвания показват, че при стоп мутации вместо загуба на активност, генът се активира, придобива функция и обратно супресира p53-свързана транскрипция и апоптоза. Данните на *Ruark Eliseet al.* доказват, че промененият *PPM1D* протеин играе роля за карциноми на яйчник и гърда и има значение за определяне на риска и поведението на тези тумори.<sup>30</sup>

В групата на пациентките ни са разкрити варианти с неизвестно клинично значение (VUS) в следните гени: *BRIP1*, *DICER1*, *FLCN*, *GATA2*, *MUTYH*, *NBN* и *PALB2*. Всички варианти са много редки миссенс мутации. Според функционални предиктори, те водят до нарушена нормална функция на протеините и вероятно определят известна предиспозиция към овариален карцином. Необходимо е да се направи функционален анализ, за да се определи техният ефект върху функцията на протеини.

**Мутационен спектър на пациентки с карцином на гърда.** За първи път у нас са изследвани с NGS технология 24 пациентки с карцином на гърда и фамилна история на болестта и 71 здрави контроли от същата възрастова група (средна възраст 35±10 години). Използван е панел от гени на *Illumina, TruSeq CustomAmplicon*.<sup>32</sup> Определени са голям брой варианти в *BRCA1* и *BRCA2* гени. В групата на пациентите е установен патологичен вариант в *BRCA2* с хромозомна позиция chr13:32890665, който засяга първия нуклеотид в 5' сплайсинг района след втори екзон и един вероятно патологичен вариант с три нуклеотидна делеция, водеща до загуба на валин на 1688 място. В контролната група са определени 2 варианта с неизвестно клинично значение, съответно в *BRCA1* и в *BRCA2* гени.

## Медикогенетична консултация за изследване на *BRCA* патогенни мутации

Въвеждането на таргетна терапия при високостепенен серозен овариален карцином за носители на герминативни или соматични патогенни *BRCA* мутации разкрива необходимост от нови подходи при медикогенетичното консултиране на пациентите.

Идентифицирането на всички носители на *BRCA* мутации при овариален карцином и карцином на гърда е ключов момент за определяне на персонализиран подход към пациентите и се предлага като модел за най-добра клинична практика.<sup>33</sup> Изясняването на носителския статус на родствениците също е много важно за взимане на превантивни мерки и за ранно диагностициране на болестта.

В различните страни се предлагат различни модели на медико-генетична консултация, адаптирани при тестване на *BRCA*-гените.

**Модел на „Huntington“.** Той е най-разпространената практика. При него се извършва консултация предимно на възрастни незасегнати лица, които искат да си направят предиктивно генетично изследване, за да се установи дали носят фамилно разпространена патогенна мутация.<sup>34</sup> Ръководствата предлагат 2 до 4 сесии за медико-генетично консултиране за 3-месечен период, преди да бъде съобщен резултатът от теста. При положителен тест се предлага консултация на родствениците. Консултацията преди теста, проведена от клиничен генетик, има за цел да бъде представена на лицата информация по всички въпроси, свързани с теста, положителни и отрицателни страни на изследването, възможности за поведение при носителство на патогенна мутация, риск за наследяване, превенция, терапевтични опции. Консултацията след

теста има за цел предоставяне на информация и на други професионалисти, за да се вземе решение дали е необходимо да се правят допълнителни генетични изследвания и какви превантивни мерки могат да бъдат предложени.

При извършване на генетично изследване с цел взимане на решение за терапия този подход вероятно не е възможен.

**ДНК директен модел (Холандски).** При него пациентът с карцином на гърда получава телефонно обаждане, написана или дигитална информация (която не е консултация) преди извършване на генетично изследване.<sup>35</sup> След получаване на резултата се прави директна медико-генетична консултация в лекарски кабинет, базирана на теста. Резултатите от рандомизирано изследване на два подхода – обичайната консултация (преди и след теста) и телефонно обаждане (преди теста и консултация след теста) показват, че по-малък процент на пациенти, получили информация по телефона, приемат да бъдат тествани (84%) в сравнение с пациентите, получили консултация преди изследването (90%). При телефонния подход минава по-дълго време от момента на обаждане до посещението на пациента за взимане на тест-проба. Телефонният подход не е подходящ за новодиагностицирани пациенти и за пациенти с метастатичен карцином, при които е важна личната среща и консултация преди изследването.

**Лондонски модел – Royal Marsden.** Този модел се прилага за пациенти с не-муцинозен овариален карцином, диагностициран преди 65 г. възраст, при овариален карцином, карцином на гърда на всяка възраст.<sup>36</sup> Консултацията с пациента преди генетично тестване се прави от специално обучени клиницисти (онколози), а при необходимост от допълнителна информация – пациентът се насочва към генетичен консултативен кабинет. Нито един от пациентите, вклю-

чени в пилотното проучване, не е поускал допълнителна консултация. При инициращата консултация пациентът получава информация за теста, провежда се дискусия за BRCA, подписва информирано съгласие, дава кръвна проба, попълва поръчка за ДНК анализ и се включва в електронно досие (EPR). При установяване на патогенна мутация в BRCA ген резултатът се дава от клинициста на пациента и с писмо се определя дата за медикогенетично консултиране 3 седмици след предоставяне на резултата. При нормален BRCA ген без патогенна мутация, клиницистът дава резултата и информация на пациента. Генетичната консултация се предлага при поискване. При 60% от пациентите с патогенна мутация няма фамилна история на болестта. Това показва, че фамилната история не е достатъчно основание за насочване на пациентите за генетичен тест за BRCA мутации.

**План за туморен анализ Nijmegen.** Двуврижните нарушения в ДНК се коригират чрез хомоложна рекомбинация (HR), в която освен BRCA гените, играят роля и други HR гени: ATM, BARD1, BRIP1, CHEK1, CHEK2, FANCD1, MRE11A, NBN, PALB2, RAD51C и RAD51D. При 31% от пациентите с овариален карцином се доказват патогенни мутации, от които 75% са герминативни; при соматичните мутации 71% са локализирани в BRCA гените.<sup>37</sup> Авторите доказват, че пациентите със соматични или герминативни патогенни мутации са по-чувствителни на платина-базирана химиотерапия и имат по-добра преживяемост в сравнение с пациентите, носители на див тип гени. Пациентите със соматични патогенни BRCA мутации са показани за таргетна терапия с *olaparib*.

Планът за туморен анализ Nijmegen предлага изследване на BRCA соматични мутации в туморни проби на новодиагностицирани пациенти с овариален карцином преди теста за герминативни BRCA мутации.

Ползата от този план за изследване е голяма: изследването за соматични мутации в BRCA увеличава броя на пациентите, които са показани за таргетна терапия с *olaparib*; половината от пациентите с патологични соматични BRCA мутации са носители на герминативни мутации; наличието на патогенни соматични мутации в BRCA е индикация за извършване на генетично изследване за герминативни мутации, за да се определи рискът техните родственици да развият наследствен карцином.

**Модел на Hoogerbrugge и Jongmans.** Nicoline Hoogerbrugge и Marjolijn Jongmans допускат, че бъдещият модел за медикогенетично консултиране ще обхване по-голяма част от пациентите с овариален карцином и техните родственици.<sup>33</sup> Всички новодиагностицирани пациенти с епителен овариален карцином, консултирани от гинеколози, ще бъдат изследвани за соматични BRCA мутации. При позитивен тест с или без позитивна фамилна история за болестта, пациентът ще получи медикогенетична консултация преди изследване за герминативни мутации. В зависимост от предпочитанията на пациента това може да стане и по телефона, но при достатъчно ниво на познания и осигурена писмена и електронна информация. Резултатът от изследването на герминативни мутации се предава на пациента и се обсъжда от медицински генетик в медико-генетичен кабинет. Пациенти с негативен тест, но положителна фамилна анамнеза също се насочват за генетична консултация (Фиг. 5).

### Заклучение

В българското ръководство на Националния експертен борг за „Предиктивни и прогностични биомаркери в онкологията – методи за изследване и клиничноприложение“, МОРЕ 2017, са изведени следните основни препоръки с най-високо ниво на доказателственост (A):





Фигура 5. Модел на Hoogerbrugge и Jongmans за BRCA-тестиране и консултиране на всички пациенти с овариален карцином.

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.

Акцентите включват:

Преди и след извършване на генетично изследване за мутации в *BRCA1/2* гени, болните трябва да получат медикогенетична 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.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Robson ME. Clinical considerations in the management of individuals at risk for hereditary breast and ovarian cancer. *Cancer Control* 2002; 9: 457-465
2. van den Broek AJ, Schmidt MK, van Leeuwen FE, et al. Worse Breast Cancer Prognosis of *BRCA1/BRCA2* Mutation Carriers: What's the Evidence? A Systematic Review with Meta-Analysis. *PLOS ONE* 2015, DOI:10.1371/journal.pone.0120189
3. Cooke SL, Brenton JD. Evolution of platinum resistance in high-grade serous ovarian cancer. *Lancet Oncol* 2011; 12:1169-1174
4. Castera L, Krieger S, Rousselin A, et al. Next-generation sequencing for the diagnosis of hereditary breast and ovarian cancer using genomic capture targeting multiple candidate genes. *Eur J Hum Genet* 2014; 22:1305-1313
5. Maxwell KN, Wubbenhorst B, D'Andrea K, et al. Prevalence of mutations in a panel of breast cancer susceptibility genes in *BRCA1/2*-negative patients with early-onset breast cancer. *Genet Med* 2015; 17:630-638
6. Antoniou A, Pharoah PD, Narod S, et al. Average risks of breast and ovarian cancer associated with *BRCA1* or *BRCA2* mutations detected in case series unselected for family history: A combined analysis of 22 studies. *Am J Hum Genet* 2003; 72(5):1117-1130
7. Chen S, Parmigiani G. Meta-analysis of *BRCA1* and *BRCA2* penetrance. *J Clin Oncol* 2007; 25(11):1329-1333
8. Lowry KP, Lee JM, Gazelle GS, et al. Annual screening strategies in *BRCA1* and *BRCA2* gene mutation carriers: a comparative effectiveness analysis. *Cancer* 2012; 118:2021-2030



9. Sun C, Li N, Ding D, et al. The Role of BRCA Status on the Prognosis of Patients with Epithelial Ovarian Cancer: A Systematic Review of the Literature with a Meta-Analysis. *PLoS One* 2014; 9(5): e95285
10. Cummings SR, Eckert S, Krueger KA, et al. The effect of raloxifene on risk of breast cancer in postmenopausal women: results from the MORE randomized trial. Multiple outcomes of raloxifene evaluation. *JAMA* 1999;281:2189-2197
11. Cuzick J, Sestak I, Bonanni B, et al. Selective oestrogen receptor modulators in prevention of breast cancer: an updated meta-analysis of individual participant data. *Lancet* 2013;381:1827-1834
12. Lippman ME, Cummings SR, Disch DP, et al. Effect of raloxifene on the incidence of invasive breast cancer in postmenopausal women with osteoporosis categorized by breast cancer risk. *Clin Cancer Res* 2006;12:5242-5247
13. Martino S, Cauley JA, Barrett-Connor E, et al. Continuing outcomes relevant to Evista: breast cancer incidence in postmenopausal osteoporotic women in a randomized trial of raloxifene. *J Natl Cancer Inst* 2004;96:1751-1761
14. Vogel VG, Costantino JP, Wickerham DL, et al. Effects of tamoxifen vs raloxifene on the risk of developing invasive breast cancer and other disease outcomes: the NSABP Study of Tamoxifen and Raloxifene (STAR) P-2 trial. *JAMA* 2006;295:2727-2741
15. Vogel VG, Costantino JP, Wickerham DL, et al. Update of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Study of Tamoxifen and Raloxifene (STAR) P-2 Trial: Preventing breast cancer. *Cancer Prev Res (Phila)* 2010;3:696-706
16. Mavaddat N, Peock S, Frost D, et al. Cancer risks for BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: results from prospective analysis of EMBRACE. *J Natl Cancer Inst* 2013;105:812-822
17. King MC, Wieand S, Hale K, et al. Tamoxifen and breast cancer incidence among women with inherited mutations in BRCA1 and BRCA2: National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project (NSABP) Breast Cancer Prevention Trial. *JAMA* 2001;286:2251-2256
18. Ingle JN, Liu M, Wickerham DL, et al. Selective estrogen receptor modulators and pharmacogenomic variation in ZNF423 regulation of BRCA1 expression: individualized breast cancer prevention. *Cancer Discov* 2013;3:812-825
19. Iodice S, Barile M, Rotmensz N, et al. Oral contraceptive use and breast or ovarian cancer risk in BRCA1/2 carriers: a meta-analysis. *Eur J Cancer* 2010;46:2275-2284
20. Moorman PG, Havrilesky LJ, Gierisch JM, et al. Oral contraceptives and risk of ovarian cancer and breast cancer among high-risk women: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Oncol* 2013;31:4188-4198
21. Lancaster JM, Powell CB, Chen LM, Richardson DL. Society of Gynecologic Oncology statement on risk assessment for inherited gynecologic cancer predispositions. *Gynecol Oncol* 2015;136:3-7
22. Bryant HE, SchultzN, ThomasHD, et al. Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. *Nature* 2005; (434):913-917
23. SchultzN., E. Lopez, N. Saleh-Gohari, et al. Poly (ADP-ribose) polymerase (PARP-1) has a controlling role in homologous recombination. *Nucleic Acids Res* 2003; (31):4959-4964
24. 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; 26:3785-3790.
25. Robson M, Im SA, Senkus E, et al. Phase III trial of olaparib monotherapy versus chemotherapy for patients (pts) with HER2-negative metastatic breast cancer (mBC) and a germline BRCA mutation (gBRCAm), Presented at the ASCO Annual Meeting, Chicago; June 2-6, 2017. Abstract.
26. National Institutes of Health. Assessment of the Efficacy and Safety of Olaparib Monotherapy Versus Physicians Choice Chemotherapy in the Treatment of Metastatic Breast Cancer Patients With Germline BRCA1/2 Mutations (OlympiAD).
27. National Institutes of Health. Olaparib as adjuvant treatment in patients with germline BRCA mutated high risk HER2 negative primary breast cancer (OlympiA). Available Online. Accessed June 2017.
28. Food and Drug Administration. FDA approves Lynparza to treat advanced ovarian cancer. Accessed June 2017.
29. Ledermann J, Harter P, Gourley C, et al. Olaparib maintenance therapy in patients with platinum-sensitive relapsed serous ovarian cancer: a preplanned retrospective analysis of outcomes by BRCA status in a randomised phase 2 trial. *Lancet Oncol* 2014; 15(8):852-856

30. Balabanski LT, Vazharova R, Karachanak S. et al. Characterization of the mutational spectrum of 24 Bulgarian women with ovarian cancer. ESHG Conference, Copenhagen, May 27-30; 2017
31. Ruark E, Snape K, Humburg P, et al. Mosaic PPM1D mutations are associated with predisposition to breast and ovarian cancer. *Nature* 2013; 493:406-410
32. Balabanski L, Antov G, Dimova I, et al. Nextgeneration sequencing of *BRCA1* and *BRCA2* in breast cancer patients and control subjects. *Mol Clin Oncol* 2014; 2(3):435-439
33. Hoogerbrugge N, Jongmans M. Finding all BRCA pathogenic mutation carriers: best practice models. *Eur J Hum Genet* 2016; 24(1):19-26
34. VanOostrom I, Tibben A. A counselling model for BRCA1/2 genetic susceptibility testing. *Hered Cancer Clin Pract* 2004; 2:19-23
35. Schwartz MD, Valdimarsdottir HB, Peshkin BN, et al. Randomized noninferiority trial of telephone versus in-person genetic counseling for hereditary breast and ovarian cancer. *J Clin Oncol* 2014; 32:618-626
36. George A, Smith F, Cloke V, et al. Implementation of routine BRCA gene testing of ovarian cancer (OC) patients at Royal Marsden Hospital. *Ann Oncol* 2014; 25:305-326
37. Pennington KP, Walsh T, Harrell MI, et al. Germline and somatic mutations in homologous recombination genes predict platinum response and survival in ovarian, fallopian tube, and peritoneal carcinomas. *Clin Cancer Res* 2014; 20:764-775

////////////////////////////////////

**ПРЕДИКТИВНИ МОДЕЛИ ПРИ РАНЕН И  
МЕТАСТАТИЧЕН КОЛОРЕКТАЛЕН КАРЦИНОМ**

////////////////////////////////////

**доц. Милка Георгиева, гбн**

Българско сдружение по патология



# ПРЕДИКТИВНИ МОДЕЛИ ПРИ РАНЕН И МЕТАСТАТИЧЕН КОЛОРЕКТАЛЕН КАРЦИНОМ

доц. Милка Георгиева, дбн

Българско дружество по патология

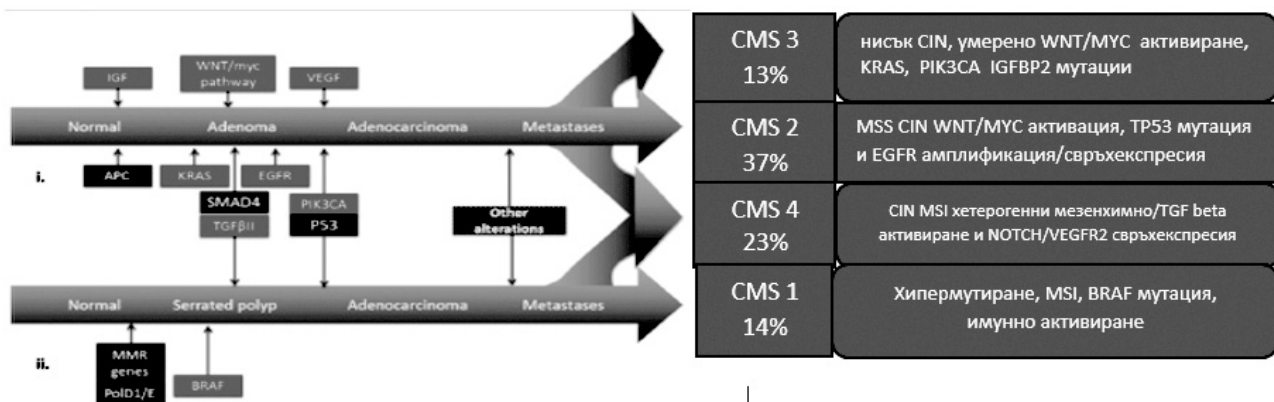
## ОБЗОР

В развитието на колоректалния карцином (КРК) участват много ключови сигнални пътища, с клиникопатологични свойства на специфични подгрупи, задействани от основни молекулярни промени. В статията се обсъжда ролята на генно-експресионното профилиране, дефинират се 5 вътрешни молекулярни субтипа при КРК и се описва тяхната прогностична и предиктивна стойност и възможността за специфичен избор на лечение. Дискутират се видовете мултигенни сигнатури, тяхната роля при ранен и напреднал КРК.

## Колоректална канцерогенеза

Известният многостъпален механизъм за колоректалната канцерогенеза на Fearon и Vogelstein се основава на критичната роля на тумор-супресорните гени и онкогени при аденом и последващото развитие на карцином с инактивиране на туморсупресорния ген

*adenomatous polyposis coli (APC)* като инициращ агент.<sup>1</sup> Впоследствие са идентифицирани и други онкогенни сигнални пътища, класифицирани или като хромозомна нестабилност (CIN), или като мутиращ фенотип, включващ ДНК репаративни дефекти и аберантно ДНК метилиране.<sup>2</sup> Всеки от тях се свързва с характерни геномни промени (Фиг. 1).



**Фигура 1.** Генетични модели на КРК. i. Хромозомна нестабилност (CIN); ii. Мутиращ фенотип. Многостъпалната канцерогенеза настъпва поради различни молекулярни промени във всеки модел. MMR mismatch repair, CIN chromosomal instability, MSS microsatellite stable, MSI microsatellite instable (Адаптирано от Graham, D.M., Coyle, V. M., Kennedy, R. D., Wilson, R. H. *Molecular Subtypes and Personalized Therapy in Metastatic Colorectal Cancer*; *Curr Colorectal Cancer Rep* 2016;12:141-150)



## Дефиниране на молекулярни субтипове КРК: генноекспресионно профилиране

Молекулярното субтипизиране на КРК показва предизвикателства, които доведоха до противоречия в литературата по отношение на прогностичните и предиктивни биомаркери. Това може би отразява хетерогенността на КРК, вероятно дължаща се на липса на ексклузивност между основните пътища на канцерогенеза и прогресия. Чрез генно-експресионно профилиране може да се оцени функцията на множество гени едновременно, за да се даде по-ясна картина на сложните характеристики на болестта и генетичната и епигенетична регулация. Тази техника осигурява по-информативен резултат, по-кратко време за молекулярно изследване и по-ниска цена за клиничната практика.

**Ранен КРК.** Голям брой генно-експресионни тестове са клинично валидирани като прогностични за стадий II КРК, при който ползата от химиотерапия остава неясна.<sup>4</sup> *Oncotype DX* и *ColDx* тестовете са разработени за включена в парафин туморна тъкан, а *ColoPrint* – за прясно замразена тъкан.<sup>5,6,7</sup> *Oncotype DX* използва 12-генна сигнатура от гени, свързани с рецидив и клинична полза от 5-FU, като стратифицира тумори с нисък, среден и висок риск за рецидив.<sup>5</sup> *ColDx* (с ново име *GeneFX colon*) е 634-генна сигнатура, която различава стадий II тумори с нисък и висок риск за рецидив. Тестът работи по-добре от използването на традиционните клиникопатологични параметри.<sup>6</sup> *ColoPrint* използва 18-генна сигнатура за класифициране на пациенти в стадий II с нисък и висок риск за рецидив и подобри точността на клиникопатологичните параметри за предикция на нисък риск КРК.<sup>7</sup> Практически трудности за получаване на прясно замразе-

на тъкан могат да ограничат използването на този тест в рутинната клинична практика.

**Авансиран КРК.** Независими изследователски групи използват генно-експресионни профили за идентифициране на вътрешни молекулярни субтипове.<sup>8,9,10,11</sup> Поради слабото съответствие между получените субтипове от няколко генно-експресионни профила, членове на *Colorectal Cancer Subtyping Consortium* комбинират данни от техните геномни групи, за да генерират консенсусна стратегия за молекулярно субтипизиране (CMS).<sup>12</sup> Направен е мащабен анализ на около 4000 проби от КРК (основно стадии II–III), който идентифицира 4 молекулярни субтипа, коректно класифициращи 78% от тези проби. Тези молекулярни субтипове се различават по генетични и епигенетични характеристики, експресия на сигнални пътища и клинични свойства. Изследването докладва и пета подгрупа без ясно определяне.<sup>13</sup>

**CMS1** включва 14% от пациентите; обхваща по-възрастни пациенти, жени с хипермутирани MSI тумори (MSI/CIMP), имунна инфилтрация и честоти *BRAF* мутации.

**CMS2** е най-разпространеният субтип, обхващащ 37%. Това са микросателитно стабилни (MSS) тумори, също с CIN със силно активиран *WNT/MYC* път, *EGFR* амплификация или свръхекспресия и мутирал *TP53*. Тези тумори са свързани с по-добра обща преживяемост (ОП) и произлизат предимно от левия колон.

**CMS3** са свързани с нисък CIN, умерено активиране на *WNT/MYC* пътя. *KRAS* и *PIK3CA* мутации обикновено са намерени в този субтип, както и свръхекспресия на *IGFBP2*. Този субтип е намерен в 13% и е свързан с умерена преживяемост.

**CMS4** представляват 23% от туморите. Те са CIN/MSI хетерогенни, експресират мезенхимни характеристики с активиране

на *TGF-beta* и активни пътища като ангиогенеза и матрично ремоделиране (*NOTCH3/VEGFR2* свърхекспресия). Случват се в по-късни стадии (III и IV). Тези пациенти се диагностицират в по-млада възраст и имат лоша преживяемост.

Една подгрупа (13 %) е също идентифицирана, но не класифицирана, без общи свойства между туморните тъкани. Авторите допускат, че или са преходен фенотип, или са резултат от интра-туморна хетерогенност. Въпреки че не е терапевтичен класификатор (тъй като не е възможно проспективно да се класифицират индивидуални пациентски тумори в тези биологични групи), тази голяма група улесни по-доброто разбиране на основните биологични групи в КРК (Фиг. 1).<sup>12</sup>

CMS1 се диагностицира преимуществено в десностранните КРК, CMS2 расте по-често в ляв колон и ректум. CMS4 и CMS3 субтипове не ямят предпочитана анатомична локализация. CMS4 се свързват с лоша прогноза, склонни са към рецидивирание и кратка преживяемост, докато CMS1 групата е с добра прогноза, редки рецидиви, въпреки че са много агресивни, защото съответстват на MSI тумори с мутирал *BRAF*.<sup>14</sup> Трябва да се отбележи, че 13% от пробите показват смесени характеристики, съвместими с два или повече субтипа. Все пак, някои колоректални тумори не могат да бъдат класифицирани в тези предефинирани подгрупи и затова е необходимо допълнително усъвършенстване на консенсусната класификация.

### Лечение, базирано на молекулярни субтипове

Теоретично, тези молекулярни класификации трябва да помогнат избора на най-подходящо лечение при всеки пациент. Повечето тумори с MSI са включени в CMS1 субтипа. Трябва да се отбележи, че малка

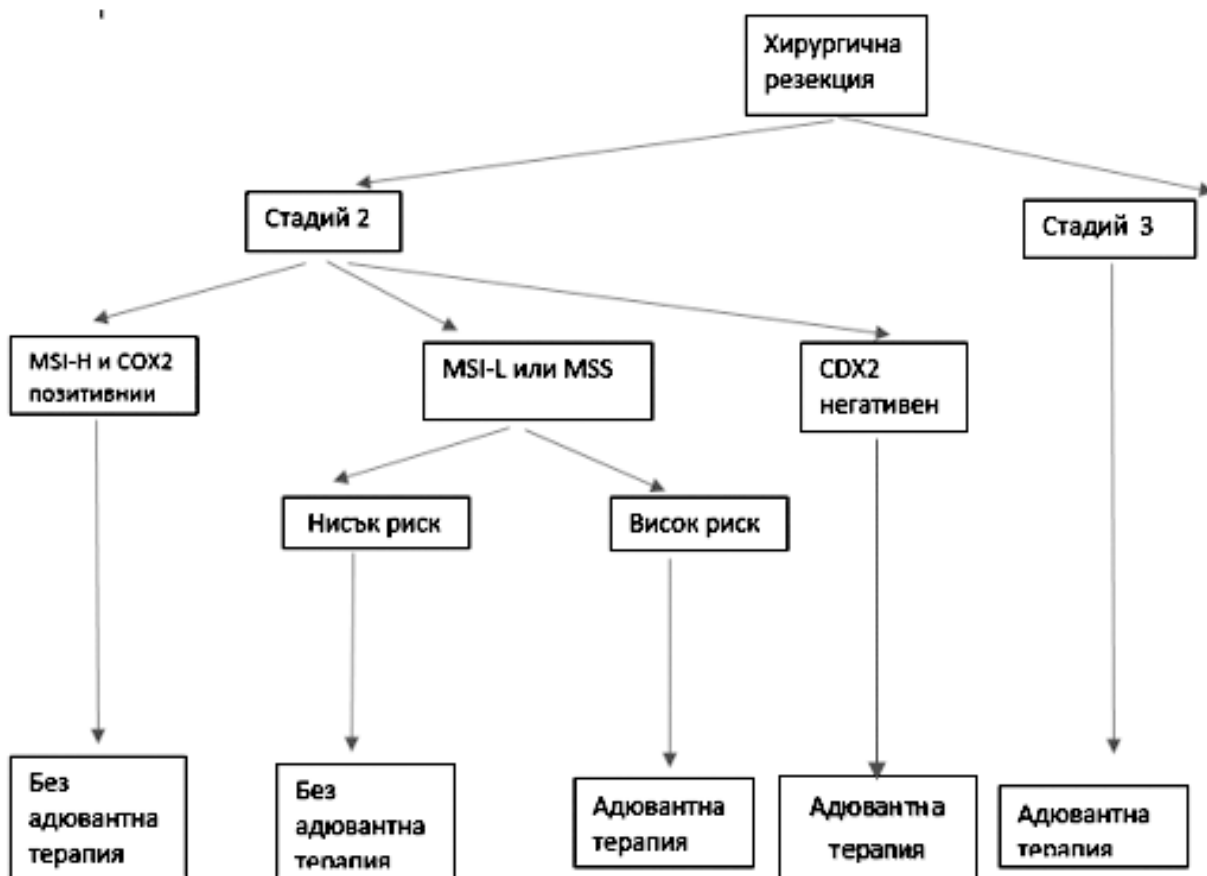
част от туморите, експресиращи мезенхимни характеристики, са класифицирани като CMS4. Честотата на MSI намалява с прогресията на стадия: в стадий II е около 20%, в стадий III - 10% и стадий IV - само 5%.

