

Rola patomorfologa w erze terapii personalizowanej na przykładzie nowotworów jelita grubego

Małgorzata Kołos¹, Anna Nasierowska-Guttmejer^{1,2}, Anna Wasążnik-Jędras¹

Rak jelita grubego (RJG) to jeden z najczęstszych nowotworów nabłonkowych rozwijających się u człowieka. Prawidłowe leczenie wymaga multidyscyplinarnego podejścia do pacjenta oraz — w wybranych przypadkach — zastosowania terapii celowanej. Podstawą do wyboru metody leczenia jest stopień klinicznego zaawansowania nowotworu oraz diagnoza patomorfologiczna. Rozpoznanie nowotworu wynika z analizy obrazu mikroskopowego wraz z oceną biomarkerów immunohistochemicznych i molekularnych, które można podzielić na dwie grupy. Grupa pierwsza to biomarkery o wartości diagnostycznej oraz prognostycznej. Są one stosowane w codziennej pracy patomorfologa i służą do określenia cech morfologicznych i klinicznych nowotworów jelita grubego. Biomarkery drugiej grupy mają wartość predykcyjną i są zalecane przez klinicystów. Rolą patomorfologa w erze terapii personalizowanej jest ocena czynników prognostycznych i predykcyjnych, które wytypują pacjentów odnoszących korzyść z terapii celowanej molekularnie. W raku jelita grubego przydatna klinicznie jest ocena mutacji genów *KRAS*, *NRAS* i *BRAF*. Brak mutacji w wyżej wymienionych genach wiąże się z lepszą odpowiedzią na terapię anti-EGFR.

The pathomorphologist's role in the era of personalised therapy regarding the case of colorectal tumours

Colorectal cancer is one of the most common epithelial tumours amongst humans. Effective treatment requires a multidisciplinary approach and in some cases target therapy. In order to introduce treatment both the clinical stage and pathomorphological diagnosis have to be taken into account. An analysis of the microscopic appearance as well as immunohistochemical and molecular tests are the basis of proper recognition. Biomarkers for diagnosis of colorectal cancer can be divided in two groups. The first one constitutes of diagnostic and prognostic markers, which are commonly used by pathologists. They are useful in recognition of morphological and clinical features of tumours. The second group of biomarkers is used additionally and has predictive value. In the era of personalized therapy the pathomorphologist's role is to assess the prognostic and predictive biomarkers, in order to identify patients who will benefit from the molecular targeted therapy. In the case of colorectal cancer mutations of genes: *KRAS*, *NRAS* and *BRAF* are clinically significant. Lack of aforementioned mutations correlates with a better response to anti-EGFR therapy.

Biuletyn PTO NOWOTWORY 2016; 1, 2: 140–149

Słowa kluczowe: rak jelita grubego, szlaki karcinogenezy, biomarkery prognostyczne, biomarkery predykcyjne, CIN, MSI, CIMP, mutacje *BRAF*

Key words: colorectal cancer, carcinogenesis pathways, prognostic biomarkers, predictive biomarkers, CIN, MSI, CIMP, *BRAF* mutations

¹Zakład Patomorfologii

Centralny Szpital Kliniczny MSW, Warszawa

²Wydział Lekarski i Nauk o Zdrowiu

Uniwersytet im. Jana Kochanowskiego, Kielce

Artykuł w wersji pierwotnej:

Kołos M, Nasierowska-Guttmejer A, Wasążnik-Jędras A. The pathomorphologist's role in the era of personalised therapy regarding the case of colorectal tumours. *NOWOTWORY J Oncol* 2016; 66: 386–395.

Należy cytować wersję pierwotną.

Wprowadzenie

Rak jelita grubego (13% u mężczyzn, M i 10% u kobiet, K), rak piersi (23% u K), rak płuca (20% u M i 9% u K) i rak gruczołu krokowego (15% u M) należały do najczęściej wykrywanych nowotworów złośliwych w 2012 roku i stanowiły łącznie 48% przyczyn zachorowań u mężczyzn i 42% u kobiet (razem 65 310 przypadków) [1]. Wymienione nowotwory coraz częściej poddawane są terapii personalizowanej, opartej na szczegółowym raporcie patomorfologicznym zawierającym ocenę czynników prognostycznych i predykcyjnych badanych metodami immunohistochemicznymi i/lub molekularnymi. Nowoczesne leczenie onkologiczne wymaga z jednej strony współpracy interdyscyplinarnych zespołów złożonych z diagnostów, radiologów, patomorfologów, biologów molekularnych oraz klinicystów (szczególnie ważny jest bezpośredni kontakt lekarza patomorfologa z onkologiem). Z drugiej zaś strony wymagana jest ocena realnych kosztów diagnostyki patomorfologiczno-molekularnej. W kontekście szerokiej dyskusji na temat finansowania leczenia chorych uwzględnia się co najmniej jedno ze świadczeń typu chemioterapia, radioterapia, leczenie chirurgiczne i opieka paliatywna. Według analiz Koziarkiewicza i wsp. [2] szacowane wydatki NFZ na leczenie, rocznie około 15 000 przypadków raka piersi w latach 2004–2010, wyniosły 2 893 mld zł. Suma ta jednak nie uwzględnia diagnostyki, która w przypadku terapii onkologicznej, zwłaszcza celowanej molekularnie, powinna stanowić istotny element kosztów.

Rak jelita grubego jest przykładem nowotworu, w którym rokowanie chorych i koszty leczenia zależą od stopnia jego zaawansowania w momencie rozpoznania. Podstawą do wyboru metody leczenia jest raport patomorfologiczny wraz z oceną czynników predykcyjnych. Na prawidłowy wynik badania mikroskopowego ma znaczący wpływ sposób zabezpieczenia materiału pooperacyjnego przez chirurga, sposób jego utrwalenia (rodzaj utrwalacza i czas utrwalania) oraz jakość badania makroskopowego [3]. Szczególne znaczenie ma liczba znalezionych węzłów chłonnych (w raku okrężnicy) oraz ocena całkowitego wycięcia tkanek mezorektum z weryfikacją marginesu radialnego w raku odbytnicy. W przypadku znalezienia mniej niż 12 węzłów chłonnych w materiale pooperacyjnym okrężnicy chory poddawany jest terapii adiuwantowej podobnie jak pacjenci paliatywni. Wymienione parametry są podstawą do oceny jakości pracy chirurga i patomorfologa [4]. Do obowiązkowo ocenianych cech mikroskopowych należą typ histologiczny i stopień dojrzałości nowotworu, stopień zaawansowania według klasyfikacji pTNM AJCC/UICC, cechy inwazji naczyń i nerwów, marginesy chirurgiczne (dystalny, proksymalny i radialny w odcinkach jelita grubego pozbawionych surowicówki) oraz stopień regresji guza po terapii neoadiuwantowej. Wymienione parametry są zawarte w zaleceniach Polskiego Towarzystwa Patologów [4, 5].

Nowoczesny zakład patomorfologii w erze terapii celowanej wymaga specjalnej organizacji. Zwiększone zostały wymagania onkologów w stosunku do patomorfologów i biologów molekularnych. Momentami kluczowymi dla jakości uzyskania prawidłowych wyników badań immunohistochemicznych (IHC) i molekularnych są etap preanalizy (zabezpieczenie, utrwalenie i obróbka techniczna materiału tkankowego), identyfikacja tkanki nowotworowej przez patomorfologa do badań molekularnych oraz walidacja i standaryzacja metod IHC i molekularnych. Schemat pracy w nowoczesnym zakładzie patomorfologii według zaleceń patomorfologicznych towarzystw europejskich i brytyjskich przedstawiono na rycinie 1 [6]. Patomorfolog współpracujący z onkologiem powinien dysponować zakładem wyposażonym w automatyczny sprzęt umożliwiający z użyciem metod diagnostycznych otrzymanie powtarzalnych wyników w ocenie biomarkerów.

