

**ОБЗОРИ
REVIEWS**
**НЕДРЕБНОКЛЕТЪЧНИТЕ БЕЛОДРОБНИ КАРЦИНОМИ,
EGFR/KRAS – МУТАЦИОННА ЧЕСТОТА, РАСОВИ РАЗЛИЧИЯ И
КЛАСИФИКАЦИОННИ ПОДХОДИ**
С. Генова¹, Ст. Бичев² и В. Беловеждов¹
¹Катедра „Обща и клинична патология и съдебна медицина“, МУ – Пловдив

²Национална генетична лаборатория, СБАПАГ „Майчин дом“ – София

**NON-SMALL CELL LUNG CANCERS: FREQUENCY
OF EGFR/KRAS MUTATIONS, RACIAL DIFFERENCES
AND CLASSIFICATION APPROACHES**
S. Genova¹, St. Bichev² and V. Belovezhdiv¹
¹Department of General and Clinical Pathology and Forensic Medicine, MU – Plovdiv

²National Genetic Laboratory, SHATAG “Maichin dom” – Sofia

<p>Резюме:</p> <p>Ключови думи:</p> <p>Адрес за кореспонденция:</p>	<p>Недребноклетъчните белодробни карциноми (НДКБК) съставляват около 80% от всички морфологични видове белодробни карциноми. Хистологичните варианти са основни прогностични фактори за преживяемостта и последващата терапия. Рецепторът за епидермален растежен фактор (EGFR) се експресира в нормалните човешки клетки в значително по-ниски нива, докато метапластичният бронхиален епител и човешките тумори често експресират високи нива на епидермален растежен фактор и неговите рецептори. Свърхекспресия на EGFR се наблюдава в 40-80% от НДКБК и се свързва с агресивност на тумора, висока пролиферативна активност и лоша прогноза. Мутациите в кодиращия тирозин киназен домейн варират от 9.4% до 40% в различните раси и популации. Статията е литературен обзор, обхващащ епидемиологията, мутациите в НДКБК, анализ на генната фамилия и честотата им в различните раси и региони. Напредъкът в таргетната терапия с тирозин киназни инхибитори налага прецизиране на туморните субтипове, имунохистохимичен и генетичен анализ. Разглеждат се и нови алгоритми в диагностичната практика на патолога по отношение на белодробните карциноми, съобразени с обновената патологоанатомична класификация и мултидисциплинарната класификация на аденокарциномите.</p> <p>НДКБК, EGFR/KRAS мутации, тирозинкиназни инхибитори, класификация</p> <p><i>Д-р Силвия Генова, Катедра „Обща и клинична патоанатомия и съдебна медицина“, Медицински университет, бул. „В. Априлов“ № 15А, 4002 Пловдив, тел. 0887 198 557, сл. 032 602 444, e-mail: sylvia_genova@abv.bg</i></p>
<p>Summary:</p>	<p>Non-small cell lung cancers (NSCLC) constitute approximately 80% of all morphological types of lung cancers. The histological subtype appears to be a major determinant of survival and subsequent therapy. The receptor for epidermal growth factor (EGFR) is expressed in normal human cells to a much lower level, while metaplastic bronchial epithelial and human tumors often express high levels of epidermal growth factor and his receptors. The</p>

<p>Key words:</p> <p>Address for correspondence:</p>	<p>overexpression of EGFR has been observed in 40-80% of NSCLC and has been associated with tumor aggression, high proliferative activity and a poor prognosis. Mutations in the tyrosine kinase domain coding range from 9.4% to 40% in different populations and races. The article covers the epidemiology, mutations in NSCLC, analysis of gene family and their frequency in different races and regions. Advances in the target therapy with tyrosine kinase inhibitors require accurate histologic subtyping, immunohistochemistry and genetic analysis. We also reviewed the new diagnostic algorithms for lung cancer, which comply with the revised pathological classification and multidisciplinary classification of adenocarcinomas.</p> <p>NSCLC, EGFR/KRAS mutations, TKI, classification</p> <p><i>Silvia Genova, M. D., Department of General and Clinical Pathology and Forensic Medicine, 15A, V. Aprilov Blvd., Bg – 4002 Plovdiv, tel. +359 887 198 557, +359 32 602 444, e-mail: sylvia_genova@abv.bg</i></p>
--	--

Увод

Белодробните карциноми са едни от най-често срещаните карциноми и имат водеща роля в смъртността на редица страни, като 5-годишната преживяемост е по-малка от 15% [23]. В публикация от 2011 г. Global Cancer Statistics установява тенденция за нарастване броя на белодробните карциноми в развитите и развиващите се страни, като 56% от тях са в развитите страни. Причините за това се коренят в канцерасоцирания начин на живот – тютюнопушене, намалена физическа активност и нерационално хранене – „westernized diet” [24].

