

A tüdőrák molekuláris patológiai vizsgálatának feltételei

Tímár József

Semmelweis Egyetem, 2. Sz. Patológiai Intézet, Budapest

A tüdőrák korszerű diagnosztikája szempontjából kulcskérdés a mintavételi eljárás és annak eredményessége, miután ebben a daganatféleségben a biopszia és a citológia játszik még mindig döntő szerepet. Bár eddig a citológia egyenlő értékűnek volt tekinthető, a mai követelményeknek alig tud eleget tenni, ezért háttérbe kell szorítani a biopsziával szemben. A molekuláris diagnosztikai eljárások sajátosságait maximálisan figyelembe kell venni abból a szempontból, hogy milyen mintaféleségek alkalmasak azok alkalmazására. E szempontok mellett a mintában lévő daganatsejt-normális sejt arány, illetve a molekuláris diagnosztikára rendelkezésre álló abszolút daganatsejtszám alapvető jelentőségű, és részét kell képezze a szövettani diagnózisnak. Végül, de nem utolsósorban a finanszírozható molekuláris patológiai diagnosztikához racionális algoritmusok, költséghatékony eljárások és stabil finanszírozás szükségesek. Magyar Onkológia 58:139–142, 2014

Kulcsszavak: tüdőrák, molekuláris diagnosztika, mintavétel

From the aspect of the contemporary pathologic diagnostics of lung cancer the tissue obtained is a key issue since small biopsies and cytology still play a major role. In the non-small cell lung cancer era cytology is considered equal to biopsy however, in recent years it is unable to provide quality diagnosis and must be replaced by biopsy. Various molecular techniques can handle various different tissue samples which must be considered during molecular pathology diagnosis. Moreover, tumor cell-normal cell ratio in the obtained tissue, as well as the absolute tumor cell number have great significance, which information must be provided in the primary lung cancer diagnosis. Last but not least, for continuous sustainable molecular diagnostics of lung cancer rational algorithms, affordable technology and appropriate reimbursement are equally necessary.

Tímár J. Criteria of the molecular pathology testing of lung cancer. Hungarian Oncology 58:139–142, 2014

Keywords: lung cancer, molecular diagnostics, sampling problems

Levelezési cím: Tímár József, SE. 2.sz. Patológiai Intézet, 1091 Budapest, Üllői út 93,
tel.: 215-6921, e-mail: jtimar@gmail.com

Közlésre érkezett: 2014. április 30. • Elfogadva: 2014. május 20.

BEVEZETÉS

A tüdőrák terápiájában paradigmaváltás történt az elmúlt 10 évben, ami a célzott terápiák hadrendbe állítását jelentette, jelentette, jelentősen megnövelve a betegek túlélési kilátásait (1). Ennek feltétele az volt, hogy elsősorban az adenocarcinoma alcsoportban világosan definiálni lehetett az egyes molekuláris alcsoportokat (2), amihez meg kellett teremteni a molekuláris diagnosztika minőségi szolgáltatását úgy, hogy annak tartalma folyamatosan változott, és az elvárások mennyiségi és minőségi téren is egyre növekedtek. Bár ezek a kérdések minden országban nagy feladatokat jelentettek, hazánkban ez azzal kombinálódott, hogy az egészségügyi ellátórendszer nem tudta, és a mai napig nem tudja kezelni ennek az új szolgáltatásnak a finanszírozását. A molekuláris patológiai igények megjelenése és fokozódása azonban visszahatott és hat a klinikai diagnosztika körülményeire és gyakorlatára is, ami a probléma rendszerszerű átgondolását kényszeríti ki.

