A **GRADUÁLIS ÉS POSZTGRADUÁLIS KÉPZÉS** folyóirata
Alapítva 1911-ben

2021.
XCVI. évfolyam,
3. szám

ORVOS-KÉPZÉS

Molekuláris onkológia

Semmelweis Kiadó

FELELŐS SZERKESZTŐ

Merkely Béla
merkely.bela@kardio.sote.hu

FŐSZERKESZTŐ

Matolcsy András
matolcsy.andras@med.semmelweis-univ.hu

A MOLEKULÁRIS ONKOLÓGIA TEMATIKUS SZÁM SZERKESZTŐJE

Bödör Csaba
bodor.csaba1@med.semmelweis-univ.hu

SZERKESZTŐBIZOTTSÁG

Graduális képzés
Kellermayer Miklós
kellermayer.miklos@med.semmelweis-univ.hu

PhD-képzés
Benyó Zoltán
benyo.zoltan@med.semmelweis-univ.hu

Rezidens- és szakorvosképzés
Nyirády Péter
nyirady.peter@med.semmelweis-univ.hu

Tagok
Ács Nándor, Ádám Veronika, Banczerowski Péter, Bartha Károly, Bérczi Viktor, Bereczki Dániel, Bucsky Péter, Buzás Edit, Cseh Károly, Csermely Péter, Dobó Nagy Csaba, Dobozy Attila, Édes István, Fekete György, Karádi István, Ferdinandy Péter, Gerber Gábor, Hangody László, Harsányi László, Horkay Ferenc, Hunyady László, Igaz Péter, István Gábor, Kalabay László, Kárpáti Sarolta, Kásler Miklós, Keller Éva, Kivovics Péter, Kollai Márk, Kopper László, Ligeti Erzsébet, Kovács József, Lang György, Losonczy György, Mandl József, Márton Krisztina, Masszi Tamás, Máthé Zoltán, Molnár Mária Judit, Muszbek László, Nagy Zoltán Zsolt, Nardai Sándor, Nemes Attila, Németh János, Németh Zsolt, Noszál Béla, Palkovits Miklós, Papp Gyula, Papp Zoltán, Perczel-Forintos Dóra, Petrányi Győző, Polgár Csaba, Répássy Gábor, Réthelyi János, Réthelyi Miklós, Rosivall László, Rigó János, Sárdy Miklós, Sótonyi Péter, Szabó András, Szabó Attila, Szabó Dóra, Szathmári Miklós, Szendrői Miklós, Tamás László, Telegdy Gyula, Tímár József, Tompa Anna, Tordai Attila, Tóth Zsuzsanna, Tretter László, Tulassay Tivadar, Tulassay Zsolt, Varga Gábor, Vásárhelyi Barna, Vasas Lívia, Zelles Tivadar, Windisch Péter

Az ORVOSKÉPZÉS megjelenik negyedévente. Megrendelhető a Kiadótól.

Szerzői jog és másolás: minden jog fenntartva. A folyóiratban valamennyi írásos és képi anyag közlési joga a szerkesztőséget illeti. A megjelent anyag, illetve annak egy részének bármilyen formában történő másolásához, ismételt megjelentetéséhez a szerkesztőség hozzájárulása szük-

ORVOSKÉPZÉS
A graduális és posztgraduális képzés folyóirata
2021; XCVI. évfolyam, 3:301-620.
MOLEKULÁRIS ONKOLÓGIA

Orvosképzés Szerkesztőség:
1086 Budapest, Nagyvárad tér 4.

Kiadja és terjeszti:
Semmelweis Kiadó
1086 Budapest, Nagyvárad tér 4.
Telefon: 210-4403
Internet honlap:
www.semmelweiskiado.hu
E-mail: info@semmelweiskiado.hu
orvoskepzes@semmelweiskiado.hu

Szerkesztő:
VINCZE JUDIT
vincze.judit@kiado.semmelweis-univ.hu

Illusztráció:
ÁNGYÁN GERGŐ

Kiadásért felel:
TÁNCOS LÁSZLÓ
tancos@mail.datanet.hu

Hirdetésszervező:
KOVÁCS VERONIKA
Telefon: 215-1401, 06 20/ 221-5265
veronika.kovács@kiado.semmelweis-univ.hu

Nyomta és kötötte:
Érdi Rózsa Nyomda Kft.
Felelős vezető: JUHÁSZ LÁSZLÓ

ISSN 0030-6037

ORVOSKÉPZÉS
A graduális és posztgraduális képzés folyóirata
Alapítva 1911-ben
2021; XCVI. évfolyam, 3:301-300.
MOLEKULÁRIS ONKOLÓGIA

Tartalom

Bödör Csaba előszava 309

ÖSSZEFOGLALÓ TANULMÁNYOK

Kotmayer Lili, Papp Gergő, Baghy Kornélia, Zajta Erik, Matolcsy András, Bödör Csaba
Daganatos megbetegedések célzott diagnosztikáját és kezelését támogató molekuláris diagnosztikai eljárások a mindennapokban
Routine application of molecular diagnostic techniques for precision diagnostics and therapy in oncology. 311

Éles Klára, Tóth Erika
Új generációs szekvenálás jelentősége a metasztatikus daganatok kezelésében – ESMO ajánlás és gyakorlati megfontolások
The role of next-generation sequencing as a diagnostic tool in oncology – ESMO guidelines and practical issues. 323

Nagy Ákos, Lévay Luca, Zajta Erik, Papp Gergő
A folyadékbiopszia nyújtotta lehetőségek a szolid daganatok molekuláris diagnosztikájában
Potential applications of liquid biopsy-based analyses in molecular diagnostics of solid tumors 329

Bedics Gábor, Sebestyén Endre
Az újgenerációs szekvenálás diagnosztikus alkalmazásának alapjai – gyakorlati bevezetés a precíziós medicinába
Basic concepts of diagnostic application of next-generation sequencing – a practical introduction to precision medicine . . 343

Vraukó Veronika, Sebestyén Endre
Genomikai adatbázisok a célzott terápiában
Genomic databases in targeted therapy 357

Papp Gergő, Regős Eszter, Szentkereszty Márton, Téglási Vanda, Pápay Judit
A nem-kissejtes tüdődaganatok korszerű diagnosztikája és célzott kezelése a biomarkerek korszakában
Advanced diagnosis and targeted treatment of non-small cell lung cancers in the era of biomarkers. 365

Mühl Dorottya, Tóth Andrea, Pálffy Veronika, Dank Magdolna
Az emlődaganatok korszerű diagnosztikája és kezelése
Modern therapy and diagnostics of breast cancer 375

Jakab Anna, Patai Árpád V., Micsik Tamás
Colorectalis carcinoma: molekuláris biomarkerek, precíziós terápia és új perspektívák
Colorectal cancer: molecular biomarkers, precision therapy and emerging concepts 387

Tímár József
A melanoma molekuláris diagnosztikája és célzott kezelése: prognosztikus és prediktív markerek
Molecular diagnostics and target therapy of melanoma: prognostic and predictive markers. 405

E-ORVOSKÉPZÉS

Töltse le a folyóiratot a *www.semmelweiskiado.hu/folyoiratok/* oldaláról!

Szarvas Tibor
Csizmarik Anita
Váradi Melinda
Oláh Csilla
Nyirády Péter

A prosztatarák és húgyhólyagrák molekuláris hátterének terápiás vonatkozásai
Therapeutically relevant molecular alterations in prostate and bladder cancer 413

Dezső Katalin
Nagy Péter
Lohinszky Júlia

A májdaganatok kezelése a molekuláris biomarkerek korszakában
Treatment of liver cancer in the era of biomarkers 423

Rókusz András
Máté Szabolcs

A tuboovarialis high-grade serosus carcinoma komplex patológiai diagnosztikája és célzott kezelése
Complex pathologic diagnosis and targeted therapy of tuboovarian high-gade serous carcinoma 433

Rajnai Hajnalka
Téglási Vanda
Scheich Bálint

A központi idegrendszeri tumorok korszerű patológiai diagnosztikája – Diagnosztikai kihívások a központi idegrendszeri tumorok WHO klasszifikációjának 2016-os megjelenését követően
Advanced Pathological Diagnosis of Central Nervous System Tumors – Diagnostic Challenges following the 2016 Publication of the WHO Classification of Central Nervous System Tumors 443

Lippai Zoltán
Sápi Zoltán

Az NTRK génfúziók, mint szövet-agnosztikus biomarker szerepe különböző daganatok diagnosztikájában és célzott kezelésében
The role of NTRK gene fusions as tissue-agnostic biomarkers in the diagnostic and targeted therapy of different tumors . . 455

Regős Eszter
Lotz Gábor

Az immuncheckpoint-gátlók biomarkereinek molekuláris diagnosztikai vizsgálata
Molecular diagnostic methodology of the immun checkpoint inhibitor biomarkers 469

Sebestyén Anna
Petővári Gábor
Dankó Titanilla
Sztankovics Dániel
Vetlényi Enikő
Khoor András
Jeney András
Krencz Ildikó
Pápay Judit

A tumorszövet metabolikus heterogenitása – anyagcsere-változások vizsgálati lehetőségei és jelentősége a daganatbiológiában
Metabolic heterogeneity in malignant tissues – the importance of bioenergetic alternatives in tumour biology 479

Tóth Eszter
Novák János
Barna Boglárka
Szabó Dóra
Kiss Richárd

Bélmikrobiom jelentősége daganatos betegségek kialakulásában, szűrésében és kezelésében
The significance of intestinal microbiome in the development, screening and treatment of cancer 495

Alpár Donát
Egyed Bálint
Krizsán Szilvia
Erdélyi Dániel
Bödör Csaba
Kovács Gábor
A gyermekkori akut leukaemiák korszerű molekuláris diagnosztikája és kezelése
State-of-the-art molecular diagnostics and treatment of pediatric acute leukemia 507

Kozma András
Hardi Apor
Ceglédi Andrea
Matula Zsolt
Bors András
Andrikovics Hajnalka
Varga Gergely
Mikala Gábor
TP53 diszfunkciós myeloma multiplex és kezelési lehetőségei
Treatment of multiple myeloma with TP53 disfunction. 523

Kiss Richárd
Jenei Alex
Fatima Abdul Kader
Demeter Judit
Bödör Csaba
Molekuláris genetikai vizsgálatok jelentősége krónikus myeloid leukaemiában
Significance of molecular genetic testing in chronic myeloid leukemia. 535

Kotmayer Lili
Balogh Alexandra
Gróf Stefánia
Gángó Ambrus
Bödör Csaba
A krónikus lymphocytás leukaemia genetikai háttere és személyre szabott terápiája
Genetic landscape and targeted therapy of chronic lymphocytic leukemia 551

Krizsán Szilvia
Hegyi Lajos
Masszi Tamás
Bödör Csaba
Az akut myeloid leukaemia korszerű molekuláris diagnosztikája és célzott kezelése
Recent advances in molecular diagnostics and targeted therapy of acute myeloid leukemia 567

Timár Botond
A diffúz nagy B-sejtes lymphoma legújabb molekuláris klasszifikációja és ennek terápiás vonatkozásai
New molecular classifications and their therapeutical consequence of diffuse large B-cell lymphoma 583

Barna Gábor
Erdélyi Dániel
Varga Gergely
Masszi András
Márk Ágnes
Szalóki Gábor
A mérhető reziduális betegség szerepe az onkohematológiai betegségek diagnosztikájában és kezelésében
The role of measurable residual disease in the diagnostic and treatment of oncohematological diseases 595

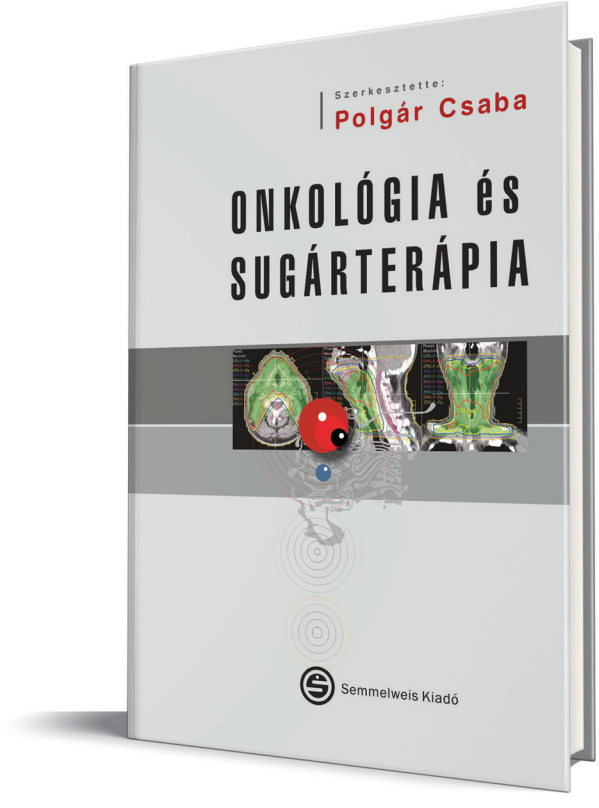
Patócs Attila
Molekuláris genetikai módszerek az örökletes rákszindrómák klinikai diagnosztikájában
Molecular genetic methods in clinical diagnosis of hereditary cancer syndromes 607

Zeke Helga
Fekete Bálint András
Molnár Mária Judit
Mi a szerepe a genetikai tanácsadásnak onkológiai betegségek esetén?
What is the role of genetic counselling in case of an oncological disorder? 615

SEMMELWEIS KIADÓ SZAK- ÉS TANKÖNYVEI

Onkológia

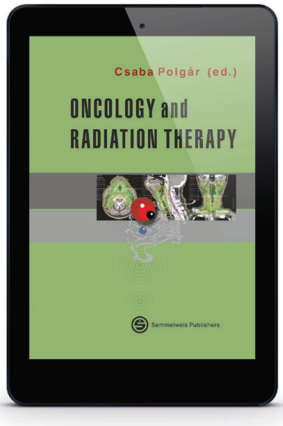
Könyveink megvásárolhatók a Legendus Könyvesboltban, illetve a Líra Kereskedelmi hálózaton belül az egész országban, de egyre nagyobb igényt elégít ki webshopunk.



Polgár Csaba (szerk)

ONKOLÓGIA ÉS SUGÁRTERÁPIA

A rosszindulatú daganatok népegészségügyi szempontból kiemelt jelentőségű betegségnek számítanak. Részletesebben tárgyaljuk a sugárterápiát és a daganatellenes gyógyszeres kezeléseket. A hallgatók átfogó képet kaphatnak a legfontosabb szolid, rosszindulatú daganatok kezeléséről, melynek célja, hogy az új orvos generáció képes legyen a leggyakoribb daganatos betegségek gyanújának felismerésére és arra, hogy a betegség gyanúja esetén a megfelelő szakorvoshoz irányíthassa a beteget, és tisztában legyen a betegség kezelésének lehetőségeivel és várható kimenetelével.



Keménytáblás könyv ára: 4000 Ft ■ **Angolul, illetve németül ingyenesen letölthető**

Könyvek E-könyvek Folyóiratok Apropó Poszter Box

Semmelweis Kiadó
1089 Budapest, Nagyvárad tér 4.
www.semmelweiskiado.hu

LEGENDUS KÖNYVESBOLT
1089 Budapest, Nagyvárad tér 4.
Tel.: 210-4408, 459-1500/56353
Nyitva tartás: H–Sz: 9.00–16.00,
Cs: 9.00–18.00, P: 9.00–14.00
E-mail: info@semmelweiskiado.hu

ORVOSKÉPZÉS folyóirat szerzői útmutatója

A folyóirat célja: Az 1911-óta megjelenő Orvosképzés legfontosabb célja a hazai orvoskollégák folyamatos graduális és posztgraduális képzésének támogatása. A lap elsősorban olyan munkák közlését tartja feladatának, amelyek az orvostudomány egy-egy ágának újabb és leszűrt eredményeit foglalják össze magas színvonalon úgy, hogy azok a gyakorló orvoshoz, szakorvoshoz, klinikushoz és elméleti orvoshoz egyaránt szóljanak. Emellett lehetőség van eredeti közlemények és esetismertetések benyújtására, és az újság a Semmelweis Egyetem szakmai kötelező szinten tartó tanfolyamok előadási összefoglalóinak is teret ad. Az eredeti közlemények a rendszeres lapszámokban, vagy a témához kapcsolódó tematikus lapszámokban kapnak helyet. Fontos feladatunknak tartjuk, hogy rezidens kollégák tollából származó esetismertetéseket is közöljünk, melyeket mentori ajánlással kérünk benyújtani. A beadott dolgozatokat a szerkesztőbizottság előzetes bírálatra adja ki, és a kézirat közlésére a bírálat eredményének függvényében kerül sor. Tudományos dolgozat benyújtására az alábbiak szerint van lehetőség:

- Esetismertetés (case report)
- Fiatal doktorok (PhD) tudományos beszámolója, új eredményeinek összefoglalása (nem tézisek vagy doktori értekezések!)
- Klasszikus összefoglaló közlemény az elméleti és klinikai orvostudomány bármely területéről, a legújabb irodalmi eredmények felhasználásával
- „Update" jellegű közlemény, azaz nem egy téma kidolgozása, hanem adott szakterület legújabb tudományos eredményeinek összefoglalása
- Előadási összefoglaló (a tanfolyamszervezők felkérése alapján)

A kézirat: A tudományos közleményeket elektronikusan, Word dokumentum formátumban kérjük eljuttatni a szerkesztőségbe. Az illusztrációkat, ábrákat és táblázatokat külön file-ként kérjük elküldeni. Az ábrák címeit és az ábramagyarázatokat a Word dokumentumban külön oldalon kell feltüntetni, az ábra/táblázat számának egyértelmű megjelölésével. A digitális képeket minimum 300 dpi felbontásban kérjük, elfogadunk tif, eps, illetve cdr kiterjesztésű file-okat. A kézirat elfogadása esetén az ábrákat a szerkesztőség nyomtatott formában is kéri elküldeni. Az orvosi szavak helyesírásában az Akadémia állásfoglalásának megfelelően, a latinos írásmód következetes alkalmazását tekintjük elfogadottnak. Magyarosan kérjük írni a tudományágak és szakterületek, a technikai eljárások, műszerek, a kémiai vegyületek neveit. A szerkesztők fenntartják maguknak a stiláris javítás jogát. A mértékegységeket SI mértékrendszerben kérjük megadni.

A kézirat felépítése a következő: (1) címoldal, (2) magyar összefoglalás, kulcsszavakkal, (3) angol összefoglalás (angol címmel), angol kulcsszavakkal, (sorrendben): magyar cím, angol cím, (4) rövidítések jegyzéke (ha van), (5) szöveg, (6) irodalomjegyzék, (7) ábrajegyzék, (8) táblázatok, (9) ábrák. Az oldalszámozást a címoldaltól kezdve kell megadni és az egyes felsorolt tételeket külön lapon kell kezdeni.
(1) A *címoldalon* sorrendben a következők szerepeljenek: a kézirat címe, a szerzők neve, valamint a szerzők munkahelye, a kapcsolattartó szerző pontos elektronikus és postai címének megjelölésével. (2–3) Az *összefoglalást* magyar és angol nyelven kell beküldeni, külön oldalakon, a következő szerkezet szerint: „Bevezetés" („Introduction"), „Célkitűzés" („Aim"), „Módszer" („Methods"), „Eredmények" („Results") és „Következtetések" („Conclusions") lényegre törő megfogalmazása történjék. A magyar és az angol összefoglalások terjedelme – külön-külön – ne haladja meg a 200 szót (kulcsszavak nélkül). A témához kapcsolódó, maximum 5 kulcsszót az összefoglalók oldalán, azokat követően kérjük feltüntetni magyar és angol nyelven. (4) A kéziratban előforduló, nem általánosan elfogadott *rövidítésekről* külön jegyzéket kell készíteni abc-sorrendben. (5) A szövegtörzs szerkezete világos és az olvasó számára átlátható legyen. Eredeti közlemények esetén a „Bevezető"-ben röviden meg kell jelölni a problémafelvetést, és az irodalmi hivatkozásokat a legújabb eredeti közleményekre és összefoglalókra kell szűkíteni. A „Módszer" részben világosan és pontosan kell leírni azokat a módszereket, amelyek alapján a közölt eredmények születtek. Korábban közölt módszereket esetén csak a metodika alapelveit kell megjelölni, megfelelő irodalmi hivatkozással. Klinikai vizsgálatoknál a kézirathoz csatolni kell az illetékes etikai bizottság állásfoglalását. Állatkísérletek esetén a Magyar Tudományos Akadémia – Egészségügyi Tudományos Tanács – állatkísérletekre vonatkozó etikai kódexe érvényes, melyre a metodikai részben utalni kell. A statisztikai módszereket és azok irodalmát is meg kell adni. Az „Eredmények" és a „Megbeszélés" részeket világosan kell megszerkeszteni. *Referáló közlemények* benyújtása esetén a szövegtörzs altémákra osztható, melyeket alcímek vezessenek be. *Összefoglaló referátumoknál* a szövegtörzs terjedelme ne haladja meg a 30 000 karaktert (szóközzel), *eredeti közleménynél* (klinikai, vagy kísérletes) ne haladja meg a 20 000 karaktert (szóközzel), *esetismertetésnél* ne haladja meg a 10.000 karaktert (szóközzel), *előadási összefoglaló* esetén pedig ne haladja meg a 8000 karaktert (szóközzel).
Irodalom: a hivatkozásokat (maximum 50, előadási összefoglalónál maximum 10) a szövegben való megjelenés sorrendjében tüntessék fel. A szövegben a hivatkozást a sorszáma jelöli.
Hivatkozás cikkre: sorrendben: szerzők neve (4 szerző felett et al./és mtsai), cikk címe, folyóirat neve (Index Medicus szerint rövidítve), év; kötetszám:első-utolsó oldal. Példa: 1. Kelly PJ, Eisman JA, Sambrook PN. Interaction of genetic and environmental influences on peak bone density. Osteoporosis Int, 1990; 1:56-60. *Hivatkozás könyvfejezetre,* sorrendben: a fejezet szerzői. A fejezet címe. In: szerkesztők (editors). A könyv címe. A kiadás helye, kiadó, megjelenés éve; fejezet első-utolsó oldala. Példa: 2. Delange FM, Ermans AM. Iodide deficiency. In: Braverman LE, Utiger RD, eds. Werner and Ingbar's the thyroid. 7th ed. Philadelphia, Lipincott-Raven, 1996; 296 316.
Ábrajegyzék: a megjelenés sorrendjében, arab számmal sorszámozva egymás alatt tartalmazza az ábra címét és alatta rövid és lényegre törő ábramagyarázatot
Táblázatok: külön-külön lapokon kérjük, címmel ellátva és arab számmal sorszámozva. Törekedjenek arra, hogy a táblázat könnyen áttekinthető legyen, ne tartalmazzon zavaróan sok adatot.
Ábrák: külön-külön lapokon kérjük. Csak reprodukálható minőségű ábrákat, fényképek küldését kérjük (min. 300 dpi felbontásban), a korábban megjelölt file formátumokban. A kézirat elfogadása esetén a nyomtatott ábrát kérjük beküldeni a szerkesztőségbe és az ábra hátoldalán puha ceruzával kérjük jelölni a szerző nevét, arab számmal az ábra sorszámát és a vertikális irányát.

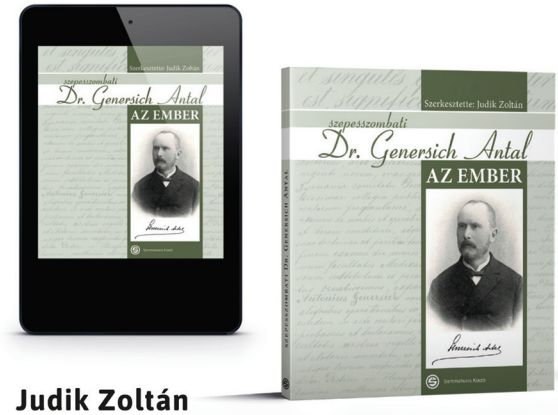
A formai hiányossággal beküldött kéziratokat nem tudjuk elfogadni. A gyors lektori és korrektúrafordulók érdekében kérjük a legbiztosabb levelezési, illetve e-mail címet, telefon- és faxszámot megadni.
Elfogadás esetén külön levélben kérjük jelezni, hogy a szerzők a közleménnyel egyetértenek (és ezt aláírásukkal igazolják), valamint lemondanak a folyóirat javára a kiadási jogról. Írásbeli engedélyt kérünk mellékelni a már közölt adat/ábra felhasználása, felismerhető személy ábrázolása, szerzőnek nem minősülő személy nevének említése/feltüntetése esetén. A szerkesztőség az általa felkért szakértők személyét titkossággal kezeli. A kézirat tulajdonjoga a megjelenésig a szerzőt illeti meg, a megjelenés napján tulajdonjoga a kiadóra száll. A megjelent kéziratok megőrzésére szerkesztőségünk nem tud vállalkozni.

A kéziratok benyújtását a következő címre várjuk:
Dr. Matolcsy András egyetemi tanár, főszerkesztő
I. sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet
1085 Budapest, Üllői út 26.
Tel: 36-1-459-1500/54455
E-mail: titkarsag.1path@med.semmelweis-univ.hu

SEMMELWEIS KIADÓ ISMERETTERJESZTŐ KIADVÁNYAI

Életrajzok

Könyveink megvásárolhatók a Legendus Könyvesboltban, illetve a Líra Kereskedelmi hálózaton belül az egész országban, de egyre nagyobb igényt elégít ki webshopunk.

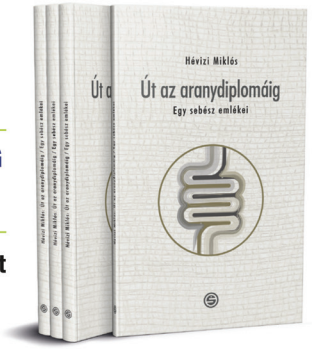


Judik Zoltán

SZEPESSZOMBATI DR. GENERSICH ANTAL

Az ember

E-könyv ára: 960 Ft ■ Könyv ára: 4000 Ft



Hévizi Miklós

ÚT AZ ARANYDIPLOMÁIG

Egy sebész emlékei

■ Könyv ára: 2400 Ft

Farkas Sándor

KÖPENYBEN ÉS MASZKBAN

Pillanatképek egy sebészorvos életéből

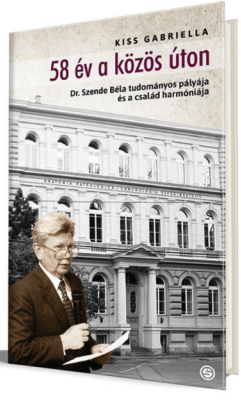
■ Könyv ára: 1990 Ft

Kiss Gabriella

58 ÉV A KÖZÖS ÚTON

Dr. Szende Béla tudományos pályája és a család harmóniája

■ Könyv ára: 3400 Ft



Boga Bálint

A BELGYÓGYÁSZATTÓL AZ ÖREGEDÉS TUDOMÁNYÁIG

■ Könyv ára: 2400 Ft

Könyvek E-könyvek Folyóiratok Apropó Poszter Box

Semmelweis Kiadó

1089 Budapest, Nagyvárad tér 4.

www.semmelweiskiado.hu

LEGENDUS KÖNYVESBOLT

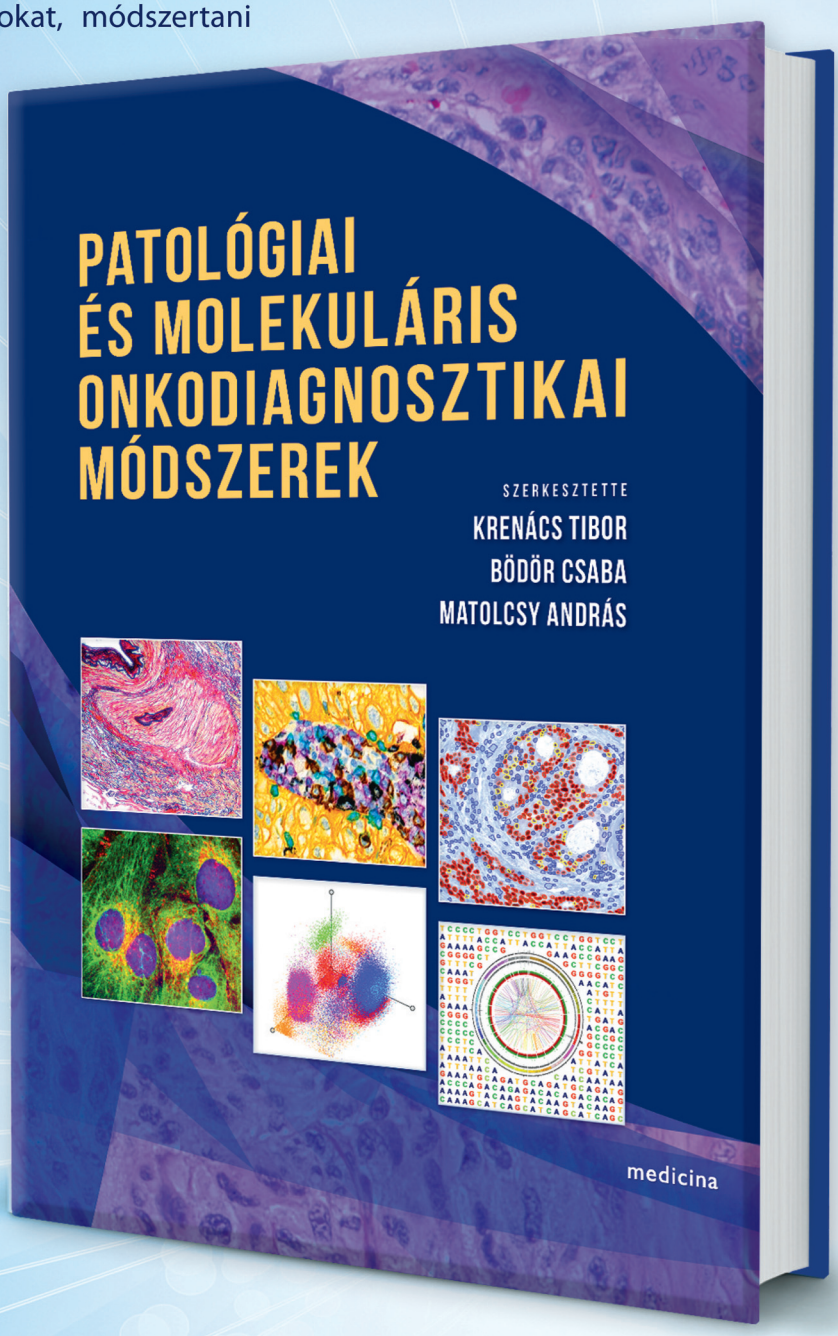
1089 Budapest, Nagyvárad tér 4.
Tel.: 210-4408, 459-1500/56353
Nyitva tartás: H–Sz: 9.00–16.00,
Cs: 9.00–18.00, P: 9.00–14.00
E-mail: info@semmelweiskiado.hu

Innovatív patológiai szakkönyv, amely a témát és annak dinamikus evolúcióját a módszertan oldaláról közelíti meg.

A 35 alfejezetet magában foglaló 18 fejezet a korszerű patológiai és onkodiagnosztikai módszerek elméleti alapjainak fókuszált bemutatása és esszenciális összefüggéseinek megvilágítása mellett reprodukálható és ellenőrzött protokollokat, módszertani algoritmusokat és részletes differenciáldiagnosztikai összefoglaló táblázatokat tartalmaz, amit demonstratív példák és gazdag ábraanyag támogat.

Részletesen tárgyalja többek között a mikroszkópos módszereket klasszikustól a szuperfelbontású mikroszkópiáig, a patológiai minta-előkészítés és -feldolgozás, az immuncito-/hisztokémia, az áramlási citometria, az *in situ* hibridizáció, a PCR alapú molekuláris onkológiai módszerek, az újgenerációs szekvenálás (NGS), a célzott terápiákhoz kötődő molekuláris diagnosztika, a digitális patológia, az automatizált képanalízis, a mesterséges intelligencia, a szöveti multiblokk (TMA) módszer, a képalkotó tömegspektrometria („multiplexing"), a sejttenyésztés, valamint a biostatisztika és a bioinformatika patológiai alkalmazását és jövőbeni potenciálját. Emellett bemutatja a szövet-patológiai osztályok felépítésének és működtetésének minőségügyi szabályait és elvárásait.

Hiánypótló kötet, amely a patológiában tevékenykedők mellett a társszakmák képviselőinek figyelmére is számíthat a közös cél, a kor színvonalának megfelelő diagnosztika és gyógyítás érdekében.

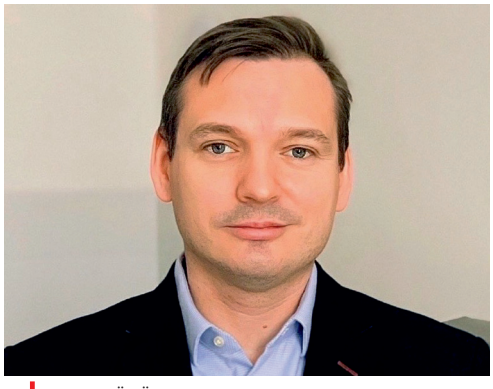


medicina

Ár: 15 800 Ft
Méret: 202x285 mm
Terjedelem: 680 oldal
Megjelent: 2020. augusztus

Medicina Könyvkiadó Zrt.
1072 Budapest, Rákóczi út 16.
tel.: 36(1)312-2650

www.medicina-kiado.hu



DR. BÖDÖR CSABA
TUDOMÁNYOS FŐMUNKATÁRS
SEMMELWEIS EGYETEM

Tisztelt Olvasó!

Az elmúlt évtizedben egy paradigmaváltásnak lehettünk szemtanúi, amely a precíziós, célzott terápiát is magában foglaló diagnosztika és kezelés korszakát hozta el az onkológiában. A legtöbb daganattípus genomtérképének megismerésével párhuzamosan számos molekuláris támadáspontú kezelés került bevezetésre, jelentősen javítva a betegek túlélési esélyeit. A célzott kezelések sikeres alkalmazásához elengedhetetlen prediktív biomarkerek kimutatása által a molekuláris patológia/diagnosztika egyre fontosabb szerepet tölt be ebben a dinamikus fejlődési folyamatban.

Az Orvosképzés jelen tematikus számában szakterületük elismert képviselői mutatják be az elmúlt évek diagnosztikus és terápiás fejlődésének legújabb eredményeit a legkülönbözőbb daganattípusok esetében. Emellett betekintést szeretnénk nyújtani a Semmelweis Egyetemen a közelmúltban a betegellátás szolgálatába állított újgenerációs szekvenálás alapjaiba, valamint az onkológia új izgalmas területeinek, a mikrobiom és tumor metabolizmus vizsgálatok szerepébe és az általuk nyújtott lehetőségekbe is.

Köszönettel tartozunk valamennyi szerzőnek, akik a COVID-19-pandémia szorításában is elkészítették színvonalas közleményeiket.

Az Orvosképzés *Molekuláris Onkológia* tematikus különszámát szeretettel ajánljuk a graduális és posztgraduális képzésben résztvevő hallgatóink mellett az onkológia, patológia és egyéb társszakmák művelőinek.

Semmelweis Egyetem
I. Sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet
Tudományos főmunkatárs
Molekuláris Diagnosztika részleg vezetője

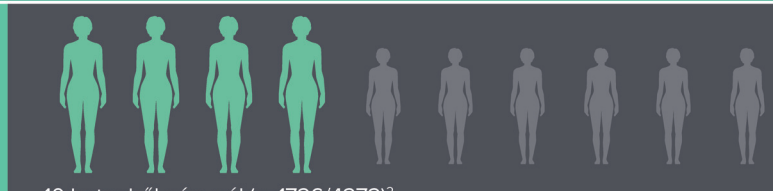
A HR+, HER2- emlőrákos betegek

~40%-ában több közös van, mint maga a betegség[1-4]

A PIK3CA mutációinak onkogén driver szerepük van az előrehaladott emlőrákban, és jelenlétüket a betegség kedvezőtlenebb prognózisával is összefüggésbe hozzák.[5,6]

PIK3CA a leggyakoribb génmutáció a HR+, HER2- emlődaganatokban[7]

~40%
PIK3CA+

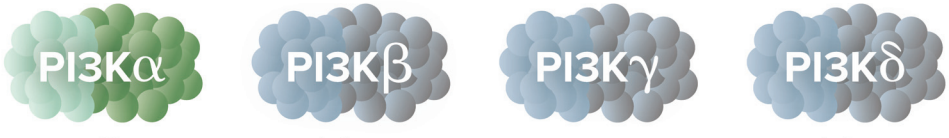


10 betegből négynél (n=1726/4272)[2]

A PIK3CA olyan onkogén, amely a PI3-kináz-alfa izoformáját kódolja (PI3Kα).[3]

- Az I. osztályú PI3-kinázok egy p110 katalitikus alegységből és egy p85 szabályozó alegységből álló heterodimerek. A PIK3CA specifikusan a p110-alfa izoformáját kódolja.

A PI3K izofomái különböző fiziológia szerepet játszanak[8]



alfa béta gamma delta

PI3Kα izoforma különösen fontos lehet az emlőrákban[8]

A tumor-angiogenezis és a sztromális interakciók támogatásával a PI3Kα egyedi szerepet játszik a daganatképződésben, és ez teszi hangsúlyossá a jelentőségét az előrehaladott emlőrákban.

Referenciák: 1. Mayer IA, Abramson VG, Formisano L, et al. A phase Ib study of alpelisib (BYL719), a PI3Kα-specific inhibitor, with letrozole in ER+/HER2- metastatic breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2017;23(1):26-34. **2.** Sabine VS, Crozier C, Brookes CL, et al. Mutational analysis of PI3K/AKT signaling pathway in tamoxifen exemestane adjuvant multinational pathology study. *J Clin Oncol.* 2014;32(27):2951-2958. **3.** Thorpe LM, Yuzugullu H, Zhao JJ. PI3K in cancer: divergent roles of isoforms, modes of activation and therapeutic targeting. *Nat Rev Cancer.* 2015;15(1):7-24. **4.** LoRusso PM. Inhibition of the PI3K/AKT/mTOR pathway in solid tumors. *J Clin Oncol.* 2016;34(31):3803-3815. **5.** Zardavas D, Phillips WA, Loi S. PIK3CA mutations in breast cancer: reconciling findings from preclinical and clinical data. *Breast Cancer Res.* 2014;16(1):201. **6.** Saal LH, Johansson P, Holm K. Poor prognosis in carcinoma is associated with a gene expression signature of aberrant PTEN tumor suppressor pathway activity. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007;104(18):7564-7569. **7.** The Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular portraits of human breast tumors. *Nature.* 2012;490(7418):61-70. **8.** Fruman DA, Rommel C. PI3K and cancer: lessons, challenges, and opportunities. *Nat Rev Drug Discov.* 2014;13(2):140-156.

NOVARTIS

Készült a Novartis Hungária támogatásával.

P3-szám: HU2102177781
Lezárás dátuma: 2021. 02. 17

Daganatos megbetegedések célzott diagnosztikáját és kezelését támogató molekuláris diagnosztikai eljárások a mindennapokban

Routine application of molecular diagnostic techniques for precision diagnostics and therapy in oncology

Kotmayer Lili, Papp Gergő, Baghy Kornélia, Zajta Erik, Matolcsy András, Bödör Csaba
I. Sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet, Semmelweis Egyetem, Budapest
E-levél: bodor.csaba1@med.semmelweis-univ.hu

ÖSSZEFOGLALÁS A daganatos betegségek diagnosztikájának és optimális kezelési stratégiájának megtervezésében napjainkban kulcsszerepet töltenek be a molekuláris patológiai vizsgálatok. A diagnosztikus, prognosztikus és prediktív biomarkerek szenzitív azonosítása és nyomonkövetése jelenti a precíziós medicina alappillérét, amely számos daganattípus esetében vezetett a betegek életkilátásainak jelentős javulásához, paradigmaváltást eredményezve az onkológiában. Összefoglaló közleményünkben a precíziós medicina legkorszerűbb eszköztárát ismertetjük a Semmelweis Egyetem országos szintű molekuláris patológiai tevékenységének és az elmúlt évek fejlesztéseinek áttekintése által.

KULCSSZAVAK molekuláris diagnosztika, prediktív biomarkerek, precíziós medicina, újgenerációs szekvenálás

SUMMARY Molecular genetic testing has become one of today's most important fields of modern pathology, playing a key role in both diagnostics and optimal therapeutic decision making in oncology. Sensitive detection and monitoring of distinct diagnostic, prognostic and predictive biomarkers are the main cornerstones of precision medicine. Utilizing these results has led to the improvement of cancer patients' life expectancy in many entities, resulting in a paradigm shift in oncology. In this review, we present the state-of-the-art armamentarium of precision medicine by depicting our nationwide activities in molecular pathology and recent developments at Semmelweis University.

KEY WORDS molecular diagnostics, predictive biomarkers, precision medicine, next generation sequencing

Bevezetés

A patológia egyike az onkológiai betegellátás legfontosabb területeinek, szerepe azonban az elmúlt időszakban jelentősen megváltozott. A szövettani és morfológiai eltérések vizsgálata mellett napjainkban egyre nagyobb hangsúlyt kapnak a daganatos megbetegedések genetikai hátterének megismerését célzó vizsgálatok, melyek számos malignitás esetében új diagnosztikai kritériumrendszerek, valamint prognosztikai és prediktív biomarkerek megjelenését eredményezték. Az így kialakult új diszciplína, a molekuláris patológia szolgáltatja napjainkban a precíziós medicina alappillérét. Az elmúlt évtizedben a molekuláris biológiai technológiák robbanásszerű fejlődésének köszönhetően exponenciálisan felgyorsult a különböző daganattípusok genomikai hátterének megismerése, ami számos új terápiás célpont felfedezését és molekuláris támadáspontú célzott terápia bevezetését eredményezte az onkológiában. Ez több szolid és hematológiai daganatos megbetegedés terápiájában is jelentős áttörésekhez vezetett az elmúlt években.

A klasszikus immunhisztokémiai (IHC) és fluoreszcens in situ hibridizációs (FISH) vizsgálatok mellett ma már rutinszerűen alkalmazott DNS- és RNS-alapú molekuláris vizsgálatokkal olyan prognosztikai és prediktív biomarkerek, célzott terápiás célpontok és rezisztenciát előrejelző mutációk, valamint a minimális/mérhető reziduális betegség (MRD) monitorozására alkalmas eltérések azonosíthatók, melyek együttes vizsgálata megteremtette a daganatok átfogó genetikai profilozásának alapjait. Az egyes eltérések vizsgálatára szorítkozó diagnosztikai panelek mellett egyre több entitás-

Rövidítések

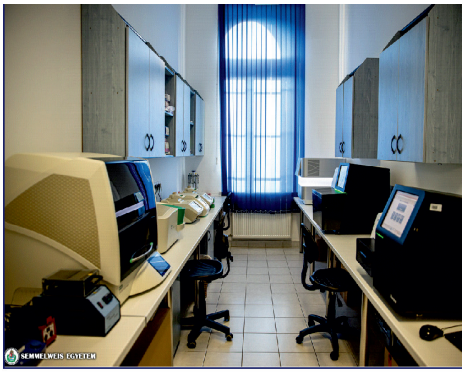
AML	*akut myeloid leukaemia*
CLL	*krónikus lymphocytás leukaemia*
CML	*krónikus myeloid leukaemia*
CPG	*komprehenzív genomikai profilozás*
ddPCR	*digitális droplet PCR*
ESMO	*Európai Klinikai Onkológiai Társaság*
FISH	*fluoreszcens in situ hibridizáció*
IHC	*immunhisztokémia*
MPN	*myeloproliferatív neoplasmák*
MRD	*mérhető/minimális reziduális betegség*
MSI	*mikroszatellita instabilitás*
NGS	*újgenerációs szekvenálás (next generation sequencing)*
RQ-PCR	*valós idejű, kvantitatív PCR*
PCR	*polimeráz láncreakció*
TKI	*tirozin-kináz-inhibitor*
TMB	*tumor mutációs terhelés*

ban kerülnek előtérbe a komplex (ún. multigénes) genetikai vizsgálatok, melyek a nagy áteresztőképességű és érzékenységű molekuláris módszerek alkalmazásával minden eddiginél pontosabb képet nyújtanak a tumorgenezis genetikai hátteréről. A molekuláris diagnosztikai eszköztár legkorszerűbb komponenseit jelentik a nagy áteresztőképességű újgenerációs szekvenálás *(NGS, next generation sequencing),* valamint a genetikai eltérések nagy érzékenységű kimutatására alkalmas droplet-digitális PCR (ddPCR).

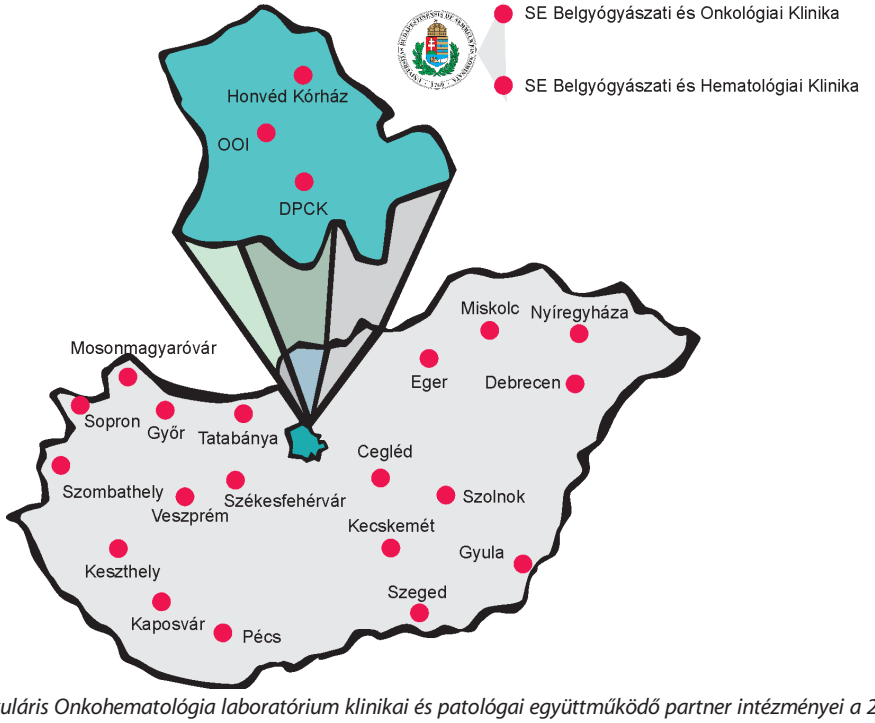
A Semmelweis Egyetem országos centrumként a hazai onkológiai és onkohematológiai betegek jelentős részének molekuláris diagnosztikai ellátását végzi, évente a tizenötezret is meghaladó vizsgálatszámmal. Az elmúlt négy évben a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal (NKFIH) támogatásával megvalósult Nemzeti Versenyképességi és Kiválósági Program (NVKP16) *Magyar Onkogenom és Személyre Szabott Diagnosztika és Terápia Programjának,* valamint ipari szereplőkkel való együttműködésnek köszönhetően az I. Sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet Molekuláris Diagnosztikai részlegében a legkorszerűbb NGS és ddPCR technológiákra épülő, valamennyi klinikai igényt kielégítő laboratóriumi és bioinformatikai infrastruktúrát alakítottunk ki *(1. ábra).* Ennek a mindennapi betegállátásba való bevonásával a korábban kizárólag magánszolgáltatók által ajánlott korszerű molekuláris diagnosztikai vizsgálatok váltak elérhetővé Egyetemünkön.

Molekuláris vizsgálatok jelentősége az onkohematológiában

Az I. Sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet 2001 óta működő Onkohematológiai Központja mára szinte országos lefedettséggel, több mint húsz fővárosi és vidéki klinikai hematológiai centrum részére végez molekuláris diagnosztikai vizsgálatokat *(2. ábra).* Az onkohematológiai kórképek rendkívül heterogén klinikai megjelenéssel és eltérő genetikai háttérrel bíró entitások. A korábban szinte kizárólag klinikai és morfológiai jellemzők alapján diagnosztizált betegségcsoport esetében mára a molekuláris vizsgálatok elengedhetetlenek a genetikai alapú diagnózis felállításához, valamint a betegek személyre szabott, célzott kezeléséhez és nyomonkövetéséhez. Az elmúlt néhány évben a különböző onkohematológiai kórképek genetikai hátterének megismerésével párhuzamosan emelkedett a mindennapi molekuláris onkohematológiai diagnosztikában vizsgálandó genetikai eltérések száma. A szövettani, hagyományos citogenetikai, FISH és áramlási citometriai vizsgálatok mellett ma már közel 40-féle DNS- és RNS-alapú vizsgálat alkotja a molekuláris onko-



1. ábra. Az I. Sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet Molekuláris Diagnosztikai részlegén 2017–2021 között kialakított korszerű újgenerációs szekvenálás és droplet digitális PCR-alapú laboratóriumi infrastruktúra. Rendelkezésre álló műszerek: NextSeq2000 (Illumina), MiSeq (Illumina), GeneReader (Qiagen), automatizált QX200 digitális droplet PCR rendszer (Bio-Rad), Tapestation (Agilent), nCounter technológia (Nanostring). Hamarosan elérhető: GeoMx® Digital Spatial Profiler technológia



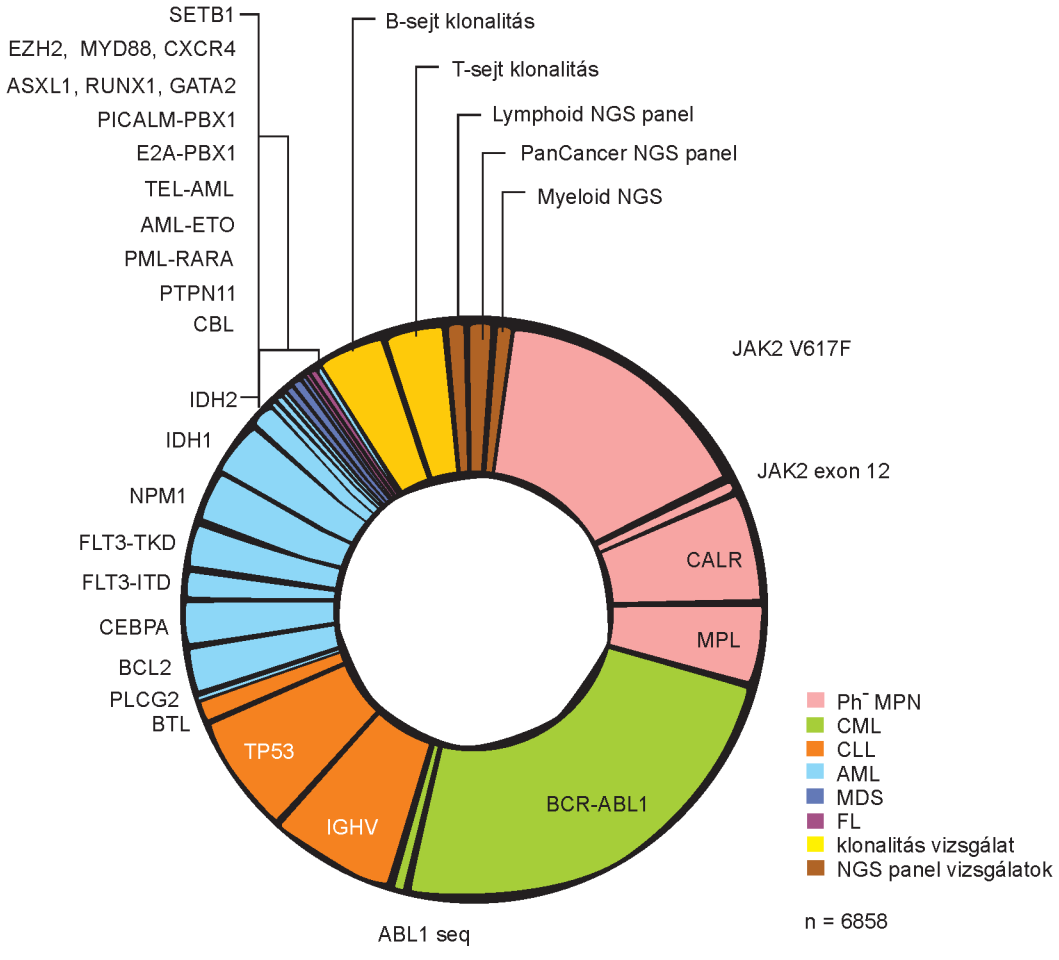
2. ábra. A Molekuláris Onkohematológia laboratórium klinikai és patológiai együttműködő partner intézményei a 2020-as évben.

hematológia vizsgálati palettáját *(3. ábra)*. A módszertani repertoár tekintetében pontmutációk szekvenálással vagy valós-idejű allélspecifikus PCR-rel történő kimutatása, immunglobulin (Ig) és T-sejt-receptor (*TCR*) gének fragmenshossz-analízissel történő azonosítása, visszatérő fúziós transzkriptumok RNS-alapú mennyiségi PCR-rel történő érzékeny nyomonkövetése mellett az elmúlt néhány évben bevezetésre kerültek az NGS-alapú vizsgálatok is, melyek számának folyamatos emelkedése figyelhető meg laboratóriumunkban *(4. ábra)*.[1] Figyelembe véve a betegek pontosabb rizikóbesorolása és célzott kezelési lehetőségeinek azonosítása kapcsán egyre bővülő klinikai igényeket, a közeljövőben a nagyobb áteresztőképességű NGS-vizsgálatok további térnyerése várható a lymphomák és leukaemák molekuláris diagnosztikájában.

Mivel az Orvosképzés jelen tematikus számában a legfőbb onkohematológiai entitások molekuláris vonatkozásai különálló közlemények formájában kifejtésre kerülnek, az alábbiakban mindössze néhány kiemelt kórkép esetében vázoljuk a molekuláris diagnosztikai vizsgálatok jelentőségét.

Krónikus myeloid leukaema (CML)

A Philadelphia kromoszóma és a BCR-ABL1 fúziós transzkriptum azonosítását követően a myeloproliferatív neoplasmák (MPN) körébe tartozó CML a tirozinkináz-inhibitor (TKI) imatinib megjelenésével rövid idő alatt az onkohematológia modellbetegségévé vált.[2] Az immár két évtizede bevezetett imatinib nemcsak a CML kezelését forradalmasította, de nagyban elősegítette a precíziós onkológia megjelenéséhez vezető paradigmaváltást az onkológiában. Egyedülálló módon a CML mára egy krónikus betegséggé szelídült, melynek várható túlélése megegyezik a normál populációéval. A sikeres kezeléshez ugyanakkor elengedhetetlen a betegek molekuláris szintű nyomon követése, amelyre a TKI terápia célpontját jelentő BCR-ABL1 fúziós transzkriptum valósidejű PCR-rel zajló mennyiségi analízise nyújt lehetőséget. A perifériás vérmintából háromhavonta elvégzendő vizsgálat informálja a klinikust a kezelés hatékonyságáról, a fúziós transzkriptum szintjének emelkedése pedig előre jelezheti az alkalmazott TKI-val szemben fellépő rezisztenciát. Az alkalmazott TKI kezelés hatástalansága esetén az *ABL1* gén kináz doménjének mutációanalízise szükséges a rezisztenciamutációk azonosításához, ami támpontot nyújthat a következő vonalban alkalmazható TKI kiválasztásához. Napjainkban már második és harmadik generációs TKI-k is elérhetőek a CML kezelésében, melyek megfelelő alkalmazásához és hatásuk nyomonkövetéséhez elengedhetetlen segítséget nyújt a molekuláris diagnosztika.[3] Intézetünkben mintegy 800 CML-ben szenvedő beteg rendszeres molekuláris nyomonkövetését végezzük a nemzetközi szakmai protokolloknak megfe-



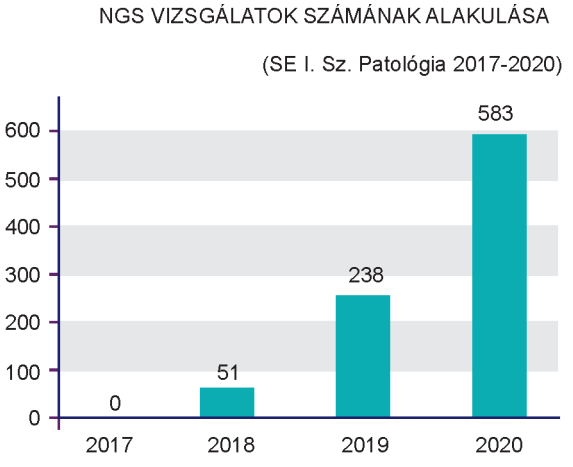
3. ábra. A Semmelweis Egyetem, I. Sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet Molekuláris Onkohematológia laboratóriuma által 2020-ban végzett 6858 DNS- és RNS-alapú vizsgálatok megoszlása a különböző kórképekben. Rövidítések: AML: akut myeloid leukaemia, CLL: krónikus lymphocytás leukaemia, CML: krónikus myeloid leukaemia, FL: follicularis lymphoma, MDS: myelodysplasiás szindróma, NGS: újgenerációs szekvenálás, Ph- MPN: Philadelphia-negatív myeloproliferatív neoplasiák

lelően, ami a molekuláris onkohematológiai diagnosztikai vizsgálatok megközelítőleg negyedét jelenti *(3. ábra)*.

Philadelphia kromoszóma negatív myeloproliferatív neoplasmák (MPN)

Bár a Philadelphia kromoszóma negatív (Ph⁻) MPN-ák csoportjába tartozó essentialis thrombocytaemia (ET), polycytaemia vera (PV) és primer myelofibrosis (MF) genetikai hátterét csak az elmúlt évtizedben ismertük meg, a kórképekben azonosítható genetikai eltérések vizsgálata rövid idő alatt alapvető szerephez jutott a betegségcsoport mindennapi diagnosztikájában. A betegek döntő hányadában (70–98%) azonosítható *JAK2*, *CALR* vagy *MPL* gének valamelyikének mutációi napjainkban már major diagnosztikai kritériumként szerepelnek a betegségcsoport diagnosztikus algoritmusában. Vizsgálatuk perifériás vérből Sanger-szekvenálás vagy nagy érzékenységű allélspecifikus PCR segítségével történik.[4]

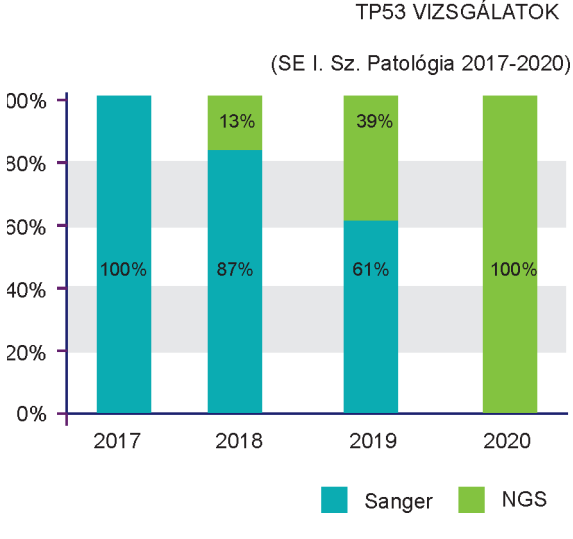
A *JAK2*, *CALR* és *MPL* mutációk diagnosztikus értékük mellett prognosztikus szereppel is bírnak. Az utóbbi években egyre inkább előtérbe kerül a mutációk mennyiségi kimutatása is, melynek prognosztikai és terápiás relevanciája is ismert. Az ún. mutáns alléterhelés („allele burden") a mutációt hordozó klón méretére utal és prognosztikus jelentőséggel is bírhat. A *JAK2* célzott terápia nyomonkövetésére alkalmas lehet a *JAK2* V617F mutáns alléltömeg mennyiségi meghatározása ddPCR eljárással. Intézetünkben a Ph⁻ MPN-ák molekuláris diagnosztikája évente több mint 1500 vizsgálatot foglal magában *(3. ábra)*.[5]



4. ábra. Az újgenerációs szekvenálás alapú vizsgálatok számának emelkedése az onkohematológiai kórképekben a 2018. évi bevezetést követően a Semmelweis Egyetem, I. Sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet Molekuláris Onkohematológia laboratóriumában.

Krónikus lymphocytás leukaemia (CLL)

A CLL molekuláris vizsgálata a rendkívül heterogén genetikai hátterének köszönhetően az eddig ismertetett onkohematológiai kórképekétől eltérő megközelítést igényel, hiszen a nagyszámú eltérés azonosítása csak több módszer együttes alkalmazásával lehetséges. Bár a CLL diagnózisának felállításához nem szükséges a genetikai eltérések ismerete, a kórképben alkalmazott rizikóbecslés során egyes citogenetikai és molekuláris defektusok vizsgálata elengedhetetlen.[6] A sokáig csak FISH-sel detektálható kópiaszám-eltérések vizsgálatára szorítkozó rizikóstratifikációs besorolásban nagy előrelépést jelentett a molekuláris vizsgálatok megjelenése, melyekkel újabb prognosztikai és prediktív biomarkerek is azonosításra kerültek. A prognosztikai és prediktív biomarkerek közül kiemelendők a Sanger-szekvenálással meghatározott IGHV mutációs státusz, valamint a *TP53* tumorszuppresszor gén teljes kódoló régióját érintő patogén mutációk, melyek detektálását célzott szekvenálással, végezzük. A *TP53* mutációanalízis kiváló példája az NGS-alapú eljárások térnyerésének: míg 2017-ben még valamennyi TP53 vizsgálat hagyományos szekvenálással zajlott laboratóriumunkban, 2020-ban az NGS már teljesen felváltotta a hagyományos szekvenálási eljárást *(5. ábra)*.



5. ábra. Az újgenerációs szekvenálási vizsgálatok térnyerése a Semmelweis Egyetem, I. Sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet Molekuláris Onkohematológia laboratóriumában a TP53 mutációanalízis példáján szemléltetve.

Az IGHV és *TP53* mutációanalízisek már a CLL- ben elérhető célzott terápiák indikációját is jelentik, így a IGHV státusz meghatározás és az NGS-sel igazolt *TP53* mutációk azonosítása rövid idő alatt a CLL legfontosabb molekuláris vizsgálataivá váltak. Intézetünkben e két biomarker vizsgálata 2017 óta elérhető, az elmúlt 3 évben a European Research Initiative on CLL (ERIC) nemzetközi szervezet által akkreditált laboratóriumként jelentős évenkénti mintaszámon végezzük a két biomarker vizsgálatát *(3. ábra)*.[7, 8]

A terápiás indikációt jelentő eltérések mellett az elmúlt pár évben a célzott terápiákkal (BTK gátlószerek és BCL2 gátlószerek) szemben fellépő rezisztencia genetikai hátterét is megismerhettük CLL-ben, aminek vizsgálatában szintén megfigyelhető a nagy érzékenységű módszerek térnyerése. Az ibrutinib rezisztencia-asszociált *BTK* p.C481S mutáció mellett jelenleg már a *PLCG2* és a venetoclax rezisztencia hátterében álló *BCL2* mutációk vizsgálata is ultraszenzitív ddPCR-módszerrel történik és adataink alapján első detektálásuk akár hónapokkal megelőzheti a progresszió első klinikai jeleit.[9]

Akut myeloid leukaemia (AML)

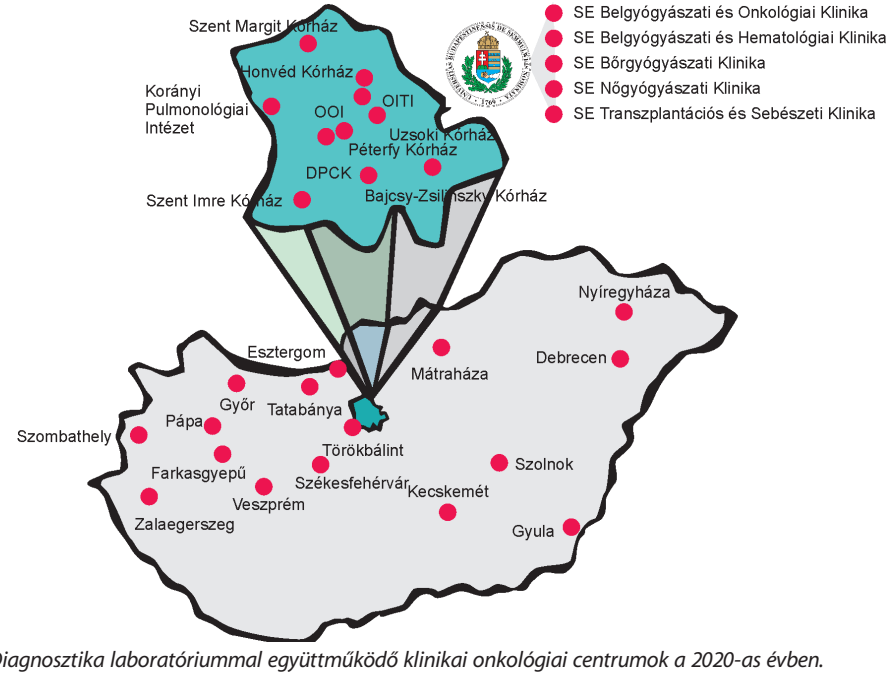
A myeloid rendszert érintő onkohematológiai kórképek közé tartozó AML egy kedvezőtlen túléléssel jellemezhető megbetegedés, melynek diagnosztikája a közelmúltig a morfológiai jegyek és citogenetikai vizsgálattal azonosítható kromoszómaeltérések alapján zajlott.[10] Az NGS megjelenése azonban számos új mutációs célpontot azonosított a betegségben, melyek között több fehérje célozható jelátviteli utak komponenseit képviseli. Az új genomikai felfedezések nagyban hozzájárultak az AML kezelésére alkalmas új terápiás megközelítések kidolgozásához, amit a betegség terápiájá-

ban alkalmazható számos új gátlószer (többek között FLT3-inhibitorok, IDH1/2 inhibitorok, különböző antitest-toxin konjugátumok) megjelenése tükröz. Mára a korábban kizárólag hagyományos eljárások alkalmazásával diagnosztizált betegség korszerű, a nemzetközi standardoknak megfelelő diagnózisához, rizikóbecsléséhez és terápiás stratégiájának megtervezéséhez nélkülözhetetlen több gén *(CEBPA, NPM1, FLT3, IDH1/2, RUNX1, TP53, ASXL1)* mutációanalízise is. Ezen vizsgálatok folyamatosan növekvő száma indokolja a multigénes NGS alapú eljárások alkalmazását, szemben a hagyományos szekvenálási eljárásokkal kivitelezett ún. monogénes teszteléssel.[11] Intézetünk Molekuláris Onkohematológiai kutatócsoportja kifejlesztett egy 54 génes NGS-alapú vizsgálati eljárást, amely alkalmas a felnőtt és gyermekkori AML komplex molekuláris profiljának meghatározására. A vizsgálat jelenleg egyedi méltányossági finanszírozással érhető el.

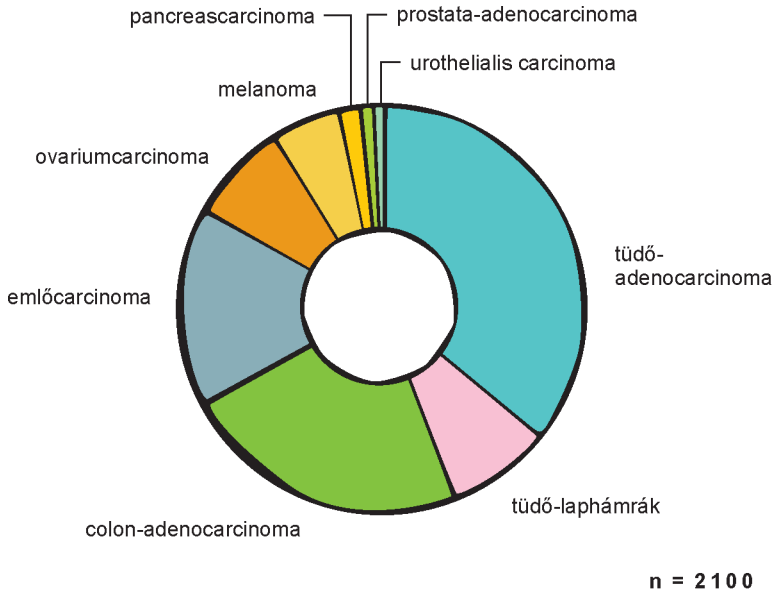
Szolid tumorok molekuláris diagnosztikája

A molekuláris diagnosztika eszköztárának fejlődése az onkohematológiai kórképekhez hasonlóan a szolid daganatok genetikai hátterének vizsgálatában is jelentős áttöréseket hozott az elmúlt évtizedben. Számos daganattípus diagnózisának és klasszifikációjának elengedhetetlen része lett bizonyos molekuláris eltérések kimutatása, és az új kezelési lehetőségek megjelenésével a prediktív biomarkerek nagy érzékenységű kimutatása a célzott- és immunterápiák sikeres alkalmazásának feltételévé vált. Az I. Sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet Molekuláris Diagnosztika laboratóriuma hazánk egyik vezető molekuláris patológiai centrumaként mintegy harminc klinikai onkológiai centrum számára végez komplex molekuláris diagnosztikai vizsgálatokat *(6. ábra)*. Évente több mint 2000 beteg esetében végzünk molekuláris vizsgálatokat, amelyek többségét tüdő-, vastagbél, ovarium- és emlődaganatok teszik ki, de melanoma és pancreastumorok is szerepelnek a vizsgált entitások között *(7. ábra)*. A szolid tumorok molekuláris diagnosztikájában a prediktív biomarkerek úgynevezett monogénes tesztelése vált a mindennapi gyakorlattá az elmúlt években, amely során az egyes molekuláris eltérések vizsgálata egyenként történik, gyakran eltérő technológiát/vizsgálómódszert alkalmazva. A prediktív biomarkerek vizsgálatának módszertani palettáján napjainkban a FISH és a PCR alapú hagyományos szekvenálási eljárások mellett bizonyos biomarkerek (PD-L1, ALK, ROS1) fehérjeszintű immunhisztokémiai kimutatásai is jelentős szereppel bír. Intézetünkben a 2020-as évben 10000 feletti monogénes molekuláris vizsgálatot végeztünk, melyek részét képezik a transzplantáció kapcsán vizsgált víruskimutatások is *(8. ábra)*.

A szolid tumorok genetikai hátterének egyre pontosabb megismerésével és az új terápiás lehetőségek megjelenésével párhuzamosan emelkedik a vizsgálandó biomarkerek száma, ami jelentős terhet ró a molekulá-

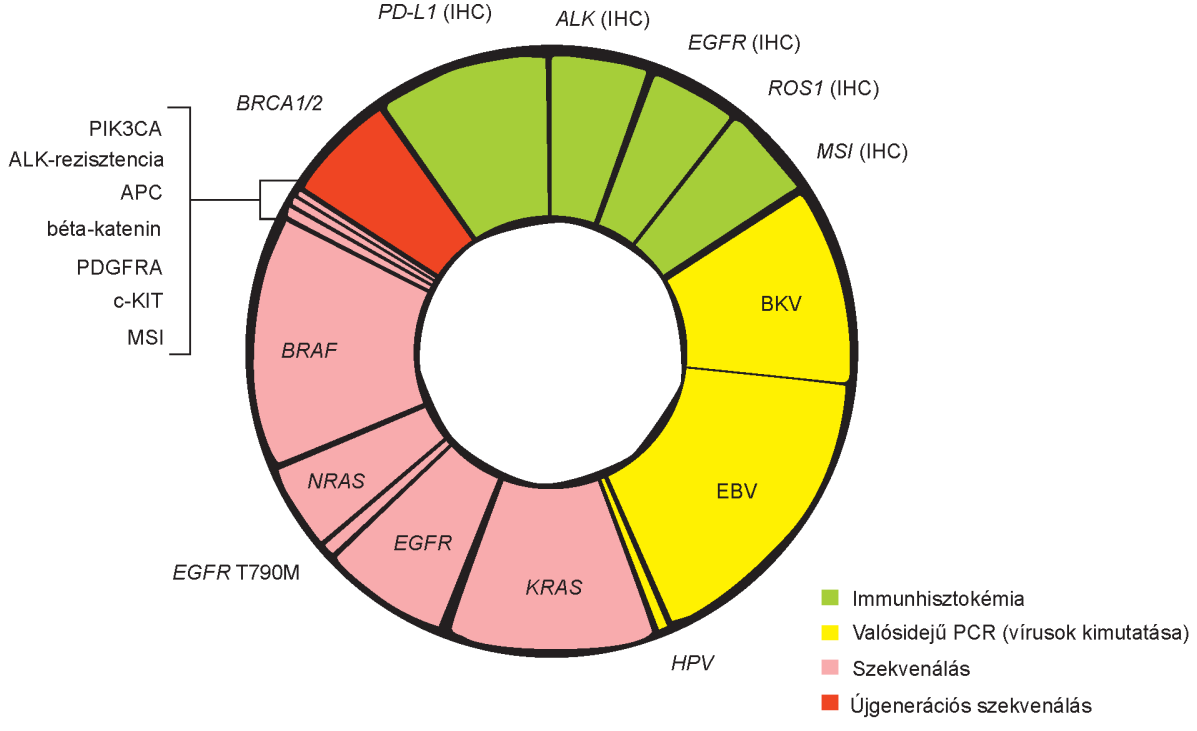


6. ábra. A Molekuláris Diagnosztika laboratóriummal együttműködő klinikai onkológiai centrumok a 2020-as évben.

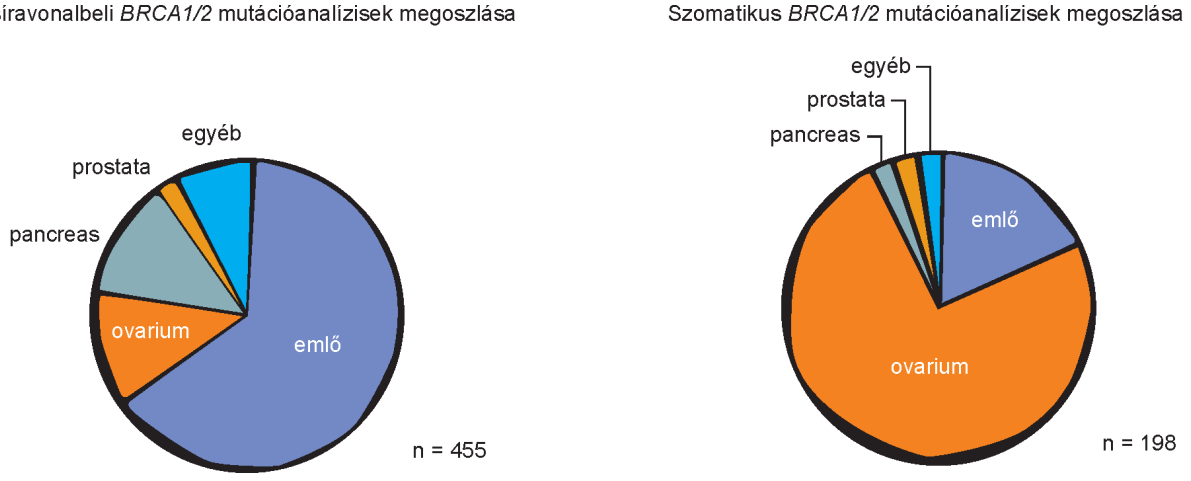


7. ábra. A Molekuláris Diagnosztika laboratórium által molekuláris szinten vizsgált különböző daganattípusok megoszlása 2020-ban.

ris diagnosztikát végző laboratóriumokra. Mára egyértelművé vált, hogy a bővülő klinikai igényeknek az új, nagyobb áteresztőképességű, a genetikai eltéréseket szimultán módon vizsgálni képes technológiák bevonásával lehet megfelelni.[12] Ennek megtestesítője az újgenerációs szekvenálás, melynek jelentős térhódítása figyelhető meg napjainkban. A multigénes tesztelés költséghatékony lehetősége mellett az NGS nagyméretű gének gyors és érzékeny mutációanalízisére is kiválóan alkalmazható, amire remek példát szolgáltatnak a



8. ábra. Monogénes molekuláris patológiai vizsgálatok típusai az I. Sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet Molekuláris Diagnosztika laboratóriumában 2020-ban. BKV: BK-vírus, EBV: Epstein-Barr-vírus, HPV: humán papillomavírus, MSI: mikroszatellita-instabilitás



9. ábra. Újgenerációs szekvenálással végzett BRCA1- és BRCA2-vizsgálatok száma és vizsgált daganattípusok az I. Sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet Molekuláris Diagnosztika laboratóriumában 2020-ban.