ЕПИДЕМИОЛОГИЯ

С 12.7 млн. случая на доказани белодробни карциноми и 7.6 млн. смъртност за година белодробните карциноми заемат първо място при мъжете както в развитите така и в развиващите се страни. Те съставляват 13% от общия брой регистрирани карциноми и 18% от смъртността. При жените заемат 4-то място, но са на второ място като причина за смъртност [24]. Мъжкият пол е по-засегнатият и в Източна, и в Западна Европа, както и в Северна Америка, Микронезия, Полинезия, Източна Азия, докато най-ниска е честотата в Африка. В САЩ всяка година се откриват 221 130 нови случая, а 156 940 умират от белодробен карцином (по статистика за 2011 г.) [9]. При жените висока заболяемост от белодробен карцином е регистрирана в Северна Америка, Северна Европа, Австралия. Смущаващо е процентното увеличаване на белодробните тумори при женския пол в Китай – 21.3 случая на 100 000 в сравнение със страни като Германия (16.4) и Италия (11.4), където делът на възрастните пушачки е висок – около 20%. Високата честота на белодробни карциноми в азиатския регион се свързва с отделяния пушек

от все още използваните за готвене печки на въглища. Вредно въздействие от околната среда оказват и карциногени като азбест, арсеник, радон и полициклични ароматни хидрокарбони [24].

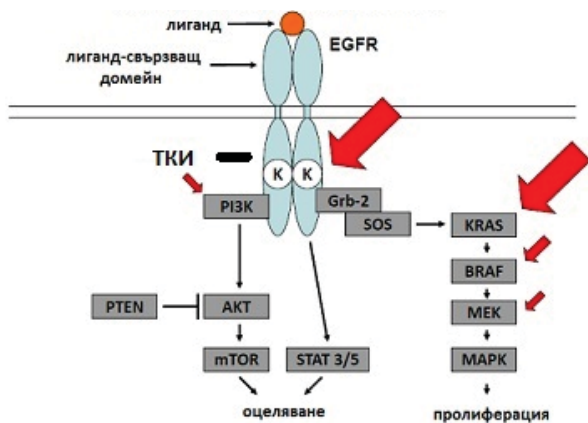
В последните години смъртността от белодробен карцином при мъжете има тенденция да намалява в страните от Европа, Северна Америка и Австралия, където тютюневата епидемия беше в апогея си в средата на миналия век. Увеличава се честотата на белодробния карцином в Китай, други азиатски страни и Африка, където епидемията от тютюнопушене е обхванала страните сравнително отскоро [24].

НДКБК – ГЕНИ И ГЕНОМ. МУТАЦИИ В НДКБК. АНАЛИЗ НА ЦЯЛАТА ГЕННА ФАМИЛИЯ

Съществуват три главни хистологични типа белодробен карцином – плоскоклетъчен, аденокарцином и дребноклетъчен недиференциран. Плоскоклетъчният и аденокарциномът, означавани още като НДКБК, съставляват около 80% от видовете белодробен рак [23]. Класификацията се основава на хистологичния им строеж, като при различните видове рак терапевтичният подход е различен. Напредъкът на генетиката в последните години освен с разширяване на теоретичното познание е предпоставка чрез възможностите на фармацевтичната промишленост да се произвеждат медикаменти, ограничаващи развитието на някои видове тумори. Сред тях са и НДКБК. Медикаментозният ефект при тях е осъществим чрез блокиране на звено, което ограничава растежа на туморните клетки. Такъв е рецепторът за епидермалния растежен фактор – EGFR. Свърхекспресия на EGFR се наблюдава в 40-80% от НДКБК и се свързва с агресивност на тумора, висока пролиферативна активност и лоша прогноза [8]. Блокирането е въз-

можно с помощта на медикаменти, наречени тирозинкиназни инхибитори (ТКИ).

Епидермалният растежен фактор (EGF) се експресира в нормалните човешки клетки в значително по-ниски нива, докато метапластичният бронхиален епител и човешките тумори често експресират високи нива на епидермален растежен фактор и неговите рецептори [12]. Тирозин-киназният рецептор на erbB фамилията включва четири близки рецептора: EGFR/HER1, c-erbB2/HER2, c-erbB3/HER3, c-erbB4/HER4 [13]. Всички рецептори имат общ екстрацелуларен лиганд-свързващ домейн, който притежава място за свързване с аденозин-трифосфатазата и проявява тирозин-киназна активност. При свързване на лиганда с EGF рецепторът се активира, осъществява се хомо- или хетеродимеризация, която от своя страна води до активиране на вътрешната тирозин-киназна активност с последваща автофосфорилация на тирозиназните остатъци. Последните активират сигналните пътища, предаващи стимулация към ядрото. Доказани са мутации на протеиново ниво в много от сигналните пътища на RAS/RAF/MEK/MAP киназните сигнали. Мутациите водят до оцеляване на клетката, пролиферация, ангиогенеза, инвазия и метастазиране на туморните клетки [13] (фиг. 1).



Фиг. 1. Мутация на EGFR рецептора в белодробни аденокарциноми

Проучванията показват, че серин/киназната система BRAF най-често мутира в човешките неоплазми, включително и в малигнения меланом (66%), но по-слабо в белодробните тумори (2% от първичните аденокарциноми). В скорошни разработки са открити и нови, над 1000 соматични мутации след ДНК секвениране на 623 гена със суспектна неопластична активност. Идентифицирани са 26 гена със сигнификантно висок мутагенен индекс вероятно играещи роля

при туморогенезата. Други често мутирани гени, включващи тирозин киназният път са EGFR homolog ERBB4 и Multiple Ephrin Receptor genes – EPHA3, VEGFR2 (KDR), NTKR. Проучванията върху белодробния карцином документират няколко генни вариации на EGFR, BRAF, KRAS, MET, LKBI, PIK3CA [9].