**Лечение на ранен стадий КРК.** Тумори, диагностицирани в стадий II или III с MSI, имат по-добра прогноза и по-ниска степен на рецидивирание отколкото MSS туморите.<sup>15,16</sup> В тези случаи се поставя под въпрос необходимостта от *5-fluorouracil (5-FU)* като монотерапия за адювантно лечение. Негативният ефект върху преживяемостта на адювантна терапия с *5-FU* е потвърден в две ретроспективни изследвания, лимитирани за пациенти в стадий II и MSI.<sup>13,17</sup> Друго изследване показва, че при пациенти в стадий III с MSI, полза от терапия с *5-FU* имат само тези с мутации в *MMR* гени.<sup>18</sup>

В заключение, при пациенти в стадий II и MSI, адювантна терапия трябва да се избягва като се имат предвид добрата прогноза и негативния ефект на *5-FU* върху тяхната преживяемост. При пациенти в стадий III за селекция на адювантна терапия понастоящем MSI детекция не трябва да се използва.<sup>18</sup>

Напоследък е докладван CDX2-хомеобокс транскрипционен фактор-2 като биомаркер за КРК, като е показано, че CDX2-негативни тумори често се асоциират с лоши прогностични параметри при напреднал стадий, слаба диференциация, васкуларна инвазия, *BRAF* мутация и CIMP позитивен статус. Изводът е, че адювантна химиотерапия би могла да бъде терапевтична опция за пациенти в стадий II CDX2-негативни, които обикновено се лекуват само хирургично.<sup>19</sup>

Алгоритъм за използване на микросателитна нестабилност и CDX-2 експресия при решаване на терапия при КРК стадии II и III е обобщен във Фиг.2 (не е базиран на рандомизирани доказателства).



**Фигура 2.** Алгоритъм за използване на MSI и експресия на CDX-2 при решаване терапия на пациенти в стадий II и III КРК. (Адаптирано от Rodriguez-Salas N, Dominguez G, Barderas R, et al. Clinical relevance of colorectal cancer molecular subtypes; *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 109 (2017) 9–19)

**Лечение на авансирал КРК: лечение на CMS1 субтип.** MSI туморите продуцират нови протеини (с неоантигени), поради множество мутации с изместване на рамката и дефицит на репликация на нуклеотидни повтори. Тези нео-протеини и нео-пептиди са представени на *major histocompatibility complex 1 (MHC-1)*, който задейства имунен отговор, водещ до лимфоцитен инфилтрат на тумора. Затова тези пациенти могат да имат полза от имунно чекпойнт блокиране.<sup>21</sup> Всъщност в скорошно фаза II проучване  *pembrolizumab* (инхибитор на PD-1) даде 40% отговор при поредица от 10 пациенти с

MMR-дефицитен мКРК; не бе открит отговор при 18 пациенти с нормален MMR.<sup>22</sup> Понастоящем се провежда и се набират пациенти с метастатичен КРК с MSI-H във фаза III проучване, сравняващо *pembrolizumab* със стандартна химиотерапия.

**Лечение на CMS2 и CMS3 субтипове.** Засега има малко данни, които да насочват решението за лечение на всеки от тези два субтипа. Пациенти с CMS2 имат по-благоприятна преживяемост от други субтипове. В повечето случаи не са открити мутации в *BRAF* или *RAS*, така, че анти-EGFR лечение може да е ефективно. Онкогенни-

те амплификации, открити в този субтип, могат да са потенциални терапевтични таргети. Тъй като често CMS2 туморите имат активирани MYC и WNT-пътища, има изследвания върху ефективността на лекарства, действащи върху тези пътища – инхибитори на Aurora kinase A, в комбинация с инхибитори на MYC или Wnt-пътищата.<sup>23</sup>

Пациенти със субтип CMS3 често имат RAS-мутации и са резистентни към анти-EGFR-лечение. Тъй като те показват увеличена активност при различни метаболитни пътища, като аминокиселини, нуклеотиди, глутамин, глюкоза, пентоза, мастни киселини и груги, би било интересно да се изследва ефективността на потенциални инхибитори на тези метаболитни процеси при този молекулярен субтип, примерно лекарства, специфично таргетиращи метаболитни пътища на аминокиселини при туморни клетки.<sup>24</sup> Някои групи работят и с инхибитори на гликолизата, инхибитори на гликоген-синтаза киназата или инхибитори на пируват-дехидрогеназа киназите.<sup>25,26</sup>

**Лечение на CMS4 субтип.** Тумори с епително мезенхимен преход (EMT) могат да са резистентни към *cetuximab*, независимо от KRAS мутационния статус. Наличието на BRAF или PIK3CA мутации в този субтип може също да допринесе за резистентност при лечение с анти-EGFR медикаменти, въпреки че влиянието на фенотипа понастоящем е неясно. Тумори, обогатени на стволови клетки, изглежда са особено чувствителни към FOLFIRI.<sup>27</sup> И обратно – показано е, че индуцирането на EMT е свързано с придобита резистентност към oxaliplatin.<sup>28</sup>

Има една подгрупа в CMS4 с V600E BRAF мутация. Резултатите от проучването TRIBE показват, че FOLFOXIRI плюс bevacizumab може да бъде по-ефективна комбинация, отколкото FOLFIRI плюс bevacizumab по отношение на подобряване

на преживяемостта в групата с пациенти с BRAF мутации.<sup>28</sup>

Напоследък е докладвано, че експресията на гени, асоциирани с EMT, може да бъде по-висока при стромални клетки (фибробласти, левкоцити и ендотелни клетки), отколкото в туморни клетки.<sup>7</sup> Освен това е известно, че активирането на TGF-beta сигналния път има ключова роля в EMT процеса; активирането на стромалните клетки може да е от съществено значение за задвижването на този процес.<sup>29</sup> Затова е възможно да се спекулира, че в този молекулярен субтип, лекарства, действащи на стромата и инхибиращи TGF-beta, може да са полезни. Предклинични изследвания показват, че инхибирането на TGF-beta сигнализацията предпазва от формиране на метастази от органоиди чрез получен от пациент тумор. Тъй като ангиогенезата също е активирана в този субтип е възможно анти-ангиогенезни лекарства да са по-ефективни.<sup>20</sup>

На ASCO 2017 са докладвани резултати от две изследвания с пациенти, включени в проучването CALGB 80405. Първото проучване анализира въздействието на консенсусното молекулярно субтипизиране (CMS) върху ОП и преживяемостта без прогресия (ПБП) при пациенти с мКРК, лекувани с първа линия bevacizumab или cetuximab. С Nanostring платформа по CMS са класифицирани 392 пациенти от CALGB 80405, които са с div тип KRAS (кодон 12 и 13) първични тумори и е проведена корелация с ОП и ПБП. Описани са CMS1 (14%), CMS2 (47%), CMS3 (2%), CMS4 (29%), неконсенсусни (8%). Пациенти с CMS1, лекувани с bevacizumab, имат значително по-дълга ОП отколкото тези с cetuximab (HR 0.47, 95% CI [0.24, 0.92]). Пациенти с CMS2 и bevacizumab имат тенденция към по-къса ОП отколкото тези с cetuximab (HR 1.41, CI [0.95, 2.08]). Резултатите показват, че CMS са асоциирани с ОП и ПБП като първа линия лечение при



пациенти с мКРК. Предварителните данни говорят, че някои CMS могат да са свързани с ефикасността на *bevacizumab*- и *cetuximab*-базирана химиотерапия.<sup>30</sup>

Второто изследване анализира първична туморна локация като независим от молекулярните свойства прогностичен маркер за ОП при пациенти с мКРК. Авторите заключават, че мястото на първичния тумор е независим прогностичен фактор, когато е съгласуван с възраст, синхронен/метахронен, CMS, MSI и *BRAF* статус. За да се обясни значението на мястото, са изследвани клинични променливи като туморен товар, метастатични места и измеримост на болестта.<sup>31</sup>

## Заключение

Преди да се използват, молекулярните класификации за планиране на терапия трябва да са валидирани в групи проспективни серии пациенти, включително да се съберат повече КРК в стадий IV, тъй като пробите използвани за разработване и валидиране на молекулярните класификации са главно от тумори в стадий II и III. Всъщност не е известно дали метастазите възпроизвеждат същата молекулярна схема като първичния тумор. Макар да изглежда, че мутациите са с висока степен на съвпадение между първичен тумор и метастази, може да има и разлики, поради интратуморната хетерогенност и взаимодействията на тумора с околната микросреда и имунната система.<sup>32,33</sup>

Молекулярните субтипове КРК могат да се считат за различни болести с различно биологично поведение и с потенциално различна чувствителност към химиотерапия, таргетни агенти и имунотерапия. За по-нататъшно подобрене на КРК фенотипното характеризирание и използването му в клиничната практика, тези фенотипове трябва да могат да се определят ясно и лесно. Необходимо е да се проведат проспективни

проучвания които да докажат, че при всеки от тези субтипове таргетни терапии или комбинирани имунотерапии са по-добри от настоящите стандарти.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990;61(5):759-767
2. Markowitz SD, Bertagnolli MM. Molecular origins of cancer: molecular basis of colorectal cancer. *N Engl J Med* 2009; 361(25): 2449-2460
3. Graham DM, Coyle VM, Kennedy RD, Wilson, RH. Molecular Subtypes and Personalized Therapy in Metastatic Colorectal Cancer. *Curr Colorectal Cancer Rep* 2016;12:141-150
4. Di Narzo AF, Tejpar S, Delorenzi M, et al. Test of four colon cancer risk-scores in formalin fixed paraffin embedded microarray gene expression data. *J Natl Cancer Inst* 2014. 106(10). doi: 10.1093/jnci/dju247
5. Gray RG, Quirke P, Kerr DJ, 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
6. Kennedy RD, Bylesjo M, Harkin DP, 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(35):4620-4626
7. Salazar R, Roepman P, Tollenaar 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
8. Sadanandam A, Lyssiotis C, Homicsko K, et al. A colorectal cancer classification system that associates cellular phenotype and responses to therapy. *Nat Med* 2013;19:619-625
9. Marisa L, de Reinies A, Boige V, et al. Gene expression classification of colon cancer into molecular subtypes: characterization, validation, and prognostic value. *PLoS Med* 2013;10(5):e1001453
10. Budinska E, Popovici V, Delorenzi M, et al. Gene expression patterns unveil a new level of molecular heterogeneity in colorectal cancer. *J Pathol* 2013;231(1): 63-76



11. Schlicker A, Beran G, Wessels F, et al. Subtypes of primary colorectal tumors correlate with response to targeted treatment in colorectal cell lines. *BMC Med Genomics* 2012;5:66. doi: 10.1186/1755-8794-5-66
12. Sadanandam A, Wang X, De Sousa E, et al. Reconciliation of classification systems defining molecular subtypes of colorectal cancer: interrelationships and clinical implications. *ABV Cell Cycle* 2014; 13: 353-357
13. Guinney J, Dienstmann R, Tejpar S, et al. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nat Med* 2015;21(11):1350-1356
14. Gavin PG, Colangelo LH, Fumagalli D, et al. Mutation profiling and microsatellite instability in stage II and III colon cancer: an assessment of their prognostic and oxaliplatin predictive value. *Clin Cancer Res* 2012; 18:6531-6541
15. Malesci A, Laghi I, Bianchi P, et al. Reduced likelihood of metastases in patients with microsatellite-unstable colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2007; 13:3831-3839
16. Simons CC, Hughes LA, Smits KM, et al. A novel classification of colorectal tumors based on microsatellite instability, the CpG island methylator phenotype and chromosomal instability: implications for prognosis. *Ann Oncol* 2013; 24:2048-2056
17. Sanoff HK, Sargent DJ, Campbell ME, et al. Five-year data and prognostic factor analysis of oxaliplatin and irinotecan combinations for advanced colorectal cancer: N 9741. *J Clin Oncol* 2008;26(35): 5721-5727
18. Dienstmann R, Salazar R, Tabernero J. Personalizing colon cancer adjuvant therapy: selecting optimal treatments for individual patients. *J Clin Oncol* 2015; 33:1787-1796
19. Dalerba P, Sahoo D, Clarke MF, et al. CDX2 as a prognostic biomarker in stage II and stage III colon cancer. *N Eng J Med* 2016; 374(3):211-222
20. Rodriguez-Salas N, Dominguez, G, Barderas R, et al. Clinical relevance of colorectal cancer molecular subtypes. *Crit Rev Oncol Hematol* 2017;109:9-19
21. Becht E, de Reynie, A, Giraldo NA, et al. Immune and stromal classification of colorectal cancer is associated with molecular subtypes and relevant for precision immunotherapy. *Clin Cancer Res* 2016; 22 (16): 4057-4066
22. Le DT, Uram JN, Wang H, et al. PD-1 blockage in tumors with mismatch-repair deficiency. *N Engl J Med* 2015; 372: 2509-2520
23. Yang AD, Fan F, Camp ER, et al. Chronic oxaliplatin resistance induces epithelial-to-mesenchymal transition in colorectal cancer cell lines. *Clin Cancer Res* 2006;12 (14): 4147-4153
24. Calon A, Lonardo E, Berenguer-Llargo A, et al. Stromal gene expression defines poor-prognosis subtypes in colorectal cancer. *Nat Genet* 2015;47:320-329
25. Teufel M, Schwenke S, Seidel H, et al. Molecular subtypes and outcomes in regorafenib-treated patients with metastatic colorectal cancer (mCRC) enrolled in the CORRECT trial. *J Clin Oncol* 2015;33, abstr 3558
26. Chen J, Elfiky A, Han M, et al. The role of Src in colon cancer and its therapeutic implications. *Clin Colorectal Cancer* 2014; 13:5-13
27. De Sousa E, Melo F, Wang X, Jansen M, et al. Poor-prognosis colon cancer is defined by a molecularly distinct subtype and develops from serrated precursors lesions. *Nat Med* 2013; 19: 614-621
28. Ryan DN, Ryan DP. Should FOLFOXIRI plus bevacizumab be the standard first-line therapy in metastatic colorectal cancer? *Oncologist* 2015;20(3): 236-238
29. Teng F, Tian WY, Wang YM, et al. Cancer-associated fibroblasts promote the progression of endometrial cancer via the SDF-1/CXCR4 axis. *J Hematol Oncol* 2016; 9(1):8
30. Lenz HJ, Ou FS, Venook AP, et al. Impact of consensus molecular subtyping (CMS) on overall survival (OS) and progression free survival (PFS) in patients (pts) with metastatic colorectal cancer (mCRC): Analysis of CALGB/SWOG 80405 (Alliance). *J Clin Oncol* 2017; 35:abstr 3511
31. Venook A, Ou FS, Lenz J, et al. Primary (1°) tumor location as an independent prognostic marker from molecular features for overall survival (OS) in patients (pts) with metastatic colorectal cancer (mCRC): Analysis of CALGB / SWOG 80405 (Alliance). *J Clin Oncol* 2017; 35; abstr 3503
32. López-Gómez M, Moreno-Rubio J, Suárez-García I, et al. Gene expression differences in primary colorectal tumors and matched liver metastases: chemotherapy related or tumoral heterogeneity? *Clin Transl Oncol* 2015;17, 322-329
33. Garraway LA. Concordance and discordance in tumor genomic profiling. *J Clin Oncol* 2012; 30(24): 2937-2939



//

**ПРЕДИКТИВНА СТОЙНОСТ НА  
НУКЛЕАРНОМЕДИЦИНСКИТЕ МЕТОДИ ПРИ  
НЕВРОЕНДОКРИННИ ТУМОРИ**

//

**проф. д-р Соня Сергиева, дм<sup>1</sup>**  
**доц. д-р Павел Бочев, дм<sup>2</sup>**  
**проф. д-р Ирена Костадинова, дмн<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Отделение по нуклеарна медицина, СБАЛОЗ, София

<sup>2</sup>Българско дружество по нуклеарна медицина

<sup>3</sup>Клиника по нуклеарна медицина, *Адъсибадем Сити Клиник*, София



# ПРЕДИКТИВНА СТОЙНОСТ НА НУКЛЕАРНОМЕДИЦИНСКИТЕ МЕТОДИ ПРИ НЕВРОЕНДОКРИННИ ТУМОРИ

*проф. д-р Соня Сергиева, дм<sup>1</sup>*

*доц. д-р Павел Бочев, дм<sup>2</sup>*

*проф. д-р Ирена Костадинова, дмн<sup>3</sup>*

<sup>1</sup>Отделение по нуклеарна медицина, СБАЛОЗ, София

<sup>2</sup>Българско гружество по нуклеарна медицина

<sup>3</sup>Клиника по нуклеарна медицина, *Аджибадем Сити Клиник*, София

## ОБЗОР

*Невроендокринните тумори (НЕТ) са хетерогенна група неоплазми, произхождащи от дифузната ендокринна система, локализирана във всички органи и системи, което обуславя и тяхната разнообразна клинична изява. По-голямата част от НЕТ показват свръхекспресия на повърхностноклетъчни соматостатинови рецептори SSTR1-SSTR5, взаимодействащи с естествените соматостатинови фракции, като това зависи от хистологичната диференциация и вида на тумора. Свръхекспресията на соматостатинови рецептори от малигнено трансформирани клетки се използва като таргет за изобразяване на НЕТ в нуклеарната медицина. С навлизането в клиничната практика през последните години на мултимодалните SPECT-CT и PET/КТ методи, бяха синтезирани нови радиофармацевтици за визуализиране на НЕТ, маркирани с емисионни или позитронни емитери като <sup>99m</sup>Tc-Tektrotyd, <sup>68</sup>Ga-DOTA съединения, <sup>18</sup>F-DOPA и т.н. Соматостатинови аналози, маркирани съответно с <sup>99m</sup>Tc/<sup>68</sup>Ga за SPECT-CT или PET/КТ изследвания, се препоръчват за определяне на точната локализация, степента на разпространение и биологичната характеристика на НЕТ (наличие и степен на свръхекспресия на соматостатинови рецептори) като предиктивен маркер за терапевтичен ефект от лечение със соматостатинови аналози и приложение на пептидна рецепторна радионуклидна терапия.*

## Увод

Невроендокринните тумори (НЕТ) представляват хетерогенна група неоплазми, произхождащи от дифузната ендокринна

система, локализирана във всички органи и системи, което обуславя и тяхната разнообразна клинична изява. НЕТ могат да са функционално активни – да секретират биологично активни субстанции, които имат различна

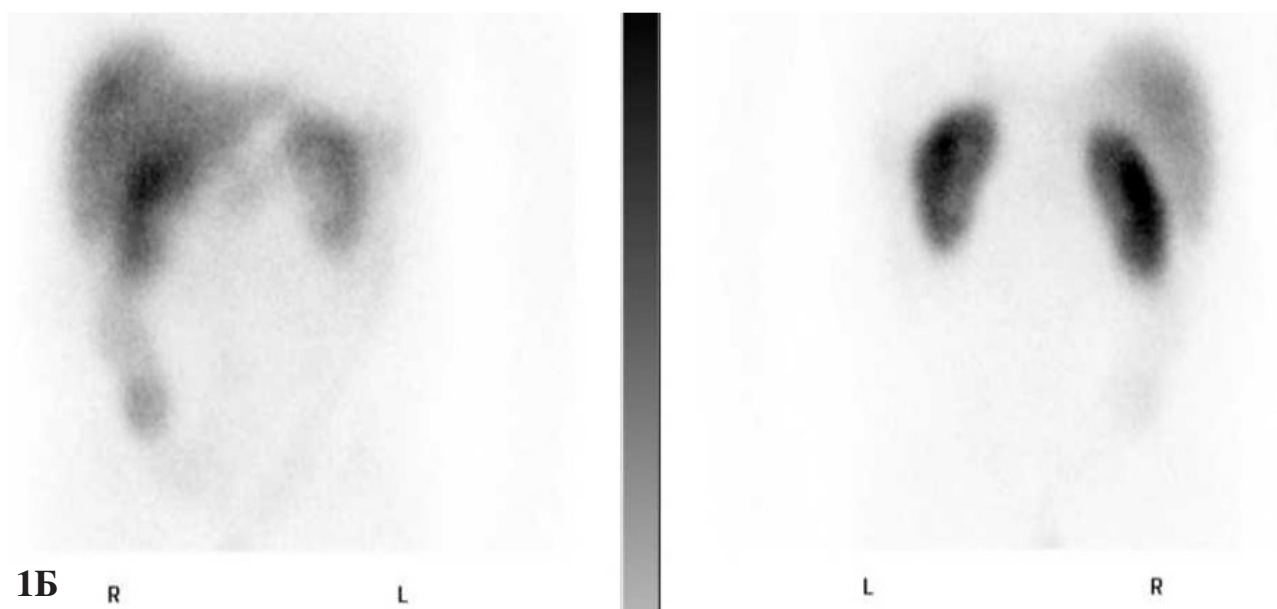
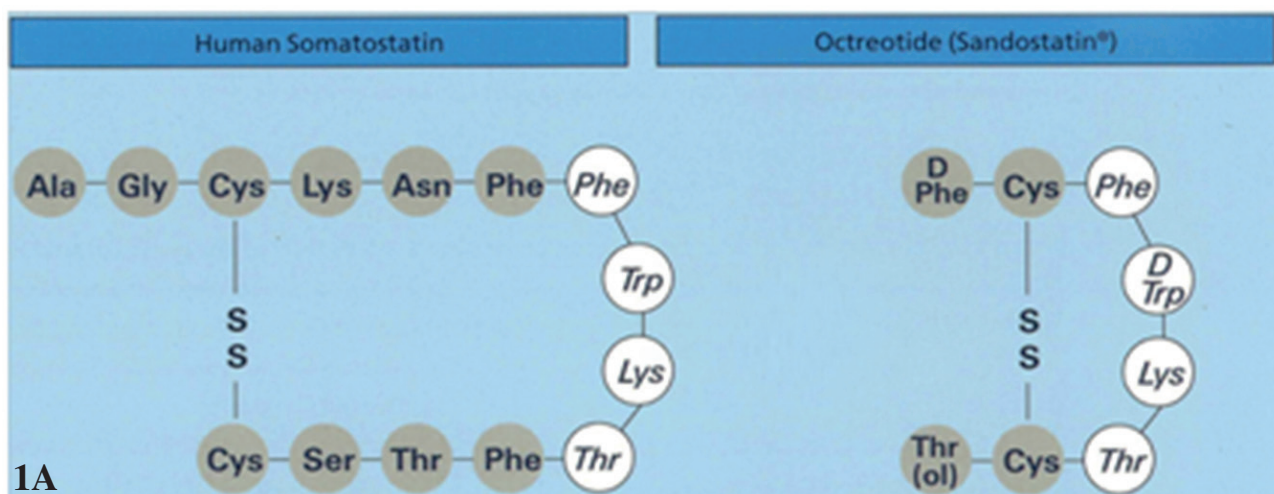


клинична симптоматика; могат да са и функционално неактивни (несекретиращи). НЕТ са бавно растящи тумори, но с голям метастатичен потенциал.<sup>1-6</sup> Често първите прояви на болестта са симптомите от напреднал стадий – метастатичен процес и/или усложнение, в зависимост от тяхната локализация – напр. интестинална обструкция, локална инвазия, иктер и т.н. Несекретиращите НЕТ и нискодиференцираните невроендокринни неоплазми протичат с органоспецифична клинична картина както при карцином, т.е. без ендокринна симптоматика. В зависимост от ембрионалното развитие на храносмилателния тракт НЕТ са класифицирани като локализиращи в горния, среден и долен етаж, съответно *foregut/midgut/hindgut* НЕТ. *Foregut* включва органите в гръден кош (тимус, бели дробове), както и горен гастроинтестинален тракт: хранопровод, стомах, дуоденум, панкреас и черен дроб; като *midgut* се означават тумори с произход от илеум, цюкум, апендикс и възходящо дебело черво; *hindgut* са групата НЕТ от трансверзално и низходящо дебело черво и ректум.<sup>1-6</sup> Приблизително 75% от всички НЕТ са с гастро-ентеро-панкреатичен произход (ГЕП НЕТ), 25% от НЕТ са с бронхопулмонална или тимусна локализация, 5% се развиват от останалите органи – млечна жлеза, щитовидна жлеза, тумори в областта на глава и шия и др. Според класификацията на Световната здравна организация (WHO), НЕТ могат да се развият и от жлези с ендокринна секреция: адренален феохромоцитом, хипофизарен аденом, параганглиом, невробластом, медуларен карцином на щитовидната жлеза.<sup>5</sup> Описани са смесени ГЕП НЕТ, които са изградени едновременно от ендокринни, сквамозни и муцинозни клетки, като невроендокринната компонента трябва да бъде > 30%, т.нар. смесени невроендокринни – невроендокринни неоплазми (Mixed Neuroendocrine Non-Neuroendocrine Neoplasms или MiNEN); при наличие на невро-

ендокринна компонента < 30%, туморите се определят като карциноми с невроендокринни клетки.<sup>5</sup> Според степента на клетъчна диференциация, обусловена от пролиферативния малигнен потенциал и стойност на Ki-67, НЕТ се разделят на: високодиференцирани тумори – G1 (Ki67 < 3%), умеренодиференцирани – G2 (Ki67: 3-20%) и нискодиференцирани – G3 (Ki67 > 20). Нискодиференцираните G3 НЕТ се подразделят на добре диференцирани невроендокринни тумори (G3 НЕТ) и нискодиференцирани невроендокринни карциноми (G3 НЕК).<sup>5</sup>

### Основни принципи на нуклеарномедицинските методи при НЕТ

По-голямата част от невроендокринните тумори (НЕТ) показват свръхекспресия на повърхностноклетъчни соматостатинови рецептори 1-5 (SSTR1-SSTR5), взаимодействащи с естествените соматостатинови фракции, като това зависи от хистологичната диференциация и вида на тумора.<sup>1-6</sup> Имунохистохимични изследвания при ГЕП НЕТ показват, че в най-голям процент се експресира рецепторен 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 нискодиференцираните G3 НЕК.<sup>5-6</sup> Свръхекспресията на соматостатинови рецептори от малигнено трансформирани клетки се използва като таргет за визуализиране на НЕТ посредством различни нуклеарномедицински методи.<sup>6</sup> С оглед създаване на стабилни соматостатинови аналози, подходящи за терапевтично приложение, е синтезиран *octreotid*. Чрез маркиране със <sup>123</sup>I (<sup>123</sup>I-Tyr3-octreotide) е произведен първият радиофармацевтичен препарат, соматостатинов аналог за визуализиране на НЕТ.<sup>6,7</sup> По-късно радиоидът е заменен със <sup>111</sup>In, поради по-добри физични



**Фигура 1.** Структура на човешки краткоживуиц (3-4 минути в кръвната циркулация) соматостатин и на първия стабилен соматостатинов аналог *octreotide* (А). Планарна соматостатин-рецепторна сцинтиграфия със  $^{111}\text{In}$ -*Ostreoscan* в предна (А-Р) и задна (Р-А) позиция, позитивна за солитарна метастатична лезия в черен дроб при пациент, опериран по повод НЕТ на панкреас (Б).