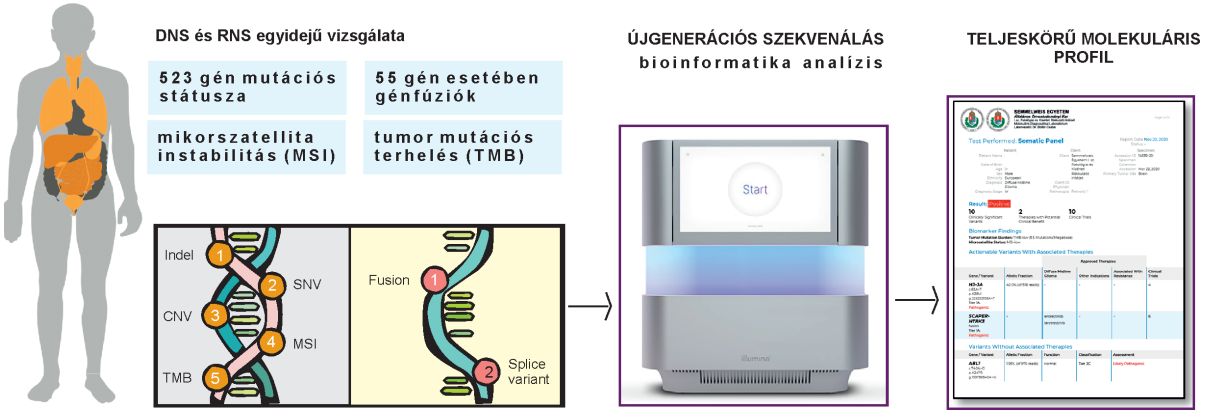
BRCA1 és *BRCA2* gének, melyek vizsgálata nagy méretükből kifolyólag csak NGS alkalmazásával életszerű.[13] Intézetünkben évek óta zajlik a *BRCA1*/2 gének NGS-alapú analízise szomatikus (szövetmintából) és csíravonalbeli (perifériás vérből) mutációk meghatározásának céljából ovarium- és emlődaganatok, valamint a legutóbbi időszakban pancreas és prosztata tumorok esetében is, évente közel 700 esetet vizsgálva *(9. ábra)*. A leggyakoribb daganattípusok molekuláris hátterének ismertetésére jelen tematikus szám további közleményiben kerül sor, így az alábbiakban az elmúlt év jelentős NGS fejlesztésének, a komprehenzív genomikus profilozás bevezetésének ismertetésére szorítkozunk.

Multigénes NGS vizsgálatok, komprehenzív genomikus profilozás

Az NGS nyújtotta legjelentősebb előrelépés a multigénes tesztelés lehetősége, amely során DNS és RNS egyidejű vizsgálatával nagyszámú (akár több száz) gén vizsgálatára nyílik lehetőség. Az NGS alapú, ún. génpanelvizsgálatok elterjedése figyelhető meg napjainkban a szolid tumorok molekuláris diagnosztikájában, amelyek alkalmazásával a megfelelő célzott terápia kiválasztásához szükséges prediktív biomarkerek azonosíthatók a legkülönbözőbb daganattípusokban. Az NGS tesztek pontos indikációs területe, alkalmazásuk időzítése, az alkalmazandó génpanel mérete, valamint az eredmények interpretációja a molekuláris diagnosztika forrongó területe. Az ilyen típusú vizsgálatok alkalmazása kapcsán az első szakmai állásfoglalás 2020 nyarán közölték az Európiai Klinikai Onkológiai Társaság (ESMO) szakértői, amelyet jelen tematikus szám következő közleményében tekintünk át.[14]

Az NGS metodikák legkorszerűbb, legszélesebb körű analízist biztosító képviselője az az ún. komprehenzív genomikus profilozás (CPG: „comprehensive genomic profiling"), amely jellemzően több száz gén (300–600) egyidejű vizsgálata során képes pontmutációk, kópiaszámeltérések, génfúziók (fúziós transzkriptumok), valamint a mikroszatellita instabilitás (MSI), tumor mutációs terhelés (TMB) meghatározása és egyéb tumoragnosztikus biomarkerek azonosítására.[15, 16] A 2020-as évben az I. Sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézetben kidolgoztunk egy CPG eljárást, amely a legkorszerűbb szekvenálási technológiákon *(NextSeq2000, Illumina)* és bioinformatikai értékelő és klinikai interpretáló rendszereken *(Clinical Insight, Qiagen; PierianDx)* alapul *(10. ábra)*. Az ún. *TSO500* panelen alapuló eljárással 523 gén esetében van lehetőség pontmutációk, kópiaszámeltérések és génfúziók azonosítására *(11. ábra)*. Az alkalmazott bioinformatikai szoftverek pedig a már engedélyezett terápiák mellett valamennyi klinikai tanulmány azonosítására is képesek a meghatározott genetikai eltérések alapján. A vizsgálat jelenleg egyedi méltányossági finanszírozás keretében érhető el Intézetünkben.

A vizsgálatot eddig 151 beteg estében végeztük el, a legkülönbözőbb daganattípusok esetében *(12. ábra)*. A szekvenálási eredmények részletes bemutatása külön közlemény tárgyát képezi a közeljövőben, azonban kiemelendő, hogy az eljárással számos beteg esetében azonosítottunk célozható genetikai eltéréseket. A jól ismert és monogénes eljárásokkal is vizsgált gének (*ALK*,



10. ábra. A Semmelweis Egyetem, I. Sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézetében kidolgozott komprehenzív genomikus profilozási eljárás áttekintő összefoglalása.

ROS1 fúziók, *EGFR, BRAF, BRCA1/2* mutációk és kópiaszámeltérések eltérésein túl, a teljesség igénye nélkül, több esetben azonosítottunk terápiás jelentőséggel bíró *NTRK1-3* fúziókat, *RET* mutációkat, a homológ rekombinációs „repair" rendszer komponenseinek *(ATM, CHEK2, FANCL, PALB2)* mutációit, *PIK3CA* mutációkat, *IDH11/2* mutációkat, valamint új hiszton metiltranszferázokkal célozható *EZH2*, *SMARCB1* és *SMARCA4* mutációkat.

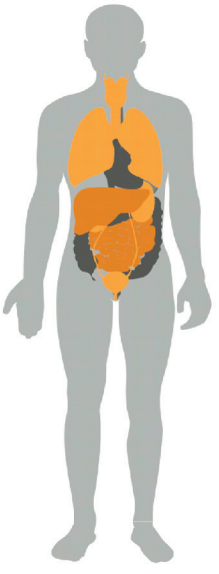
Pontmutációk és kópiaszámeltérések

ABL1	CD74	EPHA7	GPR124	IL7R	MEF2B	PIK3C2G	RNF43	SUFU
ABL2	CDC73	EPHB1	GPS2	INHA	MEN1	PIK3C3	RPS6KA4	SUZ12
ACVR1	CDK8	ERCC3	GREM1	INHBA	MGA	PIK3R2	RPS6KB2	SYK
ACVR1B	CDKN1A	ERCC4	GRIN2A	INPP4A	MITF	PIK3R3	RPTOR	TAF1
ALOX12B	CDKN1B	ERCC5	GRM3	INSR	MST1	PIM1	RUNX1	TBX3
ANKRD11	CDKN2B	ERRFI1	GSK3B	IRF2	MST1R	PLCG2	RUNX1T1	TCEB1
ANKRD26	CDKN2C	ETS1	H3F3A	IRF4	MYB	PLK2	RYBP	TCF3
ARAF	CENPA	ETV1	H3F3B	IRS1	MYOD1	PMAIP1	SDHA	TCF7L2
ARFRP1	CHD2	ETV4	H3F3C	IRS2	NAB2	PMS1	SDHAF2	TERC
ARID1B	CHD4	ETV5	HGF	JAK1	NCOA3	PNRC1	SDHB	TET1
ARID2	CIC	ETV6	HIST1H1C	JUN	NCOR1	POLD1	SDHC	TFE3
ARID5B	CRKL	EWSR1	HIST1H2BD	KAT6A	NEGR1	POLE	SDHD	TFRC
ASXL1	CRLF2	FAM123B	HIST1H3A	KDM5A	NF2	PPARG	SETBP1	TGFBR1
ASXL2	CSF3R	FAM46C	HIST1H3B	KDM5C	NFE2L2	PPM1D	SETD2	TGFBR2
ATRX	CSNK1A1	FANCA	HIST1H3C	KDM6A	NFKBIA	PPP2R1A	SF3B1	TMEM127
AURKA	CTCF	FANCC	HIST1H3D	KEAP1	NKX2-1	PPP6C	SH2B3	TMPRSS2
AURKB	CTLA4	FANCD2	HIST1H3E	KEL	NKX3-1	PRDM1	SH2D1A	TNFAIP3
AXIN1	CTNNA1	FANCE	HIST1H3F	KIF5B	NOTCH4	PREX2	SHQ1	TNFRSF14
AXIN2	CUL3	FANCF	HIST1H3G	KLF4	NSD1	PRKAR1A	SLIT2	TOP1
AXL	CUX1	FANCG	HIST1H3H	KLHL6	NTRK1	PRKCI	SMAD2	TOP2A
B2M	CXCR4	FAS	HIST1H3I	KMT2B	NTRK2	PRKDC	SMAD3	TP63
BBC3	CYLD	FAT1	HIST1H3J	KMT2C	NTRK3	PRSS8	SMARCA4	TRAF2
BCL10	DAXX	FGF19	HIST2H3A	KMT2D	NUP93	PTPRD	SMARCD1	TRAF7
BCL2L1	DCUN1D1	FH	HIST2H3C	LAMP1	NUTM1	PTPRS	SMC1A	TSHR
BCL2L11	DDX41	FLCN	HIST2H3D	LATS1	PAK1	PTPRT	SMC3	U2AF1
BCL2L2	DHX15	FLI1	HIST3H3	LATS2	PAK3	QKI	SNCAIP	VEGFA
BCOR	DICER1	FLT4	HLA-A	LMO1	PAK7	RAB35	SOCS1	VTCN1
BCORL1	DIS3	FOXA1	HLA-B	LRP1B	PARK2	RAC1	SOX10	WISP3
BCR	DNAJB1	FOXO1	HLA-C	LYN	PARP1	RAD21	SOX17	WT1
BIRC3	DNMT1	FOXP1	HNRNPK	LZTR1	PAX3	RAD50	SOX2	XIAP
BLM	DNMT3B	FRS2	HOXB13	MAGI2	PAX5	RAD52	SOX9	XPO1
BMPR1A	DOT1L	FUBP1	HSD3B1	MALT1	PAX7	RAF1	SPEN	YAP1
BRD4	E2F3	FYN	HSP90AA1	MAP2K4	PAX8	RANBP2	SPOP	YES1
BTG1	EED	GABRA6	ICOSLG	MAP3K1	PBRM1	RARA	SPTA1	ZBTB2
C11orf30	EGFL7	GATA1	ID3	MAP3K13	PDCD1	RASA1	SRSF2	ZBTB7A
CALR	EIF1AX	GATA2	IFNGR1	MAP3K14	PDCD1LG2	RBM10	STAG1	ZFHX3
CASP8	EIF4A2	GATA3	IGF1	MAP3K4	PDK1	RECQL4	STAG2	ZNF217
CBFB	EIF4E	GATA4	IGF1R	MAPK1	PDPK1	REL	STAT3	ZNF703
CBL	EML4	GATA6	IGF2	MAPK3	PGR	RFWD2	STAT4	ZRSR2
CD274	EPCAM	GID4	IKBKE	MAX	PHF6	RHEB	STAT5A	
CD276	EPHA3	GLI1	IKZF1	MDC1	PHOX2B	RHOA	STAT5B	
	EPHA5	GNA13	IL10	MED12	PIK3C2B	RIT1	STK40	

Génfúziók és splice variánsok

ABL1	KDR
AKT3	KIF5B
ALK	KIT
AR	KMT2A (MLL)
AXL	MET
BCL2	MLLT3
BRAF	MSH2
BRCA1	MYC
BRCA2	NOTCH1
CDK4	NOTCH2
CSF1R	NOTCH3
EGFR	NRG1
EML4	NTRK1
ERBB2	NTRK2
ERG	NTRK3
ESR1	PAX3
ETS1	PAX7
ETV1	PDGFRA
ETV4	PDGFRB
ETV5	PIK3CA
EWSR1	PPARG
FGFR1	RAF1
FGFR2	RET
FGFR3	ROS1
FGFR4	RPS6KB1
FLI1	TMPRSS2
FLT1	
FLT3	
JAK2	

11. ábra. A Semmelweis Egyetem, I. Sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézetében kidolgozott komprehenzív genomikus profilozási eljárás által vizsgált gének listája. Forrás: Illumina TruSight Oncology 500 génlista (https://www.illumina.com)



TUMORTÍPUS	SZÁM
nőgyógyászati daganatok	25
tüdődagantok	15
központi idegrendszer	16
colorectalis daganatok	14
lágyrésztumorok	15
hematológiai malignitások	6
pancreasdaganatok	10
endokrin daganatok	12
emlődaganatok	9
urológiai daganatok	4
gyomordaganatok	3
egyéb daganatok	22
ÖSSZESEN	151

12. ábra. Komprehenzív genomikus profilozással vizsgált esetek megoszlása az I. Sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet Molekuláris Diagnosztika laboratóriumában.

Fontos kiemelni, hogy a korszerű multigénes NGS vizsgálatok esetében is kiemelt jelentőséggel bír a megfelelő minőségű és mennyiségű vizsgálati minta. Az NGS-vizsgálatok a szövettani minták mellett általában citológiai mintákból is elvégezhetők, azonban 20% alatti tumorsejtarány esetében a vizsgálat elvégzése nem javasolt.

Összefoglalás

A daganatok genetikai hátterének alapos feltérképezésével párhuzamosan számos új molekuláris és immunológiai támadáspontú kezelés került bevezetésre az onkológiában, ami új távlatokat nyitott a legtöbb daganattípus kezelésében, hozzájárulva a betegek hosszabb várható túléléséhez. Az így kialakult precíziós medicina egyik alappillérét nyújtja a molekuláris patológia/diagnosztika, melynek feladata az új kezelési lehetőségek sikeres alkalmazásához szükséges prediktív biomarkerek korszerű módszerekkel való érzékeny kimutatása. Mára a molekuláris patológia multidiszciplináris területté vált, ahol a klinikus és a beteg számára hasznosítható eredmények szolgáltatásához a korszerű technológiák alkalmazása mellett patológusok, molekuláris diagnoszták és bioinformatikusok szoros együttműködése szükséges.

Az elmúlt években e fejlődési folyamat magával hozta az újgenerációs szekvenálási technológiák meghonosítását a mindennapi diagnosztikában. Figyelembe véve a tényt, hogy a korszerű NGS vizsgálatok költ-

sége ma már nem haladja meg a szekvenciálisan végzett monogénes vizsgálatok költségét, a technológia további térnyerésére lehet számítani a közeljövőben. Ugyanakkor a vizsgálatokat végző laboratóriumok és az új technológiák akkreditációja, valamint a megfelelő minőségbiztosítás kidolgozása terén még számos teendő áll a szakma képviselői előtt.

Köszönetnyilvánítás

A közlemény a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal NVKP_16-1-2016-0004 támogatásával készült.

A szerzők köszönetet mondanak a Molekuláris Diagnosztika részleg munkatársainak, akik a vizsgálatok mindennapi kivitelezésében játszanak kulcsszerepet. Névszerint: *Abdul Kader Fatima, Bárányné Pallagi Adrienne, Bóha Éva, Bokányi-Balogh Viktória, Császár Krisztina, Csonka Katalin, Egedi Krisztina, Gróf Stefánia, Hegyi Lajos, Juhász-Nagy Laura, Kapczár Dóra, Lévay Luca, Lukátsiné Nagy Veronika, Moravcsik Éva, Presztolánszky Natália, Sárkány Andrea, Szikszai Katalin, Zajta Erik.*

Köszönet illeti *Kovalszky Ilona* professzor asszonyt a szolid tumorok molekuláris patológiai vizsgálatainak megalapozásáért és a szolid molekuláris diagnosztikai laboratórium vezetéséért egészen 2017-ig.

Irodalom

1. Kiraly AP, Alpar D, Fesus V, Marosvari D, Matolcsy A, Bodor C. [Introduction to the molecular diagnostic methods of oncohematology]. Magy Onkol 2016; 60:88-98.
2. O'Hare T, Zabriskie MS, Eiring AM, Deininger MW. Pushing the limits of targeted therapy in chronic myeloid leukaemia. Nat Rev Cancer 2012; 12:513-26.
3. Kiss R, Kiraly AP, Gaal-Weisinger J, Marosvari D, Gango PA, Demeter J, et al. [Molecular monitoring of myeloid leukemia]. Magy Onkol 2017; 61:57-66.
4. Krahling T, Balassa K, Meggyesi N, Bors A, Csomor J, Batai A, et al. [Complex molecular genetic algorithm in the diagnosis of myeloproliferative neoplasms]. Orv Hetil 2014; 155:2074-81.
5. Gango A, Mozes R, Boha Z, Kajtar B, Timar B, Kiraly PA, et al. Quantitative assessment of JAK2 V617F and CALR mutations in Philadelphia negative myeloproliferative neoplasms. Leuk Res 2018; 65:42-8.
6. Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, Caligaris-Cappio F, Dighiero G, Dohner H, et al. iwCLL guidelines for diagnosis, indications for treatment, response assessment, and supportive management of CLL. Blood 2018; 131:2745-60.
7. Malcikova J, Tausch E, Rossi D, Sutton LA, Soussi T, Zenz T, et al. ERIC recommendations for TP53 mutation analysis in chronic lymphocytic leukemia-update on methodological approaches and results interpretation. Leukemia 2018; 32:1070-80.
8. Rosenquist R, Ghia P, Hadzidimitriou A, Sutton LA, Agathangelidis A, Baliakas P, et al. Immunoglobulin gene sequence analysis in chronic lymphocytic leukemia: updated ERIC recommendations. Leukemia 2017; 31: 1477-81.
9. Aczél D, Mátrai Z, Kiss R, Balogh A, lllés S, Bödör C, et al. [Ibrutinib resistance in chronic lymphocytic leukemia]. Hematológia-Transzfuziológia 2019; 52:136-48.
10. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. Blood 2016; 127:2391-405.
11. Dohner H, Estey E, Grimwade D, Amadori S, Appelbaum FR, Buchner T, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. Blood 2017; 129:424-47.
12. Colomer R, Mondejar R, Romero-Laorden N, Alfranca A, Sanchez-Madrid F, Quintela-Fandino M. When should we order a next generation sequencing test in a patient with cancer? EClinicalMedicine 2020; 25:100487
13. Yoshida R. Hereditary breast and ovarian cancer (HBOC): review of its molecular characteristics, screening, treatment, and prognosis. Breast Cancer 2020; https://doi.org/10.1007/s12282-020-01148-2
14. Mosele F, Remon J, Mateo J, Westphalen CB, Barlesi F, Lolkema MP, et al. Recommendations for the use of next-generation sequencing (NGS) for patients with metastatic cancers: a report from the ESMO Precision Medicine Working Group. Ann Oncol 2020; 31:1491-505.
15. Chakravarty D and Solit DB. Clinical cancer genomic profiling. Nat Rev Genet 2021; https://doi.org/10.1038/s41576-021-00338-8
16. Pestinger V, Smith M, Sillo T, Findlay JM, Laes JF, Martin G, et al. Use of an Integrated Pan-Cancer Oncology Enrichment Next-Generation Sequencing Assay to Measure Tumour Mutational Burden and Detect Clinically Actionable Variants. Mol Diagn Ther 2020; 24:339-49.

HR+, HER2- MBC?*

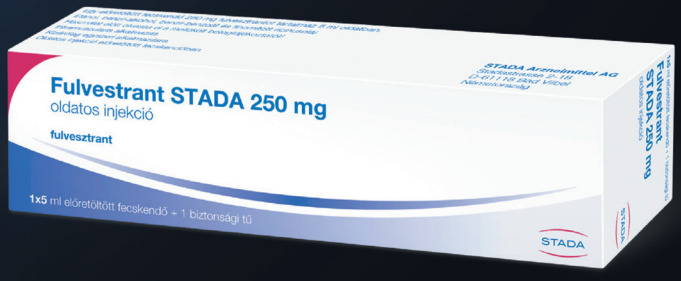
Fulvestrant® STADA 250 mg
oldatos injekció

A fulvesztrant:

- monoterápiában endokrin terápia naív vagy amellett relabált illetve progrediált betegeknek[1]
- palbociklibbel kombinálva, korábbi endokrin kezelés után[1]
- kompetitív ösztrogénreceptor (ER) antagonista, amely az ösztradiolhoz hasonló affinitással rendelkezik[1]
- downregulálja az ER proteint[1]
- downregulálja a Ki67 proliferációs markert[1]

Irodalom:
1. Fulvestrant STADA 250 mg oldatos injekció alkalmazási előírás. A szöveg ellenőrzésének dátuma: 2019. július 8.

*HR+, HER2- MBC - hormon receptor pozitív, humán epidermális növekedési faktor receptor 2 negatív lokálisan előrehaladott vagy metasztatikus emlőrák



Készítmény megnevezése	Bruttó fogyasztói ár (Ft)	Térítési díj kiemelt támogatás esetén (Ft)	Vonatkozó indikációs pont (Eü. pont)	Közgyógyon kiváltható-e
FULVESTRANT STADA 250 MG OLDATOS INJEKCIÓ 1x5ml előretöltött fecskendőben	44090	300	8/i4	Igen
Lokálisan, lokoregionálisan előrehaladott vagy metasztatikus, hormonreceptor pozitív emlőrákban, tamoxifen és aromatase-gátló - vagy ha a beteg korábban tamoxifent nem kapott, aromatase-gátló - kezelés után bekövetkező progresszió (elváltozások méretének 25%-os növekedése, vagy új gócok megjelenése) esetén				

A feltüntetett, 2021. január 1.-től érvényes árra vonatkozó adatokat a 2021. január 25.-én, a www.neak.gov.hu oldalon hozzáférhető adatok alapján közöltük. Az adatok visszavonásig érvényesek. Ez a tájékoztató orvosok és gyógyszerészek számára készült az OGYÉI honlapján megtalálható hatályos alkalmazási előírások alapján. A STADA HUNGARY Kft. nem vállal felelősséget a közölt információk illetéktelen felhasználásából eredő következményekért! A gyógyszerek rendelése előtt a figyelmeztetések, adagolással, alkalmazással kapcsolatos óvintézkedések, gyógyszerkölcsönhatások és egyéb interakciók tekintetében olvassa el a teljes alkalmazási előírást A gyógyszer alkalmazása során tapasztalt mellékhatásokat, kérjük, jelentse a +36 30 643 6850-es telefonszámon vagy a pharmacovigilance@stada.hu e-mailcimen.
Dokumentum lezárva: 2021. 01. 25.

RÖVIDÍTETT ALKALMAZÁSI ELŐÍRÁS

ATC kód: L02BA03
Hatóanyag: 250 mg fulvesztrant 5 ml olajos oldatban, előretöltött fecskendőben
A forgalomba hozatali engedély számai:
OGYI-T-23569/01 1x5 ml és OGYI-T-23569/02 2x5 ml
Bővebb információért olvassa el a gyógyszer alkalmazási előírását!
A QR kódot okostelefonnal lefényképezve az adott gyógyszer alkalmazási előírása nyílik meg.

STADA HUNGARY Kft. 1138 Budapest, Madarász Viktor utca 47-49.
www.stada.com

21STADAFULVMH2/2021.01.25.

Új generációs szekvenálás jelentősége a metasztatikus daganatok kezelésében – ESMO ajánlás és gyakorlati megfontolások

The role of next-generation sequencing as a diagnostic tool in oncology – ESMO guidelines and practical issues

Éles Klára, Tóth Erika
Országos Onkológiai Intézet, Sebészeti és Molekuláris Patológiai Osztály, Budapest
E-levél: toth.erika@oncol.hu

ÖSSZEFOGLALÁS A molekuláris genetikai vizsgálatokon alapuló személyre szabott gyógyítás számos eredményes új terápiás lehetőséget hozott az onkológiai kezelésekben. Miközben az új generációs szekvenálás (NGS) széles körben elterjedt, az alkalmazásának és az eredményeknek a felhasználására vonatkozó onkológiai irányelvek hiányoznak. Az Európai Klinikai Onkológus Társaság (ESMO) által kiadott ajánlás az NGS alkalmazására, illetve az alkalmazott panelek méretére vonatkozóan 3 területet különböztet meg: 1. ESCAT I. szintű mutációk vizsgálata a rutin klinikai ellátásban, 2. nagy génpaneles vizsgálatok klinikai kutató központokban és 3. a személyre szabott, egyes betegekre vonatkozó speciális megfontolások. Az ESMO precíziós munkacsoportja off-label gyógyszerek alkalmazásához a széleskörű genomikai vizsgálatot csak megfelelő hozzáférési program kidolgozása esetén javasolja. Ezek elvégzését elsősorban a klinikai kutató központokban tartja indokoltnak, mivel ott van lehetőség olyan klinikai és prospektív vizsgálatokra és gyógyszerfejlesztésekre, ami az NGS klinikai munkában betöltött pontos szerepét meghatározhatja a későbbiekben.

KULCSSZAVAK újgenerációs szekvenálás (NGS), széleskörű genetikai vizsgálat, metasztatikus tumorok

SUMMARY Precision cancer medicine holds great promises to offer more effective therapies to patients based on molecular profiling of their individual tumors. While next-generation sequencing (NGS) has been widely implemented, there are no recommendations about its use in every-day oncology practice. The European Society for Medical Oncology (ESMO) is proposing three levels of recommendations for the use of NGS: 1) routine molecular labs, 2) clinical research centers, and 3) individualized recommendations. ESMO recommends the use of off-label drugs matched to genomics only if an access program has been developed at the national level. ESMO recommends that clinical research centers develop multigene sequencing as a tool to screen patients eligible for clinical trials, to accelerate drug development, and prospectively capture data which could further help in optimalisation of this technology.

KEY WORDS next-generation sequencing (NGS), comprehensive genomic profiling, metastatic cancers

Bevezetés

A daganatos megbetegedések genetikai hátterének megismerése egyre hatékonyabb célzott terápiák felfedezéséhez és ezeknek a klinikai gyakorlatban való alkalmazásához vezetett. A patológiai és molekuláris patológiai diagnosztika a daganatos betegségek szűrésének, kezelésének és monitorozásának szerves részévé vált, az onkológiai spektrum teljes egészében jelentős szerepe van.[1, 2] A terápiás célpontok számának ugrásszerű növekedését elsősorban az újgenerációs szekvenálás (NGS, Next Generation Sequencing) kutatásban való alkalmazása, illetve a módszer mindennapi diagnosztikában való rutinszerű alkalmazásának elterjedése eredményezte. Kijelenthetjük, hogy mára a precíziós daganatterápia alapja az NGS alapú molekuláris diagnosztika lett. Az NGS kiválóan alkalmas arra, hogy a különböző genetikai eltéréseket – mutációkat, génfúziókat, génamplifikációkat – a klinikai gyakorlatban is gyorsan, egyszerre nagyszámú beteg anyagából kimutassuk. Jelenleg még a kisebb 30–50 gént tartalmazó panelek is drágábbak, mint a monogénes szekvenciális jellegű vizsgálat, ahol pl. a kizáró jellegű *KRAS* mutáció esetén nem végzünk további vizsgálatot. Ugyanakkor számos daganattípusban már költséghatékonyabb lehet a kisebb NGS panelek használata. A leggyakoribb daganatok közül a tüdő-adenocarcinomák nagyszámú célzott terápiás lehetősége mutatja leginkább, mekkora fejlődés történt az elmúlt 20 évben. A daganatok döntő többségének kezeléséhez ma már az első vonalas terápiák megkezdése előtt elengedhetetlen a részletes molekuláris patológiai vizsgálat.

Rövidítések

NGS	*újgenerációs szekvenálás*
ESMO	*Európai Klinikai Onkológia Társaság*
CGP	*komprehenzív genomikai profilozás*
ESCAT	*ESMO Scale of Clinical Actionability for molecular Targets*
MTB	*molekuláris tumor board*
TMB	*tumor mutációs teher*

Precíziós medicina gyakorlati problémái

Az NGS alapú vizsgálatok szélesebb körű alkalmazásának részben finanszírozási, részben a rendelkezésre álló minták mennyiségéből és minőségéből eredő korlátai vannak. Ezen túl számos daganattípusban a kiterjedt kutatások ellenére jelenleg még nem állnak rendelkezésre egyértelműen hatásos terápiák alapjául szolgáló biomarkerek, illetve a potenciális biomarkerek jelentőségére nézve nincsenek megfelelő klinikai evidenciák. Miközben az NGS alapú széles körű genetikai vizsgálat ma már technikailag nem okoz gondot, a szekvenálás során keletkező adatok elemzése, és ezek klinikai jelentőségének értékelése óriási kihívás. A technikai fejlődés és a módszer implementációja gyorsabban történt, minthogy az eredmények nagy részét hasznosítani tudnánk a mindennapi gyakorlatban. Mindezek miatt nagyon fontos, hogy a meglévő anyagi forrásokat és a betegek rendelkezésre álló mintáit a legoptimálisabban használjuk fel és ezáltal a lehető legtöbb beteg hozzájuthasson a valóban hatékony terápiákhoz.

ESMO irányelvek, a metasztatikus daganatok NGS alapú molekuláris diagnosztikája

Az ESMO (Európai Klinikai Onkológia Társaság, European Society for Medical Oncology) precíziós medicina munkacsoportja világos irányelveket fogalmazott meg a metasztatikus daganatok NGS alapú vizsgálatára, az ún. széleskörű genomikai vizsgálatnak (CGP, Comprehensive Genomic Profiling) a klinikai alkalmazására vonatkozóan.[3] A különböző daganatokban eddig leírt mutációkat az ezekhez rendelhető célzott terápiák validáltsága alapján 4 ún. ESCAT (ESMO Scale of Clinical Actionability for molecular Targets) szintbe sorolták be.[4] Az ESCAT I-es szintbe tartozó mutáció olyan genetikai eltérés, amihez validált, napi rutinban használt célzott terápia kapcsolódik. Ilyennek tekinthetők pl. tüdő adenocarcinomák esetén az *EGFR* gén gyakori mutációi (*EGFR* 19 exon deléció) vagy a her-2 amplifikáció emlőrákokban. ESCAT II-es szintű mutációkhoz fázis I/II vagy retrospektív vizsgálatokban hatásos célzott terápia kapcsolódik, a III-as szintű csoportba olyan genetikai eltérések sorolhatók, amelyek jelentőségét már másik tumortípusban igazolták, de a kezelendő daganattípusban nem. A IV-es csoportba tartoznak azok a genetikai eltérések, melyek preklinikai adatok alapján feltételezhetően alkalmasak lehetnek célzott terápiára *(1. táblázat)*. További példaként a *2. táblázatban* a tüdő adenocarcinomák prediktív markereinek ESCAT szintek szerinti besorolása látható.

Az ESMO ajánlás az NGS alkalmazására, illetve az alkalmazott panelek méretére vonatkozóan 3 területet különböztet meg: ESCAT I. szintű mutációk vizsgálata a rutin klinikai ellátásban (1), nagy génpaneles vizsgálatok klinikai kutató központokban (2), és a személyre szabott, egyes betegekre vonatkozó speciális megfontolások (3). A leggyakoribb daganattípusokban a rutin diagnosztikára vonatkozó ajánlásokat a *3. táblázatban* foglaltuk össze. A nagy génpaneles vizsgálatok elsősorban a klinikai kutatóközpontok számára javasoltak. Itt van lehetőség új gyógyszerek kipróbálására, ami egyben hozzájárul a klinikai kutatások felgyorsításához is. Ez különösen fontos emlő-, pancreas- és hepatocellularis carcinomákban, ahol nagyon sok ESCAT II–IV-be tartozó mutációt azonosítottak. Nagy génpanelek alkalmazásával ritkán klinikailag olyan releváns mutációk azonosíthatók, melyeket kisebb panelekkel nem lehet azonosítani, de ezek döntő többségében ESCAT III–IV. szintű mutációk. Az orvos és a beteg olyan esetekben, amikor a multigénes vizsgálat egyébként nem indokolt, dönthet úgy, hogy multigénes NGS vizsgálat történjen, de az ajánlás szerint ennek a finanszírozása nem okozhat extra költséget az állami egészségügynek, a beteget pedig részletesen fel kell világosítani arról, hogy kicsi a valószínűsége annak, hogy terápiás célpontot találnak, illetve a gyógyszer hozzáférés nehézségeiről is részletesen tájékoztatni kell. A multigénes vizsgálatok indikációja esetén mindig kiemelten fontos a gyógyszerhozzáférést figyelembe venni.

A tumoragnosztikus terápiák, amelyek specifikus molekuláris eltérés alapján (*NTRK1-3* és *RET* fúzió, TMB, mikroszatellita instabilitás) a daganat kiindulási

1. táblázat: ESCAT (ESMO Scale of Clinical Actionability for molecular Targets) szintek definíciója

ESCAT SZINT	DEFINÍCIÓ
Szint I	Genetikai eltérés, melyhez validált, napi rutinban használt célzott terápia kapcsolódik.
Szint II	Genetikai eltérés, melyhez fázis I/II vagy retrospektív vizsgálatokban hatásos célzott terápia kapcsolódik
Szint III	Olyan genetikai eltérés, mely másik tumortípusban már validált, de a kezelendő daganattípusban nem
Szint IV	Olyan genetikai eltérés, ami preklinikai adatok alapján feltételezhetően alkalmas lehet célzott terápiára.

2. táblázat: Terápiás célpontok és ezek ESCAT szintje tüdő adenocarcinomák esetén

GÉN	GENETIKAI ELTÉRÉSEK	ELŐFORDULÁSI GYAKORISÁG	ESCAT LEVEL
EGFR	Gyakori mutációk (Del19, L858R) Szerzett T790M exon 20 Ritka *EGFR* mutációk (G719X 18-as exon, L861Q 21-es exon, S768I 20-as exon) Exon 20 insertio	15% 50% TKI rezisztencia 10% 2%	IA IA IB IIB
ALK	Fúzió	5%	IA
MET	Mutáció 14 exon skipping Amplifikáció (*EGFR* TKI szerzett rezisztencia)	3% 3%	IB IIB
BRAF (V600E)	Mutáció	2%	IB
ROS1	Fúzió	1–2%	IB
NTRK	Fúzió	0,23–3%	IC
RET	Fúzió	1–2%	IC
KRAS (G12C)	Mutáció	12%	IIB
ERBB2	Hotspot mutáció Amplifikáció	2–5%	IIB
BRCA1/2	Mutáció	1,2%	IIIA
PIK3CA	Hotspot mutáció	1,2-7%	IIIA
NRG1	Fúzió	1,7	IIIB

helyétől függetlenül bármilyen daganattípusban használhatók, szintén kérdéseket vetnek fel a multigénes NGS panelek alkalmazására vonatkozóan.[4-6] Az *NTRK* fúzió esetén az ESMO ajánlás szerint, mivel a daganatok döntő többségében <1%-ban fordul elő, a secretoros nyálmirigy és emlőcarcinomát, illetve a sarcomákat és pajzsmirigy papilláris carcinomát kivéve, NGS alapú vizsgálat elsősorban azokban a daganatokban javasolt, ahol eleve ez az elsődleges vizsgálómódszer. Más esetben elsősorban költséghatékonyságot figyelembe véve érdemes dönteni arról, hogy NGS alapú vizsgálat történjen, vagy egyéb szűrőmódszert alkalmazzunk. Az immunterápiák térhódítása miatt a tumor mutációs teher (TMB) vizsgálatának igénye szintén egyre gyak-

3. táblázat: NGS vizsgálatokra vonatkozó ajánlások a rutin diagnosztikában a leggyakoribb daganatok esetén

TUMORTÍPUS	ÁLTALÁNOS AJÁNLÁSOK A RUTIN DIAGNOSZTIKÁBAN
Tüdő adenocarcinoma	Multigénes panelek használata (DNS és RNS alapú) level I mutációk detektálására javasolt. Nagyobb panelek alkalmazásához egyedi finanszírozási háttér szükséges, illetve az eredmények értelmezésénél egyértelműen jelezni kell az egyes mutációk evidencia szintjét.
Tüdő-laphámcarcinoma	Jelenleg multigénes NGS nem indokolt.
Emlőcarcinoma	Jelenleg multigénes NGS nem indokolt.
Coloncarcinoma	Multigénes NGS lehetséges alternatíva, amennyiben a PCR vizsgálatoknál nem drágább.
Prostatacarcinoma	Multigénes panelek használata I. szintű mutációk detektálására javasolt. Nagyobb panelek alkalmazásához egyedi finanszírozási háttér szükséges, illetve az eredmények értelmezésénél egyértelműen jelezni kell az egyes mutációk evidencia szintjét.
Gyomorcarcinoma	Jelenleg multigénes NGS nem indokolt.
Pancreascarcinoma	Jelenleg multigénes NGS nem indokolt.
Hepatocellularis carcinoma	Jelenleg multigénes NGS nem indokolt.
Cholangiocellularis carcinoma	Multigénes panelek használata I. szintű mutációk detektálására javasolt. Nagyobb panelek alkalmazásához egyedi finanszírozási háttér szükséges, illetve az eredmények értelmezésénél egyértelműen jelezni kell az egyes mutációk evidencia szintjét.
Egyéb tumorok	Tumor multigénes panel szomatikus *BRCA1/2* mutáció detektálására ovarium-, pancreas- és prostatacarcinomában. Nagy multigénes paneleket lehet haszálni ismeretlen primer tumor esetén. TMB meghatározás javasolt: cervicalis, vulva, nyálmirigy, pajzsmirigy carcinomákban és jól-közepesen differenciált neuroendokrin tumorokban.

TMB: tumor mutációs teher

rabban merül fel. Itt az irányelv szerint mérlegelni kell, hogy mely esetekben nem alkalmas a PD-L1 immunhisztokémiai vizsgálat, mint prediktív marker. A rendelkezésre álló klinikai vizsgálatok alapján a TMB-t ESCAT IIA kategóriába sorolták és jelenleg elsősorban méhnyak-, nyálmirigy-, vulva- és pajzsmirigy-carcinoma, illetve neuroendokrin tumorok esetén javasolt a meghatározása.[7]

Gyakorlati megfontolások, molekuláris diagnosztika és célzott terápiák

Mivel az onkológiai ellátás rendkívül költséges része az egészségügyi rendszereknek, az ezzel kapcsolatos problémák, a költséghatékonyságra vonatkozó kérdések a világ minden részén felmerülnek, az adott ország gazdasági helyzetétől függetlenül. Számos munkacsoport foglalkozott az elmúlt években a precíziós medicina gyakorlati problémáival.[8, 9] Az optimális működés feltételei az alábbiakban foglalhatók össze:

1. A molekuláris vizsgálat beépítése a klinikai gyakorlatba.
2. A célzott terápiák alapjául szolgáló mutációk definiálása és ezek klinikai értelmezésének harmonizálása.
3. A molekuláris onco-team (MTB – molecular tumor board) kialakítása és feladatainak meghatározása.
4. Hozzáférés az új terápiás lehetőségekhez és ezeknek irányelvekben történő rögzítése.
5. Strukturált adatgyűjtés a klinikai adatokra és az utánkövetésre vonatkozóan.
6. A molekuláris diagnosztika és célzott terápia finanszírozása.

A jövőben várható a szekvenálási költségek további csökkenése, ami minden valószínűség szerint az egyre nagyobb panelek alkalmazásának irányába fogja eltolni a rutin molekuláris patológiai diagnosztikát. A nagyobb panelek alkalmazása lehetővé teszi különböző szövettani típusú daganatok egyidejű vizsgálatát, illetve a prediktív markerek egyidejű meghatározását, ami jelentősen rövidítheti a leletátfutási időt, a laboratóriumok munkamenetének egyszerűsödése miatt. Ugyanakkor komoly bioinformatikai kihívást jelent és rendkívül fontos, hogy a szekvenálás eredményeit az aktuális terápiás evidenciákat és gyógyszerhozzáférést figyelembe véve adjuk meg. Ebben a folyamatban a molekuláris onkoteamek szerepe egyre fontosabb lesz. Míg az ESCAT I. szintű mutációk vizsgálatának javaslata a szervspecifikus onkoteamekben történik, addig a széleskörű genomikai vizsgálatok indikációja és eredményeinek komplex értelmezése a molekuláris onkoteam feladata. Számos vizsgálat igazolta, hogy megfelelően működő molekuláris onkoteam esetén jelentősen javulnak a betegek túlélési adatai.[10] Ideális esetben a molekuláris onkoteam tagjai klinikai onkológusok, molekuláris patológus, bioinformatikus, többféle klinikai szakember, klinikai és molekuláris genetikus és klinikai vizsgálatokban, illetve gyógyszerhozzáférésben jártas szakember. A széleskörű genetikai vizsgálat indikációja mellett az eredmények értelmezése és ezek alapján a terápiás javaslat felállítása is az onkoteam feladata. Minden onkoteam működését megkönnyíti, ha a beteg kezelőorvosa is részt vesz a megbeszélésen, hiszen ő ismeri legjobban a beteget és később az ő feladata az onkoteam döntésének a beteggel történő megbeszélése és a beteggel együtt a végső terápiás döntés kialakítása.

A nemzetközi irányelvek alkalmazásán túl fontos az ország specifikus gyógyszerhozzáférésekre vonatkozó irányelvek kidolgozása és ezek folyamatos aktualizálása.

A jobb átláthatóság, a klinikai kutatások és retrospektív vizsgálatok miatt a standardizált leletezés kiemelten fontos a molekuláris laboratóriumokban, olyan formátumban, ami a strukturált adatgyűjtést lehetővé teszi. A leleteknek minden esetben tartalmaznia kell a detektált mutációk jelentőségét (patogén, benignus, ismeretlen jelentőségű) és ezek klinikai konzekvenciáit.

Elmondhatjuk, hogy Magyarországon az elmúlt években megtörtént a molekuláris patológiai diagnosztika beépülése a klinikai gyakorlatba. A jelenleg működő molekuláris patológiai centrumok az ESCAT I. szintbe tartozó mutációk vizsgálatát rutinszerűen végzik. Több laboratórium pedig felkészült a széleskörű genomikai vizsgálatokra is. Az Országos Onkológiai Intézetben megkezdte működését az Országos Molekuláris Onkológiai Bizottság, aminek egyik legfontosabb célja, hogy a széleskörű genomikai vizsgálatok valóban azon esetekben történjenek meg, ahol a betegek számára hatékony terápiás célpontok azonosítása várható. A költséghatékonyság az alapvető feltétele annak, hogy minden olyan beteg számára, akinél valóban szükséges ezen vizsgálat, elérhető legyen. A jelenlegi költségeket figyelembe véve elmondható, hogy egyetlen nagy génpaneles vizsgálat árából két-három beteg daganatának 50–100 génes panellel történő vizsgálata végezhető el. Ezen kisebb génpaneles vizsgálatok szinte a világban ma elérhető összes célzott terápia alkalmazásához szükséges prediktív genetikai eltérés vizsgálatát lehetővé teszik és jelenleg költséghatékonyabbak, mint a nagy génpaneles vizsgálatok.

Fontos lenne, hogy az egyre növekvő igények miatt a finanszírozás lépést tartson a szakmailag valóban indokolt vizsgálatok térítésével. Az ESMO irányelvhez hasonlóan szükség volna hazai irányelvre, ami pontosan szabályozza a vizsgálati szinteket és a finanszírozott vizsgálatok körét, illetve összehangolja a laboratóriumok munkáját. Véleményünk szerint az egyes laboratóriumok és a laboratóriumokhoz tartozó molekuláris onkoteamek működési területének meghatározása jelentősen növelné az átláthatóságot és hatékonyságot is. A vizsgálatok minőségbiztosítása elengedhetetlen. Ezen a téren is történtek előrelépések, a molekuláris patológiai laboratóriumok többsége rendszeresen részt vesz az Európai Patológus Társaság által szervezett vagy más nemzetközi minőségbiztosítási körvizsgálatokban. Az Európai Patológus Társaság honlapján elérhető az eredményesen szereplő laboratóriumok listája. Ugyanakkor a molekuláris diagnosztika relatíve magas költségigénye és jelentősége miatt véleményünk szerint a jelenleginél szigorúbb egységes minőségbiztosítási rendszer volna kívánatos.

Lényeges az irányelvek folyamatos aktualizálása, hiszen az egyik leggyorsabban változó területről van szó. Emellett a széleskörű genetikai vizsgálatok értéke csak akkor mérhető, ha a vizsgálatok eredményére és az indikált terápiák hatékonyságára vonatkozó pontos adatgyűjtés is történik. Fontos lenne a nemzetközi adatbázisokhoz való kapcsolódás vagy saját regiszter kialakítása, ami tartalmazza a vizsgálatok eredményét, az ezek alapján indikált terápiákat és a hatékonyságra vonatkozó betegadatokat.

Összefoglalás

Miközben az NGS alapú molekuláris vizsgálatok a molekuláris patológiai diagnosztika szerves részévé váltak, az ezen vizsgálatokból származó információk terápiás hasznára, felhasználására vonatkozó irányelvek jórészt hiányoznak. Az ESMO precíziós medicina munkacsoportjának ajánlásai hiánypótlók ezen a téren. Az egyes mutációkat a terápiás evidenciák alapján négy ESCAT csoportba sorolják. Az ESCAT I szintű mutációk vizsgálatát javasolják a rutin laboratóriumokban. A széleskörű genomikai vizsgálatokat a klinikai kutató központok fontos feladatának tartják, mivel ott elérhetőek a klinikai vizsgálatok és új gyógyszerfejlesztések. Egyik legfontosabb alapelvnek a széleskörű genomikai profilozás indikációja során a gyógyszerhozzáférés figyelembe vételét tekintik. Hangsúlyozzák, hogy ha a beteg és a kezelőorvos a nagy génpaneles vizsgálat mellett dönt annak ellenére, hogy minimális esélye van terápiás jellegű prediktív mutáció azonosításának, erről a beteget részletesen fel kell világosítani, illetve a vizsgálat költsége nem terhelheti a közösségi egészségügyi rendszert. Mivel rendkívül gyorsan fejlődő területről van szó, az irányelveket folyamatosan aktualizálni kell. Magyarországon a molekuláris patológiai laboratóriumok felkészültek az NGS alapú vizsgálatokra, de a jövőben fontos feladat lesz a laboratóriumok működésének szintjeit és az ehhez tartozó finanszírozást meghatározni, illetve az aktuális gyógyszerhozzáférésnek megfelelő irányelveket kidolgozni a nem ESCAT I szintű terápiák esetén.

Irodalom

1. Matteo F. Molecular Diagnostics in Pathology Time for a Next-Generation Pathologist? Arch Pathol Lab Med 2018; 142:313-20.
2. Salto-Tellez M, James JA, Hamilton P. Molecular pathology-The value of an integrative approach. Molecular Oncology 2014; 8:1163-8.
3. Mosele F, Remon J, Mateo J, Westphalen CB, Barlesi F, Lolkema MP et al. Recommendations for the use of next-generation sequencing (NGS) for patients with metastatic cancers: a report from the ESMO Precision Medicine Working Group. Ann Oncol 2020; 11:1491-505.
4. Mateo J, Chakravarty D, Dienstmann R, Jezdic S, Gonzalez-Perez A, Lopez-Bigas N et al. A framework to rank genomic alterations as targets for cancer precision medicine: the ESMO Scale for Clinical Actionability of molecular Targets (ESCAT). Ann Oncol 2018; 29:1895-902.
5. Marcus L, Lemery SJ, Keegan P, et al. FDA approval summary: pembrolizumab for the treatment of microsatellite instability-high solid tumors. Clin Cancer Res 2019; 25(13):3753-8.
6. Hong DS, DuBois SG, Kummar S, et al. Larotrectinib in patients with TRK fusion-positive solid tumours: a pooled analysis of three phase 1/2 clinical trials. Lancet Oncol 2020;21(4):531-40.
7. Marabelle A, Fakih M, Lopez J, Shah M, Shapira-Frommer R, Nakagawa K et al. Lacet Oncol 2020; 21(10):1353-65.
8. Westphalen BC, Bokemeyer C, Büttner R, Fröhling S, Gaidzik VI, Glimm H et al. Conceptual framework for precision cancer medicine in Germany: Consensus statement of the Deutsche Krebshilfe working group 'Molecular Diagnostics and Therapy' European Journal of Cancer 2020; 135:1-7.
9. Shao-Peng Tan D, Shao-Weng Tan D, Huat Tan IB, Yan B, Choo SP, Chng WJ et al. Recommendations to improve the clinical adoption of NGS-based cancer diagnostics in Singapore. Asia-Pac J Clin Oncol 2020; 16:222-31.
10. Kato S, Kim KH, Lim HJ, Boichard A, Nikanjam M, Weihe E et al. Real-world data from a molecular tumor board demonstrates improved outcomes with a precision N-of-One strategy. Nature Communications 2020; 11: 4965.

EGIS
ONKOLÓGIA
HEMATOLÓGIA

ÉLET. MINŐSÉG.

LATIB® IMATINIB

Zegonig® BORTEZOMIB

ANABREST® anastrozol

Verimmus EVEROLIMUS

ZitazOnium® tamoxifen

etruzil letrozol

PELMEG® ▼ Pegfilgrastim

▼ Ez a gyógyszer fokozott felügyelet alatt áll, mely lehetővé teszi az új gyógyszerbiztonsági információk gyors azonosítását.

Bármely említett termék alkalmazásakor az érvényes alkalmazási előírás az irányadó. Termékeink árváltozásával és rendelhetőségével kapcsolatos információkért forduljon key account manager kollégáinkhoz, illetve ezekről tájékozódhat a Nemzeti Egészségbiztosítási Alapkezelő (NEAK) honlapján: **neak.gov.hu**

Ez a tájékoztató anyag orvosok és gyógyszerészek számára készült. Az Egis Gyógyszergyár Zrt. nem vállal felelősséget a közölt információk illetéktelen felhasználásából eredő következményekért. A termékről további tájékoztatás kapható key account manager kollégáinktól, illetve a náluk található információs anyagokból.

Az egészségügyi szakembereket arra kérjük, hogy jelentsenek bármilyen feltételezett mellékhatást.

Amennyiben termékeink alkalmazása során „nemkívánatos eseményt" észlel, kérjük, 24 órán belül jelentse a következő e-mail címen: **pharmacovigilance@egis.hu**, vagy a **+36 1 803 2222** telefonszámon!

HU20/21ONC3PA1

Egis Gyógyszergyár Zrt., Specialista Üzletág
1134 Budapest, Lehel u. 15.
Tel.: +36 1-803 2222
E-mail: marketing@egis.hu
honlap: hu.egis.health
Lezárás dátuma: 2021.03.16.

EGIS mundipharma

A folyadékbiopszia nyújtotta lehetőségek a szolid daganatok molekuláris diagnosztikájában

Potential applications of liquid biopsy-based analyses in molecular diagnostics of solid tumors

Nagy Ákos, Lévay Luca, Zajta Erik, Papp Gergő
I. Sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet, Semmelweis Egyetem, Budapest
E-levél: papp.gergo@med.semmelweis-univ.hu

ÖSSZEFOGLALÁS A molekuláris biológiai technikák utóbbi évtizedekben látott fejlődésének köszönhetően a plazmában keringő tumor eredetű makromolekulák, így a tumor eredetű szabad keringő DNS-molekulák korábban elképzelhetetlen mélységű vizsgálata vált elérhetővé, mely eljárást folyadék- (likvid) biopsziának nevezzük. A vizsgálat előnyei közé a minimálinvazivitás, a különböző anatómiai lokalizációkban található tumorklónok egyidejű vizsgálatának lehetősége (térbeli heterogenitás) mellett a klonális evolúció és az egyes onkológiai terápiák hatására létrejövő molekuláris folyamatok időbeli nyomonkövetése (időbeli heterogenitás) tartozik. Az utóbbi években számos folyadékbiopsziával foglalkozó tanulmány jelent meg a szolid tumorok kapcsán, a nem-kissejtes tüdőrák és a vastagbélrákok esetén az eljárás már a rutin diagnosztika részét is képezi. Irodalmi adatok alapján a tumor eredetű sejtmentes DNS vizsgálata hasznos lehet a kezelést megelőző prognózisbecslésben, a prediktív biomarkerek azonosításában, a terápiás hatékonyság monitorozásában, valamint a minimális reziduális betegség kimutatásában. Jelen összefoglaló közleményünkben a folyadékbiopsziás vizsgálatok alkalmazhatóságát tekintjük át a szolid tumorok vonatkozásában.

KULCSSZAVAK folyadékbiopszia, keringő sejtmentes DNS, keringő tumor-DNS

SUMMARY Technological advances in the field of molecular biology during the past decades allow for the scrutiny of tumor derived biomolecules, including circulating tumor DNA fragments at an unprecedented level. The approach is referred to as liquid biopsy, whose main advantages include the minimally invasive nature, the possibility to simultaneously analyze tumor DNA derived from different anatomical locations (spatial heterogeneity), the ability to detect clonal evolution and longitudinally monitor treatment related molecular responses (temporal heterogeneity) in patients receiving antitumor therapy. Recently, several studies were published interrogating the utility of the approach in solid tumors, which is already incorporated into the diagnostic guidelines of non-small cell lung cancer and colorectal cancer. Based on the literature, liquid biopsy has the potential to determine prognosis, to identify predictive biomarkers prior to specific treatments and to monitor therapeutic efficacy and minimal residual disease. Here, we review the potential applications of liquid biopsy in the field of solid tumors.

KEY WORDS liquid biopsy, circulating free DNA, circulating tumor DNA

A daganatos megbetegedések világszerte, így Magyarországon is a halálozási statisztikák élén járnak. Hazánkban a 2018-ban diagnosztizált új daganatos esetek száma meghaladta a 70 000-et, a halálozások száma pedig túllépte a 33 000 főt. A 75 éves kor előtt kialakult tumoros megbetegedések kockázata a magyar populációban 35,1%-nak, a mortalitási rizikó 16,9%-nak adódott (WHO Global Cancer Observatory 2018). Ezek az adatok arra utalnak, hogy a korai diagnosztikában és az alkalmazott kezelések hatékonyságának nyomonkövetésében az egyre magasabb számú betegpopuláció hatékony és korszerű ellátására van szükség. Ugyanakkor a szolid daganatok magas térbeli és időbeli heterogenitása jelentős akadály a precíziós orvoslás előrehaladásában és fejlesztésében, mivel a tumor biopsziás mintavételek hosszú ideig tartó sorozata szükséges a daganatok genetikai evolúciójának követéséhez és megértéséhez. Ezek a kihívások indukálták a likvid- (folyadék) biopszia alapú vizsgálatok kidolgozását és ma már bevonását is a rutin diagnosztikus vizsgálatok tárházába. A folyadékbiopsziák a klinikumban jelenleg domináló szöveti biopsziákhoz képest számos előnnyel bírnak,

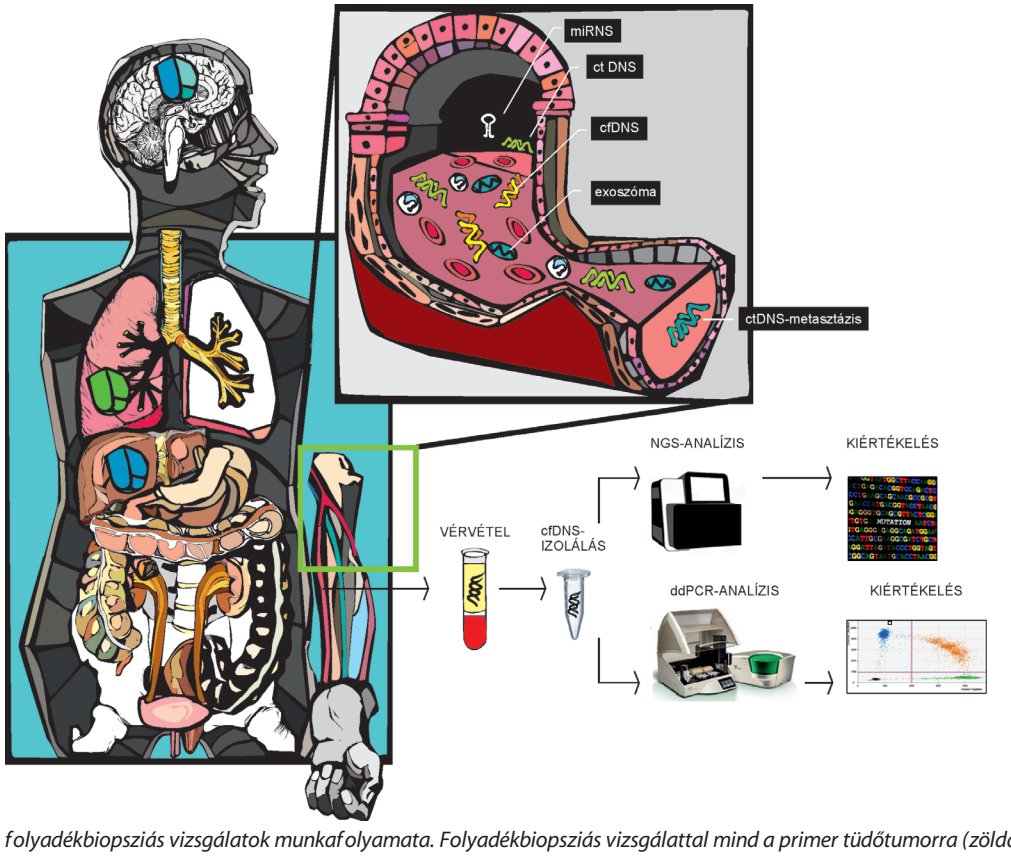
Rövidítések

cfDNS	*keringő szabad DNS*
cfRNS	*keringő szabad RNS*
CRC	*colorectalis carcinoma*
CTC	*keringő tumorsejt*
ctDNS	*keringő tumor DNS*
CUP	*cancer of unknown primary*
DdPCR	*digitális droplet PCR*
FDA	*Amerikai Élelmiszer és Gyógyszerengedélyeztetési Hivatal*
GBM	*glioblasztóma multifome*
MRD	*minimális reziduális betegség*
NGS	*újgenerációs szekvenálás*
NIPT	*non-invazív prenatális teszt*
NSCLC	*nem-kissejtes tüdőrák*
OS	*teljes túlélés*
PFS	*progressziómentes túlélés*
VAF	*variáns allél frekvencia*
WES	*teljes exom szekvenálás*
WGS	*teljes genom szekvenálás*

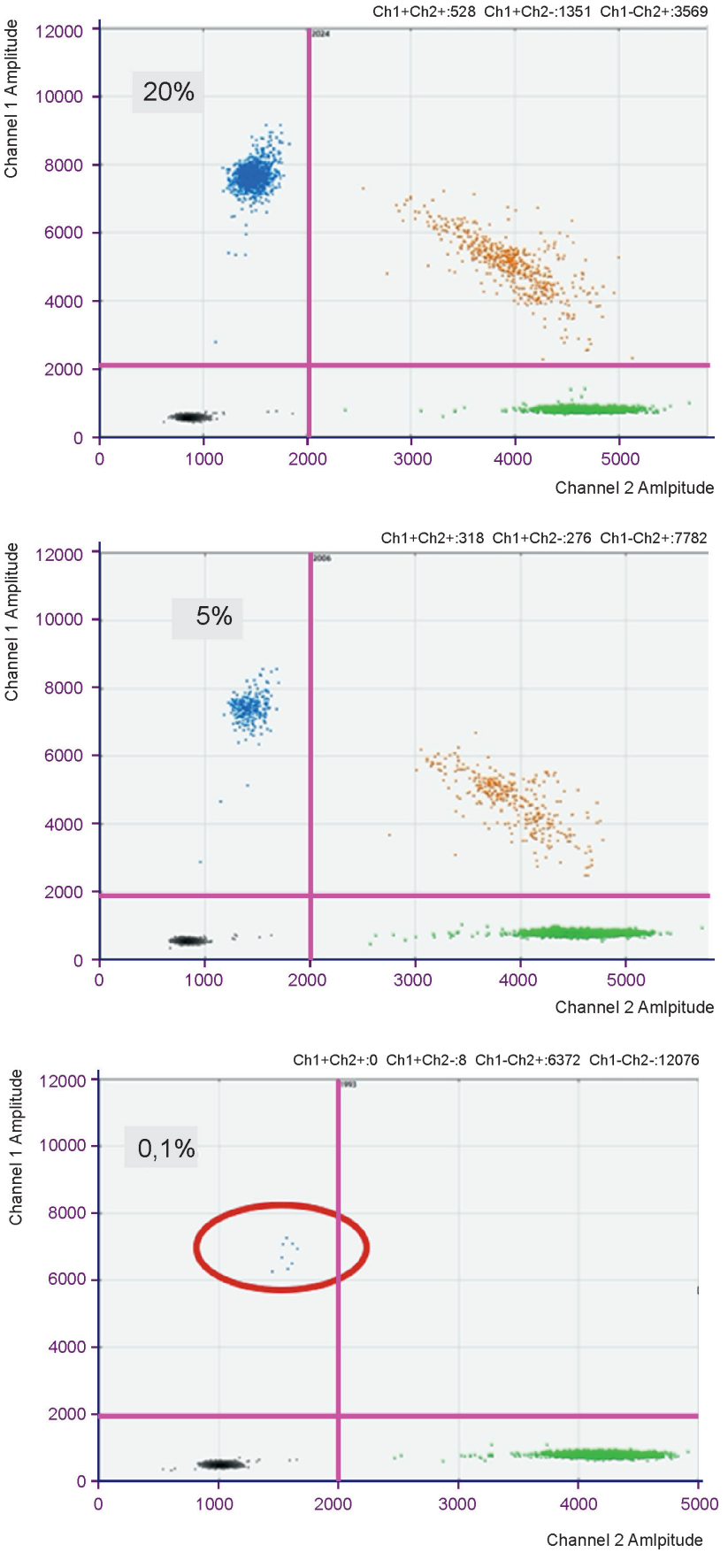
melyek között elsőként említendő a minimál- invazivitás. Az előnyök magukban foglalják továbbá a reprodukálhatóságot, a költséghatékonyságot és a daganatok szélesebb spektrumú felismerésének képességét. A daganatokból felszabaduló és a véráramban keringő molekulák közül jelenleg a legfontosabb biomarkernek a keringő szabad DNS (cfDNS) fragmentumok számítanak, melynek a tumorból eredő frakcióját keringő tumor DNS-nek (ctDNS) nevezzük. Jelenleg a folyadékbiopszia a klinikusok számára limitációkkal elérhető rutinvizsgálatnak számít Magyarországon, de a lehetséges alkalmazások köre a molekuláris diagnosztikát végző centrumokban gyorsan növekszik. Ebben az összefoglaló tanulmányban a folyadékbiopsziáknak a szolid tumorok klinikai gyakorlatában rejlő legfontosabb alkalmazási lehetőségeit tekintjük át.

A folyadékbiopszia

A folyadék- vagy likvidbiopszia a perifériás vérben levő cfDNS vizsgálatán túl egyéb biomolekulák (pl. RNS vagy intakt sejtek) vérplazmából, illetve más testfolyadékból, például nyálból, vizeletből, pleuralis vagy cerebrospinalis folyadékból való kinyerését és kimutatását jelenti.[1, 2] A vérplazmában detektálható cfDNS általánosságban mintegy 150–200 bázispár hosszúságú, kétszálú nukleotidfragmentumokból áll és körülbelül 4–5 óra féléletidővel bír.[3] Az egészséges egyénekből származó cfDNS alacsony szintje (átlagosan kb. 10–15 ng/ml) szöveti stressz pl. gyulladás, műtéti beavatkozás vagy sérülés hatására növekedhet[4] A keringő tumorsejtek (CTC) diagnosztikai alkalmazhatósága a daganatok többségében korlátozott a véráramba bekerült alacsony mennyiségük miatt.[5] Ezzel ellentétben, a daganatos sejtek apoptózisa és nekrózisa útján passzívan vagy a sejtekből aktív szekrécióval kijutó és a vérplazmában cirkuláló ctDNS kimutatása számos daganatos entitás esetében hatékonyan kivitelezhető. A ctDNS mennyisége tág határokon belül változik, jelentheti az összes sejtmentes DNS csupán 0,1, de akár a 90%-át is.[6] Emiatt a ctDNS vizsgálata magas szenzitivitású technológiákhoz, PCR és szekvenálás alapú módszerekhez kötött *(1. ábra)*. A PCR módszerek közül nagy érzékenysé-



1. ábra. A folyadékbiopsziás vizsgálatok munkafolyamata. Folyadékbiopsziás vizsgálattal mind a primer tüdőtumorra (zölddel jelölt tumoros terület) mind az áttétekre (kékkel jelölt tumoros területek) jellemző molekuláris eltérések vizsgálatára lehetőség nyílik a vérben keringő tumor DNS (ctDNS) analízisével (kékkel és zölddel jelölt DNS fragmentumok). A ctDNS fragmentumok mellett a vérben daganat-asszociált exoszómák és miRNS-ek is vizsgálhatók. A leggyakrabban használt ctDNS alapú technikák az egyes gének „hotspot" eltéréseinek vizsgálatára alkalmas digitális droplet PCR és az akár teljes genom lefedettségű vizsgálatokra képes újgenerációs szekvenálás. cfDNS: keringő szabad DNS, ctDNS: keringő tumor DNS, NGS: újgenerációs szekvenálás, ddPCR: digitális droplet PCR.



2. ábra. Eltérő allél frekvenciák kimutatása digitális droplet PCR segítségével. A digitális droplet PCR (ddPCR) reakció eredményeként kétdimenziós grafikonon jelennek meg a mutáns (kék színnel jelölt) és a vad típusú (zöld) DNS-t tartalmazó dropletek. A mutáns és a vad típusú DNS-t is tartalmazó dropletek narancssárga, az üres dropletek szürke színnel jelölődnek. A variáns allél frekvenciát a mutáns DNS-t tartalmazó dropletek összegének (kék + narancssárga), illetve a DNS-t tartalmazó, nem üres dropletek összegének (kék + narancssárga + zöld) a hányadosa adja. A ddPCR nagy érzékenységének köszönhetően nagyon alacsony, akár 0,1% vagy 0,01%-os allél frekvenciát is ki tudunk mutatni, mely tulajdonság teszi lehetővé a folyadékbiopsziás minták vizsgálatát.

ge kapcsán kiemelkedik a digitális droplet PCR (ddPCR) eljárás. Segítségével akár 0,01%-os variáns allél frekvencia (VAF) is mérhető folyadékbiopsziás minták vizsgálata során *(2. ábra)*.[7] A szekvenálási technikák közül az újgenerációs szekvenálás (NGS) képes a célszekvenciák elvárt, magas érzékenységű detektálására.[2] Utóbbi módszerrel a „hotspot" régiók célzott szekvenálásán túlmenően akár teljes genom (WGS) vagy teljes exom (WES) lefedettségű vizsgálat is kivitelezhető (bár WGS vagy WES esetén csak alacsonyabb érzékenység érhető el, és ezen eljárások jelen pillanatban elsősorban a kutatás eszköztárát bővítik). A folyadékbiopszia molekuláris biológiai elemzése során minimális invazivitással vizsgálható a tumor asszociált gének mutációs státusza, kópiaszám-eltérése és metilációs mintázata, de ezenkívül génátrendeződések, transzlokációk és génfúziók is kimutathatók.[8] A folyadékbiopszia számos előnye közül kiemelendő, hogy az anatómiailag nehezen hozzáférhető daganatok (pl. központi idegrendszeri metasztázisok) molekuláris jellemzésére is lehetőséget nyújthat megfelelő minőségű és mennyiségű szövetminta hiányában is *(1. ábra)*. Végül, a folyadékbiopsziás vizsgálatok további fontos klinikai jelentősége a kezelésekkel szemben kialakult rezisztencia monitorozása, valamint a terápia során a daganatban zajló klonális evolúció során megjelenő rezisztens szubklónok meglétének igazolása.[9]

Az utóbbi évtizedben számos szolid tumorral kapcsolatos folyadékbiopsziával foglalkozó tanulmány jelent meg, és tüdő-adenocarcinomák, valamint vastagbéldaganatok esetén a ctDNS-vizsgálatok már a rutin diagnosztikus,[10] illetve „screening"[11] irányelvek szerves részét képezik.

Sejtmentes nukleinsavak

A „sejtmentes nukleinsavak" kifejezés magában foglalja a korábban említett cfDNS-t, a sejtmentes RNS-t (cfRNS) és a sejtmentes mitokondriális DNS-t. A cfDNS jelenlétét vérplazmában elsőként *Mandel és Metais* igazolta 1948-ban, azonban különböző betegségekkel való kapcsolatára, mint például autoimmun betegségek, diabétesz, myocardialis infarctus, később derült fény.[12] A daganatok diagnosztikájában 1977-ben alkalmaztak először cfDNS-t, de úttörő eredményeket csak az elmúlt évtizedekben sikerült elérni az onkológiában.[13] A cfDNS típusai a megjelenési formák alapján oszthatók tovább szabad DNS-fragmentumok, nukleo-

1. táblázat. A keringő tumor DNS, a keringő tumorsejtek és az exoszómák folyadékbiopszia alapú vizsgálatának előnyei, hátrányai és az egyes molekulák esetén vizsgálható eltérések. ctDNS: keringő tumor DNS, CTC: keringő tumorsejt, NGS: újgenerációs szekvenálás

VIZSGÁLATI MINTA	ELŐNYÖK	HÁTRÁNYOK	VIZSGÁLHATÓ ELTÉRÉSEK
ctDNS	Magas érzékenység DNS szekvencia és metiláció analízis (PCR és NGS) Tumor heterogenitásból adódó torzítás csökkentése Időben és dinamikusan monitorozható a tumorprogresszió A prognózissal szignifikáns korrelációban lévő mennyiség	Alacsony specificitás a normál szöveti ctDNS miatt Álnegatív és álpozitív eredmények	Koncentráció DNS-integritás Mikroszatellita-analízis Mutációanalízis DNS-metiláció-analízis
CTC	A prognózissal szignifikáns korrelációban lévő mennyiség Fenotípus és genotípus analízisek, beleértve a sejtmorfológiát, az NGS-t, a fehérje lokalizációját és más immunjelölésen alapuló megközelítéseket Potenciális összefüggés a tumor progressziójával és áttétképzéssel Többféle izoláló és dúsító technológia *In vitro* vizsgálati lehetőségek	Magas mennyiségi és morfológiai heterogenitás a különböző daganatokban és betegekben Alacsony abundancia Fragilitás Álnegatív és álpozitív eredmények	Koncentráció Marker fehérjék Mutációanalízis DNS-metiláció-analízis RNS
Exoszóma	DNS-, RNS- és fehérjeanalízis szolid tumorokban Potenciális összefüggés a gyógyszerrezisztenciával és az áttétképzéssel	Hiányzó hatékony dúsító technológia	Koncentráció Marker fehérjék Mutációanalízis DNS-metiláció-analízis RNS

szómák, vezikulakötött DNS (exoszómák) és virtoszómák alcsoportokra.[14] A szabad DNS-fragmentumok nem kapcsolódnak más molekulához vagy sejtfelszínhez, felszabadulásukat követően a vérben DNáz enzimek által emésztődnek, illetve renalis és hepatikus „clearance"-szel rendelkeznek. A molekuláris vizsgálatok szempontjából további előny, hogy a daganatos állapotokban alacsony DNáz és a DNáz-inhibitor szintek mérhetők, ami hozzájárul az emelkedett ctDNS mennyiségekhez.[15] A folyadékbiopsziás vizsgálatok közül legszélesebb körben a relatív stabilitás miatt a ctDNS fragmentumok vizsgálata terjedt el a daganatok diagnosztikájában és kezelés-monitorozásában *(1. ábra)*.