Аномалиите в EGFR при НДКБК включват свръхекспресия, амплификация и миссенс мутации, като най-често възникват в кодиращия тирозин-киназен домейн (екзони 18-21). Мутации, чувствителни към ТКИ, възникват в екзони 18-21 на епидермалния растежен фактор [3, 9]. Мутациите, възникващи най-често, са делеции (с различна големина) в екзон 19, както и точковите мутации L858R и L861Q в екзон 21, и двете чувствителни на ТКИ. Мутациите в екзон 19 показва някои особености при пациентите. Те се срещат обикновено при жени, непущещи или пушещи по-малко, а хистологичният вид е аденокарцином.

Наскоро бе открита фузия между два гена като пусков механизъм в онкогенезата. Представява свързващ протеин между N-терминалната част на Echinoderm microtubule-associated protein like 4 (EML4) protein и вътрешния регион от anaplastic lymphoma kinase (ALK) tyrosine kinase receptor (2p23) гените, които нормално се намират на разстояние един от друг. Транслокацията събира двата гена и предизвиква конструктивна активация на киназата.

Този фузионен ген е бил изолиран в малка група пациенти с НДКБК. Проучването е върху 208 пациенти от азиатски произход, като позитивни са били 7 – 3.37%. В същото проучване са изследвани и мутациите на EGFR и KRAS. Мутации в EGF рецептора се наблюдават при 51 случая – 24.5% от 208, като най-голям процент са в екзоните 19 и 21 (90.19%; 46/51). Най-чести са при жени 47.5% срещу 15.0% при мъже; непущачи 42.3% срещу 13.9% пушачи; аденокарциноми 44.2% срещу 8.0% не-аденокарциноми (Ying Li et al., 2013) [23]. KRAS мутации са установени само в 6 случая (2.88%, 6/208). Не е намерена връзка между KRAS мутациите и възрастта, клиничния стадий, пола, хистологичния вид, тютюнопушенето, туморната локализация или наличието на метастази в това проучване [23].

Счита се, че EGFR мутациите са характерни за недребноклетъчните белодробни аденокарциноми и не са свързани с тютюнопушенето. A. Marchetti et al. (2005) [15]. правят проучване върху голяма серия – 860 НДКБК, като ги изследват за EGFR и KRAS мутации. Всички сквамозни карциноми (454 на брой и 31 едроклетъчни карциноми) са били отрицателни за EGFR и KRAS мутации. Позитивни за EGFR са били 39 от 375 аденокар-

циноми (10%). Преобладаващо лепидичният (БАК) тип белодробни аденокарциноми са били позитивни за EGFR мутации – 26% от 86 БАК. Непушачите са показали мутации в 23 тумора от 39 (59%), сравнено с 41% при пушачи (16/39). KRAS мутации са отчетени в 32% (108/375) от аденокарциномите, различни от тези с мутации в EGFR [15].

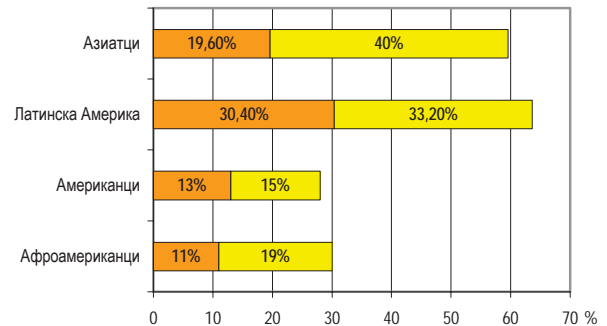
В скорошно скринингово проучване на N. Rekhtman et al. от 2011 г. [16] върху 95 плоскоклетъчни карцинома за EGFR и KRAS мутации всичките са дали отрицателен резултат и ниска честота на PIK3CA (4%) и AKT1 (1%). Рекласифицирани са 16 случая, от които 10 са с положителна мутация за EGFR, включваща делеция в ехон 19 (7 бр.) и L858R (3 бр.), а 6 случая са позитивни за KRAS мутации. Във всичките 16 е намерен glandуларен компонент, а недиференцираните са дали TTF-1+/p63- резултат, като са били рекласифицирани като аденосквамозни карциноми и нискодиференцирани солидни аденокарциноми със „сквамоиден“ вид [16].

РАСОВИ РАЗЛИЧИЯ И МУТАЦИОННА ЧЕСТОТА В НДКБК

Честотата на EGFR мутациите е различна в различните популации и раси. Така например в азиатската популация тя е 30%, докато при бялата раса – 7%. В други проучвания честотата сред азиатския етнос варира от 19.6 до 40%. Сред непушачите процентът се колебае между 48 и 75.3%. Интересен е фактът, че KRAS мутациите се установяват много по-рядко при азиатската раса (2-8%), сравнено със Западните страни (12-25%) [10]. Точковите мутации при KRAS са налице при около 30% от пациентите с НДКБК и играят роля за пролиферацията и оцеляването на туморната клетка.

В епидемиологично проучване в САЩ за периода 2000-2008 г. делът на афроамериканците, заболели от белодробен карцином, е 75.2 на 100 000, а за белите – 64.9 на 100 000. EGFR мутациите в различни проучвания варират от 11 до 19% при афроамериканците и 13-15% при белите американци. В две скорошни проучвания в Латинска Америка честотата на EGFR мутациите е сигнификантно по-висока – достига 30.4 до 33.2% [10] (фиг. 2).

В проучване на Sun et al. [18] в Корея (2012 г.) върху 382 резецирани материала на белодробни аденокарциноми EGFR мутациите се установяват в 51.3%. И макар че делът на жените и непушачите е висок (65.7 и 63.4%), значително висок е делът и на мъжете пушачи с аденокарцином (34.3 и 29.7%).