характеристики и се създава най-широко използваният радиофармацевтик за изследване на НЕТ:  $^{111}\text{In}$ -*Ostreoscan*, експресиращ предимно подтип SSTR2-рецептори (Фиг.1).<sup>7</sup>

През 2000 г. са публикувани първи клинични резултати от приложение на соматостатинов аналог, маркиран с  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HYNIC-TOC (Tektrotyd, Polatom).<sup>8</sup> В сравнение със соматостатин-рецептор-

ните сцинтиграфии, провеждани с  $^{111}\text{In}$ -*Ostreoscan*, основните предимства на радиофармацевтик, маркиран с  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ , се обуславят от следните дозиметрични характеристики: (1) по-малко лъчево натоварване за пациентите с ефективна еквивалентна доза на радиоактивността след i.v. на  $970\text{MBq}$   $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Tektrotyd/70 kg от 4.2mSv; (2) по-малка продължителност на изследването с възмож-

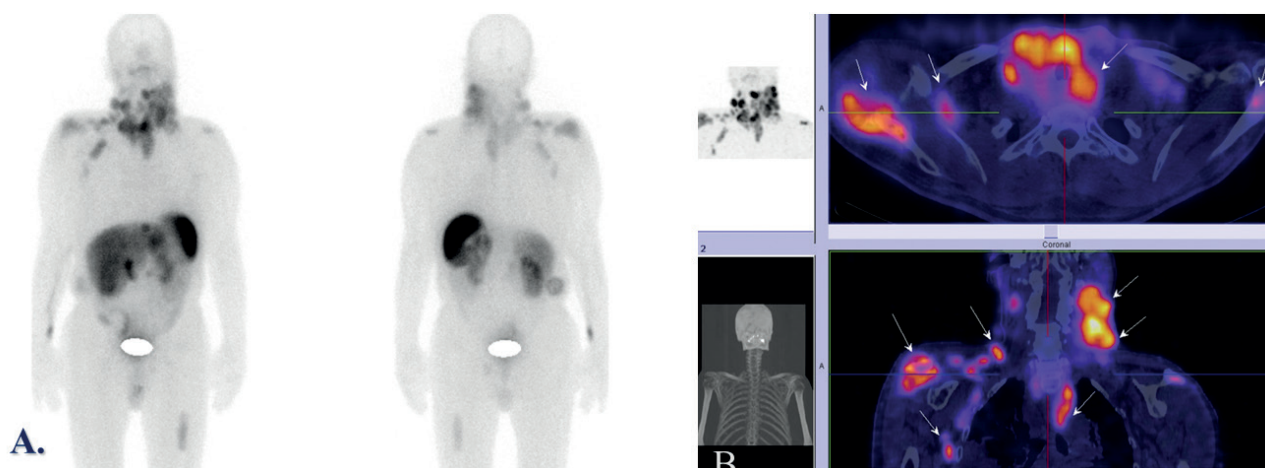
ност за провеждане на еднократно протокол на сканиране в рамките на 2-4 часа след инжектиране, без необходимост от сканиране на 24-и час; (3) значително по-малко физиологично биоразпределение в черен дроб за детекция на хепатални лезии; (4) висока чувствителност на свързване с рецептори от SSTR2-подтип, но в по-малка степен и с SSTR3 и SSTR5; (5) възможност за приготвяне и дозиране на място според конкретни нужди на пациентите.<sup>8</sup> Публикуваните данни показват широко приложение на този радиофармацевтик при различни по произход и степен на диференциация НЕТ.<sup>9,10</sup> Въвеждането на хибридни SPECT-СТ апарати в нуклеарната медицина оптимизира в голяма степен планарните целотелесни и SPECT соматостатин-рецепторни сцинтиграми (Фиг.2).<sup>10,11</sup>

Повишеното качество на получения образ чрез корекция на разсеяното лъчение направи възможно изобразяване на огнища с размери под 10 mm. SPECT-СТ-изследванията позволяват коректното определяне на

степен на разпространение, точна локализация и морфологична характеристика на лезии с абнормно натрупване, диференциална диагноза на зони с физиологичната активност спрямо такива с патологична хиперфиксация, особено в областта на абдомена и малкия таз (Фиг.3).<sup>10,11</sup>

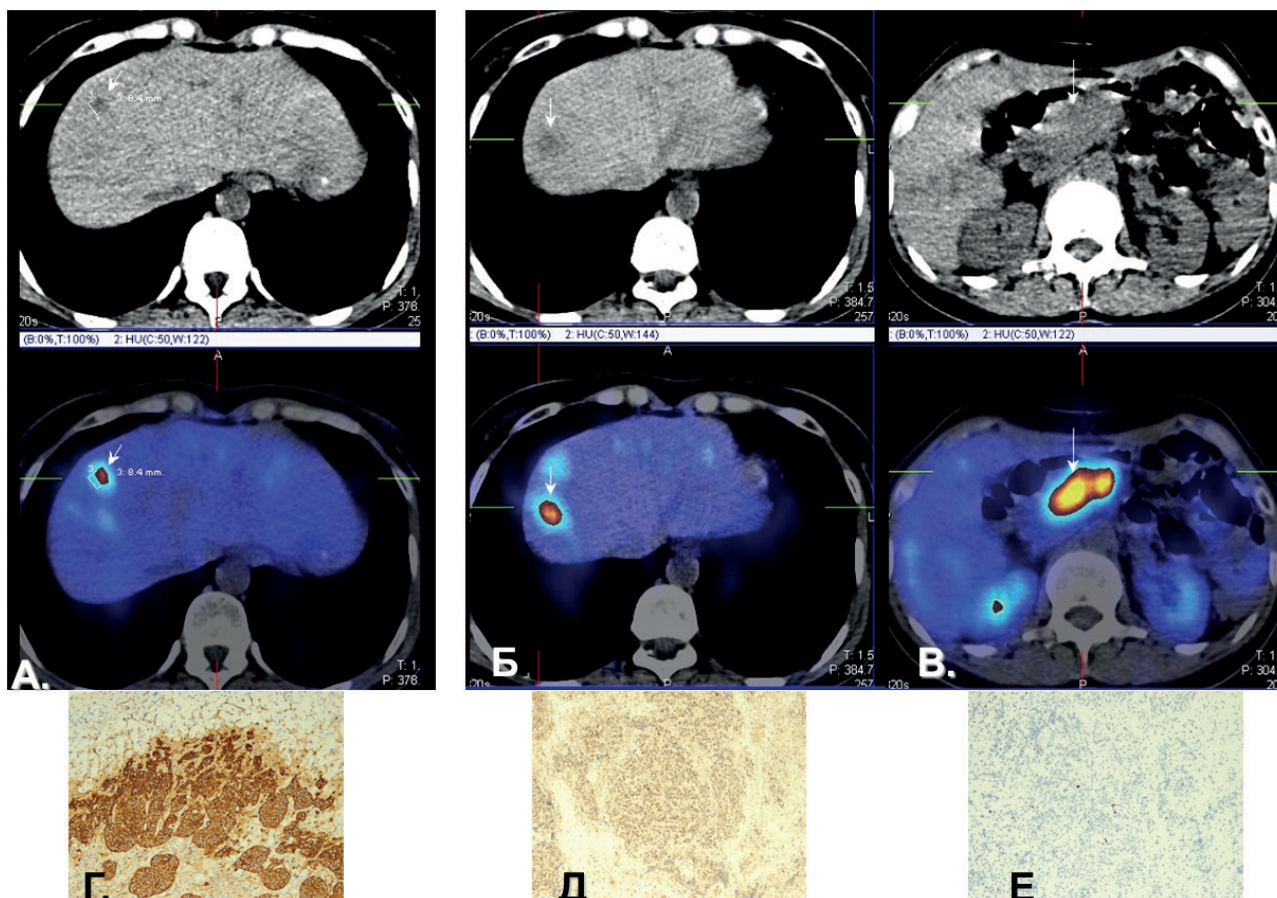
Тези диагностични възможности на хибридните SPECT-СТ образи подобряват в значителна степен диагностичната чувствителност и специфичност на планарните и SPECT соматостатин-рецепторни сцинтиграфии.<sup>10</sup>

С навлизането в клиничната практика през последните години на ПЕТ/КТ изследванията бяха синтезирани нови радиофармацевтици за визуализиране на НЕТ, маркирани с позитронни емитери като <sup>68</sup>Ga, <sup>18</sup>F-DOPA и др.<sup>12,13,16</sup> В научната литература бяха публикувани данни за предимствата на ПЕТ/КТ метода с белязани соматостатинови аналози вследствие на по-високата разделителна способност при детекция и значително подобрена чувствителност, варираща между



**Фигура 2.** Пациент на 68 г. с медуларен тиреоиден карцином с клинични данни за локален рецидив и шийна лимфаденопатия след проведена тотална тиреоидектомия, лъчелечение и химиотерапия; серумен калцитонин >56 000 pg/ml. Целотелесното изследване с <sup>99m</sup>Tc-Tektrotid показа множествени вторични огнища с хиперфиксация на въведения радиофармацевтик (А). На последващите прицелни SPECT-СТ образи се визуализират тяхната точна локализация, брой, размери и морфологична характеристика: локален рецидив в ложето на щитовидната жлеза с експанзия в околните тъкани, билатерална латероцервикална, супраклавикуларна, паратрахеална и медиастинална лимфаденопатия, множествени остеолитични костни огнища, чернодробни вторични лезии (В). Пациентът е планиран за таргетна терапия с Caprelsa.



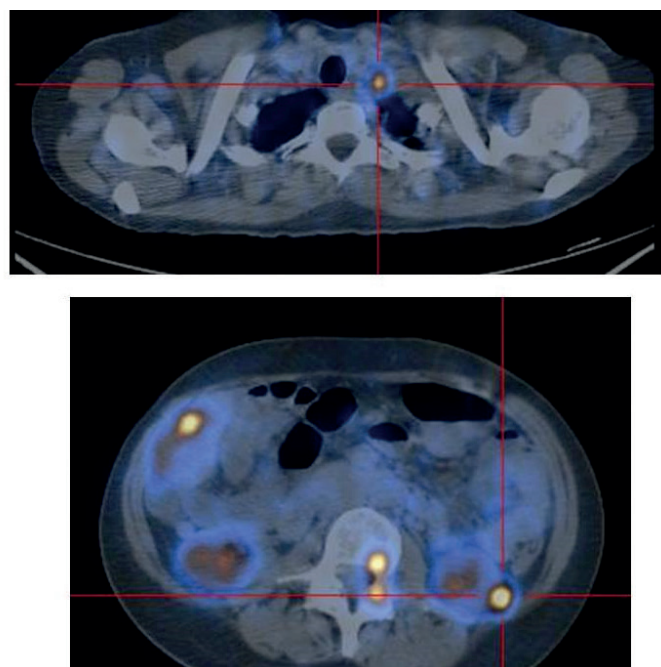
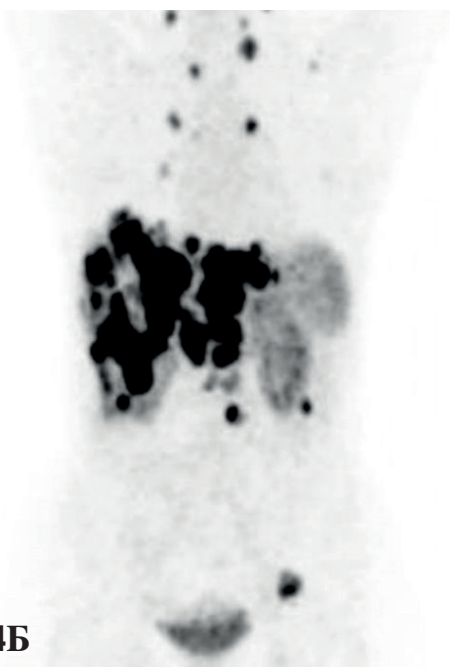
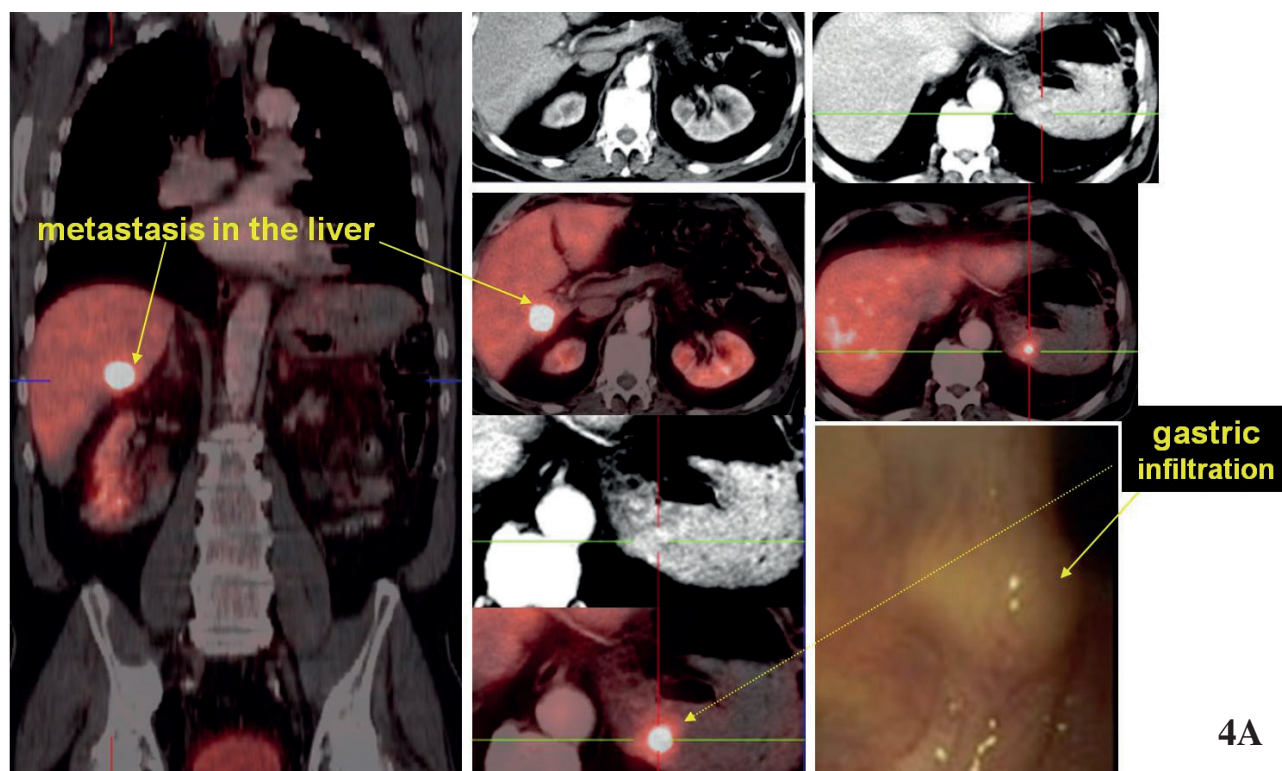


**Фигура 3.** Пациентка на 46 г. с невроендокринен тумор на панкреас. Проведеното SPECT-CT изследване с  $^{99m}\text{Tc}$ -Тектотид показва интензивно натрупване на маркираните соматостатинови аналози в туморна формация, локализирана в тяло на панкреас и 2 чернодробни вторични огнища в десен лоб (M-стадиране), сигнификантни за свръхекспресия на SSTR (A, B, B), потвърдено след направената прицелна биопсия. Имунохистохимичното изследване е позитивно за експресия на Chromogranin A (x10) на първичния тумор (Г); Ki 67 < 2%, G1 и чернодробни метастази (Д, Е).

80-100% при визуализиране на минимални по големина лезии и специфичност между 82 и 90%.<sup>18-19</sup> Най-често използваните позитронни радиофармацевтици за визуализация на соматостатинекспресиращите тумори са  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-съединенията, от които съществуват няколко вида. Тези съединения като агонисти се свързват приоритетно с различни подтипове соматостатинови рецептори:  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA<sup>0</sup>-Tyr<sup>3</sup>octreotide ( $^{68}\text{Ga}$ -DOTA<sup>0</sup>-TOC,  $^{68}\text{Ga}$ -edotreotide),  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA<sup>0</sup>-<sup>125</sup>I<sup>3</sup>octreotide ( $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-NOC) и  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA<sup>0</sup>-Tyr<sup>3</sup>octreotate ( $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-TATE).<sup>16-18</sup> Най-често прилаган е  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-

NOC, който е с най-висок афинитет към рецепторите от SSTR2-подтип, но също и към SSTR3 и SSTR5-подтипове (Фиг. 4).

Друго проучване показва, че точността на детекция достига 96% и е значително по-висока както в сравнение с тази на компютърната томография (с точност 75%), така и на останалите нуклеарно-медицински методи.<sup>18</sup>  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-TOC се свързва предимно със SSTR2- и SSTR5-подтип, а  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-TATE – основно със SSTR2-подтип. Независимо от разликите в афинитета, основните клинични индикации за диагностика, стадиране и рестадиране на НЕТ



**Фигура 4.** ПЕТ/КТ с  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-NOC при пациент с НЕТ на стомах. Визуализират се първичният тумор и солитарна метастатична лезия в черния дроб (М-стадиране) с интензивно натрупване на маркираните соматостатинови аналози, сигнификантно за свръхекспресия на соматостатинови рецептори (А). ПЕТ/КТ с  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-NOC при пациент, опериран по повод НЕТ на илеум. Визуализират се множествени чернодробни, костни и лимфогенни вторични огнища (рестадиране) с интензивна хиперфиксация на въведения радиофармацевтик, показващи свръхекспресия на соматостатинови рецептори (Б). С любезното съдействие на проф. Стефано Фанти, УБ Болоня).



## ПРЕДИКТИВНА СТОЙНОСТ НА НУКЛЕАРНОМЕДИЦИНСКИТЕ МЕТОДИ ...

са приблизително еднакво добре покрити и от трите радиофармацевтика. От друга страна, образните характеристики не винаги корелират с афинитета на свързване; например афинитетът на  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-TATE към SSTR2-подтип е почти десет пъти по-висок от този на  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-TOC, което обаче при директно сравнение на образите при едни и същи пациенти не показва по-висока чувствителност на детекция. В сравнително проучване на двата радиофармацевтика дори се установяват по-високи стойности на стандартизираното отношение на натрупване  $SUV_{max}$  и повече визуализирани туморни лезии с  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-TOC, отколкото с  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-TATE, което говори за непредвидимото „поведение“ на всеки индивидуален радиомаркер при отделни пациенти.<sup>19</sup> Въз основа на данните от научната литература може да се обобщи, че  $^{68}\text{Ga}$  DOTA TOC/NOС/TATE са взаимнозаменяеми като диагностични радиофармацевтици, въпреки известни разлики в афинитета си към различните соматостатинови рецепторни субтипове. Тези разлики са без съществено значение за диагностичните изследвания на НЕТ, но следва да се взимат в съображение при планиране на радионуклидната терапия с маркирани соматостатинови аналози и при серийно проследяване на един и същи пациент.

При ПЕТ/КТ с  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-съединения се получава допълнителна важна диагностична информация при 14% от пациентите спрямо СПЕСТ и при 21% от пациентите, спрямо компютърната томография.<sup>16-18</sup> Данните от публикуваните научни статии доказват водещата роля на  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA ПЕТ/КТ и по отношение целотелесно ЯМР изследване с контраст, като е цитирана точност съответно 99% и 89%.<sup>16-19</sup> Подчертава се предимството на  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA ПЕТ/КТ при детекцията на ангажирани лимфни възли (100% спрямо 73%) и белодорбни лезии

(100% спрямо 87%), но ПЕТ/КТ отстъпва по чувствителност при визуализацията на костномозъчни метастази (92%, спрямо 99% с ЯМР) и чернодорбни лезии (82% спрямо 96%).<sup>19</sup> Други автори също определят водещата ролята на  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA ПЕТ/КТ спрямо другите образни методи, при визуализацията на НЕТ и определяне на стадия, с чувствителност от 94.8%, специфичност 86.5%, с висока позитивна и негативна предикативна стойност от 91% и 92%.<sup>20</sup> Допълнително преимущество на този метод е уникалната възможност за целотелесно изследване и количествена оценка за функционална активност на лезиите и степента на експресия на соматостатиновите рецептори, предпоставка за прилагане на персонализирана терапия.<sup>17</sup>

Освен използването на добре известни и широко проучени агонисти на соматостатинови рецептори, напоследък съществуват публикации и върху използването на соматостатин-рецепторни антагонисти, които са със сходен афинитет към всички субтипове рецептори. Приложението обаче към момента е само пилотно и не може да се счита за дефинитивно валидирано.<sup>11, 23</sup>

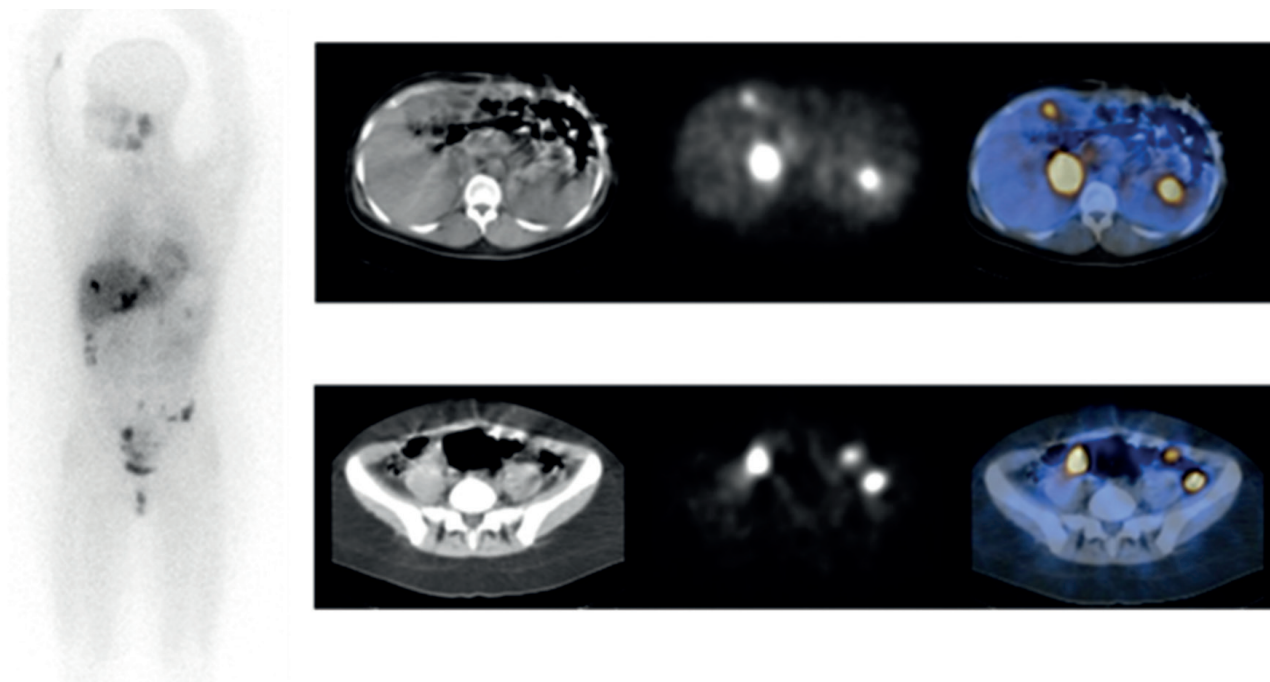
Ролята на изследванията с маркирани соматостатинови аналози е от особено значение при не невроендокринните тумори тумори с неизвестна соматостатинова експресия в контекста на възможно повлияване чрез използване на соматостатинов аналог, който в повечето случаи не влиза като терапевтично съображение. В рандомизирано проучване ефектът от дългодействащ *octreotide* при авансиран хепатоцелуларен карцином е сравнен спрямо плацебо при сцинтиграфски доказан позитивен SSTR-статус.<sup>24</sup> Установено е сигнификантното подобрение в общата преживяемост (ОП) при SSTR позитивни тумори, което рязко контрастира с общата кохорта без селекция на SSTR-статус<sup>25</sup>; това предполага ролята на соматостатин-

рецепторната сцинтиграфия като основен предиктивен фактор за отговор към терапия със соматостатинови аналози.

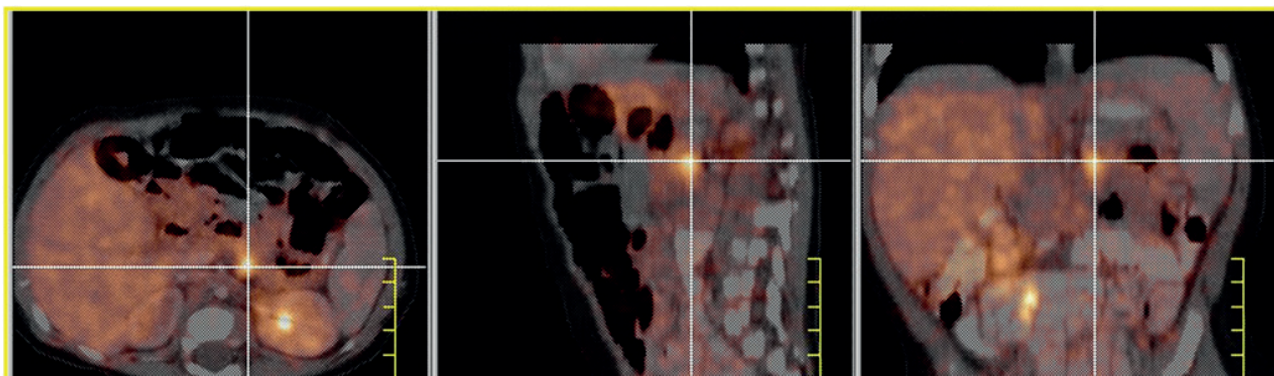
НЕТ могат да бъдат визуализирани и чрез използване на други радиофармацевтици, базирани на техните невроендокринни функционални характеристики. Един от нуклеарномедицинските методи с предиктивно значение за диагностика, терапия и проследяване на НЕТ е  $^{123/131}\text{I}$ -MIBG (metaiodobenzylguanidine), който се използва за визуализиране на тумори в надбъбречна медула, най-често феохромоцитом, параганглиом, невробластом, ганглионевробластом и др. Този радиофармацевтик се свързва с повърхностноклетъчните катехоламиннови рецептори, експресирани от туморната клетка, концентрира се в цитозола посредством активен трансмембранен транспорт и се съхранява интрацелуларно в невросекреторни гранули.<sup>14</sup> Целотелесна сцинтиг-

рафия с последващо SPECT-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 предопределяне ефективността на метаболитна радионуклидна терапия с лечебни дози  $^{131}\text{I}$ -MIBG<sup>14</sup> (Фиг. 5).

Един от най-широко използваните алтернативни методи при НЕТ е  $^{18}\text{F}$ -DOPA ПЕТ/КТ, приложим при невроектодермалните тумори с наличие на катехоламиннови рецептори (медуларен карцином на щитовидната жлеза, феохромоцитом, невробластом), които са с ниска или променлива соматостатинова експресия.<sup>21</sup> Детекцията с този радиофармацевтик е показана за визуализиране на първичните туморни формации и определяне на стадия на болестта, като е доказана по-високата му точност в сравнение с другите образни методи, но няма роля за определяне на индикации за соматостатинова терапия<sup>21</sup> (Фиг. 6).



**Фигура 5.** Пациент на 5 г., опериран по повод феохромоцитом на десен надбъбрек със suspectни клинични данни за рецидив. На целотелесното изследване със  $^{131}\text{I}$ -MIBG с последващо прицелно SPECT-СТ изследване се визуализират множествени метастатични инфилтрати в перитонеум с интензивно натрупване на въведения радиофармацевтик.

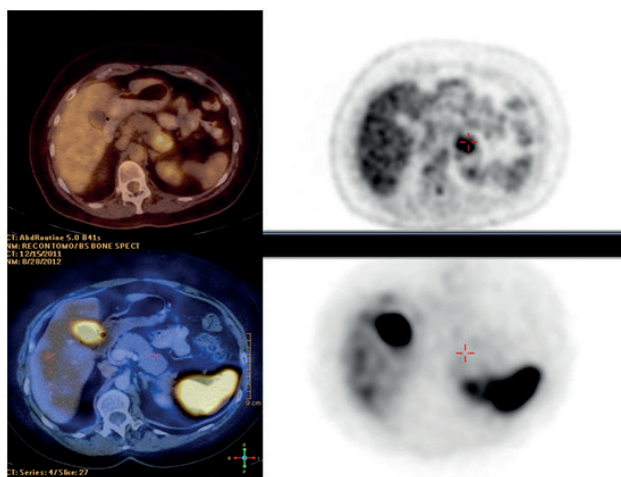


**Фигура 6.** ПЕТ/КТ с  $^{18}\text{F}$ -DOPA при пациент с хиперинсулинемия и хипогликемия. Визуализира се туморна формация, локализирана в опашка на панкреас с интензивно натрупване на въведения радиофармацевтик. След проведено оперативно лечение е установен инсулином (с любезното съдействие на проф. Стефано Фанти, УБ Болоня).