Keringő cfRNS-t először 1987-ben izoláltak RNS proteo-lipid komplex formában malignus tumorokban szenvedő betegek szérumából.[16] 1999-ben a cfRNS molekulákat megtalálták nasopharyngealis carcinomával és malignus melanomával diagnosztizált páciensek plazmájában vagy szérumában.[17, 18] Ezen túlmenően a cfRNS jelenlétét igazolták emlő-, colorectalis daganatokban és hepatocelluláris carcinomában egyaránt.[19-21] A cirkuláló sejtmentes mikroRNS-ek a biomarkerek új irányvonalát szolgáltathatják, hisz minden lényeges biomarker sajátossággal rendelkeznek, mint pl. érzékenység, specifitás és robusztusság.[22]

A CpG-szigetek DNS-metilációja mint epigenetikai változás megy végbe a tumorkialakulás korai fázisában, ezáltal potenciális biomarker lehet a tumorok korai diagnosztikájában.[23, 24] A cfDNS-metiláció akár teljes genomszinten (tumorokban jellegzetes generalizált hipometiláció), akár génspecifikusan is vizsgálható (pl. a *GSTP1* prosztatarákban, a *SEPT9* promóter régió colorectalis rákban vagy a *RASSF1A* számos tumortípus esetében).[25, 26] *Zhai és mtsai* igazolták, hogy a genom egészére kiterjedő cfDNS metilációs profil rendkívül hasonló a tumorsejtekben detektált metilációhoz.[27] A cfDNS-metiláció vizsgálata alkalmas lehet a kezelésre adott válasz monitorozására metasztatikus vastagbélrákban,[28] emlőrákok esetén pedig a *SOX17* gén promóter magas metilációs szintje a plazmából kinyert CTC-ben és cfDNS-ben éppúgy detektálható, mint a primer tumorban.[29]

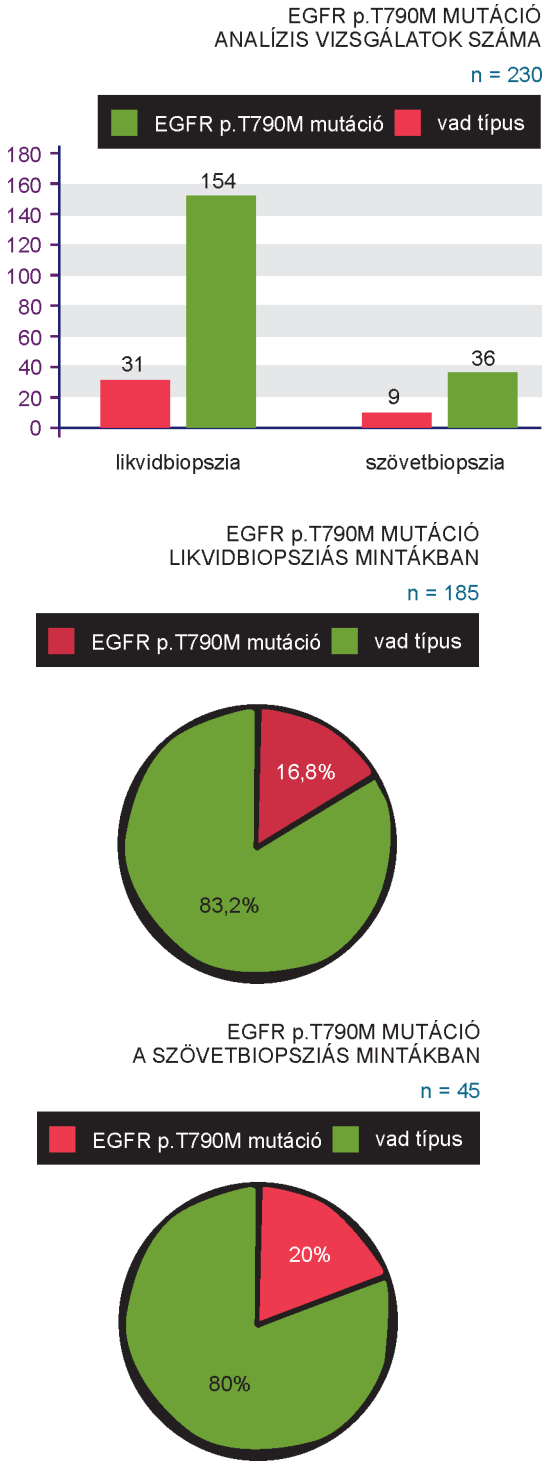
Folyadékbiopsziás detektáló módszerek

A folyadékbiopsziás minták kvantitatív elemzését megelőzőleg elengedhetetlen a különböző preanalitikai tényezők (pl. vérvétel módja és időzítése, cfDNS kivonat tárolása) figyelembevétele, hisz ezek nagymértékben befolyásolhatják a kinyert cfDNS koncentrációját és fragmentációját.[30] A CTC, a cfDNS és az exoszómák jelentik a három tipikus detektálási célpontot likvidbiopszia esetén. Közülük az exoszómák klinikai alkalmazhatósága tűnik a legnehezebbnek a hiányzó hatékony dúsító technológiák és pontos kvantitatív elemzési módszerek miatt.[31] Emiatt célszerűbb a CTC, de kiváltképp a cfDNS klinikai alkalmazása a mindennapi rutin diagnosztikában. A két mintatípus vizsgálatának sajátságos előnyei és hátrányai mellett egymást kiegészítő előnyei is ismertek *(1. táblázat)*. Az álpozitivitás és álnegativitás mindkettő esetében előfordul, azonban a ctDNS kimutatásának érzékenysége és specificitása jelentős növekedést mutat az NGS technikák gyors fejlődésével. Ennek köszönhetően a cfDNS alapú klinikai tesztek széles körben váltak alkalmazhatóvá.[32] 2014-ben az Európai Unió jóváhagyta a ctDNS tesztelését (a tumorbiopszia alternatívájaként) nem-kissejtes tüdőrákban az EGFR-gátló Iressa terápia indikációjában.[33] Ennek következtében a likvidbiopszián alapuló molekuláris diagnosztikai vizsgálatok jelentős részét ebben a tumortípusban végezzük az *EGFR* gén szekunder p.T790M (rezisztencia) mutáció igazolása kapcsán.

Folyadékbiopsziás vizsgálatok nem-kissejtes tüdőrákban

A fejlett nyugati országokban a tüdőrák, ezen belül is a nem-kissejtes tüdőrák (NSCLC) jelenti a legnagyobb onkológiai egészségügyi terhet mind a betegek, mind az egészségügyi ellátórendszer számára (az Európai Unióban évente mintegy 310 ezer beteget diagnosztizálnak NSCLC-vel, mely betegek medián ötéves túlélése 13%, kezelési költségük pedig meghaladja a 100 milliárd dollárt).[34] A gyakori előfordulás és a magas mortalitási ráta következtében kifejezett igény mutatkozik a precíziós, személyre szabott medicina iránt. A tüdőrákokra jellemző jelentős térbeli heterogenitás, a genetikai vizsgálatokhoz szükséges biopsziás mintavétel invazív és nehézkes volta, illetve a gyakran elégtelen mennyiségű tumorminta miatt a folyadékbiopsziás vizsgálatoknak várhatóan egyre fontosabb szerepe lehet majd a tüdőrákok kivizsgálásában.

Korai tanulmányok kimutatták, hogy tüdőrákban szenvedő betegek vérében a cfDNS mennyisége megemelkedik,[13] illetve a magasabb cfDNS-szintek kedvezőtlen prognózissal társulnak,[35] aminek kézenfekvő magyarázata, hogy az előrehaladott stádiumú daganatok esetén a nagyobb és metabolikusan aktívabb tumortömeg több ctDNS-t juttat a keringésbe. Több tanulmány is kimutatta, hogy molekuláris genetikai szempontból a plazma-DNS-minták 74–97%-os konkordan-



3. ábra. A Semmelweis Egyetem I. Sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató intézetében 2018 óta végzett EGFR p.T790M mutációs vizsgálatok száma és a mutáns esetek aránya.

ciát mutatnak a szövetbiopsziás mintákkal, sőt a folyadékbiopsziás mintában olyan daganatasszociált szomatikus eltérések is detektálhatók, amik az adott eset biopsziás mintájában nem voltak jelen, így feltehetőleg a mintavétel során nem érintett területekből erednek (36). Egy tumoros lézió térbeli heterogenitásának korrekt leképezésén túl a folyadékbiopsziának további előnye, hogy vizsgálatával a primer tumorról és az áttétekről egyszerre kaphatunk molekuláris információt (ami egyben hátránya is, mivel az egyes genetikai eltérésekhez nem köthető anatómiai információ). Az NSCLC metasztázisainak molekuláris biológiai vizsgálati érzékenysége tovább növelhető az áttétek anatómiai lokalizációjának megfelelő alternatív folyadékbiopsziás mintavételek alkalmazásával[37] (például likvor-ctDNS-vizsgálat agyi áttét esetén).

A rutin diagnosztikába a folyadékbiopsziás vizsgálat elsőként az NSCLC esetén került bevezetésre: az Amerikai Élelmiszer és Gyógyszerengedélyeztetési Hivatal (FDA) 2016 nyarán engedélyezte az *EGFR* mutációt hordozó NSCLC-ben szenvedő betegek folyadékbiopszia-alapú minimálinvazív tesztelését, mely tesztnek segítségével nemcsak az első generációs EGFR-gátló (erlotinib) terápiára érzékeny beteg populáció azonosítható (az összes NSCLC-ben szenvedő beteg mintegy 15%-a), hanem a célzott terápiára rezisztencia mutációval (*EGFR* p.T790M) rendelkező betegek is,[38] akik számára már elérhetők a hatékony harmadik generációs EGFR-gátlók (osimertinib).[39] *Akamatsu és mtsai* 57 késői stádiumú, *EGFR* gátlószerel kezelt, NSCLC-ben szenvedő beteg nyomonkövetése során kimutatták, hogy a kezelés megkezdését követő negyedik héten negatív ctDNS-teszttel rendelkező betegek progressziómentes túlélése (PFS) kedvezőbb, mint a pozitív teszttel rendelkező betegeké.[40] Ezzel összhangban *Iwama és mtsai* tanulmánya kimutatta, hogy az EGFR gátló kezelésben részesülő betegek nyomonkövetése során kimutatott emelkedő *EGFR* mutáns allél frekvenciák később klinikai tünetekkel jelentkező terápia rezisztenciával hozhatók kapcsolatba.[41] Az *EGFR* gén mutációs státuszának molekuláris biológiai tesztelésével az esetek mintegy 30%-ában csak folyadékbiopsziás vizsgálattal, míg további 30%-ban csak a szövetbiopszia vizsgálatával mutatható ki az *EGFR*-gátlószerrre érzékenyítő eltérés,[42] ezért a jelenleg érvényben lévő irányelvek szerint a folyadékbiopsziás vizsgálattal negatívnak bizonyuló betegek esetében mindenképp ajánlott elvégezni a szövetbiopszia molekuláris vizsgálatát is.[42]

Intézetünkben az elmúlt két és fél év során összesen 230 *EGFR* p.T790M rezisztencia mutációanalízis vizsgálatot végeztünk nagy érzékenységű ddPCR módszer segítségével. Az összességében 185 perifériás vérmintából az esetek 16,8%-ában, míg a 45 szövet biopsziás tumormintában az esetek 20%-ában detektáltuk a p.T790M mutációt *(3. ábra, 2. táblázat)*.

2. táblázat. Intézetünkben folyadékbiopsziás mintákból ddPCR módszerrel vizsgálható gén mutációk. NSCLC: nem-kissejtes tüdőrák, CRC: colorectalis carcinoma, mplx PCR: multiplex PCR (több mutáció szimultán vizsgálata az egyes mutációk elkülönítése nélkül)

DAGANATTÍPUS	VIZSGÁLT GÉN	VIZSGÁLT EXON	VIZSGÁLT MUTÁCIÓ
NSCLC	*EGFR*	exon 18	p.G719A/C/S (mplx PCR)
NSCLC	*EGFR*	exon 19	különböző deléciók (mplx PCR)
NSCLC	*EGFR*	exon 19	p.S768I (mplx PCR)
NSCLC	*EGFR*	exon 20	p.T790M, p.C797S
NSCLC	*EGFR*	exon 21	p.L858R, p.L861Q (mplx PCR)
NSCLC	*ALK*	exon 22	p.C1156Y, p.I1171N
NSCLC	*ALK*	exon 23	p.L1196M, p.G1202R
NSCLC	*ALK*	exon 25	p.G1269A
melanoma / NSCLC / CRC / stb.	*BRAF*	exon 15	p.V600E
emlő carcinoma/ CRC	*PIK3CA*	exon 5	p.N345K (mplx PCR)
emlő carcinoma/ CRC	*PIK3CA*	exon 8	p.C420R (mplx PCR)
emlő carcinoma/ CRC	*PIK3CA*	exon 10	p.E542K, p.E545A/K/G/D, p.Q546E/R (mplx PCR)
emlő carcinoma/ CRC	*PIK3CA*	exon 21	p.H1047R/L/Y (mplx PCR)

NSCLC-ben szenvedő betegek esetén az *ALK* gén mutációi, illetve fúziói a legjelentősebb molekuláris eltérések közé tartoznak. *Cui és mtsai* kimutatták, hogy ezen eltérések is vizsgálhatók a plazma-DNS minimálinvazív analízisével, továbbá azt, hogy az *ALK* gén eltéréseinek allélfrekvenciája párhuzamosan változik a képalkotókkal detektálható tumortömeggel.[43] Intézetünkben elérhető az ALK gátlószerekkel szembeni rezisztenciáért felelős, és következő vonalbeli ALK gátlószer kezelés választását támogató rezisztenciamutációk likvidbiopszia-alapú vizsgálata *(2. táblázat)*.

Az utóbbi években NSCLC-ben engedélyezett immun-ellenőrzőpont gátlók egyik új prediktív biomarkere a tumor mutációs terhelés (TMB) lehet, amely bizonyos újgenerációs szekvenálás alapú eljárásokkal akár plazma DNS-ből is meghatározható (úgynevezett „bloodTMB").[44, 45]

Folyadékbiopsziás vizsgálatok vastagbélrák esetén

A fejlett országokban a colorectalis carcinoma (CRC) felelős a második legtöbb daganatasszociált mortalitásért a tüdőrákot követően,[46] az Európai Unióban évente mintegy 152 ezer ember hal meg a betegség következtében.[47] A CRC populáció szintű szűrésének fontosságára továbbá rávilágít, hogy az öt éves teljes túlélés (OS) tekintetében markáns különbség mutatkozik a korán, illetve a későn diagnosztizált betegek között (5 éves OS 93% vs. 6%). A betegség szűrésére jelenleg az invazív kolonoszkópiát, illetve a kevésbé szenzitív és specifikus okkult széklet vér kimutatást (Weber-teszt) használják.[48] Ezen vizsgálóeljárások limitációi és hátrányai miatt egyre nagyobb az igény új betegség kimutató eljárások kifejlesztésére.

CRC-ben szenvedő betegek esetén a *SEPT9* gén hipermetilációja figyelhető meg, mely eltérés minimál invazív módon kimutatható a betegek vérplazmájából is.[11] Az FDA által 2016-ban CRC szűrésére engedélyezett Epi proColon© teszt is a *SEPT9* gén metilációs vizsgálatán alapszik. A legújabb eredmények alapján a teszt szenzitivitása 73% (650 CRC-s betegből 475 pozitív teszt), specificitása 94,5% (27 álpozitív eset 427 egészséges kontrollból).[49] Előrehaladottabb stádiumú betegek vizsgálatával az érzékenység jelentősen javul (I. stádiumú betegek esetén 45%, IV. stádiumú betegek esetén 79%). Fontos megemlíteni, hogy az eddigi eredmények szerint a *SEPT9* gén metilációs vizsgálat nem alkalmas CRC asszociált precancerózus léziók minimálinvazív kimutatására,[50] ezekben az esetekben egyéb genomi lókuszok (cg10673833) metilációs vizsgálatára lehet szükség.[51]

Bár folyadékbiopsziát a CRC rutin diagnosztikájában jelenleg csak a betegség korai szűrésére használják, számos tanulmány vizsgálja az eljárás hatékonyságát a betegséglefolyás és terápia monitorozás szempontjából. Standard kemoterápiával elsővonalban kezelt

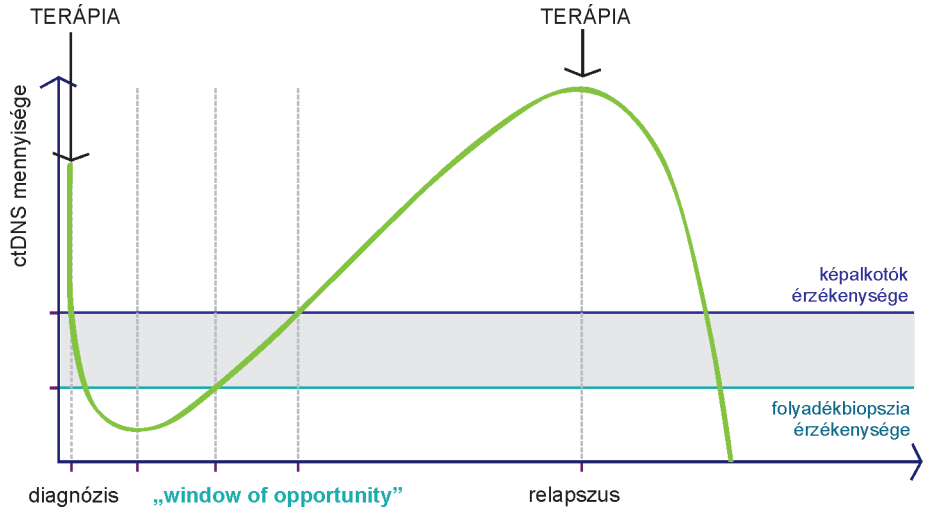
CRC-s betegek folyadékbiopszia alapú nyomonkövetése során Tie és mtsai kimutatták, hogy a második ciklus előtti nagymértékű ctDNS-szint csökkenés kedvező prognózist jelez.[52] Egy másik tanulmányban a kuratív szándékú, elsővonalban alkalmazott sebészi terápiát követően használták a folyadékbiopsziás vizsgálatot a minimális reziduális betegség (MRD) jelenlétének kizárására és az adjuváns kemoterápiás kezelést igénylő betegcsoport azonosítására.[53] Ismert, hogy a *RAS* mutációt hordozó, CRC-ben szenvedő betegek esetén az EGFR-gátló terápia nem hatékony,[54] így a *RAS* mutációk minimál invazív, folyadékbiopszia alapú vizsgálata segíthet az EGFR-gátló terápiára érzékeny betegpopuláció azonosításában, és a terápia nyomonkövetése során megjelenő terápia refrakteritást okozó *RAS* mutáns klónok korai detektálásában.[55]

Folyadékbiopszia egyéb szolid daganatokban

A folyadékbiopsziás tanulmányok szempontjából a legintenzívebben kutatott entitásnak az NSCLC és a CRC számít, de kiemelendő, hogy szinte az összes szolid tumor kapcsán publikáltak az utóbbi évtizedben plazma-DNS-vizsgálatot alkalmazó tanulmányt. Az eddigi eredmények alapján a folyadékbiopsziás vizsgálat hasznos lehet a daganatok szűrésében, a kezelést megelőző prognózis becslésében, terápiásan célozható biomarkerek detektálásában, illetve a kezelések precíz, valós idejű molekuláris monitorozásában, az MRD kimutatásában és a korai relapszus azonosításában is.[2]

Zhang és mtsai 978 szolid tumorban szenvedő beteg kezelés előtti folyadékbiopsziás mintájának analízise során igazolták, hogy a nagyobb ctDNS koncentrációval rendelkező betegek kedvezőtlenebb PFS és OS mutatókkal rendelkeznek.[56] Ezzel összhangban *Gray és mtsai* 48 immun- vagy célzott terápiával kezelt melanomás beteg vizsgálatával kimutatták, hogy az alacsonyabb kezelés előtti ctDNS-szint a terápia típusától függetlenül kedvezőbb terápiás választ jelez előre. Ebben a vizsgálatban továbbá ismert prediktív biomarkerek minimálinvazív detektálhatóságát is igazolták: szelektív BRAF-gátlókra érzékenyítő (*BRAF* p.V600X), illetve rezisztenciát (*NRAS*) okozó mutációkat is kimutattak.[57] Prediktív biomarker folyadékbiopszia alapú kimutatására egy másik példa a *PIK3CA*-gátló alpelisib terápiára várhatóan jól reagáló, *PIK3CA* mutációt hordozó emlőrákos betegek azonosítása.[58] Intézetünkben elérhető a leggyakoribb *PIK3CA* mutációk likvidbiopszia-alapú kimutatása ddPCR technológia alkalmazásával *(2. táblázat)*.

Bizonyos daganatok nem vagy csak kifejezetten előrehaladott stádiumban juttatnak ctDNS-t a perifériás keringésbe, ezért például endometrium carcinomás nőbetegek esetén a *KRAS* és a *PIK3CA* mutációk megjelenése a vérplazmában kedvezőtlen előjel,[59] illetve daganatasszociált molekuláris eltérések detektálása glio-



4. ábra. A folyadékbiopsziás vizsgálat és a képalkotók érzékenységének összehasonlítása. Diagnózis idejében jellemzően mind a keringő tumor DNS (ctDNS) alapú folyadékbiopsziával, mind a képalkotókkal végzett vizsgálatokkal ki tudjuk mutatni a tumoros megbetegedést. Első vonalbeli kezelésre adott terápiás választ gyakran a folyadékbiopsziás és a radiológiai vizsgálatok negatívvá válása jellemzi. Remisszióban lévő beteg monitorozására a folyadékbiopszia egy ígéretes módszer, mivel a nagy érzékenységű laboratóriumi technikáknak köszönhetően a radiológiai vizsgálatok pozitívvá válását és a klinikai tünetek megjelenését megelőzően detektálhatóvá válhatnak a ctDNS fragmentumok. Ezt az idő intevallumot nevezik „window of opportunity”-nek, mivel számos megbetegedés esetén még kuratív terápiás beavatkozásra lehet ebben az időablakban lehetőség. ctDNS: keringő tumor DNS.

blastomás (GBM) betegek vérplazmájában a vér-agy gát sérülésének lehet a jele.[60] Ilyen daganatok esetén alternatív plazma-DNS mintavételi helyek jöhetnek szóba (pl. cerebrospinalis folyadék – GBM, vizelet – prosztatarák).[61, 62]

A szolid tumorok specifikus (célzott terápia, immunterápia) vagy nem specifikus (kemoterápia, sebészi terápia stb.) kezelésének minimálinvazív molekuláris nyomonkövetési lehetősége az egyik legnagyobb potenciált rejtő és az egyik legintenzívebben kutatott területe a folyadékbiopsziás vizsgálatoknak. Általánosságban elmondható, hogy a sikeres kezelést ctDNS elimináció, terápia refrakteritást stagnáló vagy növekvő plazma DNS szintek kísérnek. A képalkotókkal (például CT vagy PET-CT) történő terápiamonitorozással összevetve a folyadékbiopsziás vizsgálatoknak előnye a magas szenzitivitás és specificitás mellett, hogy az eljárás során nincs sugárterhelés *(4. ábra)*. PARP gátló olaparib kezelésben részesülő prosztatarákos betegeknél a ctDNS mennyiségének csökkenése jó terápiás kimenetelt, míg a klonális evolúcióval asszociált mutációk megjelenése terápia rezisztenciát jelzett.[63] Műtét előtt alkalmazott neoadjuváns kemoterápiát követően plazma DNS-ből kimutatható MRD csökkent két éves betegségmentes túlélést jelzett előre (81% MRD-negatív, 56% MRD-pozitív betegeknél) tripla negatív emlőrákos nőknél.[64] Ehhez hasonlóan, a műtétet követő MRD-negativitás hasnyálmirigyrákos betegeknél is kedvezőbb PFS-sel járt,[65] mely betegcsoportnál a *KRAS* mutációk plazma DNS alapú monitorozása jobban korrelált a várható prognózissal, mint a CA19-9 tumormarker nyomonkövetése.[66] Egy másik tanulmányban sebészi terápiával kezelt emlőrákos betegekben perzisztáló vagy újra megjelenő ctDNS fragmentumok medián 7,9 hónappal előzték meg a klinikai tüneteket is okozó relapszust.[67] *Gray és mtsai* tanulmánya alapján célzott- vagy immunterápiával kezelt melanomás betegeknél terápiás kudarcot jelző relapszust 9 héttel lehet plazma DNS vizsgálattal korábban detektálni, mint képalkotókkal.[57]

Magyarországon jelenleg elérhető multigénes folyadékbiopszia alapú tesztek a FoundationOne® Liquid CDx és a Signatera©. A FoundationOne© teszt több mint 300 gén eltéréseit (mutációk, kópiaszám-eltérések, inzerciók/deléciók, génátrendeződések) képes azonosítani és alkalmas a mikroszatellita-instabilitás, valamint a tumor mutációs terhelés meghatározására is. A Signatera© teszt első lépésben szövetbiopsziából WES vizsgálattal határozza meg a daganat mutációs profilját. Ezt követően 16, az adott daganatra jellemző mutáció nagy érzékenységű mennyiségi monitorozása zajlik az onkológiai kezelés alatt és azt követően folyadékbiopsziás mintákból.

Folyadékbiopsziás vizsgálat a primer diagnózis idején

A daganatok kezelésének sikerességét nagyban befolyásolja a diagnózis ideje, vagyis a korai stádiumban diagnosztizált betegségek lényegesen nagyobb arányban gyógyíthatók vagy kezelhetők.[68] Bár a tumorok diagnosztikájának „arany standardja” a szövettani diagnózis, számos próbálkozás van egy minimál invazív, általános daganatszűrésre alkalmas eljárás kidolgozására. Ebből kifolyólag nem meglepő, hogy az onkológia egyik kiemelkedő innovációja egy olyan folyadékbiopsziás vizsgálat lehet, amely alkalmas lehet az egészséges populáció vagy bizonyos rizikócsoportok szűrésére. A folyadékbiopsziás vizsgálatok ilyen irányú kiterjesztésének egyik kihívása, hogy a korai stádiumban lévő daganatok csekély mennyiségű ctDNS-t juttatnak a szisztémás keringésbe.[6] Emiatt a daganat asszociált gének szomatikus mutációs státuszának vizsgálata a legtöbb esetben nem rendelkezik kellő szenzitivitással, ezért felmerült a mutációs vizsgálatok egyéb ctDNS alapú analízissel (pl. metilációs vizsgálat, kópiaszám eltérések detektálása), illetve nem DNS alapú tumormarker méréssel (pl. CEA, CA19-9, AFP) történő kiegészítése.[69]

A plazma-DNS-vizsgálat diagnosztikus értékére először egy várandós hölgy non-invazív praenatalis tesztjének (NIPT) molekuláris vizsgálata hívta fel a figyelmet: a folyadékbiopsziás mintában B-sejtes lymphomára jellemző genetikai eltéréseket találtak, az ezt követő képalkotók és szövettani vizsgálat pedig egy addig tüneteket nem okozó, korai stádiumú Hodgkin-lymphoma diagnózisához vezettek.[70] Ezt követően *Amant és mtsai* publikáltak egy tanulmányt, amiben 4000 várandós hölgy NIPT mintáinak molekuláris vizsgálata három okkult, korai stádiumú malignus tumor jelenlétére vetett fényt.[71]

Ezidáig csak a vastagbélrák fejezetben tárgyalt epi ProColon© teszt klinikai alkalmazását engedélyezte az FDA a ctDNS alapú szűrővizsgálatok közül. Egy további reménykeltő eljárás lehet a CancerSeek teszt, ami 16, daganatokban gyakran mutált gén vizsgálata mellett további nyolc tumormarkerként funkcionáló plazmafehérje szintjét is méri. A teszt 1005 korai stádiumú tumorban szenvedő beteg 70%-ában adott pozitív eredményt, az egyes entitásokra vonatkoztatva a szenzitivitás 33 és 98% között mozgott, míg a teszt specificitása

99%-nak bizonyult (812 egészséges önkéntes esetén 7 álpozitív eredmény született). A CancerSeek teszt mesterséges intelligencia alapú algoritmusával 84%-ban tudták a primer tumor eredetét meghatározni, továbbá a jellemzően későn felismerésre kerülő tumorok (petefészekrák, hasnyálmirigyrák, nyelőcsőrák) 69%-át tudták minimál invazív módon, már a korai stádiumban kimutatni.[72] A CancerSeek teszt, illetve a folyadékbiopszia alapú daganatszűrés ígéretes vizsgálat lehet az ismeretlen eredetű, metasztatikus carcinomában szenvedő betegek (CUP, „cancer of unknown primary") diagnosztikus kivizsgálása során is.[73, 74]

A likvidbiopsziás eljárások egyértelműen az onkológia legintenzívebben kutatott területét jelentik napjainkban. A tudományos eredmények egyre bővülő tárházának és a folyamatos fejlesztés alatt álló eljárásoknak köszönhetően a folyadékbiopsziás eljárások fokozatosan teret hódítanak a mindennapi diagnosztikában is. Az ígéretes eredmények és már sikeres mindennapi alkalmazások ellenére fontos kiemelni, hogy a likvidbiopsziás eljárások negatív prediktív értéke még fejlesztésre szorul és a daganatok molekuláris jellemzésének preferált módszere továbbra is a szövetminták analízise.

Irodalom

1. Haber DA and Velculescu VE. Blood-based analyses of cancer: circulating tumor cells and circulating tumor DNA. Cancer discovery 2014; 4:650-61.
2. Siravegna G, Marsoni S, Siena S and Bardelli A. Integrating liquid biopsies into the management of cancer. Nat Rev Clin Oncol 2017; 14:531-48-
3. Fan HC, Blumenfeld YJ, Chitkara U, Hudgins L and Quake SR. Analysis of the size distributions of fetal and maternal cell-free DNA by paired-end sequencing. Clinical chemistry 2010; 56:1279-86.
4. Diehl F, Schmidt K, Choti MA, Romans K, Goodman S, Li M, et al. Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. Nature medicine 2008; 14:985-90.
5. Alix-Panabieres C and Pantel K. [The circulating tumor cells: liquid biopsy of cancer]. Klinicheskaia laboratornaia diagnostika 2014; 60-64.
6. Bettegowda C, Sausen M, Leary RJ, Kinde I, Wang Y, Agrawal N, et al. Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. Sci Transl Med 2014; 6:224ra224
7. Hindson BJ, Ness KD, Masquelier DA, Belgrader P, Heredia NJ, Makarewicz AJ, et al. High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number. Analytical chemistry 2011; 83:8604-10.
8. Fiala C and Diamandis EP. Cell-free DNA Analysis in Cancer. The New England journal of medicine 2019; 380:501.
9. Heitzer E, Haque IS, Roberts CES and Speicher MR. Current and future perspectives of liquid biopsies in genomics-driven oncology. Nature reviews. Genetics 2019; 20:71-88.
10. Malapelle U, Sirera R, Jantus-Lewintre E, Reclusa P, Calabuig-Farinas S, Blasco A, et al. Profile of the Roche cobas(R) EGFR mutation test v2 for non-small cell lung cancer. Expert review of molecular diagnostics 2017; 17:209-15.
11. Warren JD, Xiong W, Bunker AM, Vaughn CP, Furtado LV, Roberts WL, et al. Septin 9 methylated DNA is a sensitive and specific blood test for colorectal cancer. BMC Med 2011; 9:133.
12. Mandel P and Metais P. [Not Available]. Comptes rendus des seances de la Societe de biologie et de ses filiales 1948; 142:241-3.
13. Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM and Yaros MJ. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. Cancer Res 1977; 37:646-50.
14. Peters DL and Pretorius PJ. Origin, translocation and destination of extracellular occurring DNA—a new paradigm in genetic behaviour. Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry 2011; 412:806-11.
15. Tamkovich SN, Cherepanova AV, Kolesnikova EV, Rykova EY, Pyshnyi DV, Vlassov VV, et al. Circulating DNA and DNase activity in human blood. Annals of the New York Academy of Sciences 2006; 1075:191-6.
16. Wieczorek AJ, Sitaramam V, Machleidt W, Rhyner K, Perruchoud AP and Block LH. Diagnostic and prognostic value of RNA-proteolipid in sera of patients with malignant disorders following therapy: first clinical evaluation of a novel tumor marker. Cancer research 1987; 47:6407-12.
17. Lo KW, Lo YM, Leung SF, Tsang YS, Chan LY, Johnson PJ, et al. Analysis of cell-free Epstein-Barr virus associated RNA in the plasma of patients with nasopharyngeal carcinoma. Clinical chemistry 1999; 45:1292-4.
18. Kopreski MS, Benko FA, Kwak LW and Gocke CD. Detection of tumor messenger RNA in the serum of patients with malignant melanoma. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research 1999; 5:1961-65.
19. Chen XQ, Bonnefoi H, Pelte MF, Lyautey J, Lederrey C, Movarekhi S, et al. Telomerase RNA as a detection marker in the serum of breast cancer patients. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research 2000; 6:3823-6.
20. Dasi F, Lledo S, Garcia-Granero E, Ripoll R, Marugan M, Tormo M, et al. Real-time quantification in plasma of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) mRNA: a simple blood test to monitor disease in cancer patients. Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology 2001; 81:767-9.
21. Miura N, Shiota G, Nakagawa T, Maeda Y, Sano A, Marumoto A, et al. Sensitive detection of human telomerase reverse transcriptase mRNA in the serum of patients with hepatocellular carcinoma. Oncology 2003; 64:430-4.
22. Faraldi M, Gomarasca M, Banfi G and Lombardi G. Free Circulating miRNAs Measurement in Clinical Settings: The Still Unsolved Issue of the Normalization. Advances in clinical chemistry 2018; 87:113-39.

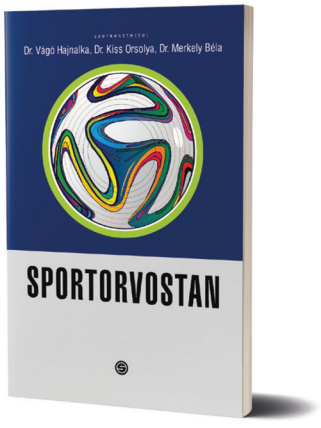
23. Egger G, Liang G, Aparicio A and Jones PA. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. Nature 2004; 429:457-63.
24. Lehmann-Werman R, Neiman D, Zemmour H, Moss J, Magenheim J, Vaknin-Dembinsky A, et al. Identification of tissue-specific cell death using methylation patterns of circulating DNA. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2016; 113: E1826-34.
25. Mastoraki S, Strati A, Tzanikou E, Chimonidou M, Politaki E, Voutsina A, et al. ESR1 Methylation: A Liquid Biopsy-Based Epigenetic Assay for the Follow-up of Patients with Metastatic Breast Cancer Receiving Endocrine Treatment. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research 2018; 24:1500-10.
26. Gale D, Lawson ARJ, Howarth K, Madi M, Durham B, Smalley S, et al. Development of a highly sensitive liquid biopsy platform to detect clinically-relevant cancer mutations at low allele fractions in cell-free DNA. PloS one 2018; 13:e0194630
27. Zhai R, Zhao Y, Su L, Cassidy L, Liu G and Christiani DC. Genome-wide DNA methylation profiling of cell-free serum DNA in esophageal adenocarcinoma and Barrett esophagus. Neoplasia (New York, N.Y.) 2012; 14:29-33.
28. Barault L, Amatu A, Siravegna G, Ponzetti A, Moran S, Cassingena A, et al. Discovery of methylated circulating DNA biomarkers for comprehensive non-invasive monitoring of treatment response in metastatic colorectal cancer. Gut 2018; 67:1995-2005.
29. Chimonidou M, Strati A, Malamos N, Georgoulias V and Lianidou ES. SOX17 promoter methylation in circulating tumor cells and matched cell-free DNA isolated from plasma of patients with breast cancer. Clinical chemistry 2013; 59:270-9.
30. El Messaoudi S, Rolet F, Mouliere F and Thierry AR. Circulating cell free DNA: Preanalytical considerations. Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry 2013; 424:222-30.
31. Zhang X, Yuan X, Shi H, Wu L, Qian H and Xu W. Exosomes in cancer: small particle, big player. Journal of hematology & oncology 2015; 8:83.
32. Salvi S, Gurioli G, De Giorgi U, Conteduca V, Tedaldi G, Calistri D, et al. Cell-free DNA as a diagnostic marker for cancer: current insights. OncoTargets and therapy 2016; 9:6549-59.
33. Douillard JY, Ostoros G, Cobo M, Ciuleanu T, McCormack R, Webster A, et al. First-line gefitinib in Caucasian EGFR mutation-positive NSCLC patients: a phase-IV, open-label, single-arm study. British journal of cancer 2014; 110:55-62.
34. Wood R and Taylor-Stokes G. Cost burden associated with advanced non-small cell lung cancer in Europe and influence of disease stage. BMC Cancer 2019; 19:214.
35. Gautschi O, Bigosch C, Huegli B, Jermann M, Marx A, Chassé E, et al. Circulating deoxyribonucleic Acid as prognostic marker in non-small-cell lung cancer patients undergoing chemotherapy. J Clin Oncol 2004; 22:4157-64.
36. Voigt W, Manegold C, Pilz L, Wu YL, Müllauer L, Pirker R, et al. Beyond tissue biopsy: a diagnostic framework to address tumor heterogeneity in lung cancer. Curr Opin Oncol 2020; 32:68-77.
37. Villatoro S, Mayo-de-Las-Casas C, Jordana-Ariza N, Viteri-Ramírez S, Garzón-Iba□ez M, Moya-Horno I, et al. Prospective detection of mutations in cerebrospinal fluid, pleural effusion, and ascites of advanced cancer patients to guide treatment decisions. Mol Oncol 2019; 13: 2633-45.
38. Dal Maso A, Lorenzi M, Roca E, Pilotto S, Macerelli M, Polo V, et al. Clinical Features and Progression Pattern of Acquired T790M-positive Compared With T790M-negative EGFR Mutant Non-small-cell Lung Cancer: Catching Tumor and Clinical Heterogeneity Over Time Through Liquid Biopsy. Clin Lung Cancer 2020; 21:1-14.e13.
39. Yang JC, Ahn MJ, Kim DW, Ramalingam SS, Sequist LV, Su WC, et al. Osimertinib in Pretreated T790M-Positive Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer: AURA Study Phase II Extension Component. J Clin Oncol 2017; 35:1288-96.
40. Akamatsu H, Koh Y, Okamoto I, Fujimoto D, Bessho A, Azuma K, et al. Clinical significance of monitoring EGFR mutation in plasma using multiplexed digital PCR in EGFR mutated patients treated with afatinib (West Japan Oncology Group 8114LTR study). Lung Cancer 2019; 131:128-33.
41. Iwama E, Sakai K, Hidaka N, Inoue K, Fujii A, Nakagaki N, et al. Longitudinal monitoring of somatic genetic alterations in circulating cell-free DNA during treatment with epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitors. Cancer 2020; 126:219-27.
42. Oxnard GR, Thress KS, Alden RS, Lawrance R, Paweletz CP, Cantarini M, et al. Association Between Plasma Genotyping and Outcomes of Treatment With Osimertinib (AZD9291) in Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. J Clin Oncol 2016; 34:3375-82.
43. Cui S, Zhang W, Xiong L, Pan F, Niu Y, Chu T, et al. Use of capture-based next-generation sequencing to detect ALK fusion in plasma cell-free DNA of patients with non-small-cell lung cancer. Oncotarget 2017; 8:2771-80.
44. Wang Z, Duan J, Cai S, Han M, Dong H, Zhao J, et al. Assessment of Blood Tumor Mutational Burden as a Potential Biomarker for Immunotherapy in Patients With Non-Small Cell Lung Cancer With Use of a Next-Generation Sequencing Cancer Gene Panel. JAMA Oncol 2019; 5:696-702.
45. Gandara DR, Paul SM, Kowanetz M, Schleifman E, Zou W, Li Y, et al. Blood-based tumor mutational burden as a predictor of clinical benefit in non-small-cell lung cancer patients treated with atezolizumab. Nat Med 2018; 24:1441-8.
46. Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, Rosso S, Coebergh JW, Comber H, et al. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. Eur J Cancer 2013; 49:1374-1403.
47. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. Int J Cancer 2015; 136:E359-386.
48. Bénard F, Barkun AN, Martel M and von Renteln D. Systematic review of colorectal cancer screening guidelines for average-risk adults: Summarizing the current global recommendations. World J Gastroenterol 2018; 24:124-38.

49. Sun J, Fei F, Zhang M, Li Y, Zhang X, Zhu S, et al. The role of (m)SEPT9 in screening, diagnosis, and recurrence monitoring of colorectal cancer. BMC Cancer 2019; 19:450.
50. Nian J, Sun X, Ming S, Yan C, Ma Y, Feng Y, et al. Diagnostic Accuracy of Methylated SEPT9 for Blood-based Colorectal Cancer Detection: A Systematic Review and Meta-Analysis. Clin Transl Gastroenterol 2017; 8:e216.
51. Luo H, Zhao Q, Wei W, Zheng L, Yi S, Li G, et al. Circulating tumor DNA methylation profiles enable early diagnosis, prognosis prediction, and screening for colorectal cancer. Sci Transl Med 2020; 12:524 1-11.
52. Tie J, Kinde I, Wang Y, Wong HL, Roebert J, Christie M, et al. Circulating tumor DNA as an early marker of therapeutic response in patients with metastatic colorectal cancer. Ann Oncol 2015; 26:1715-22.
53. Tie J, Wang Y, Tomasetti C, Li L, Springer S, Kinde I, et al. Circulating tumor DNA analysis detects minimal residual disease and predicts recurrence in patients with stage II colon cancer. Sci Transl Med 2016; 8:346ra392
54. Siravegna G, Mussolin B, Buscarino M, Corti G, Cassingena A, Crisafulli G, et al. Clonal evolution and resistance to EGFR blockade in the blood of colorectal cancer patients. Nat Med 2015; 21:795-801.
55. Khan KH, Cunningham D, Werner B, Vlachogiannis G, Spiteri I, Heide T, et al. Longitudinal Liquid Biopsy and Mathematical Modeling of Clonal Evolution Forecast Time to Treatment Failure in the PROSPECT-C Phase II Colorectal Cancer Clinical Trial. Cancer Discov 2018; 8:1270-85.
56. Zhang Q, Luo J, Wu S, Si H, Gao C, Xu W, et al. Prognostic and predictive impact of circulating tumor DNA in patients with advanced cancers treated with immune checkpoint blockade. Cancer Discov 2020; 10:12:1842-53.
57. Gray ES, Rizos H, Reid AL, Boyd SC, Pereira MR, Lo J, et al. Circulating tumor DNA to monitor treatment response and detect acquired resistance in patients with metastatic melanoma. Oncotarget 2015; 6:42008-18.
58. Takeshita T, Yamamoto Y, Yamamoto-Ibusuki M, Tomiguchi M, Sueta A, Murakami K, et al. Analysis of ESR1 and PIK3CA mutations in plasma cell-free DNA from ER-positive breast cancer patients. Oncotarget 2017; 8:52142-55.
59. Shintani D, Hihara T, Ogasawara A, Sato S, Yabuno A, Tai K, et al. Tumor-related mutations in cell-free DNA in pre-operative plasma as a prognostic indicator of recurrence in endometrial cancer. Int J Gynecol Cancer 2020; 30:1340-6.
60. Nabavizadeh SA, Ware JB, Guiry S, Nasrallah MP, Mays JJ, Till JE, et al. Imaging and histopathologic correlates of plasma cell-free DNA concentration and circulating tumor DNA in adult patients with newly diagnosed glioblastoma. Neurooncol Adv 2020; 2:vdaa016
61. Xiao F, Lv S, Zong Z, Wu L, Tang X, Kuang W, et al. Cerebrospinal fluid biomarkers for brain tumor detection: clinical roles and current progress. Am J Transl Res 2020; 12:1379-1396
62. Salvi S, Gurioli G, Martignano F, Foca F, Gunelli R, Cicchetti G, et al. Urine Cell-Free DNA Integrity Analysis for Early Detection of Prostate Cancer Patients. Dis Markers 2015; 2015:574120.
63. Goodall J, Mateo J, Yuan W, Mossop H, Porta N, Miranda S, et al. Circulating Cell-Free DNA to Guide Prostate Cancer Treatment with PARP Inhibition. Cancer Discov 2017; 7:1006-17.
64. Radovich M, Jiang G, Hancock BA, Chitambar C, Nanda R, Falkson C, et al. Association of Circulating Tumor DNA and Circulating Tumor Cells After Neoadjuvant Chemotherapy With Disease Recurrence in Patients With Triple-Negative Breast Cancer: Preplanned Secondary Analysis of the BRE12-158 Randomized Clinical Trial. JAMA Oncol 2020; 6:1-6.
65. Jiang J, Ye S, Xu Y, Chang L, Hu X, Ru G, et al. Circulating Tumor DNA as a Potential Marker to Detect Minimal Residual Disease and Predict Recurrence in Pancreatic Cancer. Front Oncol 2020; 10:1220.
66. Watanabe F, Suzuki K, Tamaki S, Abe I, Endo Y, Takayama Y, et al. Longitudinal monitoring of KRAS-mutated circulating tumor DNA enables the prediction of prognosis and therapeutic responses in patients with pancreatic cancer. PLoS One 2019; 14:e0227366
67. Garcia-Murillas I, Schiavon G, Weigelt B, Ng C, Hrebien S, Cutts RJ, et al. Mutation tracking in circulating tumor DNA predicts relapse in early breast cancer. Sci Transl Med 2015; 7:302ra133
68. Ott JJ, Ullrich A and Miller AB. The importance of early symptom recognition in the context of early detection and cancer survival. Eur J Cancer 2009; 45:2743-8.
69. Campos-Carrillo A, Weitzel JN, Sahoo P, Rockne R, Mokhnatkin JV, Murtaza M, et al. Circulating tumor DNA as an early cancer detection tool. Pharmacol Ther 2020; 207:107458
70. Hohaus S. Genomic imbalances in circulating DNA in Hodgkin's lymphoma. Lancet Haematol 2015; 2:e48-49.
71. Amant F, Verheecke M, Wlodarska I, Dehaspe L, Brady P, Brison N, et al. Presymptomatic Identification of Cancers in Pregnant Women During Noninvasive Prenatal Testing. JAMA Oncol 2015; 1:814-819
72. Cohen JD, Li L, Wang Y, Thoburn C, Afsari B, Danilova L, et al. Detection and localization of surgically resectable cancers with a multi-analyte blood test. Science 2018; 359:926-30.
73. Conway AM, Mitchell C, Kilgour E, Brady G, Dive C and Cook N. Molecular characterisation and liquid biomarkers in Carcinoma of Unknown Primary (CUP): taking the 'U' out of 'CUP'. Br J Cancer 2019; 120:141-53.
74. El Rassy E, Khaled H and Pavlidis N. Liquid biopsy: a new diagnostic, predictive and prognostic window in cancers of unknown primary. Eur J Cancer 2018; 105:28-32.

SEMMELWEIS KIADÓ SZAK- ÉS TANKÖNYVEI

Sport, Testképzés / Kardiológia, Szív- és érgyógyászat

Könyveink megvásárolhatók a Legendus Könyvesboltban, illetve a Líra Kereskedelmi hálózaton belül az egész országban, de egyre nagyobb igényt elégít ki webshopunk.



Dr. Kiss Orsolya, Dr. Merkely Béla, Dr. Vágó Hajnalka (szerk.)

SPORTORVOSTAN

Tudományos, multidiszciplináris alapokon nyugvó sportorvoslás tömör kézikönyve.

196 oldal ■ Ára: 3400 Ft

Merkely Béla, Becker Dávid (szerk.)

SZÍV- ÉS ÉRGYÓGYÁSZAT 1-2.

Számos ábra, kép, grafikon segítségével a klinikai alapoktól a legkorszerűbb diagnosztikus és terápiás eljárások bemutatásáig, a kardiológia területén érintettek széles körének szól, az orvostanhallgatóktól a szakorvosokig.

936 oldal ■ A két kötet ára: 16 000 Ft

Könyvek E-könyvek Folyóiratok Apropó Poszter Box

Semmelweis Kiadó
1089 Budapest, Nagyvárad tér 4.
www.semmelweiskiado.hu

LEGENDUS KÖNYVESBOLT
1089 Budapest, Nagyvárad tér 4.
Tel.: 210-4408, 459-1500/56353
Nyitva tartás: H–Sz: 9.00–16.00,
Cs: 9.00–18.00, P: 9.00–14.00
E-mail: info@semmelweiskiado.hu

GIOTRIF®

az EGFR M+ előrehaladott NSCLC-ben szenvedő betegek kezelésére akik TKI kezelésben még nem részesültek[1]

Lépéselőny az elsővonalbeli terápiában is

- Szignifikáns OS eredmények elsővonalbeli kezelés esetén a standard kemoterápiákhoz képest [2,3]
- Több, mint 1 éves OS előny a del19-es betegek esetében a pemetrexed/cisplatin kombinációhoz képest [2,3]

Az alkalmazási előírás a QR kódon keresztül érhető el.

A forgalomba hozatali engedély jogosultja: Boehringer Ingelheim International GmbH.

A forgalomba hozatali engedély számai: EU/1/13/879/001-012.

Orvosi rendelvényhez kötött gyógyszer (SZ). Az alkalmazási előírás dátuma: 2020.09.14. (EMEA/H/C/002280/R/0026 /). Bővebb információért olvassa el a gyógyszer részletes alkalmazási előírását! Ezt megtalálhatja a http://www.ema.europa.eu/ illetve https://www.ogyei.gov.hu/gyogyszeradatbazis/ alatt, illetve kérheti a a Boehringer Ingelheim International GmbH magyarországi elérhetőségén: info@bud.boehringer-ingelheim.com OEP által tételes finanszírozásban támogatott készítmény a 8/a4. pont indikáció alapján. http://njt.hu/cgi_bin/njt_doc.cgi?docid=18771.333237. Letöltés dátuma 2021.02.15. Bruttó fogyasztói ár: Giotrif 40mg 28x -582 026 HUF. Giotrif 30mg 28x -582 026 HUF. www.oep.hu letöltés dátuma 2021.02.15.

PC-HU-101796 Oncology Giotrif lezárás dátuma: 2021.02.15

[1] Giotrif alkalmazási előírás

[2] Yang JHC et al, Overall survival (OS) in patients with advanced non-small cell lung cancer (NSCLC) harboring common (del19/L858R) epidermal growth factor receptor mutations (EGFR mut): Pooled analysis of two large open-label phase III studies (LUX-Lung 3 and LUX-Lung 6) comparing afatinib with chemotherapy (CT). J Clin Oncol 2014:32:5s (suppl;abstr 8004^)

[3] Yang JCH et al. Afatinib versus cisplatin-based chemotherapy for EGFR mutation-positive lung adenocarcinoma (LUX-Lung 3 and LUX-Lung 6): analysis of survival data from two randomised phase 3 trial.

Lancet Oncology 2015;16(2):141-151

* predefined sub-group of common mutations in the LUX-Lung 3 trial

† N=345. PFS=progression-free survival OS=overall survival

Boehringer Ingelheim

Boehringer Ingelheim
RCV GmbH & Co. KG Magyarországi Fióktelepe
1095 Budapest, Lechner Ö. fasor 10.
Tel.: 1 299-8900; Fax: 1 299-8901
Orvosi információ: medinfo.hu@boehringer-ingelheim.com
www.boehringer-ingelheim.hu

GIOTRIF® (afatinib) tabletta

Az újgenerációs szekvenálás diagnosztikus alkalmazásának alapjai – gyakorlati bevezetés a precíziós medicinába

Basic concepts of diagnostic application of next-generation sequencing – a practical introduction to precision medicine

Bedics Gábor[1,2], **Sebestyén Endre**[1]

[1] Bioinformatika Munkacsoport, I. Sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet, Semmelweis Egyetem, Budapest

[2] HCEMM-SE Molekuláris Onkohematológia Kutatócsoport, I. Sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet, Semmelweis Egyetem, Budapest

E-levél: bedics.gabor@med.semmelweis-univ.hu

ÖSSZEFOGLALÁS A precíziós medicina megjelenése új távlatokat nyitott a gyakorlati orvoslás számára. A precíziós medicina eszköztára teszi lehetővé, hogy molekuláris patológiai vizsgálatok alapján célzott gátlószeres kezelésben részesüljenek egyes genetikai variánsokat hordozó betegek. Újításainak sok diszciplína használ láthatja, ám az onkológiai betegellátás számára különös előnyt jelent. Ezen eszközök használata modern molekuláris biológiai felkészültséget vár el a gyakorló orvostól, másrészt pedig előnyös, ha a célzott gátlószer indikációjához vezető molekuláris patológiai módszerek lényegét is átlátja a klinikus. Ennek érdekében tanulmányunkban összefoglaltuk a legszükségesebb molekuláris biológiai alapfogalmakat. Emellett igyekeztünk a klinikumban dolgozó orvosok számára is érthető módon összefoglalni a molekuláris patológia egyre többet használt új eszközének, az újgenerációs szekvenálásnak a működési elvét, valamint a generált eredmények bioinformatikai elemzését és az eredmények klinikai interpretációját.

KULCSSZAVAK precíziós medicina, újgenerációs szekvenálás, bioinformatika, célzott terápia

SUMMARY Emergence of precision medicine provides new insights for clinical medicine. The opportunities of precision medicine facilitate selecting the optimal targeted therapy for patients with certain genetic abnormalities. Its methods benefit diverse medical disciplines, however they are particularly useful in oncology. Using these methods requires in-depth knowledge of molecular biology from the clinicians. Moreover, it is advantageous to have a comprehensive overview of the full molecular diagnostics pipeline, leading to the medical indication of a certain targeted therapy. Therefore, in this paper we summarized the most important concepts of molecular biology. Beyond this, we aimed to summarize the principles of next-generation sequencing (NGS), the bioinformatic analysis of NGS generated data, and its clinical interpretation. We hope that our paper will serve as an easily understandable guideline for healthcare workers without an in-depth knowledge of molecular biology.

KEY WORDS precision medicine, next-generation sequencing, bioinformatics, targeted therapy

Rövidítések

BWA	*Burrows-Wheeler Aligner – Burrows-Wheeler genomi illesztőprogram*
cDNS	*complementer DNS*
CML	*krónikus myeloid leukaemia*
CNV	*Copy Number Variation - kópiaszámeltérés*
COSMIC	*Catalogue of Somatic Mutations in Cancer – tumoros szomatikus mutációk adatbázisa*
dbSNP	*Single Nucleotide Polymorphism Database – egyedi nukleotidpolimorfizmus adatbázis*
FDA	*Food and Drug Administration – az USA élelmiszer- és gyógyszerügyi hatósága*
FFPE	*Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded – formalinfixált, paraffinba ágyazott (szövet)*
GATK	*Genome Analysis Toolkit – genomanalízis eszköztár*
GIST	*gastrointestinalis stromalis tumor*
NGS	*Next-Generation Sequencing – újgenerációs szekvenálás*
pre-mRNS	*pre-messengerRNS*
SNP	*Single Nucleotide Polymorphism – egyedi nukleotidpolimorfizmus*
snRNS	*small nucleolar RNA – kis sejtmagi RNS*
SNV	*Single Nucleotide Variant – egyedi nukleotidvariáns*
STAR	*Spliced Transcripts Alignment to a Reference – Splicingon átesett transzkriptumok referenciához való illesztése (szoftver)*
TMB	*Tumor Mutational Burden – tumor mutációs terhelés*
UTR	*Untranslated Region – nem átíródó régió*
VAF	*Variant Allele Frequency – variáns allél frekvencia*
VEP	*Variant Effect Predictor – variáns hatás becslő (szoftver)*

Bevezetés a precíziós medicinába

A precíziós medicina egyike a legnagyobb paradigmaváltásoknak az orvostudomány történetében. Ezen újítás előtt a különböző genetikai hátterű, eltérő életmódú betegek legtöbbször ugyanazt a terápiát kapták, sokszor csak a dozírozásban mutatkozott különbség. Napjainkban a precíziós medicina lehetővé teszi, hogy a páciens genom- vagy transzkriptomszintű vizsgálata alapján a legmegfelelőbb terápiát, a megfelelő időben és a megfelelő dózisban alkalmazhassuk. Az említetteken túl a jövőben a betegek epigenetikai, proteomikai és metabolomikai analízise tovább bővítheti a diagnosztikus, prognosztikus, valamint terápiás lehetőségeket.

Az orvostudomány valamennyi területe számára hasznos a precíziós medicina alkalmazása, azonban az onkológia kitüntetett haszonélvezője ennek a paradig-

maváltásnak.[1] A precíziós orvoslás módszereinek alkalmazása minden tumoros megbetegedés esetén hasznos lehet, de az emlő-, gyomor-bélrendszeri, tüdő-, vérképző szervi, illetve a ritka tumorok esetén kiemelt gyakorisággal alkalmazzuk ezen módszereket. A precíziós medicina eddig is számtalan beteg diagnosztizálásában, terápiájának meghatározásában játszott alapvető szerepet, a haszon, melyet a célzott terápiák által megmentett életek jelentenek, felbecsülhetetlen. Számos onkológiai sikertörténet eredménye köszönhető ezen módszereknek. Ilyen például a krónikus myeloid leukaemia (CML) története, melynek kezelésében átütő sikert hozott az imatinib nevű célzott tirozin-kinázgátló alkalmazása.[2] Az imatinib nem csak az addig rossz prognózist jelentő CML kezelését forradalmasította, hanem az igen nehezen kezelhető gastrointestinalis stromalis tumor (GIST) terápiájában is áttörést hozott.[3] Említést érdemel a herceptin (trastuzumab) monoklonális antitest is, mely az emlőtumorok egy részének gyógyítását teszi lehetővé.[4] A példákban említett gyógyszerek alkalmazásának az alapja egy adott gyógyszerrel célba vehető mutáció kimutatása, melyhez a precíziós medicina alkalmazása segíti hozzá a kezelőorvost.

Mint minden újítás, a precíziós medicina eszköztára is sok nehezen érthető részletet tár a szakemberek

MUTÁCIÓ
A DNS bázissorrendjének megváltoztatása

VARIÁNS
A vizsgált mintában talált, referenciától eltérő DNS-szekvencia.

CNV (kópiaszám-változás)
Különböző hosszúságú nukleotidok, gének számának a referenciától történő eltérése.

VAF (variáns allél frekvencia)
Megmutatja, hogy az adott genomi pozícióban a vizsgált DNS szakaszok mekkora aránya tartozik egy adott variánsahoz.

MISSENSE MUTÁCIÓ
Olyan mutáció, melynek eredménye a kódolt fehérje aminosavsorrendjének megváltozása.

NONSENSE MUTÁCIÓ
Olyan mutáció, mely „STOP-kodont" hoz létre, így a fehérjeszintézis túl korai terminációjához vezet.

SZINONÍM MUTÁCIÓ
Olyan mutáció, mely során a megváltozott nukleotid nem módosítja a kódolt aminosavat.

INTRON VARIÁNS
Nem kódoló régióban bekövetkező mutáció hatására módosulhat a splicing, mely akár kóros folyamatokhoz is vezethet.

SNP (egynukleotid-polimorfizmus)
Egy nukleotidot érintő eltérés a referenciagenomtól, mely a populáció legalább 1%-ban megtalálható.

TNB (tumormutációs terhelés)
A tumorban talált mutációk összege, mely utal a neoantigének expressziójára, azáltal immunterápiákat indikálhat.

MSI (mikroszatellita-instabilitás)
A DNS „mismatch-repair" hibajavító funkciójának zavara következtében megjelenő jellegzetes mutációs forma.

GERMLINE (csíravonalat érintő)
Ilyen mutáció megjelenését követően az utódok minden testi sejtjében megjelenik, öröklődhet az adott variáns.

SZOMATIKUS
Testi sejteket érintő, nem öröklődő tulajdonság.

READ
Új generációs szekvenálás során a megsokszorozott vizsgált fragmentum egy kópiája.

1. ábra: A precíziós medicina néhány alapfogalma

elé, és saját szakmai nyelvezete sem mindig egyértelmű. Jelen tanulmány célja a gyakorló orvos számára betekintést nyújtani a precíziós medicina világába, közérthetően leírni azon eltéréseket és módszereket, melyek alapján a molekuláris diagnosztika leletei elkészülnek. Ezzel szeretnénk hozzájárulni ahhoz, hogy ez a hatalmas távlatokat nyújtó újítás egyre több orvos számára legyen érthető és a mindennapokban használt, ezzel is a betegek javát szolgálva.

Alapfogalmak

A molekuláris diagnosztika alkalmazása során egyes molekuláris biológiai ismeretek elengedhetetlenek, így a diagnosztika részleteinek kifejtése előtt ismertetünk néhány alapvető fogalmat. Ennek kivonata szerepel az *1. ábrán*, részletes kifejtése pedig alább található.

A *mutáció* eukarióta sejtekben a genomi DNS-szekvenciájának megváltozását jelenti. Eredete alapvetően három féle lehet: indukált, mely esetben fizikai hatások (ultraibolya-sugárzás, ionizáló sugárzások) vagy kémiai ágensek (oxidatív stressz, alkilálószerek) állnak a mutáció hátterében; a DNS-hiba-javító mechanizmusok működésének zavara; ritka esetben pedig spontán történik a DNS mutációja.

A *mutációk szerkezeti jellege* nagy változatosságot mutat, ennek alapján két nagy csoportba sorolhatók.

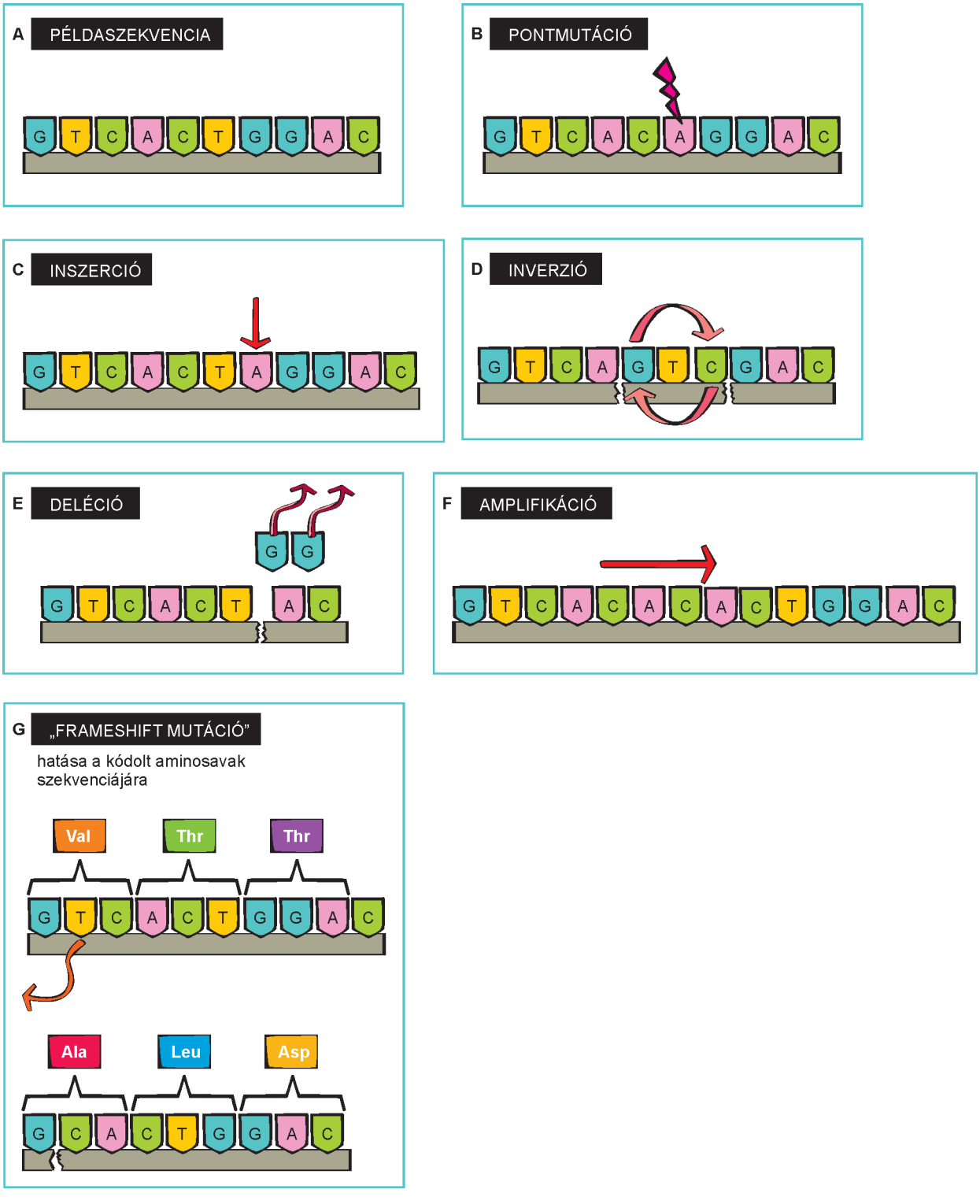
A *kisméretű mutációk* csoportjába tartozik a pontmutáció, mely esetén egyetlen nukleotid változik meg. Ebbe a csoportba tartozik még az inszerció, mely egy vagy több nukleotid beékelődését jelenti a genomi DNS-be, illetve a deléció, mely egy vagy több nukleotid kivágódását eredményezi. Az inszerciókat és deléciókat összefoglaló néven indelnek is nevezzük.

A mutációk szerkezet szerinti felosztásának másik fő csoportját a *nagyméretű mutációk* alkotják. Ide tartoznak génszakaszok, gének vagy nagyobb kromoszóma régiók duplikációi és amplifikációi (sokszorozódás), hasonló méretű régiókat érintő deléciók, vagy olyan eltérések, melyek korábban egymástól távoli kromoszómarégiókat helyeznek egymás közelébe. A nagyméretű mutációk kitüntetett alcsoportja a kromoszomális átrendeződések gyűjtőcsoport, melybe kromoszomális inverziók – egy régió irányának megcserélődése, kromoszóma transzlokációk – nem homológ kromoszómák törése, illetve a levált fragmentum kicserélődése, valamint intersticiális deléciók tartoznak. Utóbbi során a kromoszómán belül jelentős méretű deléció jön létre, mely korábban egymástól távol elhelyezkedő géneket hoz egymás közelébe.

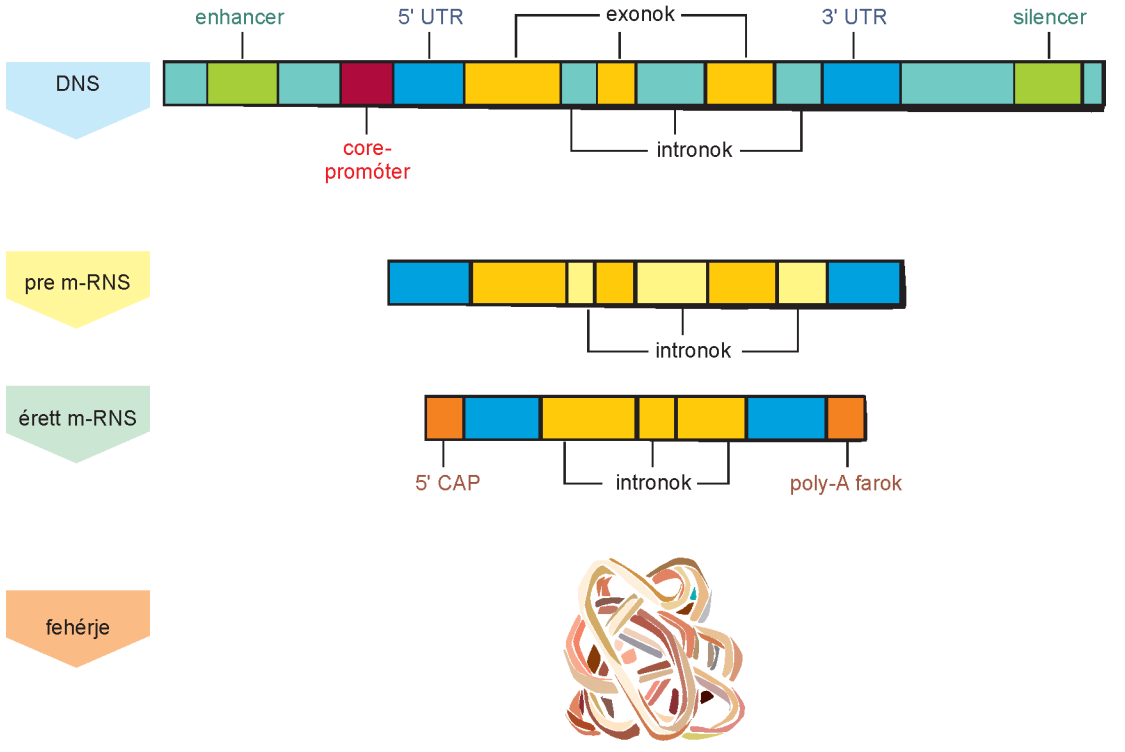
A *mutációk hatása* a kódolt fehérje funkciójára igen változatos lehet. Ez döntően attól függ, hogy a mutáció milyen kódoló régiót érint, milyen méretű, és jár-e aminosavcserével. A kódoló régiókat érintő mutációk közül a *pontmutáció* ugyan megváltoztat egy nukleotidot, de ez nem jelenti feltétlenül a kódolt protein aminosavsorrendjének megváltozását, hiszen többféle nukleotid-triplet is kódolhatja ugyanazt az aminosavat. Az ilyen eseteket *szinonim szubsztitúciónak* nevezzük, hiszen a pontmutációval létrejött triplet változás lényegében szinonimája az eredeti triplet jelentésének. Ha a pontmutáció következtében létrejött nukleotidváltozás a kódolt aminosav változását, következésképp a kódolt fehérje funkciójának potenciális megváltozását vonja maga után, a mutációt *missense mutációnak* nevezzük. Ugyanakkor a missense mutáció következtében létrejövő aminosavcsere történhet kémiailag igen hasonló entitások között, mely alig vagy nem jár funkcióváltozással. Olyan esetekben, amikor a pontmutáció következtében ún. STOP-kodon jön létre rendellenes helyen, mely a transzláció folyamatának idő előtti terminálásához vezet, *nonsense mutációról* beszélünk. Ilyenkor többnyire jelentősen változik a kódolt fehérje szerkezete, funkciója.

A kódoló régiókban létrejövő mutációk másik típusa az ún. *„frameshift mutation”* vagy leolvasási keret eltolódás. Olyan esetekben jön létre, amikor hárommal nem osztható számú nukleotid inszerciója vagy deléciója történik. A genetikai kód vagyis a fehérjéket alkotó aminosavak kódolása nukleotidtripletek formájában történik, mely tripletek folyamatosan követik egymást. Ezért a DNS-szál leolvasása során egy hárommal nem osztható nukleotidszámú eltérés az utána következő összes tripletet eltolja, és így az eredetitől potenciálisan nagyon különböző aminosavakat tartalmazó fehérje jöhet létre *(2. ábra)*.

A nem kódoló régiók közül a promóter, enhancer, silencer szekvenciákat *(3. ábra)* érintő mutációk nem járnak a kódolt fehérje aminosav-sorrendjének megváltozásával, de az érintett gén expressziója megváltozhat az előbb említett génexpressziós szabályozásban résztvevő szekvenciák mutációjával. A direkt aminosavcserével nem járó pontmutációk érinthetnek olyan splice-helyeket, amelyek befolyásolják az RNS-splicingot, ezáltal potenciálisan megváltoztatva a fehérje transzlációját, szerkezetét vagy lebomlását. Ilyen mutációk létrejöhetnek az exon–intron határon vagy bizonyos intronikus szekvenciákban is.



2. ábra: Egyes mutációtípusok sematikus rajza.
*Az **A** ábrán látható példaszekvencia segítségével mutatjuk be a gyakori mutációtípusokat. A **B** ábrán látható, ahogy a 6. pozícióban található timin nukleotid pontmutáció hatására adeninre cserélődött. A **C** ábra mutatja egy adenin nukleotid beékelődését a 6. és korábban 7. pozícióban elhelyezkedő nukleotidok közé. A **D** ábrán az 5-7 pozícióban levő nukleotid-triplet DNS-törések hatására fordított irányban illeszkedik vissza. Az **E** ábra két guanin nukleotid kivágódását illusztrálja a példaszekvenciából, míg az **F** ábra egy citozin-adenin dinukleotid amplifikációját szemlélteti. A **G** ábrán egy frameshift mutációt látunk, ahol a példaszekvencia 2. pozícióban elhelyezkedő timin nukleotidja deletálódik, minek következtében a keletkezett kódoló szekvencia által kódolt aminosavak teljesen megváltoznak, ugyanis a frameshift-deléció miatt elcsúszott a leolvasási keret.*



3. ábra: Gének sematikus szerkezete. A DNS szekvenciában a később kifejeződő elemeken kívül egyéb struktúrák is találhatóak. A core promóter (vagy másként alap promóter) régió a transzkripció iniciációjához szükséges, mintegy 50 bázispár hosszú régió, mely fő feladata az általános transzkripciós faktorok és az RNS-polimeráz II enzim megkötésén keresztül az alap transzkripció biztosítása. Ettől távolabb helyezkednek el további, a transzkripció szabályozásában szerepet játszó szekvenciák, mint az enhancerek és silencerek. A gén végeinél helyezkednek el az ún. nem transzlálódó régiók (untranslated region, UTR), melyek mRNS-be átíródnak, génkifejeződést szabályozó funkcióval rendelkeznek. A transzkripció során mind az exon, mind az intron szekvenciák pre-mRNS-be íródnak át, majd a splicing során hasítódnak ki az intronok. Ez történhet konstitutív módon, amikor egy gén exonjai közül mindig csak ugyanazok fejeződnek ki az intronok kihasadásával, vagy alternatív módon, amikor egy gén exonjai különböző kombinációkban fejeződnek ki. Az érett mRNS molekula már csak exonokat tartalmaz a speciális -szabályozást és védelmet biztosító- CAP, illetve poli-A farok szekvenciák mellett. A transzláció során már csak az exonok fordítódnak le aminosavakra.

A következő szinten vizsgálva a mutációk hatását, azok következménye a fehérje funkciójára nézve járhat funkciónyeréssel (*gain-of-function)* vagy funkcióvesztéssel *(loss-of-function)*. Ez a funkcióbeli változás széles skálán mozoghat. Onkológiai relevanciája lehet például egy protoonkogén funkcióvesztő mutációjának, mely fokozott proliferációs szignált ad a sejtnek (pl. RAS-mutációk). Szintén onkogén lehet a tumorszuppresszor gének funkcióvesztő mutációja, mely például proapoptotikus útvonalak vagy a genom integritásának elvesztéséhez vezethet (pl. *TP53*).

A mutációk érinthetnek csírasejteket, mely esetben csíravonal-mutációról vagy *germline* mutációról beszélünk. Ilyenkor a mutáció bekövetkezte utáni generációban minden szomatikus sejtben megtalálható lesz az eltérés. Ha nem csírasejtet, hanem testi sejtet érint a mutáció, szomatikus mutációnak nevezzük, amely nem öröklődik.

Variáns alatt értjük az adott minta vizsgálatából nyert olyan szekvenciát, mely eltér a referenciaszekvenciától. Sokszor a mutáció kifejezés szinonimájaként használják a variáns kifejezést. Ennek a nevezéktana még nem teljesen kiforrott, ebben a tanulmányban elkülönítjük ezen kifejezéseket, mutáció alatt a különböző nukleotid változásokról mint jelenségekről beszélünk, míg variáns alatt az adott minta adott szekvenciáját értjük. A variáns vizsgálatának az a célja, hogy megállapítsuk, hogy a referenciától való eltérésének hátterében milyen mutáció áll, és annak milyen következménye lehet. Vannak olyan variánsok, melyek nem patogének, hiszen nem járnak a fehérje funkciójának változásával.

A variáns allél gyakoriság *(variant allele frequency,* VAF*)* megmutatja, hogy az adott genomi régióra illeszthető összes szekvenálási read hány százaléka tartozik az adott variánshoz. Leegyszerűsítve: megadja tehát, hogy a szekvenálási readek mekkora arányát teszi ki egy adott variáns. Mivel a mintában levő összes DNS-hez képest vizsgál arányokat, ezért befolyásolja, hogy milyen típusú sejtekből származik a DNS. Ismert jelen-

ség a tumorszövetben levő sejtek genetikai heterogenitása, ezért meghatározható, hogy az adott tumorszövetben az általunk vizsgált variáns a sejtek mekkora hányadában található meg. Tovább bonyolítja a számítást az a lehetőség, hogy mintavételkor sokszor nem kóros sejtek is keveredtek a kórosak közé. Így az egészséges sejtek DNS tartalma keveredik a kóros sejtekével, ami módosítja a kapott VAF értéket. Amennyiben lehetséges, a tumorsejtarány pontos meghatározásával az említett hibalehetőség korrigálható.

A kópiaszám-változás, vagy *copy number variation* (CNV) fogalma alatt tárgyaljuk a genomi régió vesztéseket (deléciókat), vagy régió sokszorozódásokat (duplikációk, amplifikációk). Ezek a kópiaszám eltérések gyakran patogének, mivel gének deléciója, vagy éppen kópiaszámuk növekedése jelentős funkcióváltozást eredményezhet.