Фиг. 2. Расови различия на EGFR мутационната честота в различни проучвания (по El-Telbany) [10]

У нас в две големи проспективни проучвания на Д. Дамянов и съавт. от 2012 г. [1] и 2013 г. [2] върху 481 и 773 пациенти с НДКБК е установена честота на EGFR мутациите в 9.4%, като жените са били двойно повече от мъжете. Преобладават и болните, които никога не са пушили или са бивши пушачи (39.7/33.3%) спрямо активните пушачи (27.0%), което съвпада с данните от литературата. Интересен е фактът, че проучването установява висока честота на плоскоклетъчните карциноми с позитивна EGFR мутациите – 33.9%, спрямо аденокарциномите – 59.7%.

СРАВНИТЕЛНА ХАРАКТЕРИСТИКА НА EGFR И KRAS МУТАЦИИТЕ В НДКБК

Двата конвенционални мутирани онкогена в белодробния карцином са EGFR и KRAS. Тези две мутации са взаимноизключващи се, независими една от друга и не се срещат в един и същи тумор [16, 23]. Счита се, че EGFR и KRAS мутациите са характерни за белодробните аденокарциноми, като тази честота варира за различните хистологични подтипове. KRAS мутациите не са характерни за плоскоклетъчните карциноми, но присъстват почти в 15-25% от белодробните аденокарциноми [9]. Някои недребноклетъчни белодробни карциноми притежават единичен, специфичен мутирал онкоген, който има характеристиката на пусков генетичен механизъм в онкогенезата. Мутациите в EGFR киназния домейн бяха идентифицирани сравнително наскоро, но вече са познати в клиниката като ясен предиктор в повишената чувствителност към EGFR киназните инхибитори (Gefitinib, Erlotinib). За разлика от последните KRAS мутациите са установени в НДКБК преди 20 години, но ние тепърва започваме да разбираме клиничното значение на KRAS гена за туморния статус. RAS гените, като много други онкогени, се откриват при изучаването на ретровируси, причиняващи карциноми у живот-

ните. RAS свързаните проучвания стартират през 60-те години на XX в., когато изследователите забелязали, че съхранените вируси, причиняващи левкемия по мишките, взети от левкемична линия плъхове, индуцират саркоми при зайците. Подобни ретровируси са открити през 1967 г., чрез сериен пасаж на вируси, причиняващи левкемия по мишките през плъхове. Тези два плъши саркома RAS индуциращи ретровируси са наречени от изследователите Harvey and Kristen. През 1982 г. много групи учени съобщават за молекулярно клониране на трансформирани гени от човешка ракова линия. Оказало се, че тези човешки гени са хомоложни с плъшите линии Harvey (Ha- or H-) ras и Kristen (Ki- or K-) ras [25]. Друга RAS фамилия гени, невробластома или N-ras, са били открити година по-късно. Днес знаем, че RAS гените представляват 21 kd гуанозин трифосфатаза-свързан протеин, който се включва в действие от активния EGFR. KRAS регулира клетъчния растеж, диференциация и апоптоза, като взаимодейства с много ефектори, включващи този при MAPK (митоген активираща протеин киназа), STAT (signal transducer and activator of transcription), and PI3K (phosphoinositide 3-kinase) сигнална каскада.

Пациентите с мутирал KRAS ген подлежат на лечение с адювантна химиотерапия и не са податливи на терапия чрез EGFR инхибитори [25]. Така излиза необходимостта от проучвания и на KRAS мутациите в НДКБК, тъй като те са свързани с лоша прогноза и са предиктивни маркери за липсващ лечебен ефект от химиотерапия [23].

Откакто се установи, че KRAS мутациите са характерни за НДКБК, а тютюнопушенето е честа причина за НДКБК, широко се дискутира тяхната директна връзка и прякото действие на тютюневия дим. W. Pao et al. считат че EGFR мутациите се срещат по-често в тумори при пациенти, които никога не са пушили [26], докато KRAS мутациите присъстват в тези със сигнификантна експозиция на тютюнев дим [27]. Оказало се обаче, че в анализирания случаи с KRAS мутации липсват или са оскъдни данните от пациентите за предшестваща употреба на цигари (интензитет на тютюнопушене, продължителност) и повечето публикации са върху малък брой непущачи с НДКБК (по дефиниция индивиди, изпушили под 100 цигари през живота). Докато EGFR мутациите се срещат по-често при непущачи, то KRAS мутациите не може да се предскажат на базата само на предшестващо тютюнопушене.

EGFR и KRAS МУТАЦИИТЕ В НДКБК И ЕРАТА НА ТКИ

Досега строгото разграничаване на белодробните аденокарциноми от плоскоклетъчните не беше от съществено значение за клиниката, тъй като липсваха различия в терапията на белодробните тумори. Напредъкът в таргетната терапия с ТКИ налага прецизиране на туморните субтипове и точна класификация на карциномите. Тирозин-киназните инхибитори действат, като индуцират апоптоза в туморните клетки с мутации в епидермалния растежен фактор и предизвикват драматичен отговор при лечение на пациенти с НДКБК. Като се използва мутационният профил на туморната ДНК на пациента и се прилага таргетна терапия, се демонстрира, че соматичните мутации в тирозин-киназния домейн на EGFR се асоциират с чувствителност към Gefitinib и Erlotinib, докато мутациите в KRAS, които кодират GTP-азата са асоциирани с първична резистентност [15].