ПЕТ/КТ с  $^{18}\text{F}$ -FDG е показан за визуализация на НЕТ с по-ниска клетъчна диференциация и слаба експресия на соматостатинови рецептори, основно при G3 НЕК, медуларен карцином на щитовидна жлеза с високи стойности на серумен калцитонин ( $> 1000$  pg), смесени невроендокринни – не невроендокринниеоплазми (MiNEN), синхронни/метахронни злокачествени болести. Изследването с  $^{18}\text{F}$ -FDG ПЕТ/КТ осигурява

важна прогностична информация за наличие на по-агресивни тумори и необходимост от прилагане на химиотерапия<sup>22</sup> (Фиг. 7).

Провеждането на соматостин-рецепторна сцинтиграфия с  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HYNIC-TOC (Tektrotyd) или  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA ПЕТ/КТ следва да е съобразено с назначената терапия със соматостатинови аналози, като е необходимо да се осигури минимум 20-дневен срок между последна апликация на дългодействащи препарати и сцинтиграфското изследване; така се избягва възможна блокада на соматостатиновите рецептори. В практиката това се постига като сканирането се изтегли максимално преди поредна апликация.<sup>1,12, 13</sup>



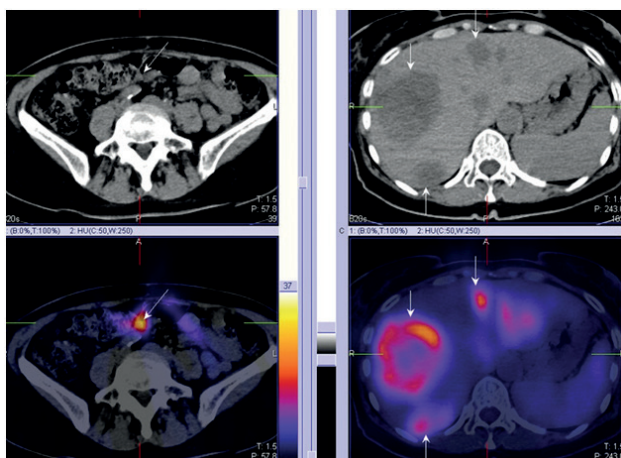
**Фигура 7.** Пациент на 71 г. с нискодиференциран невроендокринен тумор, локализиран в опашка на панкреас, с негативен образ на соматостатин-рецепторната сцинтиграфия, поради липса на SSTR експресия и позитивен образ на  $^{18}\text{F}$ -FDG ПЕТ/КТ, сигнификантен за по-агресивен характер на тумора.

### Основни клинични индикации за приложение на SPECT-CT с $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Tektrotyd/ $^{68}\text{Ga}$ -DOTA ПЕТ/КТ с предиктивно значение

I. Диагностика, N/M стадиране и определяне на SSTR-статус на НЕТ:

1. За визуализиране на suspekten първичен НЕТ в изследван орган или телесна структура;
2. За определяне на морфологичната структура, размери и точната локализация





**Фигура 8.** Пациентка с хепатални вторични огнища от невроендокринен тумор с неизвестно първично огнище, серумен CgA = 540 ng/ml. SPECT-CT изследването с  $^{99m}\text{Tc}$ -Tektrotid е позитивно за туморна формация, локализирана в илеум и множествени разнокалибрени чернодробни метастатични лезии в десия лоб, някои от които с централни зони на некроза, сигнификантни за свърхекспресия на SSTR. Проведено е оперативно лечение и терапия със Sandostatin LAR, 30 mg/28 d.

на съмнително огнище за биопсия;

3. За откриване на окултен първичен тумор при метастатичен процес с неизвестен първичен произход (Фиг.8).

4. За коректно N/M стадиране на болестта.

5. Нуклеарномедицинските методи за визуализиране на НЕТ са строго регламентирани като базисно предиктивно изследване за *in vivo* онагледяване наличието и степента на експресия на соматостатиновите рецептори и предопределяне на терапевтичния ефект от лечението със соматостатинови аналози и пептидната рецепторна радионуклидна терапия на принципа на тераностиката.<sup>12</sup> Тераностиката (диагностика и терапия) е нова концепция за специфична диагностика и прицелно ефективно лечение след прилагането на една таргетна молекула, свързана с различни радиоактивни изотопи при пациенти с прогресиращи авансирани НЕТ.<sup>12,13</sup> Соматостатиновите аналози се маркират съответно с

$^{99m}\text{Tc}/^{68}\text{Ga}$  или с  $^{177}\text{Lu}/^{90}\text{Y}$  за диагностични цели или за радионуклидна терапия. По този начин се визуализира наличието и плътността на експресираните соматостатинови рецептори, топографската им локализация и възможността за терапевтична алтернатива при пациенти с рефрактерни НЕТ.<sup>12,13</sup> 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. тераностика – една и съща молекула за терапия и диагностика). Независимо от спазването на това правило, следва да се има предвид, че дори промяната в радиометала (от  $^{68}\text{Ga}$  към  $^{177}\text{Lu}/\text{Y}$ ) може да доведе до промени в афинитета към SSTR, биоразпределението и фармакокинетиката.<sup>21</sup> Тераностиката се утвърждава като съвременен подход за персонализирана диагностика и терапия при НЕТ.<sup>12,13</sup>

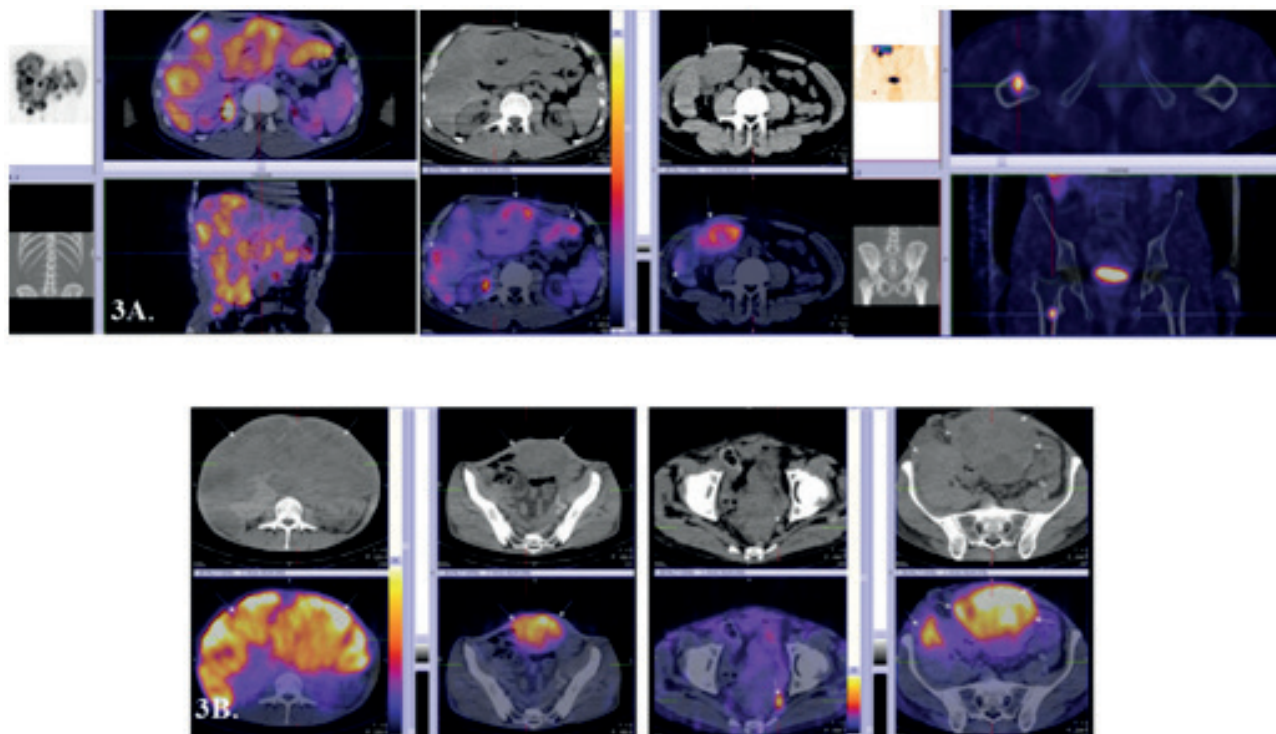
II. При болни с туморна хетерогенност по отношение на соматостатин-рецепторна експресия (основно при метастатични G3 невроендокринни тумори) се препоръчва комбинирана предиктивна оценка със соматостатин-рецепторни изследвания и ПЕТ/КТ с  $^{18}\text{F}$ -FDG за дефиниране на рискови SSTR-негативни/FDG-позитивни лезии.

III. При негативна експресия на соматостатинови рецептори, най-често при нискодиференцирани G3 НЕК и смесени НЕТ (MiNEN), е целесъобразно провеждане на ПЕТ/КТ с  $^{18}\text{F}$ -FDG.

IV. 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 А (CgA), СЕА, калцитонин, серотонин или 5-HIAA в урина.

2. За откриване, локализиране и определяне на степен на разпространение на метастатичен процес.



**Фигура 9.** Пациент на 38 г. с НЕТ на ректум. Базисното SPECT-CT  $^{99m}\text{Tc}$ -Tektrotyd показва хепатомегалия с множествени метастатични лезии със смесен характер – с интензивно натрупване на маркираните соматостатинови аналози и такива, ненагрупващи радиофармацевтика и единична костна вторична лезия в десния фемур; серумен СgA = 691 ng/ml (3A.). След провеждане на химиотерапия и лечение със Sandostatin LAR контролното изследване показва прогресия на хепатомегалията и черnodробните метастатични огнища, нови вторични лезии в костните структури и лимфаденопатия в лява илйачна област, сигнификантни за прогресия на болестта (3B).

3. За отгиференциране на патологични хиперфиксиращи огнища от физиологична активност, фиброзна тъкан или бенигни образувания.

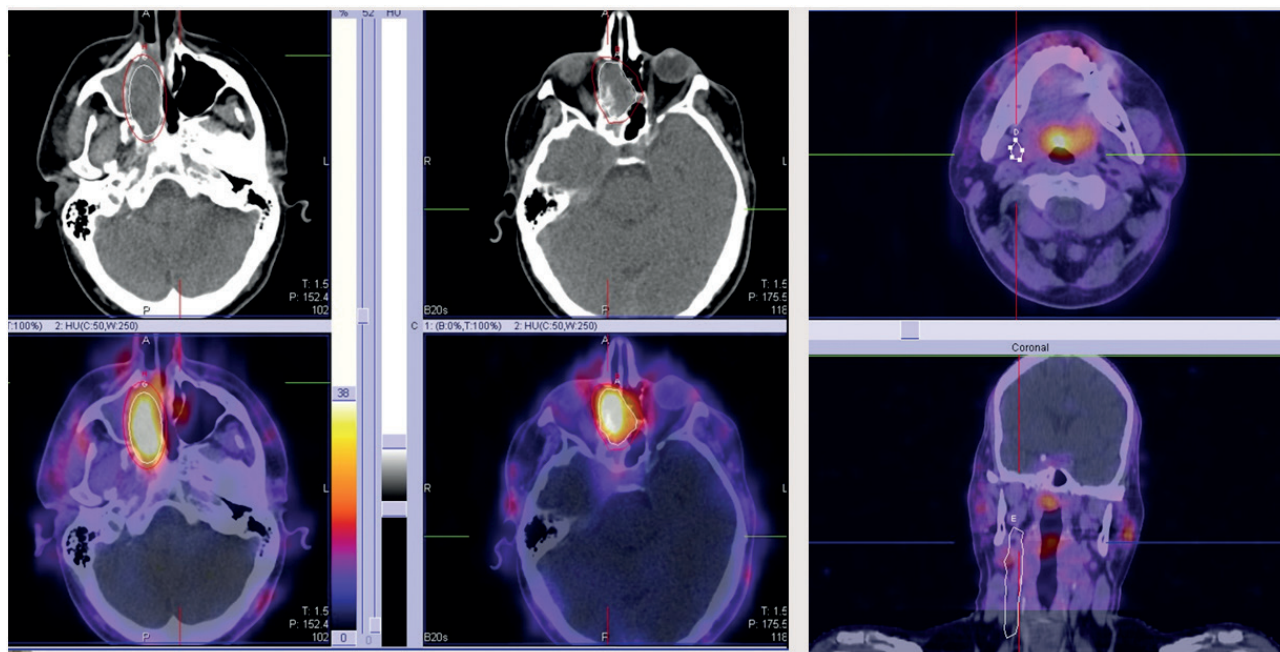
4. За определяне степенята на терапевтичен отговор при метастатична болест – пълен отговор, частична ремисия, стабилизирана болест, прогресия (Фиг. 9).

V. Чувствителността на SPECT-CT с  $^{99m}\text{Tc}$ -Tektrotyd/  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA ПЕТ/КТ за тумори на панкреас, секретирани биологично активни субстанции, напр. инсулиноми, гастриноми, VIPоми и др., е около 50-65%.<sup>7,9</sup> Косвен показател е повишена стойност на серумен СgA, предиктивен белег за наличие за свръхекспресирани повърхностноклетъчни рецептори за соматостатин.<sup>7,9</sup>

VI. Соматостатин-рецепторна сцинтиграфия се препоръчва за оценка на соматостатин-рецепторен статус като предиктор за отговор към лечение с *octreotide* LAR при не невроендокринни тумори с неизвестна или вариабилна експресия на соматостатинови рецептори, където лечението със соматостатинови аналози не е стандарт.

VII. Целотелесна сцинтиграфия с последващо SPECT-CT-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 предопределяне ефективността на метаболитна брахитерапия с терапевтични дози  $^{131}\text{I}$ -MIBG при НЕТ със свръхекспресия на катехоламинови рецептори.<sup>14</sup>





**Фигура 10.** Пациент на 55 г. с НЕТ на дясна конха, инфилтриращ етмоидален синус и назален септум; с единичен уголемен субмандибуларен лимфен възел – IV ниво вясно. Анатомио-топографско планиране при същия болел с delineация на мишенните обеми GTV и PTV, включващи първичния тумор и латероцервикалните лимфни възли вясно. Критичен орган е десният оптичен нерв, намиращ се в непосредствена близост до туморното ложе.

VIII. СПЕКТ-СТ-соматостатин-рецепторна сцинтиграфия или ПЕТ/КТ с  $^{68}\text{Ga}$ -маркирани соматостатинови аналози се препоръчва за лъчетерапевтично планиране при невроендокринни тумори: очертаване на същински туморен обем (GTV) и клиничен прицелен обем (CTV) (Фиг.10).

IX. Прицелните СПЕКТ-СТ сцинтиграфии с  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Tektrotyd и целотелесните ПЕТ/КТ изследвания с  $^{68}\text{Ga}$ -маркирани соматостатинови аналози значително повишават чувствителността, специфичността и диагностичната точност на детекция при НЕТ в сравнение с другите образни методи.

## Заклучение

В заключение можем да обобщим, че нуклеарномедицинските изследвания с маркирани соматостатинови рецептори СПЕКТ-СТ с  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Tektrotyd/  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA PET-CT имат много важна роля като пре-

дуктивни фактори за определяне на рецепторния SSTR-статусна НЕТ с оглед избор на персонализиран терапевтичен подход със соматостатинови аналози и/или пептидна рецепторна радионуклидна терапия при всеки отделен пациент с невроендокринен тумор.

## 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 (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 (5): 223-227
4. Williams ED, Sandler M. The Classification of Carcinoid Tumors. *Lancet* 1963; 2:1(7275): 238-239

## ПРЕДИКТИВНА СТОЙНОСТ НА НУКЛЕАРНОМЕДИЦИНСКИТЕ МЕТОДИ ...

---

- Gill Anthony. WHO 2017 Neuroendocrine Tumor Grading System. 4th Edition 2017
- Reubi JC, Caser B. Concomitant expression of several peptide receptors in neuroendocrine tumors: molecular basis for in vivo multireceptor tumour targeting. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2003;30:781-779
- Krenning EP, Kwekkeboom DJ, Lamberts SWJ, et al. Somatostatin receptor scintigraphy with [<sup>111</sup>In-DTPA-D-Phe1]- and [<sup>123</sup>I-Tyr3]- octreotide: the Rotterdam experience with more than 1000 patients. *Eur J Nucl Med* 1993; 20 (8): 716-731
- Decristoforo C, Mather S, Cholewinski W, et al. <sup>99m</sup>Tc-EDDA/HYNIC-TOC: a new <sup>99m</sup>Tc-labelled radiopharmaceutical for imaging somatostatin receptor-positive tumors: first clinical results and intra-patient comparison with <sup>111</sup>In-labelled octreotide derivatives. *Eur J Nucl Med* 2000; 27(9): 1318-1325
- Parisella MG, Chianelli M, Alessandria CD, et al. Clinical indications to the use of <sup>99m</sup>Tc-EDDA/HYNIC-TOC to detect somatostatin receptor-positive neuroendocrine tumors. *Q J Nucl Med Mol Imaging* 2012; 56: 90-98
- Sergieva S, Robev B, Dimcheva M, et al. Clinical application of SPECT-CT with <sup>99m</sup>Tc-Tektrotyd in bronchial and thymic neuroendocrine tumors (NETs). *Nucl Med Rev Cent East Eur* 2016;19:81-87
- Bural G, Muthukrishnan A, Oborski M, Mountz J. Improved benefit of SPECT/CT compared to SPECT alone for the accurate localization of endocrine and neuroendocrine tumors. *J Mol Imaging Radionucl Ther* 2012;21(3):91-96
- Bodei L, Mueller-Brand J, Zaknun J, et al. The joint IAEA, EANM, and SNMMI practical guidance on peptide receptor radionuclide therapy (PRRT) in neuroendocrine tumours. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2013;40(5):800-816
- Richard PB, Harshad RK. THERANOSTICS: From Molecular Imaging Using Ga-68 Labeled Tracers and PET/CT to Personalized Radionuclide Therapy. *Theranostics* 2012; 2(5):437-447
- Van Der Horst-Schrivers AN, Jager PL, Links TP, et al. Iodine-123 metaiodobenzylguanidine scintigraphy in localising pheochromocytomas: experience and meta-analysis. *Anticancer Res* 2006; 26(2B): 1599-1604
- Reubi JC, Schaer JC, Laissue J, 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
- Virgolini I, Ambrosini V, Chiti A, et al. EANM Procedure guidelines for PET/CT tumour imaging with <sup>68</sup>Ga-DOTA-conjugated peptides: <sup>68</sup>Ga-DOTA-TOC, <sup>68</sup>Ga-DOTA-NOC, <sup>68</sup>Ga-DOTA-TATE. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2010; 37(10):2004-2010
- 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
- Campana D, Ambrosini V, Pezzilli R, et al. Standardized Uptake Values of <sup>68</sup>Ga-DOTANOC PET: A Promising Prognostic Tool in Neuroendocrine Tumors. *J Nucl Med* 2010;51(3):353-359
- Poeppel TD, Binse I, Boy C, et al. Differential uptake of (<sup>68</sup>Ga)-DOTATOC and (<sup>68</sup>Ga)-DOTATATE in PET/CT of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *Recent Results Cancer Res* 2013;194:353-371
- 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
- Strosberg J, Wolin E, Krenning E, et al. NETTER-1 Phase III in Patients with Midgut Neuroendocrine Tumors Treated with <sup>177</sup>Lu-Dotatate: Efficacy and Safety Results. *J Nucl Med* 2016;57(2): 629
- Carrasquillo J, Chen C. Molecular Imaging of Neuroendocrine Tumors. *Semin Oncol* 2010; 37(6): 662-679
- 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
- Dimitroulopoulos D, Xinopoulos D, Paraskevas E, et al. Long acting octreotide in the treatment of advanced hepatocellular cancer and overexpression of somatostatin receptors: Randomized placebo-controlled trial. *World J Gastroenterol* 2007; 13(23): 3164-3170



ИМУННИ ЧЕКПОИНТ-ИНХИБИТОРИ – PDL-1-  
ЕКСПРЕСИЯ КАТО ПРЕДИКТИВЕН БИОМАРКЕР ПРИ  
НЕДРЕБНОКЛЕТЪЧЕН КАРЦИНОМ НА БЯЛ ДРОБ

проф. д-р Савелина Поповска, гмн  
д-р Полина Дамянова  
д-р Красимир Петров

Отделение по клинична патология, УМБАЛ *Георги Странски*, Плевен





# ИМУННИ ЧЕКПОИНТ-ИНХИБИТОРИ – PDL-1-ЕКСПРЕСИЯ КАТО ПРЕДИКТИВЕН БИОМАРКЕР ПРИ НЕДРЕБНОКЛЕТЪЧЕН КАРЦИНОМ НА БЯЛ ДРОБ

*проф. д-р Савелина Поповска, дмн  
д-р Полина Дамянова  
д-р Красимир Петров*

Отделение по клинична патология, УМБАЛ Георги Странски, Плевен

## ОБЗОР

*Ролята на имунната система (ИС) в процеса на възникване, развитие и прогресия на туморите все повече се изяснява. Взаимодействието между ИС е продължителен постоянен процес, който се осъществява с участието на множество клетки, клетъчни структури и сигнални пътища. Това взаимодействие се осъществява в туморната микросреда и детайлното му разясняване предоставя възможност за неговото таргетиране.*

*В статията се обсъждат туморната имунология, механизмите на взаимодействие между туморите и ИС, както и възможностите за терапевтично повлияване. Обсъждат се класовете имунотерапия, както и съответните им предиктивни биомаркери; видовете системи и методи за изследване, както и тяхното валидиране.*

## Увод

Злокачествените неоплазми се развиват поради натрупване на генетични и епигенетични изменения, които правят туморните клетки генотипно и фенотипно различни от нормалните. Настъпилите промени в експресията на съответните антигени могат да бъдат разпознати от имунната система (ИС) на гостоприемника чрез индуциране на антиген-специфичен имуен отговор (ИО). В него участват клетъчни структури като Т-лимфоцити, антиген представящи клетки и други имунни клет-

ки, както костимулиращи и инхибиторни сигнали.<sup>1</sup>

## Туморна имунология

Някои тумори “узбавят” системата за имуен контрол и пролиферират при имунокомпетентни пациенти. Възможна причина е имунна супресия в туморната микросреда като резултат от взаимодействие между туморните и имунните клетки. В тези случаи се развива периферен Т-клетъчен имуен толеранс, в който участват т.нар. ключови “check-point” молекули, като например

Programmed cell death-1 (PD-1) и Programmed cell death-1 и 2 лиганд (PD-L1/PD-L2), cytotoxic-T-lymphocyte – associated antigen 4 (CTLA-4), Glucocorticoid-induced TNFR-related gene (GITR) и Lymphocyte-activation gene 3 (LAG3). Те функционират в различни фази от ИО като регулират продължителността и степента на Т-клетъчна активност.

Първоначалните опити да се използва ИС с терапевтични цели в онкологията са били насочени главно към повишаване на имунната атака. През последните години резултати от клинични проучвания показва, че „освобождаването“ на инхибиторни пътища в ИО има доказан благоприятен ефект върху тумора.

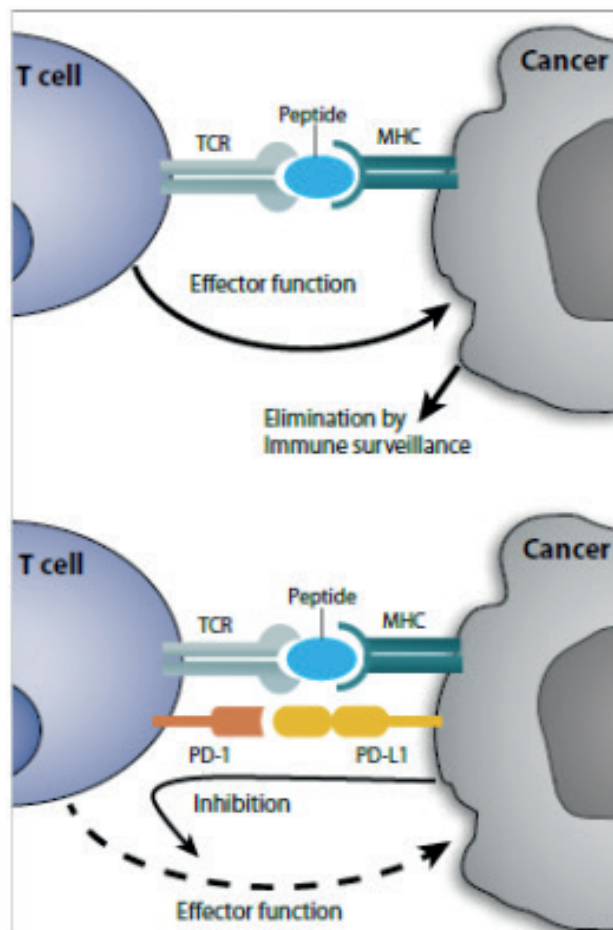
От съществуващите различни механизми, два основни пътя заслужават по-голямо внимание, поради забележителната ефективност при редица проучвания за различни видове карциноми. Това са механизмът на цитотоксичен Т лимфоцит-асоцииран антиген 4 (CTLA-4) и белтъкът, свързан с програмираната клетъчна смърт-1 (PD-1).<sup>23</sup>

### Роля на PD1 като отрицателен регулатор на ИС

PD-1 има инхибиторен ефект върху ИС и участва в ефекторната фаза на ИО, като формира комплекс с лигандите си (PD-L1 или PD-L2), за да упражнява ефекта.

PD-1 участва в развитие на периферен Т-клетъчен имуен толеранс. Ролята на PD-1 в туморната микросреда е потискане активността на активирани антиген специфични Т-лимфоцити. Свързване на PD-1 рецептора върху Т-клетките с неговите лиганди PD-L1 и 2, потиска тумор-специфичната Т-клетъчна активност и позволява на тумора да „избяга“ от ИО (Фиг.1).

PD-L2 има помощна роля при инактивацията на ИО, а основната роля е тази – на PD-L1.



Фигура 1. Роля на PD-1/PD-L1 пътя за развитие на имуен толеранс при карциноми.

Блокирането на PD-1 върху Т-лимфоцитите или на PD-L1 върху туморните клетки възстановява антитуморната Т-клетъчна активност. Определянето на PD-L1 експресията на туморните клетки е важно, за установяване на пациентите, които биха отговорили по-успешно на анти-PD-1/PD-L1 терапия.

### Предиктивни биомаркери като съпътстващи и допълващи диагностични тестове

Предиктивните биомаркери в онкологията позволяват селекция на пациенти, кои-

то биха имали полза от определено лечение и формират основата на стратифицираща или персонализирана таргетна терапия.<sup>45</sup>

С въвеждането на персонализираната медицина Американската администрация по храните и лекарствата (FDA) въведе термина „съпътстваща диагностика“, която се определя като диагностика, необходима за употребата на свързаното с нея лекарство, въз основа на данни за клинична му ефикасност и безопасност. Съпътстващите диагностични тестове (companion diagnostic, CDx) осигуряват съществена информация за ефективно и безопасно използване на определен лекарствен продукт.

Използването с кореспондиращия лекарствен продукт е указано в продуктова информация на медикамента и диагностичния kit.<sup>6</sup>

PD-L1 е предиктивен биомаркер, който може да бъде използван за взимане на информирано терапевтично решение при пациенти с метастатичен НДКБК.<sup>7</sup>

PD-L1 IHC 22C3 pharmDx е първият и единствен аналитичен тест, валидиран и одобрен за идентификация на пациенти за лечение с *Keytruda*® ( *pembrolizumab*).<sup>7</sup>

Основното предимство на съпътстващата диагностика е разделянето на пациентската популация в две подгрупи: биомаркер-положителни и биомаркер-негативни, което гарантира на пациентите шанс за клинична полза от терапията на база на безопасност и ефективност.