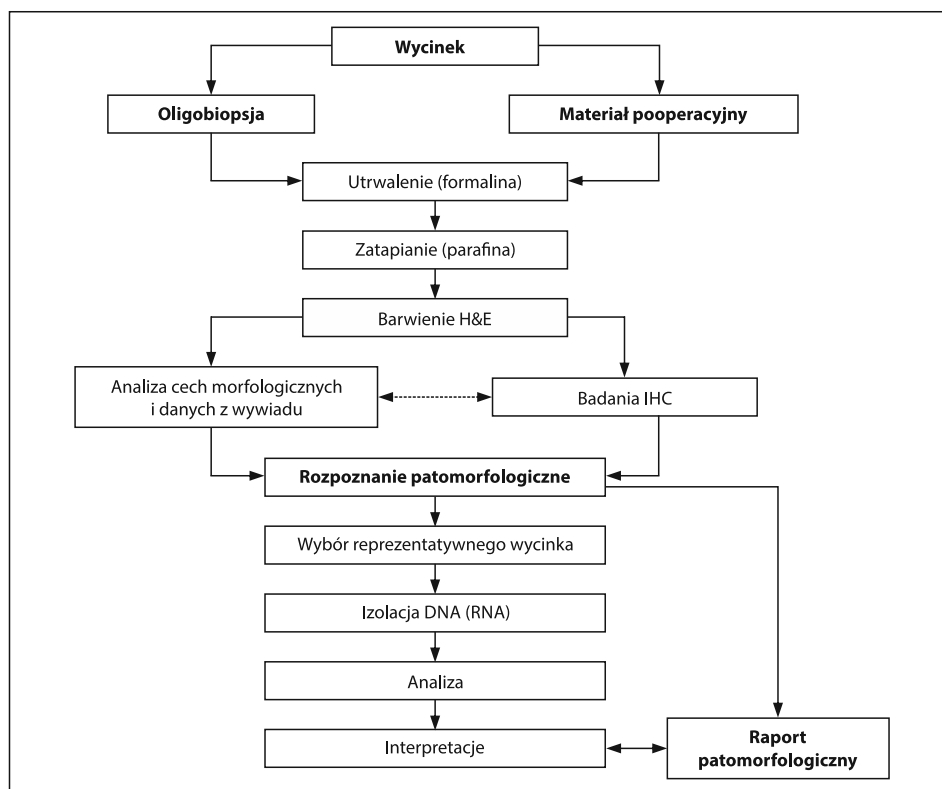
Biomarkery w diagnostyce nowotworów jelita grubego

Biomarkery przydatne w diagnostyce nowotworów można podzielić na dwie grupy. Do pierwszej z nich zaliczane są głównie biomarkery immunohistochemiczne stosowane przez patomorfologów w rutynowej diagnostyce. W wybranych przypadkach badane są także metodami molekularnymi. Mają one znaczenie zarówno diagnostyczne, jak i prognostyczne. Przydatne są one do interpretacji cech morfologicznych i klinicznych nowotworów, określają kierunek różnicowania komórkowego. Stosowane w rutynowej diagnostyce pozwalają określić typ histologiczny nowotworu pierwotnego lub ustalić histogenezę przerzutu. Należy podkreślić, iż podlegają one kontroli zewnętrznej i wewnętrznej.

Drugą grupę stanowią biomarkery o wartości predykcyjnej z udowodnioną naukowo przydatnością. Zalecane są one przez klinicystów i służą do wyboru metody leczenia oraz monitorowania przebiegu choroby. Można je podzielić na biomarkery, których ekspresję oznacza się technikami immunohistochemicznymi, i/lub markery, których zaburzenia w komórkach germinalnych lub somatycznych wykrywa się metodami molekularnymi. Powinny być one poddawane zewnętrznej kontroli jakości (EQC — *external quality control*), która prowadzona jest między innymi przez organizacje europejskie takie jak ESP (European Society of Pathology) [6, 7].

Biomarkery diagnostyczne i prognostyczne — I grupa

Biomarkery grupy pierwszej są przydatne patomorfologowi do potwierdzenia rozpoznania typu histologicznego nowotworu. Niekiedy wariant mikroskopowy raka lub mięsaka ma wartość rokowniczą, która ma znaczenie kliniczne dla przebiegu choroby. Praktyczne znaczenie biomarkerów znalazło zastosowanie w diagnostyce raka gruczołowego



Rycina 1. Schemat pracy w nowoczesnym zakładzie patomorfologii (według modyfikacji własnej na podstawie pracy I. Cree [6])

jelita grubego i jego podtypów mikroskopowych, nowotworów neuroendokrynnych, chłoniaków oraz nowotworów podścieliskowych (GIST), najczęstszych nowotworów mezenchymalnych przewodu pokarmowego.

Biomarkery grupy pierwszej (diagnostyczne i prognostyczne) dzielone są na dwie podgrupy: przydatne do diagnostyki różnicowej (IA) i do identyfikacji szlaków karcinogenezy (IB).

Biomarkery przydatne do diagnostyki różnicowej nowotworów jelita grubego (IA)

Immunohistochemiczna diagnostyka różnicowa nowotworów jelita grubego wymaga zastosowania panelu przeciwciał do badań immunohistochemicznych. Poniżej przedstawiono zasady wymienionej diagnozy.

Rak gruczołowy

Najczęstszym histologicznym typem raka jelita grubego jest rak gruczołowy. Do biomarkerów potwierdzających jego nabłonkowe różnicowanie należą keratyny, wykazujące dodatnią reakcję barwną w cytoplazmie komórek nowotworowych dla CK20 i przeważnie ujemną ekspresję cytoplazmatyczną dla CK7. Profil immunohistochemiczny typu: CK7-/CK20+ wykazuje ok 95% raków jelita grubego (poza tym większość raków z komórek Merkla i prawie jedna trzecia raków gruczołowych żołądka) [8]. Przydatnym biomarkerem w przypadku identyfikacji przerzutu raka jelita grubego do

innego narządu lub pierwotnych, nisko zróżnicowanych RJG jest czynnik transkrypcyjny CDX-2, marker proliferacji i różnicowania z nabłonka jelitowego. Wykazuje on dodatnią jądrową reakcję barwną w komórkach prawidłowej błony śluzowej jelita grubego oraz jądrową lub jądrowo-cytoplazmatyczną reakcję w komórkach raka jelita grubego [9]. Ektopowa ekspresja CDX2 stwierdzana jest ponadto w 85% ostrych białaczek szpikowych [10] oraz w przypadkach przełyku Barretta, w którym kwasy żółciowe indukują różnicowanie jelitowe (metaplastę) komórek nabłonka gruczołowego żołądka [11, 12].

Ostatnio prowadzone są badania nad przydatnością przeciwciała AMACR w nadzorze onkologicznym pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego (WZJG). Przeciwciało stosowane standardowo u pacjentów z rakiem prostaty nie wykazuje ekspresji w prawidłowej błonie śluzowej jelita grubego, natomiast stwierdza się je w ogniskach dysplazji małego stopnia w 96%, dużego stopnia w 80% oraz w nacieku nowotworowym w 71% [13].