Платин-базираната химиотерапия е основен избор при лечението на авансиралите НДКБК. Освен че имат много странични ефекти, лъче- и химиотерапията също не са специфични в терапията на белодробните карциноми. Като цяло смъртността е много висока при прилаганите стандартни схеми на терапия. Напредъкът в областта на мутационния анализ и молекулярната таргетна терапия правят възможно създаването на нови рецептор-киназни инхибитори. Мутационният анализ се премести от анализ на единични гени през анализ на цяла фамилия гени, до следваща генерация глобален геном секвенционен анализ, включващ секвениране на целия раков геном, екзон, транскриптом или епигеном (Next Generation Sequencing Analysis) [23].

Лекарствата, които са таргетни към EGFR, се разделят на няколко групи – EGFR (HER1, ERBB1 блокери):

1. Тирозин-киназни инхибитори: Small-molecule EGFR – TKI (Gefitinib и Erlotinib).
2. Моноклонално анти тяло срещу рецептор на епидермалния растежен фактор – EGFR antibody (Cetuximab).
3. ALK инхибитор: срещу анапластична лимфом киназа (Crizotinib).
4. Моноклонално анти тяло срещу васкуларен, ендотелен, растежен фактор VEGF (Bevacizumab).

През 2009 г. IRESSA Pan-Asian Study публикува сравнителни резултати на пациенти, лекувани с Gefitinib и Carboplatin-Paclitaxel. Групата, лекувана с Gefitinib, има 12-месечна ремисия на 24% от пациентите, сравнена с групата, лекувана с химио-

терапия – 6.7%. Това оправдава лечението с ТКИ като първа линия терапия при белодробни аденокарциноми с EGFR мутации. Трябва да се отбележи, че пациентите без EGFR мутации, подложени на терапия с ТКИ, имат по-ниска преживяемост и по-лоша прогноза [10].

Д. Дамянов и съавт. също отчитат 2 пълни (6.9%) и 11 частични ремисии (37.9%), с честота на обективното повлияване 44.8%. Свободната от прогресия преживяемост през първата година от терапията с ТКИ е била 20.3%, спрямо 5% при болните на химиотерапия [2]. Тези клинични проучвания, проведени за първи път в България, потвърждават необходимостта от прилагане на ТКИ като първа и последващи линии лечение при пациенти с EGFR мутации.

В хода на проведените терапии се установило, че мутационният статус варира между основния тумор и неговите метастази. Проучванията сочат, че тази дискордантност е между 16.2 и 32.5% [11]. Независимо от изключителната ефективност на Gefitinib и Erlotinib се дискутират и възможностите за вторично развита резистентност на туморните клетки към ТКИ чрез вторична мутация в T790M (50%), MET амплификация (20%) и чрез HGF (хепатоцитния растежен фактор) [3, 7, 17]. Данните показват, че 22% от НДКБК с придобита резистентност към ТКИ имат MET амплификация. Това налага едновременната инхибиция на EGFR и MET мутациите, за да бъдат повлияни и резистентните клетъчни клонове [7]. В проучване на Mascoux et al. (2011) [14] вторичната резистентност към EGFR ТКИ достига високи стойности от порядъка на 58-84%. Тези мутации възникват в хода на лечение с ТКИ, като различни мутации могат да се проявят при един и същи болен в различни популации туморни клетки, както и в различни метастатични огнища, което налага повторни биопсихни изследвания [11]. Разработват се и неинвазивни PCR базирани методи в плазмата за установяване на вторични мутации, но тестовете все още са в процес на верификация с оглед повишаване чувствителността на метода [5]. Какво е средното време за развитие на резистентност на туморната клетка все още не е известно. У нас експериментални проучвания върху вторично придобита резистентност на EGFR мутиралите клетки се провежда върху ксенотрансплантирани мишки от А. Консулова и съавт. [3, 7].

ЗНАЧЕНИЕТО НА ХИСТОЛОГИЧНИЯ ВИД ПРИ НДКБК

В миналото единственото важно за лечение-то разграничаване на белодробните карциноми беше дали са дребноклетъчни или недребно-

клетъчни. Мнозинството от карциномите на белия дроб са недребноклетъчни и има сериозни доказателства, че различните подтипове имат отделни епидемиологични, клинични, биологични, патологични и молекулярни характеристики. Появата на нови таргетни терапии и клинични проучвания, показващи различната ефикасност на лекарствата и токсичността при лечение в зависимост от специфичните хистологични подтипове на НДКБК, води до все по-голяма необходимост от конкретна и изчерпателна патохистологична диагноза. Хистологичното типизиране има решаваща роля за становището на клиничното решение и е важно за ефекта от терапията при пациента [28].

Редица клинични проучвания напълно промениха подхода на патолозите към диагнозата „рак на белия дроб“. Разграничаването на НДКБК подтипове сега категорично определя клиничното поведение. Какви са основните терапевтични принципи днес?

Стандартната химиотерапия на НДКБК отрицателни на EGFR мутации е платин-базирана терапия, комбинирана с цитостатици от трета генерация. При неплоскоклетъчни недребноклетъчни белодробни карциноми и липса на противопоказания се препоръчва добавяне на bevacizumab (моноклонално антитяло срещу съдовоендотелен растежен фактор). Пациентите с ПКБК не получават bevacizumab, който в 30% дава фатални белодробни хеморагии. Антифолатните агенти са по-ефикасни при неплоскоклетъчните карциноми [9]. Тези данни показват, че хистологичното типизиране на НДКБК е предиктор за селекция на пациентите с оглед прогностичните фактори за преживяемостта и последващата терапия.