MINTAVÉTEL A PATOLÓGUS SZEMSZÖGÉBŐL

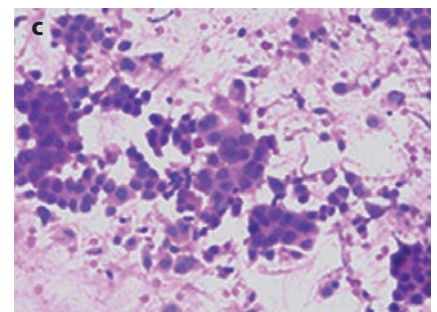
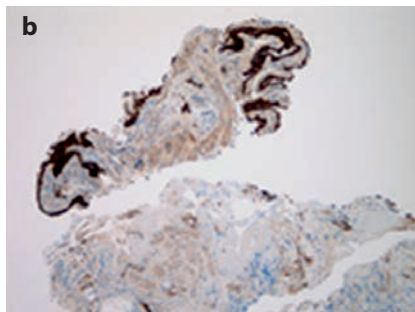
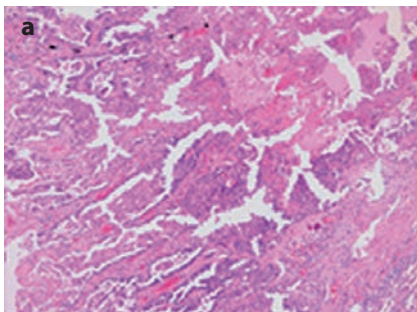
A tüdőrák patológiai diagnosztikája döntő részben a mai napig biopsziás és/vagy citológiai mintavételre alapul, és az eseteknek csak 20%-ában van lehetőség a többi szolid daganathoz hasonlóan a műtétilag eltávolított teljes daganat elemzésére (1. ábra). Miután a kis biopsziás anyagok, de főleg a citológiai preparátumok hatalmas kihívást jelentenek, a pontos szövettani diagnózis felállításához a mintavétel módjának megválasztása bronchológus vagy sebész által alapvetően befolyásolja a patológia mozgásterét. A tüdőrákok új patológiai szövettani klasszifikációja, annak megfelelő differenciáldiagnosztikája (3) megköveteli a minél nagyobb és alkalmasabb szövetrészek elemzését, a korábban kiterjedtebben követeli meg az immunhisztokémiai markerek használatát, ami gyakorlatilag meghatározza a minimálisan szükséges anyagmennyiséget is. A jelenlegi nemzetközi ajánlások a citológiára alapozott tüdőrák-diag-

nosztika minimális arányúra szűkítését és a szöveti alapú diagnosztika előtérbe helyezését követelik meg, mert ez ad lehetőséget a megkövetelt differenciáldiagnosztikai vizsgálatok és a molekuláris patológiai vizsgálatok elvégzésére (4). Ugyanakkor akármelyik eljárást is alkalmazzák, az 1-2 mintavételből származó 1-2 kenet vagy kis szöveti blokkok e követelményeknek nem tesznek eleget. Citológiai mintavétel esetében megkövetelik a sejtblokk alkalmazását, amennyiben megfelelő mennyiségű minta keletkezik, míg biopsziás mintavételkor megkövetelik a többszörös (minimum 4) mintavételt. Újabban felértékelődött a primer tumor mellett az esetleges áttéti lokalizációkból vett mintavétel is, így a mediastinalis nyirokcsomók vagy a pleurális exsudatum. Igen fontos a klinikus és a patológus számára ismerni a minimálisan szükséges szövettanmennyiség mellett a minimálisan szükséges daganatsejtszámot, illetve a további vizsgálatok számára kulcsjelentőségű minimális daganatsejt-normális sejt arányt. Ezek a kérdések mára megkövetelik azt, hogy a tüdőrák szövettani diagnózisának lelete tartalmazza a patológus véleményét arra nézve, hogy a mintában rendelkezésre áll-e még elegendő daganatsejt/szövet a további szükséges molekuláris vizsgálatok számára, ezzel mintegy jelezve a kezelőorvos felé, ha újabb mintavételre van szükség.

EGFR/KRAS-mutáció-analízis

A tüdő adenocarcinómájának leggyakoribb két mutációja a KRAS- (30%) és az EGFR-mutáció (15%), melynek elemzéséhez használt módszerek mindegyikéhez minimálisan szükséges DNS-mennyiség (5 ng) 1000 daganatsejtnek felel meg. Ezt a nukleinsav-mennyiséget a speciálisan előkészített szövettani metszetből vagy citológiai preparátumból kell eltávolítani, amikor a minta patológiai értelemben megsemmisül. Felmerülhet, hogy a tüdőrák diagnózisának felállításakor esetleg lehetséges volna a szükséges metszet(ek) biztosítása molekuláris vizsgálatra, azonban ennek feltételei nincsenek meg a patológiai osztályokon, hiszen a metszés és makrodisszekció speciális nukleázmentes

1. ábra. A tüdőrák diagnosztikájában használatos mintavételi formák. a: sebészi mintavétel/reszekció, b: transbronchialis biopszia, c: citológia



és kontaminációt kiküszöbölő körülményeket követel, ami csak molekuláris patológiai laboratóriumban biztosított. Miután az alkalmazott módszerek érzékenysége (mutáns gének kimutatási képessége nem mutáns háttérben) igen eltérő, a minta daganatsejt-normális sejt aránya meghatá-

1. táblázat. Tüdőrákminta daganatsejtarányának és az EGFR molekuláris diagnosztika érzékenységének összefüggései

Módszerek	Quiagen	Cobas	Sanger
Érzékenység	1%	5%	20%
T/N arány			
1:0 (ritka)	1%	5%	20%
1:1	2%	10%	40%
1:5	5%	25%	100% (ritka)
1:10	10%	50%	–