Poza wymienionym rakiem gruczołowym jelita grubego w omawianej lokalizacji rozwijają się również inne typy nowotworów. Należą do nich raki z niestabilnością mikrosatelitarną (MSI) związaną z wrodzonym zespołem raka jelita grubego bez polipowatości (zespół Lyncha) lub rakiem sporadycznym. Do panelu przeciwciał potwierdzających raki z MSI i różnicujących je z klasycznym rakiem gruczołowym (CIN) należą: MLH1,

Tabela I. Panel immunohistochemicznej diagnostyki różnicowej potwierdzający histogenezę nowotworu

Typ nowotworu	Panel IHC do diagnostyki różnicowej
Rak gruczołowy jelita grubego	CK20, CDX-2, CK7
Guzy neuroendokrynne jelita grubego	Obowiązkowo: Synaptofizyna, Chromogranina A, Ki-67 Warunkowo: CD56
GIST jelita grubego	Obowiązkowo: CD117 Warunkowo: DOG1, CD34, H-Caldesmon, SMA, S100, Calponina, HMB45, Melan A, S100, PLAP, CD30, D2-40, β -catenina
Chłoniaki	LCA, CD3, CD20, BCL2
Nowotwory typu mięśniowego	SMA, Desmina, H-Caldesmon
Nowotwory typu nerwowego	S100, GFAP
Nowotwory typu miofibroblastycznego	ALK1, Desmina, SMA
Nowotwory typu naczyniowego	CD31, D240

MSH2, MSH6, PMS2 i przeciwciała TP53 [14]. Kliniczne znaczenie ma odróżnienie klasycznego raka gruczołowego, wiążącego się z gorszym rokowaniem, od lepiej rokujących raków z MSI, zwłaszcza typu śluzowego i rdzeniastego.

Nowotwory neuroendokrynne

Nowotwory neuroendokrynne układu pokarmowego wymagają obowiązkowo potwierdzenia rozpoznania następującymi badaniami immunohistochemicznymi: synaptofizyną i chromograniną A oraz warunkowo CD56 lub innymi, specyficznymi endokrynnymi markerami. W każdym przypadku konieczna jest ocena aktywności proliferacyjnej Ki-67 (MIB1), której wartość powyżej 20% potwierdza rozpoznanie raka neuroendokrynnego (NEC). Wymienione biomarkery mają wartość diagnostyczną i prognostyczną, a indeks Ki67 — dodatkowo predykcyjną.

Nowotwór podścieliskowy (GIST)

Kolejnym przykładem nowotworu układu pokarmowego wymagającym specjalnej diagnostyki patomorfologicznej z użyciem biomarkerów jest GIST. W porównaniu z innymi odcinkami układu pokarmowego w jelicie grubym występuje on rzadko (w odbyciu 5% przypadków, 1% w okrężnicy). Podkreślenia jednak wymaga fakt, iż GIST w lokalizacji dystalnej rokuje znacznie gorzej niż w proksymalnej [15]. Ryzyko progresji GIST jelita grubego w przypadkach z powyżej 5 figurami podziału na 50 dużych pól widzenia i średnicą od 5 do 10 cm wynosi 85% w porównaniu z 55% w GIST żołądka [16]. W ocenie mikroskopowej GIST wykazuje heterogenną budowę mikroskopową z komórki epiteloidalnej, wrzecionowatej lub polimorficznej. Dlatego też ocena IHC ekspresji biomarkerów, a w niektórych przypadkach badanie molekularne mutacji genów *KIT* i *PDGFRA* potwierdzają diagnozę GIST i różnicują go z innymi nowotworami jelita grubego. Badaniem potwierdzającym rozpoznanie tego nowotworu jest immunohistochemiczna ekspresja białka CD117 (*KIT*) [17], błonowa dla typu dysko-

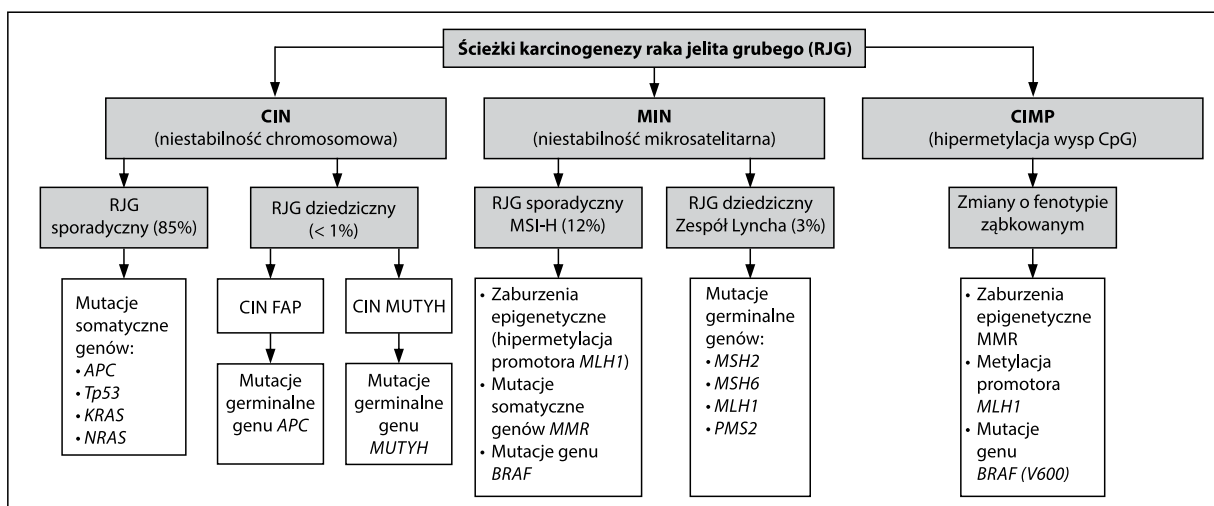
hezyjnego, boga-tokomórkowego i mięsakowatego GIST, okołojądrowa lub pancyto-plazmatyczna dla guzów typu wrzecionowatego oraz ekspresja IHC Anoctamine 1 (DOG1), stwierdzana w 100% przypadków [15]. Należy jednak zwrócić uwagę, iż brak ekspresji CD117 może świadczyć o mutacji *PDGFRA*. Około 80% GIST CD117 ujemnych wykazuje mutację genu *PDGFRA*, zaś pozostałe przypadki (10–15%) są „typu dzikiego” (WT — *wild-type*). Nie stwierdza się w nich mutacji *KIT* ani *PDGFRA*. Mniej specyficznymi biomarkerami GIST są CD34 (60–70%), H-Caldesmon (85%), SMA (30–40%), S100 (5%) oraz Calponina (9). W wybranych przypadkach zalecana jest diagnostyka różnicowa z czerniakiem (z przeciwciałami HMB45, Melan A lub S100), nasieniakiem (PLAP, CD30), rozrodczakiem (D2-40) lub zmianą typu *aggressive fibromatosis* (jądrowa ekspresja β -katenu) [16].

Chłoniaki i nowotwory mezenchymalne o jednoznacznym kierunku różnicowania

Rzadziej spotykane w jelicie grubym chłoniaki i nowotwory mezenchymalne o jednoznacznym kierunku różnicowania wymagają potwierdzenia biomarkerami IHC, niekiedy molekularnymi. Ich diagnostyka powinna przebiegać w wyspecjalizowanych ośrodkach onkologicznych. Poszczególne typy nowotworów wraz z przydatnym panelem badań immunohistochemicznych przedstawiono powyżej (tab. I).