През 2015 г. FDA въвежда и термина „допълваща диагностика“ за персонализирана терапия, която се определя като диагностично изследване, което прогнозира благоприятен резултат от свързан медикамент, чрез селектиране на пациенти въз основа на резултатите от анализа. Пациентите могат да бъдат лекувани със съответното лекарство и при отрицателни резултати от анализа, или ако те липсват, т.е. използване-

то на допълващи диагностични тестове не е задължително за лечение със съответното лекарство.<sup>8</sup>

Както съпътстващите, така и допълващите диагностични анализи се подлагат на стриктна аналитична валидация на процесите за точност, възпроизводимост, специфичност, чувствителност и устойчивост на резултата. И двата типа диагностика изискват използване на специфични аналитични реактиви и апаратура.<sup>9,10</sup>

### Имунотерапия с чекпоинт-инхибиторни PD-L1/PD-1 антитела при пациенти с НДКБК

Напредъкът в изучаване на молекулярната характеристика на НДКБК, особено при аденокарциномите, позволи идентифициране на ключови генетични аберации, които могат да бъдат използвани при молекулярна таргетна терапия.<sup>11</sup> Въпреки успеха на това лечение, възниква придобита резистентност, водеща до прогресия на болестта<sup>12</sup> и изискваща нови терапевтични подходи.

Туморна имунотерапия е всяка терапия, която взаимодейства с имунната система за лечение на злокачествени тумори. Идентифицирането на CTLA-4 и PD-1 / PD-L1 като ключови фактори, чрез които туморите избягват ИО на гостоприемника<sup>3</sup>, доведе до развитието на ново поколение имунотерапевтични средства, насочени към тези молекули.

Имунотерапията, таргетираща оста PD-L1/PD-1, е показала впечатляваща и обещаваща ефикасност за бъдещето на пациентите с метастатичен белодробен карцином.<sup>13</sup>

Лекарствени агенти, одобрени от FDA за лечение на пациенти с напреднал НДКБК, са: за I – ва и II линия терапия – *pembrolizumab* (*Keytruda* [Merck & Co]); за II – ра линия те-

рапия – *nivolumab* (*Opdivo* [Bristol-Myers Squibb]) и *atezolizumab* (*Tecentriq* [Genentech / Roche]).

*Durvalumab* (AstraZeneca) и *avelumab* (BAVENCIO, EMD Serono, Inc.) са в процес на клинично проучване за НДКБК.

**PD-1-инхибитори за терапия на НДКБК.** PD-1 инхибиторите включват лекарствени агенти като *nivolumab* и *pembrolizumab*.

*Nivolumab* е моноклонално антитяло – човешки имуноглобулин G4 (IgG4), което блокира PD-1-медираното сигнализиране и освобождава Т-клетките от инхибиторното взаимодействие с PD-L1 и PD-L2. *Nivolumab* е активен и при различни солидни тумори и е одобрен от FDA за лечение на пациенти с напреднали НДКБК, бъбречно-клетъчен карцином, меланом и класически Ходжкинов лимфом.<sup>14,15</sup>

*Pembrolizumab* е хуманизирано високоафинитетно IgG4/капа изотипно моноклонално антитяло, което блокира PD-1

върху Т-клетките и води до активиране на тумор-специфичната им цитотоксичност. *Pembrolizumab* има оптимизиран фрагмент, кристализиращ регион, което позволява да се сведе до минимум антитяло-зависимата клетъчна цитотоксичност (АТЗКЦТ) и комплемент-зависимата цитотоксичност (КЗЦТ).<sup>16</sup> Това действие е важно, тъй като интактната АТЗКЦТ има потенциал да причини изчерпване на активираните Т-клетки и тумор-инфилтриращите лимфоцити и да доведе до намалена активност, поради PD-1 експресията върху съответните имунни клетки.<sup>17</sup> *Pembrolizumab* е одобрен от FDA за лечение авансирал НДКБК и на метастатичен меланом, рецидивирал или метастазирал плоскоклетъчен карцином на глава и шия, класически Ходжкинов лимфом, локално авансирал или метастатичен уротелен карцином и карцином с висока микросателитна нестабилност (MSI-H), независимо от локализация или хистогенеza.

**Таблица 1.** Диагностични платформи за PD-1 в зависимост от вида на диагностиката, прилагания медикамент и граница за позитивност.

|  | <b>Nivolumab</b>   | <b>Pembrolizumab</b>                         | <b>Atezolizumab</b>                                     | <b>Durvalumab</b>                        |
|--|--|--|---|--|
| <b>Клон на антитяло, използван в системата</b> | 28-8 (Dako)  | 22C3 (Dako)SP263 (Ventana)                   | SP142 (Ventana)   | SP263 (Ventana)                          |
| <b>Интерпретативна оценка</b>                  | Мембрана на туморната клетка (≥ 1%, 5%, 10% TPS)                 | Мембрана на туморната клетка (≥ 1%, 50% TPS) | TC1/2/3 (≥ 1%, ≥ 5%, ≥ 50%) IC1/2/3 (≥ 1%, ≥ 5%, ≥ 10%) | Мембрана на туморната клетка (≥ 25% TPS) |
| <b>Инструмент и система</b>                    | EnVision Flex на Autostainer Link 48 Optiview on Benchmark ULTRA | EnVision Flex на Autostainer Link 48         | OptiView Detection и Amplification на Benchmark ULTRA   | OptiView Detection на Benchmark ULTRA    |
| <b>FDA IVD статус</b>                          | IVD допълваща диагностика (НДКБК, меланом)                       | IVD съпътстваща диагностика (НДКБК)          | IVD допълваща диагностика (уротелен карцином)           | IVDI клас (уротелен карцином)            |



**PD-L1-инхибитори.** PD-L1 инхибиторите възпрепятстват взаимодействието PD-1/PD-L1, но оставят PD-1/PD-L2 пътя intact. PD-L1 инхибиторите включват *atezolizumab*, *durvalumab* и *avelumab*. *Atezolizumab* и *durvalumab* са инженерни антители на човешки IgG1 анти-PD-L1, с мутации в техните Fc домейни, създадени с цел да се отстрани както АТЗКЦТ, така и КЗЦТ. *Avelumab* е напълно човешко IgG1 анти-PD-L1 моноклонално антителило и за разлика от другите PD-1/PD-L1 инхибитори е запазил своята АТЗКЦТ и КЗЦТ активност по данни от предклинични изследвания.<sup>18</sup>

*Atezolizumab* е активен при уротелен карцином в проучване фаза I<sup>19</sup> и в последствие е одобрен от FDA за лечение на напреднал стадий на уротелен карцином. Одобрен е от FDA и за терапия от втора линия при напреднал НДКБК.

Нуждата от биомаркер, който позволява по-добра селекция на пациентите, е съществена за подобряване на ефикасността от лечението и за по-добро управление на разходите.

### Установяване на PD-L1-експресия при НДКБК

Туморната PD-L1 експресия, установена с имунохистохимичен (ИХХ) метод на изследване, е потенциален биомаркер за идентифициране на пациенти, които имат благоприятен ефект от имунотерапия с PD-1/PD-L1 инхибитори.<sup>13</sup>

В проучванията  *pembrolizumab* е използван PD-L1 ИНС 22C3 PharmDx (Dako) за определяне на туморната PD-L1 експресия.<sup>20,21</sup> Този анализ е одобрен като съпътстващ диагностичен тест от FDA. В проучванията за *nivolumab* са използвали анти-PD-L1 антителило (28-8)<sup>22,23</sup>, което е одобрено като допълващ диагностичен тест. Клонове SP142 и SP263 на PD-L1 антителилото са използвани за определяне на PD-L1 експресията в проучванията за *atezolizumab*<sup>24</sup> и *durvalumab*.<sup>25</sup>

Приложението на PD-L1 като биомаркер е сложно, като се има предвид, че експресията на PD-L1 е част от различна съпътстваща или допълваща диагностика, разработена за всеки PD-1/PD-L1 инхибитор, а тестовете включват различни клонове на ИХХ антителило, протоколи за оцветяване и платформи, системи за оценяване и гранични стойности за определяне на позитивността.<sup>26</sup>

**Аналитични системи за изследване на PD-L1.** Съществуват няколко диагностични платформи за PD-L1 (Табл.1), всяка от които използва различни клонове на антителило, оцветяващи протоколи, платформи и различни гранични стойности за клинични решения.

*Blueprint Project* е PD-L1 сравнителен анализ, осигуряващ информация за аналитичната и клиничната съвместимост на четири ИХХ теста: 28-8 (Dako), 22C3 (Dako), SP263 (Ventana) и SP142 (Ventana), използвани в клинични изпитвания.

Трите PD-L1 антителила – 28-8 (Dako), 22C3 (Dako), SP263 (Ventana), определени с метода на имунохистохимията, са близки по отношение на PD-L1 експресията на туморните клетки, докато SP142 показва пониска експресия. Всички анализи демонстрират PD-L1 експресия в имунните клетки, но с по-голяма променливост, отколкото при туморните клетки.<sup>12</sup>

При взимане на терапевтични решения, патолозите не трябва да използват алтернативна гранична стойност, различна от тази, използвана за определяне на терапевтичния отговор при клинични проучвания за конкретно лекарство. Приликата на резултатите при използваните анализи не доказва взаимозаменяемостта им за клинична употреба.

Някои методологични аспекти оказват влияние на ИХХ резултати за PD-L1 в трите фази на обработка на материалите.

**Преданалитична фаза.** Препоръчва се времето на студена исхемия, т.е. от началото на ексцизията до фиксирането във формалин да е по-малко от 30 минути, пос-



ледвано от фиксиране в 10% неутрален буферизиран формалин от 6 до 48 часа. Според ръководствата за интерпретация на 22С3 и 28-8 pharmDx (Agilent Technologies/Dako), критична стъпка за PD-L1 ИХХ анализ е фиксиране на тъканите, за най-малко 3 часа. Времето на съхранение на неоцветени тъкани срезци също повлиява резултатите от оцветяването, като трябва да е в рамките на 2 месеца. PD-L1 тестовете не са валидирани в случай на декалцинация и се препоръчва да се изследват други тъкани, ако такива са налични.

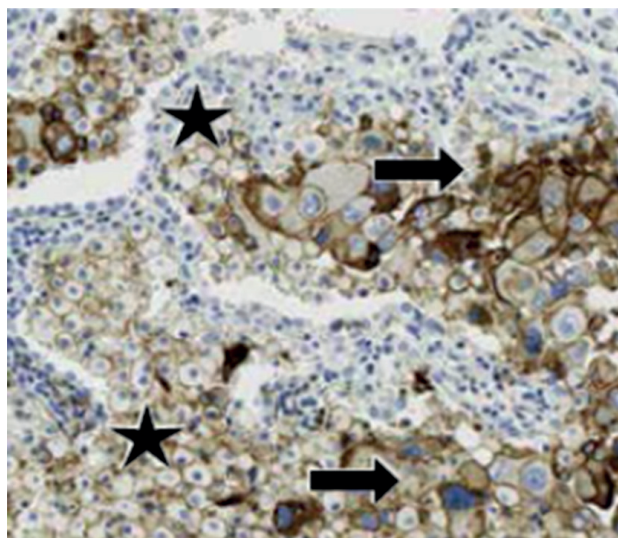
*Аналитична фаза.* Няколко общи аспекта трябва да бъдат контролирани и оптимизирани по време на аналитичната процедура: избор на подходящи антитела – вид и концентрация на антитялото, начина на възстановяване на епитопи-температура, инкубационно време, температура на топенето на парафина. Предлаганите търговски тестове за *in vitro* диагностика са стандартизирани и клинично валидирани.

За т.нар. тестове, за които всяка лаборатория сама разработва протокол и процедурата за работа (laboratory developed tests, LDTs) от решаващо значение е извършването на адекватно валидиране, спазвайки правилата за тази дейност.

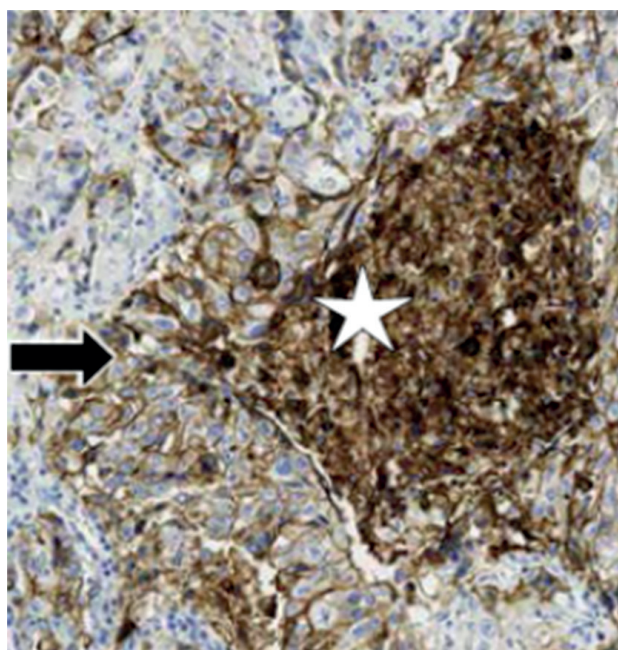
*Постаналитична фаза.* Постаналитичната фаза започва с оценяване на оцветените срезци с помощта на светлинен микроскоп и сравняване с рутинно оцветените препарати. Интензивността на оцветяването зависи от използваната система за усилване на сигнала.

### PD-L1 хистологична ИХХ-оценка

PD-L1 експресия може да е налична в дендритни клетки, макрофаги, мастоцити, Т- и В-лимфоцити, както и върху ендотелни и туморни клетки.<sup>27</sup> Имунните клетки като инфилтриращи лимфоцити или макрофаги, служат като PD-L1 позитивна вътрешна контрола (Фиг.2 и 3).



**Фигура 2.** PD-L1 ИХХ оцветяване с антитяло 28-8 (Dako) при плоскоклетъчен белодробен карцином. Туморните клетки (стрелки) са примесени с алвеоларни макрофаги (звезди). Макрофагите са по-слабо оцветени от туморните клетки.



**Фигура 3.** PD-L1 ИХХ оцветяване с антитяло 28-8 (Dako); със звезда е отбелязана туморната некроза, която не се има предвид в отчитането. Туморните клетки са отбелязани със стрелка.

Некротични или дегенерирани злокачествени клетки трябва да бъдат изключени от оценката. Минималният брой туморни клетки, определен от производителя за определяне на пропорцията позитивни туморни клетки, е различен. Например минимумът е 50 клетки за SP142 (Ventana) и 100 клетки за 28-8 и 22C3 pharmDx (Agilent Technologies/Dako).

**Определяне на положително оцветяване на PD-L1 при ИДКБК.** Критериите за PD-L1 позитивност не са еднакви за петте използвани анализа. В четири от тях – 28-8, 22C3, SP263 и 73, 10-положително оцветяване с PD-L1 се дефинира като цялостно периферно или частично линейно мембранно оцветяване на туморните клетки, независимо от интензивността. Цитоплазмено оцветяване в туморните клетки не се счита за положително, освен при използване на SP263 клон антитяло.

Немалигнени и имунни клетки, вкл. лимфоцити или макрофаги и некроза могат също да се оцветят положително за PD-L1. Тези клетки не трябва да се включват в крайната оценка за определяне на PD-L1 позитивността на тумора.

При използване на SP142 клон антитяло обаче, PD-L1-позитивните имунни клетки, както и туморните клетки се включват в крайната оценка на PD-L1 оцветяването.

**Хетерогенност на имунооцветяването на PD-L1.** Експресията на PD-L1 често е нееднородна в изследваните тумори. Препоръчва се при анализ на големи тъканни срези, на малко увеличение те условно да се разделят на области с относително еднакво количество туморна тъкан и да се оценява всяка област, като се определя процент на PD-L1 позитивност. Средният процент на позитивност от всички области се обобщава и се определя степента на позитивност на тумора, представен като процент позитивни витални туморни клетки с пълно

или частично мембранно оцветяване (tumor proportion score – TPS) за изследвания срез.

**Трудности при интерпретация на PD-L1 ИХХ резултат.** Наличието на артефакти може да се дължи на неспецифичен фон, възникващ при неподходящо изсушаване, неправилно депарафиниране или непълно измиване на срезите; ефект на смачкване; некроза; артефакти в периферията на среза, дължащи се на изсушаване на тъканта преди фиксирането или по време на процедурата за оцветяване; неподходяща фиксация или обработка на материала.

PD-L1 позитивни лимфоцити и хистиоцити, разположени между PD-L1 негативни туморни клетки, могат да бъдат интерпретирани като положителни. Алвеоларните макрофаги могат да имат мембранно оцветяване и да бъдат използвани като вътрешна позитивна контрола, но може да бъдат оценени и като фалшиво позитивни туморни клетки, когато са близки или съседни на PD-L1-негативни туморни клетки. Съотношението ядро / цитоплазма, нежната ядрена мембрана на макрофагите и съпоставянето на ИХХ с рутинно оцветения тъканен срез може да бъде от полза. Цитоплазменото оцветяване на туморните клетки не трябва да се отчита като позитивно.

Препоръчва се патолозите да интерпретират резултатите от съответните контроли като част от анализа на ИХХ резултата при оцветяване с предиктивни маркери.<sup>28</sup> Видът на диагностичния кит и използваните диагностични критерии трябва да бъдат отбелязани в изследването.

Тъй като терапевтичният отговор на PD-1/PD-L1 инхибиторите се приема като пропорционален на степента на PD-L1 позитивност, при отчитане степента на положителни туморни клетки трябва да се използват категориите (напр. < 1%, 1% до 49%; 5%; TPS > 50%), подходящи за употребата на съответното лекарство.

**PD-L1 22C3 PharmDx като съпътстващ диагностичен тест.** Представяне на платформата. Характеристики на анти тялото и условията за имунооцветяване. PD-L1 ИХХ 22C3 pharmDx е *in vitro* диагностичен (IVD) ИХХ тест, който използва мише моноклонален анти тяло клон 22C3, което разпознава извънклетъчния домейн на PD-L1, за да се оцени експресията на PD-L1 във формалин-фиксиранни, включени в парафин тъкани от НДКБК. Процедурата за оцветяване с ИХХ се извършва на Dako Autostainer Link 48 платформа с валидиран протокол за оцветяване. Оценява се процентът на жизнеспособни туморни клетки, показващи частично или пълно мембранно оцветяване спрямо общата площ на виталния тумор.<sup>29</sup> Повишената PD-L1 експресия (по-висок TPS) се свързва с по-висока честота на обективен отговор (ОО) и благоприятен резултат при пациенти, лекувани с  *pembrolizumab*.<sup>30</sup> През октомври 2015 г. PD-L1 ИХХ 22C3 pharmDx kit е одобрен от FDA като съпътстващ диагностичен тест за лечение с  *pembrolizumab* при пациенти с напреднал/метастатичен НДКБК.

Въпреки че PD-L1 ИХХ 22C3 pharmDx анализът е съпътстващ диагностичен тест, който е стандартизиран и валидиран, понякога възникват някои неочаквани проблеми, като вариации в партидата на реагентите и грешките от автоматичното обработване.<sup>31,29</sup> Препоръчва се на лабораториите да включат контролни срези заедно с клиничните случаи за тестване на PD-L1 ИХХ, за да се осигури ефективност на анализа, както и да участват в система за външен контрол. Тъкан от НДКБК, показваща области с положителна и отрицателна експресия на PD-L1, е идеална като контрола.

Паренхим от тонзила може да бъде използвана като възможна контрола с оцветяване за PD-L1 на епитела в криптите и фоликуларните макрофаги в герминатив-

ните центрове и липса на оцветяване в повърхностния епител. Тъкан от плацентата е друга контролна опция, при която се наблюдава оцветяване с PD-L1 в синцитиотрофобластните клетки.<sup>32</sup>

**Оценка на оцветяването и отчитане.** PD-L1 ИХХ трябва да се отчита от квалифициран патолог. Преди да се изследва, е необходима оценка на качеството на контролите.

Най-малко 100 жизнеспособни туморни клетки са необходими за валидна интерпретация на PD-L1 оцветяването, както и за оценка на контролните оцветявания. При наличие на по-малко от 100 жизнеспособни туморни клетки се препоръчва срязване в дълбочина на същото блокче (ако се счита, че може да бъде полезно) или се изследва друго блокче от пациентската проба (ако е налично).

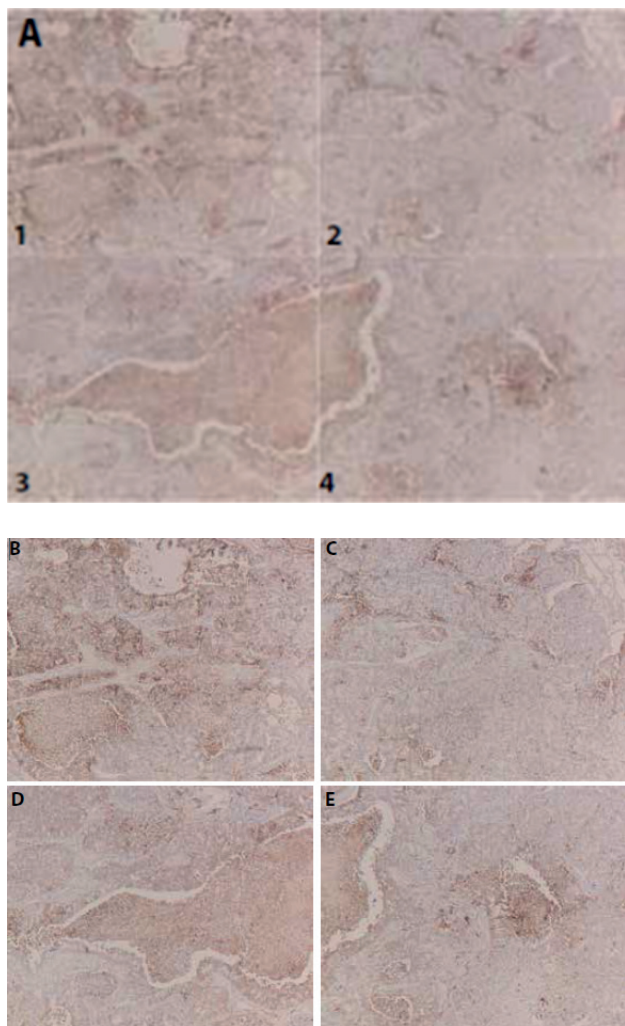
Експресията на PD-L1 се оценява чрез определяне на категория или процент позитивност на тумора (tumor proportion score – TPS).<sup>20</sup> Оценката на резултатите включва частично или цялостно оцветяване на мембраната (с интензитет 1+, 2+, 3+). Цитоплазмено оцветяване, което ако е налично, не трябва да се включва при отчитането на позитивността.

Всички други оцветени клетки като туморно-асоциирани имунни клетки, нормални/ненеопластични/или некротични клетки не се отчитат.

Резултатът се интерпретира като: липса на PD-L1 експресия (TPS < 1%); ниска PD-L1 експресия (TPS 1-49%); висока PD-L1 експресия (TPS ≥ 50%) (Фиг. 4).

Туморът трябва да се счита за PD-L1 позитивен, а пациентът е подходящ за терапия с  *pembrolizumab* от първа линия на терапия<sup>20</sup>, ако пробата показва висока PD-L1 експресия (TPS ≥ 50%), а за втора линия на лечението е необходима PD-L1 експресия ≥ 1% TPS).





**Фигура 4.** А. Пример за тумор с хетерогенно оцветяване за PD-L1, разделен на 4 полета за оценка на TPS, представени от В до Е. Вижда се хетерогенното оцветяване в отделните полета. TPS в този случай е съответно за В-Е 90%, 40%, 80%, 30%. Общият скор за TPS е 60%  $[(90+40+80+30)/4]$ .

PD-L1 анализът най-добре се оценява на туморни блокчета от хирургични резектати. Алтернативно, оцветяването може да се извърши върху малки биопсични проби.

### Предиктивно значение

Значението на PD-L1 ИХС 22C3 PharmDx анализа за прогнозиране на отговора на лечението с  *pembrolizumab*  при пациенти с НДКБК е изследвано в няколко широкомасщабни клинични проучвания.<sup>30,20,21,33</sup>

Като цяло, високата PD-L1 експресия се свързва с по-висока честота на обективен отговор (ОО) и благоприятен резултат за пациентите. Във фаза I на клиничното изпитване KEYNOTE-001, в което са включени както предварително нелекувани, така и лекувани пациенти с НДКБК, ОО е 10.7%, 16.5% и 45.2%; за пациентите с TPS, съответно, по-малко от 1%, 1% до 49% и 50% или повече.<sup>20</sup> Преживяемостта без прогресия (ПБП) и общата преживяемост (ОП) са също по-добри при пациенти с TPS от 50% или повече, в сравнение с тези с TPS < 1% или 1% до 49%.<sup>33</sup> Мембранната PD-L1 експресия в най-малко 50% от туморните клетки (TPS ≥ 50%) е избрана като клинично валидирана стойност в това изследване. Оценката на PD-L1 експресията в имунните клетки не подобрява предиктивната стойност на теста.<sup>20</sup>

Последващото KEYNOTE-010 рандомизирано проучване фаза 2/3, сравнява ефикасността на  *pembrolizumab*  със стандартна терапия ( *docetaxel* ) при предварително лекувани пациенти с напреднал НДКБК и с позитивни резултати за PD-L1 (TPS ≥ 1%).  *Pembrolizumab*  превъзхожда  *docetaxel*  по отношение на ОП и профила на съотношението полза/риск. В подгрупата, стратифицирана от степента на PD-L1 експресия, постепенното увеличаване на честотата на ОО и ОП се свързва с по-висок TPS. ОО е 8.6%, 15.8%, 22.6% и 33.7% при пациентите с TPS от 1% до 24%, 25% до 49%, 50% до 74% и > 75%, съответно.<sup>21</sup> Тъй като това проучване включва само НДКБК с положителна PD-L1 ИХХ (TPS ≥ 1%), ефикасността на  *pembrolizumab*  в сравнение с  *docetaxel*  при пациенти с отрицателен за пациенти с PD-L1 НДКБК (TPS < 1%) остава неопределена. В проучването  *pembrolizumab*  е по-добър от  *docetaxel* , независимо дали за оценка на PD-L1 е използвана нова или архивна туморна проба, което предполага, че и двата вида са подходящи за оценка.

По отношение на първа линия на лечение, изследваната подгрупа на нелекувани до момента пациенти в проучването KEYNOTE-001 фаза 1 също показва, че ОО и ОП постепенно се увеличават с нарастване стойността на TPS. ОО е 8,3%, 17,3% и 51,9% при пациентите с TPS по-малко от 1%, 1% до 49% и  $\geq 50\%$  съответно.<sup>33</sup> Рандомизирана фаза 3 на проучването KEYNOTE-024 също сравнява ефикасността на *pembrolizumab* с химиотерапия при нелекувани преди това пациенти с напреднал НДКБК, чиито тумори експресират високи нива на PD-L1 (TPS  $\geq 50\%$ ) и които нямат активираща *EGFR* мутация или *ALK*-транслокация. За тази група пациенти *pembrolizumab* е бил свързан с по-продължителна ПБП и ОП, с по-малко нежелани реакции в сравнение с платина-базирана химиотерапия.<sup>34</sup> Друга рандомизирана фаза 3, KEYNOTE-042 е предназначена да оцени ефикасността и безопасността на *pembrolizumab* в сравнение с химиотерапията като първа линия на терапия за PD-L1-позитивен напреднал стадий на НДКБК (дефинирано като TPS  $\geq 1\%$ ). Експресия на PD-L1 (TPS  $\geq 50\%$  спрямо 1% до 49%) е бил критерий за стратификация при рандомизацията.<sup>35</sup> Резултатите от проучването са предстоящи.

Провеждат се и текущи клинични изпитвания за тестване на ефикасността и безопасността на *pembrolizumab* в комбинация с други терапевтични агенти при лечение на пациенти с напреднал НДКБК.