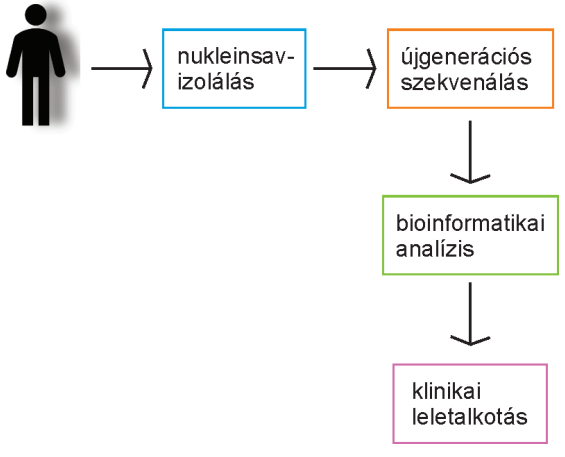
Az egyedi nukleotid polimorfizmusok (*single nucleotide polymorphism*, SNP) olyan egy nukleotid eltérését mutató variánsok, melyek a populáció legalább 1%-ban jelen vannak.[5] Ezek sok egyének közti fenotípus eltérésért, különböző betegségek kialakulásáért, vagy az azokra való hajlam növekedéséért lehetnek felelősek. Az egyedi nukleotid variációk (single nucleotide variation – SNV) szintén egy nukleotidnyi változást hordozó variánsok, de nincs meghatározva, hogy milyen gyakorisággal jelennek meg a populációban.

Egyre gyakrabban szerepel molekuláris patológiai leletekben a tumor mutációs terhelés (*tumor mutational burden* – TMB) fogalma. Ez a tumormintában fellelhető mutációk számának összegét jelenti, melyet tipikusan az exom (exonok összessége) vagy nagy méretű panelek szekvenálásával állapítunk meg. Klinikai relevanciája jelentős lehet, hiszen prediktív biomarkere bizonyos immunterápiák alkalmazásának. Ennek hátterében az áll, hogy a magas mutációs terhelésű tumorok gyakrabban fejeznek ki neoantigéneket, melyek T-sejt mediált immunválaszt váltanak ki, és ennek elősegítésében immunellenőrzőpont gátló szerek alkalmazása előnyös lehet.[6]

A mikroszatellita-instabilitás státusza is sok esetben járhat klinikai relevanciával. A mikroszatellita régiók vagy más néven rövid tandem ismétlődések 2–6 bázispárnyi ismétlődések, melyek a genom mintegy 3%-át alkotják. Ismétlődéseik instabillá válása a DNS mismatch-repair mechanizmus defektusának következménye.[7] A mikroszatellita-instabilitás által okozott betegségek közül a legismertebbek: a Huntington-kór és a fragilis-X szindróma. Az onkológiában főként colorectalis, de gastricus, és endometriumcarcinomák esetén is megfigyelhető ez a jelenség, amelynek prognosztikus, illetve terápiás relevanciája van.[8]

A mintától a molekuláris leletig

A precíziós medicina módszerei által nyújtott terápiás ajánlásokhoz és prognózisbecslésekhez előzetes molekuláris diagnosztikai vizsgálatok szükségesek *(4. ábra)*. Ennek első lépése a megfelelő módszerrel vett minta a pácienstől. Ez a minta leggyakrabban biopszia során nyert szövet- vagy vérminta, de előfordul, hogy haj-, körömmintából, vagy formalinban fixált, paraffinba ágyazott (*formaline fixed paraffine embedded*, FFPE) szövet metszetéből indul ki a nukleinsav izolálása. DNS izolálása különböző szövetekből könnyen végezhető, és jó hatásfokkal izolálható FFPE mintából is. Ezzel szemben az RNS izolálásának relatíve rövid idő alatt kell megtörténnie, annak bomlékonysága miatt. RNS izolálása FFPE mintából technikailag nehéz, általában rossz minőségű izolátumhoz vezet. A legtöbb esetben csak a kóros vagy annak tűnő szövetből végzünk vizsgálatot, de lehetőség van a tumoros mintán túl ugyanazon betegből feltételezhetően egészséges szövetet is vizsgálni. Ennek az elve hasonló a radiológi-



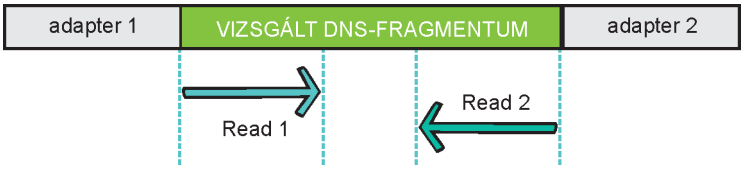
4. ábra: Újgenerációs szekvenálást alkalmazó precíziós diagnosztika folyamata. A páciensből történő klinikai mintavételt követően először a klinikai kérdéshez alkalmas molekuláris diagnosztikai módszert választjuk meg, majd eszerint történik a nukleinsav-izolálási lépés. Az izolált RNS-, DNS-ből különféle molekuláris vizsgálatok végezhetők, e tanulmány az újgenerációs szekvenálás által elvégezhető molekuláris vizsgálatokra koncentrál. Az újgenerációs szekvenálás által generált adatok elemzése csak bioinformatikai módszerekkel lehetséges, ezt az analízist követi a leletalkotás a kérdést megfogalmazó klinikus számára.

ából ismert szubtrakcióhoz, mivel így az egészséges szövetben talált esetleges populáció szintű variánsok „kivonhatók" a kóros szövet eredményeiből, egyszerűsítve annak analízisét. Emellett egy ilyen vizsgálattal fény derülhet egyéb öröklődő variánsok jelenlétére is.

A precíziós medicina a modern molekuláris biológiai módszerek széles tárházát használja, azonban a legtöbbet használt modalitása az újgenerációs szekvenálás (next-generation-sequencing, NGS). Az NGS technológia működési elvei, lehetőségei számos közlemény témáját képzik, jelen tanulmány keretei közé csak a legalapvetőbb tulajdonságok leírása fér bele.[9-11] Ezt a technológiát nevezik még tükörfordításban „nagy áteresztőképességű" vagy másképp „masszívan parallel" szekvenálásnak is. Ezek az elnevezések jól rávilágítanak a technológia lényegére. Polinukleotidok véletlenszerű hasítása után egymás mellett (parallel) történik a rengeteg DNS- vagy RNS-fragmentum szekvenálása, ezáltal válik a szekvenálás igen nagy teljesítményűvé az előző szekvenálási technológiákhoz képest. A szekvenálás folyamata nagyon különböző lehet, számos biokémiai, biofizikai változáson alapuló nukleotid sorrend-meghatározási technika ismert. Jelenleg az NGS terén piacvezető Illumina cég műszereinek használata terjedt el hazánkban is. Ezen eszközökre jellemző, hogy a szekvenálást szintézis útján végzik, 3–400 nukleotid hosszúságú polinukleotid-szakaszokat szintetizálnak, amelyeket „read"-eknek nevezünk *(5. ábra)*. A szekvenálási reakcióban minden lépésben fluoreszcens módon jelöljük az egyes nukleotidokat.

A szekvenálás a gyakorlatban DNS vagy RNS polinukleotidok szekvenciáinak meghatározását jelenti, bár lehetséges fehérjék aminosavszekvenciájának a meghatározása is, eltérő módszerrel. A DNS-szekvenálási módszerek célja a genomban fellelhető mutációk meghatározása, hiszen azoknak diagnosztikus, terápiás, prognosztikus haszna lehet. A klinikai kérdéstől függően lehetséges a teljes genom-, a fehérjeszinten is kifejeződő exonok összességének, tehát a teljes exomnak a szekvenálása, illetve lehetőség van különböző betegségekben a gyakran mutálódott génekre leszűkített ún. génpanelek szekvenálására is. A teljes genom, illetve teljes exom szekvenálása ugyan technikailag működőképes, azonban ennek az elemzése, a találatok interpretálása még komoly nehézségekbe ütközik. Emellett egy további szempont támogatja a panelszekvenálások alkalmazását. A műszertől függően minden szekvenálási vizsgálatnak van bizonyos kapacitása, tehát adott nukleotid-mennyiségű DNS feldolgozására képes. Ennek megfelelően az egyes DNS szakaszokra eső szekvenálási kapacitás annál nagyobb, minél rövidebb DNS szakaszt akarunk vizsgálni. Ezt fejezi ki a szekvenálási mélység fogalma, mely a szekvenálandó nukleotidokra eső readek átlagos számát jelenti. Az említett módszerek közül egy szekvenálási vizsgálattal (vagy ahogy a szakzsargonban szerepel: „futtatással") a legnagyobb szekvenálási mélység a panel-szekvenálással érhető el, ennél alacsonyabb a szekvenálási mélysége a teljes exom szekvenálásnak, végül a legalacsonyabb a teljes-genom szekvenálásé. Manapság a gyártók által tervezett génpaneleken túl van lehetőség egyénileg megtervezett génpanel legyártására és használatára is.

RNS-szekvenálási vizsgálatok során elsősorban a vizsgált gének expressziójáról kaphatunk információt, de ez a fajta eljárás alkalmas fúziós transzkriptumok detektálására, illetve mutációk kimutatására is, azonban az előbb említett DNS-szekvenálásnál kevésbé megbízhatóan. RNS-szekvenálás esetén a szekvenálás mélysége nem egyenletes, hiszen az RNS a génexpresszió szintjével arányos mértékben van jelen a vizsgált szövetben, sejtekben. Itt is lehetséges panel-

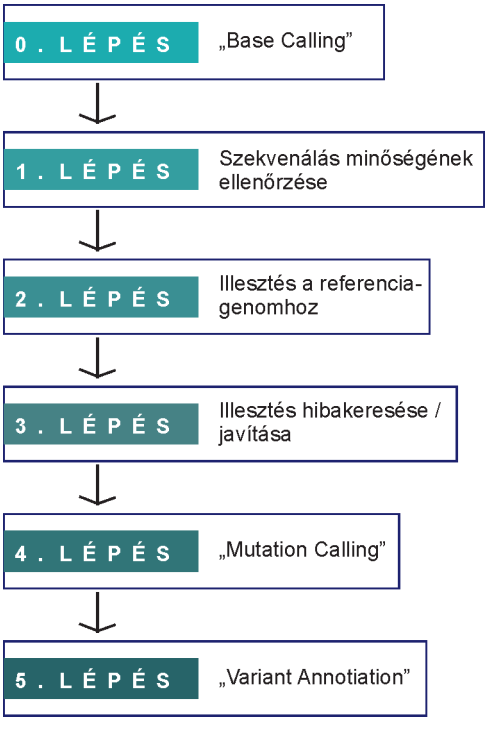


5. ábra: A „read". Az NGS módszerek azon gyakori alcsoportjában, ahol a vizsgált anyag szekvenálását egy, a benne található DNS- vagy RNS-molekulákról történő szintézissel végzik, readek keletkeznek. Ezen readek szintézise során képződnek a szekvenálási jelek, amelyeket a műszer leolvas. A readek hossza az alkalmazott technológiától függ, széles keretek közt változhat, általában 2–300 nukleotidnyi. Az ábrán egy páros végű, ún. 'paired end' szekvenálás látható, mely esetén a szekvenálandó fragmentum mindkét végéről indulva szintetizálódik egy-egy read. Ezt a páros végű szekvenálási módot alkalmazzuk a leggyakrabban. Ahogy az ábrán is látszik, a readeknek nem feltétlenül kell átérniük az aktuális fragmentum hosszát. Mégsem marad szekvenálandó DNS nukleotid meghatározás nélkül, hiszen a DNS-t fragmentáljuk a vizsgálat előtt, így a véletlen fragmentálási helyek miatt az egyik fragmensen épp readek által nem fedett szekvenciát egy másik fragmentumban valószínűleg megszekvenáljuk. Az adapter szekvenciákat az NGS vizsgálat előkészítése során illesztik a vizsgálandó molekulákhoz, technikai szerepük van.

szekvenálás alkalmazása, valamint egyes RNS alcsoportok külön meghatározása is pl. poliA-mRNS, mikroRNS (miRNS) vagy kis sejtmagi RNS (snRNS).

Az újgenerációs szekvenálás jelentősen megnövekedett teljesítménye nemcsak nagymértékben gyorsítja a szekvenálási folyamatot, de végeredményként olyan mennyiségű adatot szolgáltat, melynek manuális értelmezése nem kivitelezhető, így az NGS eredmények interpretációjához bioinformatikai és statisztikai módszerek alkalmazása elengedhetetlen *(6. ábra)*.

Elöljáróban szükséges hangsúlyozni, hogy nem rendelkezünk olyan bioinformatikai elemző módszerrel, mely minden típusú szekvenálást univerzálisan és pontosan elemezni tudna. A nyers szekvenálási adatokat analizáló módszerek intenzív kutatás tárgyát képezik, folyamatos fejlesztés alatt állnak, melynek eredményeként ma már elérhetőek olyan bioinformatikai és statisztikai eszközök, melyek klinikai kérdés és pontos szekvenálási módszer szerint megbízható elemzéseket képesek nyújtani.



6. ábra: Az NGS-szekvenálás bioinformatikai analízisének elemei. A bioinformatikai analízis „nyers adatként” a szekvenáló műszer által meghatározott nukleotidsorrendet használja, melyet a berendezés a base calling, vagy nukleotidelőhívás során generál az alkalmazott szekvenálási technikától függő fizikai-kémiai változások függvényében. Ezt követi a szekvenálás minőségének ellenőrzése különböző paraméterek alapján, majd a szekvenálás előtt fragmentált DNS- vagy RNS-darabok kópiáit a bioinformatikai elemző algoritmus a referencia genomhoz illeszti. Az illesztést követő hibakeresés globálisan is vizsgálja az illesztést, és javítja a szisztematikus technikai hibákat. Ezt követi a referencia genomtól való eltérések detektálása és besorolása különböző mutáció típusokba (mutation calling), a folyamat záróeleme pedig a variánsok klinikai annotálása, többek között a patogenitásuk meghatározása.

A DNS-alapú NGS-vizsgálatok bioinformatikai analízise

A szekvenálási reakció lezajlása után a szekvenáló műszer végez egy utolsó lépést, mely a bioinformatikai analízis bemeneti információját adja: az egyes szekvenálási lépéseknél leolvasott fizikai vagy kémiai változásokat nukleotidinformációvá alakítja (angolul: *base calling*). Olykor előfordul, hogy a bioinformatikus végzi a base calling-ot, de tipikusan ez a szekvenáló műszer által végzett lépés. Ennek eredményeként nemcsak a jól ismert nukleotidok fordulnak elő, hanem olyan betűkkel jelzett pozíciók is, melyek bizonytalanság, esetleg hiba jelzésére szolgálnak.

A bioinformatikai analízis első lépése az előhívott bázisok alkotta szekvenciák minőségellenőrzése. Léteznek olyan kisebb minőségbeli hibák, melyek korrigálhatók az analízis során, de előállhat olyan helyzet is, hogy a szekvenálás megismétlése szükséges a klinikai kérdés korrekt megválaszolásához. A legelterjedtebb minőségellenőrző szoftver a FASTQC, mely részletes analízist szolgáltat mintánként a megszekvenált nukleotidok minőségéről, a readek hosszáról, eloszlásáról, vagy guanin-citozin tartalmáról.[12] Emellett gyakran alkalmazott szoftver a MultiQC, mely nemcsak az egyes minták minőségi adatait tartalmazza, hanem ezeket integrálva a szekvenálási futtatás egészének minőségéről ad tájékoztatást, mely fontos visszajelzés lehet a szekvenálási reakciót előkészítő technikusnak, illetve a klinikai interpretálást végző orvosnak vagy kutatónak is.[13]

A bioinformatikai analízis második lépéseként genomi illesztést végzünk a referenciagenomhoz, hogy megtudjuk, a kapott readek a genom mely régiójából származó fragmentumról szintetizálódtak. Az ideális referenciagenom olyan DNS-szekvencia lenne, mely univerzális összehasonlítási alapot jelent minden személy számára, azaz egyformán reprezentálja a humán populáció minden tagjának genomját. Ennek megvalósítása lehetetlen, mivel ugyan az emberek genomjának közel 99,9%-a azonos, azonban az eltérések között nemcsak kisebb mutációk, de jelentős, több gént is magában foglaló nagy strukturális eltérések is lehetnek.[14-16] Emiatt konszenzuson alapuló, számos genom szekvenálásából létrehozott referenciagenomokat használunk, melyeket a *Genome Reference Consortium* ad közre.

A referenciagenomhoz való illesztés leegyszerűsítve úgy történik, hogy az elemző szoftver pozícióról pozícióra megpróbálja illeszteni az adott DNS fragmentumról szekvenált readet a genomi szekvenciához. Az illesztés során nem törekszünk tökéletes illeszkedésre, hiszen a cél az, hogy a potenciális mutációt tartalmazó read is illesztve legyen a referenciagenomhoz. A leggyakrabban a *„Burrows-Wheeler Aligner”* (BWA) szoftvert használjuk referenciaillesztésre, mely széles readhosszúság skálán alkalmazható, megbízható, gyors analízisre képes.[17]

A következő lépés a már illesztett readek hibajavítása. Az ekkor használt szoftver a nukleotidok szekvenálásának minőségi értékeit is felhasználva ellenőrzi az illesztést. Emellett a szoftver további hibajavításként szükség esetén újraillesztést végez. Az illesztőszoftvertől megkülönbözteti az a tulajdonsága is, hogy amíg az illesztő az egyes readeket önmagukban igyekszik illeszteni, addig a hibaellenőrző szoftver a readek illesztését globálisan is vizsgálja. Ez lehetőséget teremt arra, hogy a hibaellenőrzés az illesztési mintázatok alapján keressen technikai problémákat. A leggyakrabban alkalmazott ilyen szoftver a *Genome Analysis Toolkit* (GATK).[18]

Az ellenőrzött, vagy hibajavított illesztés után a következő lépés a mutációk detektálása, vagy „mutation calling”. Ennek a folyamatnak a lényege, hogy az illesztés során talált különbségeket statisztikailag vizsgáljuk és meghatározzuk azok megbízhatóságát, a talált különbség forrását. A referenciagenomhoz képest detektált különbségek származhatnak technikai hibákból, a különféle kísérletes módszerek egyedi torzításaiból, lehetnek gyakori, patogén hatással nem rendelkező variánsok, vagy tényleges, onkogén mutációk. E a célra a gyakorlatban rengeteg szoftver használható, az ismertebbek közé tartozik a LoFreq vagy a VarScan.[19-21] SNV-k és indelek meghatározásának a lényege a referenciagenommal való pontos összevetés. Mivel a szekvenálás is járhat hibákkal, ezért az SNV vagy kisméretű indel meghatározáskor igazából annak eldöntése a fő kérdés, hogy egy mutáció jelenlétének, vagy szekvenálási hibának nagyobb a valószínűsége.

Nagyobb strukturális variánsok, CNV-k meghatározása eltér az előbbiektől, ennek során nem az egyes readekben látható eltéréseket vizsgáljuk, hanem azok genomi eloszlását. Előfordulhat olyan strukturális variáns (pl. génfúzió), amikor a referenciagenomra nem illeszthető, így első körben hibásnak vélt readek vezetnek el a fúziós gén detektálásához. Ebben az esetben a readek olyan szekvenciákat tartalmaznak, amelyek a referenciagenomon távol helyezkednek el egymástól, nem illeszkednek megfelelő módon, de további analízisük a nagy strukturális variáns feltárásához vezethet.

A mutációk detektálását követő lépés a „variant annotation”, mely azt vizsgálja, hogy a szekvenálás analízise során talált variáns szerepet játszhat-e bizonyos kórállapotok patogenezisében, és megállapítja a variáns klinikai relevanciáját. Ehhez az annotáló szoftverek számos különböző adatbázist használnak, melyekben sokszor szakemberek által manuálisan is ellenőrzött adatok biztosítják a klinikai relevancia megállapításának hitelességét. Sok esetben a bioinformatikai elemzésbe illeszthetők azok a lépések, melyek ellenőrzik, hogy a talált variáns szerepel-e az adatbázisokban, máskor manuálisan kell az adatbázisokban keresni, hogy azok rendelkeznek-e releváns információval.

Az egyik leggyakrabban alkalmazott és legátfogóbb ilyen adatbázis a dbSNP, de hátránya, hogy manuális szűrésen nem estek át a benne szereplő adatok. Megbízható és jelentős klinikai relevanciával bír a ClinVar adatbázis. Tumorminták szekvenálásakor az egyik legfontosabb adatbázis a Catalogue of Somatic Mutations in Cancer (COSMIC). Ez igen nagy mennyiségű információval rendelkezik, a honlapján rengeteg adat található a genetikai eltérések molekuláris természetétől a kóros fehérje térszerkezetén át az adott mutációra alkalmazható célzott terápiáig, ráadásul manuálisan ellenőrzött adatokat tartalmaz.[22]

A genomböngészők prototípusaként számon tartott ENSEMBL egy alkalmazása a Variant Effect Predictor (VEP), mely szintén a variánsok klinikai relevanciájáról nyújt tájékoztatást.[23] Az adatbázis integrálható bioinformatikai elemzésekbe is, de laikusoknak is biztosítja a könnyű használatot, ugyanis a mutációs elemzések eredménye több formátumban is betölthető az adatbázisba, ami egy report formájában jelzi vissza kis idő elteltével, hogy a feltöltött variánsok milyen klinikai relevanciával rendelkeznek. Egyes programok, adatbázisok pedig arról nyújtanak információt, hogy egy mutáció következtében létrejövő aminosavcsere vezet-e tényleges patogén károsodáshoz. A két legismertebb ilyen program a SIFT és a PolyPhen.[24, 25] Ezek a gyakorlatban jól alkalmazhatók az előbb említett adatbázisok kiegészítőjeként az azokban ismertetett eredmények megerősítésére.

A klinikai relevanciával rendelkező variánsok mellett fontos azon variánsok felismerése, amelyek populációszintű gyakoriságot mutatnak. Ennek megoldása is adatbázisok használatával lehetséges, melyek közül az egyik legismertebb a gnomAD adatbázis, valamint a

„1000 Genomes Project” adatbázisa, mely az előzővel ellentétben manuálisan revideált adatokat tartalmaz.[26]

Az RNS alapú NGS vizsgálatok bioinformatikai analízise

RNS szekvenálása NGS módszerrel ma főleg az RNS molekulák reverz transzkripciója után lehetséges, mely során az RNS-t templátként használva a reverz transzkriptáz enzim DNS-t szintetizál, amit komplementer DNS-nek (cDNS) nevezünk. Emellett lehetőség van RNS molekulák direkt meghatározására is újabb szekvenálási technológiákkal.[27] Az NGS-vizsgálat után a nukleotidok megállapítása (base calling) valamint a minőségellenőrzési lépés megegyezik a DNS bioinformatikai elemzésénél tárgyaltakkal.

Az illesztési lépés viszont jelentős többletszámítást igényel a DNS alapú NGS-vizsgálat esetén leírtakhoz képest. Mint ahogy a *2. ábránál* bemutattuk, a transzkripció, valamint az azt követő splicing során az exonok közötti intron régiók kihasadnak, ennek következtében az illesztés nem folyamatos, mint DNS-szekvenciák esetén, mert az intronikus szekvenciák hiányként jelennek meg. Két exon távolsága akár több tízezer nukleotid is lehet. Emiatt az RNS szekvenálás során alkalmazott illesztőprogramok nem detektálják azonnal hibaként azt, ha a genomban nem folyamatosan illeszthető a read. Erre a célra leggyakrabban a Spliced Transcripts Alignment to a Reference (STAR) illesztő szoftvert használjuk.[28] Vannak olyan RNS szekvenáláshoz használt illesztőprogramok, melyek nem a genomhoz, hanem az ismerten átíródó régiókhoz, vagyis a transzkriptomhoz végzik az illesztést. Az egyik legismertebb ilyen szoftver a *Kallisto*.[29]

RNS-alapú NGS-vizsgálatok célja lehet a génexpressziós szintek megállapítása, fúziós transzkriptumok detektálása vagy mutációk keresése. A génexpresszió vizsgálata során a vizsgálat alapja az adott génhez tartozó readek számának meghatározása. Mivel az NGS-vizsgálat során mindig csak bizonyos számú read képződhet, és ez eloszlik a mintában eredetileg meglevő RNS molekulák között, ezért a génexpresszió abszolút értékének vizsgálatára nincs lehetőség. Komplex statisztikai módszereket használva viszont lehetséges a gén expressziójának relatív változását kiszámolni különféle mintacsoportok között. Ilyen mintacsoportok lehetnek a normál – tumor minták vagy kezelt – kezeletlen betegcsoportok.

Fúziós transzkriptumok detektálása során a cél az, hogy olyan transzkriptumok (cDNS-be átírt) molekuláit találjuk meg, melyet alkotó gének a referenciagenomban egymástól távol, sokszor más kromoszómán helyezkednek el. Az algoritmus lényege, hogy azok a readek, melyek első körben pontosan illeszthetők a referenciagenomhoz, elvetésre kerülnek, hiszen nem tartozhatnak fúziós transzkriptumhoz. A megmaradt, teljesen nem illeszkedő readeket ezután megpróbáljuk az eredeti genomi régiótól távoli régiókhoz is illeszteni, majd, ha sikerül a transzkriptum két felét egy-egy olyan régióhoz illeszteni, melyek a referenciagenomban távol helyezkednek el, akkor kimondható, hogy fúziós transzkriptumot detektáltunk. Erre a célra gyakran alkalmazzuk a STAR-Fusion, Fusion Catcher, Pizzly szoftvereket.[30-32] Genomi mutációk RNS-alapú szekvenálásból történő detektálása ugyan lehetséges, de napjainkban ez a módszer még gyermekcipőben jár.[33]

A gyakorlatban tehát a molekuláris labor bioinformatikusától, vagy annak hiányában a vásárolt grafikus felületű elemző szoftvertől függ, hogy a bioinformatikai analízis tartalmaz-e annotációkat a talált mutációk patogenitására vonatkozóan. Emellett a talált mutációkra vonatkozó klinikai vizsgálatok, potenciálisan alkalmazható célzott terápiás ajánlások is képezhetik az analízis részét. Ezen túl is van lehetőség az egyes adatbázisok külön használatára az analízis kézhezvételét követően, hiszen a legtöbb adatbázis lehetőséget nyújt arra, hogy programozási képességek nélkül is használjuk az analízis végső fájljának feltöltése, vagy a kérdéses találatok megadása után. Ezek a lépések valamilyen szinten automatizálhatók is, azonban a korrekt molekuláris lelet kiadása előtt a kapott eltérések szakirodalommal való manuális összevetése elengedhetetlen.

A molekuláris diagnosztikával foglalkozó laboratóriumok egyik legfontosabb törekvése jelenleg is, hogy a talált eltérések klinikai interpretációját egyre inkább egységes módon végezzék. Mivel maga az NGS technológia, illetve a szekvenálási reakciók adatainak bioinformatikai elemzése újdonságnak számít, ráadásul ezek eredményei sokszor sürgős klinikai döntésekben segíthetnek, világszerte trendként jelent meg, hogy a molekuláris leletalkotás egységesítése előtt az egyes laboratóriumok a saját módjukon értesítették a klinikust, alkottak leletet. Ennek megfelelően az egyes laboratóriumok által kiadott leletek közt sokszor nagy különbség mutatkozik. Ezt a különbséget tárta fel 2016-ban az Amerikai Molekuláris Patológiai Társaság (Association for Molecular Pathology), és az egységes leletalkotás érdekében már a második irányelvet alkották meg. Ebben a klinikai ajánlásokhoz hasonló rendszerben osztályozzák az egyes molekuláris eltérések klinikai jelentőségét *(7. ábra)*. Az első csoportba (Tier-be) tartoznak a

7. ábra: Az Amerikai Molekuláris Patológiai Társaság irányelvei a variánsok klinikai bizonyítékokon alapuló interpretálásához

jelentős klinikai szignifikanciával rendelkező eltérések. Az I. csoport *„A evidenciájú"* alcsoportjába tartoznak azok az eltérések, melyek klinikai irányelvekben is megtalálható mutációk, és amelyekre az Amerikai Gyógyszer-, és Élelmiszerügyi Hatóság (FDA) is célzott terápiát hagyott jóvá. A *„B evidenciájú"* alcsoportba tartoznak azon eltérések, melyek hivatalos irányelvekben aktuálisan ugyan nem szerepelnek, de több tanulmány, illetve szakértő ajánlja célzott terápia bevetését a csoportba tartozó mutációkra. A II. csoportba tartoznak a potenciális klinikai relevanciával rendelkező mutációk, a *„C evidenciájú"* alcsoportba a több tanulmányon alapuló konszenzussal elfogadott FDA-engedéllyel rendelkező, de más indikációra jóváhagyott, ún. off-label alkalmazott szerek, a *„D evidenciájú"* alcsoportba a szakmai konszenzussal nem rendelkező, csak esettanulmányokban előforduló eltérések. A III. csoportba tartoznak az ismeretlen klinikai szignifikanciával rendelkező eltérések, míg a IV. csoportba a jóindulatú, vagy valószínűleg jóindulatú variánsok. Ezen túl ez az ajánlás részletesen kitér egy molekuláris diagnosztikát folytató laboratórium tevékenységének, különösen a leletalkotásának szabályozására.[34]

Példa egy variáns interpretációjára a bioinformatikai analízistől a célzott terápia ajánlásáig

Példánkban egy tüdőtumorból származó minta molekuláris leletalkotási folyamatát mutatjuk be. A DNS alapú NGS vizsgálat lefutása után egy bioinformatikus által alkotott elemző módszert („in house pipeline") használtunk, melynek variant annotation lépésébe a COSMIC adatbázisban történő keresés és annotálás is integrálva lett. Ennek alapján az elemzés a variánsok közül egyhez talált COSMIC azonosítószámot. Maga a variáns az epidermális növekedési faktor receptor *(EGFR)* génben egy c.2369C>T (p.Thr790Met) mutáció, mely a kódoló régió 2369. pozíciójában található citozin nukleotid pontmutációját jelzi. Ennek eredménye egy timinre történő csere, amely treoninról metioninra változtatja a kódolt aminosavat. A variáns vizsgálatát a COSMIC honlapján folytattuk, ahol megbizonyosodtunk arról, hogy ez egy ismert rezisztencia-mutáció, melyet már korábban leírtak, és amely az afatinib, erlotinib, gefitinib célzott szerekre való rezisztenciát jelzi. Ezen kívül láthatjuk a felületen a szakirodalmi hivatkozásokat, illetve rögön láthatjuk azokat a közleményeket is, melyek segíthetnek a terápiás döntéshozatalban, még ritka mutációk esetén is. Ennek a mutációnak a leírása jelentősen befolyásolta a beteg terápiás szereinek megválasztását, így jó példa arra, hogy a precíziós medicina módszereinek használata közvetlenül segíti a klinikai döntéseket.

Diszkusszió

A precíziós medicina módszerei alapvető változásokat hoztak az orvostudományban, ennek a fejlődésnek az egyik legnagyobb haszonélvezője pedig az onkológia. A daganatos megbetegedésekben szenvedő betegek számára már most is sok klinikai hozadékkal jár a precíziós medicina alkalmazása. Különösen az újgenerációs szekvenálás biztosította sok betegnek a pontos molekuláris szintű diagnózist, és a célzott terápiák alkalmazásának lehetőségét. Természetesen ma még nem minden beteg számára ígér biztos javulást és gyógyulást a precíziós medicina, hiszen a diagnosztikai módszerek ma is jelentős fejlesztések alatt állnak, másrészt az elérhető célzott terápiás szerek száma is véges. Ugyanakkor a szekvenálási, és laboratóriumi technológiák hallatlan sebességgel fejlődnek, illetve az ezek eredményeit elemző bioinformatikai algoritmusok hasonló lendületű előrehaladást mutatnak. Mindez, összhangban azzal a törekvéssel, hogy a molekuláris laboratóriumok egységes szakmai felkészültséggel készítsenek leletet a klinikusok számára, nem alaptalan reményt ad az orvostársadalomnak arra, hogy a precíziós medicina a jövőben még több beteg gyógyulásához fog vezetni.

Irodalom

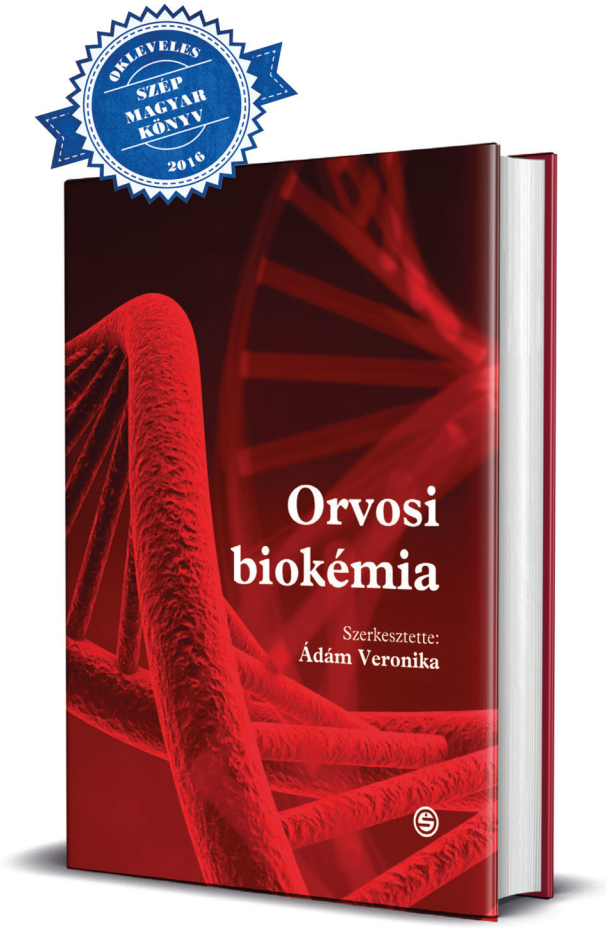
1. Bartoušková M and Melichar B. Precision medicine in medical oncology: hope, disappointment and reality. Clin Chem Lab Med 2020; 58(9):1427-31.
2. Deininger M, Buchdunger E and Druker BJ. The development of imatinib as a therapeutic agent for chronic myeloid leukemia. Blood 2005; 105:2640-53.
3. Demetri GD, von Mehren M, Blanke CD, Van den Abbeele AD, Eisenberg B, Roberts PJ, et al. Efficacy and safety of imatinib mesylate in advanced gastrointestinal stromal tumors. N Engl J Med 2002; 347:472-80.
4. Sawyers CL. Herceptin: A First Assault on Oncogenes that Launched a Revolution. Cell 2019; 179:8-12.
5. Brookes AJ. The essence of SNPs. Gene 1999; 234:177-86.
6. Yuan J, Hegde PS, Clynes R, Foukas PG, Harari A, Kleen TO, et al. Novel technologies and emerging biomarkers for personalized cancer immunotherapy. J Immunother Cancer 2016; 4:3.
7. Szeberényi J. Molekuláris Sejtbiológia. In: (János M) (editors). Dialóg Campus Kiadó, 2011.
8. Nojadeh JN, Behrouz Sharif S and Sakhinia E. Microsatellite instability in colorectal cancer. EXCLI J 2018; 17:159-68.
9. Szeberényi J. Precíziós Medicina, egyetemi tankönyv. In: (editors). Medicina Kiadó, 2019.
10. Goodwin S, McPherson JD and McCombie WR. Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. Nat Rev Genet 2016; 17:333-51.
11. Shendure J and Ji H. Next-generation DNA sequencing. Nat Biotechnol 2008; 26:1135-45.
12. Wingett SW and Andrews S. FastQ Screen: A tool for multi-genome mapping and quality control. F1000Res 2018; 7:1338.
13. Ewels P, Magnusson M, Lundin S and Käller M. MultiQC: summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report. Bioinformatics 2016; 32:3047-8.
14. Chen G, Li R, Shi L, Qi J, Hu P, Luo J, et al. Revealing the missing expressed genes beyond the human reference genome by RNA-Seq. BMC Genomics 2011; 12:590.
15. Li R, Tian X, Yang P, Fan Y, Li M, Zheng H, et al. Recovery of non-reference sequences missing from the human reference genome. BMC Genomics 2019; 20:746.
16. Pan B, Kusko R, Xiao W, Zheng Y, Liu Z, Xiao C, et al. Similarities and differences between variants called with human reference genome HG19 or HG38. BMC Bioinformatics 2019; 20:101.
17. Li H. Aligning sequence reads, clone sequences and assembly contigs with BWA-MEM. Quantitative Biology 2013; arXiv:1303.3997 https://arxiv.org/abs/1303.3997
18. McKenna A, Hanna M, Banks E, Sivachenko A, Cibulskis K, Kernytsky A, et al. The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. Genome Res 2010; 20:1297-1303
19. Wilm A, Aw PP, Bertrand D, Yeo GH, Ong SH, Wong CH, et al. LoFreq: a sequence-quality aware, ultra-sensitive variant caller for uncovering cell-population heterogeneity from high-throughput sequencing datasets. Nucleic Acids Res 2012; 40:11189-201.
20. Koboldt DC, Chen K, Wylie T, Larson DE, McLellan MD, Mardis ER, et al. VarScan: variant detection in massively parallel sequencing of individual and pooled samples. Bioinformatics 2009; 25:2283-5.
21. Koboldt DC, Zhang Q, Larson DE, Shen D, McLellan MD, Lin L, et al. VarScan 2: somatic mutation and copy number alteration discovery in cancer by exome sequencing. Genome Res 2012; 22:568-76.
22. Tate JG, Bamford S, Jubb HC, Sondka Z, Beare DM, Bindal N, et al. COSMIC: the Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer. Nucleic Acids Res 2019; 47:D941-D947.
23. McLaren W, Gil L, Hunt SE, Riat HS, Ritchie GR, Thormann A, et al. The Ensembl Variant Effect Predictor. Genome Biol 2016; 17:122.
24. Vaser R, Adusumalli S, Leng SN, Sikic M and Ng PC. SIFT missense predictions for genomes. Nat Protoc 2016; 11:1-9.
25. Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, et al. A method and server for predicting damaging missense mutations. Nat Methods 2010; 7:248-9.
26. Auton A, Brooks LD, Durbin RM, Garrison EP, Kang HM, Korbel JO, et al. A global reference for human genetic variation. Nature 2015; 526:68-74.
27. Ayub M, Hardwick SW, Luisi BF and Bayley H. Nanopore-based identification of individual nucleotides for direct RNA sequencing. Nano Lett 2013; 13:6144-50.

28. Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, Drenkow J, Zaleski C, Jha S, et al. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. Bioinformatics 2013; 29:15-21.
29. Bray NL, Pimentel H, Melsted P and Pachter L. Near-optimal probabilistic RNA-seq quantification. Nat Biotechnol 2016; 34:525-7.
30. Páll M, Shannon H, Isaac CJ, Harold Pimentel, Bray N and Pachter L. Fusion detection and quantification by pseudoalignment. bioRxiv 2017.
31. Haas BJ, Dobin A, Li B, Stransky N, Pochet N and Regev A. Accuracy assessment of fusion transcript detection via read-mapping and de novo fusion transcript assembly-based methods. Genome Biol 2019; 20:213.
32. Nicorici D, Mihaela Ş, Edgren H, Kangaspeska S, Murumägi A, Kallioniemi O, et al. FusionCatcher – a tool for finding somatic fusion genes in paired-end RNA-sequencing data. bioRxiv 2014.
33. Sheng Q, Zhao S, Li CI, Shyr Y and Guo Y. Practicability of detecting somatic point mutation from RNA high throughput sequencing data. Genomics 2016; 107:163-9.
34. Li MM, Datto M, Duncavage EJ, Kulkarni S, Lindeman NI, Roy S, et al. Standards and Guidelines for the Interpretation and Reporting of Sequence Variants in Cancer: A Joint Consensus Recommendation of the Association for Molecular Pathology, American Society of Clinical Oncology, and College of American Pathologists. J Mol Diagn 2017; 19:4-23.

SEMMELWEIS KIADÓ SZAK- ÉS TANKÖNYVEI

Biokémia/Kémia

Könyveink megvásárolhatók a Legendus Könyvesboltban, illetve a Líra Kereskedelmi hálózaton belül az egész országban, de egyre nagyobb igényt elégít ki webshopunk.



Ádám Veronika

ORVOSI BIOKÉMIA

Az ***Orvosi biokémia*** c. egyetemi tankönyv mind tartalmában, mind koncepciójában, mind pedig kinézetében megújult. A korábbi kiadás minden fejezetét a szerkesztő és szerzők újragondolták, a legtöbbet újraírták, mert az első kiadás óta eltelt húsz év felismerései a biokémia számos területét átírták vagy továbbírták.

„Nincs az orvostudománynak még egy olyan területe, talán csak a képalkotó eljárások világa, ahol az elmúlt évtizedekben ilyen ütemben és mélységben tárultak volna fel azok az ismeretek, amelyek előbbre vitték az életfolyamatok megértését és az erre alapuló beavatkozási lehetőségeket. A modern terápia olyan molekuláris célpontokat keres, amelyek kedvezően befolyásolhatnak alapvető biokémiai folyamatokat, s ezáltal életfolyamatokat. Ennek alapja pedig a folyamatok megismerése és megértése. A biokémia ezt a kalandot kínálja az olvasónak. Ami logikus, tiszta és érthető – a molekulák világa pedig ilyen –, annak elsajátítása örömöt, szellemi élvezetet jelent, reményem szerint még azoknak is, akik ehhez egy egyetemi vizsga teljesítésének kényszere alatt látnak neki.”

Ádám Veronika

788 oldal ■ Ára: 18 400 Ft

Könyvek E-könyvek Folyóiratok Apropó Poszter Box

Semmelweis Kiadó
1089 Budapest, Nagyvárad tér 4.
www.semmelweiskiado.hu

LEGENDUS KÖNYVESBOLT
1089 Budapest, Nagyvárad tér 4.
Tel.: 210-4408, 459-1500/56353
Nyitva tartás: H–Sz: 9.00–16.00,
Cs: 9.00–18.00, P: 9.00–14.00
E-mail: info@semmelweiskiado.hu

Genomikai adatbázisok a célzott terápiában

Genomic databases in targeted therapy

Vraukó Veronika, Sebestyén Endre
I. Sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet, Semmelweis Egyetem, Budapest
E-levél: sebestyen.endre@med.semmelweis-univ.hu

ÖSSZEFOGLALÁS Napjainkban rengeteg információ áll rendelkezésre az emberi genomról, ami különböző online adatbázisokban érhető el. Ezek az adatok nagymértékben megkönnyítik a daganatos betegségek karakterizálását, a daganatok kialakulásához hozzájáruló mutációk általános törvényszerűségeinek megértését, így hozzájárulva a minél pontosabb, személyre szabott vagy célzott terápia kialakításához. A cikkben áttekintjük a fontosabb adatbázisokat, amelyek genomi és mutációs adatokat tartalmaznak. A felsorolt adatbázisok többségénél az adatok szabadon felhasználhatók és ingyenesen letölthetők, ami hatalmas előnyt jelent a tudományos-orvosi közösség számára és nagymértékben hozzájárul a diagnosztikai és terápiás módszerek fejlődéséhez.

KULCSSZAVAK onkológia, mutáció, adatbázis, diagnosztika, célzott terápia

SUMMARY Currently a large amount of information is available on the human genome from multiple databases. These databases are extremely helpful in characterizing cancer, understanding the general properties of cancer-causing mutations, thus contributing to more precise and targeted therapies. In this paper, we review the most important databases providing genomic and mutation information. Most of these databases are freely available for anyone, contributing significantly to the development of diagnostic and therapeutic methods.

KEY WORDS oncology, mutation, database, diagnostics, targeted therapy

Mutációk és szerepük a tumorok kialakulásában

A Humán Genom Projektnek[1, 2] (HGP) köszönhetően, ma már rengeteg adat áll rendelkezésre az emberi genomról, melyhez nagymértékben hozzájárult a különböző szekvenálási módszerek széleskörű elterjedése és fejlődése. Az újgenerációs szekvenálási (Next-Generation Sequencing, NGS) módszerek segítségével lehetővé vált nagymennyiségű DNS vagy RNS minden eddiginél gyorsabb és olcsóbb szekvenálása. A szekvenálás, vagyis a DNS-t és RNS-t felépítő nukleotidok sorrendjének meghatározása ma már az egyik legelterjedtebb és legalapvetőbb molekuláris biológiai vizsgálati módszer. Mivel a rák alapvetően genetikai betegség, kulcsfontosságú tanulmányozni a betegséggel összefüggésbe hozható genetikai változásokat, melyhez nagy segítséget nyújtanak az újgenerációs szekvenálási módszerek. A tumorok elsősorban a testi sejtjeinkben kialakuló szomatikus mutációk következtében jönnek létre. Szomatikus mutációk többféle okból is keletkezhetnek, például külső (UV-sugárzás, vegyszerek) vagy belső (DNS hibajavító mechanizmusok károsodása) hatások következtében. Az idő előrehaladtával, ahogy egyre több környezeti hatás éri a szervezetet, valamint egyre több sejtosztódás történik, a mutációk felhalmozódnak és rendellenes sejteket eredményezhetnek. Ezek a mutációk spontán alakulnak ki, a daganatsejtek egy populációjára korlátozódnak és az egyedek között nem öröklődnek. A mutációk másik típusa az öröklődő csíravonalbeli mutáció, mely az ivarsejtben található és azok kialakulásakor jön létre. A csíravonalbeli mutációk hajlamosíthatnak különböző betegségekre, és így a

Rövidítések

ALL	*akut lymphoblastos leukaemia*
AML	*akut myeloid leukaemia*
CNV	*genomi kópiaszám-változások, copy number variation*
COSMIC	*Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer*
dbSNP	*Single Nucleotide Polymorphism Database*
GDC	*Genomic Data Commons*
gnomAD	*Genom Aggregációs Adatbázis, Genome Aggregation Database*
HGP	*Humán Genom Projekt*
IARC	*Nemzetközi Rákkutató Ügynökség, International Agency for Research on Cancer*
IntOGen	*Integrative Onco Genomics*
NCBI	*Nemzeti Biotechnológiai Információs Központ, National Center for Biotechnology Information*
NCI	*Nemzeti Rákkutató Intézet, National Cancer Institute*
NGS	*újgenerációs szekvenálás, Next-Generation Sequencing*
NHGRI	*Nemzeti Humán Genom Kutatóintézet, National Human Genome Research Institute*
TARGET	*Therapeutically Applicable Research to Generate Effective Therapies*
TCGA	*The Cancer Genome Atlas*
WHO	*Egészségügyi Világszervezet, World Health Organization*

daganatok kialakulását is elősegíthetik. Az NGS módszerek segítségével azonosíthatók a normál vagy daganatos sejtek genomjában a genetikai változások, mint a mutációk vagy genetikai polimorfizmusok. A genetikai polimorfizmusok olyan mutációk, melyek az általunk tárgyalt mutációknál gyakrabban fordulnak elő a populációkban (>1%) és a mutációkhoz hasonlóan nem mindig patogének.[4] A genetikai eltérések vizsgálata további ismereteket nyújt a humán genomról és a genetikai betegségekről, melyek alapvető fontosságúak a kutatás, diagnosztika és célzott terápia esetén is. Az elmúlt évtizedekben összegyűjtött, szekvenálásból származó kísérletes adatok többféle adatbázisban megtalálhatók, például betegség, mutációk, sejt vagy szövettí-

1. táblázat. Összefoglaló táblázat a legismertebb, daganatos megbetegedésekkel összefüggő genomikai adatbázisokról. A táblázat tartalmazza az adatbázisok teljes és rövidített elnevezését, rövid leírást a főbb adatokról, hivatkozást és a legfontosabb publikációkat az adatbázissal kapcsolatban

NÉV	RÖVIDÍTÉS	LEÍRÁS	FŐOLDAL	PUBLIKÁCIÓ
BRCA Mutation Database	-	Az adatbázis a BRCA1 és BRCA2 mutációkról ad részletes információt	https://arup.utah.edu/database/BRCA	Tavtigian (2018) Genetics in Medicine
Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer	COSMIC	A legnagyobb, humán daganatos megbetegedésekkel összefüggésbe hozható szomatikus mutációkat összegyűjtő adatbázis	https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic	Tate et al (2018) Nucleic Acids Research
Count Me In	-	Beteg-központú nonprofit kutatási szervezet, mely elsősorban ritkán előforduló daganatos megbetegedésekből származó adatokat gyűjt	https://joincountmein.org	Wagle et al (2018) Journal of Clinical Oncology
Genome Aggregation Database	gnomAD	A gnomAD adatbázisban genom és exom szekvenálási adatok találhatók.	https://gnomad.broadinstitute.org	Collins (2019) bioRxiv
Genomic Data Commons Data Portal	GDC	A GDC nagymennyiségű, daganatokkal összefüggésbe hozható genetikai változás adatait tartalmazza	https://portal.gdc.cancer.gov	-
Integrative Onco Genomics	IntOGen	Tumoros megbetegedésekkel összefüggő szomatikus mutációkat, géneket és jelátviteli útvonalakat tartalmazó adatbázis	https://www.intogen.org/search	Gonzalez-Perez et al (2013) Nature Methods
International Agency for Research on Cancer	IARC TP53 Database	A humán *TP53* gén tumorokkal összefüggésbe hozható mutációit tartalmazó adatbázis	https://p53.iarc.fr	Olivier et al (2016) European Journal of Cancer
Pan-Cancer Atlas	-	A Pan-Cancer Atlas a TCGA adatbázisból származó legfontosabb eredményeket, publikációkat foglalja össze	https://www.cell.com/pb-assets/consortium/pancanceratlas/pancani3/index.html	Ding et al (2018) Cell, Sanchez-Vega et al (2018) Cell, Hoadley et al. (2018) Cell
Single Nucleotide Polymorphism Database	dbSNP	Genetikai variációkat tartalmazó adatbázis	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp	Sherry et al (2001) Nucleic Acids Research
The Cancer Genome Atlas	TCGA	A legnagyobb, onkológiai adatokat tartalmazó adatbázis	https://www.cancer.gov/about-nci/organization/ccg/research/structural-genomics/tcga	Gao et al (2019) Cell
Therapeutically Applicable Research to Generate Effective Treatments	TARGET	Gyerekkori daganatokra specializálódott adatbázis	https://ocg.cancer.gov/programs/target	Chun et al (2019) Cell Reports

pus szerint csoportosítva. Ezek az adatok nagymértékben megkönnyítik a betegségek karakterizálását, a daganatok kialakulásához hozzájáruló mutációk általános törvényszerűségeinek megértését, így segítve a minél pontosabb, személyre szabott vagy célzott terápia kiválasztását.

A legismertebb genomikai adatbázisok és projektek

TCGA

Az egyik legrégebbi és legnagyobb, onkológiai adatokat tartalmazó adatbázis a The Cancer Genome Atlas[5] (TCGA) *(1. táblázat)*, melyet több mint tíz éve az amerikai Nemzeti Rákkutató Intézet (National Cancer Institute, NCI) és a Nemzeti Humán Genom Kutatóintézet (National Human Genome Research Institute, NHGRI) hozott létre. Az adatbázis több mint 11 000 páciens 20 000 mintájából épül fel, melyek szigorú minőségellenőrzés és kritériumrendszer alapján lettek kiválogatva. Az adatbázisban megtalálhatóak klinikai, genomikai és képalkotó vizsgálatokból származó adatok is, amik nem csak az onkológiával foglalkozó szakemberek számára lehetnek relevánsak, de a radiológia, patológia vagy immunológia területén lévő kutatásokhoz egyaránt nagymértékben hozzájárulnak. Az összegyűjtött adatoknak köszönhetően jobban tanulmányozhatók a ritkán előforduló tumorok is, amire kis mintaszám mellett korlátozott lehetőség lenne. A TCGA adatai legkönnyebben a Genomic Data Commons (GDC) adatbázisból érhetők el.

GDC

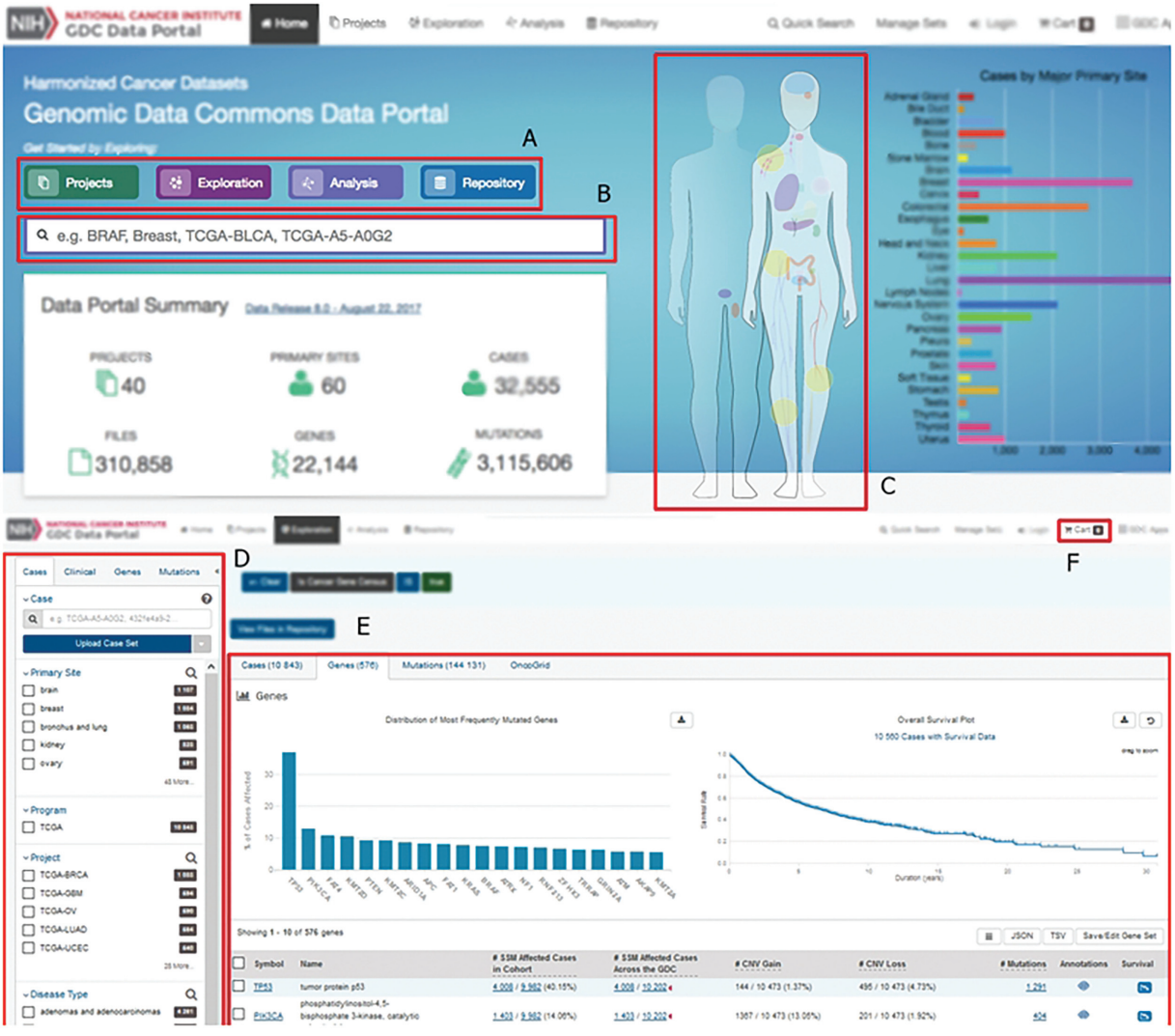
A GDC *(1. táblázat)* nagy mennyiségű, daganatokkal összefüggésbe hozható genetikai változás adatait tartalmazza *(1. ábra)*, mint például a különböző szomatikus és csíravonalbeli mutációk, genomi kópiaszámváltozások (copy number variation, CNV) vagy génexpressziós adatok. Kezdetben az adatokat a Nemzeti Rákkutató Intézet dolgozta fel és egységesítette több adatbázisból, mint a TCGA vagy a Therapeutically Applicable Research to Generate Effective Therapies (TARGET) *(1. táblázat)*, de ezeken kívül még számos további rákkutatási program adatai is megtalálhatók az adatbázisban. Ma már bárki feltöltheti az onkológiai szekvenálási adatait, ami szigorú minőségellenőrzést követően kerülhet be az adatbázisba, így segítve a tudományos közösséget. A klinikai és minta adatokat az adatbázis fejlesztői kategóriákra bontják (pl. szövettípus vagy demográfiai adatok alapján), így bármelyik adatsor letöltésénél ugyanazok a kategóriák láthatók és hasonlíthatók össze. A honlapon részletes leírás és dokumentáció található mind a GDC-n található adatokról, mind a honlap vagy az adatok használatáról. Az adatok többféle módon is letölthetők a webes felületen (Genomic Data Commons Data Portal) keresztül, valamint a főoldalon lévő illusztrációk segítségével rögtön lehet szűrni a releváns információkra, például szerv vagy szervrendszer alapján. A GDC ezen kívül egy statisztikát is készít a kiválasztott adatcsomagból, ami egy összefoglalót ad, így új információkat, összefüggéseket lehet felfedezni már az adatok letöltése és feldolgozása előtt *(2. ábra)*.

Pan-Cancer Atlas

A TCGA adatbázist is létrehozó Nemzeti Rákkutató Intézet és a Nemzeti Humán Genom Kutatóintézet legújabb projektje a Pan-Cancer Atlas *(1. táblázat)*, ami a TCGA adatbázisból származó legfontosabb eredményeket, publikációkat foglalja össze. A projekthez 27 publikáció tartozik, melyeket a legújabb kutatási eredményekhez igazodva három téma köré csoportosítanak: onkogén folyamatok,[6] jelátviteli útvonalak[7] és a daganatot létrehozó, elsőgenerációs *(cell-of-origin)* sejtek[8] vizsgálata. A Pan-Cancer Atlas újrakategorizálja a tumorokat, valamint nagy hangsúlyt fektet a tumorsejtek részletes vizsgálatára, melyek a tumortípusok és altípusok közötti különbségek és a tumorok evolúciójának megértéséhez elengedhetetlenek. A daganatok kialakulását elősegítő genetikai, jelátviteli és immunológiai változások, különös tekintettel a jelátviteli útvonalak karakterizálására, nagymértékben hozzájárulhatnak új típusú terápiák így az immunterápia fejlődéséhez is.

TARGET, Count Me In

A gyerekkori daganatokra specializálódott adatbázis, a TARGET[9] célja, hogy minél hatékonyabbá és minél kevésbé toxikussá tegye a terápiát daganatos betegségben szenvedő gyermekek számára. Fő vizsgálati területei közé tartozik a gyerekkori daganatos megbetegedések közül az akut lymphoblastos leukaemia (ALL), akut myeloid leukaemia (AML), vesetumorok, neuroblastoma és osteosarcoma karakterizálása. A TARGET-ben található adatok elérhetők a GDC oldalán és a TARGET Data Matrix oldalon egyaránt. A Count Me

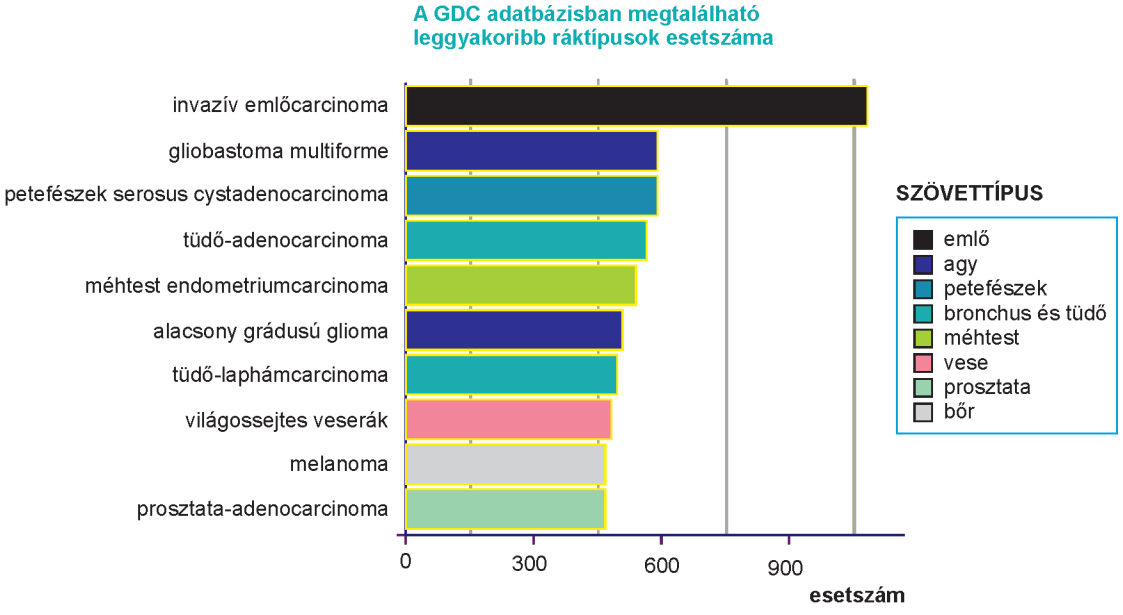


1. ábra: A GDC adatbázis letöltési oldala. A GDC-n található adatok többféle módon is letölthetők a webes felületen (Genomic Data Commons Data Portal) keresztül (A). Ha konkrét génre vagy mutációra szeretnénk keresni, legegyszerűbben ezt a keresőmezőn keresztül tehetjük meg (B). Az illusztrációk segítségével rögtön lehet szűrni a releváns információkra, például szerv vagy szervrendszer alapján (C). A letölteni kívánt adatokra is lehet szűrni, például szövettípus vagy demográfiai adatok szerint (D). A GDC ezen kívül egy statisztikát is készít a kiválasztott adatcsomagból, ami egy összefoglalót ad, így új információkat, összefüggéseket lehet felfedezni már az adatok letöltése és feldolgozása előtt (E). A kiválasztott adatcsomagot a Cart gombon keresztül érhetjük el (F)

In[10] *(1. táblázat)* egy nonprofit kutatási szervezet, melynek célja, hogy hidat képezzen a kutatók, orvosok és páciensek között és elemezze több mint 100 000 páciens adatait. A szervezet elsősorban olyan, ritkán előforduló daganatos megbetegedésekből származó adatokat gyűjt, melyeknél a ritka előfordulásuk miatt nehéz a kutatáshoz megfelelő mintaszámot elérni. A szervezet a pácienseket arra ösztönzi, hogy anonim módon mintáikkal, klinikai adataikkal és a kezelés során szerzett tapasztalataikkal járuljanak hozzá a rákkutatás fejlődéséhez. A Count Me In adatai egyéb adatbázisokon, például a GDC-n keresztül érhetők el, de különböző publikációkban is közzéteszik eredményeiket.

COSMIC, IntOGen

Az eddig említettek adatbázisok elsősorban a daganatos megbetegedésekről kívánnak átfogó képet nyújtani, de számos adatbázis található, melyek valamilyen témára specifikusak az onkológián belül. Ilyen például a COSMIC (Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer) *(1. táblázat)*, ami a humán daganatos megbete-



2. ábra: A GDC adatbázisban megtalálható nagyobb esetszámú daganatok, kategóriák szerint bontva, szövet és betegség alapján. Az ábrán jól látható, hogy a legtöbb adat invazív emlőkarcinóma esetekből származik, melyet a glioblasztóma multiforme és a petefészek szerózus cisztadenokarcinoma követ. Az adatbázisban az emlő mellett a két leggyakrabban előforduló szövettípus az agy, illetve bronchus és tüdő.

gedésekkel összefüggésbe hozható szomatikus mutációkat gyűjti össze. A COSMIC a legnagyobb ilyen adatbázis, a legfrissebb, 2018-as publikációjuk szerint 26 000 páciensből származó 1,4 millió tumormintát, 719 daganatokhoz kapcsolódó gént és közel 6 millió fehérjekódoló szakaszt érintő mutációt tartalmaz.[11] Ezek az adatok alapvető információkat hordoznak a daganatokat okozó szomatikus mutációk tulajdonságairól, mechanizmusairól, hatásairól, így a lehetséges terápiákról is. Az adatok két fő forrásból származnak: nagyobb részüket szakértők által válogatott releváns publikációkból gyűjtötték össze, míg az adatok másik részét egyéb adatbázisokból (pl. TCGA) származó genomikai adatok teszik ki. A manuálisan kiválogatott mutációs adatok több mint 25 000 publikációból származnak. Ezek az adatok a daganatos megbetegedésekkel összefüggésbe hozható ismert vagy feltételezett génekből és mutációkból, valamint a hozzájuk tartozó környezeti és kórtörténeti információból állnak. A főoldalon találhatók a szakértők által kiválasztott publikációk adatai, valamint az adatgyűjtés folyamatáról, a forrásokról és a letöltési lehetőségekről is található részletes leírás. A főoldalon keresztül egy adott génre vagy mutációra lehet keresni és különböző aloldalak adnak lehetőséget az információk letöltésére. Az adatbázist folyamatosan frissítik és évente négyszer teszik közzé a legújabb változtatásokat. Az Integrative Onco Genomics[12] (IntOGen) *(1. táblázat)* a COSMIC-hoz hasonló adatbázis, mely a tumoros megbetegedésekkel összefüggő szomatikus mutációkat, géneket és jelátviteli útvonalakat tartalmaz. Az adatok DNS-szekvenált tumormintákból származnak, amiket különböző adatbázisokból és publikációkból gyűjtöttek össze. Az IntOGen azonban nem csak egy adatbázis, hanem egy olyan bioinformatikai eszköz, ami lehetővé teszi a vizsgálni kívánt adatok elemzését is, például azonosítva a daganatok kialakulásához hozzájáruló, gyakran mutálódott driver géneket és azok tulajdonságait.

Genomikai adatbázisok alkalmazása célzott terápiában

Rákkutatás vagy a diagnosztika során sokrétűen alkalmazhatók az említett adatbázisok, melyek elsősorban a daganatos mutációk karakterizálásában nyújtanak segítséget. Rajtuk kívül még számos más adatbázis használható a különböző tumorok molekuláris diagnosztikája során azáltal, hogy segítenek az egészséges, nem patogén mutációkat detektálni, amelyek a populációban elterjedtek. Az így kapott adatok segíthetnek eldönteni diagnosztizálás során, hogy egy adott mutáció vagy genetikai változás a tumorban patogén-e vagy sem. Molekuláris diagnosztika során a vizsgálni kívánt szekvenálási adatokat, illetve mutációkat egy referenciagenomhoz vagy génhez hasonlítjuk, így segítve a minél inkább személyre szabott, célzott kezelést.

gnomAD, dbSNP

Molekuláris diagnosztika esetén nagy segítséget nyújthat a Genom Aggregációs Adatbázis[13] (Genome Aggregation Database, gnomAD) vagy a genetikai variációkat összegyűjtő Single Nucleotide Polymorphism Database[14] (dbSNP) *(1. táblázat)*. A gnomAD adatbázist egy nemzetközi kutatócsoportokból álló közösség hozta létre, mely genom és exom szekvenálási adatokat gyűjt és ma már 71 702 genomot tartalmaz. Az adatok különböző projektekből származnak és az egységesítés miatt ugyanazon adatfeldolgozó módszereken mennek keresztül. A genetikai polimorfizmusokra specializálódott dbSNP-t a Nemzeti Biotechnológiai Információs Központ (National Center for Biotechnology Information, NCBI) és a Nemzeti Humán Genom Kutatóintézet hozta létre. Az adatbázis a nevével ellentétben, nemcsak egy nukleotidos eltéréseket tartalmaz, hanem számtalan más genetikai variációról is találhatók adatok, mint például mikroszatelliták, tandem genomi ismétlődések, genomi inszerciók vagy deléciók. Mára több mint 675 millió különböző humán variáns található az adatbázisban.

Genomikai adatbázisok konkrét mutációk vagy gének vizsgálata esetén

Ha kevés információ áll rendelkezésre, hasznos lehet az említett adatbázisokban összefüggéseket vagy leírásokat keresni a különféle génekkel, mutációkkal vagy konkrét daganatos megbetegedésekkel kapcsolatban. Molekuláris diagnosztikában különösen hasznosak lehetnek a specializálódott adatbázisok, ahol részletesebb leírás található egy adott génről, mutációról vagy genetikai elváltozásról. A *TP53* a leggyakrabban mutálódó gén tumoros megbetegedések esetén, ezért kiemelt szerepe van a rákkutatásban. A humán TP53 gén tumorokkal összefüggésbe hozható mutációit az Egészségügyi Világszervezethez (World Health Organization, WHO) tartozó Nemzetközi Rákkutató Ügynökség (International Agency for Research on Cancer, IARC) gyűjtötte össze a IARC TP53 Database[15] *(1. táblázat)* adatbázisban. Az adatok külön letölthetők a szomatikus vagy csíravonal mutációk, polimorfizmusok, sejtvonalak, egérmodellek vagy mesterségesen létrehozott *p53* mutációk szerint. Két másik, a rákkutatás szempontjából különösen fontos gén, a *BRCA1* és *BRCA2*, melyek mutációi leggyakrabban emlőrák és petefészekrák esetén fordulnak elő. A BRCA Mutation Database (16) *(1. táblázat)* a *BRCA1* és *BRCA2* mutációkról ad információt. Egyfelől a publikációkból és családkutatásokból származó adatok alapján állít fel egy részletes mutációs listát, másrészt egy számítógépes predikciós adatbázist is tartalmaz, amely az eddig ismeretlen genetikai változások felderítését segíti elő.

A megfelelő terápia és adatbázis kiválasztása

A megfelelő terápia kiválasztásához szükséges kutatómunka többféleképpen is megközelíthető, attól függően, hogy mennyi információ áll a rendelkezésünkre. Minél több klinikai és genetikai adat érhető el a páciensről (melyik gén, milyen mutáció, milyen típusú daganat), annál megbízhatóbban és specifikusabban lehet keresni az adatbázisokban. Ha például egy akut myeloid leukaemiás páciens SF3B1 mutációja a vizsgálat tárgya, érdemes a specifikusabb, daganatos megbetegedéseknél előforduló mutációkat gyűjtő adatbázisokat használni, mint a COSMIC vagy IntOGen. Ezekben az adatbázisokban részletes információt lehet találni a mutációkról, azok fajtáiról a különböző tumorokban, így azt is segíthet eldönteni, hogy az adott mutáció patogén vagy sem az adott betegségben, és milyen gyógyszer, illetve terápia alkalmazása lehet a leghatásosabb. Gyerekkori daganatok esetén a TARGET, nem patogén polimorfizmusok vizsgálatakor pedig a gnomAD vagy dbSNP adatbázisokban érdemes kutatni, ahol nagy valószínűséggel találunk további információt. Ha nem ismert a mutálódott gén funkciója vagy kevés információ áll rendelkezésre, célszerű az átfogóbb, több projekt adatait összegyűjtő adatbázisokban keresni, mint a GDC, TCGA vagy a Pan-Cancer Atlas publikációi.

Diszkusszió

A daganatokat különböző genetikai eltérések okozzák, mint a pontmutációk vagy kópiaszám-változások. A daganatos megbetegedések típusban és altípusban, valamint egyénenként is eltérhetnek, de akár egy szöveten belül is nagy különbségek lehetnek molekuláris, genetikai vagy patológiai szempontból. A daganatok komplex és heterogén tulajdonságai miatt szükség van minél nagyobb adatmennyiségre, hogy jobban megértsük és karakterizáljuk a tumorokat okozó mutációk hatásait, és ezáltal célzott kezelést tudjunk nyújtani. A célzott kezelés jobb gyógyulási esélyeket és életminőség-javulást biztosít, mivel a szervezet egésze helyett csak adott daganatos sejtre, molekulára specifikus gyógyszert alkalmazunk, így az kevésbé toxikus a ha-

gyományos kezelésekhez képest. A célzott kezeléssel enyhíthetők a gyógyszer-mellékhatások és a gyógyszer-rezisztencia kialakulását is csökkentheti, elsősorban gyógyszer-kombinációk alkalmazása esetén. Az adatbázisok különösen jól használhatók a kutatás korai fázisában vagy diagnosztizáláskor, amikor még limitált információ áll rendelkezésre az adott mutációról, génről vagy betegségről. A felsorolt adatbázisok többségénél az adatok szabadon felhasználhatók és ingyenesen letölthetők bárki számára, ami hatalmas előnyt jelent a tudományos-orvosi közösség számára és nagymértékben hozzájárul annak fejlődéséhez. A különböző adatbázisok és adatfeldolgozó módszerek használatának ismeretével új utak nyílhatnak meg a rákkutatásban és -terápiában is.

Irodalom

1. Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, et al. The sequence of the human genome. Science 2001; 291:1304-51
2. Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. Nature 2001; 409:860-921
3. van Dijk EL, Auger H, Jaszczyszyn Y and Thermes C. Ten years of next-generation sequencing technology. Trends Genet 2014; 30:418-26
4. Karki R, Pandya D, Elston RC and Ferlini C. Defining "mutation" and "polymorphism" in the era of personal genomics. BMC Med Genomics 2015; 8:37
5. Gao GF, Parker JS, Reynolds SM, Silva TC, Wang LB, Zhou W, et al. Before and After: Comparison of Legacy and Harmonized TCGA Genomic Data Commons' Data. Cell Syst 2019; 9:24-34 e10
6. Ding L, Bailey MH, Porta-Pardo E, Thorsson V, Colaprico A, Bertrand D, et al. Perspective on Oncogenic Processes at the End of the Beginning of Cancer Genomics. Cell 2018; 173:305-20 e310
7. Sanchez-Vega F, Mina M, Armenia J, Chatila WK, Luna A, La KC, et al. Oncogenic Signaling Pathways in The Cancer Genome Atlas. Cell 2018; 173:321-37 e310
8. Hoadley KA, Yau C, Hinoue T, Wolf DM, Lazar AJ, Drill E, et al. Cell-of-Origin Patterns Dominate the Molecular Classification of 10,000 Tumors from 33 Types of Cancer. Cell 2018; 173:291-304 e296
9. Chun HE, Johann PD, Milne K, Zapatka M, Buellesbach A, Ishaque N, et al. Identification and Analyses of Extra-Cranial and Cranial Rhabdoid Tumor Molecular Subgroups Reveal Tumors with Cytotoxic T Cell Infiltration. Cell Rep 2019; 29:2338-54 e2337
10. Wagle N, Painter C, Van Allen EM, Bass AJ, Anastasio E, Dunphy M, et al. Count me in: A patient-driven research initiative to accelerate cancer research. J Clin Oncol 2018; 36:e13501-e13501.
11. Sondka Z, Bamford S, Cole CG, Dawson E, Ponting L, Stefancsik R, et al. COSMIC: Integrating and interpreting the world's knowledge of somatic mutations in cancer. Cancer Res 2018; 78:(13 Suppl)
12. Gonzalez-Perez A, Perez-Llamas C, Deu-Pons J, Tamborero D, Schroeder MP, Jene-Sanz A, et al. IntOGen-mutations identifies cancer drivers across tumor types. Nat Methods 2013; 10:1081-2.
13. Karczewski KJ, Francioli LC, Tiao G, Cummings BB, Alfoldi J, Wang QB, et al. The mutational constraint spectrum quantified from variation in 141,456 humans. Nature 2020; 581:434-43.
14. Sherry ST, Ward MH, Kholodov M, Baker J, Phan L, Smigielski EM, et al. dbSNP: the NCBI database of genetic variation. Nucleic Acids Res 2001; 29:308-11.
15. Bouaoun L, Sonkin D, Ardin M, Hollstein M, Byrnes G, Zavadil J, et al. TP53 Variations in Human Cancers: New Lessons from the IARC TP53 Database and Genomics Data. Hum Mutat 2016; 37:865-76.
16. Tavtigian SV, Greenblatt MS, Harrison SM, Nussbaum RL, Prabhu SA, Boucher KM, et al. Modeling the ACMG/AMP variant classification guidelines as a Bayesian classification framework. Genet Med 2018; 20:1054-60.