Biomarkery szlaku karcinogenezy raka jelita grubego (IB)

Drugą grupę wśród biomarkerów diagnostycznych i prognostycznych stanowią biomarkery dróg transformacji nowotworowej nabłonka jelita. Raki gruczołowe rozwijają się na podłożu trzech szlaków karcinogenezy. Wyróżniane są raki z niestabilnością chromosomową CIN, niestabilnością satelitarną MIN oraz raki z hipermetylacją wysp CpG [18, 19]. Powyższy podział przedstawiono na rycinie 2. Zmiany te mogą wystąpić na drodze zaburzeń genetycznych (mutacje i zmiany w DNA komórki) lub też



Rycina 2. Szlaki karcinogenezy raka jelita grubego

zaburzeń epigenetycznych (modyfikacje genów przez metylację DNA) [20]. Panel immunohistochemicznych biomarkerów: TP53, MLH1, MSH2, MSH6, PMS2 pozwala na wstępne określenie ścieżki przemiany nowotworowej odróżniającej raki z MSS od raków z MSI-H i MSI-L [18, 19]. Ocena biomarkerów mutacji germinalnych genu APC i genów MMR ma wartość prognostyczną.

Mutacje genu APC

W przypadku klasycznej ścieżki karcinogenezy CIN dochodzi do mutacji genu APC i aktywacji szlaku Wnt, odpowiedzialnego za ok. 90% raków jelita grubego [21]. Niewielka liczba raków jelita grubego (poniżej 1%) jest dziedziczna i powstaje w wyniku germinalnej mutacji genu APC (rodzinna polipowatość gruczolakowata FAP) lub genu MUTYH (polipowatość związana z MUTYH) [22, 23]. Mutacja germinalna genu APC, w porównaniu z mutacją somatyczną tego genu, ma wartość rokowniczą, gdyż identyfikuje ona chorych obarczonych ryzykiem rozwoju raka jelita grubego w młodym wieku. Średnia wieku osób, u których dochodzi do rozwoju nowotworu, wynosi 40 lat. Ryzyko powstania RJK w wieku 21 lat waha się od 1% do 6%, a w wieku 50 lat ponad 95% [24].

W rakach sporadycznych dochodzi do mutacji somatycznych genu APC. Stwierdza się w nich również mutacje typu utraty funkcji dotyczące genu supresorowego TP53, zwanego strażnikiem genomu. Nadekspresję białka TP53 można stwierdzić metodą immunohistochemiczną, akumulacja jądrowa pojawia się na wczesnym etapie przemiany nowotworowej komórek nabłonkowych jelita grubego do neoplazji śród nabłonkowej. Należy jednak podkreślić, iż potwierdzeniem mutacji genu TP53 jest badanie molekularne. Obraz mikroskopowy gruczolaka cewkowego wraz z immunohistochemiczną oceną białka TP53 przedstawiono na rycinach 3a i 3b.

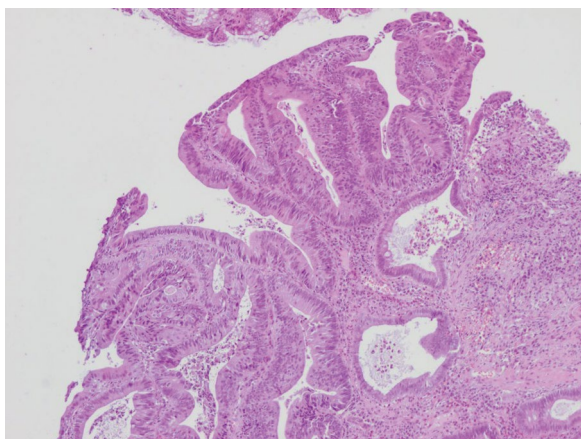
Mutacje genów MMR

Szlak związany z niestabilnością mikrosatelitarną (MIN) jest odpowiedzialny za rozwój zespołu Lyncha (dziedziczne raki jelita grubego niezwiązane z polipowatością, 3% RJK) oraz za raki sporadyczne (12% RJK) [25, 26]. W tych przypadkach dochodzi do mutacji genów mutatorowych, kodujących białka uczestniczące w naprawie błędnie sparowanych zasad azotowych (MMR — mismatch repair genes). Ocena utraty immunohistochemicznej ekspresji białek MLH1, MSH2, MSH6, PMS2 (brak barwnej reakcji jądrowej) pozwala potwierdzić fenotyp mutatorowy raka. Wartość diagnostyczna i prognostyczna badań IHC i molekularnych w tych przypadkach jest w pełni uzasadniona. Mutacje germinalne genów MMR potwierdzają zespół Lyncha (autosomalnie dominujący, mutacje co najmniej jednego z genów MMR) lub zespół Muir-Torrea (autosomalnie dominujący, mutacje genu MSH2, rzadziej MLH1), które wraz z wywiadem identyfikują rodziny obarczone ryzykiem rozwoju mnogich synchronicznych lub metachronicznych nowotworów z MSI.

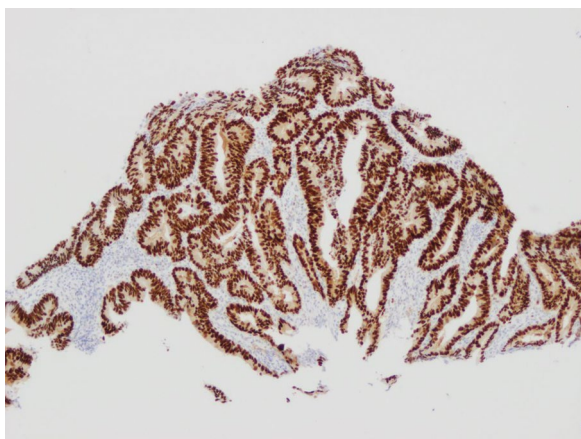
W rakach sporadycznych stwierdza się mutacje somatyczne genów MMR lub zaburzenia epigenetyczne w postaci hipermetylacji. Istotne jest, iż pierwszym etapem w diagnostyce raków jelita grubego z MSI jest ocena charakterystycznych cech makro- i mikroskopowych, takich jak: lokalizacja prawostronna, typ histologiczny, heterogenność tkanki, obecność śluzu i komórek sygnetowatych, typ nacieków zapalnych, obecność martwicy oraz rodzaj marginesu wzrostu guza. Kolejnym etapem są badania IHC i molekularne.

Hipermetylacja wysp CpG (CIMP)

Trzeci szlak karcinogenezy polega na wyciszeniu genów supresorowych odpowiedzialnych za regulację transkrypcji w mechanizmie hipermetylacji wysp CpG. Zmianami pre-



Rycina 3a. Gruczolak cewkowy jelita grubego z dysplazją/neoplazją śródnabłonkową dużego stopnia, barwienie H&E, pow. 100×



Rycina 3b. Gruczolak cewkowy jelita grubego z dysplazją/neoplazją śródnabłonkową dużego stopnia, IHC — akumulacja białka TP53, pow. 40×

kursorowymi raków jelita grubego powstających na drodze CIMP są zmiany ząbkowane, którym towarzyszą mutacje genu *BRAF* (V600), metylacje promotorów różnych genów oraz metylacje promotora *MLH1*. Raki jelita grubego z CIMP częściej występują u kobiet, w lokalizacji prawostronnej, oraz mają mikroskopowe cechy MSI-H [14]. Badanie immunohistochemiczne *MLH1* pozwala wykryć utratę ekspresji białka w guzie. Znaczenie rokownicze tej drogi karcinogenezy jest nadal dyskutowane.