От повечето проучвания се вижда, че EGFR и KRAS мутациите се срещат преобладаващо в белодробните аденокарциноми. Остава открит въпросът за малкото на брой мутирала EGFR и KRAS „сквамозни“ карциноми, при които не е използвано имунотипизиране и при едно последващо изследване може би биха били рекласифицирани като аденосквамозни или нискодиференцирани аденокарциноми [19]. Ние също имахме няколко подобни случая, които са обект на следваща публикация. Обект на проучване са и методите за обработка на материалите, продължителност на фиксация, позитивност на рецепторите в парафиновите проби след определен период на съхранение на материала и т.н. [8]. Всичко това може да доведе до фалшиво негативни резултати при мутационния анализ. Необходимостта от стандартизиране на процедурата при обработка на материалите е все по-голяма отговорност на патолога.

**ОПТИМАЛНО-МИНИМАЛЕН ВАРИАНТ
ЗА ОПРЕДЕЛЯНЕ НА ХИСТОЛОГИЧНИЯ ТИП
НА НДКБК (АДЕНОКАРЦИНОМИ – АК,
ИЛИ ПЛОСКОКЛЕТЪЧНИ БЕЛОДРОБНИ
КАРЦИНОМИ – ПКБК)**

Оптималният имунохистохимичен панел за белодробните аденокарциноми е CK7, TTF1 и Napsin A. Тези маркери позитивират пневмоцитите и туморните клетки в 75-80%. Това диференцира първичните белодробни АК от метастатичните карциноми на дебело черво и гърда. Допълнителната оцветка за муцин с PAS и PAS контрола подпомага диагнозата. P63, CK 5/6 и CK34βE12 са строго информативни за плоскоклетъчния БК [9, 19].

На следващ етап е мутационният анализ на базата на парафинови блокчета от резекционен, белодробен, туморен материал. Много често обаче пациентите са в IIIB и IV клиничен стадий и не подлежат на хирургична интервенция. При тях ДНК анализ се извършва на малки материали – ЩБ (щипкови биопсии от бронхи или плевра) (табл. 1).

През 2011 г. бе публикувана ревизирана Класификация на резецираните белодробни карциноми за патолози с участието на специалисти от IASLC/American Thoracic Society/European Respiratory Society Classification [20, 21] за НДКБК, като са дадени и конкретни препоръки към патолозите и стандартизирани диагностични критерии за практиката:

1. Терминът бронхиоло-алвеоларен аденокарцином (БАК) се препоръчва да отпадне.

2. За малки (под ≤ 3 cm) солитарни аденокарциноми с чист лепидичен (алвеоларен) растеж, се препоръчва терминът *аденокарцином in situ*, за да разграничи пациентите с потенциално 100% оздравяване, при условие за пълна резекция на тумора.

3. За малките (под ≤ 3 cm) солитарни, аденокарциноми с предимно лепидичен (алвеоларен) растеж и малки фокуси на инвазия под ≤ 0.5 cm, се препоръчва нова концепция от *минимално инвазивен аденокарцином (МИА)*.

4. За инвазивните аденокарциноми се предлага хистологично типизиране на преобладаващия вариант, като бъде споменат и процентът на останалите подтипове.

5. Въпреки че повечето аденокарциноми са представени от повече от един хистологичен подтип, се препоръчва *терминът смесен хистологичен тип да отпадне* и да се вписва преобладаващия хистологичен вариант.

6. Препоръчва се муцинозният аденокарцином да се отдели от останалите видове самостоятелно и да се класифицират като муцинозен АИС, муцинозен МИА, инвазивен муцинозен аденокарцином.

7. *Едроклетъчен белодробен карцином* следва да отпадне, за да не се бърка с варианта на НЕ (невроендокринен карцином). Освен това няма патологични критерии за тази диагноза и не е ясно как да се диференцира от неплюскоклетъчния карцином – недиференциран вариант. Диагнозата следва да отпадне и от малките и щипкови биопсии.

8. За малките – ЩБ се препоръчва при НДКБК да се типизира дали е АК или ПКК, доколкото това е възможно.

9. Препоръчва се терминът НДКБК – недиференциран вариант, да се използва колкото е възможно по-рядко.

10. Не се препоръчва да се определя степента на инвазия по малки биопсии. АКИС и МИАК е уместно да се определя само на резекционен материал.

Таблица 1. Хистологични подтипове на АК на белия дроб, имунохистохимия и молекулярен анализ (по William D. Travis) [21]

Хистологични подтипове на АК на белия дроб, TTF-1 и EGFR мутационен анализ		
Хистологични подтипове	ИХХ	Молекулярен анализ
Немуцинозен АК in situ или МИА	TTF-1+ (100%)	EGFR 10-30% непущачи KRAS 10-30% пушачи
Инвазивни немучинозен алвеоларен тип	TTF-1+ (100%)	EGFR 10-30% непущачи KRAS 10% пушачи
Папиларен	TTF-1+ (90-100%)	EGFR 10-30% KRAS 3% пушачи
Ацинарен	TTF-1+ или -(%?)	EGFR < 10% непущачи KRAS 20% пушачи
Солиден	TTF-1+ (70%)	EGFR 10-30% непущачи KRAS 10-30% пушачи
Инвазивен муцинозен аденокарцином	TTF-1+ (0-33%)	EGFR – ? KRAS 80-100% пушачи

ПРЕИНВАЗИВНИ ЛЕЗИИ

Атипичната аденоматозна хиперплазия е локализирана, малка **под ≤ 0.5 cm** лезия с минимална или умерена атипична пролиферация на тип II пневмоцити и/или клетки на Клара, постилащи алвеоларните стени и понякога респираторните бронхиоли, като подлежащите алвеоли не са нарушени. Не се препоръчва използване на степениране, добре или умерено диференцирана лезия. В категориите на преинвазивните лезии ААХ е съпоставима със сквамозната дисплазия, а АИС с плоскоклетъчния карцином *in situ*.