LORVIQUA®▼
LORLATINIB

Monoterápiás kezelés formájában anaplasztikus limfóma kináz (ALK) pozitív, előrehaladott nem kissejtes tüdőcarcinomában (non-small cell lung carcinoma, NSCLC) szenvedő felnőtt betegek kezelésére javallott, akiknek a betegsége rosszabbodott:
- alektinib vagy ceritinib, mint első ALK-tirozinkináz-gátló (tyrosine kinase inhibitor, TKI) terápia után; vagy
- krizotinib és legalább egy másik ALK TKI után.[1]

VONALVÁLTÁSNÁL EGYÉRTELMŰ

LORVIQUA Hatásos harmadik generációs ALK TKI a CNS metasztázis kezelésében is[1,2]

LORVIQUA Kézen fekvő megoldás a legtöbb ALK rezisztencia mutáció esetében[2,3]

LORVIQUA Hatásos kezelési lehetőség a második generációs ALK TKI mellett kialakult progresszió után[1,2]

LORVIQUA Kezelhető biztonságossági profil alacsony abbahagyási ráta mellett[1,2]*

*A lorlatinib-kezelésben részesülő betegek 3,1%-ában került sor a kezelés végleges leállítására mellékhatások miatt.[1]
ALK, anaplasztikus lymphoma kináz; CNS, central nervous system (központi idegrendszer); NSCLC, non-small cell lung cancer (nem-kissejtes tüdőrák); TKI, tyrosine kinase inhibitor (tirozinkináz gátló);

A LORVIQUA reményt adhat azoknak a betegeknek, akiknek a betegsége progrediált egy második generációs ALK TKI mellett[1,2]

Ajánlott dózis: LORVIQUA 100 mg, napi egyszer

▼Ez a gyógyszer fokozott felügyelet alatt áll, mely lehetővé teszi az új gyógyszerbiztonsági információk gyors azonosítását. Az egészségügyi szakembereket arra kérjük, hogy jelentsenek bármilyen feltételezett mellékhatást.

Hivatkozások: 1. Pfi zer. LORVIQUA Alkalmazási előírás, 2020. december 17. 2. Solomon et al. Lancet Oncol 2018 Dec;19(12):1654-1667. 3. Gainor JF et al. Cancer Discov. 2016;6(10):1118–33

Bővebb információért olvassa el a gyógyszer alkalmazási előírását!
A gyógyszerről részletes információ az Európai Gyógyszerügynökség internetes honlapján http://www.ema.europa.eu érhető el.
Az alkalmazási előírás legutolsó frissítésének dátuma: 2020. december 17.
Az aktuálisan érvényes árért kérjük, keresse fel az Nemzeti Egészségbiztosítási Alapkezelő honlapját (www.neak.gov.hu)
Kiadhatóság: (Sz) szakorvosi/kórházi diagnózist követően folyamatos szakorvosi ellenőrzés mellett alkalmazható gyógyszer.
Lezárás dátuma: 2021. február 17.
PP-LQA-HUN-0013

Pfizer Gyógyszerkereskedelmi Kft.
1123 Budapest, Alkotás u 53.,
MOM Park „A” épület
Tel.: 06-1-488-3700
www.pfizer.hu

Pfizer Oncology

A nem-kissejtes tüdődaganatok korszerű diagnosztikája és célzott kezelése a biomarkerek korszakában

Advanced diagnosis and targeted treatment of non-small cell lung cancers in the era of biomarkers

Papp Gergő, Regős Eszter, Szentkereszty Márton, Téglási Vanda, Pápay Judit
I. Sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet, Semmelweis Egyetem, Budapest
E-levél: papayjudith@gmail.com

ÖSSZEFOGLALÁS A tüdőrák vezető helyen áll a daganatok okozta haláloki statisztikában, Európában és világszerte egyaránt. Az esetek döntő hányada (85-90%-a) nem-kissejtes carcinoma (NSCLC), ezen belül az adenocarcinoma (ADC) a leggyakoribb, melyet a laphámsejtes carcinoma (SCC) követ. A betegek jelentős többségében a daganat már előrehaladott stádiumban kerül felismerésre, ami irrezekábilitást jelent, tehát a tumor nem távolítható el sebészi úton. A tüdő adenocarcinoma mind klinikai, mind hisztológiai megjelenésében igen heterogén csoportot képvisel, így sebészi kimenetele és molekuláris genetikai profilja is igen sokszínű. Diagnózisa főként kis biopsziás és citológiai mintákon, mint a core biopszia, a transbronchialis excisio, az ultrahang vezérelt transbronchialis vékonytű aspiráció (TBNA), továbbá az UH-vezérelt vékonytű aspiráció (FNA) alapul. A különböző hisztológiai típusok pontos azonosítása immunhisztokémia panelek használatával válik lehetővé a 2015-ös WHO ajánlásnak megfelelően, s a hisztológiai típusokban molekuláris szinten kimutatható driver mutációk előre jelezhetik a célzott kezelés hatékonyságát. A tüdőrákok molekuláris diagnosztikai jellemzése így voltaképpen „felülírhatja" a tumorok hisztológiai osztályozását és meghatározza a terápiás döntéseket. A célzott daganatellenes kezelés sikeressége és az új immunterápiás lehetőségek felismerése új paradigmát jelent a személyre szabott terápia kialakításában.

KULCSSZAVAK NSCLC, immunhisztokémia, molekuláris analízis, személyre szabott kezelés

SUMMARY Lung cancer is the leading cause of cancer-related death in Europe and worldwide. The majority (85–90%) of the cases are non–small cell lung cancer (NSCLC), of which the most common subtypes are adenocarcinoma and squamous cell carcinoma, with most patients having advanced disease at the time of diagnosis. Lung adenocarcinoma is heterogeneous in clinical presentation, histological appearance, surgical outcome and molecular biological profile. Lung cancers are increasingly diagnosed by small biopsies, ie. core needle biopsy, transbroncial excision, ultrasound-guided transbronchial needle aspiration (TBNA), and endoscopic ultrasound-guided FNA. Small biopsies and cytology specimens must present diagnostic sample for further analysis. Using a panel of immunohistochemistry, most morphologically diagnosed lung cancers can be accurately reclassified as adenocarcinoma or SCC according to the last version of WHO 2015. Molecular detection of driver mutations in specific histologic types of lung cancer can predict favorable response to targeted therapy. Molecular characterization of lung cancer has considerably changed the classification and treatment of these tumors, becoming an essential component of pathologic diagnosis and oncologic therapy decisions. The success of targeted cancer therapies and new immunotherapy approaches has created a new paradigm of personalized therapy.

KEY WORDS NSCLC, immunohistochemistry, molecular analysis, personalized therapy

Bevezetés

A tüdőrák a második leggyakoribb rosszindulatú daganat, a daganatok okozta halálozási statisztikában világszerte az első helyen áll, megelőzve a férfiak prosztatarákját, a nők emlőrákját, valamint a mindkét nemet érintő colorectalis carcinomát. A 2020-as adatok alapján a tüdőrák magyarországi előfordulása és mortalitása habár kiemelkedően magas, de nem lépi túl a közép-európai átlagos incidenciát.[1] A lokalizált, nemmetasztatikus stádiumban felismert tüdőrák eseteiben az 5 éves túlélési idő 61%-os, ez az arány a már távoli áttétet adó tüdőrákoknál 6%-ra csökken.[2] Ennek hátterében elsősorban az áll, hogy napjainkig nem ismertek olyan előszűrő módszerek, amelyek kellően korai stádiumban tennék felismerhetővé a tüdődaganatot, és így lehetővé válna az operabilitás, a tumormentes állapot elérése. A 2000-es évek elején azonban a betegek kezelése szempontjából reménykeltőnek bizonyult az

Rövidítések

ADC	*adenocarcinoma*
FISH	*fluoreszcens in situ hibridizáció*
FNA	*vékonytű aspiráció*
NSCLC	*nem-kissejtes carcinoma*
NSCLC-NOS	*NSCLC- Not Otherwise Specified*
SCLC	*kissejtes carcinoma*
SCC	*laphámsejtes carcinoma*
IHC	*immunhisztokémia*
CK7, CK5/6	*citokeratin 7, citokeratin 5/6*
NGS	*újgenerációs szekvenálás*
TBNA	*transbronchialis vékonytű aspiráció*
TKI	*tirozin kináz inhibitor*
WHO	*Egészségügyi Világszervezet*

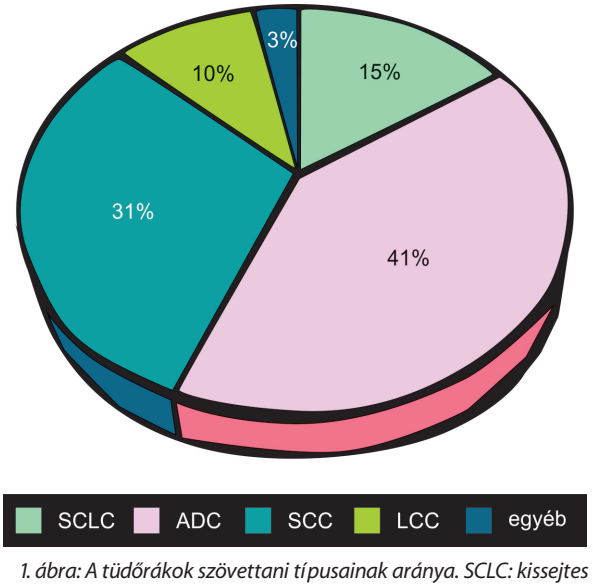
EGFR mutáció felismerése, mely az első, célzott terápiára alkalmas biomarkernek bizonyult. Ezen felismerés elindított egy olyan szemléletmódot, amelynek kapcsán újabb és újabb célpontok válhattak vizsgálatok tárgyává, és ma már a mindennapi diagnosztika és kezelési algoritmusok integráns részévé.[3, 4]

A tüdőrákok hisztológiai osztályozása

A tüdőrákok modern hisztológiai osztályozásában a 2015-ös WHO ajánlást követjük. Arányukat tekintve 10–15%-uk kissejtes carcinoma (SCLC), míg a fennmaradó, 80–85%-ot alkotó nem-kissejtes csoportban (NSCLC) leggyakoribb az adenocarcinoma (ADC), ezt követi a laphámsejtes, majd a nagysejtes carcinoma. Ritka, de jelenthet differenciáldiagnosztikai gondot az adenosquamosus carcinoma, amely keverten tartalmazza a malignus mirigy- és laphámsejtes komponenst *(1. ábra)*.

Az egyes altípusok mutatnak némi eltérést az eltérő etnikumokon belül, de szignifikáns különbség nem jellemző. Csaknem valamennyi altípus esetében jelentős rizikótényező a dohányzás, azonban ez alól kivételt képez a később részleteiben tárgyalt, lepidikus növekedést mutató, gyakran *EGFR* mutációval rendelkező ADC.[2]

A 2015-ös WHO a 2011-ben megjelent multidiszciplináris, elsősorban az ADC-k reklasszifikációján alapuló összefoglalóra épült, de érinti az egyéb, nem-kissejtes daganatokat és a neuroendokrin tumorokat egyaránt.[5] Tekintettel arra, hogy az utóbbi tumorcsoport és ezen belül a kissejtes neuroendokrin carcinoma is elkülönülő entitás, valamint a nem-kissejtes carcinomáktól eltérő klinikopatológiai konzekvenciával és eltérő kezeléssel jár, továbbiakban döntően a nem-kissejtes carcinomákra vonatkozó legújabb adatokat és korszerű diagnosztikai eszközöket igyekszünk összefoglalni. Napjainkig a kissejtes carcinomák esetében nem sikerült olyan molekuláris célpontot találni, amelyre kellően hatékony célzott terápia kiépíthető lenne.[6] A 2004-es WHO-val összehasonlítva a 2015- ben megjelent osztályozás főként a citológiai és kis biopsziás minták (endoszkópos, core biopszia, TBNA) diagnosztikai értékét emeli egy szintre és több szempontból állít fel újabb diagnosztikus feltételeket a rezekátumokon alapuló szövettani leletet illetően is. Ennek talán legfontosabb üzenete a mindennapi patológiai tevékenység szempontjából, hogy már a legkisebb diagnosztikus értékű mintából törekedjünk a morfológiai és immunhisztokémiai eredmények alapján besorolni az egyes szövettani típusokat, majd részben a patológus, részben az onkoteam döntése alapján történjenek a további, a terápiát meghatározó prediktív immunhisztokémiai és molekuláris genetikai vizsgálatok.[7]

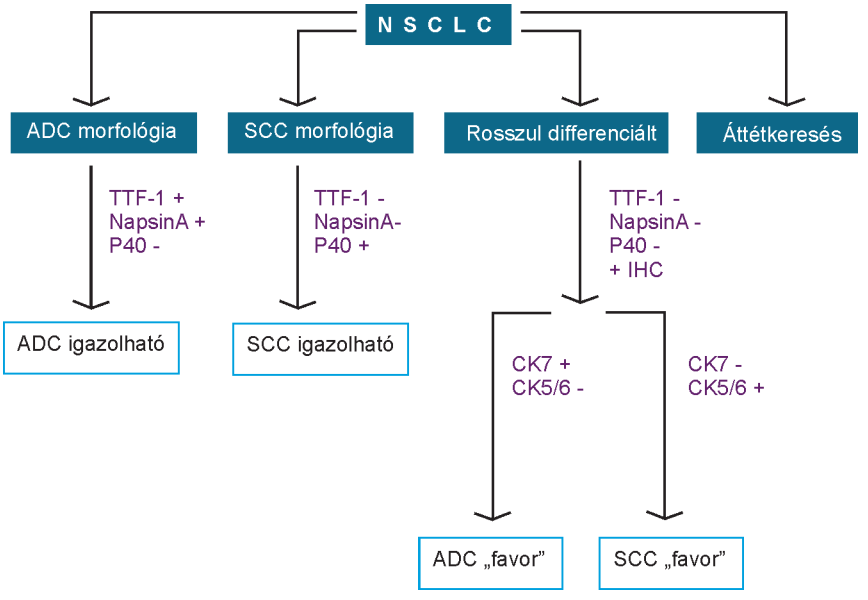


1. ábra: A tüdőrákok szövettani típusainak aránya. SCLC: kissejtes carcinoma (small cell lung carcinoma), ADC: adenocarcinoma, SCC: laphámsejtes carcinoma (squamous cell carcinoma), LCC: nagysejtes carcinoma (large cell carcinoma)

A nem-kissejtes tüdőrákok osztályozásának főbb szempontjai

A tüdőrákos betegek 70%-ában a daganat már előrehaladott, irrezekábilis stádiumban kerül felismerésre, így diagnózisuk kis biopsziás vagy citológiai mintából történik, és ennek alapján kell eldönteni, hogy adeno- vagy laphámsejtes carcinomáról van-e szó. Ha ez immunhisztokémiai vizsgálattal sem vezet eredményre, a nem-kissejtes carcinoma, NOS (NSCLC-NOS) diagnózisa molekuláris vizsgálatokkal tovább osztályozható. A „bronchioloalveolaris carcinoma" (BAC) és a kevert altípusokból felépülő ADC diagnózisa napjainkban már nem használatos, idejétmúlt. A rezekált ADC-k esetében új nómenklatúra az *in situ* ADC és a minimálisan invazív ADC (MIA) mintázat, amelyek teljes eltávolítása után 100%-os betegségmentes túlélés jósolható.

Az invazív ADC-k esetében a predomináns mintázat alapján határozzuk meg a szövettani diagnózist, mely lehet így lepidikus, acinaris, papillaris és szolid. Mint új szövettani típus a micropapillaris altípus is bekerült a klasszifikációba, ami egyben rossz prognózisra



2. ábra: Nem-kissejtes tüdőrákok (NSCLC) immunhisztokémiai algoritmusa. ADC: adenocarcinoma, SCC: laphámsejtes carcinoma, IHC: immunhisztokémia, „favor”diagnózis: „támogatott” diagnózis, CK7: citokeratin 7, CK5/6: citokeratin 5/6

is utaló megjelenés. A korábbi mucinosus BAC helyett ma az invazív mucinosus ADC elnevezést használjuk.

A 2015-ös WHO kiemeli azokat a morfológiai és immunhisztokémiai elemeket, amik alapján elkülöníthető a kis biopsziás és sebészi minták hisztológiai „értéke”, tehát mennyire vagyunk jogosultak a szövettani diagnózis felállítására attól függően, hogy milyen kiterjedésű, milyen reprezentatív értékű mintával állunk szemben.[8]

Mintavétel és immunhisztokémia

A szövettani kis biopsziák mellett még ma is nagy gyakoriságú a citológiai mintákra alapozott diagnózis, mely származhat mellkasi folyadékból, a korábban már említett hörgő átszúrásos vékonytű aspirációból (TBNA) vagy vékonytű aspirációs mintavételből (FNA), illetve kefecitológiából. Utóbbi vizsgálatok egyre gyakrabban ultrahangvezérlés mellett történnek. A citológiai anyagokat célszerű „szövettani értékűvé” átalakítani, azaz sejtblokkban feldolgozni őket.[9]

A kis biopsziás és sebészi rezekciós minták eltérő reprezentatív értéke következtében azok diagnosztikus értéke is eltérő lehet. Ennek áthidalására is tartalmaz ajánlást a 2015-ös WHO, amelynek lényege: 1. a kis biopsziákat és a műtéti anyagokat eltérő osztályozási kritériumok alapján kell értékelni, 2. immunhisztokémiai panelek szükségesek a korrekt tipizáláshoz *(2. ábra)*, 3. az NSCLC diagnózis csak bizonyos feltételek mellett használható.

Ugyanakkor egyes daganattípusok csak rezekátumok alapján tipizálhatók, így például a „nagysejtes carcinoma” vagy a szolid növekedési mintázatú ADC. Utóbbi könnyen mutat hasonlóságot kis szövetmintában az el nem szarusodó laphámsejtes carcinomával. Elkülönítésük immunhisztokémiai vizsgálaton alapul. Az ADC esetén a TTF1 (thyroid transcription factor 1) és a napsin-A (aspartic proteinase of pepsin family) reakciók mutatnak pozitivitást, míg a laphámsejtes

1. táblázat: A leggyakrabban alkalmazott immunhisztokémiai algoritmusok az NSCLC diagnosztikájában.
TTF-1: thyroid transcription factor 1, NSCLC: nem-kissejtes tüdőrák, NSCLC-NOS: NSCLC - Not Otherwise Specified.
**CK7 reakció a laphámsejtes carcinoma differenciáltsági fokával gyakran ellentétesen expresszálódik*

	TTF-1	NAPSIN A	P40	CK5/6	CK7
Adenocarcinoma	+	+	-	-	+
Laphámsejtes carcinoma	-	-	+	+	-/+ *
NSCLC-NOS	-	-	-	-	-

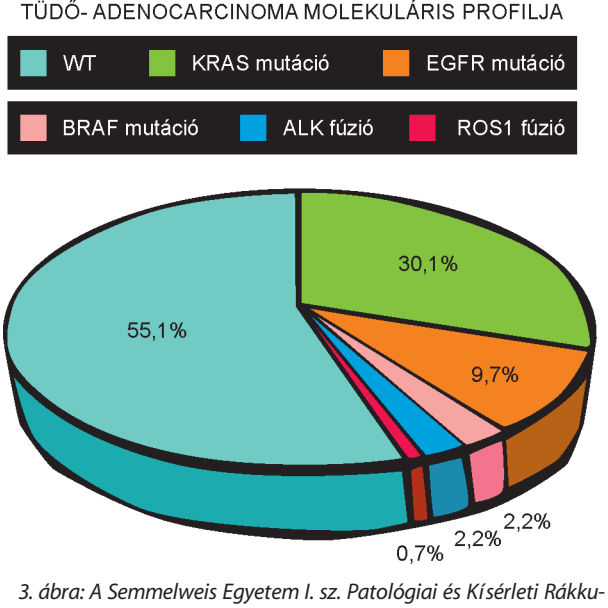
carcinomáknál a p40, a CK5/6 továbbá a p63 fehérjék megjelenése figyelhető meg *(1. táblázat)*.[10, 11]

A szöveti és citológiai minták fent leírt morfológiai és immunhisztokémiai vizsgálata után felállított diagnózis képezi indikációját a további, személyre szabott kezelés felépítéséhez szükséges biomarker meghatározásnak. A nemzetközi ajánlásoknak megfelelően minden előrehaladott NSCLC (legfőképp az ADC-k) esetében vizsgálandó molekuláris diagnosztikai célpontok az *EGFR* gén aktiváló mutációi, az *ALK* és *ROS1* onkogének fúziói, a *MET* gén mutációi, valamint egyéb a sejtosztódásban szereplő fő jelátviteli utak génjeinek *(KRAS, BRAF)* driver mutációi. Ugyanakkor laphámrákoknál az onkológus elsősorban a PD-L1 expresszió immunhisztokémiával meghatározott és az immunterápiát befolyásoló kiegészítő eredményre vár a patológustól. Az alábbiakban a célzott, személyre szabott kezeléseket meghatározó biomarkereket részletezzük, az immunterápiákat befolyásoló diagnosztikát itt nem tárgyaljuk.

A célzott kezelés alapjai: genomikus biomarkerek nem-kissejtes tüdőrákokban

EGFR – epidermalis növekedési faktor (epidermal growth factor)

Az EGFR az ERBB családba tartozó tirozin-kináz-receptor. Az *EGFR* gén a 7-es kromoszóma rövid karján,



3. ábra: A Semmelweis Egyetem I. sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézetében 2019-2020-ban 1436 tüdő adenocarcinoma mintában molekuláris diagnosztikai vizsgálatokkal igazolt driver mutációk/fúziók megoszlása. WT: vad típus

a 11-es régióban helyezkedik el. Az extracellularis ligand EGFR-hez való kötődésével a receptor homo- és heterodimerizációja után a citoplazmatikus tirozin-kináz foszforilációja következik be, amely azután különböző intracellularis utakon keresztül sejtproliferációhoz, metasztázis kialakulásához és az apoptosis gátlásához vezet. Az *EGFR* a NSCLC-k 62%-ában overexpresszált és expressziója rossz prognózissal társul. Az ázsiai populációban a gént érintő mutációk az esetek 45–50%- ában kimutathatók, míg a kaukázusi tüdő ADC-ban szenvedő betegek csupán 10–15%-ára jellemző az eltérés. Az *EGFR* aktiváló mutációk ~85%-át a 19-es exon deléciója vagy a 21-es exon p.L858R misszensz pontmutációja jelenti. A fennmaradó ~15%-ot az ún. ritka *EGFR* mutációk teszik ki, leggyakrabban gén 18, 20 és 21-es exonjában kódolt pontmutációkkal, deléciókkal vagy inszerciókkal.[12] Intézetünkben a 2019–2020-as évi adatok alapján, összesen 1436 NSCLC minta molekuláris vizsgálata során az *EGFR* mutációs gyakoriság 9,7%-nak adódott *(3. ábra)*. Az *EGFR* mutáció leggyakrabban a lepidikus növekedést mutató ADC-kban fordul elő, főként olyan középkorú nőkben, akik sohasem dohányoztak. Az *EGFR*-mutáns betegeknél tirozin-kináz-inhibitor kezeléssel elért pozitív eredmények alapján ebben a betegcsoportban ez lett a standard terápia. Számos randomizált III.fázisú vizsgálat igazolta az első (erlotinib vagy gefitinib) vagy a második generációs (afatinib) EGFR-TKI szerek prediktív értékét a konvencionális citosztatikus terápiával szemben.[13-15] Ugyanakkor számos beteg esetében rezisztencia és gyors relapszus alakulhat ki, ami egy új, másodlagos *EGFR* (50%-ban a p.T790M) mutáció vagy *MET* onkogén amplifikáció (21%), illetve *P13KCA* mutáció következtében jöhet létre. Az osimertinib egy harmadik generációs EGFR-TKI, ami a szenzitizáló mutáció mellett az exon 20-as p.T790M rezisztencia mutációt is célozza.[16] Az *EGFR* mutációkat szekvenálási módszerekkel és valós idejű PCR alapú esszével határozhatjuk meg. Mindkét módszer igen elterjedt és magas érzékenységű, jól alkalmazható formalin fixált és paraffinba ágyazott (FFPE) archív mintákon, citológiai mintavételből származó és folyadékbiopsziás eredetű anyagokon egyaránt.[10]

ALK – anaplasztikus lymphoma kináz (anaplastic lymphoma kinase)

Az ALK az inzulin receptor családba tartozó tirozin kináz receptor. Az *ALK* gén a 2-es kromoszóma rövid karján, a 23-as kromoszóma régióban kódolt. Az eredetileg anaplasztikus nagysejtes lymphomában leírt *ALK*

génátrendeződést később ismerték fel NSCLC-es betegekben, leggyakrabban az *ALK* és az *EML4* gének fúziójaként.[17] Ezt a transzlokációt a NSCLC-s betegek 3,7–7%-ában mutatták ki. Általában pecsétgyűrűsejtes vagy cribriform mintázatot mutató ADC-val társul és gyakrabban fordul elő soha nem dohányzó fiatalabb betegekben. Előrehaladott stádiumú ADC-s betegekben az *ALK* átrendeződés vizsgálata mindenképpen javasolt. Intézetünkben az *ALK* génfúzió összesített gyakorisága 2,2%-nak bizonyult *(3. ábra)*. Az *ALK* fúziót hordozó NSCLC-ben szenvedő betegeknek első vonalban adható a crizotinib, alectinib vagy ceritinib TKI kezelés. Sajnos ebben az esetben is számolni kell rezisztencia (pl. p.L1196M vagy p.C1156Y mutáció) kialakulásával, és az *EGFR*-gátló kezelésben létrejött rezisztenciához hasonlóan, másod vagy többgenerációs ALK-gátlókat (pl. brigatinib vagy lorlatinib) szükséges ilyenkor alkalmazni.[18] Az *ALK* génfúzió kimutatására az FFPE és a citológiai mintákon egyaránt alkalmazható break-apart fluoreszcens in situ hibridizációs (FISH), reverz transzkripciós PCR és újgenerációs szekvenálási módszerek állnak rendelkezésre. Mindazonáltal a legolcsóbb kompanion diagnosztikus vizsgálati megoldást az ALK immunhisztokémiai reakció biztosítja, ami szövettani anyagok mellett a folyadék mintákból feldolgozott sejtblokkokon is elvégezhető.[19] Az *ALK*-rezisztencia mutációk nagy érzékenységű kimutatása a szövetmintán túl ma már liquid biopsziás mintából izolált sejtmentes nukleinsavból egyaránt kivitelezhető. Ez az eljárás is elérhető intézetünkben.

ROS1 – ROS proto-oncogene 1 receptor tyrosine kinase

A ROS1 tirozin-kináz-receptor az inzulin receptor család tagja, a 6. kromoszóma hosszú karján, a 22-es kromoszóma régióban helyezkedik el. Számos szervben a hámsejt differenciációban játszik szerepet. *ROS1* átrendeződést elsőként glioblastomában azonosítottak, de cholangiocarcinomában és petefészekrákban is leírták már szerepét.[20] A *ROS1* átrendeződés az NSCLC betegek 1–2%-ában jelenik meg, jellegzetesen fiatal, nem-dohányzó, ADC-ás nőkben, akiknél egyéb onkogén driver mutáció nem igazolható.

NSCLC primer *ROS1* transzlokációja esetében jó prognózis és akár több éves túlélés várható crizotinib kezelés hatására. A *ROS1* fúziót hordozó esetekben az NTRK-gátló szerek hatékonyságára is számítani lehet. A mindennapi gyakorlatban a szövettani minták esetén a ROS1 protein immunhisztokémiával történő kimutatását részesítik előnyben, mint a legköltséghatékonyabb validált módszer, ugyanakkor a pozitív immunhisztokémiai reakciót FISH vizsgálattal szükséges validálni.[21] Citológiai kenet esetén a *ROS1* transzlokáció FISH vizsgálattal azonosítható.

BRAF - B-RAF protoonkogén, serine/threonine kinase

A *BRAF* onkogén a 7-es kromoszóma hosszú karján, a 34-es kromoszóma régióban található. Az általa kódolt kináz a RAS/RAF/MEK/ERK jelútban érintett, aktivációja a sejtnövekedésben, proliferációban és túlélésben játszik szerepet.[22] *BRAF* mutáció a leggyakrabban melanoma malignum esetében igazolt, amelyet a papillaris pajzsmirigyrák és a low-grade serosus ovariumcarcinoma követ. A nem-kissejtes tüdőrákok 1–3%-ában közöltek *BRAF* mutációkat, legnagyobb gyakorisággal (~50%-ban) a p.V600E pontmutációt. A *BRAF* mutációt az intézetünkben vizsgált 1436 NSCLC minta 2,2%-ában azonosítottuk *(3. ábra)*. Valamennyi *BRAF* mutáció az *EGFR*, *KRAS* és *ALK* mutációkkal egymást kizáró módon funkcionál, igazolásuk PCR és/vagy szekvenálás alapú metódusokhoz kötődik. A főként a soha nem dohányzó ADC-és betegekben kimutatott *EGFR* és *ALK* eltérésekkel szemben a *BRAF* mutációk általában jelenleg és/vagy korábban dohányzókban detektálhatók. A *BRAF* mutáns NSCLC-s betegek prognózisa rosszabb és platinum bázisú kemoterápiára is gyengébben reagálnak, ugyanakkor *BRAF*/*MEK* inhibitorokkal (dabrafenib + trametinib kombinált kezeléssel) jobb terápiás eredmények érhetők el.[23, 24]

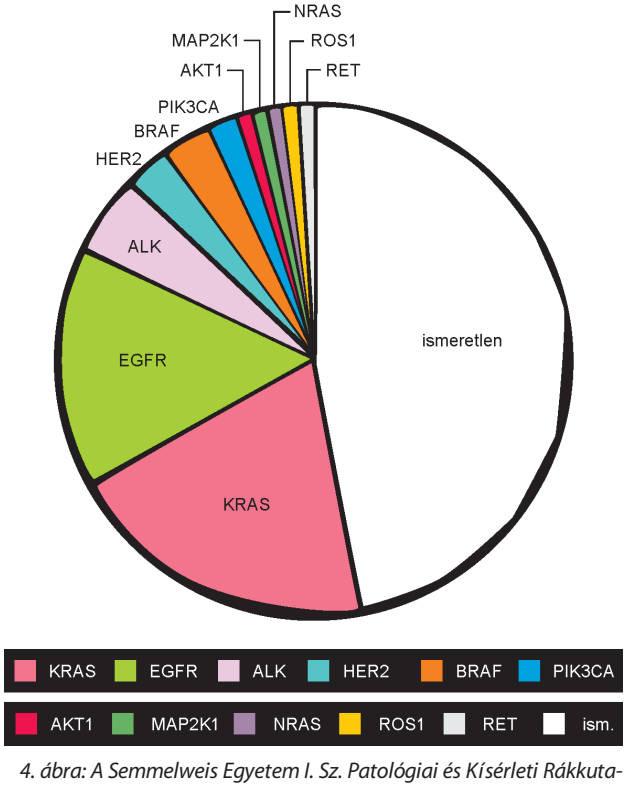
KRAS – Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog

A *KRAS* onkogén a 12-es kromoszóma hosszú karján, a 12.1-es kromoszóma régióban helyezkedik el. A membránasszociált G-proteinek RAS-családjának tagja, olyan fehérjét kódol, amely intrinzik GTPáz aktivitással bír, és számos sejtválaszban szerepet játszik. Ilyen a proliferáció, a citoszkeletális reorganizáció és a sejttúlélés. A *KRAS* mutáció a jelátviteli útvonal folyamatos aktivációját eredményezi, így a jelpálya a tirozin kináz receptorok, többek között az *EGFR* hatása alól felszabadul. *KRAS* mutáció 25–35%-ban fordul elő NSCLC-s betegekben, elsősorban a szolid mintázatú ADC-ban. Gyakrabban igazolható a kaukázusi populációban, volt és jelenlegi dohányosokban, de nem mutat nemek közötti különbséget. A mutáció, amely az esetek 95%-ában a 12-es és a 13-as kodonokban fordul elő, valószínűleg rosszabb kimenetellel párosul, és negatív prediktora lehet a kemoterápiára adott terápiás válasznak.[25] A tüdő-ADC-ban szenvedő betegekben a *KRAS* p.G12C mutáció előfordulása mintegy 13%-ra tehető és

az összes *KRAS* mutáns eset közel 50%-át teszi ki. Mindennek fényében kiemelendő, hogy 2020 decemberében az Amerikai Élelmiszer és Gyógyszerengedélyeztetési Hivatal (FDA) engedélyezte a *KRAS* p.G12C mutációra szelektív sotorasib inhibitor terápiát lokálisan előrehaladott vagy metasztatikus NSCLC esetén.[26] Mivel a *KRAS*, *EGFR* és *ALK* molekuláris eltérések leggyakrabban egymást kizárják, javasolt a *KRAS* analízissel indítani a vizsgálatokat.

MET protoonkogén

A *MET* gén a 7. kromoszóma hosszú karján, a 31-es kromoszóma régióban található, a HGFR-t (hepatocyte growth factor receptor) kódolja, ami a proliferációban, túlélésben, motilitásban és invázióban játszik alapvető szerepet.[27] Kóros aktivációját először a vese papillaris tumorában írták le. A tüdőrákok között a *MET* géneltérés laphámsejtes carcinomák 3%-ában, ADC-k 8%-ában fordul elő. Az NSCLC-k között azok a daganatok reagáltak jól a *MET*-gátló kezelésre, melyekben *MET* génamplifikáció vagy a gén 14-es exonjának „skipping" mutációja volt megfigyelhető. Míg a gén amplifikációja az ADC-k 4 és laphámrákok 1%-ában azonosított, addig az ADC-k 4%-ában előforduló a kezelésre jól reagáló mutáció.[28] A korábban már említett crizotinib a MET-TK-t is gátolni képes NSCLC esetében.[29] Míg a *MET* génamplifikáció FISH vizsgálattal mutatható ki, addig a mutációk vizsgálata szekvenáláson alapuló módszerekkel lehetséges.



4. ábra: A Semmelweis Egyetem I. Sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézetében 2020-ban 138 tüdő adenocarcinoma mintában újgenerációs szekvenálással (NGS) igazolt driver mutációk megoszlása.

NTRK – neurotrofikus tropomiozin receptor-tirozin-kináz géncsalád (NTRK1, NTRK2, NTRK3)

A neurotrofikus tropomiozin receptor-tirozin-kináz (*NTRK*-) géncsaládba három gén sorolható – *NTRK1* (1q23), *NTRK2* (9q21) és *NTRK3* (15q25), melyek a különböző neuronalis szövetek fejlődésének szabályozásában játszanak szerepet. A TrkA-receptorhoz az NGF, a TrkB-receptorhoz a BDNF, a TrkC-receptorhoz az NT-3 neurotrofinok kötődése ismert jelátviteli utak – *PI3K/AKT, RAS/MEK/ERK, PLC/ PKC* – aktiválódását okozza, s ezáltal megváltozhat a sejtciklus szabályozásában fontos transzkripciós faktorok és gének működése.[30] NSCLC-ben az NTRK enzimeket kódoló génekben többféle abnormalitást, többségében kóros génfúziókat és pontmutációkat igazoltak. Az FDA 2018 novemberében jóváhagyta a larotrectinib, majd 2019 augusztusában az entrectinib alkalmazását *NTRK* génfúzióval rendelkező tumorokban, mint szövetagnosztikus kezelési lehetőséget.[31] Az *NTRK* géneltérések igazolása többféle módszer, például immunhisztokémia, FISH, RT-PCR alkalmazásával történhet, azonban úgy tűnik, mindezek várhatóan háttérbe szorulnak az újgenerációs szekvenálás folyamatos elérhetővé válásával.

PIK3CA – phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha

A *PIK3CA* gén a 3-as kromoszóma hosszú karján, a 26-os kromoszóma régióban foglal helyet, az általa kódolt lipidkinázok érintettek a sejtnövekedésben, transzformációban, adhézióban, apoptózisban, túlélésben és a motilitásban. Amplifikációját, delécióját és szomatikus misszensz mutációját számos tumorban, így tüdőrákokban is leírták. A *KRAS* mellett az egyik leggyakrabban mutálódott onkogén a humán daganatokban. NSCLC-ben 1–4%-os előfordulását tapasztalták, laphámrákokban gyakrabban, mint ADC-ban.[32] Vizsgálatok rámutattak, hogy *PIK3CA* mutációk *EGFR*- mutáns NSCLC betegekben EGFR tirozin-kináz-inhibitorral szembeni rezisztenciára utalnak, így negatív prediktorai az EGFR-TKI kezelésnek. A PI3K/Akt/mTOR jelátvitel (pl. *PIK3CA*, *PTEN*)

elemei további potenciális célpontot jelentenek a nem-kissejtes tüdőrákos betegek kezelésében. A *PIK3CA* eltéréseket valósidejű PCR-rel vagy NGS esszével vizsgálják *(4. ábra)*.[33]

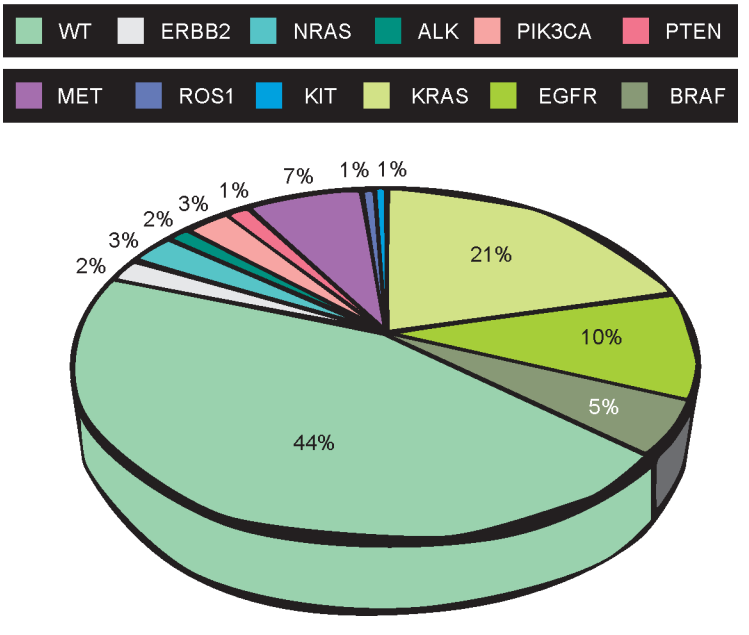
Újgenerációs szekvenálás (next generation sequencing, NGS)

Napjainkban a legtöbb laboratórium az *EGFR*, *BRAF* és *KRAS* mutációk, továbbá az *ALK* és *ROS1* génátrendeződések kimutatását különálló, ún. monogénes eljárásokkal végzi. Fontos ugyanakkor kiemelni, hogy a tüdődaganatok genetikai hátterének egyre alaposabb megismerése az elmúlt években újabb onkogén mutációs célpontok azonosításához vezetett, ami tovább bővíti a különböző célzott kezelésekből várhatóan profitáló betegek körét. Ezen onkogén célpontok egyre bővülő listája közül említendő a *MET*, *ERBB2*, *PIK3CA*, *RET* és *AKT1*, amelyek szimultán vizsgálatára multigénes újgenerációs szekvenálási (NGS) eljárások adnak lehetőséget *(4. ábra)*. A kereskedelmi forgalomban többféle platformspecifikus génpanel érhető el, amely a DNS mutációk és a fúziós gének RNS-alapú célzott multiplex azonosítására alkalmas. Az NGS módszere a fehérjeexpresszió alapú biomarker-vizsgálatot (PD-L1) nem teszi lehetővé, ugyanakkor a transzlokációk (például *ALK1*, *ROS1*, *NTRK1-3* és egyebek) pontosabb (partnergénekre kiterjedő) és magasabb érzékenységű kimutatása jelentős előny az immunhisztokémiával szemben.

Intézetünkben 2020-ban összesen 138 tüdő ADC-ában szenvedő beteg mintájának NGS analízisét végeztük el egy 19 gén DNS mutációit és kópiaszám eltéréseit magában foglaló panel (Qiagen, GeneReader) segítségével. Az NGS tesztelés a hagyományos eljárással nem vizsgált gének mutációinak kimutatásán túl különösen hatékonynak bizonyult az *EGFR* gén ritka variánsainak azonosításában is. A driver mutációt nem hordozó vad típusú minták aránya ezáltal 44%-ra csökkent *(5. ábra)*.

Következtetés

Az NSCLC morfológiai diagnózisát követő lépés a célzott kezelések prediktív biomarkereinek meghatározása. A jelenleg érvényes gyakorlat két vizsgálati irányt fejlesztett ki: egyet a célzott onkogénmódosulások kimutatására és egy másikat az immunonkológiai terápia biomarkereinek vizsgálatára. A személyre szabott orvoslás összefoglaló táblázatát áttétes NSCLC-ben a *2. táblázat* tartalmazza.[34] Az előrehaladott stádiumban felismert, így nem rezekábilis malignus tüdődaganatok, ezen belül a nem-kissejtes tüdőrák esetében a kis biopsziás és/vagy citológiai minta képezi a morfológiai és immunhisztokémiai vizsgálatok eredményétől függő diagnózis alapját. Ezzel együtt rendkívül fontos az is, hogy a minta alkalmas legyen molekuláris analízisek kivitelezésére, illetve a százalékos meghatározást igénylő és így az immunterápia szempontjából prediktív értékű PD-L1 vizsgálatra. Tehát mind a mintavétel, mind pedig a feldolgozás kellően óvatos és igényes kell, hogy legyen a diagnosztikus érték megőrzése céljából. Fontosnak tartjuk kiemelni, hogy a terápiás lehetőségek és a vizsgálandó genetikai eltérések számának folyamatos emelkedésével ma már egyre inkább kristályosodik a multigénes NGS-alapú tesztelés elengedhetetlen szükségessége a tüdőrák molekuláris diagnosztikájában, aminek köszönhetően tovább növelhető a célzott kezelésre alkalmas betegek aránya.



5. ábra: Molekuláris célzott terápia célpontjai nem-kissejtes tüdőrákban. Az ábra eredeti forrása[35]

2. táblázat: Személyre szabott kezelés alapját képező molekuláris diagnosztika összefoglaló táblázata áttétes NSCLC-ben. ALK: Anaplasztikus lymphoma kináz; EGFR: Epidermalis növekedési faktor; FISH: fluoreszcens in situ hibridizáció; IHC: immunhisztokémia; MEK: mitogén aktivált proteinkináz; NGS: újgenerációs szekvenálás; NSCLC: nem-kissejtes tüdőrák: PD1: programozott sejthalál fehérje 1; PD-L1: programozott sejthalál fehérje ligand 1, TKI: tirozin-kináz-gátló

BIOMARKER	MÓDSZER	ALKALMAZÁS
EGFR-mutáció	Bármilyen megfelelő validált módszer,	Az *EGFR-TKI* kezelésre legnagyobb valószínűséggel reagáló *EGFR*-szenzitizáló mutációval rendelkező betegek kiválasztása,
ALK-átrendeződés	Bármilyen megfelelő validált módszer. A FISH a történelmi standard, de az IHC fokozatosan válik az elsődleges kezelést meghatározó vizsgálattá. Az NGS egy újonnan bevezetett technológia.	Az *ALK* génátrendeződéssel rendelkező, az ALK-TKI kezelésre legnagyobb valószínűséggel reagáló betegek kiválasztása.
ROS1-átrendeződés	FISH módszer a vizsgálat validált standardja. Az IHC alkalmazható a betegek kiválasztását megerősítő FISH-vizsgálatra, de specificitása jelenleg alacsony. AZ NGS egy újonnan megjelent módszer.	A ROS1-TKI kezelésre legvalószínűbben reagáló *ROS1* génátrendeződéssel rendelkező betegek kiválasztása.
BRAF-mutáció	Bármilyen megfelelő, validált módszer.	A *BRAF* V600-szenzitizáló mutációkkal rendelkező betegek kiválasztása, akiknél a legnagyobb a B*RAF*-gátlóra adott válasz valószínűsége, MEK-gátló kezeléssel vagy anélkül.
PD-L1-expresszió	IHC a PD-L1 expresszió azonosítására a megfelelő szinten és a megfelelő sejtpopuláción, a tervezett gyógyszer és kezelési vonal alapján. Kizárólag specifikus vizsgálati módszerek validáltak.	Cél: növelni azoknak a betegeknek a számát, akiknek nagyobb valószínűséggel származik előnyük az anti-PD1 vagy anti PD-L1 kezelésből.

Irodalom

1. Bogos K, Kiss Z, Gálffy G, Tamási L, Ostoros G, Müller V, et al. [Novel approaches to the epidemiology of lung cancer in Hungary]. Magy Onkol 2020; 64:175-81.
2. Houston KA, Mitchell KA, King J, White A and Ryan BM. Histologic Lung Cancer Incidence Rates and Trends Vary by Race/Ethnicity and Residential County. J Thorac Oncol 2018; 13:497-509.
3. Tímár J, Méhes G and Vass L. [Molecular diagnostics of lung cancer and its clinical relevance]. Magy Onkol 2020; 64:183-9.
4. Gálffy G. [From rare mutations to classical ones, inhibition of signaling pathways in non-small cell lung cancer]. Magy Onkol 2020; 64:196-204.
5. Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, Nicholson AG, Geisinger KR, Yatabe Y, et al. International association for the study of lung cancer/american thoracic society/european respiratory society international multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma. J Thorac Oncol 2011; 6:244-85.
6. Abidin AZ, Garassino MC, Califano R, Harle A and Blackhall F. Targeted therapies in small cell lung cancer: a review. Ther Adv Med Oncol 2010; 2:25-37.
7. Travis WD, Brambilla E, Nicholson AG, Yatabe Y, Austin JHM, Beasley MB, et al. The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors: Impact of Genetic, Clinical and Radiologic Advances Since the 2004 Classification. J Thorac Oncol 2015; 10:1243-60.
8. Travis WD, Brambilla E and Riely GJ. New pathologic classification of lung cancer: relevance for clinical practice and clinical trials. J Clin Oncol 2013; 31:992-1001.
9. Villalobos P and Wistuba, II. Lung Cancer Biomarkers. Hematol Oncol Clin North Am 2017; 31:13-29.
10. Osmani L, Askin F, Gabrielson E and Li QK. Current WHO guidelines and the critical role of immunohistochemical markers in the subclassification of non-small cell lung carcinoma (NSCLC): Moving from targeted therapy to immunotherapy. Semin Cancer Biol 2018; 52:103-109.
11. Zheng M. Classification and Pathology of Lung Cancer. Surg Oncol Clin N Am 2016; 25:447-468
12. Harrison PT, Vyse S and Huang PH. Rare epidermal growth factor receptor (EGFR) mutations in non-small cell lung cancer. Semin Cancer Biol 2020; 61:167-79.
13. Maemondo M, Inoue A, Kobayashi K, Sugawara S, Oizumi S, Isobe H, et al. Gefitinib or chemotherapy for non-small-cell lung cancer with mutated EGFR. N Engl J Med 2010; 362:2380-8.
14. Rosell R, Carcereny E, Gervais R, Vergnenegre A, Massuti B, Felip E, et al. Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for European patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (EURTAC): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. Lancet Oncol 2012; 13:239-46.
15. Wu YL, Zhou C, Hu CP, Feng J, Lu S, Huang Y, et al. Afatinib versus cisplatin plus gemcitabine for first-line treatment of Asian patients with advanced non-small-cell lung cancer harbouring EGFR mutations (LUX-Lung 6): an open-label, randomised phase 3 trial. Lancet Oncol 2014; 15:213-22.
16. Planchard D, Boyer MJ, Lee JS, Dechaphunkul A, Cheema PK, Takahashi T, et al. Postprogression Outcomes for Osimertinib versus Standard-of-Care EGFR-TKI in Patients with Previously Untreated EGFR-mutated Advanced Non-Small Cell Lung Cancer. Clin Cancer Res 2019; 25:2058-63.

17. Fujimoto J and Wistuba, II. Current concepts on the molecular pathology of non-small cell lung carcinoma. Semin Diagn Pathol 2014; 31:306-13.
18. Sullivan I and Planchard D. ALK inhibitors in non-small cell lung cancer: the latest evidence and developments. Ther Adv Med Oncol 2016; 8:32-47.
19. Toyokawa G and Seto T. Anaplastic lymphoma kinase rearrangement in lung cancer: its biological and clinical significance. Respir Investig 2014; 52:330-8.
20. Yoshida A, Kohno T, Tsuta K, Wakai S, Arai Y, Shimada Y, et al. ROS1-rearranged lung cancer: a clinicopathologic and molecular study of 15 surgical cases. Am J Surg Pathol 2013; 37:554-62.
21. Cao B, Wei P, Liu Z, Bi R, Lu Y, Zhang L, et al. Detection of lung adenocarcinoma with ROS1 rearrangement by IHC, FISH, and RT-PCR and analysis of its clinicopathologic features. Onco Targets Ther 2016; 9:131-8.
22. Cardarella S, Ogino A, Nishino M, Butaney M, Shen J, Lydon C, et al. Clinical, pathologic, and biologic features associated with BRAF mutations in non-small cell lung cancer. Clin Cancer Res 2013; 19:4532-40.
23. Hyman DM, Puzanov I, Subbiah V, Faris JE, Chau I, Blay JY, et al. Vemurafenib in Multiple Nonmelanoma Cancers with BRAF V600 Mutations. N Engl J Med 2015; 373: 726-36.
24. Planchard D, Kim TM, Mazieres J, Quoix E, Riely G, Barlesi F, et al. Dabrafenib in patients with BRAF(V600E)-positive advanced non-small-cell lung cancer: a single-arm, multicentre, open-label, phase 2 trial. Lancet Oncol 2016; 17:642-50.
25. Pao W, Wang TY, Riely GJ, Miller VA, Pan Q, Ladanyi M, et al. KRAS mutations and primary resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib. PLoS Med 2005; 2:e17.
26. Uras IZ, Moll HP and Casanova E. Targeting KRAS Mutant Non-Small-Cell Lung Cancer: Past, Present and Future. Int J Mol Sci 2020; 21:12:4325.
27. Zhen Z, Giordano S, Longati P, Medico E, Campiglio M and Comoglio PM. Structural and functional domains critical for constitutive activation of the HGF-receptor (Met). Oncogene 1994; 9:1691-7.
28. Paik PK, Drilon A, Fan PD, Yu H, Rekhtman N, Ginsberg MS, et al. Response to MET inhibitors in patients with stage IV lung adenocarcinomas harboring MET mutations causing exon 14 skipping. Cancer Discov 2015; 5:842-9.
29. Caparica R, Yen CT, Coudry R, Ou SI, Varella-Garcia M, Camidge DR, et al. Responses to Crizotinib Can Occur in High-Level MET-Amplified Non-Small Cell Lung Cancer Independent of MET Exon 14 Alterations. J Thorac Oncol 2017; 12:141-4.
30. Vaishnavi A, Le AT and Doebele RC. TRKing down an old oncogene in a new era of targeted therapy. Cancer Discov 2015; 5:25-4.
31. Doebele RC, Drilon A, Paz-Ares L, Siena S, Shaw AT, Farago AF, et al. Entrectinib in patients with advanced or metastatic NTRK fusion-positive solid tumours: integrated analysis of three phase 1-2 trials. Lancet Oncol 2020; 21:271-82.
32. Yamamoto H, Shigematsu H, Nomura M, Lockwood WW, Sato M, Okumura N, et al. PIK3CA mutations and copy number gains in human lung cancers. Cancer Res 2008; 68:6913-21.
33. Thomas A, Rajan A, Lopez-Chavez A, Wang Y and Giaccone G. From targets to targeted therapies and molecular profiling in non-small cell lung carcinoma. Ann Oncol 2013; 24:577-85.
34. Planchard D, Popat S, Kerr K, Novello S, Smit EF, Faivre-Finn C, et al. Metastatic non-small cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. Ann Oncol 2018; 29: iv192-iv237
35. Pao W and Hutchinson KE. Chipping away at the lung cancer genome. Nat Med 2012; 18:349-51.

HR+, HER2-, NYIROKCSOMÓ NEGATÍV, KORAI EMLŐRÁKOS BETEGEI RÉSZÉRE

Soha nem volt még ennyire egyértelmű

TAILORx klinikai vizsgálat adatai alapján, az Oncotype DX® teszt a betegellátás egyértelmű standardja[1-5]

A kemoterápiás kezelés várható hatékonyságának a predikciója[1-5]

NEM KEMOTERÁPIA

IGEN KEMOTERÁPIA

Referenciák:
1. Sparano et al. *N Engl J Med.* 2015.
2. Sparano et al. *N Engl J Med.* 2018.
3. Sparano et al. ASCO 2018.
4. Paik et al. *J Clin Oncol.* 2006.
5. Geyer et al. *npj Breast Cancer*. 2018.

HER2-= human epidermal growth factor 2 negatív;
HR+=hormonreceptor pozitív;
TAILORx=Trial Assigning Individualised Options for Treatment.

Genomic Health, Oncotype DX Breast Recurrence Score, Oncotype IQ, Genomic Intelligence Platform és a Making cancer care smarter a Genomic Health Inc. regisztrált védjegyei
© 2019 Genomic Health, Inc. Minden jog fenntartva.
EXS11519_0121_HG_H

oncotype DX®
Breast Recurrence Score

GENOMIC SOLUTION from MED GEN-SOL KFT

Making cancer care smarter.™

oncotype IQ®
Genomic Intelligence Platform

EXACT SCIENCES

Az emlődaganatok korszerű diagnosztikája és kezelése

Modern therapy and diagnostics of breast cancer

Mühl Dorottya, Tóth Andrea, Pálffy Veronika, Dank Magdolna
Belgyógyászati és Onkológiai Klinika, Semmelweis Egyetem, Budapest
E-levél: muhl.dorottya@med.semmelweis-univ.hu

ÖSSZEFOGLALÁS A női tumoros megbetegedések közül az emlődaganat a leggyakoribb világszerte. Célunk a korszerű diagnosztikai és terápiás megközelítések összegzése, melyet a hazai és nemzetközi irányelvek, randomizált klinikai vizsgálatok és metaanalízisek eredményei alapján mutatunk be. Az emlődaganatok három fő altípusa: (1) hormonreceptor-pozitív (ER+, PR+, AR+/-), (2) HER2+, (3) tripla negatív. A rutin patológiai lelet része lesz a HR+ esetekben a PIK3CA-meghatározás, valamint az immunterápia indikátora a mikroszatellita instabilitás és PDL1-státusz ismerete. Tripla negatív, valamint magas rizikójú esetekben pedig a BRCA-vizsgálat került be a rutin vizsgálatok közé. Az egyes alcsoportok eltérő prognózisúak, ezért is kap kiemelten jelentős szerepet a precíziós onkológia alkalmazása. A kezelési terv felállítása a daganat stádiumától a rendelkezésre álló molekuláris es egyéb biomarkerektől, valamint a betegpreferenciától függ és értelemszerűen a finanszírozási lehetőségektől. Az onkoteam javaslatainak mindig az egyes beteg számára személyre szabott véleményt kell tükröznie. A fentieken kívül figyelembe kell venni például a szociális státuszt, hogy van-e családi/baráti (munkahelyi) támogatás, milyenek a lakhatási körülmények. Továbbá új kihívások elé állít a SARS-Cov-2 pandémia.

KULCSSZAVAK hormonpozitív emlőrák, HER2-pozitív emlőrák, tripla negatív emlőrák, genetikai teszt, irányelvek

SUMMARY Breast cancer is the most common malignant disease in women. Our aim was to summarise the modern, diagnostic and therapeutic approaches of breast cancers, with review of national and international guidelines, randomized clinical trials, and meta-analyzes. There are three main types of brest cancers: (1) ER+, PR+ (AR+/-) (2) HER2+ (3) triple negative. Routine pathological findings will include PIK3CA determination in HR+ cases, and knowledge of microsatellite instability and PDL-1 status as an indicator of immunotherapy. In case of triple negative or other high-risk cases, BRCA test is included in the routine diagnostic algorithm. Each subgroup has a different prognosis. This is why precision oncology plays a particularly important role. Establishment of a treatment plan depends on the stage of the tumor, the available molecular and other biomarkers, and patient preference, and, of course, funding opportunities. The recommendations of the oncoteam should always reflect a personalized opinion for each patient. In addition, for example, social status, whether there are family / friends (work) support, housing conditions should be taken into account. Furthermore, the SARS - Cov-2 pandemic poses new challenges.

KEY WORDS hormone positive breast cancer, HER2 positive breast cancer, triple negative breast cancer, molecular test, guidelines

Bevezetés

A cikkben az emlődaganat három altípusának szisztémás kezelési lehetőségeit foglaljuk össze nem metasztatikus és metasztatikus stádiumban.

- Hormonreceptor-pozitív HR+ / HER2-
- HER2-pozitív HER2+ / HR+ vagy HR-
- tripla negatív HR- HER2-

Rövidítések

AI	*aromatázinhibitor*
AR	*androgénreceptor*
DFS	*betegség mentes túlélés*
EMA	*European Medicines Agency*
ER	*ösztrogénreceptor*
ET	*endokrin terápia*
FDA U.S.	*Food and Drug Administration*
G-CSF	*granulocyta kolonia stimuláló faktor*
GnRh	*gonadotropin releasing hormon analóg*
HR	*hormonreceptor*
IHC	*immunhisztokémia*
KT	*kemoterápia*
MSI-H vagy dMMR	*microsatellita instabilitás-high vagy mismatch repair deficiencia*
mTOR-gátló	*mammalian target of rapamycin*
OS	*teljes túlélés*
PARP-gátló	*Poly Adenosine diphosphate Ribose Polymerase gátló*
pCR	*patológiai komplett remisszió*
PD1	*programozott sejthalál 1 fehérje*
PD-L1	*programozott sejthalál ligand 1 fehérje*
PFS	*progressziómentes túlélés*
PIK3CA	*Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha*
PR	*progeszteronreceptor*
RS	*recurrencia score*
RT-PCR	*real time polimeráz láncreakció*
T-DM1	*trastuzumab emtansine*
TNBC	*tripla negatív emlőrák*

A primer diagnózis elengedhetetlen része az immunhisztokémiai ER, PR, HER2, Ki67 és grade meghatározás. AR, PD1, PD-L1, MSI, PIK3CA, NTRK-meghatározás is szóba jöhet metasztatikus esetben és BRCA-meghatározás bármely altípus esetén.[1]

A következőkben a különböző alcsoportok terápiás lehetőségeit vesszük sorra, a teljesség igénye nélkül.

Nem metasztatikus emlőrák szisztémás kezelése

Hormon receptor pozitív emlőrák (neo)adjuváns endokrin terápia

A HR+/HER2- emlőrák alacsony proliferációs aktivitású eseteiben az elsődleges adjuváns/neoadjuváns szisztémás terápia az endokrin terápia (ET). Közepes és magas proliferációs aktivitású eseteiben az ET a kemoterápiát követi. Az adjuváns endokrin terápia orális antiösztrogén kezelés, menopauzalis státusztól függően megválasztott gyógyszerrel: tamoxifen vagy aromatáz-inhibitor (AI), premenopauzális státuszban ovariumszuppresszióval kiegészítve.

Hormonreceptor-pozitív emlőrák adjuváns endokrin terápia kiegészítése kemoterápiával

A daganat hagyományos biológiai jellemzőinek ismerete nem elegendő a daganat kemoszenzitivitásának előrejelzésére. Ma már rendelkezésünkre állnak RNS-alapú multigén tesztek, melyekkel további biomarkerek azonosíthatók. A biomarkerek egy része kiegészítő információt nyújt az emlődaganat prognózisáról és az endokrin terápia, valamint a kemoterápia várható hatékonyságáról. Ezen genetikai tesztek elvégzésével lehetőségünk nyílik az egyéni rizikó becslésére és a kemoterápiás haszon előrejelzésére. A genetikai tesztek eredményeit prospektív követéses vizsgálatok validálják: TAILORx (Trial Assigning Individualized Options for Treatment), WGSG Plan B (West German Study Group), RxPONDER (Rx for Positive Node Endocrine Responsive Breast Cancer), MINDACT (Microarray in Node-Negative and 1 to 3 Positive Lymph Node Disease May Avoid Chemotherapy).[2-5] Az emlődaganatok génexpressziós profiljának meghatározását célzó tesztek használata nem képezi a rutin staging részét. Azonban magas szintű bizonyítékok alapján a nemzetközi irányelveknek már részét képezi a 12, 21, 50, 70 gén alapú tesztek javaslata HR+/HER2-, nyirokcsomó negatív emlődaganatok esetében az adjuváns kemoterápia szükségességének mérlegelésére.[6-8] Kevesebb előzetes adat támasztja alá, hogy ezen genetikai tesztek nyirokcsomó-pozitív emlődaganat esetén is megbízhatóan jeleznék a prognózist és az adjuváns kemoterápia szükségességét. Nyirokcsomó-negatív esetekben az ajánlások a génexpressziós tesztek közül a 21 gént vizsgáló Oncotype Dx tesztet preferálják, mivel prognosztikus és prediktív értéke is igazolt. Egyéb gén expressziós tesztek prediktív értéke még nem bizonyított.

- 70 génes MammaPrint
- 50 génes PAM 50
- 12 génes EndoPredict
- Breast Cancer Index - BCI

Oncotype DX: Magyarországon az Oncotype DX tesztet ER+, HER2-, pT1c-pT2 (esetleg pT3), pN0 (esetleg pN1 1-3 nycs) korai stádiumban lévő emlődaganatos betegek esetén lehet alkalmazni. Az Oncotype DX RT-PCR technológiával 21 gént vizsgál.[9] A teszt által megadott kiújulási pontszám RS (recurrencia score) meghatározza a 10 éves kiújulás valószínűségét. Ha az RS 0-25 között van, akkor az ET mellett kemoterápia nem javasolt. 26-100 közötti RS esetén jelentős hozzáadott értéke van a kemoterápiának. A TAILORx vizsgálat legújabb interim analízise alapján jelentősen csökken a távoli áttétek kialakulásának kockázata, ER+, HER2-, N0 esetben anthracyclin vagy taxan kemoterápia után az 5. évnél a DFS 93,8%. 50 év alatt RS 21-25 között meg kell beszélni a beteggel a kemoterápia lehetőségét. RS <14 alatt nem javasolt kemoterápia hozzáadása.[10]

Prosigna, második generációs mRNS-alapú, génexpressziós profilt vizsgáló teszt.[11] A panel 50 tumorasszociált (PAM50) és 8 referenciagént tartalmaz. A vizsgálat NanoString technológia segítségével történik. A módszer alapja az mRNS-molekulák direkt kimutatása „molekuláris bárkód" (MBC) rendszer segítségével, a folyamat nem igényel PCR amplifikációt.[12] A vizsgálat akkreditált laboratóriumokban történik, licensszel rendelkező dolgozók segítségével, szigorú protokoll betartása mellett. Az értékelés automatizálva zajlik, ezt a vizsgálatot végző személyzet befolyásolni nem tudja. Az eredmény az mRNS expressziós profil alapján, valamint klinikai paraméterek figyelembe vételével jön létre. Így minden alkalommal a klinikus feladata, hogy az adott betegről klinikai információt (tumor legnagyobb átmérője és a pozitív nyirokcsomók száma) biztosítson a tesztet végzők számára. A teszt figyelembe veszi a kiindulási tumorméretet (T<2 cm, vagy T≥2cm), illetve a nyirokcsomó státuszt. A végleges eredmény egy Risk of Recurrence „ROR" score,

amely a panel által kapott genetikai információk, valamint a klinikai adatok összegzéseként jön létre. Az ROR megmutatja, hogy egy adott beteg milyen rizikócsoportba tartozik (alacsony, közepes vagy magas). Továbbá a teszt előnye, hogy molekuláris információi alapján biológiai szubtípusba sorol, amely időnként eltérhet az immunhisztokémiai vizsgálatok által meghatározott szubtípustól.

Hormonreceptor-pozitív emlőrák (neo)adjuváns kemoterápia

Rövid és hosszú távú mellékhatásai ellenére a HR+ daganatok magas kockázatú eseteiben igazolt a kemoterápia abszolút hatékonysága. Nagy dózisú antraciklintartalmú kezelés kb. 1/3-dal csökkenti az emlőrák okozta 10 éven belüli mortalitást.[13] Szekvenciális, dose dense anthracyclin vagy taxan + alkilálószer tartalmú protokoll javasolt. Az adjuváns kemoterápia részletezése nem tartozik szorosan jelen összefoglaló témájához, de azt meg kívánjuk jegyezni, hogy anthracyclin- és taxantartalmú neoadjuváns kezelést követően továbbra sem tisztázott, hogy a műtétkor talált reziduális tumor esetén mikor szükséges további adjuváns kemoterápia. A közelmúltban befejeződött CREATE-X klinikai vizsgálat alapján ilyen esetben HR+ vagy tripla negatív emlődaganatoknál adjuváns capacitabine alkalmazandó.[14]

HER2+ emlőrák (neo)adjuváns kemoterápia

HER2-pozitív emlődaganat esetén az adjuváns kemoterápia kiegészítése 1 éves trastuzumab kezeléssel jelentősen növeli a DFS-t és az OS-t. Anthracyclin vagy taxan + alkilálószer tartalmú protokoll javasolt. Magasabb kockázatú esetekben, ha a trastuzumab kezelés kiegészül pertuzumab vagy neratinib kezeléssel a kiújulás kockázata tovább mérsékelhető. A pertuzumab az APHINITY trial alapján tovább növelte az OS-t korai emlőrákban és csökkentette a betegség kiújulásának rizikóját a 6. éves követésnél a HR- és N1 betegcsoportban.[15] HR+, N2 esetben a kiterjesztett adjuváns neratinib NERLYNX® kezelés megfontolható.[16] Ha a neoadjuváns kemoterápia + HER2-gátló kezelés után a műtét során reziduális tumor kimutatható a trastuzumab T-DM1-re váltandó adjuváns vonalban.[17] Terápiát meghatározó szerepe van, tehát „kvázi" biomarkernek tekintendő: a hormonreceptor és nyirokcsomó státusz, valamint a kimutatható reziduális tumor jelenléte.

A jelenlegi Covid-járvány alatt a PERSEPHONE trial eredményének jelentősége is felértékelődik, mely alapján 6 hónapig vagy 12 hónapig tartó trastuzumab kezeléssel hasonló DFS és OS érhető el. Főleg távol lakó betegek esetében fontos a szerepe és a betegszelekcióra figyelni kell.[18]

Tripla negatív emlőrák (neo)adjuváns kemoterápia

A tripla negatív emlődaganat többsége agresszív biológiai viselkedésére az 5 mm-nél nagyobb TNBC esetén javasolt adjuváns kemoterápia adása még nyirokcsomó érintettség hiányában is. Biomarkernek tekintjük a BRCA státuszt és a pCR-t. Szekvenciális, dose dense anthracyclin vagy taxan + alkilálószer tartalmú protokoll javasolt. Neoadjuváns vonalban megfontolható a kezelés kiegészítése platinaszármazékkal. Neoadjuvánsan a carboplatin hozzáadásával szignifikánsan nő a műtétkor talált pCR aránya. A pCR a TNBC kedvező prognosztikai faktora.[19] Továbbra is kihívást jelent a pCR-t el nem érő betegek további kezelése. Jelenleg az egyetlen bizonyíthatóan előrevivő stratégia ilyen esetben a további adjuváns vonalban mono capecitabine kezelés adása.

Metasztatikus emlőrák szisztémás kezelése

A prognózist befolyásoló tényezők közül kiemelendő az oligometasztázis vs. multiplex visceralis metasztázisok jelenléte, utóbbi rosszabb prognózist vetít előre. Visceralis metasztázisok jelenléte esetén ki kell zárni a visceralis krízist. A visceralis krízis nem csupán az áttétek jelenlétét jelenti, hanem súlyos szervi diszfunkciót, amit tünetek, panaszok, valamint laboratóriumi eltérések, szervi elégtelenség kísér. Visceralis krízis fennállása esetén mindig a gyorsabban, drasztikusabban ható (általában kemoterápia) preferálandó. Jó teljesítmény státusz, csak csontmetasztázis jelenléte, hosszabb DFS esetén jobb prognózis feltételezhető. Törekedni kell hosszú DFS-t követően kialakult metasztázisokból rebiopszia végzésére – tisztázandó a betegség aktuális IHC státusza. Napjainkban már PD1, PD-L1, MSI, PIK3CA, NTRK meghatározás is szóba jön. A betegek klinikai vizsgálatban történő kezelése minden ponton, neoadjuváns/adjuváns/metasztatikus vonalban is javasolható a betegpreferencia figyelembevételével. Megfelelő klinikai vizsgálat elérhetősége esetén fel kell ajánlani az abban való részvételt.

Hormonpozitív metasztatikus emlőrák szisztémás kezelése

A hormonpozitív metasztatikus emlőrák elsődleges kezelése endokrin terápia (ET). A standard elsővonalbeli kezelés AI + CDK4/6 inhibitorok alkalmazása. A CDK4/6-inhibitorok (palbociclib, ribociclib, abemaciclib) AI-val vagy fulvestranttal kombinálhatók, első-, és másodvonalban is hatékonyak.[20-22] Megfelelően vezetett endokrin terápiás vonalakkal az OS az 5 évet is meghaladhatja.

Alkalmazandó endokrin terápiák *(1. táblázat)*

Visceralis krízisben vagy hormonrezisztencia esetén a metasztatikus HR+ emlőrák kezelésében is kemoterápiára kényszerülünk.[23] Visceralis krízisben a standard ellátás a szekvenciális mono anthracyclin vagy taxan KT. Kombinált KT-t ritkán, rapid progresszió esetén alkalmazunk. Ha korábban kapott már anthracyclint vagy taxánt a beteg, akkor capecitabine, eribulin, vinorelbin javasolható. A kemoterápia elfogadható mellékhatások mellett maximális válaszadásig folytatható, majd fenntartó ET-re kell váltani.

1. táblázat: ER + metasztatikus daganatok endokrin terápiás lehetőségei

fulvestrant
fulvestrant + AI
fulvestrant + CDK4/6 inhibitor
AI + CDK4/6 inhibitor
everolimus (mTOR-gátló) + exemesthan (AI)
everolimus + tamoxifen
everolimus + fulvestrant
AI
tamoxifen

HER2-pozitív metasztatikus emlőrák szisztémás kezelése

Metasztatikus HER2-pozitív emlőrák esetén a standard elsővonalbeli kezelés: taxan + trastuzumab + pertuzumab alkalmazása.[24] 6–8 ciklus kemoterápia után, ha nincs progresszió a kettős HER2-gátló kezelés folytatása javasolt. Komplett remisszió esetén a kettős HER2-gátló kezelés fenntartásának optimalis időtartama nem meghatározott. Komplett remisszió után néhány évvel a kezelés elhagyása opcionális. Hormonreceptor-pozitív esetekben a HER2-gátló kezelés endokrin terápiával kiegészül.

Progresszió esetén másodvonalban T-DM1 kezelés javasolt.[25] Harmadvonalban lapatinib + capecitabine, trastuzumab + lapatinib, trastuzumab + capecitabine és legújabban neratinib + capecitabine adása jön szóba. A 2 éves DFS előny összehasonlítva a lapatinib + capecitabine kezeléssel 12% vs. 3%.[26]

A trastuzumab deruxtecan (DS-8201) ENHERTU®, antidrug konjugátum (trastuzumab + topoisomerase I gátló) alkalmazható 2 vagy több vonalban kezelt vagy HER2 1+ vagy 2+ „low expressor" irrezekábilis/metasztatikus HER2+ emlőrák kezelésére.[27]

Érdekes kérdés, hogy a PD-L1 expresszió mikor és hol biomarker, a jövő dönti el. HER2+ emlőrák esetén atezolizumab + T-DM1 kezeléssel zajlik klinikai vizsgálat. Pembrolizumab + trastuzumab kombinációval a trastuzumab rezisztencia ellensúlyozhatónak tűnik. Mindkét vizsgálatban külön alcsoport analízist végeznek a PD-L1+ betegeknél.[28, 29]

Új fajta HER2-gátló tirozin-kináz inhibitor a tucatinib TUKYSA®. A HER2Climb study alapján harmadvonalban trastuzumab / pertuzumab és T-DM1 kezelést követően trastuzumab + capecitabine + tucatinib vs. trastuzumab + capecitabine + placebo kezeléssel 24 hónapos analízis alapján az OS 21,9 hónap vs 17,4 hónap. Agyi metasztázisok esetén a tucatinib különösen ígéretesnek bizonyul.[36]

A SOPHIA III vizsgálatban módosított HER2-gátló antitesttel a margetuximabbal zajlik kutatás. Kemoterápiával kombinálva egyelőre szerény, de szignifikáns PFS előnyt nyújt többszörösen előkezelt HER2+ betegeknél, összehasonlítva a trastuzumabbal kombinált kemoterápiával. A margetuximabot vizsgálják még gyomor- és GEJ adenocarcinomában immunterápiával kombinációban, HER2+, PD-L1+, non MSI-H profilú betegek kerültek a vizsgálat egyik alcsoportjába. A HER2-gátló kezelésre adott terápiás válasz lehetséges prediktív faktora az Fc-gamma-receptor CD16A-158F genotípusa.[31]

Tripla negatív metasztatikus emlőrák szisztémás kezelése

A tripla negatív metasztatikus emlőrák elsődleges kezelése anthracyclin- vagy taxantartalmú szekvenciális monoterápia. Ha korábban kapta már ezeket a szereket a beteg, akkor capecitabine, eribulin, vinorelbin, carboplatin alkalmazható. Visceralis krízis esetén kombinált KT: gemcitabine + carboplatin, cisplatin + 5FU / capecitabine javasolt. Agresszív biológiai viselkedésű, heterogén, de általában kemoszenzitív és im-

munterápiára érzékeny daganat. TNBC-ben elvégzendő a *BRCA* mutációs teszt. *BRCA1,2* mutáció esetén metasztatikus TNBC esetén másodvonalban PARP-inhibitor (olaparib, talazoparib, ...) kezelést alkalmazhatunk.[32-34]

Az androgénreceptor-expressziót mutató metasztatikus TNBC egyedi eseteiben off label kezelési alternatíva lehet a prosztatarákok kezelésére törzskönyvezett androgen receptor antagonista bicalutamid vagy enzalutamid alkalmazása.[35]

Az IMPassion 130 vizsgálat eredménye alapján PD-L1-pozitív, metasztatikus tripla negatív emlőrákban elsővonalban nab-paclitaxel + PD-L1 gátló atezolizumab kombinációjával vs nab-paclitaxel + placebo, az atezolizumab a progressziómentes és teljes túlélésben javulást eredményez.[36]

Célzott terápiás hatóanyagok és biomarkerek recidiváló /metasztatikus emlőrák kezelésében – a genomika szerepe döntéseinkben

(2. táblázat)

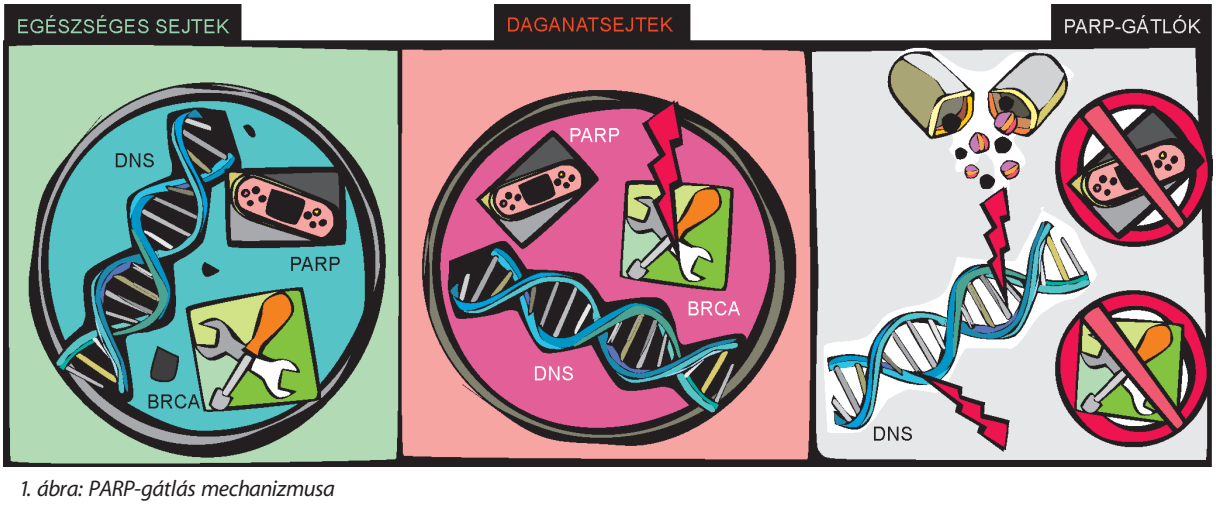
A genomika szerepe döntéseinkben

A BRCA 1/2 mutációs teszt elvégzése minden altípus esetén javasolt PARP-inhibitor terápia indikációjának felállítására. Az emlődaganatok közel 5–10%-ban mutatható ki a *BRCA1* vagy *BRCA2* gének mutációja *(1. ábra)*.