Az adatok a mutáns daganatsejtek minimális arányát jelentik az egyes molekuláris diagnosztikai eljárások esetében, amikor azok még kimutathatók.

rozó (1. táblázat). Az egyszerű elemzésből is kitűnik, hogy egy 20%-os érzékenységű minta esetében a minimálisan szükséges daganatsejtarány 20%, az 5%-os érzékenységű Cobas-rendszer esetében 5%, míg az 1%-os érzékenységű Quiagen-teszt esetében 1%, azonban az ajánlások 10%-os arány alatt egyáltalán nem javasolják a vizsgálatok elvégzését a nagymértékben megnövekedett hibázási gyakoriságra való tekintettel. Összefoglalva, a KRAS- és EGFR-mutáció-analízis esetében a minimális daganatsejtszám 1000 daganatsejt és a T/N arány minimum 10% (5, 6). Amennyiben ezek a feltételek nem teljesülnek, a patológiai diagnózis mellett ezt is rögzíteni kell a leletben.

ALK-transzlokáció

A tüdő adenocarcinomájának molekuláris klasszifikációja során derült fény arra, hogy hazánkban még alig ismert arányban, más országokban 5%-os gyakorisággal az ALK gén transzlokációja következik be, aminek eredményeként egy konstitutíven aktív tirozinkináz fúziós protein keletkezik. Az ilyen génhibákkal jellemzett daganatok érzékenyek az ALK tirozinkináz-gátló kezelésre. E génhiba kimutatása kísérleti körülmények között multiplex PCR-vizsgálattal, génszekvenálással történhet, amihez friss minta és mRNS szükséges. A mindennapi rutindiagnosztikában az ALK gén transzlokációját azonban in situ hibridizációval kell kimutatni, mivel ez az eljárás volt az alapja az ALK-gátló kezelés törzskönyvezési vizsgálatának. A tesztet formalin-fixált paraffinos metszeten kell végezni, és minimálisan 100 daganatsejtet kell értékelni, amelyek közül minimum 15%-nak kell tartalmaznia a génhibát. Ez a molekuláris di-

agnosztikai követelmény több alapvető problémát is felvet. A validált ALK-teszteket szövettani metszetek vizsgálatára dolgozták ki, és nem validálták citológiai mintára. Ez nem jelenti azt, hogy nem lehet megkísérelni a vizsgálatot citológiai mintából, de a negatív eredmény nem jelenthet negatív diagnózist egyben. Ez a kérdés tovább bonyolódik azzal, hogy szemben az EGFR/KRAS-mutáció-analízissel, amelyet el lehet végezni festett citológiai keneten is, az ALK-tesztet egyáltalán nem, ehhez szövettani/biopsziás mintára van szükség (6).

Újabban felmerült annak a lehetősége, hogy az ALK-vizsgálatokat immunhisztokémiával is el lehet végezni. Európai ajánlások alapján az ALK immunhisztokémiai vizsgálatát szűrővizsgálatként lehet alkalmazni, amely negativitása esetén nem szükséges az ALK molekuláris teszt (in situ hibridizáció) (7). Az ALK immunhisztokémiai vizsgálatával az a probléma, hogy a széles körben alkalmazott ALK-tesztek nem elég érzékenyek a tüdőrákban az ALK protein kimutatására, ezért újabbakat dolgoztak ki, és a Dako és a Ventana rendszereket tesztelték széles körben ebből a szempontból. Mindkét teszt csak a megfelelő automata berendezésen a saját elsődleges és előhívó rendszerével validált, más körülmények közötti alkalmazása nem lehetséges. Másrészt ezeket az immunhisztokémiai kiteket nem lehet citológiai mintán alkalmazni, azaz ebből a szempontból is megállapítható a szövettani mintavétel fontossága és értéke a citológiai mintavétellel szemben a tüdőrák diagnosztikájában.

A molekuláris patológiai differenciáldiagnosztika szekvenciája

A kiteljesedett molekuláris diagnosztikai panel a differenciáldiagnosztikai folyamatokkal együtt felveti a tüdőrák diagnosztikájának és molekuláris besorolásának időigényét, illetve elvárható időtartamát. Miután a molekuláris diagnosztika indikációja csak a korrekt szövettani diagnózis felállítása után következik, azelőtt elvégezni, illetve elindítani értelmetlen. Másrészt, a primer diagnózis és a molekuláris diagnózis az esetek többségében eltérő intézményben történik, ami a minta mozgásának idejével mindenképpen növeli a végleges lelet elkészültének idejét. Számos országban, ahol a molekuláris diagnosztika biztosító által térített, a rendszer „megengedheti magának” az ún. reflexvizsgálatot, ami a diagnózissal szinte párhuzamosan indított molekuláris patológiát jelent. Hazánkban ez több okból sem valósítható meg, aminek csak egyik oka a finanszírozás elégtelensége/hiánya, a másik a jelenlegi kapacitások elégtelensége.