Ефикасността на *pembrolizumab* е оценена при пациенти, включени в отворено, мултицентрично, мултикохортно изпитване KEYNOTE-021 (NCT02039674); данните за ефикасност са лимитирани за пациенти с метастатичен непlosкоклетъчен НДКБК, рандомизирани в една кохорта (G1). *Pembrolizumab* в комбинация с химиотерапия е дал значителна клинична ефикасност, с ОО от 55% в сравнение с 28% при химиотерапия

самостоятелно и коефициент на риска (HR) за преживяемост без прогресия е бил 0.53% (95% CI) в полза на *pembrolizumab*.<sup>36</sup>

За разлика от *pembrolizumab* като монотерапия, отговорът от лечението с тези схеми на комбиниране изглежда независим от PD-L1 експресията. *Pembrolizumab* в комбинация с *carboplatin* и *pemetrexed* може да бъде ефективна терапевтична опция за пациенти с непlosкоклетъчен НДКБК без предходна химиотерапия.<sup>36</sup>

## Заклучение

PD-L1-експресията, изследвана в туморните клетки на пациенти с напреднал стадий на НДКБК, е доказан предиктивен маркер за лечение с имунна терапия. PD-1 и PD-L1 инхибиторите са прогрес в онкологията и нова терапевтична надежда за пациентите с НДКБК. Точността при отчитане на пробите е изключително важна, предвид значението на окончателния резултат за прилагането на първа или втора линия терапия. Необходимо е строго да се спазват протоколите за обработване на тъканните материали, приложени към съответните съпътстващи или допълващи диагностични тестове, както и да се отчита правилно позитивността в контекст на правилно място, брой и вид клетки и различна граница за позитивност за различните тестове.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Ming ST, Kerr KM, Dacic S, et al. IASLC atlas of PD-L1 immunohistochemistry testing in lung cancer. 2017.
2. Ott PA, Hodi FS, Robert C. CTLA-4 and PD-1/PD-L1 Blockade: New Immunotherapeutic Modalities with Durable Clinical Benefit in Melanoma Patients. *Clin Cancer Res* 2013;19(19):5300-5309
3. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* 2012;12(4):252-264



## ИМУННИ ЧЕКПОИНТ-ИНХИБИТОРИ – PDL-1-ЭКСПРЕСИЯ ...

4. Burotto M, Thomas A, Subramaniam D, et al. Biomarkers in Early-Stage Non-Small-Cell Lung Cancer: Current Concepts and Future Directions. *J Thorac Oncol* 2014;9(11):1609-1617
5. Brega E, Brandao G. Non-Small Cell Lung Carcinoma Biomarker Testing: The Pathologists Perspective. *Front Oncol* 2014;4:182
6. PD-L1 IHC 22C3 pharmDx IVD [package insert]. Dako. P03951\_02/SK00621-5/2015.09.
7. National Cancer Institute Dictionary of Cancer Terms. <http://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms?cdrid=45618>. Accessed 28 March 2016. In.
8. Milne C-P, Bryan C, Garafalo S, McKiernan M. Complementary versus companion diagnostics: apples and oranges? *Biomark Med* 2015;9(1):25-34
9. Kerr KM, Tsao M-S, Nicholson AG, et al. Programmed Death-Ligand 1 Immunohistochemistry in Lung Cancer: In what state is this art? *J Thorac Oncol* 2015;10(7):985-989
10. Kerr KM, Hirsch FR. Programmed Death Ligand-1 Immunohistochemistry: Friend or Foe? *Arch Pathol Lab Med* 2016;140(4):326-331
11. Pao W, Iafrate AJ, Su Z. Genetically informed lung cancer medicine. *J Pathol* 2011;223(2):231-241
12. Hirsch FR, Suda K, Wiens J, Bunn PA. New and emerging targeted treatments in advanced non-small-cell lung cancer. *The Lancet* 2016;388(10048):1012-2104
13. Ilie M, Falk AT, Butori C, et al. PD-L1 expression in basaloid squamous cell lung carcinoma: Relationship to PD-1+ and CD8+ tumor-infiltrating T cells and outcome. *Mod Pathol* 2016;29(12):1552-1564
14. Motzer RJ, Escudier B, McDermott DF, et al. Nivolumab versus Everolimus in Advanced Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med* 2015;373(19):1803-1813
15. Ansell SM, Lesokhin AM, Borrello I, et al. PD-1 Blockade with Nivolumab in Relapsed or Refractory Hodgkin's Lymphoma. *N Engl J Med* 2015;372(4):311-319
16. Homet Moreno B, Ribas A. Anti-programmed cell death protein-1/ligand-1 therapy in different cancers. *Br J Cancer* 2015;112(9):1421-1427
17. Chen DS, Irving BA, Hodi FS. Molecular Pathways: Next-Generation Immunotherapy--Inhibiting Programmed Death-Ligand 1 and Programmed Death-1. *Clin Cancer Res* 2012;18(24):6580-6587
18. Boyerinas B, Jochems C, Fantini M, et al. Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity Activity of a Novel Anti-PD-L1 Antibody Avelumab (MSB0010718C) on Human Tumor Cells. *Cancer Immunol Res* 2015;3(10):1148-1157
19. Powles T, Eder JP, Fine GD, et al. MPDL3280A (anti-PD-L1) treatment leads to clinical activity in metastatic bladder cancer. *Nature* 2014;515(7528):558-562
20. Garon EB, Rizvi NA, Hui R, et al. Pembrolizumab for the Treatment of Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* 2015;372(21):2018-2028
21. Herbst RS, Baas P, Kim D-W, et al. Pembrolizumab versus docetaxel for previously treated, PD-L1-positive, advanced non-small-cell lung cancer (KEYNOTE-010): a randomised controlled trial. *The Lancet* 2016;387(10027):1540-1550
22. Borghaei H, Paz-Ares L, Horn L, et al. Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* 2015;373(17):1627-1639
23. Brahmer J, Reckamp KL, Baas P, et al. Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Squamous-Cell Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* 2015;373(2):123-135
24. 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. *The Lancet* 2016;387(10030):1837-1846
25. Rebelatto MC, Midha A, Mistry A, et al. Development of a programmed cell death ligand-1 immunohistochemical assay validated for analysis of non-small cell lung cancer and head and neck squamous cell carcinoma. *Diagn Pathol* 2016;11(1):95
26. Sholl LM, Aisner DL, Allen TC, et al. Programmed Death Ligand-1 Immunohistochemistry— A New Challenge for Pathologists: A Perspective From Members of the Pulmonary Pathology Society. *Arch Pathol Lab Med* 2016;140(4):341-344
27. Yu H, Boyle TA, Zhou C, Rimm DL, Hirsch FR. PD-L1 Expression in Lung Cancer. *J Thorac Oncol* 2016;11(7):964-975
28. Torlakovic EE, Francis G, Garratt J, et al. Standardization of Negative Controls in Diagnostic Immunohistochemistry: Recommendations From

- the International Ad Hoc Expert Panel. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2014;22(4):241-252
29. Dako North America. PD-L1 IHC 22C3 pharmDx interpretation manual. [http://www.dako.com/us/29109\\_pdl1-ihc-22c3-interpretation-manual.pdf](http://www.dako.com/us/29109_pdl1-ihc-22c3-interpretation-manual.pdf). (accessed August 13, 2016.).
30. Baas P, Garon EB, Herbst RS, et al. Relationship between level of PD-L1 expression and outcomes in the KEYNOTE-010 study of pembrolizumab vs docetaxel for previously treated, PD-L1-Positive NSCLC. *J Clin Oncol* 2016;34(15):9015-9015
31. Cree IA, Booton R, Cane P, et al. PD-L1 testing for lung cancer in the UK: recognizing the challenges for implementation. *Histopathology* 2016;69(2):177-186
32. Dolled-Filhart M, Roach C, Toland G, et al. Development of a Companion Diagnostic for Pembrolizumab in Non-Small Cell Lung Cancer Using Immunohistochemistry for Programmed Death Ligand-1. *Arch Pathol Lab Med* 2016;140(11):1243-1249
33. Hui R, Garon EB, Goldman JW, et al. Pembrolizumab as first-line therapy for patients with PD-L1-positive advanced non-small cell lung cancer: a phase 1 trial. *Ann Oncol* 2017;28(4):874-881
34. Reck M, Rodríguez-Abreu D, Robinson AG, et al. Pembrolizumab versus Chemotherapy for PD-L1-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* 2016;375(19):1823-1833
35. Mok T, Wu Y-L, Sadowski S, et al. 195TiP: Pembrolizumab (MK-3475) versus platinum-based chemotherapy for PD-L1+ NSCLC in a phase 3, randomized, open-label study: KEYNOTE-042. *J Thorac Oncol Off Publ Int Assoc Study Lung Cancer* 2016;11(4):S142
36. Langer CJ, Gadgeel SM, Borghaei H, et al. Carboplatin and pemetrexed with or without pembrolizumab for advanced, non-squamous non-small-cell lung cancer: a randomised, phase 2 cohort of the open-label KEYNOTE-021 study. *Lancet Oncol* 2016;17(11):1497-1508
37. Gubens MA, Sequist LV, Stevenson J, et al. Phase I/II study of pembrolizumab (pembro) plus ipilimumab (ipi) as second-line therapy for NSCLC: KEYNOTE-021 cohorts D and H. *J Clin Oncol* 2016;34(15):9027-9027

////////////////////////////////////

**КОНТРОЛНИ ТОЧКИ (CHECK POINTS) И СПОСОБИ  
ЗА ПОВЛИЯВАНЕ НА ИМУНОСУПРЕСИЯТА  
В ТУМОРНАТА МИКРОСРЕДА**

////////////////////////////////////

**проф. д-р Милчо Минчев, дмн**

СБАЛХЗ, София



# КОНТРОЛНИ ТОЧКИ (CHECK POINTS) И СПОСОБИ ЗА ПОВЛИЯВАНЕ НА ИМУНОСУПРЕСИЯТА В ТУМОРНАТА МИКРОСРЕДА

проф. д-р Милчо Минчев, дмн

СБААХЗ, София

## ОБЗОР

*Имунната система и малигнените тумори „съжителстват” в постоянна връзка помежду си и това е неизменна част от процесите на туморно развитие, растеж и прогресия. Нейните клетки са в постоянен контакт с туморните и между тези две системи се осъществява постоянно взаимодействие и обмен на информация, чрез който трансформирани клетки се разпознават и отстраняват чрез множество вродени и придобити ефекторни механизми. Това „общуване” се осъществява чрез контролни точки (check points) и чрез него имунната система „скупурира” антигените на тумора – процес, известен като имуноредактиране. Туморите обаче развиват различни механизми за защита от имунните ефектори и успяват да избегнат елиминиране от имунната система; в същото време могат да предизвикат и имunosупресия в туморната микросреда.*

*В статията се дискутират съвременните терапевтични усилия за намиране на фактори, премахващи имunosупресията в интимната туморна микросреда и начините за възвръщане на реактивността и ефекторната имунна цитотоксична функция, в това число и въздействие върху т.нар. контролни точки (чекпоинт). Обсъждат се сигналните пътища и молекули, участващи в имунния отговор, които биха могли да послужат като таргети за противотуморно лечение.*

## Увод

Имунната система разпознава и отстранява трансформирани клетки чрез вродени и придобити ефекторни механизми. Същевременно тя играе активна роля в развитието на тумора не само като участник в клетъчната трансформация, но и като промотор на неконтролираната пролифе-

рация и модулатор на имуногенността.<sup>1</sup> Това схващане е застъпено още от Вирхов който, наблюдавайки лимфоретикуларната инфилтрация около малигнени тумори, указва хипотезата за ролята на хроничното възпаление в клетъчната трансформация в ранната фаза на канцерогенезата.<sup>2</sup>

Едно от най-важните развития в областта на туморната имунология е въ-



веждането на концепцията за туморно-имуноредактиране – т.е. антигенното скулптуриране на тумора под въздействието на имунната система.<sup>3, 4</sup> Като резултат от това имуноредактиране, по-слабо антигенни и неимуногенни туморни клетки, които резистират на апоптоза или са с повишена имуносупресивност, имат пролиферационно предимство.

### Етапи на имуноредакцията – елиминиране, равновесие и туморен растеж

Имуноредакцията преминава през три ключови Т-клетъчно зависими фази – (А) на елиминиране (*elimination*) – като следствие на протективен имунитет, (Б) на равновесие (*equilibrium*), при която туморни клетки, оцеляли след имунна атака, са в състояние на латентност (летаргия) и (В) фаза на туморен растеж (*escape*), при която настъпват клинични прояви на болестта, поради имунна селекция на туморни клетки с понижена имуногенност или повишена имуносупресивност.

**Фаза на елиминиране.** В резултат на своята хетерогенност и/или генетична микросателитна нестабилност (MSI), водеща до недостатъчност на репарация механизъм за несъвпадения (*mismatch repair deficiency; dMMR*), туморните клетки експресират неоантигени, които ги отличават от нормалните клетки и могат да служат за тяхното разпознаване и отстраняване от имунните ефектори. Съществуват два различни модела за активиране на антиген-специфичен имунен отговор срещу туморните клетки. Първият, т.нар. модел на разузнаването, постулира, че туморите, представящи чужди антигени, се разпознават от различните звена на имунната система и биват елиминирани още при своята поява.<sup>5</sup> Основната концепция във втория модел е,

че туморни клетки, които не се разпознават в контекста на опасност (виж по-долу), не стимулират имунен отговор.<sup>6</sup> Според него, стимулирането на Т-клетъчен имунен отговор към туморните антигени зависи от начина на представяне на последните. Наивните нестимулирани досега Т лимфоцити могат да бъдат активирани само след представяне на антигена във вторичните лимфоидни органи от специализирани клетки. Разпознаването на антиген от Т клетки върху мембраната на туморна или здрава паренхимна клетка не води до стимулация, а до парализа на лимфоцитите.<sup>7</sup>

Туморните клетки, подложени на стрес, освобождават фактори като протеини на топлинния шок – *heat shock proteins (HSPs)*<sup>8</sup>, молекулни последователности, характеризиращи тъканна увреда – *tissue damage-associated molecular patterns (DAMPs)*<sup>9</sup> и/или микробиални HSP като патоген-асоциирани молекулни последователности – *pathogen-associated molecular patterns (PAMPs)*.<sup>9, 10</sup> Тези фактори са включени в т.н. комплекс сигнали за „опасност“ (*danger signals*). С растежа на тумора и настъпването на клетъчна смърт вследствие на неадекватно хранене или лечебна намеса (химио- или лъчетерапия), такива сигнали несъмнено се появяват. Първите клетки, които реагират на тези сигнали, са клетките от т.н. първична имунна система – неутрофили, макрофаги, дендритни клетки (ДК). Те не притежават специализирани рецептори за антиген, но реагират на сигнали на опасността и атакуват тумора чрез разрушаване на туморния матрикс и съдовото му русло и чрез потискане на неоангиогенезата<sup>11-14</sup>, като това довежда до освобождаване на туморни антигени.

Други клетки от първичната имунна система, които играят роля в откриването и унищожаването на туморни клетки, са клетките естествени убийци (*natural killer* –

## КОНТРОЛНИ ТОЧКИ (CHECK POINTS) И СПОСОБИ ЗА ПОВЛИЯВАНЕ ...

NK cells).<sup>15</sup> Те разпознават туморни клетки, които не експресират клас I тъканно съвместими молекули – т.нар. „missing self” хипотеза.<sup>16, 17</sup> Активността им се определя от баланса между позитивни и негативни сигнали. Позитивните сигнали постъпват чрез т.н. Killer Activating Receptors (KARS), които реагират с продукти, индуцирани от клетъчен стрес – MHC class I chain-related (MIC) MICA, MICB, ULBP1, ULBP2, ULBP3.<sup>18-20</sup> Негативните сигнали идват от т.н. Killer Inhibitory Receptors (KIRS), като разпознаването на тъканно-съвместими молекули върху туморните клетки от KIRS блокира активирането на NK клетките.<sup>21</sup> Освен KIRs, хетеродимерът CD94/NKG2A потиска NK клетките. Естественият лиганд за CD94/NKG2A е HLA-E, неklasическа HLA клас I молекула, експресирана върху повечето левкоцити, включително вирус-инфектирани и туморни клетки.<sup>22, 23</sup>

За да се стигне до ефективна антиген-специфична стимулация, Т лимфоцитите се нуждаят от най-малко от два сигнала.<sup>7</sup> Докато първият идва от специфичното разпознаване на антигена от Т-клетъчния рецептор, то вторият, т.н. костимулиращ, идва от антиген представящата клетка (АПК). Най-ярки представители на антиген-представящите клетки са дендритните клетки (ДК).<sup>24</sup> Те произлизат както от миелоидната, така и от лимфоидната линия на хемопоезата. При хората, класическите миелоидни дендритни клетки произлизат от комитиран предшественик, насочен към гранулоцитно-моноцитната редица. Моноцити или CD34+ стволови клетки могат да се насочат към дендритна диференциация при култивиране с гранулоцит-макрофаг колониостимулиращ фактор (GM-CSF), IL-4 със или без TNF- $\alpha$ .<sup>25, 26</sup> Дендритните клетки пребивават както в нормалните, така и в неопластичните тъкани. В незряло състояние те събират информация за настъпили

антигенни промени. Узряването и миграцията им се отключват от гореописаните сигнали на „опасност“ или от лимфокини, например GM-CSF.<sup>9, 27</sup> Натоварените с антиген ДК мигрират към локалния дренаж лимфен възел и стимулират антиген-специфични Т лимфоцити, които рециркулират между кръвта и вторичната лимфоидна система. Представянето на антигена не е монолог от страна на дендритните клетки, а взаимен диалог, в който Т лимфоцитите и дендритните клетки разменят информация и съзряват взаимно.<sup>28</sup> Накрая, пълноценно стимулираните Т лимфоцити индуцират програмирана клетъчна смърт (апоптоза) в дендритните клетки, което от своя страна сигнализира края на имунното стимулиране и е своеобразен „feedback” механизъм.<sup>29</sup> Този „катарзисен” момент в имунния отговор е изключително важен, защото предпазва системата както от превъзбуждане с развитието на аутоимунни процеси, така и от изтощаване вследствие на прекалена стимулация.

За целите на имуноterapiaта дендритните клетки могат да се „натоварят” с антигенна информация в среда, далечна на тази около тумора и най-вероятно не съдържаща лимфокини, потискащи тяхната функция. Това може да бъде извършено както *in vitro*, така и *in vivo*.<sup>30, 31</sup> Независимо, че туморните клетки са антигенни, съществуват механизми, пречещи на тяхното елиминиране. Те са възникнали в процеса на еволюция и целят потискане на имунологичната реакция към собствените антигени. Тези механизми включват: централния толеранс – невъзможността за активиране на имунните клетки в периферните тъкани, външната регулация на Т лимфоцитите (напр. въздействието на регулаторни Т лимфоцити, на миелоидни имуносупресивни клетки, на супресивни цитокини като IL-10), както и вътрешна регулация на Т клетките вследствие на неправилна и

прекалена антигенна стимулация (анергия и изтощение).<sup>32-34</sup>

Най-добре проучената костимулираща сигнална верига включва CD28 Т-клетъчния рецептор, който има афинитет за свързване към две молекули върху АПК – В7-1 (CD80) и В7-2 (CD86)<sup>35</sup> – т.нар. В-7 комплекс. Освен CD28, афинитет за свързване към В-7 комплекса има и негов хомолог – СТЛА-4(CD152).<sup>36</sup> Докато CD28 е конститутивно експресиран върху мембраната на 95% от CD4+ и 50% от CD8+ Т лимфоцити, СТЛА-4 е цитоплазмен протеин<sup>37</sup> и се експресира от тези клетки само след тяхното стимулиране. За разлика от CD28, СТЛА-4 трансмира инхибиращ сигнал и потиска Т-клетъчното активиране<sup>38</sup>, като това е физиологичен механизъм както за изграждане на толерантност към автоложни антигени, така и за спиране на вече стимулирана имунна реакция към определен антиген – т.нар. критична точка (check point; чек поинт) в регулацията на Т-клетъчното активиране. Поради конкуренцията между CD28 и СТЛА-4 за свързване към В-7 комплекса слаби антигенни гразнения не водят до стимулиране и пролиферация на антиген-специфични Т лимфоцити. Освен това СТЛА-4 е конститутивно експресиран в цитоплазмата на т.н. Т-регулаторни (супресорни, CD4+CD25+) клетки и е един от механизмите за тяхното имunosупресивно действие<sup>39</sup> и поддържане на толерантно състояние към собствените антигени.

**Фаза на равновесие.** В тази фаза на равновесие и на имуноредактиране имунната система гържи туморните клетки в състояние на функционална летаргия. Това е състоянието на „спящите“ туморни клетки. През тази фаза протича имуно моделиране на тумора, като в него настъпва генетична нестабилност с риск за клонална експанзия. Някои от туморните клетки претърпяват генетични и епигене-

тични промени като под въздействието на постоянната имунна селекция се появяват варианти на туморни клетки, които не са податливи на имунна атака (загуба на антигени или индугиране на имunosупресия).<sup>40-42</sup>

**Фаза на туморна прогресия при неефективност на имунния контрол (escape).**<sup>43</sup> В края на фазата на равновесие чрез имунната селекция и скулптуриране на туморната тъкан се появяват неопластични клетки с понижена имуногенност и/или повишена имunosупресивност. В тази фаза поради неефективност на имунния контрол се стига до клинична проява и прогресия на злокачественото заболяване. Енеефективността на имунния контрол може да се опосредства чрез най-различни механизми, в това число намалено имуно разпознаване (липса на туморни антигени, загуба на тъканно-съвместими молекули или костимулиращи лиганди) и увеличена резистентност на туморните клетки към апоптоза (увеличена експресия на STAT-3 или Bcl2).

От своя страна туморните клетки развиват различни механизми за защита от имунните ефектори. При липса на терапия с напредване на заболяването те започват да секретират лимфокини, които потискат функцията на дендритните клетки.<sup>44, 45</sup> Дори и да достигнат до локалния лимфен възел, такива дендритни клетки не са в състояние за пълноценно общуване с антиген-специфичните Т лимфоцити. Като резултат на това, взаимодействието между тях и Т лимфоцитите не довежда до пълноценен катарзис, а продължава на ниско ниво до пълно изтощаване на системата. Развива се порочен кръг: с прогреса на заболяването все повече и повече нефункционални дендритни клетки достигат до локалните лимфни басейни, където срещат вече полуизтощени антиген-специфични Т лимфоцити. Тези Т лимфоцити екстравазират и инфилтрират туморните тъкани, но тъй

## КОНТРОЛНИ ТОЧКИ (CHECK POINTS) И СПОСОБИ ЗА ПОВЛИЯВАНЕ ...

като не са пълноценно узрели цитотоксични клетки, стимулират секрецията в туморната микросреда на антиинфламаторни лимфокини. При пациенти с напреднало неопластично заболяване като следствие от дефектното стимулиране, Т лимфоцитите са с нарушена функция (дисфункционални), като изпадат в състояние на „изтощение“ (Т cell „exhaustion“). Това състояние на Т-клетъчно изтощение първоначално е описано като клонално елиминиране (дефекция) на вирус-специфични Т лимфоцити при хронични вирусни инфекции<sup>46</sup>, но-по-късно е валидирано като неспособност на Т-лимфоцитите да развиват мощен цитотоксичен отговор. Наблюдавано е и при пациенти с карцином.<sup>47</sup> В туморното ложе се създава имуносупресивна туморна микросреда чрез синтез на Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO), на цитокини като transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) и interleukin 10 (IL-10)<sup>44</sup>, стимулира се неоангиогенезата чрез VEGF. Изтощените Т клетки в тази микросреда са с повишена експресия на чек-пойнтмолекули, в това число PD-1 (CD279), CTLA-4 (CD152), Т-клетъчен муцин имунодомейн/галектин 9 (TIM-3/galectin-9)<sup>[48]</sup>, лимфоцит активиращ ген 3 (LAG-3)<sup>49, 50</sup>, CD244/2B4, CD160, Т cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains (TIGIT) и гр.<sup>51</sup> Туморните клетки поддържат имуносупресивната микросреда и чрез рекрутиране на CTLA-4+ Т-регулаторни клетки (Tregs). Активизираните Tregs повишават експресията на инхибиторни молекули като glycoprotein A repetitions predominant/latency-associated peptide (GARP/LAP), CD39/CD73, чек-пойнт рецептори като CTLA-4, TIM-3, GITR, PD-1, LAG-3, като по този начин засилват още повече имуносупресията.

### Чекпойнт-инхибитори

Съвременните терапевтични усилия са насочени към намиране и изпитване в клинични условия на фактори, премахващи

имуносупресията в интимната туморна микросреда и възвръщане на реактивността и ефекторната функция на изтощените цитотоксични Т лимфоцити, в това число и въздействие върху т.нар. контролни точки (чекпойнт). Засега в клинично и експериментално проучване са следните чекпойнти съответните инхибитори:

**CTLA-4.** Тя е първата чекпойнт молекула, използвана като мишена за въздействие. Блокирането ѝ за целите на клиничната практика се извършва с моноклонални антители. В практиката като инхибитори се използват човешки моноклонални антители *ipilimumab* (*Yervoy*) и *tremelimumab*.

- *Ipilimumab* е одобрен през 2011 г. за лечение на метастатичен меланом, а през 2015 година за адювантно лечение на меланом след хирургично отстраняване на тумора.
- Въпреки че от 2015 г. е със статут на orphan drug, в последвало фаза IIb DETERMINE клинично проучване *Tremelimumab* не води до по-висока преживяемост като втора и трета линия лечение при пациенти с нерезектабилен мезотелиом.

**PD-1.** регулира клетъчната функция и терминологично също е известен като чек пойнт в Т-лимфоцит опосредстваната антитуморна атака.<sup>52-55</sup> PD-1 е експресиран върху повърхността на Т лимфоцити, В лимфоцити и моноцити<sup>[56]</sup>. 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 плацентата. PD-L1 е 40 kDa тип 1 трансмембранен белтък, играещ основна роля при потискане на имунната система при бременност, трансплантации, аутоимунни и неопластични заболявания. Свързването на PD-1 към PD-L1 или PD-L2 потиска вече активизираните Т клетки.<sup>57, 58</sup> 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.<sup>59</sup> 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.<sup>60, 61</sup> PD-L1 експресията при възпалителен процес е компонент от адаптивния имуен отговор и е често свързан с наличието на имуен инфилтрат, докато онкогенно стимулираната експресия може да не е свързана с имунна реакция.<sup>62, 63</sup> Многочислени смущения в клетъчната сигнализация се свързват с конститутивната експресия на PD-L1, например – загубата на *phosphatase and tensin homolog* (PTEN) при глиобластом и колоректален карцином.<sup>63, 64</sup> Увеличената активност на *anaplastic lymphoma kinase* (ALK), водеща до повишената експресия на *STAT3*, води до индукция на PD-L1 и до избягване на имунологичния контрол при лимфому.<sup>65</sup>

Блокирането на оста PD-1-PDL-1(2)с цел премахване на Т-клетъчното изтощаване в експериментални и клинични условия се постига с прилагане на моноклонални антитела срещу PD-1 и PDL-1.

Анти-PD-1 антитела, навлезли в клиничната практика, са човешкото моноклонално антитяло *nivolumab* (*Opdivo*) и хуманизираните  *pembrolizumab* (*Keytruda*), *BGB-A317* и *PDR001*.

- *Nivolumab* (*Opdivo*) е одобрен през 2014 г. при метастатичен меланом, неповлияващ се от друга терапия, през 2015 г. за метастатичен недребноклетъчен карцином на бял дроб (НДКБД) след прогресия при терапия с платина и при метастатичен карцином на бъбрек, през 2016 г. при класически Ходжкинов лимфом при рецидив или прогресия след

автоложна трансплантация на стволови клетки и лечение с *brentuximab/vedotin*. От 2017 г. *Nivolumab* се прилага и при пациенти с локално авансирал или метастатичен уротелиален карцином след терапия с платина.