Biomarkery predykcyjne — II grupa

Podstawą do wdrożenia terapii celowanej u chorych na nowotwory jest określenie czynnika związanego z celem działania leku oraz wskazanie chorych, którzy odniosą kliniczną korzyść z leczenia. W praktyce kwalifikacja pacjentów do leczenia wymaga obligatoryjnej oceny czynników predykcyjnych badanych przez patomorfologa i biologa molekularnego. Immunohistochemiczna ocena ekspresji białek produkowanych przez typowane geny lub zaburzeń

molekularnych tych genów pozwalają przewidzieć indywidualną odpowiedź na leczenie.

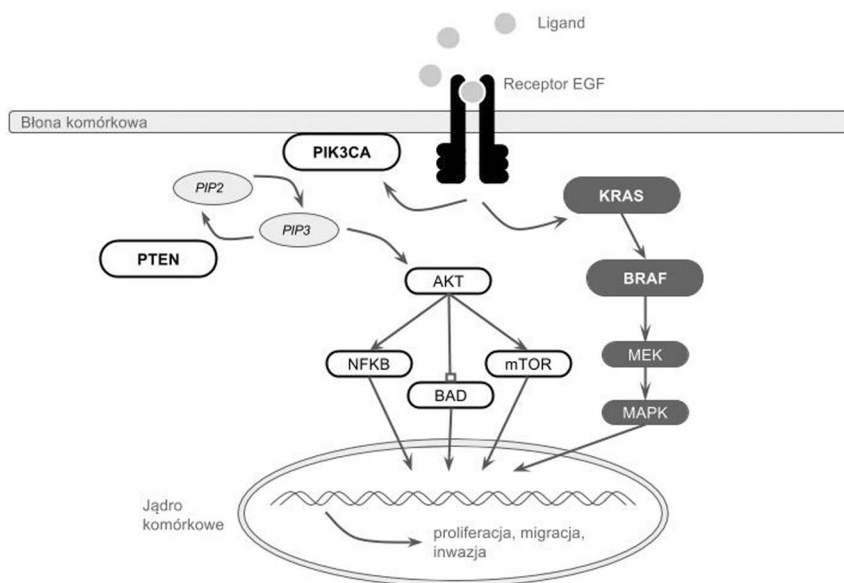
Chorem z zaawansowanym rakiem jelita grubego z przerzutami odległymi (stopień IV) proponowana jest terapia celowana inhibitorami EGFR (receptor naskórkowego czynnika wzrostu): cetuksymabem i panitumumabem, monoklonalnymi przeciwciałami skierowanymi na zewnątrzkomórkową domenę i małe cząsteczki inhibitorów kinaz tyrozynowych. EGFR należący do rodziny receptorów kinaz tyrozynowych, jest zdefiniowanym celem w terapii raka jelita grubego. Jego nadekspresja spotykana w licznych guzach litych jest także przyczyną złego rokowania chorych. Przed zastosowaniem terapii anti-EGFR konieczna jest ocena czynników predykcyjnych związanych ze szlakami przekazywania sygnału wewnątrzkomórkowego (biomarkery grupy II A). Znaczenie praktyczne biomarkerów związanych z drogami karcinogenezy raka jelita grubego, jak WNT (grupa II B), i zaburzeń epigenetycznych z MSI (grupa II C) pozostaje na etapie badań klinicznych.

Biomarkery szlaków przekazywania sygnału wewnątrzkomórkowego (IIA)

Terapia anti-EGFR w raku jelita grubego ukierunkowana jest na somatyczne zaburzenia molekularne genów prowadzące do aktywacji szlaków przekazywania sygnału wewnątrzkomórkowego *RAS – RAF – miogen-activated protein kinase (MAPK)*, *phosphatidylinositol 3-kinase (PIK3K) – Akt i phospholipase C (EGFR/RAS/RAF/MEK/MAPK, PTEN/PIK3K)*. W warunkach prawidłowych szlak ten kontrolowany jest przez EGFR. W przypadku nadekspresji EGFR i aktywacji szlaku przekazywania sygnału dochodzi do proliferacji komórek nowotworowych, hamowania apoptozy i wydłużenia ich czasu przeżycia. Skutkuje to zwiększoną inwazją nowotworu, nasiloną angiogenezą, tworzeniem się przerzutów odległych i progresją choroby nowotworowej.

Aktywacja szlaków przekazywania sygnału wewnątrzkomórkowego jest skutkiem dimeryzacji i fosforylacji wynikającej z połączenia EGF (naskórkowego czynnika wzrostu) lub innego liganda z EGFR [27]. Inną jej przyczyną są mutacje genów *KRAS*, *NRAS*, *BRAF* i *PIK3K* znajdujących się niżej w szlaku przekazywania sygnału EGFR, niepodlegających kontroli EGFR. Mutacje *PIK3K* mogą występować jednocześnie z mutacjami w genach *KRAS* lub *BRAF*, natomiast mutacje *KRAS* i *BRAF* pojawiają się niezależnie. Ponadto mutacje w kodonach 12, 13, 61, 146 genu *KRAS* oraz mutacje V600E genu *BRAF* uruchamiają niezależną drogę aktywacji szlaku, trwałą aktywację kinazy białkowej MEK i w konsekwencji niepowodzenie terapii anti-EGFR. Szlak proliferacyjny RJK przedstawiono na rycinie 4.

Immunohistochemiczna ocena ekspresji białka EGFR nie uzyskała rangi czynnika predykcyjnego, żaden pacjent nie powinien zostać wykluczony z leczenia przeciwciałami anti-EGFR na podstawie immunohistochemicznego



Rycina 4. Szlak proliferacyjny RJG (opracowanie własne na podstawie pracy M. Berga [28])

braku ekspresji białka EGFR [29, 30]. Między innymi wynika to z faktu, iż wynik reakcji może być niepewny, gdy zależy w dużym stopniu od sposobu utrwalenia tkanki oraz czasu przechowywania materiału [31]. Rekomenduje się, zgodnie z zaleceniami NCCN (National Comprehensive Cancer Network), oznaczenie mutacji *KRAS* i *NRAS* u wszystkich pacjentów z zaawansowanym rakiem jelita grubego (stadium IV) [32]. Od lipca 2013 roku Europejska Agencja ds. Leków (EMA — European Medicines Agency) uaktualniła kryteria kwalifikacji do terapii anti-EGFR, zalecając obowiązkowe badanie mutacji *KRAS* i *NRAS* w egzonach 2, 3 i 4 [33, 34].

Analiza mutacji w genach *KRAS*, *NRAS*, *BRAF* i *PIK3K* ma wartość predykcyjną. Kwalifikuje ona chorych, którzy nie odniosą korzyści z terapii anti-EGFR. Największą wartość kliniczną ma mutacja genu *KRAS*, obecna w 35% do 45% przypadków raka jelita grubego. Jest ona istotnym czynnikiem predykcyjnym oporności na leczenie cetuximabem i panitumumabem. Mutacje genów *BRAF*, *PIK3CA* i utrata ekspresji *PTEN* zaliczane są również do czynników predykcyjnych raka jelita grubego [35]. Przewidują one brak odpowiedzi na leczenie przeciwciałami anti-EGFR. Zastosowanie ich w praktyce wymaga jeszcze dalszych badań klinicznych.