2018-ban engedélyezte az FDA és az EMA a PARP-inhibitor olaparib és talazoparib kezelés alkalmazását refrakter metasztatikus emlődaganat kezelésére másodvonalban *BRCA1*/2 mutáció esetén. Az OlympiAD vizsgálat végső analízise alapján másod- vagy harmadvonalban olaparib kezeléssel vs. standard kemoterápiával szemben a PFS szignifikánsan nő 7,0 hó vs. 4,2 hó BRCA-pozitív, HER2-negatív (HR+, tripla negatív) metasztatikus emlőrák esetén. A legújabb alcsoport analízis eredménye alapján 1st line vonalban is kimutatható OS előny.[37] A talazoparib a standard kemoterápiával szemben szignifikánsan növeli a PFS-t 8,6 hó vs. 5,6 hó, de a közelmúltban lezárult III EMBRACA trial eredménye szerint az OS-t nem hosszabbítja meg.[38]

2. táblázat: molekuláris célpontok az emlőrák kezelésében

EMLŐRÁK-ALTÍPUS	BIOMARKER	MÓDSZER	HATÓANYAG
Bármely	*BRCA1* mutáció *BRCA2* mutáció	germline sequencing	olaparib talazoparib
Hormonpozitív	*PIK3CA* mutáció	PCR	alpelisib + fulvestrant
Tripla negatív	1% ≤ PD-L1 expresszió	IHC	atezolizumab + nab paclitaxel
Bármely	NTRK fúzió	FISH, NGS, PCR	larotrectinib, entrectinib
Bármely	MSI-H/dMMR	IHC, PCR	pembrolizumab

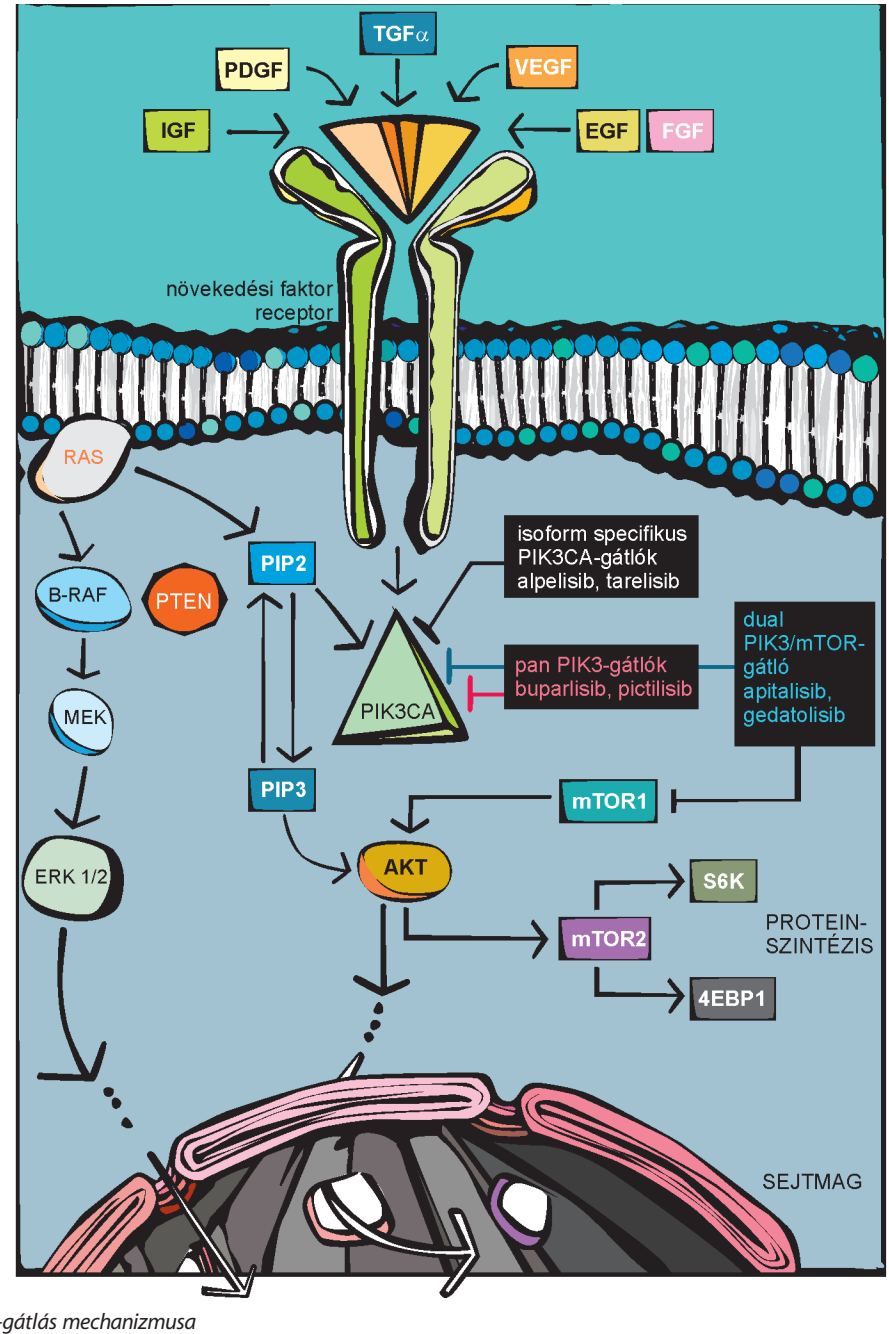


1. ábra: PARP-gátlás mechanizmusa

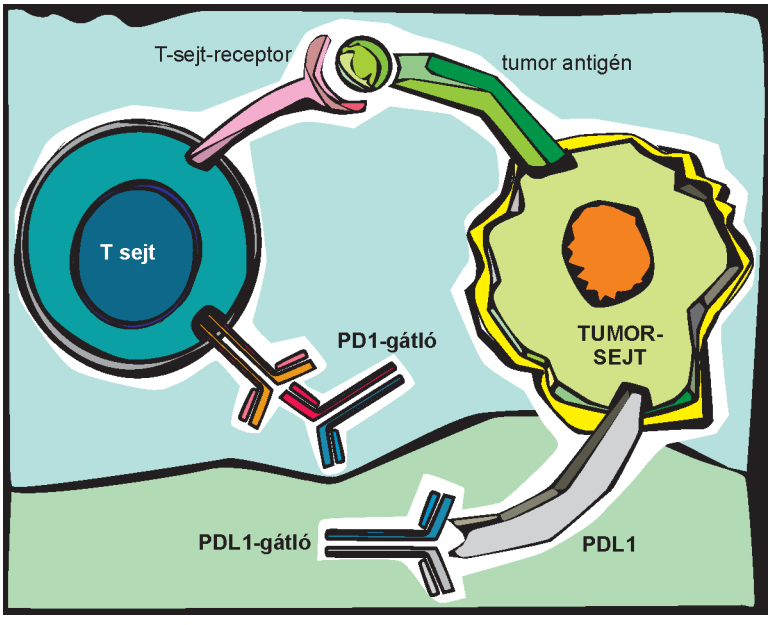
PIK3CA mutációs teszt elvégzése HR+/HER2- altípus esetén szövettani blokkon vagy vérből likvidbiopsziával (ctDNA) javasolt. Az alpelisib PIQRAY® a PIK3Ca alpha szelektív inhibitora FDA által már engedélyezett gyógyszer, melynek EMA törzskönyvére vár. A SOLAR-1 trial alapján PIK3CA mutáció fennállása esetén, másodvonalban AI után, postmenopausalis státuszban az alpelisib + fulvestrant kezeléssel vs. fulvestrant hosszabb PFS érhető el 11,0 hó vs. 5,7 hó *(2. ábra)*.[39]

Tripla negatív altípus esetén PD-L1 expressziós státusz meghatározása indokolt. Tripla negatív emlőrák, elsővonalbeli atezolizumab + nab paclitaxel kezelésével, PD-L1-pozitivitás esetén a teljes túlélés 25 hónap vs. a placebo + nab paclitaxel kezeléssel elérhető 15,5 hónappal szemben.

NTRK génfúzió igazolása esetén szövettani blokkon – egyéb megfelelő terápiás lehetőségek hiányában – pan TRK-, ROS-1-, ALK-gátló entrectinib vagy larotrectinib kezelés alkalmazható.[40, 41]



2. ábra: PIK3CA-gátlás mechanizmusa



3. ábra: PD1-, illetve PDL1-gátlás mechanizmusa

MSI-H vagy dMMR kimutatása esetén – egyéb megfelelő terápiás lehetőségek hiányában – engedélyezett immunterápia a PD1-gátló pembrolizumab alkalmazása mindenféle refrakter metasztatikus daganatban. Az emlődaganatokban 1–2%-ban kimutathatóak ezen eltérések.[43] Pembrolizumab (PD1-gátló) és atezolizumab (PD-L1-gátló) alkalmazásával neoadjuváns vonalban TNBC-ben már zajlanak klinikai vizsgálatok, a vizsgálatok végpontja a pCR és az OS *(3. ábra)*.

Emlőrák kezelésének monitorozása – nem képalkotó vizsgálattal

Az elmúlt években egy teljesen új, molekuláris alapokon működő, szűrőteszt robbant be mind a nemzetközi, mind a hazai onkológiai gondozásba. Ez a lehetőség az előttünk álló évek során teljesen átírja a daganatos betegek kezelését, ugyanis a tumorokat speciális módon, genetikai úton azonosítja és követi a vérplazmában. Ennek alapja, hogy a daganatos sejtek genetikai információt juttatnak a véráramba ún. cirkuláló tumor-(ct)DNS-ként, amelyeket a Signatera teszt extrém érzékenységgel képes felismerni. Ez lehetővé teszi, hogy a képalkotók felbontóképességénél jóval mélyebben, már igen kis méretben detektálni tudjuk a korábban diagnosztizált daganatok jelenlétét. A vizsgálatot bármilyen tumortípusban el lehet végezni, kivétel hematológiai tumorok és agytumorok, mindössze a diagnózis alapját szolgáló szövetmintára és a páciens vérmintájára van szükség. A Signatera tesztet az alábbi esetőségben lehet sikerrel alkalmazni: műtétet követően a maradék tumor kimutatására, kemoterápia során a kezelés monitorozására és a recidíva korai – akár 2 évvel korábbi – felismerésére.

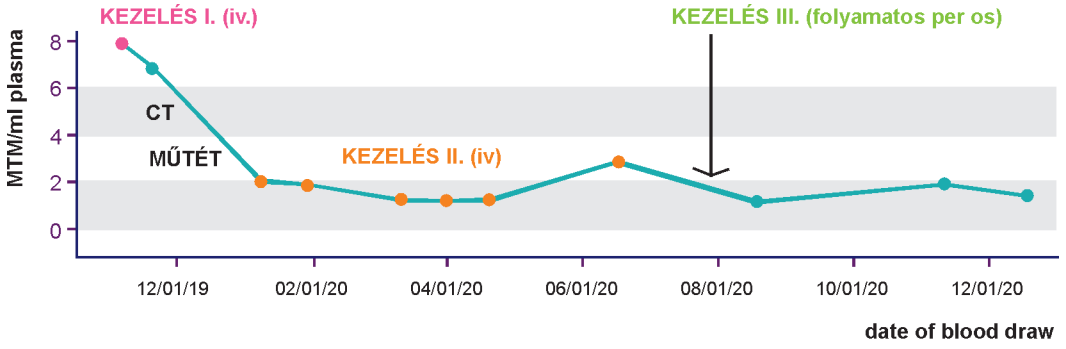
Emlőtumorok esetében a Signatera teszt átlagosan 9,5 hónappal korábban jelezte a recidivát, mint a képalkotók, illetve a CA15-3 és a klinikai vizsgálat.[47] A teszt nem alkalmas új primer tumor detektálására, csak a már kialakult daganat követésére, viszont jól használható a kezelés követésére és a preklinikai áttétek korai azonosítására. Így az emlőrákok molekuláris altípustól függetlenül monitorozhatóvá váltak, amely a hatékonyabb kezelést segítheti.[44-46]

A Signatera teszt hazánkban is elérhető, bár egyelőre nem társadalombiztosítási finanszírozásban. A *4. ábrán* bemutatunk egy emlőtumoros beteget, akinél a kezelések követésére, időzítésére alkalmaztuk az elmúlt másfél év során.

Covid-19-járványra adaptált ESMO ajánlások

Speciális megfontolások

A Covid-járvány alatt egyre inkább a felírható, szájon át szedhető terápiák kerülnek előtérbe, melyekkel több ciklusra is ellátható a beteg. Kiszámítható, jól kezelhető mellékhatásprofillal a kezelés biztonsággal vé-



DATE	MTM/ml
Nov 06, 2019	7,94
Nov 20, 2019	6,87
Jan 08, 2020	2,00
Jan 29, 2020	1,86
Feb 19, 2020	N/A
Mar 11, 2020	1,20
Apr 01, 2020	1,14
Apr 20, 2020	1,22
Jun 17, 2020	2,83
Aug 19, 2020	1,12
Nov 11, 2020	1,88
Dec 18, 2020	1,43

4. ábra: Signatera működése

gezhető. A CDK4/6-gátlók okozta neutropenia és az immunterápiák sajátságos mellékhatásai külön figyelmet érdemelnek, szoros követés mellett alkalmazhatók, szükség esetén dóziscsökkentéssel vagy a kezelés kihagyásával. Az mTOR-gátló és PIK3CA-gátló megkezdése a járvány alatt annak aktuális fázisától függően megfontolandó az esetleges immunszuppresszió, pneumonitis, diabetes kialakulásának magas kockázata miatt, érdemes ezen szereket későbbi vonalakra fenntartani. Mivel minimálisra kell csökkenteni a klinikai orvos-beteg találkozások gyakoriságát, így bizonyos esetekben a biszfoszfonátok és denosumab alkalmazásánál 3 havi adagolásra térünk át. A GnRh-analógok közül a 3 havi kiszerelésű hatóanyag részesítendő előnyben, melynek otthoni beadása együttműködő beteggel vagy háziorvosi segítséggel megoldható. A kórházba történő utazások számának csökkentése céljából, amikor kemoterápiára szükség van orálisan alkalmazandó hatóanyagokat és kivételesen nem a dose dense heti kezeléseket, hanem a 3 heti protokollokat részesítjük előnyben, intenzívebb G-CSF támogatás mellett. A szteroidok használata átgondolandó minden esetben immunszuppresszív mellékhatásuk miatt. Az esedékes restaging képalkotó és kardiológiai, valamint kontroll laborvizsgálatok a lakóhelyhez közeli egészségügyi intézményben történnek.[43]

Összefoglalás

Napjainkban kétféle tendencia határozza meg az emlőrák kezelési stratégiáját. A high risk betegcsoportokban a kezelések eszkalációja történik (endokrin terápia időtartamának kiterjesztésével, PST-t követően a reziduális tumor kezelésével, kettős HER2-gátló alkalmazásával). Ugyanakkor jól megfontoltan, low risk betegcsoportokban a terápia deeszkalációjára törekszünk (adjuváns kemoterápia elmaradásával, rövidebb ideig tartó HER2-gátló kezeléssel, nyirokcsomó-blokkdissectio elhagyásával, sugárterápia dózisának, időtartamának rövidítésével). Mindkét szándék tekintetében az előrelépéshez változatlanul jól tervezett randomizált klinikai vizsgálatok folytatása, továbbá a jelenleg már szinte mindenhol elérhető molekuláris vizsgálatok (prediktív és prognosztikus tesztek, PIK3CA-vizsgálat, BRCA1/2-vizsgálat) széles körben való alkalmazása szükséges. Ezek alapján jelenlegi standard kezeléseink hatékonyságát (vagy várható hatékonyságát) és bizton-

ságosságát össze tudjuk vetni az új szerek vagy protokollok eredményeivel. A nem várt és nem kívánt SARS-Cov-2 járvány pozitív hozadéka, hogy „real life" adatok keletkeztek, nagyszámú beteg esetében, melyek további elemzése a jövő feladata. Például dose dense kezelések, orális terápiák, terápiakövetés képalkotókkal, CDK4/6 inhibitorok monitorozása, mellékhatások kezelése, 3 havi GnRH-analógok felírása szempontjából.[41] Törekednünk kell arra, hogy a jól informált, betegségéről és annak várható kimeneteléről kellően tájékoztatott beteg bevonásával az emlőrákban jártas, gyakorlott multidiszciplináris onkoteam hozzon döntéseket a diagnosztikus és terápiás lépéseket illetően. A kezelő team tagjai folyamatos önképzés és rendszeres megbeszélések mellett tisztában legyenek a prognosztikai és prediktív diagnosztikai vizsgálatok pontos indikációjával és a javasolt terápia klinikai előnyével és kockázatával. Az egyes kezelési módok és azok hosszú távú jó és rossz következményei között reális kompromisszumok meghozatalára van szükség. Nem lehet elégszer hangsúlyozni, hogy az onkoteam javaslatoknak mindig az egyes beteg számára személyre szabott véleményünket kell tükröznie és nemcsak a betegségnek vagy a nemzetközi és hazai irányelveknek legmegfelelőbb klinikai álláspontunkat. Minél szélesebb körben hozzáférhetővé kell tenni betegeink számára nemcsak a létfontosságú, hanem a legkorszerűbb diagnosztikai és terápiás módszereket adjuváns/ neoadjuváns vonalban, korai stádiumú emlőrákban is.

Irodalom

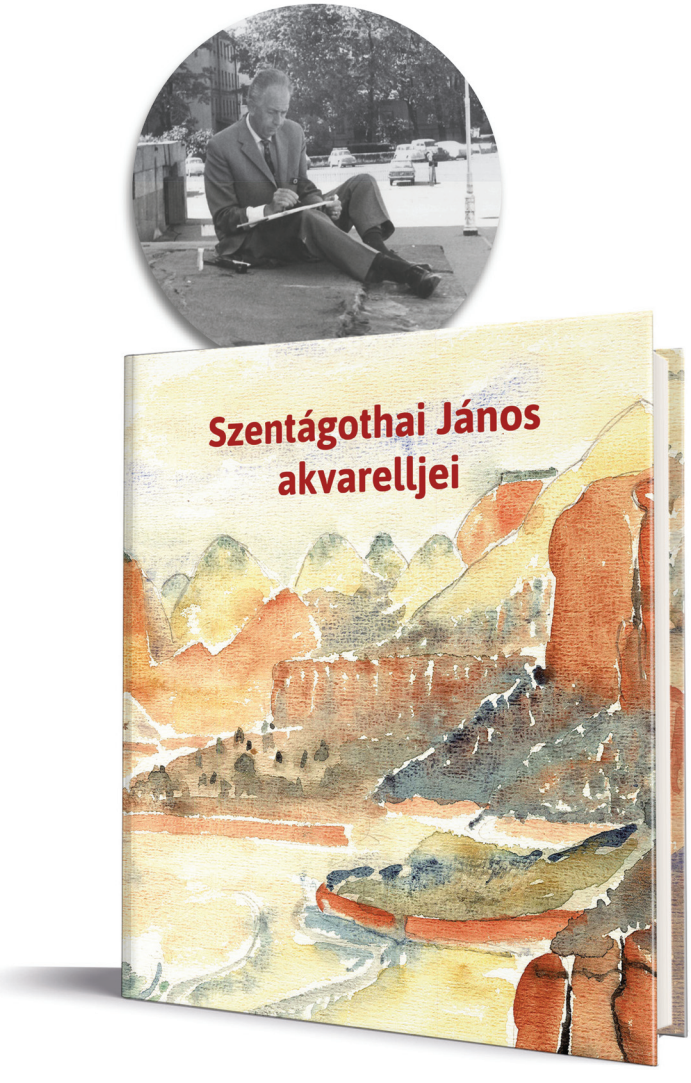
1. Horváth Zs, Boér K, Dank M és mtsai. Az emlőrák szisztémás kezelése: szakmai útmutatás. Magyar Onkológia 2016. jan.; 60:241-57.
2. Gluz O, Nitz UA, Christgen M, et al. West German Study Group Phase III Plan B Trial: first prospective outcome data for the 21-gene recurrence score assay and concordance of prognostic markers by central and local pathology assessment. J Clin Oncol. 2016; 34(20):2341-9.
3. Sparano JA, Gray RJ, Makower DF, et al. Adjuvant chemotherapy guided by a 21-gene expression assay in breast cancer. N Engl J Med. 2018; 379(2):111-21.
4. Jasem J, Fisher CM, Amini A, et al. The 21-gene recurrence score assay for node-positive, early-stage breast cancer and impact of RxPONDER Trial on chemotherapy decision-making:have clinicians already decided ? J Natl Compr Canc Netw. 2017; 15(4):494-503.
5. Cardoso F, van'tVeer LJ, Bogaerts J, et al. MINDACT Investigators. 70-Gene signature as an aid to treatment decisions in early-stage breast cancer. N Engl J Med. 2016; 375(8):717-29.
6. Burstein HJ, Curigliano G, Loibl S, et al. Estimating the benefits of therapy for early-stage breast cancer: the St. Gallen International Consensus Guidelines for the primary therapy of early breast cancer 2019. Ann Oncol. 2019 Oct 1; 30(10):1541-57.
7. National Comprehensive Cancer Network: National Clinical Practice Guidelines in Oncology. NCCN Guidelines Version 3.2020 Invasive Breast
8. Cardoso F, Kyriakides S, Ohno S, et al on behalf of the ESMO Guidelines Committee Early breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. Annals of Oncology. 2019; 30:1194-220.
9. http://www.oncotypedx.hu/
10. Sparano JA, Gray RJ, Makower DF, et al. Clinical Outcomes in Early Breast Cancer With a High 21-Gene Recurrence Score of 26 to 100 Assigned to Adjuvant Chemotherapy Plus Endocrine Therapy: A Secondary Analysis of the TAILORx Randomized Clinical Trial. JAMA Oncol 2019 Sep 30; 6(3):367-74.
11. Technologies N. nCounter XT Assay User Manual. 2016; Available from: www.nanostring.com.
12. Baskota SU, Dabbs DJ, Clark BZ, et al., Prosigna® breast cancer assay: histopathologic correlation, development, and assessment of size, nodal status, Ki-67 (SiNK™) index for breast cancer prognosis. Mod Pathol, 2020.
13. Waks AG, Winer EP. Breast Cancer Treatment: A Review. JAMA. 2019; 321(3):288-300.
14. Masuda N, Lee SJ, Ohtani S, et al. Adjuvant capecitabine for breast cancer after preoperative chemotherapy. N Engl J Med. 2017; 376(22):2147-59.
15. Piccart M, Procter M, Fumagalli D, et al. A randomised multi-center, double-blind, placebo-controlled trial comparing chemotherapy plus trastuzumab plus pertuzumab versus chemotherapy plus trastuzumab plus placebo as adjuvant therapy in patients with operable HER2-positive early breast cancer. Presented at: 2019 San Antonio Breast Cancer Symposium; December 10-14, 2019; San Antonio, TX. Abstract GS1-04.
16. Martin M, Holmes FA, Ejlertsen B, et al. ExteNET Study Group. Neratinib after trastuzumab-based adjuvant therapy in HER2-positive breastcancer (ExteNET): 5-year analysis of a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. Lancet Oncol. 2017; 18(12): 1688-700.
17. Minckwitz G, Huang CS, Mano MS, et al. Trastuzumab Emtansine for Residual Invasive HER2-Positive Breast Cancer. N Engl J Med. 2019 Feb 14; 380(7):617-28.
18. Earl HM, Hiller L, Vallier AL, et al. 6 Versus 12 Months of Adjuvant Trastuzumab for HER2-positive Early Breast Cancer (PERSEPHONE): 4-year Disease-Free Survival Results of a Randomised Phase 3 Non-Inferiority Trial. Lancet.2019 Jun 29; 393(10191):2599-612.
19. Cortazar P, Zhang L, Untch M, et al. Pathological complete response and long-term clinical benefit in breast cancer: the CTNeoBC pooled analysis. Lancet. 2014; 384(9938): 164-72.
20. Finn RS, Martin M, Rugo HS, et al. Palbociclib and letrozole in advanced breast cancer. N Engl J Med. 2016; 375(20):1925-36. PALOMA
21. Hortobagyi GN, Stemmer SM, Burris HA, et al. Ribociclib as first-line therapy for hr-positive, advanced breast cancer. MONALEESA-2 N Engl J Med. 2016; 375(18):1738-48.
22. Goetz MP, Toi M, Campone M, et al. MONARCH3: abemaciclib as initial therapy for advanced breast cancer. J Clin Oncol. 2017; 35(32):3638-46.

23. Cardoso F, Senkus E, Costa A, et al. 4th ESO–ESMO International Consensus Guidelines for Advanced Breast Cancer (ABC 4) Annals of Oncology 2018; 29:1634-57.
24. Baselga J, Cortés J, Kim SB et al. Pertuzumab plus trastuzumab plus docetaxel for metastatic breast cancer. N Engl J Med. 2012 Jan 12; 366(2):109-19.
25. Verma S, Miles D, Gianni L et al. EMILIA Study Group. Trastuzumab emtansine for HER2-positive advanced breast cancer. N Engl J Med. 2012; 367(19):1783-91.
26. Puma Biotechnology Receives U.S. FDA Approval of Supplemental New Drug Application for Nerlynx to Treat HER2-Positive Metastatic Breast Cancer [news release]. Los Angeles, CA: Puma Biotechnology; Febr. 26, 2020.
27. Modi S, Saura C, Yamashita T, et al. Trastuzumab Deruxtecan in Previously Treated HER2-Positive Breast Cancer. N Engl J Med 2020; 382:610-21
28. Emens LA, Esteva F, Beresford M, et al. Abstract PD3-01: results from KATE2, a randomized phase 2 study of atezolizumab (atezo) + trastuzumab emtansine (T-DM1) vs placebo (pbo) + T-DM1 in previously treated HER2+ advanced breast cancer (BC). Cancer Res 2019; 79:PD3-01.
29. Loi S, Giobbie-Hurder A, Gombos A, et al. Pembrolizumab plus trastuzumab in trastuzumab- resistant, advanced, HER2-positive breast cancer (PANACEA): a single-arm, multicentre, phase 1b-2 trial. Lancet Oncol 2019; 20(3): 371-82.
30. Rashmi K. Murthy RK, Loi S, Okines A, et al. Tucatinib, Trastuzumab, and Capecitabine for HER2-Positive Metastatic Breast Cancer N Engl J Med 2020; 382:597-609.
31. Phase III SOPHIA Trial Evaluates Margetuximab/ Chemotherapy vs Trastuzumab/Chemotherapy for HER2-Positive Breast Cancer. By The ASCO Post Staff March 10, 2020 - Supplement: Conference Highlights SABCS 2019.
32. Robson M, Im SA, Senkus E, et al. Olaparib for metastatic breast cancer in patients with a germline BRCA mutation. N Engl J Med. 2017; 377(6):523-33.
33. Litton JK, Rugo HS, Ettl J, et al. Talazoparib in patients with advanced breast cancer and a germline BRCA mutation. N Engl J Med. 2018; 379 (8):753-63.
34. Pogoda K, Niwinska A, Sarnowska E, et al. Effects of BRCA Germline Mutations on Triple-Negative Breast Cancer Prognosis. J Oncol.2020 Jan 27; 2020:8545643
35. Traina TA, Miller K, Yardley DA, et al. Enzalutamide for the treatment of androgen receptor-expressing triple-negative breast cancer. J Clin Oncol 2018; 36(9):884-90.
36. Schmid P, Rugo HS, Adams S, et al. Atezolizumab Plus Nab-Paclitaxel as First-Line Treatment for Unresectable, Locally Advanced or Metastatic Triple-Negative Breast Cancer (IMpassion130): Updated Efficacy Results From a Randomised, Double-Blind, Placebo-Controlled, Phase 3 Trial. Lancet Oncol 2020 Jan; 21(1):44-59.
37. Robson ME, Tung N, Conte P, et al. OlympiAD final overall survival and tolerability results: Olaparib versus chemotherapy treatment of physician's choice in patients with a germline BRCA mutation and HER2-negative metastatic breast cancer. Ann Oncol. 2019 Apr 1; 30(4):558-66.
38. AACR 2020: Final Overall Survival Results From the Phase III EMBRACA Trial By The ASCO Post Staff Posted: 4/27/2020.
39. Alpelisib for PIK3CA-Mutated, Hormone Receptor–Positive Advanced Breast Cancer André F, Ciruelos E, Rubovszky G et al. N Engl J Med 2019; 380:1929-40.
40. Doebele RC, Drilon A, Paz-Ares L, et al. Entrectinib in patients with advanced or metastatic NTRK fusion-positive solid tumours: integrated analysis of three phase 1-2 trials. Lancet Oncol. 2020 Feb; 21(2):271-82.
41. Hong DS, DuBois SG, Kummar S et al. Larotrectinib in patients with TRK fusion-positive solid tumours: a pooled analysis of three phase 1/2 clinical trials. Lancet Oncol. 2020 Apr; 21(4):531-40.
42. Le DT, Durham JN, Smth KN et al. Mismatch-repair deficiency predicts response of solid tumors to PD-1 blockade. Science. 2017 Jul 28; 357(6349):409-13.
43. https://www.esmo.org/guidelines/cancer-patient-management-during-the-covid-19-pandemic/breast-cancer-in-the-covid-19-era
44. Coombes RC, Page K, Salari R, et al. Personalized Detection of Circulating Tumor DNA Antedates Breast Cancer Metastatic Recurrence. Clin Cancer Res. 2019; 25(14):4255-63.
45. Han X, Wang J, Sun Y. Circulating Tumor DNA as Biomarkers for Cancer Detection. Genomics, Proteomics & Bioinformatics. 2017; 15(2):59-72.
46. Magbanua MJM, Brown-Swigart L, Hirst GL, et al. Personalized Serial Circulating Tumor DNA (ctDNA) Analysis in High-Risk Early Stage Breast Cancer Patients to Monitor and Predict Response to Neoadjuvant Therapy and Outcome in the I-SPY 2 TRIAL. 1.
47. Coombes C, Page K, Salari R, et al. Personalized Detection of Circulating Tumor DNA Antedates Breast Cancer Metastatic Recurrence. Clinical Cancer Research. 2019; 25(14):4255-63.

SEMMELWEIS KIADÓ MŰVÉSZETI KIADVÁNYAI

Festészet

Könyveink megvásárolhatók a Legendus Könyvesboltban, illetve a Líra Kereskedelmi hálózaton belül az egész országban, de egyre nagyobb igényt elégít ki webshopunk.



SZENTÁGOTHAI JÁNOS AKVARELLJEI

Homo universalis – száz évben talán egyszer ad meg a Gondviselés egy nemzetnek olyan elmét és szívet, mint Szentágothai Jánosé volt. Amikor intézetünk néhai igazgatójának reneszánsz zsenijére, nemzetének szentelt áldozatos életére gondolunk, Habsburg Ottó trónörökös búcsúbeszédének szavai csengenek vissza minduntalan. Szentágothai János orvostanhallgatók generációit varázsolta el azzal, hogy anatómusként az emberi testet művészi alkotásként értette meg és tanította. Tanítványaiként az idegrendszert ismertető rajzai nyűgöznek le minket immáron hetven éve. Ebben a könyvben, melyet kezében tart az Olvasó, volt professzorunkat másik oldaláról ismerhetjük meg. Művész volt a tudományban, de művészként látta és láttatta természet és ember alkotásait. Vízfestményeiben gyönyörködve az életet szerető ember világát ismerhetjük meg, aki teljes odafigyeléssel és különös tehetséggel alkotott munkában és pihenésben egyaránt. A töltekezés ideje volt számára, amikor festhetett – éljük meg olvasóként ugyanezt, amikor varázsaira rácsodálkozunk.

dr. Alpár Alán

128 oldal ■ Ára: 6000 Ft

Könyvek E-könyvek Folyóiratok Apropó Poszter Box

Semmelweis Kiadó
1089 Budapest, Nagyvárad tér 4.
www.semmelweiskiado.hu

LEGENDUS KÖNYVESBOLT
1089 Budapest, Nagyvárad tér 4.
Tel.: 210-4408, 459-1500/56353
Nyitva tartás: H–Sz: 9.00–16.00,
Cs: 9.00–18.00, P: 9.00–14.00
E-mail: info@semmelweiskiado.hu

ÚJABB NAP.
ÚJABB LEHETŐSÉG
A GYŐZELEMRE.

Vectibix® panitumumab | CÉLZOTT SZEMÉLYRE SZABOTT MEDICINA

✓ **BIZONYÍTOTTAN HOSSZABB TELJES TÚLÉLÉS**[1,2,5]

✓ **KORAI TUMOR ZSUGORODÁS**[3]

✓ **KÖVETKEZETES HATÉKONYSÁG**[1,2]

Fontolja meg a Vectibix® + FOLFIRI vagy Vectibix® + FOLFOX terápiát első vonalban RAS vad típusú mCRC betegeinél

Vectibix® (panitumumab) 20 mg/ml koncentrátum oldatos infúzióhoz 1 x 5 ml (EU/1/07/423/001)
Bővebb információért olvassa el a gyógyszer alkalmazási előírását!
A Vectibix® alkalmazási előírásának és betegtájékoztatójának elérhetősége: EMA: http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/000741/human_med_001128.jsp&mid=WC0b01ac058001d124
EC: http://ec.europa.eu/health/documents/community-register/html/h423.htm

Árak és támogatások
A Vectibix 20 mg/ml koncentrátum oldatos infúzióhoz, 1x5ml (EU/1/07/423/001) termelői ára: 106 274 Ft.
http://www.neak.gov.hu/felso_menu/szakmai_oldalak/gyogyszer_segedeszkoz_gyogyfurdo_tamogatas/egeszsegugyi_vallalkozasoknak/pupha/Vegleges_PUPHA.html
Elérési útvonal: Főoldal>Felső menü>Szakmának>Kiemelt szakmai területek>Gyógyszer/Gyógyászati segédeszköz/Gyógyfürdő támogatások>Publikus gyógyszertörzs (PUPHA)>Végleges törzs> Publikus Gyógyszertörzs – Érvényesség kezdete: 2020. július 1.

Eü. pont: 9/1993. (IV. 2) NM rendelet, 1/A. számú melléklete. Tételes elszámolás alá eső hatóanyagok jegyzéke és kódja, indikációs területek és a felírásra jogosultak köre: 8/e2.2., 8/e3.2.
http://njt.hu/cgi_bin/njt_doc.cgi?docid=18771.385159
Hatályos: 2020. július 1-től
Elérési útvonal: Nemzeti jogszabálytár
A készítmények felsorolása:
http://www.neak.gov.hu/felso_menu/szakmai_oldalak/specialis_ellatasok/erdeklodo/teteles_gyogyo.html
Elérési útvonal: Főoldal>Felső menü>Szakmának>Speciális finanszírozású ellátások>Szakmai érdeklődőknek (Orvosoknak,Gyógyszerészeknek)>Tételes elszámolás alá eső gyógyszerkészítmények>Tételes elszámolás alá eső gyógyszerkészítmények.
Finanszírozási protokoll: 31/2010. (V.13.) EüM rendelet a finanszírozási eljárásrendekről, 32., 33., melléklet.
Forrás: http://njt.hu/cgi_bin/njt_doc.cgi?docid=131312.385164
Hatályos: 2020. július 1-től
Elérési útvonal: Nemzeti jogszabálytár

Kérjük, bármely gyógyszerrel kapcsolatos valamennyi feltételezett nemkívánatos reakciót jelentsen az Országos Gyógyszerészeti és Élelmezés-egészségügyi Intézetnek (OGYÉI) a www.ogyei.gov.hu honlapon található on-line bejelentő-felületen keresztül, vagy a honlapról letölthető mellékhatás-bejelentő lapon, mely visszaküldhető levélben (OGYÉI, 1372 Budapest, Pf. 450), faxon (+36 1 886 9472), vagy e-mailben (adr.box@ogyei. gov.hu), vagy az Amgen helyi képviseletének a +36 1 354 4700 telefonszámon, illetve a +36 80 981 363-as faxszámon.

Irodalom:
1. Douillard J-Y et al. N Engl J Med 2013;369:1023–1034. **2.** Rivera F. et al. Int J Colorectal Dis 2017;DOI 10.1007/s0038-0147-2800-1 **3.** Douillard J-Y et al. Ann Oncol 2013;24(Suppl 4):iv32–iv33. (poszterbemutató PD – 0024). **4.** Vectibix® (panitumumab) alkalmazási előírás, Amgen, 2018. január **5.** Abad A, et al. Ann Oncol 2014; 25(Suppl 4):iv189 (poster 551P).

Minden jog fenntartva.
Dokumentum kódszáma: HU-VBX-0720-00001
A dokumentum lezárásának dátuma: 2020. július 21.

AMGEN
Amgen Kft., 1054 Budapest, Szabadság tér 7., Tel.: 354-4700, Fax: 354-4701, www.amgen.hu

Colorectalis carcinoma: molekuláris biomarkerek, precíziós terápia és új perspektívák

Colorectal cancer: molecular biomarkers, precision therapy and emerging concepts

Jakab Anna[1,3], **Patai Árpád V.**[2,3], **Micsik Tamás**[1,3]
[1] I. Sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet, Semmelweis Egyetem, Budapest
[2] Belgyógyászati és Hematológiai Klinika, Semmelweis Egyetem, Budapest
[3] Interdiszciplináris Gasztroenterológiai Munkacsoport, Semmelweis Egyetem, Budapest
E-levél: micsikt@gmail.com

ÖSSZEFOGLALÁS A colorectalis carcinoma (CRC) hazánkban és világszerte is jelentős népegészségügyi probléma, az öregedő populáció egyik leggyakoribb malignitása. A CRC-k molekuláris háttere összetett, ezért a folyamatosan bővülő precíziós terápiás arzenál és egyre szenzitívebb molekuláris diagnosztikai lehetőségek megjelenése és rutinba való integrálása időszerű. A mikroszatellita instabilitás (MSI) az immunterápia térnyerésének köszönhetően még fontosabbá vált. Prognosztikai jelentősége mellett jó prediktív markere az ún. immun checkpoint inhibitoroknak, melyek a CRC-k 10–15%-át kitevő MSI tumorokban sikeresnek bizonyultak.
Az EGFR-útvonal gátlása régóta alkalmazott modalitás CRC-ben, de a rezisztenciamechanizmusok és a farmakogenomikai markerek még nem teljesen ismertek vagy bizonyítottak. Jelenlegi ajánlások szerint a *RAS*-mutációk, a *BRAF*-státusz és a tumor oldaliság a mérvadó anti-EGFR terápia esetén. Anti-VEGF terápia esetén rutinszerűen nem vizsgálunk rezisztenciagéneket. A „klasszikus" célpontok mellett újabbak is előkerültek: NTRK-inhibitorok, HER2-gátlás.
A diagnosztikában megjelentek neminvazív szűrési módszerek is (például széklet DNS, Cologuard, metilált Septin9). Az ún. folyékony biopszia is elterjedőben van, mely különösen hasznos lehet a kezelésre adott válasz követésére és a recidíva korai felismerésére.
Összeségében jelentős innovációk születtek az elmúlt években, de maradtak megoldatlan kérdések. Az intratumorális heterogenitás és a komplex tumorbiológia gyakran vezet a választott terápia sikertelenségéhez, ráadásul ezek diagnosztikus kihívást is jelentenek.
Összefoglaló közleményünkben átfogó képet igyekszünk festeni a CRC-k jelenlegi célzott terápiájáról, azok klinikailag releváns molekuláris hátteréről és újabb lehetőségeiről.

KULCSSZAVAK colorectalis carcinoma, célzott terápia, molekuláris diagnosztika

SUMMARY The increasing incidence and mortality of colorectal cancer (CRC) in adult population is a significant burden to public health systems, globally and especially in Hungary.
A comprehensive picture on the complex molecular background of colorectal cancer is essential due to the expanding precision treatments and emerging molecular tests as well as biomarkers.
Immune checkpoint inhibitors (ICIs) were proven to be effective in microsatellite instable (MSI) CRC patients making up 15% of all CRC cases. The predictive value of mismatch repair status and better overall survival of early stage MSI tumours have made the determination of MSI status part of routine practice.
Agents targeting the EGFR pathway have been applied regularly in CRC patients for a long time now, but some mechanisms of resistance or certain pharmacogenomic markers are yet to be discovered or validated. According to current guidelines, the evaluation of extended *RAS* and *BRAF* mutation panel are decisive along with tumour sidedness. Evaluation of predictive markers when applying anti-VEGF agents is not routinely performed. Beside the classical targets, NTRK and HER2 inhibitors are promising newcomers.
Some non-invasive screening methods (e.g. stool DNA, Cologuard, methylated septin9) are already approved, and liquid biopsy is expected to be more prevalent, especially in monitoring response to tumour therapy and early predicting recurrent disease.
There has been a significant progress and innovations over the past few years, nevertheless, many challenges remain unsolved. Intratumoral heterogeneity and complex tumour biology often lead to resistance of personalized therapy, and also present diagnostic difficulties.
In our review we attempt to give a comprehensive picture of targeted therapy and its molecular background and also discuss some emerging concepts in CRC.

KEY WORDS colorectal cancer, targeted therapy, molecular diagnostics

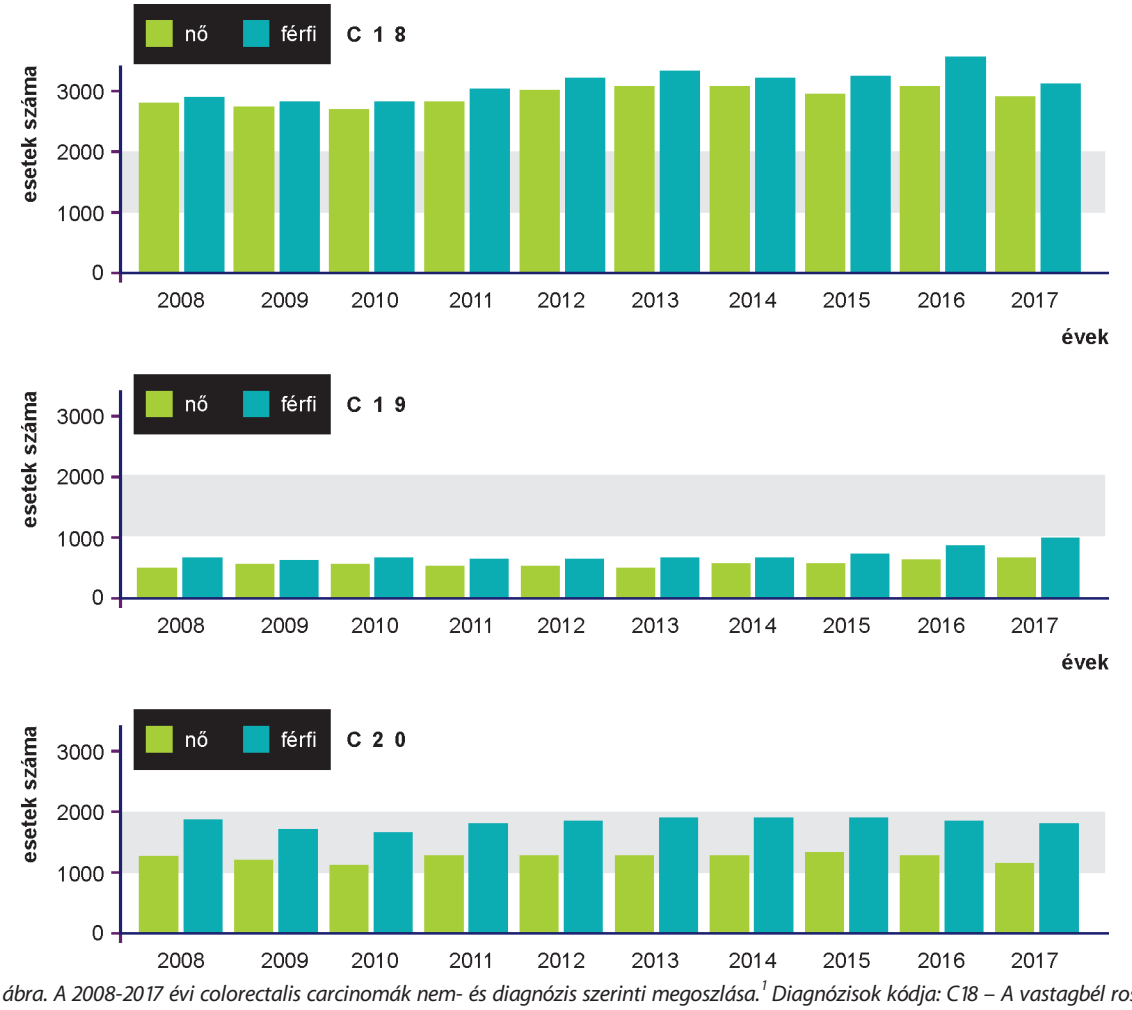
Rövidítések

APC	*antigénprezentáló sejt (antigen presenting cell)*
ASCO	*American Society of Clinical Oncology*
ASCP	*American Society of Clinical Pathology*
CIMP	*CpG Island Methylator Phenotype*
CIN	*kromoszomális instabilitás (chromosomal instability)*
CMS	*konszenzus molekuláris altípus (consensus molecular subtype)*
CRC	*colorectalis carcinoma*
CTLA-4	*citotoxikus T-lymphocyta antigen 4*
ctDNS	*keringő tumor DNS (circulating tumor DNA)*
sDNS	*széklet DNS (stool DNA)*
EGF(R)	*epithelialis növekedési factor (receptor) (epithelial growth factor (receptor))*

EMA–	European Medicine Agency
EMT	epitheliomesenchymalis átmenet (epithelio-mesenchymal transition)
FDA	Food and Drug Administration
FIT	fecal immunochemical test
5FU	5 -fluorouracil
gFOBT	guiac fecal occult blood test
HER	human epidermalis növekedési factor receptor
ICI	immune checkpoint inhibitor
ICO	immune checkpoint overexpresszió
IHC	immunhisztokémia (immunohistochemistry)
ITH	intratumorális heterogenitás
MAF	mutáns allél frekvencia
MMR	mismatch repair
MSI	mikroszatellita instabilitás/instabil
MSS	mikroszatellita stabil
NGS	újgenerációs szekvenálás (next generation sequencing)
NTRK	neurotrfin-tropomiozin-receptor-kináz
ddPCR	digitális droplet PCR
PCR-RFLP	polimerase chain reaction – restriction fragment length polimorphism
PD1	programmed death cell protein 1
PD-L1	programmed death ligand 1
PTL	peritumorális lymphocyta
lncRNS	hosszú nemkódoló RNS (long noncoding RNA)
miRNS	mikroRNS
RTK	receptor tirozin-kináz
TCGA	The Cancer Genome Atlas
TIL	tumorinfiltráló lymphocyta
TMB	tumor mutációs terhelés (tumor mutation burden)
VEGF(R)	vascular endothelial growth factor (receptor)
WT	vad típus (wild type)

Bevezetés

A colorectalis carcinoma (CRC) Magyarországon és világszerte is az egyik leggyakoribb malignus betegség, habár a megbetegedések nagy része megelőzhető lenne életviteli változtatásokkal és a szűrővizsgálatokon való rendszeres részvétellel. A magyarországi rákregiszter adatai alapján 2017-ben összesen több, mint 10 500 új esetet: 5917 férfit és 4732 nőt regisztráltak CRC-vel *(1. ábra)*.[1] Hazánkban világviszonylatban is „élenjáró" a CRC-s páciensek halálozása.[2]



1. ábra. A 2008-2017 évi colorectalis carcinomák nem- és diagnózis szerinti megoszlása.[1] Diagnózisok kódja: C18 – A vastagbél rosszindulatú daganata, C19 – A sigmabél-végbél határ rosszindulatú daganata, C20 – A végbél rosszindulatú daganata

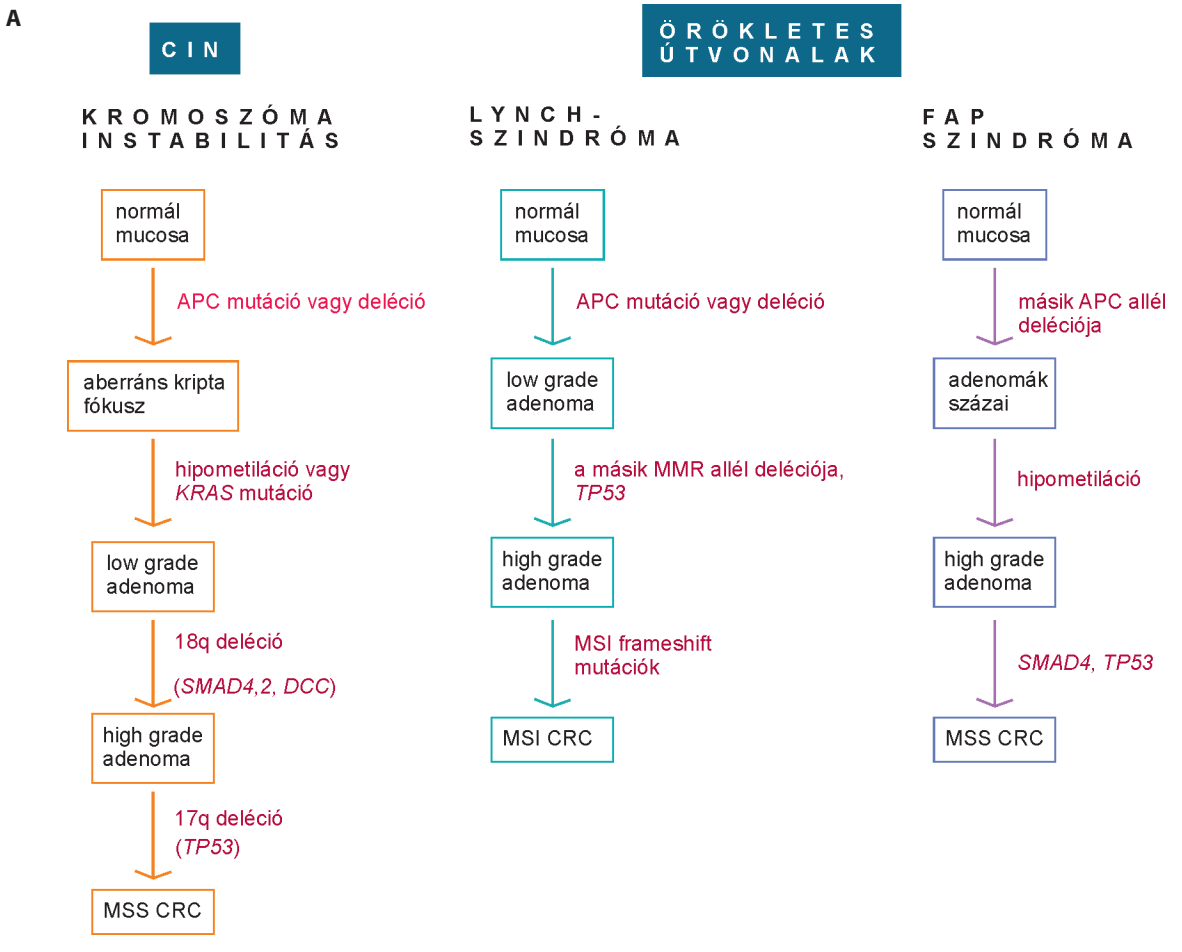
A molekuláris biológia és bioinformatika fejlődésének köszönhetően egyre többet tudunk meg a CRC meglehetősen összetett molekuláris hátteréről. A precíziós terápia a jelenlegi irányelvek alapján az előrehaladott betegségben szenvedő páciensek *ultimum refugiuma*. Habár számos ígéretesnek tűnő célpontot azonosítottak eddig, ezek nem mindegyike váltotta be a hozzájuk fűzött reményeket, és a hatékony precíziós terápiák esetén sem mindig prediktálható a kezelés sikere.

Összefoglalónkban áttekintjük a jelenleg klinikai használatban lévő célzott terápiás szereket, a klinikai döntéshozatalhoz szükséges molekuláris eltéréseket és diagnosztikájukat, valamint az újabb kihívásokat és távlatokat.

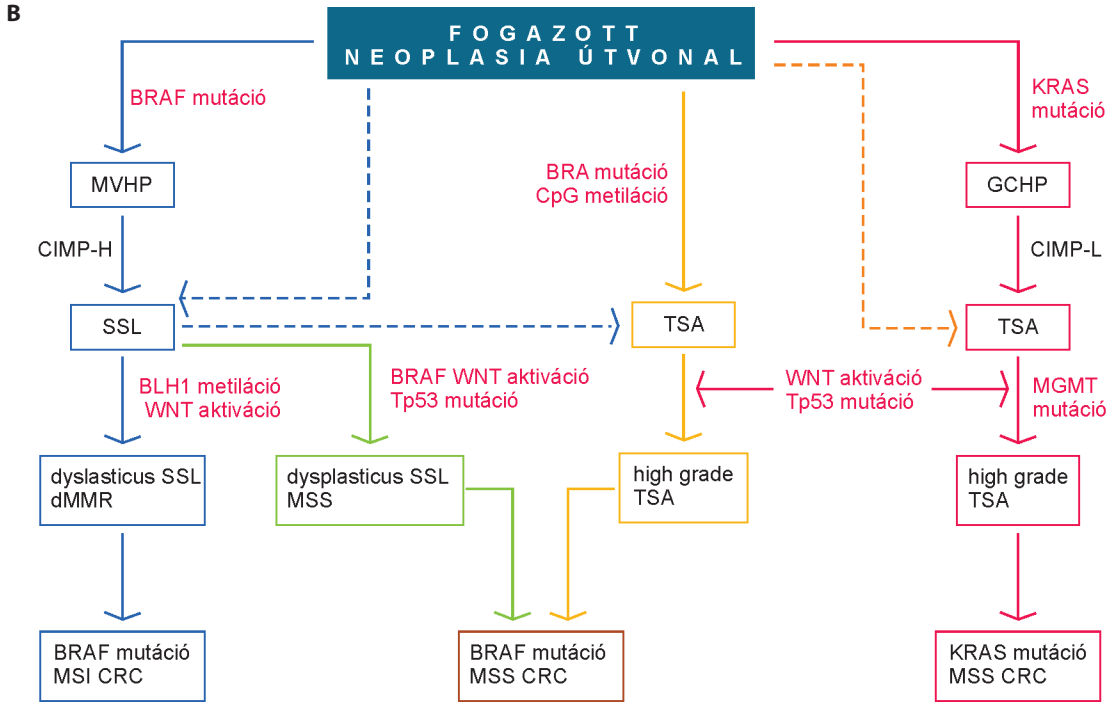
A CRC-k molekuláris patogenezise

A CRC-k döntő többsége sporadikus, csupán 5%-uk hátterében áll ismert rákszindróma. Az esetek 65–80%-ában kromoszomális instabilitás (chromosomal instability – CIN) talaján jönnek létre, melyre számbeli illetve strukturális kromoszómaaberrációk jellemzők.[3,4] A genetikai elváltozások a sejtek proliferációját és túlélését szabályzó útvonalakat is érintik, például a WNT/β-katenin, TGFβ-SMAD4, valamint MAPK és PIK3CA jelutakat.[3] A CRC karcinogenezisnek ez a módja jellemzően 15–20 évig tart *(2. ábra, A)*.[4]

A CRC-k nagyjából 30%-a az ún. CpG szigetek hipermetilációja (CpG Island Methylator Phenotype – CIMP) révén is kialakulhat, ez főleg az úgynevezett fogazott neoplasia útvonalra jellemző *(2. ábra, B)*.[5]



2A ábra: A CRC-k létrejöttéhez vezető molekuláris útvonalak:
CIN (kromoszomális instabilitás) útvonal: a CIN útvonalra jellemző a mutációk és kromoszómaaberrációk halmozódása, azonban ezek mellett epigenetikai módosulások is, mint például a hipometiláció is gyakori. Ez az ún. adenoma-carcinoma szekvencia, melyet szövettanilag leginkább a villózus vagy tubulovillózus adenomák jellemeznek.[4,5]
Örökletes útvonalak: A Lynch-szindróma az összes CRC-k 3%-áért felelős. Valamely MMR gén (ez leggyakrabban MSH2) csíravonalbeli mutációja következtében egyre több genetikai hiba keletkezik, ami eleinte adenomák, majd CRC kialakulásához vezet.[9] A FAP (familiáris adenomatosis coli) szindrómában az APC csíravonalbeli mutációja végett akár több száz adenoma is létrejöhet, melyek aztán a szokásos adenoma-carcinoma szekvencián át malignizálódnak.[50]



2B ábra: A CRC-k létrejöttéhez vezető molekuláris útvonalak.
A fogazott neoplasia útvonal: Az útvonalnak a KRAS és a BRAF mutációk egyaránt lehetnek driverei és gyakran a CIMP-nek is jelentős szerepe van a tumorok malignizálódásában. A BRAF mutáció talaján mikrovezikuláris hiperplasztikus polyp (MVHP), majd szesszilis fogazott léziók (SSL) jönnek létre. Ezek többnyire a MLH1 hipermetilációja révén, mikroszatellita instabil CRC-kké alakulnak, melyek jobb prognózisúak. Az SSL-ek 25%-a WNT aktiváció és TP53 mutáció révén malignizálódik, ezek MSS, ám rossz prognózisú CRC-k lesznek. A KRAS mutációk talaján kehelysejtes hiperplasztikus polipok (GCHP) jönnek létre, melyek tradícionális fogazott adenomákká (TSA) alakulnak. Ezek némely gén, pl. MGMT hypermetilációja révén malginizálódnak.[50]

A CpG szigetek kb. 200–500 bázispár hosszú, citozin-guanin ismétlődéseket tartalmazó, általában promoter régiók előtt található szekvenciák. Ezek hipermetilációja a promotert követő gént epigenetikailag elcsendesíti, így az nem expresszálódik.[6] CIMP esetén számos gén lehet érintett, de az esetek kb. felében a mismatch repair rendszer (MMR) kulcsfehérjéi az elcsendesítést elszenvedő alanyok *(3/B ábra)*.[5]

Az MMR rendszer

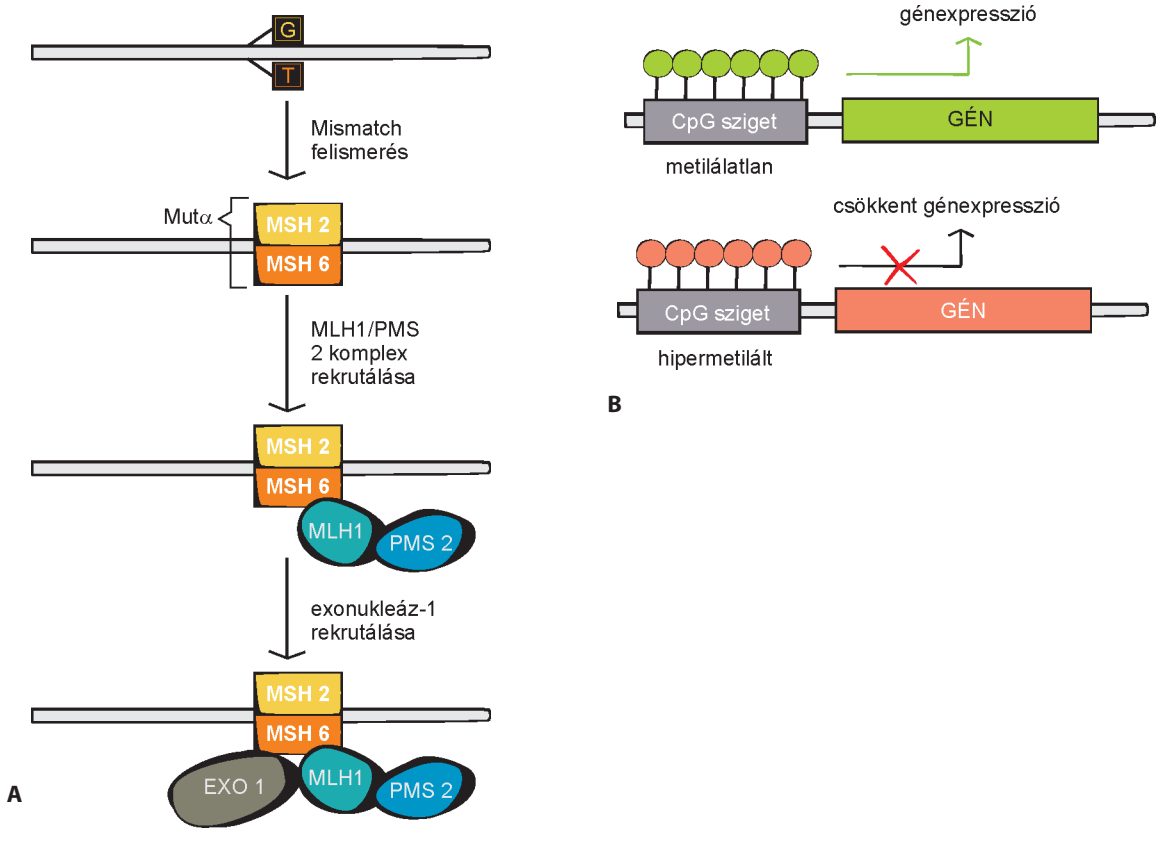
A MSH2 a MSH6-tal a MutSa, a MSH3-mal a MutSβ; valamint a MLH1 a PMS2-vel a MutLα, a PMS1-gyel a MutLb heterodimer komplexeket alkotják. A MutS komplexek felismerik a mismatch bázisokat és kisebb deléciókat/inzerciókat, majd a MutL komplexeket rekrutálják, és azok a mismatch bázisok incízióját végzik el. Ezt követi az EXO1 exonukleáz rekrutálása, mely eltávolítja a hibás szakaszt, végül a polimeráz-δ végzi el a javítást újraszintézissel *(3/A ábra)*.[7] Megfelelő partnereik hiányában az MSH6 és PMS2 fehérjék instabilak, hamar lebomlanak, míg az MSH2 és MLH1 fehérjék inaktív vagy hiányzó partner esetén nem minden esetben degradálódnak.[8, 9] A CRC-k kb. 15%-ra jellemző az MMR fehérjék hibás működése, ezeket nevezzük mikroszatellita instabil (MSI) tumoroknak.[8]

Az MMR deficiencia (dMMR) 12%-ban sporadikusan, a CIMP-útvonalon, leggyakrabban az *MLH1* hipermetilációja révén alakul ki.[10] A CRC-k 3–4%-ban az MSI tumorok az *MMR* gének csírasejtes mutációi, az autoszomális domináns öröklésmenetű rákszindróma, a Lynch-szindróma (LS) talaján alakulnak ki, melyben leggyakrabban a *MSH2* és a *MLH1* gének érintettek,[8] illetve lehet az *EPCAM* gén is, melynek delációja idővel az *MSH2* promoter inaktivációjához vezet.[11]

A mikroszatellita instabilitás diagnosztikája és klinikai relevanciája

dMMR/MSI diagnosztika

Az MMR rendszer vizsgálata történhet fehérjeszinten (immunhisztokémia – IHC), génszinten (szekve-



3. ábra. A colorectalis carcinomák patogenezisében szerepet játszó mechanizmusok. A: A mismatch repair rendszer: a MutSα (MSH2 és MSH6) és MutSβ (MSH2 és MSH3) heterodimerek funkciója a replikációs hibák detektálása, majd a MLH1/PMS2 alkotta komplexet rekrutálják. Ez utóbbi feladata az érintett DNS szakasz degradációját és reszintetizációját végző enzimek rekrutálása.[7] B: A CpG szigetek hipermetilációja a génexpresszió csökkenéséhez vezethet. Ezt a folyamatot nevezzük „epigenetikai elcsendesítés"-nek.[5]

nálás, újgenerációs szekvenálás – next generation sequencing – NGS), illetve funkcionális szinten (polimerase chain reaction – restriction fragment length polymorphism – PCR-RFLP alapú vizsgálat).[8] A rutinban elterjedt 2 kiemelt (MSH6, PMS2) vagy a 4 legfontosabb MMR fehérje (MSH6, PMS2, MSH2 és MLH1) IHC vizsgálata. A magi festődés kiesése valószínűsíti az érintett fehérjét, illetve gént, és bizonyos mintázatok felvethetik LS esélyét *(1. táblázat)*.[8] A módszer előnye a gyorsaság és költséghatékonyság, azonban rit-

1. táblázat. A mismatch repair státusz immunhisztokémiai diagnosztikája és kiértékelése[8]

MLH1	PMS2	MSH2	MSH6	KIÉRTÉKELÉS
+	+	+	+	Intakt MMR rendszer ▸ ritkán előfordulhat más gének csíravonal mutációja
-	-	+	+	dMMR, valószínűleg sporadikus ▸ *MLH1* hipermetiláció, ha sporadikus ▸ *MLH1* csíravonalbeli mutáció, ha LS
+	+	-	-	dMMR, valószínűleg LS ▸ Általában *MSH2* csíravonalbeli mutáció
+	-	+	+	dMMR, valószínűleg LS ▸ Általában *PMS2* csíravonalbeli mutáció
+	+	+	-	dMMR, valószínűleg LS ▸ Általában *MSH6* csíravonalbeli mutációja

Rövidítések: dMMR: diszfunkcionális mismatch repair rendszer, LS: Lynch-szindróma

kán előfordulhatnak olyan missense mutációk, amelyek esetén a fehérje expressziója változatlan, csupán a funkciója csökkent, ami IHC álpozitivitáshoz vezet.[8] Az IHC technikából eredendően nem ritkák a műtermékek, és előfordulhat heterogén festődés, így a kiértékelés esetenként nehézkes lehet.[9]

A diagnosztikában szintén használt PCR-RFLP alapú teszt közvetlenül a MMR rendszer működését vizsgálja, így a hibás géneket/fehérjét ezzel nem lehet pontosan meghatározni. A mikroszatelliták a genomban található, rövid (1-6 bázispár hosszú), repetitív nukleotid szekvenciák, melyekben az ismétlődések miatt a DNS-replikáció során nagy a hibalehetőség. Deficiens MMR esetén az ismétlődések száma megváltozik és méretük variábilis, instabil lesz, innen ered az MSI elnevezés is. Habár a genomban több repetitív szekvencia található, a mikroszatelliták különösen érzékeny markerei a dMMR-nek. A National Cancer Institue ajánlása alapján az ún. Bethesda-panel a legelterjedtebb, mely 2 mononukleotidot *(BAT25, BAT 26)* és 3 dinukleotidot *(D2S123, D5S346, D17S250)* vizsgál. MSI-high (MSI-H) osztályba sorolandó a tumor, ha a legalább 2/5 marker instabil (más panelnél 30% felett). 1/5 (vagy 30%-nál kevesebb) marker instabilitása esetén MSI-low (MSI-L), 0/5 (vagy 0%) esetén pedig mikroszatellita-stabil (MSS) tumorról beszélhetünk. Az MSI-L és MSS tumorok klinikai viselkedésükben megegyeznek.[8]

Szekvenálással, NGS-sel is meg lehet határozni az MSI státuszt. Ez a módszer különösen olyan pácienseknél javasolt, akiknek metasztázis miatt egyébként is javallott a *RAS* panel és *BRAF* genotipizálás.[8]

Felmerülő LS kivizsgálásánál a National Institute for Health and Care Excellence ajánlása szerint első lépésben az MSI státusz vizsgálata javasolt. Ha IHC- vizsgálattal az MLH1 festődése aberráns vagy RFLP-vel MSI igazolódott, ezt *BRAF* mutáció, majd *MLH1* promoter hipermetiláció vizsgálata kell kövesse. A *BRAF* V600E mutáció túlnyomórészt kizárja LS lehetőségét *(2. táblázat)*. Ha adott eset *BRAF* vad típusú (WT) és az *MLH1* promoter nem hipermetilált, akkor csírasejtes DNS genetikai teszt szükséges a LS kimondásához. Ha IHC-vizsgálattal az MSH2, MSH6 vagy PMS2 festődése aberráns, szintén genetikai teszt szükséges.[12]

Az MSI CRC-k az ún. hipermutált fenotípusba tartoznak, mert a frameshift mutációknak köszönhetően nagyszámú immunogén neoantigén keletkezik, ami

2. táblázat: Molekuláris diagnosztika az ASCO és ASCP ajánlása (2017) alapján, kiegészítve az NCCN ajánlásával[27,30]

AJÁNLÁS	AJÁNLÁS ERŐSSÉGE
1. Azon CRC páciensek, akiknél felmerül anti-EGFR terápia, *RAS* panel vizsgálata szükséges. Az alábbi mutációkra kell kiterjedjen a vizsgálat: *KRAS* és *NRAS* 2-es exon 12-es és 13-as kodon, 3-as exon 59-es és 61-es kodon, 4-es exon 117-es és 146-os kodon („kiterjesztett" *RAS* panel).	Ajánlott
2a. CRC pácienseknél prognosztikai célból szükséges a tumorszövet *BRAF* p. V600 [*BRAF* c.1799 (p.V600)] mutáció vizsgálata.	Ajánlott
2b. MLH1 funkcióvesztő, MMR deficiens tumorok esetén *BRAF* p.V600 mutáció vizsgálata szükséges Lynch szindróma rizikójának megítélésére. *BRAF* mutáció jelenléte sporadikus tumorra utal, azonban nem zárja ki LS lehetőségét.	Ajánlott
3. MMR státuszt meghatározó vizsgálatok szükségesek lehetnek prognosztikai célból és/vagy magas LS-rizikó esetén.	Ajánlott
4. Nincs megfelelő bizonyíték *BRAF* mutáció anti-EGFR terápia esetén prediktív biomarkereként való használatára. (NCCN, 2020: *BRAF* státusz valószínűleg jó predktív marker anti-EGFR terápiában)	Nem ajánlott
5. Nincs megfelelő bizonyíték *PIK3CA* mutáció vizsgálatának terápiás döntések meghozatalában, klinikai vizsgálatok kivételével. Megjegyzés: Posztoperatív aszpirin szedése javíthatja a túlélési paramétereket *PIK3CA* mutáns CRC páciensekben.	Nem ajánlott
6. Nincs megfelelő bizonyíték PTEN státusz vizsgálatának (expressziót IHC-val vagy deléciót FISH-sel) terápiás döntések meghozatalában, klinikai vizsgálatok kivételével.	Nem ajánlott
7. *RAS*/*BRAF* WT mCRC pácienseknél *HER2* vizsgálata ajánlott, és klinikai vizsgálatba való beválogatásuk javasolt.	Ajánlott (NCCN)
8. Amennyiben elérhető és megfelelő minőségben áll rendelkezésre, a metasztatikus vagy recidív CRC szövet javasolt a terápia prediktív biomarkereinek vizsgálatára. Ezek hiányában a primer tumor szövet elfogadható alternatíva lehet, és használata szükséges.	Szakértői konszenzuson alapuló vélemény

Rövidítések: CRC: colorectalis carcinoma, MMR: mismatch repair rendszer, LS: Lynch-szindróma, IHC: immunhisztokémia, FISH: fluoreszcens in situ hibridizáció

magas tumor mutációs terhelésként (tumor mutation burden – TMB) észlelhető. Fentiek következménye a tumor ellen irányuló élénk immunológiai válasz, ami nagyszámú tumor infiltráló lymphocyta (TIL) vagy peritumorális lymphocyta (PTL) megjelenéséhez vezet.[9, 13]

Terápiás lehetőségek

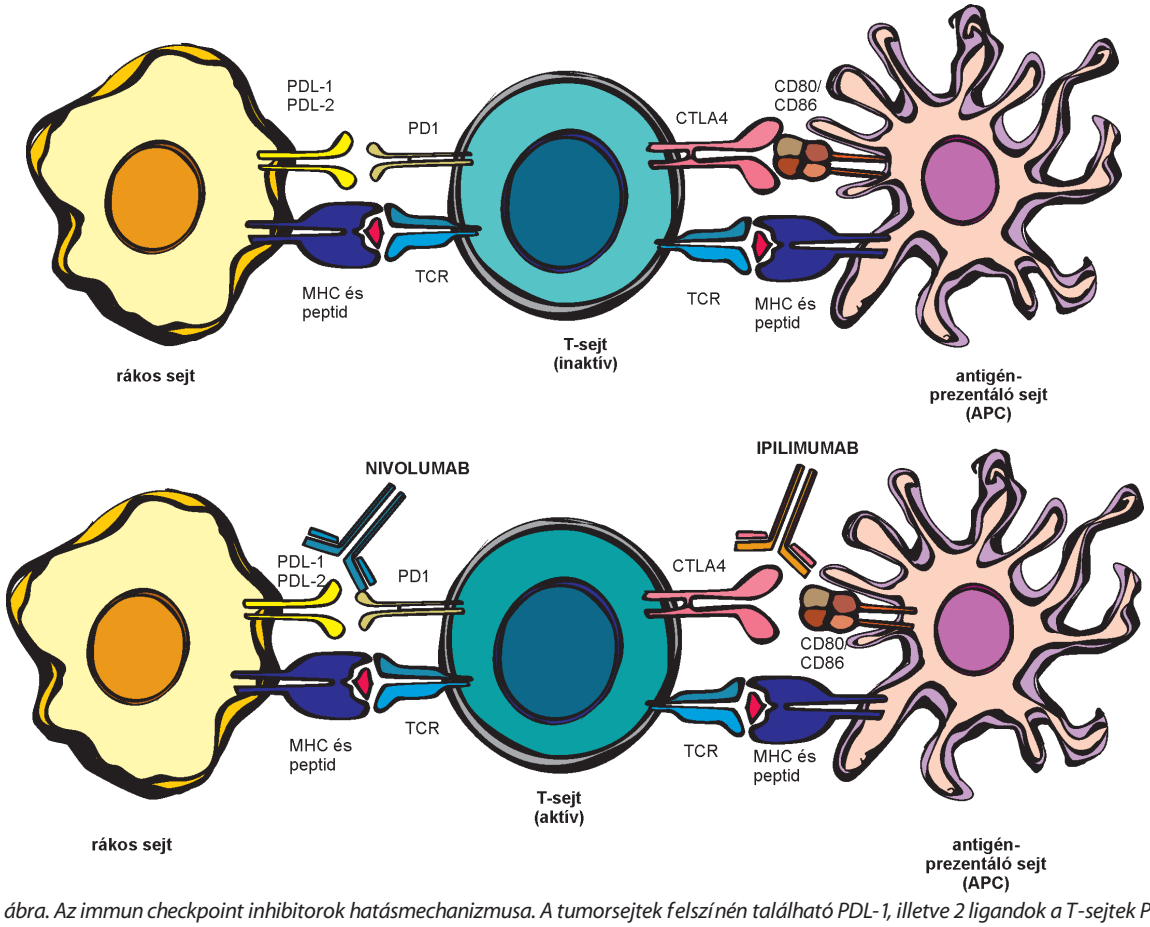
A MSI státusz prediktív és prognosztikai információt is hordoz. Az áttét nélküli MSI CRC-k korai stádiumban ab ovo jobb prognózissal bírnak, azonban a hagyományos, 5-FU alapú terápiára kevéssé reagálnak, ezért a terápia kialakításánál érdemes a stádium mellett a MSI-státuszt is figyelembe venni.[14] Ugyanakkor áttétképzés esetén a MSI mCRC-k túlélési esélyei jelentősen romlanak.[15] Ennek oka vélhetően az MSI tumorok és T-effektor sejtek ún. immun checkpoint overexpressziója (ICO, pl. CTLA4, PD1, PD-L1, IDO stb.), mely blokkolja a lobsejtek tumorellenes hatását.[16]

Citotoxikus T lymphocyta-asszociált antigén 4 (CTLA-4)

Fiziológiás körülmények között, egy idegen antigén felismerése esetén az antigénprezentáló sejtek (APC) felszínén található CD 80/86 kötődik a T-sejtek felszínén elhelyezkedő CD28 kostimulátorhoz. Ez aktiválja a T-sejtek antigén receptorait és így serkentik a szervezet immunválaszát. Amint sikerült az antigént eliminálni, a CTLA4 ko-inhibitor aktiválódik és köt a CD80/86-hoz, így gátolja a T-sejt-aktivációt, és antigén tolerancia jön létre. Ez egy homeosztatikus, optimális immunválaszt létrehozó folyamat, azonban számos tumortípusban megfigyelhető a T-sejtek CTLA4 overexpressziója, ami jelentősen csökkenti tumorellenes aktivitásukat *(4. ábra)*.