- *Pembrolizumab* (*Keytruda*) е одобрен за клинично приложение през 2014 г. при пациенти с метастатичен меланом, неповлияващ се от друго лечение и при напреднал или метастатичен НДКБД. През 2017 г. е одобрен като втора линия при сквамозноклетъчен наглава и шия след терапия с платина, при класически рефрактерен Ходжкинов лимфом и като първа линия лечение на авансирал НДКБД при PD-L1 експресия > 50% от туморните клетки. През май 2017 г. Американската агенция по храните и лекарствата (FDA) одобри *pembrolizumab* за лечение на неоперабилни или метастатични солидни тумори с генетична микросателитна нестабилност, а при колоректални карциноми – такива, които прогресират на фона на химиотерапия.
- *BGB-A317* – от 2016 г. е в клинични проучвания за солидни тумори.
- *PDR001* – в клинично проучване от 2015 г. в комбинация с анти-LAG3 моноклонално антитяло (вж. по-долу) при солидни и хематологични неоплазии
- *TSR-042* – в клинично проучване от 2016 г. като монотерапия или в комбинация с анти-LAG3 моноклонално антитяло (вж. по-долу) при ендометриален карцином

Анти-PDL-1 антитела, навлезли в клиничната практика, са хуманизираното моноклонално антитяло *atezolizumab* и човешките моноклонални антитела *avelumab* и *durvalumab*.



- *Atezolizumab (Tecentriq)* е одобрен през 2016 г. при пациенти с напреднал или метастатичен уротелиален карцином, неподходящи за лечение с платина или такива които прогресират (1) на фона на цисплатинова химиотерапия или (2) в рамките на на 12 месеца от неоаглювантна или аглювантна такава. Одобрен е и за лечение на метастатичен НДКБД прогресиращ на фона на или след платинова химиотерапия. При пациенти с EGFR или ALK геномни аберации *Tecentriq* се прилага след съответното таргетно лечение.
- *Avelumab (Bavencio)* от 2015 г. е в клинични проучвания за солидни тумори, а през 2017 г. е одобрен за пациенти над 12 г. възраст с метастатичен Меркел-клетъчен карцином и пациенти с локално авансирал или метастатичен уротелиален карцином, които прогресират (1) на фона на цисплатинова химиотерапия или (2) в рамките на на 12 месеца от неоаглювантна или аглювантна ХТ.
- *Durvalumab (Imfinzi)* е в клинични проучвания при солидни тумори от 2016 г., а от 2017 г. е одобрен от FDA за лечение на пациенти с локално авансирал или метастатичен уротелиален карцином, които прогресират (1) на фона на цисплатинова химиотерапия или (2) в рамките на на 12 месеца от неоаглювантна или аглювантна такава. FDA също одобри платформата VENTANA PD-L1 (SP263) (Ventana Medical Systems, Inc.) като тест за оценка на PD-L1 експресия върху парафиново блокче, съдържащо фиксирана във формалин тъкан от уротелиален карцином.

### Домейн на Т-клетъчния протеин имуцинов домейн 3 (TIM-3)

Това е тип I гликопротеин, експресиран преди всичко върху мембраната на активирани Т-лимфоцити и миелоидни клетки. Реагира с  $\beta$ -galactoside-свързващ лектин, познат като galectin-9 (Gal-9), и фосфатидил серин-ранен маркер за настъпваща апоптоза. В предклинични модели на солидни и хематологични неоплазии TIM-3 маркира най-супресивните и дисфункционални CD8+ Т клетки.<sup>48, 66</sup> Смята се, че TIM-3 потиска ефекторната функция на активираните Т клетки и съкращава преживяемостта им. Експресията му е повишена при изтощени Т лимфоцити и поради това представлява добра мишена за терапевтично въздействие. TIM-3 е критична точка (чекпойнт), лимитираща продължителността и големината на отговорите на Th1 и Tc1 Т-лимфоцитите.

Подобно на PD-1 инхибирането, самостоятелна TIM-3 блокада е ефективна при експериментални модели на колоректален карцином.<sup>67</sup> Значително по-ефективно е съвместното блокиране на TIM-3 и PD-1 веригите.<sup>48</sup> Терапевтичен отговор се наблюдава и при мишки с остра миелогенна левкемия (AML). В клинично изпитване са следните моноклонални антитела:

- *TSR-022* е анти-TIM-3 моноклонално антитяло, което е от м. юли 2016 г. в клинично проучване при пациенти с авансирани солидни тумори.
- *MBG453* анти-TIM-3 моноклонално антитяло, което е от 2016 в клинично проучване при пациенти с авансирани солидни тумори.

### LAG3 (CD223)

Това е протеин от имуноглобулиновата суперфамилия (IgSF)<sup>68</sup>, експресиран е

върху мембраната на активирани Т лимфоцити, клетки естествени убийци, В клетки и плазмацитогенни дендритни клетки. Той е основен лиганд за клас II тъканно съвместими молекули, като афинитета му на свързване е по-висок от този на CD4. Експресията е върху ефекторни CD4+ Т cells и върху CD4+ Т-регулаторни клетки. Смята се, че LAG3 ограничава аутоимунните реакции, но продължителна експресия заедно с други толерогенни имунни рецептори като PD1, TIGIT, TIM3, 2B4, CD160 води до функционално изтощаване, изчезване се в липса на цитокинова секреция, цитолитична активност и клетъчна пролиферация.<sup>69</sup> В момента в клинични проучвания са включени четири LAG3-насочени агенти. Първият изпитан препарат е *IMP321*, разтворим димерен рекомбинантен протеин, състоящ се от четири извънклетъчни LAG3 домейна свързани към Fc-фрагмента на човешки IgG1 (LAG3-Ig). Началната идея е той да бъде използван като LAG3 антагонист, но впоследствие е включен като адювант за активиране на АПК, тъй като взаимодействат му с клас II тъканно-съвместими молекули върху незряли дендритни клетки води до експресия върху мембраната им на CD80/CD86 комплекса, секреция на IL-12 и TNF $\alpha$  и формиране на дендритни израстъци.<sup>70</sup> Понастоящем са в ход няколко клинични изпитвания на комбинация от IMP321 както с активна имунизация с тумор-асоциирани антигени, така и с чек-пойнт инхибитори (*pembrolizumab*) или химиотерапевтици.

#### **Таргетиране на LAG3 с моноклонални антитела**

- *BMS-986016* е първото анти-LAG3 mAb, което в момента се изпитва в няколко фаза I и фаза II клинични проучвания като монотерапия или в комбинация с *nivolumab* при солидни и хематологични неоплазии.

- *LAG525* е хуманизирано IgG4 анти-LAG3 mAb (Novartis) е във фаза I/II клинично проучване като монотерапия или в комбинация с PDR001 при солидни или хематологични неоплазии.
- *MK-4280* – анти-LAG3 mAb (Merck) – във фаза I клинично проучване за солидни неоплазии
- *TSR-033* – анти-LAG3 mAb (Tesaro) – във фаза I клинично проучване като монотерапия или в комбинация с TSR-042 при авансирани солидни тумори
- В момента се разработват *биспецифични моноклонални антитела*, свързващи PD-1 и LAG3

**TIGIT** (познат също като WUCAM, Vstm3, VSIG9). Той е от семейството на полиовирус рецепторите (PVR)/nectin; протеин от имуноглобулиновата суперфамилия (IgSF). Експресията му е ограничена върху лимфоцити, основно върху ефекторни и регулаторни CD4+ Т клетки, фоликуларни хелперни CD4+ Т клетки, ефекторни CD8+ Т клетки и NK клетки.<sup>71-74</sup> Известни са няколко различни механизми на действие на TIGIT. Свързването му с рецептор върху дендритни клетки води до експресия на IL-10 и на понижена секреция на инфламаторни цитокини като IL-12.<sup>75</sup> TIGIT намалява производството на гама-интерферон (IFN-g) от NK клетките.<sup>76</sup> Смята се че TIGIT, експресията върху тумор-инфилтриращи Т лимфоцити (TILs), се свързва със CD112 (nectin-2; poliovirus receptor related-2; PVRL2) и CD155 (poliovirus receptor; PVR; nectin-like protein 5; NECL-5). В резултат CD112 и CD155 не взаимодействат с костимулиращия рецептор CD226 (DNAX Accessory molecule-1; DNAM-1), и по този начин се блокира активирането на NK и CD8+ Т клетки. Свързването на TIGIT с моноклонални антитела, подобно на свързването на CTLA-4, води до премахване на имunosупресията в туморната микро-

## КОНТРОЛНИ ТОЧКИ (CHECK POINTS) И СПОСОБИ ЗА ПОВЛИЯВАНЕ ...

среда. В момента се провеждат следните клинични проучвания с агенти, насочени срещу TIGIT:

- MTIG7192A – комбинация на човешко моноклонално антитяло MTIG7192A (Genentech) и *atezolizumab* (*Tecentriq*) при пациенти с локално авансирани или метастатични неоплазии (NCT02794571)
- BMS-986207 – приложение на човешко моноклонално антитяло BMS-986207 (Bristol Myers Squibb) – (самостоятелно или в комбинация с *nivolumab* (*Opdivo*)) при пациенти с локално авансирани или метастатични неоплазии (NCT02913313)
- OMP-313M32 – приложение на моноклонално антитяло (OncoMed) при пациенти с локално авансирани или метастатични неоплазии (NCT03119428)
- COM701 (*Comprigen*), антитяло, което таргетира PVRIG (CGEN-15029). PVRIG е клетъчно-мембранен рецептор за NECTIN2, който транслира сигнал, потискащ T клетъчното активиране. Клинично проучване ще започне в края на 2017 г.

**IDO.** Това е първият ензим, определящ скоростта на триптофановия катаболизъм, който катализира окисляването на L-триптофан в N-формилкинуренин. Деpleцията на триптофан води до потискане на T-клетъчната пролиферация и последваща имunosупресия. В туморната микросреда IDO катаболизира L-триптофан в N-формилкинуренин, блокира пролиферацията и съкращава преживяемостта на T лимфоцитите. Широка гама от локализации на злокачествени тумори при човек (простата, колон, ректум, панкреас, маточна шийка, стомах, яйчник, бял дроб и др.) са с повишена експресия на *IDO* (hIDO).<sup>77, 78</sup> Експресията на *IDO* се контролира от туморния супресор *Bmi1*,

който е потиснат в туморните клетки и комбинирането на инхибитори на IDO по време на химиотерапия възстановява имунологичния контрол и води до добър терапевтичен отговор при иначе резистентни тумори.<sup>79</sup> За потискане на активността на IDO се използват следните агенти:

- *Epracadostate* е орален хидроксиамидин, в клинични проучвания с добри резултати в комбинация с анти-PD-1 инхибитори при меланом и НДКБД.
- *Indoximod* (NLG-8189) е орален метилиран триптофан, изпитван в клинични проучвания с анти-PD-1 инхибитори или химиотерапия при авансирани солидни неоплазии.
- BMS-986205 е изпитван в комбинация с *nivolumab* или *nivolumab* и *ipilimumab* при авансирани солидни тумори.
- GDC-0919, познат също като NLG919 и RG6078, е изпитван в комбинация с *atezolizumab* при авансирани солидни тумори.

В последните години се натрупа информация за нови молекули, които допринасят за тумор-индуцираната имunosупресия като CD73<sup>80</sup>, аденозинови рецептори<sup>81, 82</sup> и нови молекули от семейството на V7, в това число V-domain Ig suppressor of T cell activation (VISTA)<sup>83, 84</sup> и B- and T-lymphocyte attenuator (BTLA).<sup>85, 86</sup>

### Предиктивни биомаркери

Навлизането на имунотерапията в онкологията, в това число на имунните чек-пойнт инхибитори, революционизираха лечението на пациентите със злокачествени болести. За съжаление, с изключение на експресията на PD-L1 в туморни клетки при НДКБД, все още липсват валидирани предиктивни биомаркери за селектиране на подходящи за това лечение пациенти, които

да спестят страничните ефекти на тези, които ще са резистентни на имуноterapia; така ще се постигне и икономия на средства. При това PD-1/PD-L1 експресията е динамичен процес, който се влияе от много фактори като съпътстващо лечение основно с таргетни терапии.<sup>87</sup>

Други обещаващи предиктивни биомаркери, основно молекули относими към имуносупресивната туморна микросреда, като TILs<sup>88</sup>, IDO<sup>89, 90</sup>, BCL-2 interacting mediator of cell death (Bim)<sup>91</sup>, IFN-g<sup>92</sup>, са обект на изследователски интерес. Засилва се интересът и към анализ на соматичния мутационен ландшафт на тумора, тъй като се наблюдава корелация между ефективността на имуноterapia и високия мутационен товар.<sup>93, 94</sup> Засега обаче цялостното екзомно секвениране е скъпо, времеемко и поради това рутинно неприменимо.<sup>95</sup>

Увеличена честота на соматични мутации се наблюдава при тумори с недостатъчност на репарацията механизъм за несъвпадения (mismatch repair deficiency; dMMR). dMMR тумори, независимо от анатомична локализация и хистологичен тип са по-податливи на имуноterapia.<sup>96-98</sup> Поради това MMR статусът може да се окаже приложим и полезен предиктивен биомаркер, още повече че е с добра прогностична стойност. Независимо от агресивната си хистология, dMMR туморите са с добра клинична прогноза.<sup>99</sup> Поради това MMR статусът е един от най-обещаващите биомаркери с предиктивна стойност и в клинични проучвания dMMR тумори се повлияват отлично след имуноterapia с чекпойнт инхибитори.<sup>100</sup>

## Заклучение

И двата биомаркера, одобрени засега за имуноterapia – dMMR and PD-L1, имат относителна, но не и абсолютна предиктивна стойност за терапевтичен отговор. По-подробно вникване в естеството на ту-

морната микросреда ще доведе до по-добро разбиране на туморната патофизиология и индивидуализиране на терапията. В момента се разработват нови мултиплексни платформи, позволяващи едновременно анализ на множество биомаркери от тъкан върху едно предметно стъкло. Това ще позволи интегриране на геномни, молекулярни, фенотипни и клинични фактори за създаване на сигнатури с далеч по-мощни предиктивни стойности за имуноterapia на злокачествените болести.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Pandya PH, Murray ME, Pollok KE, Renbarger JL. The Immune System in Cancer Pathogenesis: Potential Therapeutic Approaches. *J Immunol Res* 2016;2016: 4273943
2. Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet* 2001; 357(9255): 539-545
3. Shankaran V, Ikeda H, Bruce AT, et al. IFN $\gamma$  and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* 2001; 410: 1107-1111
4. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The three Es of cancer immunoediting. *Annu Rev Immunol* 2004; 22: 329-360
5. Burnet FM. The concept of immunological surveillance. *Prog Exp Tumor Res* 1970; 13: 1-27
6. Fuchs E, Matzinger P. Is cancer dangerous to the immune system? *Semin Immunol* 1996; 8(5): 271-280
7. Schwartz RH. T cell clonal anergy. *Curr Opin Immunol* 1997; 9(3): 351-357
8. Srivastava P. Interaction of heat shock proteins with peptides and antigen presenting cells: chaperoning of the innate and adaptive immune responses. *Annu Rev Immunol* 2002; 20: 395-425
9. Davidovich P, Kearney CJ, Martin SJ. Inflammatory outcomes of apoptosis, necrosis and necroptosis. *Biol Chem* 2014; 395(10): 1163-1171
10. Schnare M, Holt AC, Takeda K, et al. Recognition of CpG DNA is mediated by signaling pathways dependent on the adaptor protein MyD88. *Curr Biol* 2000; 10(18): 1139-1142



## КОНТРОЛНИ ТОЧКИ (CHECK POINTS) И СПОСОБИ ЗА ПОВЛИЯВАНЕ ...

---

11. Lollini PL, G Forni. Specific and nonspecific immunity in the prevention of spontaneous tumours. *Immunol Today* 1999; 20(8): 347-350
12. Di Carlo E, Forni G, Lollini P, et al. The intriguing role of polymorphonuclear neutrophils in antitumor reactions. *Blood* 2001;97(2):339-345
13. Elgert KD, Alleva DG, Mullins DW. Tumor-induced immune dysfunction: the macrophage connection. *J Leukoc Biol* 1998; 64(3): 275-290
14. Bonnotte B, Larmonier N, Favre N, et al. Identification of tumor-infiltrating macrophages as the killers of tumor cells after immunization in a rat model system. *J Immunol* 2001; 167(9): 5077-5083
15. Chester C, Fritsch K, Kohrt HE. Natural Killer Cell Immunomodulation: Targeting Activating, Inhibitory, and Co-stimulatory Receptor Signaling for Cancer Immunotherapy. *Front Immunol* 2015; 6:601
16. Watzl C, Long EO. Exposing tumor cells to killer cell attack. *Nat Med* 2000 6(8): 867-868
17. Pardoll DM. Immunology. Stress, NK receptors, and immune surveillance. *Science* 2001; 294(5542): 534-536
18. Cerwenka A, Bakker AB, McClanahan T, et al. Retinoic acid early inducible genes define a ligand family for the activating NKG2D receptor in mice. *Immunity* 2000; 12(6):721-727
19. Bauer S, Groh V, Wu J, et al. Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science* 1999; 285(5428): 727-729
20. Wu J, Song Y, Bakker AB, et al. An activating immunoreceptor complex formed by NKG2D and DAP10. *Science* 1999; 285(5428): 730-732
21. Vilches C, Parham P. KIR: diverse, rapidly evolving receptors of innate and adaptive immunity. *Annu Rev Immunol* 2002; 20: 217-251
22. Braud VM, Allan DS, O'Callaghan CA, et al. HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. *Nature* 1998; 391(6669): 795-799
23. Brooks AG, Borrego F, Posch PE, et al. Specific recognition of HLA-E, but not classical, HLA class I molecules by soluble CD94/NKG2A and NK cells. *J Immunol* 1999; 162(1):305-313
24. Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity: enhancing the efficiency of antigen presentation. *Mt Sinai J Med* 2001; 68(3): 160-166
25. Palucka KA, Taquet N, Sanchez-Chapuis F, Gluckman JC. Dendritic cells as the terminal stage of monocyte differentiation. *J Immunol* 1998; 160(9): 4587-4595
26. Oehler L, Majdic O, Pickl WF, et al. Neutrophil granulocyte-committed cells can be driven to acquire dendritic cell characteristics. *J Exp Med* 1998; 187(7):1019-1028
27. Gallucci S, Lolkema M, Matzinger P. Natural adjuvants: endogenous activators of dendritic cells. *Nat Med* 1999; 5(11): 1249-1255
28. Garside P, Ingulli E, Merica RR, et al. Visualization of specific B and T lymphocyte interactions in the lymph node. *Science* 1998; 281(5373): 96-99
29. Shortman K, Wu L, Süß G, et al. Dendritic cells and T lymphocytes: developmental and functional interactions. *Ciba Found Symp* 1997; 204: 130-138; discussion 138-141
30. Hermans IF, Daish A, Moroni-Rawson P, Ronchese F. Tumor-peptide-pulsed dendritic cells isolated from spleen or cultured in vitro from bone marrow precursors can provide protection against tumor challenge. *Cancer Immunol Immunother* 1997; 44(6): 341-347
31. Tjoa BA, Simmons SJ, Bowes VA, et al. Evaluation of phase I/II clinical trials in prostate cancer with dendritic cells and PSMA peptides. *Prostate* 1998; 36(1): 39-44
32. Schietinger A, Greenberg PD. Tolerance and exhaustion: defining mechanisms of T cell dysfunction. *Trends Immunol* 2014; 35(2): 51-60
33. Kim PS, Ahmed R. Features of responding T cells in cancer and chronic infection. *Curr Opin Immunol* 2010; 22(2): 223-230
34. Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science* 2011; 331(6024): 1565-1570
35. Greenwald RJ, Freeman GJ, Sharpe AH. The B7 family revisited. *Annu Rev Immunol* 2005;23:515-548
36. Sansom DM. CD28, CTLA-4 and their ligands: who does what and to whom? *Immunology* 2000; 101(2): 169-177
37. Linsley PS, Bradshaw J, Greene J, et al. Intracellular trafficking of CTLA-4 and focal localization towards sites of TCR engagement. *Immunity* 1996; 4(6): 535-543
38. Lenschow DJ, Walunas TL, JA Bluestone. CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu Rev Immunol* 1996; 14: 233-258



39. Levings MK, Sangregorio R, Roncarolo MG. Human cd25(+)cd4(+) t regulatory cells suppress naive and memory T cell proliferation and can be expanded in vitro without loss of function. *J Exp Med* 2001; 193(11): 1295-1302
40. Brown JA, Dorfman DM, Ma FR, et al. Blockade of programmed death-1 ligands on dendritic cells enhances T cell activation and cytokine production. *J Immunol* 2003; 170(3): 1257-1266
41. Ohigashi Y, Sho M, Yamada Y, et al. Clinical significance of programmed death-1 ligand-1 and programmed death-1 ligand-2 expression in human esophageal cancer. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 2947-2953
42. Sosman J, Sznol M, McDermott SF, et al. Clinical activity and safety of anti-programmed death-1 (PD-1) (BMS-936558, MDX-1106) in patients with advanced melanoma. *J Clin Oncol* 2012; 30 (15\_suppl) abstract 8507-8507. DOI: 10.1200/jco.2012.30.15\_suppl.8507
43. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, et al. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* 2002; 3(11): 991-998
44. Kiertscher SM, Luo J, Dubinett SM, Roth MD. Tumors promote altered maturation and early apoptosis of monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol* 2000;164(3):1269-1276
45. Yang L, Carbone DP. Tumor-host immune interactions and dendritic cell dysfunction. *AdvCancer Res* 2004; 92: 13-27
46. Moskophidis D, Lechner F, Pircher H, Zinkernagel RM. Virus persistence in acutely infected immunocompetent mice by exhaustion of antiviral cytotoxic effector T cells. *Nature* 1993; 362(6422): 758-761
47. Pauken KE, Wherry EJ. Overcoming T cell exhaustion in infection and cancer. *Trends Immunol* 2015; 36(4): 265-276
48. Sakuishi K, Apetoh L, Sullivan JM, Blazar BR, et al. Targeting Tim-3 and PD-1 pathways to reverse T cell exhaustion and restore anti-tumor immunity. *J Exp Med* 2010; 207(10): 2187-2194
49. Goldberg MV and CG Drake. LAG-3 in Cancer Immunotherapy. *Curr Top Microbiol Immunol* 2011; 344: 269-728
50. Woo SR, Turnis ME, Goldberg MV, et al. Immune inhibitory molecules LAG-3 and PD-1 synergistically regulate T-cell function to promote tumoral immune escape. *Cancer Res* 2012; 72(4): 917-927
51. Wherry EJ. T cell exhaustion. *Nat Immunol* 2011; 12(6): 492-499
52. Leach DR, Krummel MF, Allison JP. Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade. *Science* 1996; 271(5256): 1734-1736
53. Hurwitz, AA, Yu TF, Leach DR, Allison JP. 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
54. Keir ME, Liang SC, Guleria I, Let al. Tissue expression of PD-L1 mediates peripheral T cell tolerance. *J Exp Med* 2006; 203(4):883-895
55. Keir ME, Butte MJ, Freeman GJ, Sharpe AH. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol* 2008;26:677-704
56. Bennett F, Luxenberg D, Ling V, 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
57. Latchman Y, Wood CR, Chernova T, et al. PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nat Immunol* 2001; 2(3):261-268
58. Keir ME, Liang SC, Guleria I, et al. Tissue expression of PD-L1 mediates peripheral T cell tolerance. *J Exp Med* 2006; 203: 883-895
59. 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
60. Quezada SA, Peggs KS. Exploiting CTLA-4, PD-1 and PD-L1 to reactivate the host immune response against cancer. *Br J Cancer* 2013;108(8): 1560-1565
61. Sharpe AH, Wherry EJ, Ahmed R, Freeman GJ. The function of programmed cell death 1 and its ligands in regulating autoimmunity and infection. *Nat Immunol* 2007; 8(3):239-245
62. Taube, JM, Anders RA, Young GD, 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): 127ra37

## КОНТРОЛНИ ТОЧКИ (CHECK POINTS) И СПОСОБИ ЗА ПОВЛИЯВАНЕ ...

---

63. Taube JM, Klein A, Brahmer JR, 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
64. Parsa AT, Waldron JS, Panner A, et al. Loss of tumor suppressor PTEN function increases B7-H1 expression and immunoresistance in glioma. *Nat Med* 2007; 13(1): 84-88
65. Marzec M, Zhang Q, Goradia A, et al. Oncogenic kinase NPM/ALK induces through STAT3 expression of immunosuppressive protein CD274 (PD-L1, B7-H1). *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105(52):20852-20857
66. Zhou Q, Munger ME, Veenstra RG, et al. Coexpression of Tim-3 and PD-1 identifies a CD8+ T-cell exhaustion phenotype in mice with disseminated acute myelogenous leukemia. *Blood* 2011; 117(17): 4501-4510
67. Ngiow SF, von Scheidt B, Akiba H, et al. Anti-TIM3 antibody promotes T cell IFN-gamma-mediated antitumor immunity and suppresses established tumors. *Cancer Res* 2011;71(10): 3540-3551
68. Triebel F, Jitsukawa S, Baixeras E, et al. LAG-3, a novel lymphocyte activation gene closely related to CD4. *J Exp Med* 1990;171(5):1393-1405
69. Baumeister SH, Freeman GJ, Dranoff G, Sharpe AH. Coinhibitory Pathways in Immunotherapy for Cancer. *Annu Rev Immunol* 2016; 34: 539-573
70. Andrae S, Piras F, Burdin N, Triebel F. Maturation and activation of dendritic cells induced by lymphocyte activation gene-3 (CD223). *J Immunol* 2002;168(8):3874-3880
71. Levin SD, Taft DW, Brandt CS, et al. Vstm3 is a member of the CD28 family and an important modulator of T-cell function. *Eur J Immunol* 2011; 41(4): 902-915
72. Boles KS, Vermi W, Facchetti F, et al. A novel molecular interaction for the adhesion of follicular CD4 T cells to follicular DC. *Eur J Immunol* 2009; 39(3):695-703
73. Lozano E, Dominguez-Villar M, Kuchroo V, Hafler DA. The TIGIT/CD226 axis regulates human T cell function. *J Immunol* 2012; 188(8): 3869-3875
74. Johnston RJ, Comps-Agrar L, Hackney J, et al. The immunoreceptor TIGIT regulates antitumor and antiviral CD8(+) T cell effector function. *Cancer Cell* 2014; 26(6):923-937
75. Yu X, Harden K, Gonzalez LC, et al. The surface protein TIGIT suppresses T cell activation by promoting the generation of mature immunoregulatory dendritic cells. *Nat Immunol* 2009; 10(1):48-57
76. Li M, Xia P, Du Y, et al. T-cell immunoglobulin and ITIM domain (TIGIT) receptor/poliovirus receptor (PVR) ligand engagement suppresses interferon-gamma production of natural killer cells via beta-arrestin 2-mediated negative signaling. *J Biol Chem* 2014; 289(25):17647-17657
77. Uyttenhove C, , Pilotte L, Théate I, et al. Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Nat Med* 2003; 9(10): 1269-1274
78. Jiang T, Sun Y, Yin Z, et al. Research progress of indoleamine 2,3-dioxygenase inhibitors. *Future Med Chem* 2015; 7(2): 185-201
79. Muller AJ, DuHadaway JB, Donover PS, et al. Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase, an immunoregulatory target of the cancer suppression gene Bin1, potentiates cancer chemotherapy. *Nat Med* 2005; 11(3): 312-319
80. Hicklin DJ, Marincola FM, Ferrone S. HLA class I antigen downregulation in human cancers: T-cell immunotherapy revives an old story. *Mol Med Today* 1999; 5(4): 178-186
81. Garrido F, Ruiz-Cabello F, Cabrera T, et al. Implications for immunosurveillance of altered HLA class I phenotypes in human tumours. *Immunol Today* 1997; 18(2): 89-95
82. Hiraki A, Kaneshige T, Kiura K, et al. Loss of HLA haplotype in lung cancer cell lines: implications for immunosurveillance of altered HLA class I/II phenotypes in lung cancer. *Clin Cancer Res* 1999; 5(4): 933-936
83. Bicknell DC, Rowan A, Bodmer WF. Beta 2-microglobulin gene mutations: a study of established colorectal cell lines and fresh tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91(11): 4751-4755
84. Seung S, Urban JL, Schreiber H. A tumor escape variant that has lost one major histocompatibility complex class I restriction element induces specific CD8+ T cells to an antigen that no longer serves as a target. *J Exp Med* 1993; 178(3): 933-940
85. Natali PG, Nicotra MR, Bigotti A, et al. Selective changes in expression of HLA class I polymorphic determinants in human solid tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 86(17): 6719-6723