Mutacja genu *BRAF* (IIA)

Mutacja genu *BRAF* (IIA) występuje w mniej niż 15% przypadków raka jelita grubego, w około 90% dotyczy kodonu V600E. *BRAF* jest kinazą seroninowo-treoninową aktywującą kinazy MAP/ERK z rodziny RAF, powodując aktywację MEK i niezależną od EGFR proliferację komórek nowotworowych (ryc. 4) [36]. Mutacje genu *BRAF* korelują

z subtypem molekularnym MSI i fenotypem zmutowanych wysp CpG. Zależność pomiędzy MSI, CIMP a *BRAF* przedstawiono na rycinie 5.

Raki zawierające mutację w genie *BRAF* różnią się fenotypowo od typów dzikich, pozbawionych mutacji. Pacjentami w tym tych przypadkach częściej są kobiety powyżej 70 roku życia, które mają guzy zlokalizowane w proksymalnej części okrężnicy. Dominują w nich raki śluzowe i nisko zróżnicowane, które dają przerzuty do węzłów chłonnych, rzadziej do płuc [36, 37]. Mutacja *BRAF* związana jest z niekorzystnym przebiegiem choroby [38], natomiast jej znaczenie predykcyjne jest wciąż kwestią dalszych badań [34]. *BRAF*, modulator szlaku MAPK, może być obiecującym celem terapii spersonalizowanej jako biomarker oporności. Jak wynika z badań, jest on odpowiedzialny za około 12–15% niepowodzeń w terapii z zastosowaniem anti-EGFR [36, 39]. Według badań Richman i wsp. wykazanie mutacji genu *BRAF* może być wartościowym czynnikiem predykcyjnym złej odpowiedzi na cetuksymab, natomiast nie jest biomarkerem predykcyjnym dla terapii z zastosowaniem irynotekanu czy oxaliplatyny [40].

Mutacje genu *PIK3K* (IIA)

Mutacje genu *PIK3K* występują w 20% lub mniej niż 20% przypadków raka jelita grubego. Związane są z niekorzystnym przebiegiem choroby oraz brakiem odpowiedzi na leczenie przeciwciałami anti-EGFR. Wartość predykcyjna tego genu jest bardziej przydatna w połączeniu z oceną ekspresji *PTEN*, negatywnym regulatorem szlaku blokowania apoptozy i proliferacji komórek [34]. Zgodnie z obecnym stanem wiedzy mutacje w egzonach 9 i 20 *PIK3K* mogą być przyczyną oporności na cetuksymab i panitumumab.

Szlak Wnt (IIB)

Najczęstszą mutacją somatyczną w RJG jest mutacja genu *APC* (80% przypadków), która aktywuje szlak sygnałowy Wnt. Utrata funkcji białka APC zaburza fosforylację β -kateniny, która gromadząc się w nadmiarze w jądrze komórkowym, nasila ekspresję genów pobudzających procesy proliferacyjne [41]. Obecnie podejmowane są próby hamowania tego szlaku, w dostępnych środkach terapeutycznych wciąż jednak nie ma skutecznych inhibitorów. Na chwilę obecną status markera predykcyjnego dla szlaku Wnt może pełnić immunohistochemiczna ocena jądrowej ekspresji β -kateniny, która świadczy o wzmożonej proliferacji [42].

Zaburzenia genów MMR (IIC)

Około 15% przypadków raków jelita grubego wykazuje zaburzenia genów mutatorowych MMR. Większość z nich stanowi rak sporadyczny, w którym stwierdza się mutacje somatyczne i zaburzenia epigenetyczne, najczęściej hipermetylację promotora genu *MLH1*. Inaktywacja genów *MSH2* i *MSH6* występuje znacznie rzadziej [43]. W tych przypadkach ocena metylacji promotora *MLH1* ma wartość predykcyjną. Pozwala ona wyselekcjonować grupę chorych z rakiem typu MSI-H o podobnym obrazie mikroskopowym jak w zespole Lyncha, ale o innym fenotypie. Należy podkreślić, iż 70% raków jelita grubego z hipermetylacją *MLH1* ma mutację genu *BRAF*, która jest czynnikiem predykcyjnym w odniesieniu do terapii anty-EGFR (cetuximabem i panitumumabem).

Czynnikiem predykcyjnym w rakach sporadycznych z MSI-H jest badanie IHC hipermetylacji *MLH1* i analiza mutacji *BRAF*V600E. Badanie immunohistochemiczne jest lepszą i mniej kosztowną metodą od badania molekularnego mu-

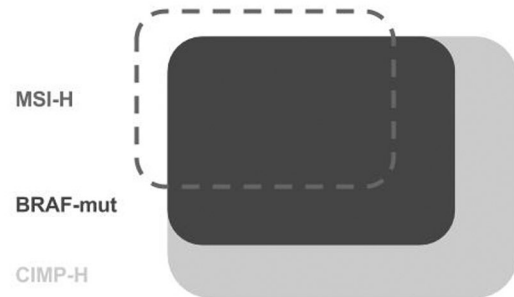
tacji genów mutatorowych MMR. Poza wyżej wymienionymi biomarkerami przydatnymi w terapii celowanej, w trakcie badań pozostaje przydatność inhibitorów topoisomerazy, inhibitorów PARP1 oraz inhibitorów szlaku PI3K-AKT-mTOR.

Ponadto pacjenci ze sporadycznymi rakami jelita grubego z MSI-H nie odnoszą korzyści z klasycznej terapii adiuwantowej opartej na 5-Fluorouracylu, natomiast linie komórkowe raka mogą być bardziej wrażliwe na terapię z irinotekanem [44].

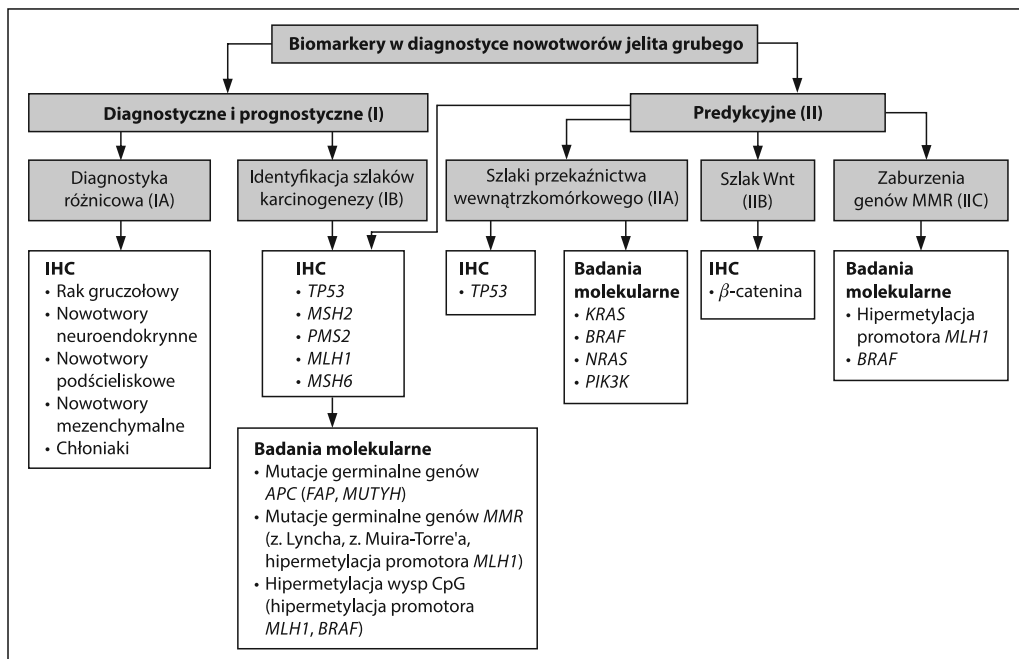
Zestawienie biomarkerów diagnostyczno-prognostycznych i predykcyjnych oraz szlaków karcinogenezy wraz z przydatnym panelem badań immunohistochemicznych i molekularnych przedstawiono poniżej (ryc. 6).