A jelenlegi körülmények között hazánkban a tüdő adenocarcinomája esetében a diagnosztikai algoritmust a KRAS-mutáció, mint leggyakoribb génhiba analízisével javasolt kezdeni, amellyel a további elemzésekből kizár-

ható a minták egy nagy százaléka, mivel KRAS-mutáció csak extrém ritkán fordul elő párhuzamosan más, ún. „driver onkogén” hibával. Következő lépésben az EGFR-mutáció analízisét célszerű elvégezni, melynek gyakorisága a KRAS vad daganatokban már 20% fölé emelkedik. Ezzel párhuzamosan lehet elvégezni az ALK-vizsgálathoz az immunhisztokémiai előszűrést, így ezek együttes eredményei alapján már egy viszonylag kezelhető nagyságú mintaszám esetében szükséges csak az ALK in situ hibridizációs vizsgálat. Egyszerű költségelemzések azt mutatják, hogy egy ilyen molekuláris vizsgálati algoritmussal az elvégzendő vizsgálatok száma és költsége 30%-kal csökkenthető.

Konklúzió

A tüdőrákok korszerű és hatékony kezelése megköveteli a korszerű diagnosztikát, aminek szerves része a molekuláris patológiai vizsgálat. Ennek feltétele a megfelelő típusú és mennyiségű minta, amit csak korszerű mintavételi eljárások és elvek alkalmazásával lehet biztosítani. Az Egészségügyi Szakmai Kollégium Patológiai Tagozatának felmérése szerint 2013-ban hazánkban több mint 3000 ún. terápiasszociált molekuláris patológiai elemzés történt tüdőrákban (döntően adenocarcinómában), melyek között az EGFR- és KRAS-mutáció meghatározása egyenlő arányban szerepelt. 2014-ben az új ALK-gátló megjelenésével a molekuláris diagnosztikai igény jelentős emelkedése várható. Bár a molekuláris patológiai laboratóriumok erejüket megfeszítve igyekeznek nemzetközileg elvárható színvonalon megfelelni ennek a kihívásnak, erőfeszítéseiket hátráltatják szakmai (mintavételi) problémák, valamint döntő mérték-

ben a molekuláris patológia finanszírozási rendezetlensége. Miközben a szakma ezekkel a problémákkal küzd, a környező országokban a tüdőrákok molekuláris diagnosztikája nemzeti programmá emelkedik, amelynek keretében nem a finanszírozás, hanem a mind korszerűbb technológia csatornába állítása a téma (következő generációs szekvenálás). Ha a daganatos halálozás hazánk egyik legnagyobb egészségügyi problémája, akkor ennek megfelelő figyelem kell, hogy megillessen az egészségpolitika részéről is, amiben ma az egyik kulcskérdés a terápiasszociált molekuláris diagnosztika.

IRODALOM

1. Ostoros Gy, Bajcsay A, Balikó Z, et al. A tüdőrák megelőzésének, diagnosztikájának és kezelésének alapelvei. *Magy Onkol* 56:114–132, 2012
2. Tímár J. A patológiai diagnosztika jelentősége a daganatos betegségek személyre szabott orvoslásában. *Magy Onkol* 57:26–32, 2013
3. Kerr KM. Personalized medicine for lung cancer: new challenges for pathology. *Histopathology* 60:531–546, 2012
4. Strausz J, Tímár J. Paradigmaváltás a tüdőrákok nem sebészi mintavételében. *Magy Onkol* 54:297–301, 2010
5. Eberhard DA, Giaccone G, Johnson BE. Biomarkers of response to epidermal growth factor receptor inhibitors in Non-Small-Cell Lung Cancer Working Group: standardization for use in the clinical trial setting. *J Clin Oncol* 26:983–994, 2008
6. Thunnissen E, Kerr KM, Herth FJ, et al. The challenge of NSCLC diagnosis and predictive analysis on small samples. Practical approach of a working group. *Lung Cancer* 76:1–18, 2012
7. Lindeman NI, Cagle PT, Beasley MB, et al. Molecular testing guidelines for selection of lung cancer patients for EGFR and ALK tyrosine kinase inhibitors: guideline from the College of American Pathologists, International Association for the Study of Lung Cancer, and Association for Molecular Pathology. *J Mol Diag* 15:415–453, 2013