- 
86. Blanchet O, et al. Altered binding of regulatory factors to HLA class I enhancer sequence in human tumor cell lines lacking class I antigen expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89(8): 3488-3492
87. Gainor JF, Sequist LV, Shaw AT, et al. Clinical correlation and frequency of programmed death ligand-1 (PD-L1) expression in EGFR-mutant and ALK-rearranged non-small cell lung cancer (NSCLC). *J Clin Oncol* 2015; 33 :15\_suppl, 8012-8012
88. Gibney GT, Weiner LM, Atkins MB. Predictive biomarkers for checkpoint inhibitor-based immunotherapy. *Lancet Oncol* 2016; 17(12):e542-e551
89. Hamid O, Schmidt H, Nissan A, et al. A prospective phase II trial exploring the association between tumor microenvironment biomarkers and clinical activity of ipilimumab in advanced melanoma. *J Transl Med* 2011; 9:204
90. Pichler R, Fritz J, Heidegger I, et al. Predictive and prognostic role of serum neopterin and tryptophan breakdown in prostate cancer. *Cancer Sci* 2017; 108(4):663-670
91. Cheraghchi-Bashi A, Parker CA, Curry E, et al. A putative biomarker signature for clinically effective AKT inhibition: correlation of in vitro, in vivo and clinical data identifies the importance of modulation of the mTORC1 pathway. *Oncotarget* 2015; 6(39): 41736-41749
92. Yamazaki N, Kiyohara Y, Uhara H, et al. Cytokine biomarkers to predict antitumor responses to nivolumab suggested in a phase 2 study for advanced melanoma. *Cancer Sci* 2017; 108(5):1022-1031
93. Boussiotis VA. Somatic mutations and immunotherapy outcome with CTLA-4 blockade in melanoma. *N Engl J Med* 2014; 371(23):2230-2232
94. Rizvi NA, Hellmann MD, Snyder A, et al. Cancer immunology. Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer. *Science* 2015; 348(6230):124-128
95. Watson IR, Takahashi K, Futreal PA, Chin L. Emerging patterns of somatic mutations in cancer. *Nat Rev Genet* 2013; 14(10):703-718
96. Le DT, Durham JN, Smith KN, et al. Mismatch repair deficiency predicts response of solid tumors to PD-1 blockade. *Science* 2017; 357(6349): 409-413
97. Lee V, Murphy A, Le DT, Diaz LA Jr. Mismatch Repair Deficiency and Response to Immune Checkpoint Blockade. *Oncologist* 2016; 21(10):1200-1211
98. 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
99. Gryfe R, Kim H, Hsieh ET, et al. Tumor microsatellite instability and clinical outcome in young patients with colorectal cancer. *N Engl J Med* 2000; 342(2):69-77
100. Viale G, Trapani D, Curigliano G. Mismatch Repair Deficiency as a Predictive Biomarker for Immunotherapy Efficacy. *Biomed Res Int* 2017; 2017:4719194. doi: 10.1155/2017/4719194

////////////////////////////////////  
**ПРЕДИКТИВНИ МОДЕЛИ ПРИ РАНЕН И АВАНСИРАЛ  
КОЖЕН МЕЛАНОМ**  
////////////////////////////////////

**доц. д-р Красимир Киров, дм**

УСБАЛО, София





# ПРЕДИКТИВНИ МОДЕЛИ ПРИ РАНЕН И АВАНСИРАЛ КОЖЕН МЕЛАНОМ

доц. д-р Красимир Киров, дм

УСБАЛО, София

## ОБЗОР

*Молекулярно-генетичният профил на малигнения меланом (ММ) представя информация с предиктивно значение за лечение не само с BRAF-инхибитори, но и с имунотерапия с анти-PD1, анти-CTLA4 антитела или тяхната комбинация.*

*В статията се обсъждат множество предиктивни фактори (брой митози, туморна дебелина, наличие на улцерация, експресия на PD1-L и наличие на тумор-инфилтриращи лимфоцити и др). Обсъждат се и молекулярнопатологични маркери, тяхното прогностично и предиктивно значение за отговор към лечение с таргетни медикаменти или имунотерапия, както и създаването на „раков имунограм“ като предиктивен модел за отговор към лечение.*

## Увод

Малигненият меланом (ММ) е меланоцитен тумор с постоянен темп на годишно увеличение на заболяемостта средно 3%. Като нозологична единица се състои от няколко клинични форми с различни молекулярно-патологични характеристики (водещи генетични мутации). Нарастването на заболяемостта се дължи предимно на индуцираните от ултравиолетови лъчи ММ по откритите части на тялото (с или без хронично увреждане на кожата) с водещи мутации в *BRAF* и *NRAS* и спорадични – акрални, при които има и *c-KIT* мутации; мукозни, предимно със *c-KIT* мутации и увеални с *GNAQ* и *GNA11* мутации. Честотата на спорадичните ММ нараства много по-бавно.

Дългосрочната прогноза на първичния ММ зависи от туморния стадий при начал-

но лечение. Той се определя от туморната дебелина в *mm* и наличието на улцерация. Десетгодишната преживяемост при пациентите с T1 е 92%, с T2 – 80%, с T3 – 63% и с T4 – 50% ( $p < 0.0001$ ). Митотичната активност също има прогностично значение, но е по-неопределена и затова не се включва в VIII ревизия на TNM класификацията.<sup>1,2</sup>

Туморната дебелина, наличието на улцерация и високият брой митози имат предиктивно значение при биопсия на стражевия (сентинелен) лимфен възел за откриване на метастаза.<sup>3,4</sup> Метастазата в стражевия възел е предиктор за риск от метастазирание в други регионални лимфи и е най-важният показател за метастатичен потенциал на тумора ( $p < 0.00001$ ).<sup>5</sup>

В Българи я диагнозата и лечението на първичния ММ е предимно в стадий

T3 (37.5%) и затова 5-годишната преживяемост е по-ниска от 70%. В САЩ и Австралия, ММ се открива в много по-ранен стадий T1 (72%), но тези ранни ММ причиняват смъртта на най-много пациенти (29% – „Low risk paradox“). Обяснение на този „парадокс“ се търси в настъпилите ранни генетични изменения при ММ – от генетичния профил (*P. Lorigan, ASCO 2017*). Резултатите от различните изследвани панели обаче не се припокриват. Най-надежден за сега е 31 – *gene expression profile (GEP) test, Decision Dx®-Melanoma*, при който се определя панел от нискорискови изменения (Клас I) и високорискови (Клас II). *GEP* клас II има почти същото прогностично значение като метастаза в стражевия възел.<sup>6</sup> Сега се поставя въпроса дали *GEP*, като молекулярен предиктор, може да замести биопсията на стражевия възел и дали пациентите клас II биха имали полза от адювантна терапия.

При проучванията за адювантна терапия във II, III и IV стадий с алфа *interferon* и пегулиран интерферон, улцерацията на първичния ММ има предиктивно значение за полза от лечението.<sup>7</sup>

При неприключените проучвания за адювантна терапия в III стадий, междинните резултати показват, че микрометастази в регионалните лимфни възли (IIa 1-2) може да са предиктивни за терапевтичен резултат и от *interferon*, докато макрометастази (III 2 а-в, III 3) – за чекпойнт инхибиторите (*ipilimumab, pembrolizumab, nivolumab*).

Ранно откриване на прогресия на болестта след операция във II/III стадий досега разчиташе на проследяване на стойностите на различни серумни биомаркери, изследвани самостоятелно или в панели (S100 протеин, LDH), като S100 протеин е позитивен в 37% от случаите на рецидив, но само в 5.5% е първи признак за прогресия с ниска специфичност от 29%; LDH е позитивна само в 2% от случаите. Сега за най-надежден био-

маркер се приема циркулиращата туморна ДНК (ctDNA) и е включена в панела за проследяване на пациентите в проучванията за адювантна терапия.<sup>8</sup>

Пациентите с нерезектабилен ММ в стадий III и IV подлежат на таргетна или имуно-терапия. В повече от 40% от случаите на метастатичен ММ се установява мутация на *BRAF*, в 20% на *NRAS*, а *c-KIT* е най-честата мутация при мукозните меланоми. Пациентите с *BRAF* и *NRAS* мутации имат по-лоша прогноза от тези с *div* тип, ако не проведат таргетна терапия, докато тези с *c-KIT* имат по-добра от *div* тип.<sup>9, 10</sup>

*BRAF*-мутацията е много силен предиктор за успешно лечение с *BRAF*-инхибитор. Първична резистентност се установява само в 10% от случаите поради ранна загуба на функцията на *PTEN* и *CDK4/6/2A*. Вторичната резистентност настъпва медианно след 6.9 месеца (mPFS) при монотерапия с *BRAF*-инхибитор и след 11 – 12 месеца при комбинацията *BRAF*- и *MEK*-инхибитор. От изследванията на ctDNA се очаква освен мониториране на терапията, ранно откриване на прогресия при пълен отговор, да се установява и причината за резистентност. S100 и ЛДХ имат прогностично и предиктивно значение. ЛДХ участва и в M-категорията на TNM. При подгруповия анализ на резултатите от таргетната терапия се установяват клинични и биохимични фактори, които имат както прогностично, така и предиктивно значение за резултат от терапията.

При проучванията с *vemurafenib +/- cobimetinib (BRIM2, BRIM3, coBRIM)* се установи, че най-голямо предиктивно значение има нивото на LDH (в норма vs < 2 ULN vs > 2 ULN). Другите рискови фактори са чернодробни метастази и ECOG PS 0 vs 1(11). На Табл. 1 са резултатите от 3-годишната преживяемост в проучванията в зависимост от рисковите фактори.

## ПРЕДИКТИВНИ МОДЕЛИ ПРИ РАНЕН И АВАНСИРАЛ КОЖЕН МЕЛАНОМ

Таблица 1. Тригодишна преживяемост с Vemurafenib +/- Cobimetinib.

| Прогностичен фактор  | BRAF-i      |             |            | BRAF-i + MEK-i |         |         |
|----------------------|-------------|-------------|------------|----------------|---------|---------|
|                      | 1г. (%)     | 2г. (%)     | 3г. (%)    | 1г. (%)        | 2г. (%) | 3г. (%) |
| LDH-n без LM         | 76.5        | 48.4        | 32.1       | 88.8           | 64.9    | 45.7    |
| LDH-n с LM ECOG PS 0 | 66.7        | 37.9        | 23.1       | 82.6           | 69.6    | NE      |
| LDH-n с LM ECOG PS 1 | <b>42.9</b> | <b>16.3</b> | <b>8.2</b> | 75             | 56.2    | NE      |
| LDH < x2 ECOG PS 0   | 62.4        | 30.3        | 21.3       | 74.7           | 42.9    | 28.6    |
| LDH < x2 ECOG PS 1   | 47.3        | 15.7        | 10.5       | 62.5           | 37.5    | NE      |
| LDH => x2            | 15.4        | 3.9         | 3.9        | 42.5           | 17.7    | 11.8    |

Използвани съкращения: LM – черnodробни метастази; LDH – АДХ.

Градацията на рисковите фактори съответства на постепенно понижение на преживяемостта. При сравнение на монотерапията с комбинираната, наличието на черnodробни метастази с влошаване на състоянието е с по-добра преживяемост само от пациентите с LDH > 2ULN.

Същият подгрупов анализ е направен и при комбинацията *dabrafenib* + *trametinib* (проучването *Combi-D*). Прогностичните и предиктивни фактори са отново LDH, ангажиране на 3 и повече органа (не брой метастази) и ECOG PS 0/1.<sup>12</sup> Резултати са представени на Табл. 2.

Увеличението на рисковите фактори води до постепенно влошаване на преживяемостта, като на третата година разликата между най-рисковата и най-благоприятна група е десетократна. Таргетирането на *NRAS* за сега е неуспешно. Проучва се възможността на MEK инхибиция (проучване *NEMO*), както и комбинацията на MEK- и CDK4/6 инхибитори. Прицелно лечение на *C-KIT* мутациите с *imatinib* е със скромни резултати, обаче мутациите на екзон 11 и 13 имат предиктивно значение и туморния от-

Таблица 2. Тригодишна преживяемост от проучването *Combi-D*

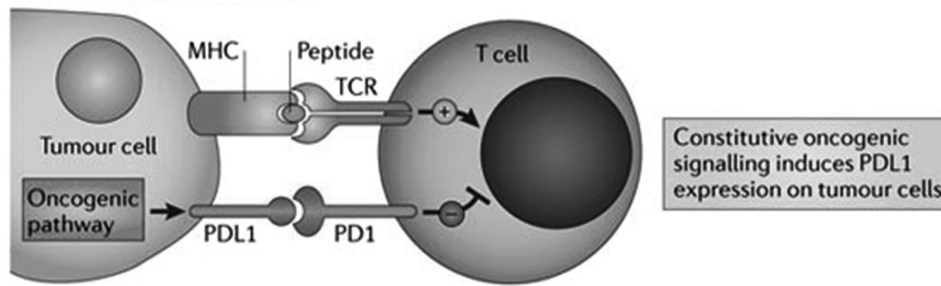
| Прогностичен фактор | Преживяемост (%) |      |      |
|---------------------|------------------|------|------|
|                     | 1 г.             | 2 г. | 3 г. |
| LDH n < 3 loc       | 90               | 75   | 70   |
| LDH n > 3 loc       | 76               | 55   | 32   |
| LDH < x2 ECOG 0     | 71               | 43   | NE   |
| LDH < x2 ECOG =/>1  | 42               | 19   | 16   |
| LDH =/> x2          | 40               | 7    | 7    |

Използвани съкращения: LM – черnodробни метастази; LDH – АДХ.

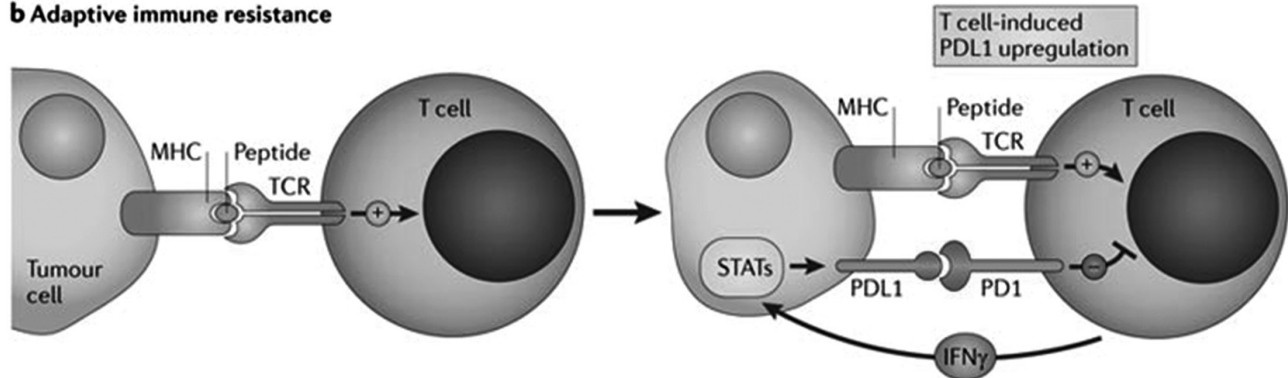
говор достига 50%.<sup>13</sup> Пациентите с ММ *div* тип *BRAF* или след прогресия след лечение с BRAF инхибитори подлежат на имунотерапия с анти-PD1, анти-CTLA4 антители или тяхната комбинация. Терапията с анти-PD1 антители (*nivolumab*,  *pembrolizumab*) е много ефективна като туморния отговор достига 40%, а 5-годишната преживяемост 35% (фаза 1). Те са единственият ефективен медикамент при мукозните ММ с туморен отговор от 23%.<sup>17, 18</sup> Ефектът от терапията зависи от няколко фактора, като най-важният е нивото на експресия на PD1-L от тумора. Онкогенната (вродена имунна резистентност) е много рядка при ММ (Фиг. 1а). В повечето случаи се касае за адоптивна имунна резистентност на туморната клетка (Фиг. 1б) и експресията на лиганда е резултат на секретирания от Т лимфоцит IFN- $\gamma$ .

При липса на експресия на лиганда (пог 1%) туморният отговор е 7% в проучването *Keynote 001*, но 23% в *Keynote 006*. С нарастването на експресията над 60% туморният отговор непрекъснато нараства до 63%. Затова при ММ не се налага рутин-

**a Innate immune resistance**



**b Adaptive immune resistance**



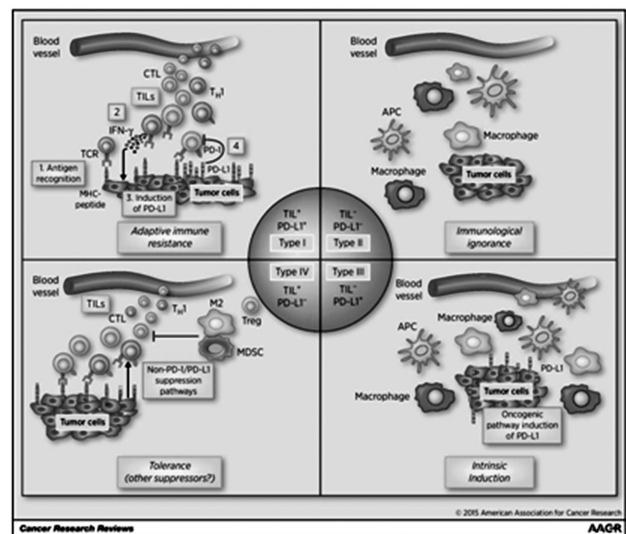
Nature Reviews | Cancer

**Фигура 1.** Вродена и придобита имунна резистентност на туморната клетка. а) Вродена имунна резистентност. б) Придобита имунна резистентност.

ното изследване на лигандата, но количественото ѝ изражение има предиктивност (G. Long, ASCO 2017).

Вторият предиктивен фактор е наличието на тумор инфилтриращи лимфоцити (TIL). На Фиг.2 и Табл. 3 са изобразени четирите възможни ситуации на имунна реакция в туморната микросреда.

Предварителното определяне на двата фактора, експресия на лигандите и наличието на TIL, може да има предиктивно значение за избора на терапия, според екипа на A. Ribas, който разработи тази концепция.<sup>14</sup> При T1a може да се очаква най-добър ефект от терапията и процентът от 38% съответства на този от туморния отговор при двете анти-PD1 антитела. При T1b туморът е неимуногенен и той може да се превърне от „студен“ в „горещ“ чрез инжектиране на онколитичен вирус (Tvec-Imlygic),



**Фигура 2.** T1a – експресия на лигандите и масивна инфилтрация от TIL; T1b – липса на лиганди и TIL – туморът е „студен“, не е имуногенен; T1c – експресия на лиганди, липса на TIL – онкогенна индукция на лигандите с липсващ имуногенен отговор; T1d – липса на експресия на лиганди, наличие на TIL, тяхната функция е блокирана от T-regs и MDSC.



## ПРЕДИКТИВНИ МОДЕЛИ ПРИ РАНЕН И АВАНСИРАЛ КОЖЕН МЕЛАНОМ

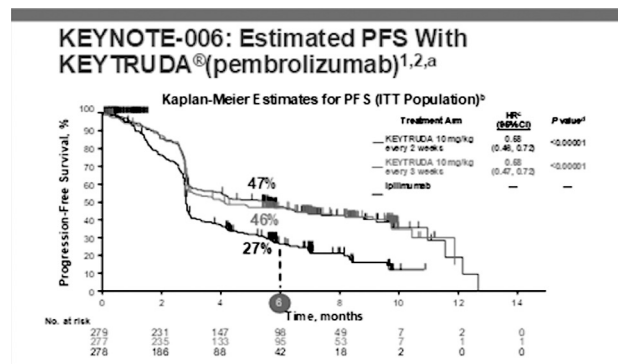
Таблица 3. Процентно съотношение на типове туморна микросреда.

|        |       |          |  |
|--------|-------|----------|--|
| PD-L + | TIL + | Type I   | Adaptive immune resistance<br>- 38%                    |
| PD-L - | TIL - | Type II  | Immunological ignorance<br>- 41%                       |
| PD-L + | TIL - | Type III | Innate immune resistance<br>(intrinsic induction) - 1% |
| PD-L - | TIL + | Type IV  | Tolerance<br>(other suppressor?) - 20%                 |

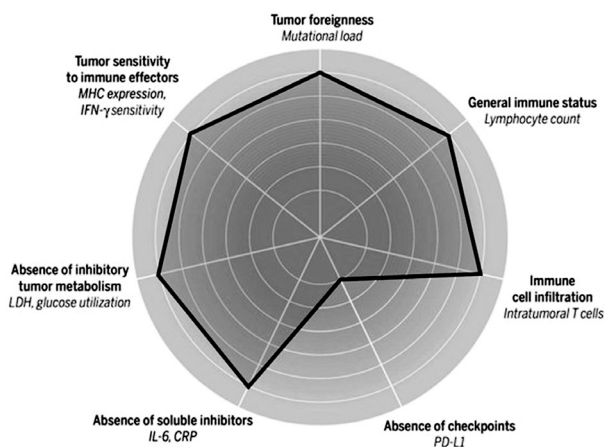
лъчетерапия или химиотерапия, които да разкрият нови антигенни епитопи. При Тип III засега няма решение, но той е много рядък при ММ. При Тип IV може да се започне с химиотерапия (напр. с *cyclophosphamide*, който потиска Tregs).

Имунотерапията, за разлика от таргетната терапия, има по-бавно начало на туморния отговор, по-малко пациенти се повлияват от нея и mPFS е по-кратък – 4-5 месеца. Причината за бързия спад на кривата на *Kaplan – Meyer* при PFS е първичната резистентност към терапията. Следващото по-хоризонтален ход на кривата (Фиг.3). Лекарят спад се дължи на придобитата резистентност. Установи се, че причините за това са две – инактивация на *JAK1* или *JAK2* – загуба на чувствителност към *IFN – γ* (*JAK – STAT3* сигнален път) и инактивация на *Beta-2-microglobulin*, част от *MHC class I* необходим за разпознаването от *CD8 T*-лимфоцитите.<sup>15</sup>

Екипът на *A. Ribas* (от Калифорнийския университет) и на *C. Blank* (от Онкологичен център Амстердам) разработиха т. нар. „раков имунограм“ (*radar plot*), на който се нанасят количествено седем показателя (Фиг. 4):<sup>16</sup> ниво на експресия на *PD1-L*; инфилтрация с *TIL*; ниво на *LDH*; ниво на



Фигура 3. PFS при Pembrolizumab.



Фигура 4. Раков имунограм.

имуносупресивни агенти (*IL6*), *S* реактивен протеин; мутационен репертоар (имуногенност на тумора); чувствителност към *IFN – γ* и експресия на *MHC* (придобита резистентност). При нанесени стойности се получава предиктивен модел за очакван ефект от лечението.

Терапията с анти-*CTLA4* антитела (*ipilimumab*) е с по-ниска ефективност. Туморният отговор е в 12% от случаите, но е първият нов препарат, доказал увеличение на 5-годишната преживяемост на 18-20%. Вече се използва като втора или трета линия на лечение. Негативните предиктори са нисък абсолютен брой лимфоцити, висока *СУЕ*, висок *S* реактивен протеин, висока стойност на *LDH*, нисък брой на *CD 8+* (*TIL*).



Комбинацията с анти PD1 + CTLA4 антители може да се прилага първа линия, като индикациите са бързо развиващи се тумори (кинетиката на комбинацията е по-бърза), при пациенти с ЛДХ > 2 ULN, при пациенти *BRAF* div тип и при липсваща експресия на PD1-L (*G. Long, ASCO 2017*). За съжаление, страничните действия 3/4 степен са при повече от 50% от пациентите и при 37% терапията се прекратява.<sup>17, 18</sup>

## Заклучение

Засега в практиката като предиктивни маркери използваме някои клинични, биохимични показатели, които не са достатъчно добри, за да се провежда истинска прецизна терапия. Очакваме в бъдеще по-добри биомаркери.

## ЛИТЕРАТУРА

- Balch CM, Gershenwald JE, Soong SJ, et al. Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. *J Clin Oncol* 2009; 27:6199-6206
- VIII-th TNM classification, Spriger Verlag, Dec. 2016
- 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
- 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
- Weiss S, Hanniford D, Hernando E, et al. Revisiting determinants of prognosis in cutaneous melanoma. *Cancer* 2015; 121(23): 4108-4123
- Zager JS, Messina J, Gerami P, et al. Clinical Results Of Melanoma Gene Expression Test In 334 Patient Performance Cohort Study, ASCO 2016
- Eggermont AM, Suci S, Spatz A, et al. 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
- Lee R, Gremel G, Lorrigan P, et al. Use of circulating DNA to predict survival in patients with resected high risk II/III melanoma. *JCO* 2017;35: abstract 9583
- 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;164:776-784
- 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
- Axel Hauschild, EADO 2016 oral presentation
- Keith Flaherty, AACR 2015 oral presentation
- 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
- Michele WL, Ribas A, Smyth MJ, et al. Classifying Cancers based on T-cell infiltration and PD-L1. *Cancer Res* 2015;75:2139-2145
- Zaretsky JM, Garcia-Diaz A, Ribas A, et al. Mutations Associated with Acquired Resistance to PD-1 Blockade in Melanoma. *N Engl J Med* 2016; 375:819-829
- Christian UB, Haanen JB, Ribas A, et al. The Cancer immunogram. *Science* 2016: 352(6286); 658-660
- Wolchok JD, Chiarion-Sileni V, Hodi SF, et al. 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:(15); abstract 9505
- Larkin J, Chiarion-Sileni V, Wolchok JD, et al. Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma. *N Engl J Med* 2015; 373:23-34



## ЕКСПЕРТЕН БОРД

*ПРЕДИКТИВНИ БИОМАРКЕРИ В ОНКОЛОГИЯТА  
методи за изследване и клинично приложение*

**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,  
Токуда Болница – София*

**проф. д-р Галина КИРОВА**

*Аджибадем Сити Клиник,  
Токуда Болница – 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**

*УСБАЛО – София*

**проф. д-р Маргарита ГЕНОВА**

*СБАЛХЗ – София*

**д-р Мариела ВАСИЛЕВА**

*УМБАЛ Александровска – София*

**доц. Милка ГЕОРГИЕВА**

*Българско дружество по патология*

**проф. д-р Милчо МИНЧЕВ**

*СБАЛХЗ – 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 Светлана ХРИСТОВА**

*УМБАЛ Александровска – София*

**проф. д-р Соня СЕРГИЕВА**

*СБАЛОЗ – София*

**проф. д-р Татяна ХАДЖИЕВА**

*УМБАЛ Св. Иван Рилски – София*

**д-р Тихомир ДИКОВ**

*УМБАЛ Александровска – София*

**доц. д-р Яна БОЧЕВА**

*Българско научно дружество  
по клинична лаборатория*

**ПРЕДИКТИВНИ БИОМАРКЕРИ  
В ОНКОЛОГИЯТА**  
**методи за изследване и клинично приложение**

Текстове за продължаващо медицинско обучение

Българска. Първо издание

Редактори

*доц. д-р Димитър Калев, д.м.*

*д-р Ася Консулова, д.м.*

Графичен и компютърен дизайн

*Петър Желев*

"АРТ ТРЕЙСЪР" ООД

Варна, 2017

ISBN 978-619-7094-33-6



9 786197 094336



www.more-conference.com

МУЛТИДИСЦИПЛИНАРНИ  
ОНКОЛОГИЧНИ  
РАЗГОВОРИ И  
ЕКСТРАКТИ

ДЕВЕТА  
НАЦИОНАЛНА  
КОНФЕРЕНЦИЯ

ПОВЕДЕНИЕ ПРИ  
КАРЦИНОМ НА  
ГЪРДА, версия 2

ПОВЕДЕНИЕ ПРИ ТОРАКАЛНИ  
И ГАСТРОЕНТЕРОПАНКРЕАСНИ  
НЕВРОЕНДОКРИННИ ТУМОРИ, версия 2



---

18–20 октомври 2018, Варна

Lilly



MSD



Boehringer  
Ingelheim



NOVARTIS

*caring and curing*



novo nordisk®



786197 094336