miRNA jako marker prognostyczno-predykcyjny

Markerem o wartości prognostyczno-predykcyjnej i potencjalnym celem terapii jest microRNA (miRNA). Jest to klasa małych, endogennych, jednoniciowych RNA, które pełnią rolę



Rycina 5. Zależność pomiędzy CIMP, MSI a BRAF



Rycina 6. Zestawienie biomarkerów przydatnych w diagnostyce nowotworów jelita grubego

regulatorów posttranskrypcyjnych biorących udział w karcinogenezie, inwazji i progresji raka jelita grubego [45, 46]. Praca opublikowana w 2014 roku przez Stiegelbauer i wsp. przedstawia charakterystykę dotychczas zbadanych miRNA i ich wartość predykcyjną w terapii pacjentów z rakiem jelita grubego.

Klasyfikacje morfologiczno-molekularne

W ciągu ostatnich lat dąży się do stworzenia klasyfikacji morfologiczno-molekularnych, które podzieliłyby chorych na grupy korelujące z odpowiedzią na leczenie. Spośród wielu powstających prac dotyczących raka jelita grubego, między innymi klasyfikacja Jassa z 2007 [47], Furlana z 2011 roku czy Sadanandama [48] lub Roepmana i wsp. z 2014 roku, żadna nie znalazła zastosowania i powszechnej akceptacji klinicznej. Wykazano natomiast, iż klasyfikacje oparte na fenotypie komórki i zaburzeniach molekularnych związanych z karcinogenezą raka mają większą wartość niż klasyfikacje wyłącznie molekularne (np. oparte na badaniu micro-RNA).

Podsumowanie

Badanie biomarkerów w nowotworach jelita grubego wymaga od patomorfologa zastosowania do diagnostyki metod immunohistochemicznych i badań molekularnych. Pierwsza grupa biomarkerów ma znaczenie diagnostyczno-prognostyczne. Powinna być rutynowo dostępna w zakładach patomorfologii zajmujących się histopatologiczną diagnostyką onkologiczną. Drugą grupę stanowią biomarkery o znaczeniu predykcyjnym w odniesieniu do terapii celowanej molekularnie. Badane są metodami immunohistochemicznymi i molekularnymi, które powinny opierać się na zwalidowanych technikach, poddawanych kontroli jakości.

Znaczenie kliniczne oceny czynników predykcyjnych polega na kwalifikacji chorych do terapii skierowanej na regulację zaburzeń leżących u podstaw karcinogenezy i selektywnie niszczącej komórki nowotworowe. Na podstawie analizy ekspresji biomarkerów identyfikuje się chorych, którzy nie odniosą korzyści z tego typu leczenia. Wyróżniamy dwie strategie wyboru pacjentów do terapii ukierunkowanej molekularnie. Pierwsza związana jest z określeniem czynnika związanego z działaniem leku, druga strategia polega na wskazaniu chorych, którzy odniosą korzyść z leczenia. Określenie czynników predykcyjnych pozwala zatem wykluczyć pacjentów, którzy nie odniosą korzyści z terapii personalizowanej. W sferze badań klinicznych pozostają nowe czynniki predykcyjne przewidujące skuteczność działania leku w powiązaniu z jego celem.

Badanie czynników prognostyczno-diagnostycznych i predykcyjnych poszerza dotychczasowy podstawowy zakres diagnostyki patomorfologicznej, wnikając w histogenezę i zaburzenia molekularne będące podstawą do rozwoju nowotworu. W dobie terapii celowanej molekularnie diagnostyka patomorfologiczna raka jelita grubego dotyczy trzech

kierunków według wytycznych ASCO/CAP 2015: 1. Oceny niestabilności mikrosatelitarnej jako czynnika prognostycznego i predykcyjnego chorych z MSI-H w zespole Lyncha i raka sporadycznego, 2. Oceny czynnika predykcyjnego w rakach z MSI-H na podstawie badania IHC hypermetylacji MLH1 i analizy mutacji *BRAF* V600E, 3. Analizy molekularnej statusu genów *KRAS* i *NRAS* czynnika predykcyjnego braku odpowiedzi na terapię anti-EGFR.

Konflikt interesów: nie zgłoszono

Lek. Małgorzata Kołos

Zakład Patomorfologii

Centralny Szpital Kliniczny MSW

ul. Wołoska 137, 02–507 Warszawa

e-mail: malgosia.kolos@gmail.com

Otrzymano: 30 marca 2016 r.

Przyjęto do druku: 6 czerwca 2016 r.

Piśmiennictwo

1. Wojciechowska U, Didkowska J. Nowotwory złośliwe w Polsce w 2012 roku. *Nowotwory J Oncol* 2014; 63: 197–216.
2. Kozierkiewicz A, Śliwczyński A, Pakulski M i wsp. Wydatki na leczenie raka piersi w Polsce. *Nowotwory J Oncol* 2013; 63: 217–226.
3. Nasierowska-Guttmejer A. Najczęstsze błędy na linii onkolog — patomorfolog. *Onkologia po Dyplomie* 2014; 11: 26–31.
4. Nasierowska-Guttmejer A. Zasady postępowania z materiałem operacyjnym u chorych na raka jelita grubego — przygotowanie materiału tkankowego do badania histologicznego. *Pol J Pathol* 2014; 65 (4 Suppl 1): S37–S39.
5. Nasierowska-Guttmejer A. Zasady postępowania z materiałem operacyjnym u chorych na raka jelita grubego — standardowe i wysokospecjalistyczne badania dodatkowe w raku jelita grubego. *Pol J Pathol* 2014; 65 (4 Suppl 1): S40–S50.
6. Cree I, Deans Z, Lichtenberg J i wsp. Guidance for laboratories performing molecular pathology for cancer patients. *J Clin Pathol* 2014; 67: 923–931.
7. van Krieken J, Jung A, Kirchner T i wsp. KRAS mutation testing for predicting response to anti-EGFR therapy for colorectal carcinoma: proposal for an European quality assurance program. *Virchows Arch* 2008; 453: 417–431.
8. Rosai J. *Rosai and Ackerman's surgical pathology*. 10th ed. Edinburgh: Mosby Elsevier, 2011: 54–55.
9. Olsen J, Espersen ML, Jess P i wsp. The clinical perspectives of CDX2 expression in colorectal cancer: a qualitative systematic review. *Surg Oncol* 2014; 23: 167–176.
10. Scholl C, Bansal D, Dohner K i wsp. The homeobox gene CDX2 is aberrantly expressed in most of cases of acute myeloid leukemia and promotes leukemogenesis. *J Clin Invest* 2007; 117: 1037–1048.
11. Debruyne PR, Witek M, Gong L i wsp. Bile acids induce ectopic expression of intestinal guanylyl cyclase C through nuclear factor- κ B and CDX2 in human esophageal cells. *Gastroenterology* 2006; 130: 1191–1206.
12. Liu Q, Teh M, Ito K i wsp. CDX2 expression in progressively decreased in human gastric intestinal metaplasia, dysplasia and cancer. *Modern Pathol* 2007; 20: 1286–1297.
13. Bressenot A, Cahn V, Danese S i wsp. Microscopic features of colorectal neoplasia in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2014; 20: 3164–3172.
14. Kołos M, Wasążnik-Jędras A, Nasierowska-Guttmejer A. Can the histological type of colorectal cancer determine the carcinogenesis pathway? *Pol J Pathol* 2015; 66: 109–120.
15. Guzińska-Ustymowicz K, Nasierowska-Guttmejer A. Nowotwory podścieliskowe przewodu pokarmowego. *Pol J Pathol* 2013; 64 (4 Suppl 2): S47–S54.
16. Nasierowska-Guttmejer A. Nowotwory podścieliskowe przewodu pokarmowego (GIST). W: *Mięsaki tkanek miękkich*. Jeziorski A, Rutkowski P (red.). Gdańsk: Via Medica 2015: 130–134.