Programmed death 1 (PD-1) receptor és ligandja (PD-L1)

Fiziológiás körülmények között a PD1/PD-L1 interakció szerepe szintén a T-effektor sejtek erős inhibíció-



4. ábra. Az immun checkpoint inhibitorok hatásmechanizmusa. A tumorsejtek felszínén található PDL-1, illetve 2 ligandok a T-sejtek PD-1 receptorához kapcsolódnak az MHC – T-sejt receptor interakció során, mint gátló co-stimulátorok és így gátolják a T-sejt funkciókat. Ezt gátolja a PDL-1 inhibitor nivolumab. Az antigénprezentáló sejtek felszínén található CD80/86 és a T-sejtek felszíni CTLA-4 kapcsolódása az MHC – T-sejt receptor interakció során hasonlóképp gátolja a T-sejt-funkciókat, mint a PDL-1 – PD-1 interakció. Ezt a gátlást gátolja a CTLA4 inhibitor ipilimumab.[17]

ja, ami alapvető az autoimmunitás és súlyos gyulladásos reakciók megelőzésében.[17] Tumoros sejtek felszínén is megfigyelhető a PDL-1 overexpresszió, mely a T-sejtek felszínén lévő PD1-hez kötve gátolja a T-sejtek aktivációját, antigéntolerancia alakul ki. és így a tumorsejteket ignorálja az immunrendszer *(4. ábra)*.[17]

Az immun checkpoint inhibitorok (ICI) a fenti immunszuppresszív hatású mechanizmust hivatottak gátolni és ezzel a tumorellenes immunválaszt újra aktiválni.[18] Az ICI-k elsőként metasztatikus melanomában, majd azóta már számos más ráktípusban mutattak ígéretes eredményeket.[17] CRC-ben többnyire MSI tumorokban voltak hatásosak.[18] Az MSI-státuszon felül a NGS által meghatározott TMB a legkiválóbb prediktív marker, de költséges vizsgálata gátolja széleskörű elterjedését. Másfelől a tumorban és mikrokörnyezetében észlelhető PD-L1-expresszió is hasznos prediktív marker lehet.[8, 19]

Az FDA eddig 3 ICI-t hagyott jóvá igazoltan MSI mCRC (illetve egyéb MSI daganatok, ún. szövet-agnosztikus) kezelésére, elsősorban másodvonalbeli szerként.[18] A PD1-inhibitor **pembrolizumab**ot és **nivolumab**ot 2017-ben,[20, 21] illetve 2018-ban a CTLA-4-hez specifikusan kötődő **ipilimumab**ot, **nivolumab**bal kombinációban *(3. táblázat, 4. ábra)*.[17] A pembrolizumabot 2020 nyarán az FDA és 2021 januárjában az EMA is a KEYNOTE-177 vizsgálat alapján MSI mCRC elsővonalbeli kezelésére is engedélyezte, ugyanis a standard elsővonalbeli kemoterápiával összehasonlítva jobb progressziómentes túlélést lehetett elérni.[22-24]

3. táblázat. A metasztatikus colorectalis carcinomák esetén alkalmazott célzott terápiás szerek. Az összes evidencia 2A szintű, tehát jó minőségű, kontrollált vizsgálatok, illetve homogén utánkövetéses vizsgálatok igazolták hatékonyságukat. Az EMA és FDA engedély éve, illetve a trial, mely alapján elfogadásra került az adott szer, mind metasztatikus CRC-re érvényesek[17,23,25-28]

TERÁPIÁS SZER	CÉLPONT	EMA (FDA) ENGEDÉLY ÉVE	TRIAL	KRITÉRIUM
Cetuximab	Anti-EGFR mAB	2004 (2004)	CRYSTAL, OPUS	*KRAS*/*NRAS*/*BRAF* WT és csak baloldali tumor
Panitumumab	Anti-EGFR mAB	2007 (2006)	20020408	*KRAS*/*NRAS*/*BRAF* WT és csak baloldali tumor
Encorafenib (dabrafenib, trametinib) (+ cetuximab vagy panitumumab, + esetenként binimetinib)	Kis molekulájú kináz inhibitor (anti-BRAF) binimetinib: MEK1/2-inhibitor	2020 (2020)	BEACON	*BRAF*V600E mutáció
Bevacizumab	Anti-VEGFA mAB	2005 (2004)		
Ziv-aflibercept	Anti-VEGF-A, VEGF-B, PIGF fúziós protein	2013 (2011)	VELOUR	
Ramucirumab	anti-VEGFR2 mAB	2015 (2015)	RAISE	
Regorafenib	Multikináz inhibitor (VEGFR1-3, FGFR, PDGFR stb.)	2013 (2012)	CORRECT	
Trastuzumab és pertuzumab/ lapatinib	Anti-HER2 antitestek és duális tirozin-kináz-inhibitor (Her2 és EGFR)		HERACLES, TRIUMPH, MY PATHWAY	*HER2* amplifikáció és *RAS*, *BRAF* WT
Pembrolizumab	Anti-PD1 mAB	(2017 és 2020)	KEYNOTE-016 (másodvonal) KEYNOTE-177 (elsővonal)	MSI/dMMR tumor
Nivolumab +/- ipilimumab	Anti-PD1 mAB és anti-CTLA4 mAB	(2017, 2018)	Checkmate-142	MSI/dMMR tumor
Entrectinib, larotrectinib, selitrectinib, repotrectinib	TRK A, B, C kismolekulájú inhibitor	2020 (2016)	ALKA, STARTRK-1, STARTRK-2	NTRK fúzió*

*NTRK fúzió esetén szövet-agnosztikus indikációval.
Rövidítések: EMA: European Medicines Agency, FDA: U.S. Food and Drug Administration, mAB: monoclonal antibody (mononklonális antitest), MSI: mikroszatellita instabil, dMMR: mismatch repair deficiencia

Nem szigorúan vett MSI, de szintén hipermutált CRC-khez vezet a *POLD1*, *POLE* és *MYH* gének mutációja. Klinikai jelentőségük abban áll, hogy immunterápiára ezek a CRC-k is jól reagálhatnak.[8]

Az ErbB család és az EGFR útvonal

Az ErbB vagy humán epidermalis növekedési faktor receptor (HER) fehérjecsaládnak négy tagja van, melyek receptor tirozin-kinázok (RTK). Ligandjaik bekötődése esetén a receptorok homo-, illetve heterodimerizációja megy végbe, és foszforiláció révén aktiválódik a sejtnövekedésért és progresszióért felelős RAS-RAF-MAPK útvonal. Ezzel párhuzamosan a PI3K-AKT útvonal is aktiválódik, mely a sejtek túlélésért, motilitásáért és inváziójáért felelős *(5. ábra)*.[25] Az ErbB család tagjai közül klinikailag a legrelevánsabbak az EGFR (Her1), illetve a Her2 (Neu), mert ezek overexpressziója számos szolid tumorban jelen lehet.[26]

CRC-ben leggyakoribb (akár 80%-ban is) az **EGFR** overepressziója, melynek endogén aktiváló ligandjai az epithelialis növekedési faktor (EGF), TGFα, epiregulin, amfiregulin és betacellulin.[26] A sejtfelszíni EGFR-t több gyógyszerrel is támadhatjuk. A **cetuximab** az endogén ligandoknál 5–10-szer nagyobb affinitással kötődik az EGFR extracelluláris doménjéhez és kompetitíve gátolja az RTK aktivációját.[26] Ez gátolja a tumorsejtek növekedését, apoptózist indukál, valamint csökkenti a mátrix metalloproteinázok és VEGF termelését. Mindemellett antitest mediálta sejt-közvetített citotoxicitás (ADCC) révén az EGFR-t expresszáló sejtek közvetlen károsodása is végbemegy.[25] Az FDA 2004-ben engedélyezte.[26] A 2006-ban törzskönyvezett **panitumumab** hatásmechanizmusa hasonló *(3. táblázat)*.[26] Kezdetben az EGFR-ellenes terápiát EGFR IHC-pozitivitáshoz kötötték, de hamar kiderült, hogy ez nem jelzi jól előre a terápia hatékonyságát.[25, 27]

CRC-ben a **HER2** amplifikációja csupán néhány százalékban van jelen, ugyanakkor ígéretes célpont, hiszen a HER2 gátlása számos szolid tumorban (pl. HER2-pozitív emlőrák és gyomorrák) már bizonyítottan hatékony.[26] A HERACLES vizsgálat során **trastuzumab** és **lapatinib**, illetve trastuzumab és **pertuzumab** kombinációját alkalmazták *HER2* overexpresszáló, *KRAS* WT, mCRC páciensekben, és jó eredményeket értek el. Bizonyos *HER2* mutációk és a *BRAF* mutációja csökkentette a terápiára adott választ.[26] A TRIUMPH vizsgálat során trastuzumab és pertuzumab kombinációját alkalmazták *HER2* overexpresszáló mCRC páciensekben. A rezisztens esetekben ctDNS mintákban KR*AS, BRAF, PIK3CA,* illetve *HER2* akiváló mutációkat találtak.[28] Más vizsgálatok is alkalmazták a *HER2*-inhibitorokat, köztük a MOUNTAINEER (trastuzumab és tucatinib), a MyPathway (trastuzumab és pertuzumab), illetve a CETIRI (trastuzumab és pertuzumab vs. cetuximab és irinotecan) *(3. táblázat)*.[28] A PICCOLO és FOCUS vizsgálatok eredménye alapján a *HER2* amplifikációja anti-EGFR rezisztenciát okozhat, de ennek klinikai relevanciáját még meg kell erősíteni.[28] Az NCCN ajánlása alapján javasolt *HER2* amplifikáció/overexpresszió vizsgálata.[27]

Potenciális célpont lehet még az RTK aktivitással nem rendelkező *HER3*, mely a PI3K-AKT tengely fő aktivátora.[26]

A **RAS** onkogén fehérjék (KRAS, NRAS, HRAS) kis G-fehérje család tagjai, melyek az EGFR jelút első – és talán legfontosabb – downstream effektorai. Az egyik leggyakrabban mutált géncsalád emberi malignitásokban.[29] CRC-ben *KRAS* mutáció kb. 30–40%-ban fordul elő, *NRAS* 10–15%-ban, míg a HRAS igen ritka, 1% körüli. Mutációik leggyakrabban aktiváló jellegűek, ami az EGFR útvonal konstitutív aktivációját – és ezzel az anti-EGFR terápiára való rezisztenciát is – okozza.[29] A RAS mutáció rossz prognosztikai tényező.[26]

Az aktuális ASCO és ASCP ajánlás az ún. kiterjesztett *RAS*-panelt javasolja anti-EGFR terápia megkezdése előtt: a *KRAS* és *NRAS* gének bizonyos mutációi bizonyítottan rezisztenciát okoznak, így csak RAS WT tumorok esetén alkalmazható az anti-EGFR terápia *(2. táblázat)*.[30]

A **BRAF** az EGFR útvonal következő downstream effektora, CRC-ben 10–15%-ban van jelen a *BRAF* V600E mutációja, mely az EGFR jelút EGFR-től független konstitutív aktivációjához vezet és önmagában rossz prognosztikai marker.[26] Kemoterápiára kevéssé reagáló, biológiailag agresszív tumortípust jelez szokatlan metasztázisprofillal (inkább tüdő-, agy-, csont- és peritoneumáttétek a jellemzők, kevésbé a májáttétek). A *BRAF* V600E MSS tumorok túlélése kifejezetten rossz, míg a *BRAF* V600E MSI tumorokkal kapcsolatban az adatok ellentmondásosak: egyesek szerint a prognózis és az immunterápiára adott válasz is jobb MSI-ben, mások szerint nem befolyásolja a MSI-státusz a túlélést.[31] A *BRAF* V600E páciensek csupán 30%-a éri meg a második vonalbeli terápiát.[28]

A *BRAF* V600E gátlása melanoma malignumban igen sikeres volt, de meglepő módon CRC-ben nem érték el a kívánt hatást. Ennek oka feltehetőleg a tumorban kialakuló, a kezdeti foszfo-ERK-gátlást követő EGFR-mediált rapid ERK reaktiváció.[28] Ugyan önmagában a *BRAF* gátlása nem hatékony CRC-ben, de anti-

EGFR terápiával kombinálva ígéretes eredményeket értek el. A jelenlegi ajánlás *BRAF* V600E esetén másodvonalbeli terápiának **encorafenib**et (BRAF-inhibitor) és anti-EGFR terápiát javasol **binimetinib**bel vagy anélkül, illetve **dabrafenib**et, **trametinib**et és anti-EGFR terápiát *(3. táblázat, 5. ábra)*.[28] A BEACON vizsgálat eredményei alapján a triplet terápia a dupletnél jobb teljes túléléshez vezet.[32] További vizsgálatok jelenleg is kutatják, mely kombinációk járnak a legnagyobb klinikai haszonnal.[28]

A *BRAF* V600E CRC-k nem reagálnak jól az anti-EGFR kezelésre, de az önmagában nagyon agresszív fenotípus és a rossz prognózis megnehezíti a *BRAF* prediktív markerként való interpretálását.[25] Az ASCO/ASCP ajánlása szerint a *BRAF* mutáció analízise prognosztikai szempontból, illetve MSI tumorok esetén LS kizárására hasznos. Az NCCN 2020-as ajánlása szerint *BRAF* mutáció esetén önmagában anti-EGFR terápiára nem várható jó válasz, csupán BRAF-inhibitorral kombinációban.[27]

A *non-V600E BRAF* mutációk NGS adatok szerint a CRC-k 2%-ban lelhetők fel. Némelyikük *KRAS* mutációval szimultán fordul elő, azonban ezek nem befolyásolják a túlélést és az anti-EGFR szerekre adott klinikai választ (33).

Érdekes lehet még a **PTEN** szerepe, hiszen ez a fehérje az EGFR útvonal fontos inhibitora. Kiesése, mely gyakran epigenetikai vagy poszttranszkripciós eltérések miatt történik, rossz prognosztikai faktor. PTEN kiesésével megszűnik a PIK3CA útvonal gátlása, így nő az mTOR, majd a HIF1α aktivitása is.[34] Emiatt ideális lehetne anti-VEGF és mTOR-gátló terápia egyidejű alkalmazása, azonban erre jelenleg nincs meggyőző klinikai adat. Nem bizonyított az anti-EGFR terápiára okozott rezisztenciája sem *(2. táblázat)*. Problematikus a PTEN funkcióvesztés kiértékelése is: gyakran epigenetikai vagy poszttranszlációs módosulás, néha azonban genetikai eltérés okozza a PTEN funkcióvesztését, mely komplex diagnosztikát igényelne.[34]

PIK3CA mutáció analízisnek az ASCO/ASCP ajánlás szerint nincs helye a rutinban, maximum gyógyszervizsgálatok esetén érdemes elvégezni *(2. táblázat)*.[30] Felmerült, hogy a 9-es és 20-as exonon található, rossz prognózisú mutációk anti-EGFR rezisztenciához vezetnek, azonban erre meggyőző bizonyíték jelenleg nem áll rendelkezésünkre.[26, 31] Egyes adatok szerint *PIK3CA* mutáns CRC-ben a posztoperatív aszpirin szedése csökkenti a recidíva kialakulását.[30]

A tumor oldalisága is befolyással van a terápia eredményességére: a bal oldali tumoroknál eredményesebb a cetuximab terápia, mint a jobb oldaliaknál, így utóbbiaknál inkább anti-VEGF terápia alkalmazása javasolt *(3. táblázat)*.[31]

A VEGF útvonal

A VEGFR (vascular endothelial growth factor receptor) egy transzmembrán RTK család, melyek ligandjaik által aktiválva az angiogenezist serkentik. A VEGF/VEGFR útvonalat célzó, esetlegesen multikináz inihibitor hatású, illetve a ligandok receptoraikhoz való bekötését megakadályozó szerek gátolják a tumor vaszkularizációját és növekedését *(5. ábra)*. A rezisztenciát okozó eltérések kevéssé ismertek, illetve igazoltak.[35]

A FDA 2004-ben hagyta jóvá a **bevacizumab**ot, amely a keringő VEGF-A szelektív megkötése révén gátolja az angiogén kaszkádot *(3. táblázat)*.[26] Önmagában nem aktív szer, ezért citotoxikus terápiával kell kombinálni, ugyanakkor széles körben alkalmazott, népszerű modalitás.[18] A terápia megszakítása, a preklinikai eredményekkel ellentétben, nem vezet gyors tumornövekedéshez a legújabb metaanalízisek és klinikai tanulmányok alapján.[27]

A **ziv-aflibercept** egy fúziós protein, mely a VEGF-A, VEGF-B, PIGF (placentáris növekedési faktor) megkötésével gátolja a tumor-angiogenezist. Az FDA 2011-ben engedélyezte alkalmazását *(3. táblázat)*.[26]

A **ramucirumab** a VEGFR-2 direkt antagonistája, annak extracelluláris doménjéhez kötve gátolja az endogén ligandok (VEGF-A, -C, -D) kötődését. A FDA 2015-ben engedélyezte alkalmazását (RAISE study) *(3. táblázat)*. A RAISE vizsgálat során történt farmakogenomikai analízis egy páciensnél azonosította a VEGFR-2-t kódoló *KDR* gén rezisztenciához vezető mutációját.[26]

A **regorafenib** egy széles spektrumú multikináz inhibitor, mely az alábbiakat célozza: VEGFR-1, -2, -3, FGFR, PDGFR, RAF-1, BRAF, diszkoidin domén receptor-2.[26] Az FDA 2012-ben engedélyezte alkalmazását. Igen komoly toxicitású szer.[28]

NTRK (neurotrofin-tropomiozin-receptor-kináz)

A TRK (tropomiozin-recptor-kináz) család tagjai RTK-k, fiziológiás szerepük a neuronok fejlődésében és differenciációjában van. A TRKA-nak endogén ligandja a neutrotrophin nerve growth factor (NGF), a TRKB-nek a brain-derived neurotrophic factor (BDNF) és neurotrofin-4, a TRKC-nek pedig a neurotrofin-3.

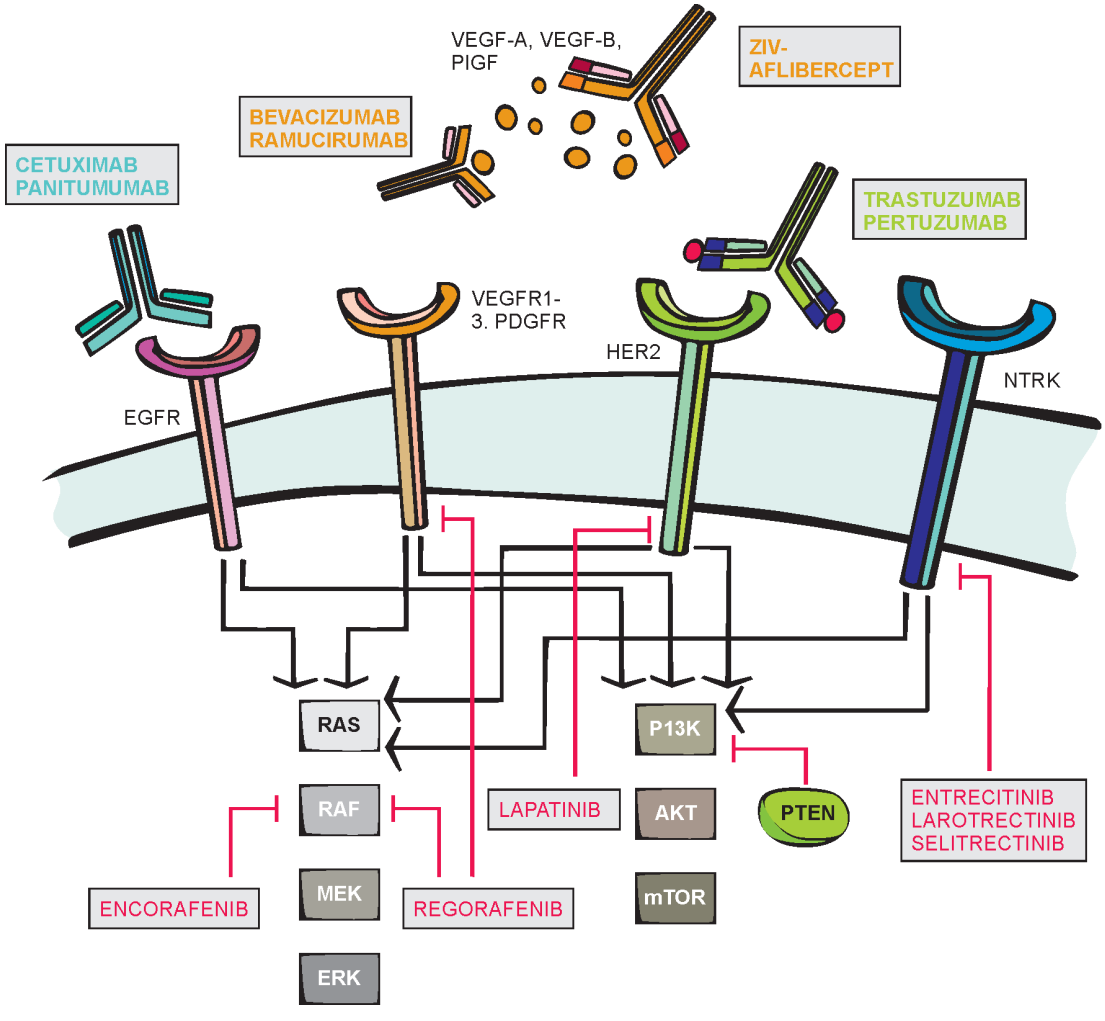
A TRK-aktiváció eredményeképp a MAPK, PIK3CA és protein-kináz-C (PKC) útvonalak is aktiválódnak *(5. ábra)*.[36]

A TRK-kat kódoló *NTRK1, -2* és *-3* gének fúziója a leggyakoribb módja a TRK onkogén aktivációjának. Leggyakrabban olyan fúziós partner génekkel alakulnak ki intra- vagy interkromoszómális eltérések, melyek oligomerizációs doméneket kódolnak, és így kimérа fúziós termékek jönnek létre, ami a TRK fő jelátviteli kaszkádjainak konstitutív aktivációjához vezet.[36] A *NTRK* fúzió a CRC-k mindössze 0,4%-ban található, azonban hatékonyan támadható. Az FDA, mint „szövet-agnosztikus" terápia, 2016-ban hagyta jóvá a TRK-inhibitorokat *(3. táblázat)*. Az első generációs TRK-inhibitorok a TRK-A, -B és -C-t gátló **larotrectinib** és **entrectinib**. A multikináz inhibitor entrectinib ALK- és ROS-ellenes hatással is bír. A larotrectinib a preferáltabb szer a toxikusabb entrectinib helyett. A leggyakoribb rezisztenciamechanizmus a TRK-kódoló gének mutációja, ezek áthidalására tervezték meg a **selitrectinib**et. A **repotrectinib** nem csupán *NTRK*, hanem *ALK* vagy *ROS* mutációk okozta rezisztencia esetén is hatékony.[28]

Kihívások és új perspektívák a személyre szabott terápiában: heterogenitás és a konszenzus molekuláris altípusok (CMS)

Preanalitikai hibalehetőségek

A molekuláris diagnosztika szenzitív módszereivel kis mennyiségű eltérést is ki lehet mutatni, de ennek si-



5. ábra. Célzott terápiás lehetőségek colorectalis carcinomában. A terápiás lehetőségek között a sejtfelszíni receptorok gátlása monoklonális antitestek (mAB – monoclonal antibodies) révén és NTRK fúzió esetén kismolekulájú NTRK-inhibitorokkal lehetséges. Némely esetben a főbb jelutak downstream effektorainak gátlása is lehetséges, mint például a BRAF gátlása kis molekulasúlyú inhibitorraival (pl. encorafenib) vagy a multikináz hatású regorafenib, mely a VEGF receptorokon kívül gátolja többek között a BRAF, RAF-1 és RET aktivitását is.[26,36]

kerét a preanalitika erősen befolyásolja. A megfelelő mintavétel és fixálás, illetve az elegendő számú tumorsejtet tartalmazó minta hiánya a szenzitivitás rovására mehet. Az ideális minta tumorsejtekben gazdag, nincs benne necrosis, lobsejtes infiltrátum, mucin, illetve dezmoplasztikus reakció, és a stromalis, illetve egyéb sejtek aránya tumorsejtekhez képest igen csekély. Javasolt továbbá rendszeresen validált laborok és módszerek használata is.[37]

Rezisztencia és intratumorális heterogenitás

A rezisztencia kérdése CRC-ben elsősorban anti-EGFR terápia esetén merül fel. Primer vagy intrinsic rezisztenciáról beszélünk, amennyiben a rezisztenciát okozó genetikai eltérés már a kezelés megkezdésekor jelen van, és a terápiára ezért nem reagál a páciens.[37] A terápia alatt vagy annak hatására alakul ki a szekunder, vagy a szerzett rezisztencia, amikor az addig hatékony terápiára a daganat refrakterré válik.[37]

Egy tumort több, genetikailag egészen különböző populáció, (szub)klón alkothat, ez az intratumorális heterogenitás (ITH).[38, 39] Ezek a klónok maguktól is, de a környezeti (pl. kemoterápia) és instrinsic (pl. tumor-mikrokörnyezet) behatásokra szelektálódnak, és ily módon az adott terápiára rezisztens klón képes túlélni és elszaporodni. Ez klinikailag progresszióban nyilvánul meg, és általában terápiaváltást indikál. Nem meglepő, hogy a jelentős ITH általában rosszabb prognózissal társul.[39] A tumor biológiai viselkedését alapvetően a domináns klón határozza meg, a kisebb populációk azonban összejátszhatnak a metasztázisképzésben, az immunogenitás csökkentésében, sőt, metasztázisokon belül is létrejöhetnek új klónok, melyek további metasztázisok kialakításáért felelősek.[38, 39]

A kezdetben esetlegesen igen kis számban jelen lévő rezisztens klónokat nem mindig lehet a standard diagnosztikus módszerekkel kimutatni, ehhez gyakran nagyon szenzitív vizsgálat szükséges (pl. NGS, ddPCR).[40] Állandó kérdés, hogy egy rezisztens klón adott tumoron belül való jelenléte hány százaléktól tekinthető klinikailag relevánsnak. A CRYSTAL vizsgálat retrospektív analízise szerint azok a *RAS*mut CRC-k, ahol a MAF 5% alatti volt, *RAS* WT-ként viselkedtek és cetuximab kezelés hatására szignifikánsan javult a túlélésük.[33] Egy közelmúltban publikált tanulmány részletesen feltárta több, klinikailag követett CRC metasztázisainak genomját, és nagyfokú heterogenitást igazolt nemcsak a tumorban, hanem a metasztázisokon belül és között is. Ezek nem mindig, de több ízben a terápiát is befolyásolhatják, vagyis az ITH klinikai implikációi még nem egyértelműek. Költségei miatt jelenleg ez nem lehet a rutinban elterjedt eljárás, de az ITH kérdése és klinikai relevanciája még sokáig a fókuszban lesz.[38]

A konszenzus molekuláris altípusok (CMS)

A tumorok biológiai viselkedését a genetikai eltéréseken túl transzkriptomikai változások, a tumor-mikrokörnyezet interakciói, a tumor anyagcseréje és immunogenitása is befolyásolja. Ilyen komplex megközelítést alkalmaztak, mikor a The Cancer Genome Atlas (TCGA) adatai, illetve többezer CRC-ből álló adatbázisok genetikai, epigenetikai és génexpressziós profiljának hálózatelemzésével meghatározták az ún. konszenzus molekuláris altípusokat (CMS – consensus molecular subtypes). Ez négy, eltérő biológiai viselkedésű és klinikai relevanciájú CRC-csoportot különít el *(4. táblázat)*.[15]

A CMS1 (immun) csoportba a CRC-k 14%-a, közel az összes MSI tumor tartozik. A tumorokat immunológiailag aktív infiltrátum jellemzi, és korai stádiumokban ennek a csoportnak a legjobb a túlélése. Azonban relapszust követően az egyik legrosszabb prognózisú alcsoport.[15, 41]

4. táblázat: A konszenzus molekuláris altípusok (CMS) jellemzői[15]

CMS1 – IMMUN	CMS2 – KANONIKUS	CMS3 – METABOLIKUS	CMS4 –MESENCHYMALIS
14%	37%	13%	23%
MSI, hypermutációk, *BRAF* mutációk	WNT és MYC aktiváció	*KRAS* mutációk	kromoszómális eltérések
Immun infiltrátum	Epithelialis megjelenés	Metabolikus dereguláció	Stromális infiltráció, TGFβ aktiváció, angiogenezis
Kedvező prognózis, kései stádiumban rossz prognózis	Alapvetően kedvező prognózis	Alapvetően kedvező prognózis	Rossz prognózis, agresszív fenotípus

Rövidítések: CMS: Consensus Molecular Subtypes (konszenzus molekuláris altípusok), MSI: mikroszatellita instabilitás, TGFβ: tumor growth factor beta

A CMS2 (kanonikus) csoport a CRC-k 37%-át teszi ki, epithelialis differenciáció jellemző, kevés stromális sejttel és csekély immunsejtes infiltrátummal. A második legjobb túlélésű csoport, jól reagál a hagyományos kemoterápiára és anti-EGFR terápiára is.[15, 42, 43]

A CMS3 (metabolikus) csoportba a CRC-k 13%-a tartozik. A *KRAS* mutációk ebben a csoportban a leggyakoribbak, és igen jellegzetes a metabolikus profiljuk. Jellemző rájuk a Warburg-effektus, a fokozott glutaminolízis, valamint a módosult lipidanyagcsere is. Megjelenésüket és prognózisukat tekintve a CMS2 tumorokhoz hasonlítanak, így többen nem is különítik el egymástól a két csoportot.[44]

A CMS4 (mesenchymalis) alcsoport a legagresszívebb és legrosszabb prognózisú tumortípus. A CMS4 tumorokban gyakori az ún. epitheliomesenchymalis tranzíció (EMT). Az EMT-re jellemző a tumorasszociált fibroblastok inváziója és a stroma dominanciája, a fokozott neoangiogenezis és a mesenchymalis jelleg.[15] Ezek a tumorok általában későbbi stádiumban kerülnek diagnózisra, és hagyományos kemoterápiára, illetve anti-EGFR terápiára is rezisztensek.[45]

A CMS klasszifikáció komplexebb képet ad a CRC-ről és viselkedésükről, de a klinikumban jelenleg még nem terjedt el. Ennek oka, hogy a diagnosztikája az igen költséges génexpressziós profil analízisen alapul. Ugyanakkor olcsóbb módszerek – például 5 antitest (CDX2, HTR2b, FRMD6, ZEB1, pancytokeratin) és MSI-vizsgálat alapján – is jól közelíthető a CMS-beosztás.[44] A kép vélhetően még tovább fog tisztulni és a felosztás előbb-utóbb a rutinba is bekerülhet.

Neminvazív biomarkerek

Széklet biomarkerek

A CRC-k és prekurzoraik nem csak okkult hemoglobin vizsgálatával (mint például FIT – fecal immunochemical test vagy gFOBT – guaiac fecal occult blood test) szűrhetők. A colon epithelsejtek folyamatosan sodródnak bele a colon lumenébe, így fekális génpanelek (stool DNA – sDNS panel) is alkalmasak lehetnek számos genetikai eltérés detektálására, esetleges szűrésre. Ezen elven alapul az FDA által 2014-ben jóváhagyott Cologuard, mely fekális genetikai (*KRAS* mutáció) és epigenetikai (*NDRG* és *BMP3* hipermetiláció) markereket detektál egy humán hemoglobin immunkémiai assay-vel kombinálva. A Cologuard szenzitívebb CRC és prekurzorok (beleértve a fogazott léziókat is) tekintetében, mint a FIT, azonban specificitásban alulmarad FIT-tel szemben. Ennek oka valószínűleg az, hogy az idősebb populációban bizonyos epigenetikai módosulások, például a DNS metilációja is, CRC-től függetlenül is gyakrabban mennek végbe.[46] A Cologuard önmagában nem elegendő, csupán felhívja a figyelmet a daganat kockázatára, ezért pozitivitás esetén vastagbéltükrözést kell végezni, mely bizonyos léziók esetén kuratív megoldás is lehet.[46, 47]

Plazmából kimutatható epigenetikai biomarkerek

A CRC-szűrés másik neminvazív alternatívája lehet a plazmából (folyékony biopsziával) kimutatható metilált szeptin-9 (SEPT9).[46] Ugyan rossz szenzitivitása miatt nem ajánlott szűrésre, az FDA 2016-ban mégis engedélyezte az ezen alapuló Epi proColon alkalmazását. A FIT-nél csupán tünetes populációban bizonyult pontosabbnak.[46]

A folyékony (likvid) biopszia és ctDNS szerepe CRC-ben

A tumorsejtekből DNS kerül a keringésbe apoptózis, nekrózis vagy szekréció révén. Ez a vérben keringő, ún. ctDNS (circulating tumor DNS), melyhez egyszerű vérvétellel tudunk hozzáférni. Ennek köszönhetően nehezen megközelíthető, sőt, ismeretlen lokalizációjú áttétről is kaphatunk információt. ctDNS-sel a primer és metasztatikus tumor genetikai eltérései is detektálhatók.[40] A ctDNS mutációs analízise lehet PCR vagy NGS alapú, jelenleg nincs egységes arany standard, ezért igen nehéz összevetni az eltérő tanulmányok eredményeit.[40]

Számos vizsgálat eredménye alapján a ctDNS jó relapszus-markernek tűnik: a képalkotó módszerekkel detektálható relapszust megelőzően már 5 hónappal pozitív lehet a ctDNS, illetve emelkedhet a szintje. A terápia modalitása – műtét, kemo-, illetve radioterápia – nem befolyásolta a ctDNS prognosztikus értékét. Több intervenciós vizsgálat (COBRA, CIRCULATE, IMPROVE-IT) is ctDNS alapján hoz terápiás döntéseket: a ctDNS pozitív páciensek intenzív kezelésben, míg a negatívak fokozott obszervációban részesülnek.[40]

A célzott kezelések monitorozására is kiválóan alkalmas a ctDNS. A konkordancia a plazma ctDNS és a tumorból származó minta között igen magas, akár 87% is lehet.[40] Utal adat arra, hogy a ctDNS prognosztikai és prediktív értékét tekintve érzékenyebb marker a tumor-DNS-nél: egy vizsgálatban a plazma *KRAS* és *BRAF* státusz erősen befolyásolta a progressziómentes túlélést, míg a tumoré nem.[40]

A ctDNS jól tükrözi az intra-, illetve intertumorális heterogenitást, mind térben és időben, ezért alkalmas a

klonális evolúció monitorozására is. A PROSPECT-C vizsgálatban a tumorból származó minta alapján a *KRAS* WT-nek diagnosztizált CRC-k 25%-a bizonyult a kezelés előtti ctDNS minták alapján *KRAS* mutánsnak. WES-sel pedig a páciensek 45%-nál találtak a *RAS* útvonalban rezisztenciát okozó eltéréseket.[40] Egyes adatok alapján a ctDNS-mintákban a *KRAS* mellett egyidejűleg más driver mutációk is előfordulhatnak minor klónokban, például *HRAS, NRAS, BRAF* mutációk, illetve *MET* vagy *ERBB2* amplifikációk. Vélhetőleg ezek későbbi túlsúlyba kerülése okozza az anti-EGFR terápiára való rezisztenciát.[33] A PROSPECT-C vizsgálatban végzett ctDNS vizsgálat szerint a rezisztenciát okozó klónok relatíve rövid (4,4 hónap) féléletidejűek, így potenciálisan visszaállhat az anti-EGFR terápiára való érzékenység és ezért a féléletidő kétszeresét kivárva, ún. rechallenge terápia javasolható. Ezt vizsgálta cetuximabbal a Cricket study.[33]

Egyéb biomarkerek – miRNS, lncRNS

A konvencionális biomarkerek mellett újabb, az epigenetikai szabályozásban szerepet játszó folyamatok és mechanizmusok kapnak szerepet a kutatásban, és idővel valószínűleg a diagnosztikában is. Ilyen potenciális biomakerek a mikroRNS-ek (miRNS vagy miR) és a hosszú, nemkódoló RNS-ek (long noncoding RNS – lncRNS).[48, 49] A miRNS-ek 21–23 nukleotid hosszú RNS szakaszok, melyek az mRNS-ek transzlációját gátolják és azok lebontását indukálják. Szerepet játszanak a CRC-k kialakulásában, illetve egyéb folyamatokban, mint proliferáció, invázió, tumorprogreszszió. A ctDNS-hez hasonlóan ez is jól kimutatható a plazmából, így likvidbiopsziás mintákkal akár a páciensek utánkövetésében és prognosztizálásában is szerepet játszhatnak. Számos esetben rosszabb prognózissal függ össze overexpresszió jük (például miR-17, -18a, -18b, -19a, -19b, -20a, -20b és 21), valamint alacsony expressziójuk rosszabb terápiás választ is előjelezhet neoadjuváns terápia esetén (miR143 és miR145).[48]

Az lncRNS-ek legalább 200 bázispárból álló RNS-ek, melyek a kromatin remodeling, a transzkripció és a posztranszlációs módosulások szintjén is befolyásolják a génexpessziót. Több folyamatban fontos szabályozók, például sejtnövekedésben és -proliferációban, rezisztenciában, illetve az invázióban és a mesechymalis fenotípus kialakításában is. Példa erre a rossz prognózist sejtető NEAT1, SNHG1 és SNHG6, melyek klinikai implikációi hasonlóak lehetnek a miR-ekhez.[49]

Összefoglalás

A CRC-k molekuláris háttere és ezért diagnosztikája és terápiája is igen komplex. Számos molekuláris célpontot azonosítottak eddig, de a paletta folyamatosan bővül a precíziós terápia terén. Jelenleg legnagyobb klinikai jelentőséggel a CRC-k MSI státusza (MMR fehérjék IHC vizsgálata, MSI PCR-RFLP vizsgálata) és az anti-EGFR terápiára való rezisztenciát okozó genetikai eltérések (*KRAS* és *NRAS* kiterjesztett panel, *BRAF* V600E) azonosítása bír. Szintén fontos a Lynch-szindrómás betegek megbízható kiszűrése. Egyelőre az alternatív szűrési lehetőségek (székletvér, széklet-DNS, Cologuard, SEPT9) nem váltották be teljesen a hozzájuk fűzött reményeket, de vélhetően ezen a területen lesz még fejlődés. Jelenleg még a kolonoszkópia az arany standard. A tumor heterogenitás CRC-k esetében magas, mely befolyással bír a terápiára is. A heterogenitás vizsgálatára és a terápia monitorozására is jó alternatíva a likvidbiopszia (ctDNS), mely remélhetőleg hamarosan elterjedtebb lesz a klinikumban.

A komplex molekuláris hátteret figyelembe vevő CMS-altípusok szerepe még nem teljesen tisztázott, azonban jó közelítéssel prognosztizálja az adott tumortípusokat és egyes célzott szerek prediktív markere is lehet.

Irodalom

1. István Kenessey MD, Éva Kiss, István Szatmári. Nemzeti Rákregiszter. 2020; Available from: http://stat.nrr.hu/.
2. OECD (2018), "Survival and mortality for colorectal cancer", in Health at a Glance: Europe 2018: State of Health in the EU Cycle, OECD Publishing, Paris, https://doi.org/10.1787/health_glance_eur-2018-43-en
3. Müller MF, Ibrahim AEK and Arends MJ. Molecular pathological classification of colorectal cancer. Virchows Archiv 2016; 469:125-34.
4. Fearon ER and Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. Cell 1990; 61:759-67.
5. Bettington M, Walker N, Clouston A, Brown I, Leggett B and Whitehall V. The serrated pathway to colorectal carcinoma: current concepts and challenges. Histopathology 2013; 62:367-86.
6. Murcia O, Juárez M, Hernández-Illán E, Egoavil C, Giner-Calabuig M, Rodríguez-Soler M, et al. Serrated colorectal cancer: Molecular classification, prognosis, and response to chemotherapy. 2016; 22:3516.
7. Graham V WJ, Putnam CD and Kolodner RD. DNA Mismatch Repair: Mechanisms and Cancer Genetics?. Oxford 2019; 530-8.
8. Nowak JA and Hornick JL. Molecular Evaluation of Colorectal Adenocarcinoma: Current Practice and Emerging Concepts. Surg Pathol Clin 2016; 9:427-39.

9. Evrard, Tachon, Randrian, Karayan T and Tougeron. Microsatellite Instability: Diagnosis, Heterogeneity, Discordance, and Clinical Impact in Colorectal Cancer. Cancers 2019; 11:1567.
10. De Palma F, D'Argenio V, Pol J, Kroemer G, Maiuri M and Salvatore F. The Molecular Hallmarks of the Serrated Pathway in Colorectal Cancer. Cancers 2019; 11:1017
11. Sobońciska J, Kolenda T, Teresiak A, Badziag-Leśniak N, Kopczyska M, Guglas K, et al. Diagnostics of Mutations in MMR/EPCAM Genes and Their Role in the Treatment and Care of Patients with Lynch Syndrome. Diagnostics 2020; 10:786
12. Excellence NIfHaC. Molecular testing strategies for Lynch syndrome in people with colorectal cancer. 2020; Available from: https://www.nice.org.uk/guidance/dg27/resources/molecular-testing-strategies-for-lynch-syndrome-in-people-with-colorectal-cancer-pdf-1053695294917.
13. Roelands J, Kuppen P, Vermeulen L, Maccalli C, Decock J, Wang E, et al. Immunogenomic Classification of Colorectal Cancer and Therapeutic Implications. International Journal of Molecular Sciences 2017; 18:2229
14. Jover R, Zapater P, Castells A, Llor X, Andreu M, Cubiella J, et al. The efficacy of adjuvant chemotherapy with 5-fluorouracil in colorectal cancer depends on the mismatch repair status. European Journal of Cancer 2009; 45:365-373
15. Guinney J, Dienstmann R, Wang X, de Reynies A, Schlicker A, Soneson C, et al. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. Nat Med 2015; 21:1350-1356
16. Cohen R, Pellat A, Boussion H, Svrcek M, Lopez-Trabada D, Trouilloud I, et al. Immunotherapy and metastatic colorectal cancers with microsatellite instability or mismatch repair deficiency. Bull Cancer 2019; 106: 137-42.
17. Johdi NA and Sukor NF. Colorectal Cancer Immunotherapy: Options and Strategies. Frontiers in Immunology 2020; 11:1624.
18. Janssen E, Subtil B, de la Jara Ortiz F, Verheul HMW and Tauriello DVF. Combinatorial Immunotherapies for Metastatic Colorectal Cancer. Cancers (Basel) 2020; 12(7): 1875.
19. Yaghoubi N, Soltani A, Ghazvini K, Hassanian SM and Hashemy SI. PD-1/ PD-L1 blockade as a novel treatment for colorectal cancer. Biomedicine & Pharmacotherapy 2019; 110:312-8.
20. Overman MJ, Lonardi S, Wong KYM, Lenz HJ, Gelsomino F, Aglietta M, et al. Durable Clinical Benefit With Nivolumab Plus Ipilimumab in DNA Mismatch Repair-Deficient/Microsatellite Instability-High Metastatic Colorectal Cancer. J Clin Oncol 2018; 36:773-9.
21. Smith KM and Desai J. Nivolumab for the treatment of colorectal cancer. Expert Rev Anticancer Ther 2018; 18:611-8.
22. Andre T, Shiu K-K, Kim TW, Jensen BV, Jensen LH, Punt CJA, et al. Pembrolizumab versus chemotherapy for microsatellite instability-high/mismatch repair deficient metastatic colorectal cancer: The phase 3 KEYNOTE-177 Study. Journal of Clinical Oncology 2020; 38:LBA4-LBA4
23. André T, Shiu K-K, Kim TW, Jensen BV, Jensen LH, Punt C, et al. Pembrolizumab in Microsatellite- Instability–High Advanced Colorectal Cancer. New England Journal of Medicine 2020; 383:2207-18.
24. Agency EM. Keytruda. 2021; Available from: https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/summaries-opinion/keytruda-2.
25. Khan K, Valeri N, Dearman C, Rao S, Watkins D, Starling N, et al. Targeting EGFR pathway in metastatic colorectal cancer- tumour heterogeniety and convergent evolution. Critical Reviews in Oncology/Hematology 2019; 143:153-63.
26. Bignucolo A, De Mattia E, Cecchin E, Roncato R and Toffoli G. Pharmacogenomics of Targeted Agents for Personalization of Colorectal Cancer Treatment. Int J Mol Sci 2017; 18:
27. Benson ABV, Alan P, Al-Hawary, Mahmoud M, Arain, Mustafa A, Chen, Yi-Jen; Ciombor, Kristen K.; Cohen, Stacey. NCCN Clinical Practie Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines) - Colon cancer. 2020; Available from: https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/colon.pdf.
28. Lam M, Lum C, Latham S, Tipping Smith S, Prenen H and Segelov E. Refractory Metastatic Colorectal Cancer: Current Challenges and Future Prospects. Cancer Manag Res 2020; 12:5819-30.
29. Timar J and Kashofer K. Molecular epidemiology and diagnostics of KRAS mutations in human cancer. Cancer and Metastasis Reviews 2020; 39(4):1029-38.
30. Sepulveda AR, Hamilton SR, Allegra CJ, Grody W, Cushman-Vokoun AM, Funkhouser WK, et al. Molecular Biomarkers for the Evaluation of Colorectal Cancer: Guideline From the American Society for Clinical Pathology, College of American Pathologists, Association for Molecular Pathology, and the American Society of Clinical Oncology. J Clin Oncol 2017; 35:1453-86.
31. Pang SW, Awi NJ, Armon S, Lim WW, Low JS, Peh KB, et al. Current Update of Laboratory Molecular Diagnostics Advancement in Management of Colorectal Cancer (CRC). Diagnostics (Basel) 2019; 10(1):9.
32. De Falco V, Napolitano S, Roselló S, Huerta M, Cervantes A, Ciardiello F, et al. How we treat metastatic colorectal cancer. ESMO Open 2020; 4(Suppl 2):e000813.
33. Martini G, Dienstmann R, Ros J, Baraibar I, Cuadra-Urteaga JL, Salva F, et al. Molecular subtypes and the evolution of treatment management in metastatic colorectal cancer. Therapeutic Advances in Medical Oncology 2020; 12:1758835920936089
34. Salvatore L, Calegari MA, Loupakis F, Fassan M, Di Stefano B, Bensi M, et al. PTEN in Colorectal Cancer: Shedding Light on Its Role as Predictor and Target. Cancers (Basel) 2019; 11(11):1765.
35. Yau TO. Precision treatment in colorectal cancer: Now and the future. JGH Open 2019; 3:361-9.
36. Cocco E, Scaltriti M and Drilon A. NTRK fusion-positive cancers and TRK inhibitor therapy. Nat Rev Clin Oncol 2018; 15:731-747
37. Chen G, Yang Z, Eshleman JR, Netto GJ and Lin M-T. Molecular Diagnostics for Precision Medicine in Colorectal Cancer: Current Status and Future Perspective. BioMed Research International 2016; 2016:9850690.
38. Dang HX, Krasnick BA, White BS, Grossman JG, Strand MS, Zhang J, et al. The clonal evolution of metastatic colorectal cancer. Science Advances 2020; 6:eaay9691

39. Zheng Z, Yu T, Zhao X, Gao X, Zhao Y and Liu G. Intratumor heterogeneity: A new perspective on colorectal cancer research. Cancer Medicine 2020; 9:7637-45.
40. Xie H and Kim RD. The Application of Circulating Tumor DNA in the Screening, Surveillance, and Treatment Monitoring of Colorectal Cancer. Ann Surg Oncol 2020; 28(3):1845-58.
41. Becht E, De Reyničs A, Giraldo NA, Pilati C, Buttard B, Lacroix L, et al. Immune and Stromal Classification of Colorectal Cancer Is Associated with Molecular Subtypes and Relevant for Precision Immunotherapy. Clinical Cancer Research 2016; 22:4057-66.
42. Sveen A, Bruun J, Eide PW, Eilertsen IA, Ramirez L, Murumagi A, et al. Colorectal Cancer Consensus Molecular Subtypes Translated to Preclinical Models Uncover Potentially Targetable Cancer Cell Dependencies. Clin Cancer Res 2018; 24:794-806.
43. Okita A, Takahashi S, Ouchi K, Inoue M, Watanabe M, Endo M, et al. Consensus molecular subtypes classification of colorectal cancer as a predictive factor for chemotherapeutic efficacy against metastatic colorectal cancer. Oncotarget 2018; 9(27):18698-711.
44. ten Hoorn S, Trinh A, de Jong J, Koens L and Vermeulen L. Classification of Colorectal Cancer in Molecular Subtypes by Immunohistochemistry. New York, NY 2018; 179-1.
45. Thanki K, Nicholls ME, Gajjar A, Senagore AJ, Qiu S, Szabo C, et al. Consensus Molecular Subtypes of Colorectal Cancer and their Clinical Implications. Int Biol Biomed J 2017; 3:105-11.
46. Tepus M and Yau TO. Non-Invasive Colorectal Cancer Screening: An Overview. Gastrointest Tumors 2020; 7:62-73.
47. Ebner DW and Kisiel JB. Stool-Based Tests for Colorectal Cancer Screening: Performance Benchmarks Lead to High Expected Efficacy. Curr Gastroenterol Rep 2020; 22:32.
48. Wu X, Yan F, Wang L, Sun G, Liu J, Qu M, et al. MicroRNA: Another Pharmacological Avenue for Colorectal Cancer? Frontiers in Cell and Developmental Biology 2020; 8:812.
49. Poursheikhani A, Abbaszadegan MR and Kerachian MA. Mechanisms of long non-coding RNA function in colorectal cancer tumorigenesis. Asia-Pacific Journal of Clinical Oncology 2020; 17:7-23.
50. Pai RK, Bettington M, Srivastava A and Rosty C. An update on the morphology and molecular pathology of serrated colorectal polyps and associated carcinomas. Mod Pathol 2019; 32:1390-415.

SEMMELWEIS KIADÓ ISMERETTERJESZTŐ KIADVÁNYAI

Egészségfejlesztés-egészségmegőrzés

Könyveink megvásárolhatók a Legendus Könyvesboltban, illetve a Líra Kereskedelmi hálózaton belül az egész országban, de egyre nagyobb igényt elégít ki webshopunk.

Deutsch Tibor és Gergely Tamás

ÚTBAN A FENNTARTHATÓ EGÉSZSÉGÜGYHÖZ

Mást, másként, más szereposztásban

Könyvünkben egy fenntartható egészségügyi ellátórendszert szeretnénk bemutatni az olvasóknak. Az új ellátási modellben alapvetően megváltozik a páciens szerepe, amit a szóhasználattal is jelezni szeretnénk. Egyre több látszólag egészséges ember igyekszik megőrizni, illetve fejleszteni az egészségét. Könyvünkben a kliens megnevezést használjuk mindenkire, aki az egészségi állapotától függetlenül valamilyen egészségügyi szolgáltatást vesz igénybe.

A könyv három fő részből áll. Az I. részben az új ellátási modell tudományos, technológiai és egészség-kulturális pilléreit mutatjuk be. A II. részben az egyes kliens ellátásának különböző sajátosságaival foglalkozunk. A III. részben a népegészségügy- és járványügy új arculatát rajzoljuk meg.

Könyvünk egyben egy iránytűt is kínál, ami segít tájékozódni a rohamosan gyarapodó ismeretek és technológiák világában.

256 oldal ■ E-könyv ára: 1800 Ft

Semmelweis Kiadó
1089 Budapest, Nagyvárad tér 4.
www.semmelweiskiado.hu

LEGENDUS KÖNYVESBOLT
1089 Budapest, Nagyvárad tér 4.
Tel.: 210-4408, 459-1500/56353
Nyitva tartás: H–Sz: 9.00–16.00,
Cs: 9.00–18.00, P: 9.00–14.00
E-mail: info@semmelweiskiado.hu

Köszönjük mindazoknak,
akik fáradhatatlanul küzdenek
a koronavírus elleni harcban.

Az Önök elkötelezettsége inspirál minket munkánkban.

Bristol Myers Squibb™

NOHU2101032-01
Lezárás dátuma: 2021. február 9.
Bristol Myers Squibb Kft. 1123 Budapest,
Alkotás u. 53. MOM Park Irodaház, A torony
Tel: +36 1 301 9797
bms.hungary@bms.com
www.bms.com/hungary
© 2020 Bristol-Myers Squibb Company.
All rights reserved.

A melanoma molekuláris diagnosztikája és célzott kezelése: prognosztikus és prediktív markerek

Molecular diagnostics and target therapy of melanoma: prognostic and predictive markers

Tímár József
II. Sz. Patológiai Intézet, Klinikai Központ, Semmelweis Egyetem, Budapest
E-levél: timar.jozsef@med.semmelweis-univ.hu

ÖSSZEFOGLALÁS A melanoma az elmúlt évtizedekben egyre gyakoribb bőrdaganattá vált az UV expozíció fokozódásával párhuzamosan. Ugyan akkor ez nem járt együtt a mortalitás fokozódásával mert a korai diagnosztika is sokat fejlődött. A klasszikus onkológiai kezelésekkel szemben rezisztens melanoma terápiájában gyökeres fordulatot hozott az onkogén mutációs mintázatainak megismerése és a daganat immunbiológiai feltérképezése. Bár a *BRAF*-mutáns és a tripla vad *(BRAF, NRAS, KIT)* melanoma kezelése célzott vagy immunterápiával megoldottnak látszik, ez nem mondható el az *NRAS* és *KIT* mutáns tumorokról vagy az uveális melanomáról. Másrészről a sikeres terápiás beavatkozások újabb kihívásokkal szembesítik az onkológusokat a kináz inhibitorokkal vagy az immunterápiával szembeni rezisztencia kialakulása és az e mögött rejlő genetikai változások miatt. Így az egyszeri mindent megoldó molekuláris profilírozást egyre inkább a folyamatos monitorozás kell, hogy helyettesítse.

KULCSSZAVAK melanoma, *BRAF, NRAS, KIT* mutációk, célzott terápia, immunellenőrző pont blokkoló terápia

SUMMARY In parallel to the increased UV exposure, incidence of malignant melanoma steadily increased in the last decades. However, this rise did not result in increased mortality due to improved and earlier diagnosis and novel, more effective therapies. Fundamental changes occured in the treatment of chemo- and radiotherapy resistant melanoma due to molecular classification and discovery of its immunobiological characteristics. Although the treatment of the *BRAF*-mutant and triple wild type *(BRAF, NRAS, KIT)* melanoma seems to be settled, this is not the case in *NRAS*- or *KIT*-mutant tumors or in uveal melanoma. Meanwhile there are novel unforeseen challenges raised by genetic changes leading to kinase inhibitor- or immunotherapy resistances. As result, a one-step moleculopathological diagnostics must be replaced by a continous molecular monitoring.

KEY WORDS melanoma, *BRAF, NRAS, KIT* mutations, target therapy, immune checkpoint inhibition

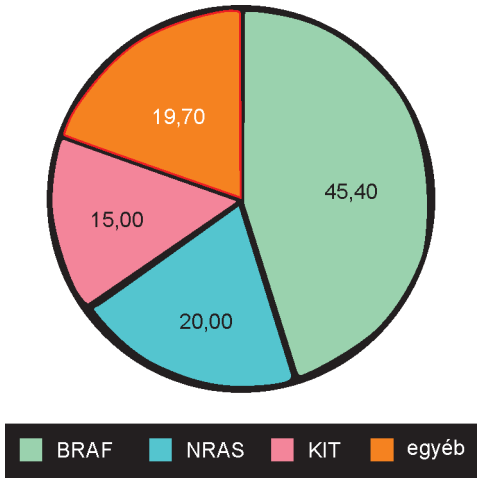
Melanoma epidemiológia és molekuláris epidemiológia hazánkban

A malignus melanoma relatíve gyakori rosszindulatú daganat, amelynek incidenciája fokozatosan emelkedik a napozási kultusz egyre elterjedtebbé válásával. Ennek az az eredménye, hogy mindkét nemben a 10 leggyakoribb daganatok közé lépett elő hazánkban (1292 férfi és 1450 nő 2016-ban). Szerencsére a dermatológiai ellátás eredményeként a felismert és kezelt melanomás esetek csak mintegy 10%-a vezet végül daganatos halálozáshoz. Az igazi probléma az, hogy a melanoma az egyik, ha nem a legagresszívabb emberi rosszindulatú daganat, amely a legkisebb T1a méret esetében is jár jelentős áttétképző képességgel, ami 0,5 mm vastagságot és nagyságrendileg 0,5–1x10^6 daganatsejtet jelent. Összehasonlításképpen, a legtöbb solid daganat esetében a T1 stádium cm-ben mérendő és minimálisan 10^9 daganatsejtet tartalmaz minimális áttétképzési hajlammal.

A malignus melanoma kialakulása kétféle, vagy *de novo* keletkezik, vagy pedig előzetes naevus malignizálódásával.[1] Azt figyelembe véve, hogy a felnőttkor küszöbén milyen nagyszámú jóindulatú melanocytás tumor található a bőrön, ehhez képest a naevus talaján kialakuló melanoma kockázata alacsony. A naevusok molekuláris elemzése azt mutatta, hogy ezek bizonyíthatóan az UV-sugárzás által indukált *BRAF* exon 15 mutációt hordozzák döntő részben (~80%). Fontos leszögezni, hogy a melanomának vannak ritka formái is, ilyen a mucosalis melanoma és az uvealis melanoma, melyek összehasonlíthatatlanul ritkábbak, mint a cutan forma, de semmivel sem kevésbé agresszívak. Felmerül a kérdés, hogy a nem UV-sugárzásnak kitett felszíneken/szervekben keletkező melanoma kialakulása mögött mi állhat? Az eddigi tudományos eredmények azt támasztják alá, hogy ezen melanomák kialaku-

Rövidítések

LOH	*heterozigótaság elvesztése*
HLA	*humán leukocyta antigén*
TIL	*tumor infiltráló lymphocyták*

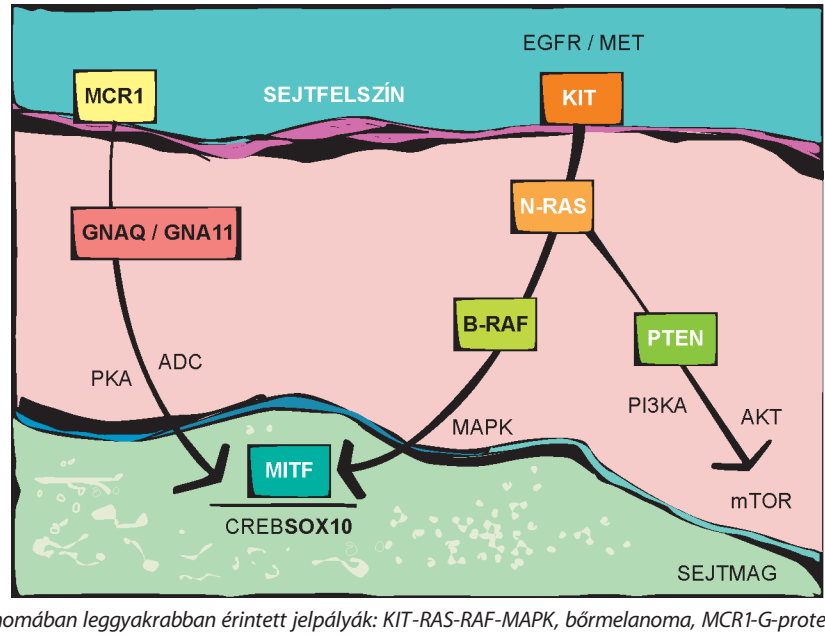


1. ábra: A bőr melanomájának molekuláris klasszifikációja: a leggyakrabban mutált onkogének[4]

lásában az UV-sugárzásnak nincsen szerepe, amit az is igazol, hogy ezen daganatokban a *BRAF* onkogén UV-indukált mutációja nincsen jelen. Megjegyzendő, hogy a melanomák mintegy 10%-a örökletes, amit leggyakrabban a p16/*CDKN2A* gén csírasejtes mutációja okoz, ritkábban azonban a *TERT*, az *MITF* vagy a *BAP1* géneké.[2] Érdekes, hogy az uvealis melanomák egy része is familiáris, amely hátterében az ismert homológ rekombinációs vagy mismatch repair deficienciák mellett a *BAP1* vagy a *MBD4* gének örökletes hibája áll.[3]

A bőrmelanomák döntően három nagy morfológiai csoportot képeznek, a felszínesen terjedő (SSM), a nodularis (NM) és az ún. (acro)lentiginosus formák, ahol az utóbbi esetében az UV-expozíció szerepe erősen megkérdőjelezhető. Molekuláris klasszifikáció szempontjából három onkogén mutációja dominál a bőr melanomájában, a *BRAF*/15exon/600kodon aktiváló mutáció (~50%), az *NRAS* onkogén/3exon/61kodon aktiváló mutáció (~20%) és a *KIT* onkogén változatos mutációi (~15%) *(1. ábra)*.[4] A jelpálya, amely melanomában érintett, a melanocyta domináló receptor-jelpályája (KIT receptoré), amelyben szintén érvényesül az aranyszabály, hogy egy jelpályában csak egy onkogén mutálódhat egyszerre *(2. ábra)*. A *BRAF* és *NRAS* mutációk az SSM/NM melanomák jellemzői, míg a lentiginózus formákban a *KIT* mutáció dominál. Megjegyzendő ugyanakkor, hogy a ritka morfológiai variánsokban más gének hibái jellemzőek: a desmoplasticusban *GRIN2A*, a naevusszerűben a lipid-kináz útvonalé *(PTEN, PI3KCA, AKT)*, a blue naevus melanomában a *CDKN2A*, míg a congenitalis naevus szindrómában a *TP53* géneké.[5]

Fontos látni, hogy a mucosalis melanoma molekuláris alapjai mások, döntően ezek a tumorok *KIT* mutáns daganatok és a *BRAF* vagy az *NRAS* mutációk jóval ritkábbak. Az uvealis melanomák mindezen melanomavariánsokhoz képest is különállók, mert ezeket a MCR1 jelpálya G-protein mutációi, a *GNAQ* vagy a *GNA11* jellemzik *(2. ábra)*.[3]



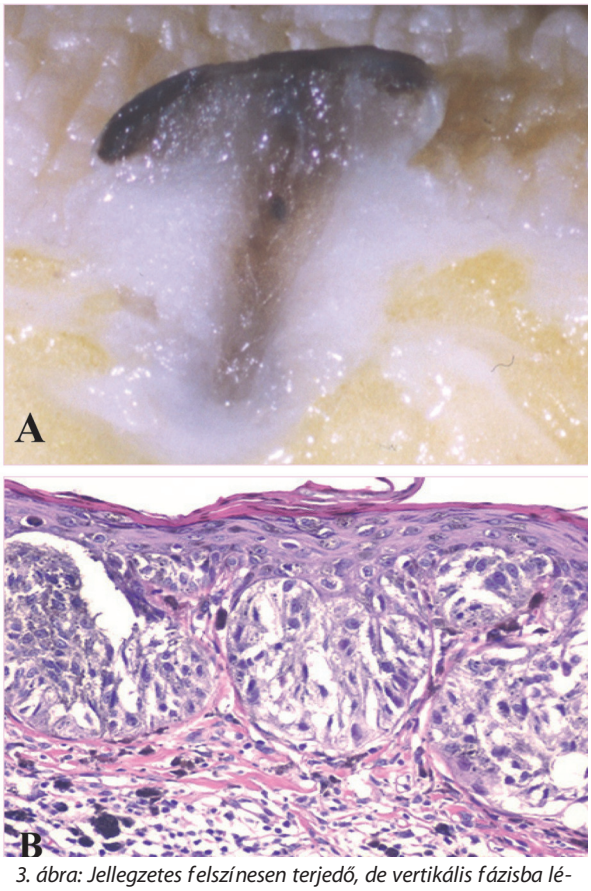
2. ábra: A melanomában leggyakrabban érintett jelpályák: KIT-RAS-RAF-MAPK, bőrmelanoma, MCR1-G-protein-AC-PKA, uveális melanoma. Mindegyik jelpálya a melanocyta-specifikus transzkripciós faktorokat aktiválja (MITF/SOX10). Pirossal a gyakrabban mutált komponensek.

Patológiai diagnosztika

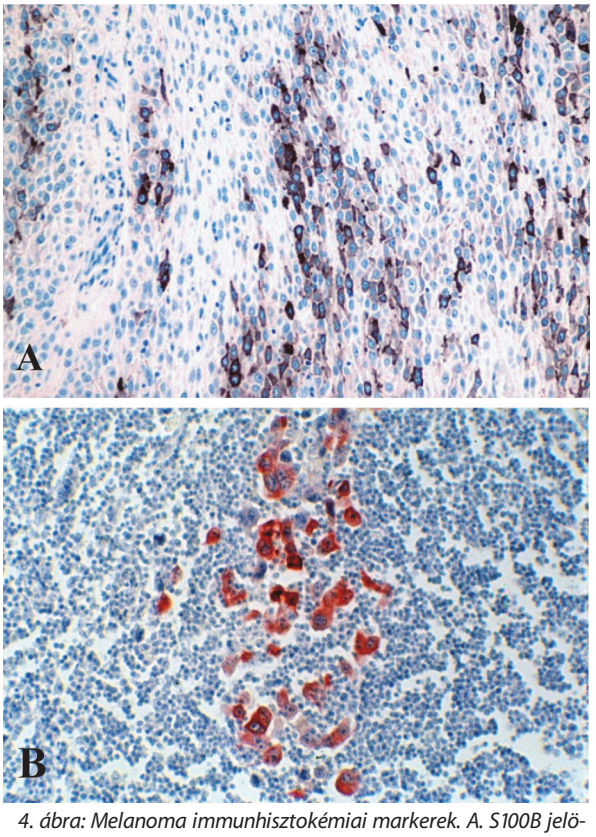
A melanoma patológiai diagnosztikájának alapja a morfológia az elmúlt évszázadban, amit azonban a technológia és a patológia fejlődése mára kissé meghaladt *(3. ábra)*. A probléma nem is elsősorban a morfológia megbízhatatlanságával magyarázható, hanem a klinikum igényeivel, melyek a rákmegelőző állapotok vagy a dysplasticus naevus formák biztonságos elkülönítésének igényét jelentik.[6] A pigmentsejtes léziók azonosítása a mai immunhisztokémiai paletta használatával biztonságosan megtehető *(4. ábra, 1. táblázat)*, de ezek a malignitás kérdésének megítélésében nem segítenek mivel ezek döntően melanocyta-specifikus markerek.[7]

Amint azt a fentiekben bemutattuk, a *BRAF*, de az *NRAS* vagy a *KIT* mutációk kimutatása azért nem segít a dignitás megítélésében mert ezek az onkogén mutációk egy korábbi fázisban keletkeznek, így a naevusokban vagy a dysplasticus léziókban is jelen lehetnek már. A proliferációs aktivitás (mitotikus index, ki-67) ugyan hasznos információ lehet, de a sérült naevusok esetében nem segít a dignitás eldöntésében. Ezért kerestek megbízhatóbb „objektívebb" molekuláris markereket, aminek eredménye lett egy multiplex fluoreszcens *in situ* hibridizáció (FISH) módszer és a myPath sokgénes expressziós teszt kidolgozása. A FISH analízisben négy gén kópiaszámát elemzik: *RREB1* (6p25), *MYB* (6p23), *CDKN2A*/p16 (9p21) és *CCDN1* (11q13). A malignus léziókban az *RREB1* és *CCDN1* kópiaszám emelkedését, míg a p16 és a *MYB* génekben kópiavesztés (loss of heterozygosity, LOH) jelenségét lehet tapasztalni.[8] A MyPath (MYRAD Genetics) analízis során az OncotypeDX-hez hasonlóan 14 gén expresszióját mérik (*PRAME, S100A12,9,8,7, PI3* melanoma és a *CCL5*, CD38, CXCL10, CXCL9, IRF1, LCP2, PTPRC, SEL1 immunstroma génekét) és egy MYRAD score értéket számolnak ki ennek alapján.[9]

A következő lépés a TNM stádium meghatározása,[10] amelynek évtizedek óta alapja a pontos vastagság-meghatározás, a Breslow-érték mm-ben, ahol a T1a stádium <0,8 mm, de ulcerált, vagy >0,8<1 mm. A locoregionalis terjedés egyik jellegzetes útja az ún. szatellita és in-tranzit áttétképzés (intralymphaticus) a környező szövetben, valamint a lokoreginális nyirokcsomó-áttétképzés. Ez utóbbi meghatározásának pon-



3. ábra: Jellegzetes felszínesen terjedő, de vertikális fázisba lépett bőr melanoma makroszkópos (A) és mikroszkópos (B) képe.



4. ábra: Melanoma immunhisztokémiai markerek. A. S100B jelölés. B. MART-1 pozitív daganatsejtek őrszemnyirokcsomóban.

1. táblázat: Immunhisztokémai melanoma markerek[7]

MARKER	LOKALIZÁCIÓ	SZENZITIVITÁS (%)	SPECIFICITÁS (%)
S100B	citoplazma	>93	alacsony
HMB45/gp100	melanoszóma	>70	>90
MART1	melanoszóma	>85	>95
tirozináz	melanoszóma	>80	alacsony
MITF	transzkripciós faktor	>80	alacsony
SOX10	transzkripciós faktor	>95	alacsony

tossága az ún. „drenáló" nyirokcsomó megtalálástól függ, ami a különféle őrszemnyirokcsomó kimutató módszerek alkalmazásával végezhető el. Az őrszemnyirokcsomó érintettségének kiértékelését makroszkópos vagy mikroszkópos (>1 mm) méretben kell megtenni. Az 1 mm- nél kisebb áttétek biológiai jelentősége nem ismert *(4B ábra)*. Ilyenkor szükség lehet a megfelelő érzékenységű és specificitású immunhisztokémiai markerek alkalmazására és a teljes nyirokcsomó feldolgozására. Ugyanakkor ismert az, hogy a regionális nyirokcsomókban lehetnek ectopiás melanocytaszigetek, amelyek morfológiai azonosítása alapvető jelentőségű.