АИС, НЕМУЦИНОЗЕН ИЛИ МУЦИНОЗЕН

АИС представлява малка локализирана лезия (**под ≤ 3 cm**), с пролиферация на неопластични клетки по съществуващите алвеоларни стени без стромална, васкуларна или плеврална инвазия. Клетките при муцинозния вариант понякога наподобяват чашковидните клетки. В повечето случаи те са източени, с базално ядро и муцин в цитоплазмата. Малките лезии предполагат преживяемост 100% при цялостна резекция на тумора. Муцинозните аденокарциноми показват строга корелация с KRAS мутациите, докато немучинозните са асоциирани по-скоро с EGFR мутации и в редки случаи с KRAS [21].

МИА, НЕМУЦИНОЗЕН ИЛИ/И МУЦИНОЗЕН

МИА представлява малък, солитарен аденокарцином (**под ≤ 3 cm**), с предимно алвеоларен растеж и **под ≤ 0.5 cm** инвазия в най-големия участък.

ИНВАЗИВЕН АДЕНОКАРЦИНОМ

Този карцином се установява в 70-90% от резецирания материал. За да се приеме, че е инвазивен аденокарциномът, трябва да се отчете инвазия **над > 5 mm** в най-големия си размер и да отговаря на следните критерии: **1. Хистологичен подтип, различен от лепидичния (алвеоларния) растеж (ацинарен, папиларен, солиден). 2. Миофибробластна строма, асоциирана с инвазия на туморни клетки. 3. Инвазия в лимфни съдове, кръвоносни съдове или плевра. 4. Туморни некрози.**

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Диференцирането на аденокарциномите от ПКБК е важно с оглед прогностичните фактори за преживяемостта на пациентите и избора на терапия.

2. Необходимостта от мутационен анализ и антитялобазирана терапия предполага все по-нарастващата зависимост на патолозите от фармакодиагностичните методи, използване на стандартни процедури и разработване на протоколи за фиксация, обработка, имунохистохимично изследване и оптимизиране на диагностиката на белодробните тумори.

3. За доказване на аденокарциномите най-честата оптимална комбинация е CK7, Napsin A, TTF1, като последният е специфичен за пневмоцити тип II и за клетките на Клара в 90%, а за ПКБК специфичен е нискомолекулен СК 5/6 в 75-100%. P63 е позитивен от 70 до 100% в плоскоклетъчните карциноми.

4. Класификацията на СЗО от 2004 г. се базира на факта, че повечето аденокарциноми имат „смесен“ хистологичен тип, който трябва да се вписва в окончателната диагноза, докато последната ревизия на IASLC/ATS/ERS от 2011 г. препоръчва да се вписва само преобладаващият вариант.

5. Повторните биопсии в хода на терапията са необходими с оглед изключване на вторична резистентност към тирозин-киназните инхибитори.

Библиография

1. Д а м я н о в , Д., К. Койнов, Е. Насева и Ст. Бичев. Честота на активиращите EGFR мутации при болни с недребноклетъчен рак на белите дробове в България и лечение с Gefitinib. – Списание бълг. онкол. дружество, **9**, 2013, № 1, 28-32.
2. Д а м я н о в , Д. Gefitinib в лечението на недребноклетъчния рак на белия дроб при пациенти с положителен EGFR мутационен статус. – Списание бълг. онкол. дружество, **8**, 2012, № 1, 4-8.
3. К о н с у л о в а , А., Ив. Донеv, Н. Цонев, Е. Димитрова и сътр. Механизми на придобитата резистентност към тирозин-киназни инхибитори на епидермален растежен фактор при недребноклетъчен белодробен карцином: обзор на проблема със собствен принос. – Списание бълг. онкол. дружество, **8**, 2012, № 1, 31-36.
4. К о н с у л о в а , А., И. Донеv и Д. Калнев. Блокиране на рецепторите за епидермален растежен фактор с Gefitinib (Iressa) при пациенти с недребноклетъчен белодробен карцином – сигнален път, индикации и вторична резистентност. – Торакална мед., **3**, 2012, № 4, 16-27.
5. Ч е р н е в а Р., О. Георгиев, Д. Петрова и Д. Тончева. Експресия на EGFR и hTERT като маркери за диагноза на недребноклетъчен белодробен карцином – сигнален път, индикации и вторична резистентност. – Торакална мед., **2**, 2010, № 1, 24-30.
6. Г е о р г и е в , О. Б., Д. Петрова и Р. Чернева. Клинико-морфологични аспекти на молекулярно-генетичните нарушения на епидермалния растежен фактор при недребноклетъчен белодробен карцином. – Медицинска мисъл, **3**, 2006, 9-14.
7. Щ е р е в , И., А. Консулова, Н. Цонев и Д. Калев. Механизми на придобитата резистентност към тирозин-киназни инхибитори на рецептора на епидермалния растежен фактор при недребноклетъчния белодробен кар-