17. Miettinen M, Lasota J. Gastrointestinal stromal tumors review on morphology, molecular pathology, prognosis, and differential diagnosis. *Arch Pathol Lab Med* 2006; 130: 1466–1478.
18. Bosman F, Yan P. Molecular pathology of colorectal cancer. *Pol J Pathol* 2014; 65: 257–266.
19. Setaffy L, Langner C. Microsatellite instability in colorectal cancer: clinicopathological significance. *Pol J Pathol* 2015; 66: 203–218.
20. Coppede F, Lopomo A, Spisni R i wsp. Genetic and epigenetic biomarkers for diagnosis, prognosis and treatment of colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2014; 20: 943–956.
21. Giles RH, van Es JH, Clevers H. Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in a cancer. *Biochim Biophys Acta* 2003; 1653: 1–24.
22. Bedeir A, Krasinskas AM. Molecular diagnostics of colorectal cancer. *Arch Pathol Lab Med* 2011; 135: 578–587.
23. Klusek J, Głuszek S. Wybrane mutacje związane z dużym ryzykiem wystąpienia nowotworów jelita grubego. *Przegląd Gastroenterologiczny* 2012; 7: 1–6.
24. Deptała A (red.). *Rak jelita grubego*. Poznań: Termedia Wydawnictwa Medyczne, 2012.
25. Lynch HT, Lanspa SJ, Boman BM i wsp. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer — Lynch syndromes I and II. *Gastroenterol Clin North Am* 1988; 17: 679–712.
26. Cunningham JM, Christensen ER, Tester DJ i wsp. Hypermethylation of the hMLH1 promoter in colon cancer with microsatellite instability. *Cancer Res* 1988; 58: 3455–3460.
27. Olszewski WP, Olszewski WT. Rola patomorfologia w doborze terapii ukierunkowanej na receptor czynnika wzrostu naskórka (EGFR) u chorych na nowotwory. *Onkol Prak Klin* 2010; 6: 228–235.
28. Berg M, Soreide K. EGFR and downstream genetic alterations in KRAS/BRAF and PI3K/AKT pathways in colorectal cancer: implications for targeted therapy. *Discov Med* 2012; 14: 207–214.
29. Hecht JR, Mitchell E, Neubauer MA i wsp. Lack of correlation between epidermal growth factor receptor status and response to Panitumumab monotherapy in metastatic colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2010; 16: 2205–2213.
30. Chung KY, Shia J, Kemeny NE i wsp. Cetuximab shows activity in colorectal cancer patients with tumors that do not express the epidermal growth factor receptor by immunohistochemistry. *J Clin Oncol* 2005; 23: 1803–1810.
31. Atkins D, Reiffen KA, Tegtmeier CL i wsp. Immunohistochemical detection of EGFR in paraffin-embedded tumor tissues: variation in staining intensity due to choice of fixative and storage time of tissue sections. *J Histochem Cytochem* 2004; 52: 893–901.
32. National Comprehensive Cancer Network. NCCN clinical practice guidelines in oncology: colon cancer V2 2015.
33. Dienstmann R, Salazar R, Tabernero J. The evolution of our molecular understanding of colorectal cancer: What we are doing now, what the future holds, and how tumor profiling is just the beginning. *Am Soc Clin Oncol Educ Book* 2014: 91–99.
34. Domagała P, Kowalik A. Badanie molekularnych markerów wykorzystywanych w leczeniu chorych na raka jelita grubego. *Pol J Pathol* 2014; 65 (4 Suppl 1): S59–S77.
35. Siena S, Sartore-Bianchi A, Nicolantonio F. Biomarkers predicting clinical outcome of epidermal growth factor receptor-targeted therapy in metastatic colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst* 2009; 101: 1308–1324.
36. Clarke C, Kopetz ES. BRAF mutant colorectal cancer as a distinct subset of colorectal cancer: clinical characteristics, clinical behaviour and response to targeted therapies. *J Gastrointest Oncol* 2015; 6: 660–667.
37. Sincrope FA, Shi Q, Smyrk T i wsp. Molecular markers identify subtypes of stage III colon cancer associated with patient outcomes. *Gastroenterology* 2015; 148: 88–89.
38. Capalbo C, Marchetti P, Coppa A. Vemurafenib and panitumumab combination tailored therapy in BRAF-mutated metastatic colorectal cancer. *Cancer Biol Ther* 2014; 15: 826–831.
39. Tie J, Gibbs P, Lipton L i wsp. Optimizing targeted therapeutic development: analysis of a colorectal cancer patient population with the BRAF(V600E) mutation. *Int J Cancer* 2011; 128: 2075–2084.
40. Richman SD, Seymour MT, Chambers P i wsp. KRAS and BRAF mutations in advanced colorectal cancer are associated with poor prognosis but do not preclude benefit from oxaliplatin or irinotecan: results from the MRC FOCUS trial. *J Clin Oncol* 2009; 27: 5931–5937.
41. Mallinger A, Crumpler S, Pichowicz M. Discovery of potent, orally bioavailable, small-molecule inhibitors of WNT signaling from a cell-based pathway screen. *J Med Chem* 2015; 58: 1717–1735.
42. Siedlecki J, Deptała A, Wojtukiewicz MZ (red.) Molekularne czynniki prognostyczne i predykcyjne w raku jelita grubego. W: *Rak jelita grubego*. Poznań: Termedia Wydawnictwa Medyczne, 2012: 34–35.
43. Cunningham JM, Kim CY, Christensen ER i wsp. The frequency of hereditary defective mismatch repair in a prospective series of unselected colorectal carcinomas. *Am J Hum Genet* 2001; 69: 780–790.
44. Vilar E, Scaltriti M, Balmana J i wsp. Microsatellite instability due to hMLH1 deficiency is associated with increased cytotoxicity to irinotecan in human colorectal cancer cell lines. *Br J Cancer* 2008; 99: 1607–1612.
45. Stiegelbauer V, Perakis S, Deutsch A i wsp. MicroRNAs as novel predictive biomarkers and therapeutic targets in colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2014; 20: 11727–11735.
46. Cantini L, Issela C PC. MicroRNA–mRNA interactions underlying colorectal cancer molecular subtypes. *Nat Commun* 2015; 6: 8878.
47. Jass JR. Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features. *Histopathology* 2007; 50: 113–130.
48. Sadanandam A, Wang X, de Sousa E i wsp. Reconciliation of classification systems defining molecular subtypes of colorectal cancer: interrelationships and clinical implications. *Cell Cycle* 2014; 13: 353–357.