- цином: обзор на проблема със собствен опит. – Сърце-бял дроб, 16, 2010, № 1-2, 3-14.
8. Atkins, D. et al. 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., 52, 2004, № 7, 893-901.
 9. Drilon, A. et al. Squamous-cell carcinomas of the lung: emerging biology, controversies, and the promise of targeted therapy. – Lancet Oncol., 13, 2012, e418-26.
 10. El-Telbany, A. et C. M. Patrick. Cancer genes in lung cancer: Racial disparities: Are there any? – Genes. Cancer, 3, 2012, № 7-8, 467-480.
 11. Kitamura, A. et al. Immunohistochemical detection of EGFR mutation using mutation-specific antibodies in lung cancer. – Clin. Cancer Res., 16, 2010, 3349-3355.
 12. Kurie, J. M. et al. Increased epidermal growth factor receptor expression in metaplastic bronchial epithelium. – Clin. Cancer Res., 2, 1996, 1787-1793.
 13. Li, A. R. et al. EGFR mutations in lung adenocarcinomas. Clinical testing experience and relationship to EGFR gene copy number and immunohistochemical expression. – J. Mol. Diag., 10, 2008, 242-248.
 14. Mascoux, C. et al. EGFR protein expression in non-small cell lung cancer predicts response to an EGFR tyrosine kinase inhibitor-A novel antibody for immunohistochemistry or AQUA technology. – Clin. Cancer Res., 17, 2011, № 24, 7796-7807.
 15. Marchetti, A. et al. EGFR mutations in Non-Small-Cell Lung cancer: Analysis of large series of cases and development of a rapid and sensitive method for diagnostic screening with potential implications on pharmacologic treatment. – J. Clin. Oncol., 23, 2005, 857-865.
 16. Rehtmán, N. et al. Clarifying the spectrum of driver oncogene mutations in biomarker-verified squamous carcinoma of lung: lack of EGFR/KRAS and presence of PIK3CA/AKT1 mutations. – Clin. Cancer Res., 18, 2012, № 4, 116-176.
 17. Soría, J. C. et al. EGFR-mutated oncogene-addicted non-small cell lung cancer: Current trends and future prospects. – Cancer Treat. Rev., 38, 2012, 416-430.
 18. Sun, P. L. et al. High incidens of EGFR mutations in Korean men smokers with no intratumoral heterogeneity of lung adenocarcinomas. Correlation with histologic subtypes, EGFR/TTF-1 expressions and clinical features. – J. Thor. Oncol., 7, 2012, № 2, 323-330.
 19. Thunnissen, E. et al. Correlation of immunohistochemical staining p63 and TTF-1 with EGFR and K-ras mutational spectrum and diagnostic reproducibility in non small cell lung carcinoma. – Virchows Arch., 461, 2012, 62-38.
 20. Travis, W. D. et al. International Assotiation for the study of Lung Cancer/American Thoracic Society International Multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma. – J. Thor. Oncol., 6, 2011, № 2, 244-285.
 21. Travis, W. D. et al. Diagnosis of lung adenocarcinoma in resected specimens. Implication of 2011 international association for the study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society Classification. – Arch. Pathol. Lab. Med., 136, 2012, 1-23.
 22. Yamaguchi, F. et al. Analysis of EGFR, KRAS and p53 mutations in lung cancer using cell in the curette lavage fluid obtained by bronchoscopy. – Lung Cancer, 78, 2012, 201-206.
 23. Ying, Li et al. Clinical significance of EML4-ALK fusion gene and association with EGFR and KRAS gene mutations in 208 Chinese patients with non-small cell lung cancer. – PLoS One, 8, 2013, № 1, e52093.
 24. Jemal, A. et al. Global Cancer Statistics. – CA Cancer J. Clin., 61, 2011, 69-90.
 25. Riely, G. J., J. Marks et W. Pao. KRAS mutations in non-small cell lung cancer. – Proc. Am. Thorac. Soc., 6, 2009, 201-205.
 26. Pao, W. et al. EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from “never smokers” and are associated with sensitivity of tumors to gefinitib and erlotinib. – Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 101, 2004, 13306-13311.
 27. Pao, W. et al. KRAS mutations and primary resistance of lung adenocarcinomas to gefinitib or erlotinib. – PLoS Med., 2, 2005, e17.
 28. Cooper, W. A. et al. What's new in non-small cell lung cancer for pathologists: the importance of accurate subtyping, EGFR mutations and ALK rearrangements. – Pathology, 43, 2011, № 2, 103-115.

Постъпил за печат на 28 януари 2014 г.

ОФЕРТИ ЗА РЕКЛАМНО УЧАСТИЕ В ИЗДАНИЯТА НА ЦМБ:

1. Отпечатване на многоцветна рекламна страница:

- на корица – 720 лв.;
- в книжното тяло – 600 лв.

2. Отпечатване на черно-бяла реклама и/или текст за 1 страница – 150 лв.

3. Разпространение на готова вложка със списание – 1.00 лв./брой.

При отпечатване на повече от една реклама се правят отстъпки по договаряне.

По желание на рекламодателя многоцветните реклами могат да бъдат придружени от безплатно отпечатване на 1 страница текст след съгласуване на съдържанието му с редколегията.

Всеки рекламодател получава книжки от списанието.