Prognosztikus markerek: génmintázat

Mind a mai napig a primer melanoma egyik legfontosabb prognosztikus faktora az ulceráció, bár ennek prognosztikus szempontból a molekuláris alapjai nem ismertek. Több elemzés is arra jutott, hogy a primer melanomát génexpresszió alapján három kategóriába lehet sorolni: a proliferatív (p16-LOH, MITF/SOX10 vezérelt), az invazív (epithelialis-mesenhymalis tranzíciós gének: *SNAI1, ZEB1, TGFBR2*) és az immunmediáltra. Értelemszerűen a proliferatív és az invazív kedvezőtlen prognosztikus faktor míg az immunmediált kedvező.[5] Ugyanakkor ezek a génexpressziós mintázatok nem kerültek validálásra megfelelő nagy klinikai anyagokon, így jelenleg vizsgálatukra nincsenek standardizált tesztek. Egy hazai vizsgálatban az agyi áttétet képező melanomák esetében észleltük az AQP1 fehérje fokozott expresszióját, amit az érintett kromoszóma régió (7p) amplifikációja okozott.[11]

A melanoma a magas mutációs terheltségű daganatok közé tartozik, így a progresszió során ennek további emelkedése, és az új neoantigének számának jelentősebb növekedése aligha várható, bár a homológ rekombináció repair zavarának fokozódása kimutatható. Az antigénprezentáció szempontjából azonban nagy jelentősége van annak, hogy a *HLA-I* génrégiót (6. kromoszóma) vagy a *B2M* génrégiót érintő LOH (15. kromoszóma) kialakul-e melanomában, mert a *HLA-I* expresszió elvesztése immunrezisztenciához vezet. Hasonlóan jelentősége van annak is, hogy a 9p24.1 régióban amplifikáció következik-e be, ami *PDL1* fokozott expresszióját okozhatja, ami szintén immunrezisztenciát okozhat, de érzékenyíthet immun checkpoint inhibitorokkal szemben (12)

Prognosztikus markerek: daganatos mikrokörnyezet

Évtizedek óta ismert a primer melanoma sajátossága, hogy igen jellegzetes lymphoid infiltrátumot tartalmazhat, másrészről talán az egyetlen olyan daganat, amelyben „spontán" regresszió alakulhat ki a primer tumorban, valószínűleg az aktív daganatellenes immunválasz miatt. A melanoma a legimmunogénebb malignus daganat, aminek egyik oka a magas mutációs terheltség, aminek következménye a nagyszámú neoantigén keletkezése. Mindezek alapján azt várhatnánk, hogy a tumort infiltráló lymphocyták (TIL) mennyiségének vagy összetételének komoly prognosztikus szerepe van. Elsőként a primer melanoma lymphoid infiltrációjának nagysága nem prognosztikus értékű. Másodszor azzal szemben, amit várnánk, sem a CD4+T, sem a CD8+T, sem az NK vagy macrophag effektor sejtek denzitása nem prognosztikus primer melanomában. Ehhez képest az is érdekes, hogy nem rendelkeznek ilyen képességgel a Treg sejtek sem. Ugyanakkor érdekes, hogy a TIL-ben lévő B-sejtek denzitása és valószínűleg ezzel összefüggésben a dendritikus sejtek denzitása prognosztikus jelentőségű.[13]

A melanoma progressziójának molekuláris háttere

A melanomák döntő részét sebészileg eltávolítják, és amennyiben nincsen áttét, a beteg nem részesül kezelésben. Úgy különben a melanoma az egyik leginkább kemorezisztens emberi daganat, a veserákhoz ha-

sonlóan. Míg ott a vesetubulus hámsejtek nagyfokú gyógyszer-kipumpáló funkciója, melanomában a kemorezisztencia alapja a genetikai/biológiai apoptózis rezisztencia és valószínűleg a magával hozott UV-indukált DNS-hibajavító képesség.

A melanoma genetikai progressziója során (áttétképzés) számos jellegzetes új génhiba jelenik meg, mint pl. a *BRCA1*, *EGFR4* vagy az *NMDAR2* mutációk, az *MITF*, *AP1*, *BRIC5* és *MET* amplifikációk, és nem utolsósorban a *PTEN* és a metasztázis szuppresszor *KISS1R* LOH, amelyek jelentősen megváltoztatják a daganat viselkedését.[5] További kérdés az ún. driver gének viselkedése a progresszió során. Sajnos meglehetősen kevés ilyen irányú vizsgálat van, feltételezve azt, hogy a *BRAF*, *NRAS* és *KIT* mutációs státusz változatlan. A primer melanoma (is) klonálisan heterogén daganat, amelyben sokféle klón van jelen, amelyek között vannak a driver onkogénekre vad típusúak is. Egy nagyobb tanulmányban megvizsgáltuk azt, hogy a szervi áttétekben hogyan alakul a melanoma driver génjeinek a szerepe és aránya a vad típusú klónokhoz képest. Annyit ki lehet jelenteni, hogy a driver onkogén elvesztése a szervi áttétekben igen ritka jelenség. Ugyanakkor a driver onkogént hordozó klónok relatív aránya meglehetősen kiszámíthatatlanul változik az áttétekben, igen alacsony arány dominálóvá válhat és fordítva. Azt is meg lehetett állapítani, hogy a *BRAF* mutáns melanomák esetében az onkogén klón elsősorban a tüdőáttétekben válik dominálóvá (a ritkább mellékvese-, bél vagy veseáttétekhez hasonlóan), tehát valamifajta szervpreferenciát mutat, ami nem jellemző az *NRAS* mutáns melanomákra.[4]

Célzott terápia/prediktív markerek *(2. táblázat)*

A jelenleg érvényes ajánlások alapján a St-III. rezekált bőrmelanomás betegek akkor részesülhetnek célzott terápiában, amennyiben a daganat *BRAF* mutáns (ex15/c600E vagy K). Minden egyéb *BRAF* mutáció nem tekinthető szenzitizáló mutációnak. A fenti helyzetben a BRAF/MEK kettős inhibitor terápia indikált: dabrafenib és trametinib. Az *NRAS* mutáns St-III melanomák esetében nincsen törzskönyvezett célzott terápia, hasonlóan a *KIT* mutáns daganatokhoz.

A jelenleg érvényes ajánlások szerint a St-IV. rezekált *BRAF* mutáns (V600E/K) melanoma esetében is a BRAF+MEK inhibitor kombináció törzskönyvezett (dabrafenib+trametinib). Az *NRAS* mutáns St-IV. melanomák esetében nincsen törzskönyvezett célzott terápia, hasonlóan a *KIT* mutáns daganatokhoz.

A *BRAF* mutáns (V600E/K) nem-rezekálható St-III-IV. melanomák esetében többféle BRAF/MEK inhibitor terápiát is törzskönyveztek: dabrafenib + trametinib, encorafenib + binimetinib és vemurafenib + cobimetinib. Az *NRAS* mutáns nem rezekálható melanomák esetében nincsen törzskönyvezett célzott terápia, hasonlóan a *KIT* mutáns daganatokhoz.

Fontos még kihangsúlyozni, hogy a BRAF vad melanoma azt jelenti, hogy az nem mutáns *NRAS* és *KIT* onkogénekre sem. Ugyanakkor ismert az is, hogy igen kis százalékban egyes daganatok genetikailag heterogének lehetnek, ahol a *BRAF* mutáció mellett *NRAS* vagy esetleg *KIT* mutáció is előfordulhat. Ilyen esetekben célszerű megvizsgálni az egyes onkogének mutáns allél frekvenciáját, hogy az adott daganatban melyik dominál, és a terápiás döntéseknél ezt figyelembe kell venni.

Másrészről azonban, ahogy azt korábban bemutattuk, a BRAF mutáns daganat nagyon eltérő lehet genetikailag annyiban, hogy abban a BRAF mutáns klón abszolút minoritás (ún. szubklonális) (<10%), kisebbségben van (<50%), vagy domináns (>50%), esetleg akár kizárólagos. Alaphelyzetben a *BRAF* mutáció heterozigóta a melanomákban, ami azt jelenti, hogy vad és mutáns allél egy-egy kópiában szerepel (50–50%). Emellett azonban további genetikai változások is bekövetkezhetnek a vad allélben (LOH) vagy a mutáns allélben (amplifikáció), ami a klonalitást befolyásolhatja, és elképzelhető, hogy mennyire befolyásolhatja a BRAF/MEK inhibitor terápia hatékonyságát. Talán nem is olyan meglepő ezek után, hogy a célzott terápiák esetében a hosszú távú klinikai hatásosság nem éri

2. táblázat: A nem uvealis melanoma gyógyszeres kezelésének lehetséges formái

DAGANAT TÍPUSA	TRIPLA-VAD (BRAF/NRAS/KIT)	BRAF MUTÁNS	NRAS MUTÁNS	KIT MUTÁNS
BRAF inhibitor	-	+	-	-
MEK inhibitor	-	+	(+)	-
KIT inhibitor	-	-	-	(+)
anti-CTLA4 antitest	+	+	+	+
anti-PD1 antitest	+	+	+	+

el az immunterápiákét, mivel valamennyi *BRAF* mutáns daganatot egyformán kezelnek.

A célzott terápián lévő *BRAF* mutáns daganatokban további genetikai változások alakulnak ki, amelyek rezisztenciához vezetnek. Ilyen változás lehet a rekurráló daganatban az *MITF* vagy *BRAF* amplifikáció (ez esetben a vad allélt érinti), a *PTEN* vesztés (LOH) vagy az újabb (nem-600-as kodon) *BRAF* mutáció fellépte, de leggyakrabban másodlagosan *MEK1*/2 mutáció vagy a lipid-kináz útvonal mutációi lépnek fel.[5,16] Ezek kialakulásában minden bizonnyal nagy szerepet játszik a *BRAF* mutáns melanomák egységes kezelése, a klonalitási arányok figyelembe vétele nélkül.

Külön kérdés a *KIT* mutáns melanomák esetleges célzott kezelése. A *KIT* mutáns melanomákban a *KIT* gén 9-19 exonjai lehetnek érintettek, és a kodonok szempontjából vannak forrópontok, de a gént érintő mutációk az esetek felében a tirozin kináz régióban csaknem random helyezkednek el. Az eddigi klinikai vizsgálatok azt mutatták, hogy a 11. és 13. exon mutáns melanomák reagáltak a különféle *KIT* inhibitor kezelésekre. Ugyanakkor több olyan exon/kodon is érintett a melanomákban, amelyek esetében GIST daganatokban KIT inhibitorra adott választ tapasztaltak, tehát a terápiás döntések meghozatalához ezeket figyelembe kell venni.[4]

Immunterápia/prediktív markerek *(2. táblázat)*

A magas rizikójú St-III. melanomát tradicionálisan immunstimuláns ún. citokin terápiával kezelték a múltban (IL-2 vagy IFNα2). Ennek a terápiának kicsi volt a hatékonysága, azonban sok mellékhatása volt. Hatalmas fejlődést jelentett az ún. checkpoint inhibitor terápiák törzskönyvezése, ami az anti-CTLA4 elleni antitesttel kezdődött, majd az anti-PD1/PDL1 antitestekkel folytatódott, és végül a kettő kombinációjában végződött, aminek eredményeként az ilyen betegek 5 éves túlélése 50% fölé emelkedett.[17] Ugyanakkor szemben más solid daganatokkal, az „eredendő bűn" (nem volt markervizsgálat/szelekció) elkövetése miatt gyakorlatilag a mai napig nincsen(ek) ún. immunterápiás prediktív marker(ek) törzskönyvezve melanomában.

A *BRAF* vad rezekált St-III. melanomákban anti-PD1 nivolumab vagy pembrolizumab kezelés törzskönyvezett. Rezekált St-IV. melanoma esetében az immunterápiás lehetőség az anti-PD1 antitest pembrolizumab.

BRAF vad típusú nem rezekálható vagy áttétes bőrmelanoma esetében az anti-PD1 antitestek nivolumab vagy pembrolizumab monoterápia, vagy az anti-CTLA4 + anti-PD1 kombináció ipilimumab + nivolumab a törzskönyvezett kezelés.

Az anti-PD1 terápián progrediáló vad BRAF típusú melanomákat anti-CTLA4 ipilimumab-tartalmú protokollal kell kezelni, míg a *BRAF* V600E/K mutáns daganatokat BRAF+MEK inhibitor kombinációval kell kezelni. Hasonlóképpen, a BRAF/MEK inhibitor terápián progrediáló *BRAF* mutáns melanomákat anti-PD1 terápiával kell kezelni.

A szakmai ajánlások arra is ráirányítják a figyelmet, hogy az *NRAS* (és *KIT*) mutáns melanomák gyakorlatilag „orphan" daganatok lettek, amelyeknek nincsen jól körülhatárolt immunterápiás protokolljuk, szemben a *BRAF* mutáns variánsaikkal, de értelemszerűen ezen daganatok célzott kezelés hiányában csak immunterápiával lennének kezelhetők.

A fentiekből is jól látható, hogy a molekuláris diagnosztikának igen is lehet szerepe a terápiás döntések meghozatalában. Egyfelől mindig figyelembe kell venni, hogy általában a *BRAF* mutáció meghatározás a primer tumorból történik, de a mutáns allél frekvencia változhat az áttétekben, így célszerű a vizsgálatot áttétből (pl. bőr vagy nyirokcsomó) megismételni. Az alacsony mutáns allél frakciót hordozó daganatok esetében a célzott terápiával szemben az immunterápiának nagyobb esélye van és fordítva, a magas mutáns allél frekvenciájú daganatokban a célzott terápiás kombináció az esélyesebb.

Korábban bemutattuk, hogy az immunrezisztencia egyik fontos faktora a HLA-I expresszió elvesztése, amit érdemes figyelembe venni a terápiás döntések szempontjából. Másrészt a klinikai vizsgálatok azt mutatták, hogy a melanomasejtek erősebb PDL1 expressziója (>10%) az anti-CTLA4 + anti-PD1 kombináció mellett szól. Ipilimumab kezelés esetében az áttétes nyirokcsomó FOXP3/CD8 T-sejt, míg a bőráttét CD16/CD68 macrophag denzitása bizonyult prediktív értékűnek.[18]

Végül még két kérdést érdemes megvizsgálni a jövő szempontjából. Az ún. immunoterápiák alkalmazása esetén (itt most elsősorban az immun checkpoint inhibitorokra gondolva) figyelembe kell venni azt a fontos tényt, hogy ezek a terápiák sem hatékonyak a hipoxiás daganatokban mert a nagy mennyiségben termelődő VEGF T-sejt-blokkoló. Más szolid daganatokban már bevezetésre került az immunterápia kombinációja az anti-VEGF terápiával (veserák, tüdőrák). Melanoma esetében a konstitutív HIF-aktiválás fő oka az onkogén driver mutáció *(BRAF, NRAS, KIT)*, így az ilyen dagana-

tok esetében alkalmazott immunterápiát meg lehetne kísérelni kombinálni anti-VEGF kezeléssel.

A másik kérdés a melanomák esetében a citokin terápia esetleges racionális felhasználása. Az érthető, hogy az immun- vagy célzott kezelések bevezetéséhez végzett klinikai vizsgálatokban a dacarbazin vagy citokin kar volt a kontroll kar, amelyet az új terápiák legyőztek. Ugyanakkor ismeretes, hogy a daganatelleni immunválasz problémájának csak az egyik része a PDL1/PD1 kérdés, az effektor sejtek aktivitása/aktiválódás legalább olyan fontos lehet, amiben a citokín stimuláció az immunterápia mellett hasonlóan jó szolgálatot tehet, mint a VEGF blokád. A veserák esetében már zajlanak ilyen kezdeményezések, itt az ideje, hogy melanoma esetében is elinduljanak ilyen vizsgálatok.

Az elmúlt évtized forradalmat hozott a „kezelhetetlen" melanoma terápiájában. Ennek alapja a célzott terápia és az immunterápia bevezetése volt, aminek az eredménye lett a metasztatikus betegségben tapasztalt 50%-os 5 éves túlélés.[17] Ennek az eredménynek a további javítása azonban csak a molekuláris diagnosztika további finomításával, illetve eredményeinek célszerű felhasználásával lehetséges.

Irodalom

1. Tímár J, Barbai T, Győrffy B, Rásó E. Understanding melanoma progression by gene expression signatures. Chapter2. In. Pfeffer U. Cancer Genomics, Springer, Dordrecht, 2013; 47-79.
2. Tímár J. A daganatok öröklődésének molekuláris alapjai. Magyar Onkológia 2020; 64:7-12.
3. Jager MJ, Shields CL, Cebulla CM et al. Uveal melanoma. Nat Rev Dis Primers 2020; 6:24.
4. Doma V, Barbai T, Beleaua MA, Kovalszky I, Rásó E, Tímár J. KIT mutation incidence and pattern of melanoma in central-east Europe. Pathol Oncol Res 2020; 26:17-22.
5. Tímár J, Vizkeleti L, Doma V, Barbai T, Rásó E. Genetic progression of malignant melanoma. Cancer Metastasis Rev 2016; 35:93-107.
6. Plótár V, Orosz Zs, Tóth E, Szentirmay Z. A melanoma malignum hisztopatológiai prognosztikus faktorai. Magyar Onkológia 2007; 51:39-52.
7. Ordonez NG. Value of melanocyte-associated immunohistochemical markers in the diagnosis of malignant melanoma. Human Pathol 2014; 45:191-205.
8. Reimann JDR, Salim S, Velazquez EF et al. Comparison of melanoma gene expression score with histopathology, FISH and SNP array for the classification of melanocytic neoplasms. Modern Pathol 2018; 31:1733-43.
9. Clarke LE, Flake DD, Busam K et al. An independent validation of a gene expression signature to differentiate malignant melanoma from benign melanocytic nevi. Cancer 2017; 123:617-28.
10. Elmore JG, Elder DE, Barnhill RL et al. Concordance and reproducibility of melanoma staging according to the 7th and 8th edition of the AJCC cancer staging manual. JAMA Netw Open 2018; 1: e180083.
11. Imrédi E, Liszkay G, Kenessey I et al. Aquaporin-1 protien expression of the primary tumor may predict cerebral progression of cutaneous melanoma. Pathol Oncol Res 2020; 26:405-10.
12. Ladányi A, Tímár J. Immunologic and immunogenomic aspects of tumor progression. Sem Cancer Biol 2020; 60:249-61.
13. Ladányi A. Prognostic and predictive significance of immune cell infiltrating cutaneous melanoma. Pigment Cell Melanoma Res 2015; 28:490-500.
14. Doma V, Kárpáti S, Rásó E, Barbai T, Tímár J. Dynamic and unpredictable changes in mutant allele fractions of BRAF and NRAS during visceral progression of cutaneous malignant melanoma. BMC Cancer 2019; 19:786.
15. Seth R, Messerschmith H, Kaur V et al. Systemic therapy of melanoma: ASCO guideline. J Clin Oncol 2020; 38: 3947-70.
16. Tímár J, Hegedűs B, Rásó E. The role of lipid signaling in the progression of malignant melanoma. Cancer Metast Rev 2018; 37:245-55.
17. Spain L, Larkin J, Turajlic S. New survival standards for advanced melanoma. Br J Cancer 2020; 122:1275-6.
18. Balatoni T, Mohos A, Papp E et al. Tumor-infiltrating immune cells as potential biomarkers predicting response to treatment and survival in patients with metastatic melanoma receiving ipilimumab therapy. Cancer Immunol Immunother 2016; 7:141-51.

astellas

Xtandi™
enzalutamide

METASZTATIKUS?
NEM METASZTATIKUS?

A XTANDI bizonyítottan hatékony és jól tolerálható, ismert biztonságossági profilú készítmény a magas kockázatú nmCRPC-ben és mCRPC-ben szenvedő betegek számára.[1]

Adjon időt arra, ami igazán számít!

mCRPC-ben kemoterápia előtt alkalmazott Xtandi kezeléssel a placebohoz képest

- ✓ szignifikánsan javíthatja a teljes túlélést*[1]
- ✓ 3,5-szer több időt adhat betegének a rPFS-ig zsigeri és nem-zsigeri metasztázisok esetén**[1]
- ✓ szignifikánsan csökkentheti betege PSA szintjét és 4-szer hosszabb ideig progressziómentesen tarthatja***[1]
- ✓ 12-szer nagyobb mértékben csökkentheti a tumor méretét****[1]
- ✓ 3-szor hosszabb ideig késleltetheti betege fájdalom progresszióját*****[2]
- ✓ hosszabb ideig fenntarthatja betege jobb életminőségét.[1]

Megteheti mindezt kötelező szteroid használata nélkül!#[1]

*Xtandi vs. placebo: 35,3 vs. 31,3 hónap
** Xtandi vs. placebo: 19,7 vs. 5,4 hónap
*** Xtandi vs. placebo: 11,2 vs. 2,8 hónap
**** Xtandi vs. placebo: 58,8% vs. 5%
*****Xtandi vs. placebo: 8,3 vs. 2,8 hónap
A betegeknek engedélyezett, de nem kötelező a szteroid alkalmazása[1]

Hivatkozások

1. Xtandi alkalmazási előírás www.ogyei.gov.hu/gyogyszeradatbazis
2. Loriot Y et al, *Lancet Oncol* 2015; 16: 509–21

XTANDI 40 mg lágy kapszula (ATC: L02BB04) 40 mg enzalutamid lágy kapszulánként, XTANDI 40 mg filmtabletta 40 mg enzalutamid filmtablettánként

A forgalomba hozatali engedély jogosultja: Astellas Pharma Europe B.V. A forgalomba hozatali engedély száma: EU/1/13/846/001-002. Forgalomba hozatali engedély jogosult magyarországi képviselője és elérhetősége: Astellas Pharma Kft.; 1124 Budapest, Csörsz u. 49-51.; Telefon: +36 (1) 577-8200. **Bővebb információért olvassa el a gyógyszer alkalmazási előírását!**

A hatályos "alkalmazási előírás" teljes szövegét megtalálja az Országos Gyógyszerészeti és Élelmezés-egészségügyi Intézet (www.ogyei.gov.hu/gyogyszeradatbazis/) vagy az Európai Gyógyszerügynökség (www.ema.europa.eu) honlapokon.

OGYÉI honlapon keresztül történő elérési útvonal: www.ogyei.gov.hu; Adatbázisok, nyilvántartások; Gyógyszer-adatbázis; Xtandi (szabadszavas keresésben a termék „Xtandi" megadása), a „KERESÉS INDÍTÁSA", a kiadott találatok után a → jelre kattintva, majd az EMA ikon vagy **Kísérőiratok** hiperlinkre történő kattintással elérhető az alkalmazási előírás.

Árral kapcsolatos információk: XTANDI 40 mg lágy kapszula (112 x) és Xtandi 40 mg filmtabletta (112 x): a közfinanszírozás alapjául elfogadott ár: 949998 Ft, a támogatás összege 0 Ft, a térítési díj: 949998 Ft. A feltüntetett árat és a támogatás mértékét a 2020. február 1. napján a www.neak.gov.hu oldalon hozzáférhető adatok alapján közöltük, és visszavonásig érvényes. *Az aktuális árak tekintetében kérjük, ellenőrizze a www.neak.gov.hu honlapon található információkat.*

Elérési útvonal: http://www.neak.gov.hu: SZAKMÁNAK; GYÓGYSZER/ GYÓGYÁSZATI SEGÉDESZKÖZ/ GYÓGYFÜRDŐ TÁMOGATÁSOK; Egészségügyi szakembereknek; PUBLIKUS GYÓGYSZERTÖRZS; VÉGLEGES TÖRZS

További információk: Astellas Pharma Kft. 1124 Budapest, Csörsz utca 49-51., Tel.: 06 1 577 8200, Fax: 06 1 577 8210.

XTD_2020_0071_HBR Lezárás dátuma: 2020.05.20.

A prosztatarák és húgyhólyagrák molekuláris hátterének terápiás vonatkozásai

Therapeutically relevant molecular alterations in prostate and bladder cancer

Szarvas Tibor*[1,2], Csizmarik Anita*[1], Váradi Melinda[1], Oláh Csilla[1,2], Nyirády Péter[1]

[1] Urológiai Klinika, Semmelweis Egyetem, Budapest

[2] Urológiai Klinika, Essen-Duisburgi Egyetem, Duisburg, Essen, Németország

* a két szerző egyenlő mértékben járult hozzá a cikk megszületéséhez

E-levél: sztibusz@gmail.com

ÖSSZEFOGLALÁS A prosztata- és a húgyhólyagdaganat a két leggyakrabban előforduló urológiai malignitás. Az elmúlt öt évben mindkét tumorféleség előrehaladott stádiumú eseteinek gyógyszeres kezelési lehetőségei jelentős mértékben javultak. Így ma már mindkét daganatra igaz, hogy a hasonló stádiumú betegek számára egyszerre több szer közül is lehet választani. Ez az alapvetően kedvező változás azonban egyben a klinikai döntéshozatalt is összetettebbé tette. A tendencia pedig folytatódik; egyre növekvő számú új szert próbálnak ki klinikai vizsgálatokban, ezért a jövőben a helyzet még összetettebbé válhat. A terápia helyes megválasztásához a jelenleg rutinszerűen elérhető klinikopatológiai adatok gyakran nem nyújtanak elegendő mélységű információt. Ezért szükséges a daganatok molekuláris szintű megértése is. A prosztatarák esetében az androgén támadáspontú gyógyszerek elleni rezisztencia alaposabb ismerete vezetett el az újabb hatóanyagok kifejlesztéséhez, de a közeljövőben a PARP enzim gátlásán keresztül ható gyógyszerek – bizonyos molekuláris eltérések megléte esetén – alkalmazhatók lesznek. A húgyhólyagrák kezelésében a több mint 30 éven át kizárólagosan alkalmazott platina-alapú kemoterápia mellett ma már használhatók az immunellenőrzőpont-gátló szerek, valamint a közeljövőben bizonyos FGFR eltérések jelenléte esetén az FGFR3-gátló kezelés is elérhetővé válik. Ebben az összefoglalóban egy rövid áttekintést szeretnénk nyújtani a húgyhólyag- és a prosztatadaganat azon molekuláris sajátságairól, melyek terápiás szempontból jelentőséggel bírnak.

KULCSSZAVAK húgyhólyagrák, prosztatarák, molekuláris alcsoportok, immunellenőrzőpont-gátló, FGFR

SUMMARY Prostate and urinary bladder cancer are the two most common urological malignancies. In the last few years, by the approval of new drugs the therapeutic landscape of both tumor entities has significantly improved. Currently, for patients with progressed bladder or prostate cancer in similar stage categories more than one effective drugs are available, making clinical decision-making incresingly complex. This tendency will be most probably accelerated considering the increasing number of drugs being tested in ongoing prospective clinical studies. Conventional clinicopathological parameters often provide only insufficiently detailed information for informed therapeutic decision-making. Therefore, molecular techniques are needed to be incorporated in the clinicopathological diagnostics in order to support therapeutic decisions. In prostate cancer, our improved understanding of the regulation of androgen pathways and resistance mechanisms resulted in the development of novel effective therapies. In addition, PARP inhibition represents a further, soon to be available therapeutic option for molecularly selected prostate cancer patients. For locally progressed and metastatic bladder cancer, platinum-based chemotherapy has been the only therapeutic option for almost 30 years. In the last few years, immune checkpoint inhibitors have become available for platinum-resistant or chemotherapy ineligible patients. Furthermore, FGFR3 inhibitors will be available for patients with specific molecular alterations. In this review, we provide an overview of the most important and therapeutically relevant molecular features of prostate and bladder cancer.

KEY WORDS bladder cancer, prostate cancer, molecular subtypes, immune checkpoint inhibitor, FGFR

Rövidítések:

ABI	*abirateron*
AR	*androgén receptor*
ATM	*ataxia telangiectasia mutated*
BRCA2	*breast cancer gene 2*
CDK4/6/12	*ciklin-dependens kináz4/6/12*
CGA	*chromogranin A*
CPS	*kombinált pozitív pontszám*
CRPC	*kasztráció rezisztens prosztatarák*
CTNNB1	*catenin, beta-1*
DOC	*docetaxel*
EMMPRIN	*extracellular matrix metalloproteinase inducer*
ENZA	*enzalutamid*
ERCC1/2	*excision repair cross-complementation group 1/2*
ERG	*ETS-related gene*
ETS	*erythroblast transformation-specific*
ETV1/4	*ETS translocation variant 1/4*
FANCC	*Fanconi anaemia complementation group C*
FGFR	*fibroblastnövekedési faktor receptor*
FLI1	*friend leukemia integration 1 transcription factor*
FOXA1	*forkhead box protein A1*
HMGA2	*high-mobility group AT-hook 2*
IDH1	*isocitrate dehydrogenase 1*
IEG	*immunellenőrzőpont-gátló*
mCRPC	*metasztatikus kasztráció rezisztens prosztatarák*
MLH1	*human mutL homolog 1*
mRNS	*hírvivő/messenger RNS*
MSH2	*human mutS homolog 2*
mTOR	*mechanistic target of rapamycin*
NCOR1/2	*nuclear receptor corepressor 1/2*
NSE	*neuronspecifikus enoláz*
PARP	*poli(ADP-ribóz)-polimeráz*
PCR	*polimeráz-láncreakció*

PD1	*programozott sejthalál receptor-1*
PD-L1	*programozott sejthalál ligand-1*
PI3K	*foszfoinozitol-3-kináz*
PSA	*prosztata specifikus antigén*
PTEN	*phosphatase and tensin homolog*
RB1	*retinoblastoma1*
SPOP	*speckle-type POZ protein*
TCGA	*The Cancer Genome Atlas*
TMB	*tumor mutációs terhelés*
TMPRSS2	*transmembrane protease, serine 2*
TP53	*tumor protein P53*

Támogatás: A cikk az NKFIH (FK 124431), az NVKP (16-1-2016-004) és a Bolyai János Kutatási Ösztöndíj támogatásával készült. A közlemény végleges változatát a szerzők elolvasták és jóváhagyták. Érdekeltségek: A szerzőknek jelen cikkel kapcsolatban nincsenek érdekeltségeik.

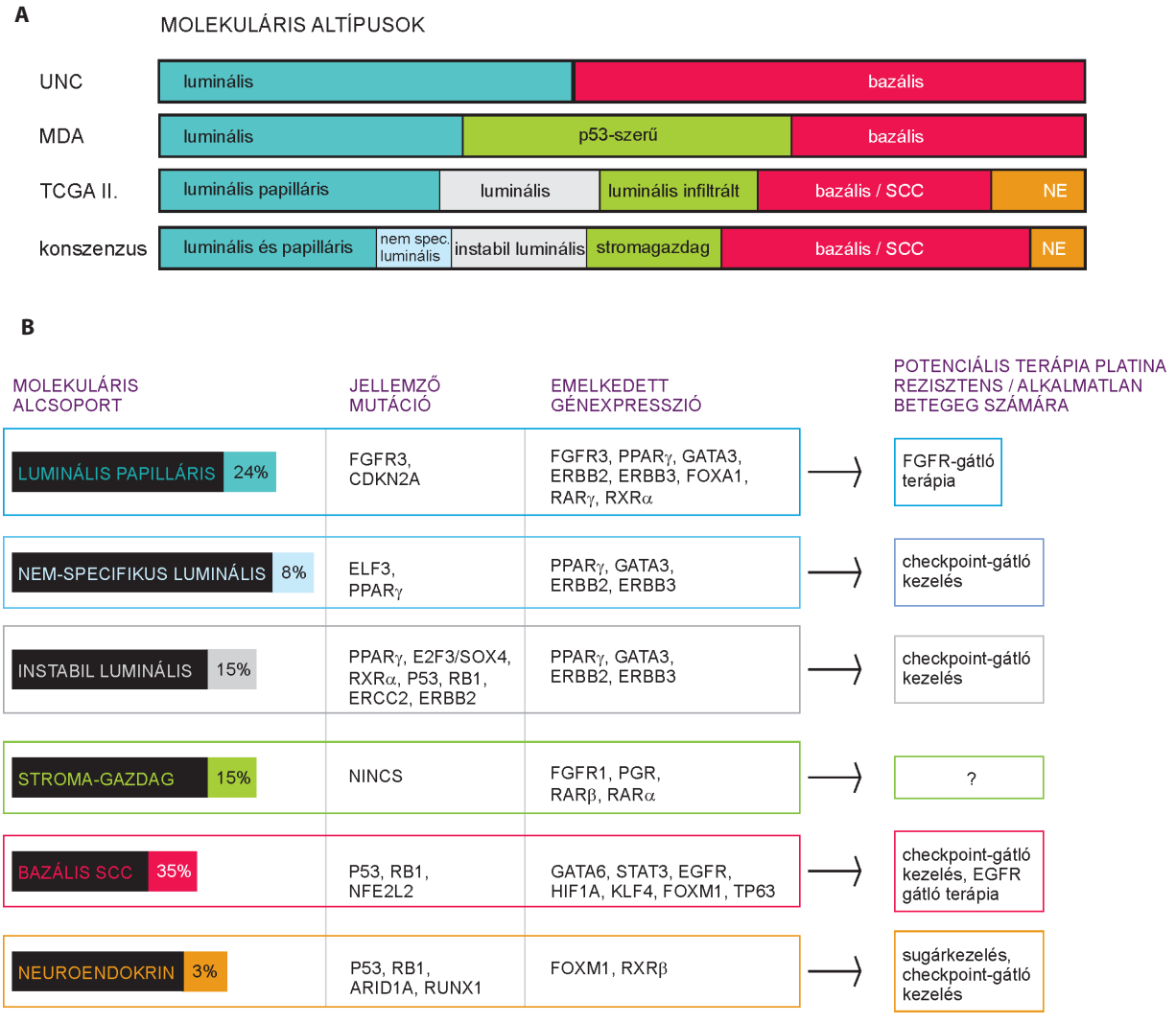
Húgyhólyagrák

A húgyhólyagrák a húgyutakat érintő leggyakoribb daganat, mely a Nemzeti Rákregiszter adatai alapján Magyarországon évente mintegy 3000 új megbetegedés mellett 900 halálozásért felelős.[1] Kezelési lehetőségeit a diagnosztikus transurethralis biopszia szövettani eredménye határozza meg. Az első diagnóziskor a betegek 70–80%-ánál nem izominvazív daganat igazolódik. Ezen betegek számára a transurethralis tumorrezekció magas recidíva, ám alacsony progressziós kockázat mellett igen jó, 90% feletti 5 éves túlélést biztosít. Ezzel szemben az izominvazív daganatok esetében a radikális hólyageltávolítással és a műtét előtt vagy után alkalmazott platinaalapú kemoterápiával is csupán 50% körüli 5 éves túlélés érhető el.[2] A húgyhólyagrákok több mint 90%-át kitevő urothelialis daganatok gyógyszeres kezelésére hosszú ideig csupán a műtét előtti neoadjuváns, a műtét után alkalmazott adjuváns, illetve a késleltetett módon alkalmazott platina-alapú kemoterápia állt rendelkezésre. Az elmúlt években azonban a terápiás lehetőségek bővültek, így ma a kemoterápiás kezelés alatt vagy az azt követő 3 hónapon belül progrediáló betegek számára másodvonalban, illetve kemoterápiára alkalmatlan betegek számára elsővonalban is elérhetővé vált az immunellenőrzőpont-gátló (IEG) terápia, mely a betegek 15–30%-ában tartós túlélést biztosít.[3-4] Továbbá a megfelelő genetikai eltérést hordozó betegek számára egyes országokban már adható az FGFR-molekulát célzó terápia is.[5] Ezzel párhuzamosan átfogó molekuláris vizsgálatok eredményeképpen kifejlődött az izominvazív húgyhólyagdaganat molekuláris alcsoportbeosztása, mely a jövőben támpontot nyújthat a terápiaválasztásban is.[6]

A húgyhólyagrák molekuláris alcsoportbeosztása

A húgyhólyag urothel eredetű izominvazív daganatainak teljes (több tízezer génre vonatkozó) génexpressziós mintázatát vizsgálva az első tanulmányok azt találták, hogy ez a tumorféleség két, esetszámát tekintve hasonló méretű ún. *luminális és bazális alcsoportra* osztható.[7] A további vizsgálatok a bazális és a luminális csoportok mellett egy, a stromasejtek génexpressziójával jellemezhető „p53-típusú" alcsoportot is elkülönítettek, mely csoport csökkent platina-érzékenységét emelték ki.[8] Ezzel párhuzamosan különböző kutatócsoportok több, egymástól eltérő alcsoportbesorolást is javasoltak, ám ezek a két fő csoport, a luminális és bazális típusok megtartása mellett azok lehetséges további alcsoportokra osztásának szempontjaiban tértek el egymástól.[9-10] Közülük az ún. TCGA II (The Cancer Genome Atlas) vizsgálat emelendő ki, hiszen mindmáig ez a legnagyobb esetszámot felölelő tanulmány, mely több mint 400 izominvazív daganat eredményeit dolgozta fel.[10] Ebben a luminális csoportot három alcsoportba; luminális, luminális papilláris és luminlális infiltrált csoportba osztották tovább, valamint a bazális mellett egy ritkább, azonban igen rossz prognózisú neuronális alcsoportot is azonosítottak.[10] A luminális papilláris izominvazív alcsoporba tartozó daganatokról morfológiai sajátságaik, valamint génexpressziós és mutációs mintázatuk alapján jó okkal feltételezhető, hogy ezek kezdetben nem invazív daganatok progressziójával alakultak ki. Ezt támasztja alá az is, hogy a nem izominvazív daganatok szinte kizárólag luminális papilláris alcsoportra jellemző mintázatot mutatnak. Ezzel szemben a bazális daganatok valószínűleg ettől eltérő patomechanizmus szerint alakulnak ki. Az alcsoportbeosztásra tett növekvő számú javaslat egyre átláthatatlanabb helyzetet eredményezett, melynek végül a közelmúltban a terület vezető csoportjai által megalkotott ún. konszenzus klasszifikáció kialakításával sikerült elejét venni *(1/A ábra)*.[11]

A különböző alcsoportok prognosztikai szempontból és a különböző terápiákra adott válaszok szempontjából is különbségeket mutatnak. Így például a luminális alcsoportú betegek prognózisa kedvezőbb a bazális csoporthoz képest, míg a bazális alcsoporttal kapcsolatban a platinaalapú kemoterápia iránti érzékenység merült fel,[12] ami azonban egyelőre további megerősítésre vár. Ugyanakkor a luminális instabil és a



1. ábra: Az izominvazív húgyhólyagrák alcsoport besorolásai. A: Az elmúlt évek legmeghatározóbb, génexpressziós alapon javasolt alcsoportjai, több kutatócsoport ajánlásai alapján. NE-neuronális/neuroendokrin alcsoport. B: A konszenzus alapján meghatározott alcsoportbeosztás, a csoportokra jellemző molekuláris eltérésekkel és terápiás lehetőségekkel. (Szarvas T, Oláh C, Riesz P, Géczi L, Nyirády P. Molecular subtype classification of urothelial bladder cancer and its clinical relevance Orv Hetil. 2019; 160:1647-1654. (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0)

neuronális csoportok esetében a IEG kezelések hatékonysága emelhető ki *(1/B ábra)*.

Jelenleg a konszenzus klasszifikáció terápiás relevanciáját számos folyamatban lévő gyógyszerkísérletben prospektív módon is vizsgálják, így várható, hogy a közeljövőben a molekuláris alcsoportvizsgálat bekerül a klinikai gyakorlatba, fontos támpontot szolgáltatva a terápiaválasztásban.

A platinaalapú kemoterápia hatékonyságának előrejelzése

Az izominvazív húgyhólyagrákos betegek számára elérhető újfajta kezelési lehetőségek megjelenésével felmerül a kérdés, hogy mely beteg számára, melyik kezelés a leghatékonyabb? A molekuláris alcsoportok közül eddig a „p53-szerű” csoport platinarezisztenciáját, míg a bazális alcsoport fokozott érzékenységét írták le.[8,12]

Egy további munkában *Pietzak és munkatársai* azt találták, hogy azok a „szekunder invazív” daganatok, melyek egy korábban igazolt nem izominvazív daganat progressziójával alakultak ki, kisebb érzékenységgel válaszoltak a neodajuváns platina terápiára, mint azok, akiknél már az első diagnózis idején izominvazív daganatot diagnosztizáltak („primer invazív”).[13] Ez egybevág azzal a megfigyeléssel, hogy a „szekunder invazív”

daganatok a luminális papilláris alcsoporthoz tartoznak, melyről ismert, hogy kevésbé reagál a platina-alapú kemoterápiára az a csoport.[14]

A daganatban található mutációk is előrejelezhetik a kemoterápia iránti érzékenységet. Az *ERCC2* gén funkcióvesztő mutációi és a platina-alapú kemoterápia iránti érzékenység közötti összefüggést több független vizsgálat is meggyőzően igazolta.[13,15] Az *ERCC2* az ún. nukleotid excíziós repair egyik génjeként a DNS-hibajavító mechanizmusban vesz rész. A platina-terápia az osztódó sejtek DNS-károsításán keresztül fejti ki tumorellenes hatását, melyet a szervezet fiziológiásan működő DNS-hibajavító mechanizmusa képes kijavítani. Az *ERCC2* funkcióvesztése esetén a platina terápia által okozott DNS-károsodás nem javítódik ki, és ezáltal az erősebb terápiás hatást tud kiváltani. Ennek megfelelően az *ERCC2* funkcióvesztő mutációit hordozó daganatok esetében a platinaalapú kemoterápia igen hatékonynak bizonyult.[16] A módszer pozitív prediktív értéke száz százalékhoz közelít, tehát a mutációt hordozó betegek szinte mind jól reagálnak a platina kezelésre.[16] A negatív prediktív értéke viszont sajnos nem elég magas, így egy egészséges (vad típusú) *ERCC2* gént tartalmazó daganat nem biztos, hogy nem reagál jól a kemoterápiára.[16] Az ERCC2 mellett további DNS-hibajavítással kapcsolatos gének, mint az ATM, RB1 és FANCC terápiaprediktív értékét is sikerült igazolni.[17] Az immunhisztokémiai markerek közül az ERCC1, az EMMPRIN és a HMGA2 emelhető ki, mint a platinaalapú kemoterápia ígéretes markerei.[18-20]

Az immunellenőrzőpont-gátló terápia hatékonyságának előrejelzése

A tumorsejtek képesek az ellenük kialakuló immunválasz csendesítésére, melyhez olyan molekulákat, ligandokat (PD-L1) termelnek, melyek az aktivált T-sejtek receptoraihoz (PD1) kötődve képesek azok működését blokkolni. Az IEG terápiák ezt a gátlást képesek blokkolni, kiváltva ezzel a tumor immunsejtek általi elpusztítását. Magyarországon mind PD-L1 gátló (atezolizumab, Tecentriq, 1. és 2. vonalban, valamint pembrolizumab, Keytruda 1. és 2. vonalban), mind pedig PD1-gátló (nivolumab, Opdivo, 2. vonalban) szerek elérhetők húgyhólyagrákos betegek számára. Elsővonalban az IEG kezelés jelenleg csak azoknak a betegeknek érhető el, akik kemoterápiával történő kezelése nem lehetséges. Ilyenkor a szer alkalmazásához PD-L1 immunhisztokémiai vizsgálat elvégzése szükséges, melynek során atezolizumab esetén az immunsejtek legalább 5%-nak kell (IC2/3) festődést mutatni, míg a pembrolizumab esetén egy kombinált pontszám (CPS) ≥10 elérése szükséges.[21] Az immunhisztokémiai módszer (antitest, szekunder reagensek, automata) megválasztására vonatkozóan nincsenek megkötések. A másodvonalban (kemoterápia alatt és után progrediáló betegek számára) történő alkalmazáshoz nincs szükség előzetes immunhisztokémiai vizsgálatra.

Az IEG terápia, hatékonyságára vonatkozóan azonban az immunhisztokémiai vizsgálatok is csupán korlátozott becslést tesznek lehetővé, ezért további prediktív markerek azonosítására van szükség. A kísérleti stádiumban lévő markerek közül a tumorban található mutációk mennyisége emelhető ki, melyet az egységnyi DNS szakaszra jutó átlagos mutációs szám (tumor mutational burden – TMB) fejez ki. A magasabb TMB érték az IEG kezelésre adott jobb terápiás válasszal mutat összefüggést.[22] Ennek hátterében a több mutáció következtében termelődő több abnormális, és ezért az immunrendszer által idegen antigénként felismert fehérje jelenléte áll. Ezek az ún. neoantigének kiváltják a szervezet immunválaszát, mely az ilyen daganatok szövettanilag is megfigyelhető erősebb gyulladásos beszűrődésében is megnyilvánul. Ismert, hogy a gyulladásos területeket tartalmazó ún. „immun-forró" fenotípusú tumorok jobban reagálnak az IEG-kezelésre. Nem meglepő tehát, hogy a CD8+ T-sejtek tumorszövetben történő jelenléte és mennyisége is pozitív korrelációt mutat az IEG-kezelés hatékonyságával.[23]

Az IEG kezeléssel kapcsolatban is elmondható, hogy a különböző molekuláris alcsoportokba tartozó daganatok eltérő érzékenységgel reagálnak a kezelésre. A konszenzus klasszifikáció szerinti ún. „nem specifikus luminális", „instabil lumiális" és „neuroendokrinszerű" alcsoportok reagálnak kedvezően az IEG kezelésre.[11,24] Ezek a megfigyelések bár nagyobb esetszámot felölelő prospektív vizsgálatokból származnak, azonban a mindennapi gyakorlatban történő felhasználásuk előtt további validációra van szükség.

A bélrendszerben élő mikrobaközösség összetételének komoly jelentőséget tulajdonítanak a daganatos megbetegedések vonatkozásában. A bél mikrobiomközössége hatással van a szervezet immunitására. Ez a hatás magyarázhatja azokat a kutatási eredményeket melyek jelentős eltéréseket igazoltak a IEG-kezelésre jól, illetve rosszul reagáló daganatos betegek bélmikrobiom-összetételében. A kezdeti igencsak ígéretes eredmények a gastrointestinalis mikrobiom-összetételének az egyénre szabott terápiás döntéshozatalban való jövőbeni alkalmazását is előrevetítik.[25-29] Továbbá már elindultak azok a prospektív klinikai kutatások, melyekben a mikrobiom mesterséges, célzott megvál-

toztatásán keresztül próbálják fokozni az IEG-terápiák hatékonyságát.

További célzott terápiás lehetőségek

Az erdafitinib egy orálisan alkalmazható FGFR1-4 tirozin kináz inhibitor, mely metasztatikus húgyhólyagrákos betegek kezelésére másodvonalban (platina terápia után) alkalmazható abban az esetben, ha bizonyos *FGFR2* és *FGFR3* géneket érintő eltérés a daganatban kimutatható.[5] Az ide vonatkozó fázis 2-es klinikai vizsgálatban az *FGFR2* és *FGFR3* eltéréseket hordozó betegek 40%-a pozitív radiológiai válasszal reagált a kezelésre.[5] A szer jelenleg még csak az Egyesült Államokban rendelhető, ahol az *FGFR3* gén mutációs mintázatának vizsgálatához egy PCR alapú assay (Therascreen, FGFR RGQ RT-PCR Kit, Qiagen) is elérhető, mely a 7-es és a 10-es exonon előforduló 4, a terápia szempontjából prediktív mutáció jelenlétét, továbbá az *FGFR3* gén fúziós elváltozásait is kimutatja. A kit által ugyancsak kimutatható *FGFR2* gén fúziós eltéréseinek terápiás relevanciája azonban még nem igazolt. A molekuláris alcsoportok közül a „luminális papilláris" alcsoportban mind az FGFR3 eltérései, mind pedig expressziója domináns, így az ehhez az alcsoporthoz tartozó daganatok nagyobb valószínűséggel reagálnak az FGFR-gátló kezelésre.

Prosztatarák

A prosztatarák a férfiak második leggyakoribb daganattípusa, mely hazánkban évente mintegy 4500 új megbetegedésért és 1300 halálesetért tehető felelőssé.[1] A betegség klinikai és biológiai megjelenését tekintve igen heterogén képet mutat. A korai stádiumú, lokális prosztatarákok esetében a klinikailag veszélytelen és ezért aktív kezelést nem igénylő ún. indolens daganatoknak a beavatkozást igénylő agresszív daganatoktól való elkülönítése jelent problémát. A lokálisan előrehaladott, metasztatikus prosztatarákok esetében pedig az androgén megvonásos terápiával szemben kialakuló érzéketlenség okoz problémát. Az androgén megvonásra a prosztatadaganatok túlnyomó többsége kezdetben jól reagál, azonban jellemzően 1–2 év után szinte minden esetben kialakul a kasztrációrezisztens állapot. A kasztrációrezisztens prosztatarákos (CRPC) betegek kemoterápiában, újgenerációs antiandrogén terápiában és csontáttét esetén alfa-sugárzó terápiában részesülhetnek. A kezelésekre adott válaszok egyénenként eltérnek és számos esetben figyelhető meg kezdeti vagy a kezelés során kialakuló rezisztencia. Ez az eltérő viselkedés a tumorok molekuláris háttérének különbözőségeire vezethető vissza.

Az előrehaladott, metasztatikus prosztatarák terápia rezisztenciája

A metasztatikus CRPC kezelésében több mint másfél évtizede elsővonalbeli kezelés a docetaxel (DOC) kemoterápia. A DOC mellett az elmúlt években újabb készítményekről derült ki, hogy szignifikánsan képesek növelni a betegek túlélését és életminőségét. A DOC kezelésre nem reagáló betegek számára elérhetővé vált a kabazitaxel, valamint megjelentek az újgenerációs androgén támadáspontú készítmények is, az enzalutamid (ENZA) és az abirateron (ABI). Azonban itt is elmondható, hogy a prosztatadaganatok e kezelésre adott válasz szempontjából is igen nagy heterogenitást mutatnak, ezért a megfelelő terápia megválasztásához a terápiarezisztencia előrejelzésére van szükség. Az ehhez szükséges prediktív biomarkerek felkutatására jelenleg is nagy erőfeszítések folynak.

A DOC hatását a mikrotubulusok tubulin molekuláihoz kapcsolódva éri el, melynek következtében a sejtosztódás megáll és a sejt apoptózis következtében elpusztul. A DOC rezisztencia kialakulását leggyakrabban az ABC-transzporterekkel hozzák összefüggésbe. DOC rezisztens sejtekben ezen pumpafehérjék száma megsokszorozódik a sejtmembránban, ezáltal nagyobb mennyiségben képesek kipumpálni a DOC-t a sejtekből.[30] A DOC-rezisztens betegeknek adható kabazitaxel azért lehet ilyenkor is hatékony, mert a pumpafehérjék kevésbé képesek eltávolítani, mint a docetaxelt.

Az ABI és az ENZA mind első, mind másodvonalban alkalmazva szignifikánsan javítja az mCRPC betegek túlélését és életminőségét. Az ABI hatását az androgén-bioszintézis gátlásán keresztül, míg az ENZA az AR-receptor gátlásával, sejtmagba jutásával és átíródásának blokkolásával fejti ki. Ezért nem meglepő, hogy a leggyakrabban előforduló rezisztencia mechanizmusok az AR eltéréseihez köthetők. Az eltérések alapvetően háromfélék lehetnek; (1) járhatnak az AR gén számbeli növekedésével (AR-amplifikáció), (2) egyes pontmutációk kiválthatják az AR fokozott aktivitását, illetve (3) a gén mRNS-szinten történő eltérései (splice variánsai) is szabályozatlan túlaktivitáshoz vezethetnek. Az AR-receptor amplifikációja során többszörös kópiaszámban jelenik meg az AR-gén, melynek következtében a funkcióképes AR fehérje mennyisége is megnövekedik az adott sejtben, ami mCRPC betegeknél összefüggést mutat az ABI/ENZA kezelésre adott rosszabb válasszal.[31] Az AR-t érintő aktiváló mutációk

többnyire a ligandkötő domént érintik, és hatásukra az AR már nemcsak az őt fiziológiásan aktiváló dihidrotesztoszteron, hanem egyéb szteroid szerkezetű endogén molekulák (ösztrogén, progeszteron, glükokortikoidok) és gyógyszerek (bicalutamid, enzalutamid, egyes gyulladáscsökkentő szteroidok) bekötődésére is aktiválódik kiváltva a prosztatadaganat növekedését. Terápiás szempontból igen fontos az AR splice variánsának, az AR-V7-nek a szerepe, mely a prosztatarákos betegek 10–30%-ban előfordul. Az AR-V7 egy olyan csonkolt AR fehérje, mely ligandkötő régió nélkül is folyamatosan aktív jelet közvetít a tumorsejtnek, így annak aktivitása az androgének jelenlététől független. Számos egymástól független tanulmány is kimutatta, hogy az AR-V7 jelenléte az ABI/ENZA terápiák elleni rezisztenciával jár együtt. Ugyanakkor ezek a betegek jobban reagálnak a DOC kezelésre.[32] Az AR-V7 kimutatása történhet vérből izolált keringő tumorsejtekből RNS szinten, real-time PCR technikával vagy fehérje szinten immunhisztokémiával. Jelenleg kereskedelmi forgalomban két kit is elérhető, az EPIC Science kit és az AdnaTest.[33]

A DNS-hiba-javításban szerepet játszó *BRCA2* és *ATM* gének szomatikus eltérési is összefüggésben lehetnek az újgenerációs androgén támadáspontú gyógyszerek elleni rezisztenciával. Egy nagy esetszámú kutatásban, amelyben ENZA és ABI kezelt betegeket vizsgáltak, a betegek 7%-nál találtak *BRCA2* vagy *ATM* mutációt, ami összefüggést mutatott a rosszabb progressziómentes túléléssel.[34] A *BRCA2* és *ATM* eltérései viszont a PARP inhibitor terápia sikerességét vetítik előre, kiemelve a molekuláris vizsgálatok potenciális jelentőségét a terápia szekvencia megválasztásában.

A prosztatarákok többsége már a betegség korai stádiumában is tartalmaz neuroendokrin típusú tumorsejteket is. Ezek közös tulajdonsága, hogy nem termelnek PSA-t, érzéketlenek az antiandrogén kezelésekre és agresszív viselkedésűek. Androgén kezelés hatására éppen ezért kiszelektálódnak és kasztrációrezisztens állapot elérésekor már sokkal nagyobb számban vannak jelen és gyakran meghatározzák a betegség súlyosabb lefolyását. Az ilyen, terápia által kiszelektálódott neuroendokrin daganatok többnyire ellenállóbbak az ABI és ENZA terápiákra is. Ezzel összhangban a neuroendokrin szérummarkerek, mint a chromogranin-A (CGA) és neuronspecifikus enoláz (NSE) emelkedett szintjei összefüggést mutatnak az ABI és ENZA kezelés csökkent hatékonyságával.[35,36]

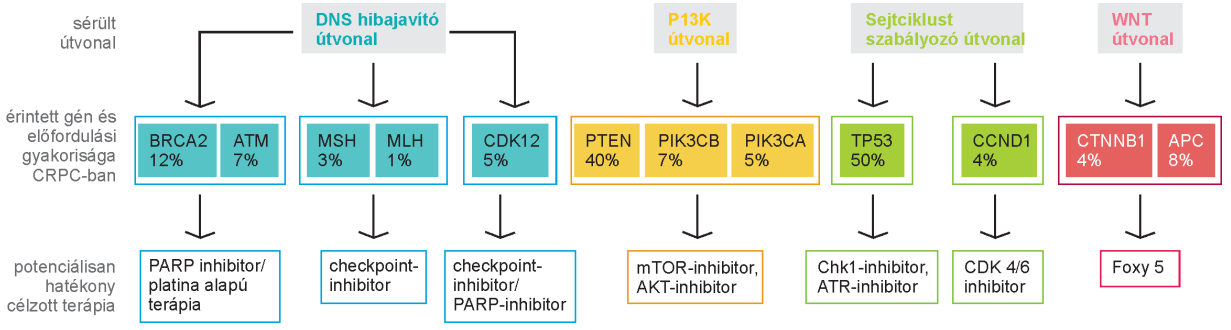
A prosztatarákban leggyakrabban sérült szabályozási útvonalak és azok célzott kezelésének lehetőségei

Az elmúlt években a molekuláris biológiai módszerek fejlődésének köszönhetően megtörtént a tumorok átfogó molekuláris vizsgálata, ami magába foglalta a teljes genom, epigenom, transzkriptom, valamint proteom analízisét, és ezáltal lehetővé tette mind a lokális, mind pedig az előrehaladott prosztatarák molekuláris hátterének megértését. Az eredmények alapján azonosították a prosztatarák kialakulásában és progressziójában leggyakrabban érintett szignálútvonalakat is *(2. ábra)*.

A metasztatikus, előrehaladott prosztatarák esetében a leginkább érintett gén az androgén receptor (AR), melynek eltérései (amplifikációja vagy mutációi) az esetek több mint 60%-ban jelen vannak. Ezzel szemben a lokális prosztatarákokban az AR közvetlenül csupán 1–2%-ban érintett, az AR jelpálya további tagjai, mint a FOXA1, NCOR1, -2, SPOP viszont mind a lokális (~5%), mind pedig az előrehaladott (~11%) prosztatarákban előfordulnak.[37,38]

Terápiás szempontból különösen értékes célpontot jelentenek a DNS-hibajavító mechanizmusának sérülései. A DNS-hibajavító mechanizmus génjei közül prosztatarák esetében az *ATM* és *BRCA2* sérülési emelhetők ki. A *BRCA2* és egyéb DNS-hiba-javító génjeiben mutáns prosztatarákos betegeknél kedvező terápiás hatást lehet elérni PARP-inhibitorokkal. Ilyen PARP-inhibitor az olaparib, mely klinikai fázis 3 vizsgálatban szignifikánsan növelte a radiológiai progresszióig eltelt időt azoknál a betegeknél, akiknek tumorjuk a DNS hibajavító génjeiben hordoz mutációt.[39] Az olaparib mellett további PARP inhibitorokkal is folynak klinikai vizsgálatok, úgymint a velaparib, niraparib, rucaparib és a talazoparib.[40] Továbbá újabb vizsgálatok szerint platinaalapú készítményekkel is kedvező hatást lehet elérni olyan betegeknél, akik *BRCA2* mutációt hordoznak és korábban progrediáltak docetaxel, enzalutamid vagy abirateron terápiára.[41] Ezen hibák mellett ritkán, 1–2%-ban fordulnak elő a mismatch repair gének (legtöbbször a *MLH1*, *MSH2*) hibái, melyek mikroszatellita instabilitást eredményeznek. Ezeknél a tumoroknál ismert az IEG kezelések hatékonysága. Jelenleg számos klinikai vizsgálat folyik prosztatarákban IEG kezelésekkel.[40]

Az AR jelpálya után a második leggyakrabban sérült útvonala a PI3K szignálút. Az útvonal fokozott aktivitásának hátterében többnyire a PTEN homozigóta deléciója és mutációja áll, mely primer prosztatarák



2. ábra: A prosztatarákban leggyakrabban sérült szabályozási útvonalak és azok célzott kezeléseinek lehetőségei (Szarvas T, Csizmarik A, Szűcs M, Nyirády P. Molecular subtypes and perspectives of targeted therapies in prostate cancer Orv Hetil. 2019; 160:252-263. (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0)

esetében ~15%-ban, metasztatikus betegeknél pedig 40%-ban fordul elő.[37,38] Előrehaladott prosztatarákban a *PTEN* eltérései mellett gyakoriak a *PI3KCA* és *PI3KCB gének* mutációi is. Jelenleg számos célzott terápiás szer – mTOR, AKT és PI3Kβ inhibitor – áll klinikai tesztelés alatt, melyek hatékonysága leginkább a fenti mutációk jelenléte esetén várható.40

A sejtciklus szabályozásában résztvevő gének is gyakran szenvednek sérülést prosztatarákban. A *TP53* gén mutációi lokális stádiumban 8%-ban, míg előrehaladott stádiumban 50%-ban fordulnak elő. Továbbá a *RB1* gén és a sejtciklus szabályozásában részt vevő ciklinek és ciklindependens kinázok is gyakran érintettek a prosztatarák kialakulásában.[37,38] Ezen genetikai eltérések terápiás jelentősége felértékelődhet abban az esetben, ha a jelenleg klinikai kipróbálás alatt álló CDK4/6 inhibitorok hatékonynak bizonyulnak.[40]

Főleg előrehaladott, metasztatikus prosztatarák esetében fordul elő a Wnt szignálút génjeinek sérülése. CRPC-ben az *APC* és *CTNNB1* gének érintettsége 8% és 4%.[37,38] Az útvonal gátlására szolgáló klinikai kipróbálás alatt álló szerek a Foxy-5 molekula, az ipafricept, valamint az LGK974, porcupin inhibitor.[40]

A prosztatarák molekuláris alcsoportbeosztása

A tumorok átfogó molekuláris vizsgálata lehetővé tette, hogy a prosztatarákokat genetikai eltéréseik alapján jól elkülönülő alcsoportokba sorolják. A molekuláris alcsoportbeosztás a több mint 300 primer prosztatadaganat- és 150 prosztatametasztázis-mintát vizsgáló TCGA tanulmány alapján történt. A legnagyobb alcsoportot az ETS transzkripciós faktorokat érintő mutációkkal rendelkező prosztatarákok alkotják, melyek az esetek több mint 50%-át teszik ki. Az ETS transzkripciós faktor családon belül az ERG-TMPRSS2 génfúzió a leggyakoribb, de az *ETV1*, *ETV4*, és *FLI1* gének is fúziós mutánst alkothatnak a *TMPRSS2* génnel. A fúzió hatására az ERG androgén szabályozás alá kerül, így nagyobb mennyiségben termelődve képes az általa szabályozott gének fokozott expressziójával a tumorsejtek növekedését serkenteni. Az *ERG* mutációt hordozó tumorok klinikai relevanciája jelenleg is aktív kutatás tárgyát képezi. A további alcsoportokat a *FOXA1*, *SPOP*, és *IDH1* mutációval rendelkező prosztatatumorok alkotják.[37,38] Továbbá, a legújabb vizsgálatok alapján sikerült egy újabb altípust elkülöníteni, mely a *CDK12* gén elvesztésével jellemezhető.[42] Azonban fontos megjegyeznünk, hogy a molekuláris alcsoportok terápiás relevanciájának felderítése még további kutatásokat igényel.

Irodalom

1. Kásler M, Ottó Sz, Kenessey I. The current situation of cancer morbidity and mortality in the light of the National Cancer Registry, Hungary. (A rákmorbiditás és -mortalitás jelenlegi helyzete a Nemzeti Rákregiszter tükrében.) Orv Hetil. 2017; 158:84-9.
2. Knowles MA, Hurst CD. Molecular biology of bladder cancer: new insights into pathogenesis and clinical diversity. Nat Rev Cancer 2015; 15:25-41.
3. Rosenberg JE, Hoffman-Censits J, Powles T, van der Heijden MS, Balar AV, Necchi A, et al. Atezolizumab in patients with locally advanced and metastatic urothelial carcinoma who have progressed following treatment with platinum-based chemotherapy: a single-arm, multicentre, phase 2 trial Lancet 2016; 387:1909-20.
4. Bellmunt J, de Wit R, Vaughn DJ, Fradet Y, Lee JL, Fong L, et al. Pembrolizumab as Second-Line Therapy for Advanced Urothelial Carcinoma. N Engl J Med. 2017; 376:1015-26.
5. Loriot Y, Necchi A, Park SH, Garcia-Donas J, Huddart R, Burgess E, et al. BLC2001 Study Group. Erdafitinib in Locally Advanced or Metastatic Urothelial Carcinoma. N Engl J Med. 2019; 381:338-48.

6. Szarvas T, Oláh C, Riesz P, Géczi L, Nyirády P. Molecular subtype classification of urothelial bladder cancer and its clinical relevance. Orv Hetil. 2019; 160:1647-54.
7. Damrauer JS, Hoadley KA, Chism DD, Fan C, Tiganelli CJ, Wobker SE, et al. Intrinsic subtypes of high-grade bladder cancer reflect the hallmarks of breast cancer biology. Proc Natl Acad Sci. 2014; 111:3110-5.
8. Choi W, Porten S, Kim S, Willis D, Plimack ER, Hoffman-Censits J, et al. Identification of Distinct Basal and Luminal Subtypes of Muscle-Invasive Bladder Cancer with Different Sensitivities to Frontline Chemotherapy. Cancer Cell. 2014; 25:152-65.
9. Sjödahl G, Lauss M, Lövgren K Chebil G, Gudjonsson S, Veerla S, et al. A molecular taxonomy for urothelial carcinoma. Clin cancer Res. 2012; 18:3377-68.
10. Robertson AG, Kim J, Al-ahmadie H Bellmunt J, Guo G, Cherniack AD, et al. Comprehensive Molecular Characterization of Muscle-Invasive Bladder Cancer. Cell. 2017; 171:1-17.
11. Kamoun A, Reyničs A De, Allory Y, Sjödahl G, Robertson AG, Seiler R, et al. The consensus molecular classification of muscle-invasive bladder cancer Authors Abstract Muscle-Invasive Bladder Cancer. Eur Urol. 2020; 77:420-33.
12. Seiler R, Douglas J, Kessel KE Van, van Rhijn, Winters B, Douglas J, et al. Impact of Molecular Subtypes in Muscle-invasive Bladder Cancer on Predicting Response and Survival after Neoadjuvant Chemotherapy. Eur Urol. 2017; 72:544-54.
13. Pietzak EJ, Zabor EC, Bagrodia A, Armenia J, Hu W, Zehir A, et al. Genomic Differences Between „Primary " and „Secondary" Muscle-invasive Bladder Cancer as a Basis for Disparate Outcomes to Cisplatin-based Neoadjuvant Chemotherapy. Eur Urol. 2018; 75:231-9.
14. Szarvas T, Olah C, Reis H. Neoadjuvant cisplatin-based chemotherapy in „primary" and „secondary" muscle-invasive bladder cancer — is it a surrogate for molecular subtypes? Transl Cancer Res. 2019; 8:S176-S179.
15. Allen EM Van, Mouw KW, Kim P, Iyer G, Wagle N, Al-Ahmadie H, et al. Somatic ERCC2 mutations correlate with cisplatin sensitivity in muscle-invasive urothelial carcinoma. Am Assoc Cancer Res. 2014; 4:1140-53.
16. Yoshida T, Kates M, Fujita K, Bivalacqua TJ, McConkey DJ. Predictive biomarkers for drug response in bladder cancer. Int J Urol. 2019; 26:1044-53.
17. Plimack ER, Dunbrack RL, Brennan TA, Andrake MD, Zhou Y, Serebriiskii IG, et al. Defects in DNA repair genes predict response to neoadjuvant cisplatin-based chemotherapy in muscle-invasive bladder cancer. Eur Urol. 2015; 68:959-67.
18. Matsumura N, Nakamura Y, Kohjimoto Y, Inagaki T, Nanpo Y, Yasuoka H, et al. The prognostic significance of human equilibrative nucleoside transporter 1 expression in patients with metastatic bladder cancer treated with gemcitabine-cisplatin-based combination chemotherapy. BJU Int. 2011; 108:E110-6.
19. Als AB, Dyrskjøt L, von der Maase H, Koed K, Mansilla F, Toldbod HE, et al. Emmprin and survivin predict response and survival following cisplatin-containing chemotherapy in patients with advanced bladder cancer. Clin Cancer Res. 2007; 13:4407-14.
20. Krafft U, Tschirdewahn S, Hess J, Harke NN, Hadaschik B, Olah C, et al. Validation of survivin and HMGA2 as biomarkers for cisplatin resistance in bladder cancer. Urol Oncol. 2019; 37:810.e7-810.e15.
21. Reis H, Grünwald V, Szarvas T. Predictive biomarkers in oncologic uropathology. Pathologe. 2019; 40:264-75.
22. Balar AV, Galsky MD, Rosenberg JE, Powles T, Petrylak DP, Bellmunt J, et al. Atezolizumab as first-line treatment in cisplatin in eligible patients with locally advanced and metastatic urothelial carcinoma: a single-arm, multi-centre, phase 2 trial. Lancet 2017; 389:67-6.
23. Mariathasan S, Turley SJ, Nickles D, Castiglioni A, Yuen K, Wang Y, et al. TGFbeta attenuates tumour response to PD-L1 blockade by contributing to exclusion of T cells. Nature 2018; 554:544-8.
24. Kim J, Kwiatkowski D, Mcconkey DJ, Meeks JJ, Freeman SS, Bellmunt J, et al. The cancer genome atlas expression subtypes stratify response to checkpoint inhibition in advanced urothelial cancer and identify a subset of patients with high survival probability. EurUrol 2019; 75:961-4.
25. Sivan A, Corrales L, Hubert N, Williams JB, Aquino-Michaels K, Earley ZM, et al. Commensal Bifidobacterium promotes antitumor immunity and facilitates anti - PD-L1 efficacy. Science 2015; 350:1084-9.
26. Matson V, Fessler J, Bao R, Chongsuwat T, Zha Y, Alegre ML, et al. The commensal microbiome is associated with anti - PD-1 efficacy in metastatic melanoma patients. Science 2018; 359:104-8.
27. Gopalakrishnan, Spencer CN, Nezi L, Reuben A, Andrews MC, Karpinets TV, et al. Gut microbiome modulates response to anti - PD-1 immunotherapy in melanoma patients. Cancer Immunother 2018; 103:97-103.
28. Frankel AE, Coughlin LA, Kim J, Froehlich TW, Xie Y, Frenkel EP, et al. Metagenomic Shotgun Sequencing and Unbiased Metabolomic Profiling Identify Specific Human Gut Microbiota and Metabolites Associated with Immune Checkpoint Therapy Efficacy in Melanoma Patients. Neoplasia 2017; 19:848-55.
29. Chaput N1, Lepage P, Coutzac C, Soularue E, Le Roux K, Monot C, et al. Baseline gut microbiota predicts clinical response and colitis in metastatic melanoma patients treated with ipilimumab. Ann. Oncol. 2017; 28:1368-79.
30. Szakács G, Paterson J, Ludwig J, Booth-Genthe C, Gottesman MM. Targeting multidrug resistance in cancer. Nat. Rev. Drug Discov. 2006; 5: 219-34.
31. Conteduca V, Wetterskog D, Sharabiani MTA, Grande E, Fernandez-Perez MP, Jayaram A, et al. Androgen receptor gene status in plasma DNA associates with worse outcome on enzalutamide or abiraterone for castration-resistant prostate cancer: a multi-institution correlative biomarker study. Ann Oncol. 2017; 28:1508-16.
32. Bastos DA, Antonarakis ES. CTC-derived AR-V7 detection as a prognostic and predictive biomarker in advanced prostate cancer. Expert Rev Mol Diagn. 2018; 18:155-163.
33. Armstrong AJ, Halabi S, Luo J, Nanus DM, Giannakakou P, Szmulewitz RZ, et al. The PROPHECY trial: Multi-center prospective trial of circulating tumor cell (CTC) AR-V7 detection in men with mCRPC receiving abiraterone (A) or enzalutamide (E). J Clin Oncol. 2018; 36:5004.
34. Annala M, Vandekerkhove G, Khalaf D, Taavitsainen S, Beja K, Warner EW, et al Circulating tumor DNA genomics correlate with resistance to abiraterone and

enzalutamide in prostate cancer. Cancer Discov. 2018; 8:444-57.

35. Heck MM, Thaler MA, Schmid SC, Seitz AK, Tauber R, Kübler H, et al. Chromogramin A and neurone-specific enolase serum levels as predictors of treatment outcome in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer undergoing abiraterone therapy. BJU Int. 2017; 119:30-37.
36. Szarvas T, Csizmarik A, Fazekas T, Hüttl A, Nyirády P, Hadaschik B, et al. Comprehensive analysis of serum chromogranin A and neuron-specific enolase levels in localized and castration-resistant prostate cancer BJU Int. 2020; doi.org/10.1111/bju.15086
37. Cancer Genome Atlas Research Network. The molecular taxonomy of primary prostate cancer. Cell. 2015; 163:1011-1025.
38. Robinson D, Van Allen EM, Wu Y-M, Schultz N, Lonigro RJ, Mosquera JM, et al. Integrative clinical genomics of advanced prostate cancer. Cell. 2015; 161:1215-1228.
39. Hussain M, Mateo J, Fizazi K, Saad F, Shore ND, Sandhu S, et al. LBA12_PR - PROfound: Phase III study of olaparib versus enzalutamide or abiraterone for metastatic castration-resistant prostate cancer (mCRPC) with homologous recombination repair (HRR) gene alterations. Anal Oncol 2019; 30:881-882.
40. Szarvas T, Csizmarik A, Szűcs M, Nyirády P. Molecular subtypes and perspectives of targeted therapies in prostate cancer Orv Hetil. 2019; 160:252-263.
41. Cheng HH, Pritchard CC, Boyd T, Nelson PS, Montgomery B. Biallelic inactivation of BRCA2 in platinum-sensitive metastatic castration-resistant prostate cancer. Eur Urol. 2016; 69:992-995.
42. Wu YM, Cieślik M, Lonigro RJ, Vats P, Reimers MA, Cao X et al. Inactivation of CDK12 delineates a distinct immunogenic class of advanced prostate cancer. Cell. 2018; 173:1770-1782.

SEMMELWEIS KIADÓ SZAK- ÉS TANKÖNYVEI

Gasztroenterológia

Könyveink megvásárolhatók a Legendus Könyvesboltban, illetve a Líra Kereskedelmi hálózaton belül az egész országban, de egyre nagyobb igényt elégít ki webshopunk.

Bodoky György, Kopper László (szerk)

GASZTROENTEROLÓGIAI ONKOLÓGIA

Az epidemiológiától és szűréstől kiindulva a molekuláris ismereteken keresztül jelennek meg a patológiai, a képalkotói diagnosztika, a sebészi, a gyógyszeres és a sugárterápia legapróbb részletei. A könyv első része fontos általános elveket foglal össze, majd szervenként tárgyalja a betegségek előfordulását, megelőzésük lehetőségeit, illetve a szűrővizsgálatok szerepét. A diagnózis felállításának elemzésekor a betegség patológiai és molekuláris biológiai hátterét, a képalkotó diagnosztika egyre bővülő eszköztárát, a gasztroenterológiai kivizsgálás szerepét tekinti át, majd kitér a legfontosabb sebészi, klinikai onkológiai és sugárterápiás kezelési lehetőségekre. Végül, a könyv befejező részében a szupportív terápia különböző kérdései jelennek meg.

Elsősorban a gasztroenterológiában érintett szakembereknek, főleg a daganatos betegekkel foglalkozóknak szól.

554 oldal ■ Ára: 12 000 Ft helyett 2000 Ft

Könyvek E-könyvek Folyóiratok Apropó Poszter Box

Semmelweis Kiadó
1089 Budapest, Nagyvárad tér 4.
www.semmelweiskiado.hu

LEGENDUS KÖNYVESBOLT
1089 Budapest, Nagyvárad tér 4.
Tel.: 210-4408, 459-1500/56353
Nyitva tartás: H–Sz: 9.00–16.00,
Cs: 9.00–18.00, P: 9.00–14.00
E-mail: info@semmelweiskiado.hu

A májdaganatok kezelése a molekuláris biomarkerek korszakában

Treatment of liver cancer in the era of biomarkers

Dezső Katalin[1], Nagy Péter[1], Lohinszky Júlia[2]
[1] I. Sz.Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet, Semmelweis Egyetem, Budapest
[2] Belgyógyászati és Hematológiai Klinika, Semmelweis Egyetem, Budapest
E-levél: dezso.katalin@ med.semmelweis-univ.hu

ÖSSZEFOGLALÁS A tumor-biomarkerek nemcsak a korai szűrésben és diagnosztikában fontosak, de befolyásolhatják a terápiát, előrevetíthetik a rekurrenciát és meghatározhatják akár a prognózist is. A primer májdaganatok előfordulása meglehetősen gyakori, ezeknek a daganatoknak mind az incidenciája, mind pedig a halálozási rátája magas. A primer májdaganatok két leggyakoribb szövettani típusa a hepatocelullaris carcinoma és az intrahepaticus cholangiocarcinoma. Jelen közlemény megkísérli röviden összefoglalni a primer májdaganatok jelenleg ismert biomarkereit, a konvencionális vérből kimutatható biomarkerektől a hisztológiai biomarkereken át, a molekuláris biomarkerekig. A számos kezelési lehetőség és előrelépés ellenére a primer májdaganatok kezelése napjainkban is sok nehézségbe ütközik, így továbbra is a sebészi terápia tekinthető a teljes gyógyulást eredményező kezelésnek ezen daganattípus esetében.

KULCSSZAVAK májdaganatok, biomarkerek, hepatocellularis carcinoma, intrahepatikus cholangiocarcinoma

SUMMARY Tumor biomarkers are important in the early screening, diagnosis, therapeutic evaluation, recurrence, and prognosis prediction of tumors. Primary liver cancer is one of the most common malignant tumors; it has high incidence and mortality rates. The main histological types of primary liver cancer include hepatocellular carcinoma (HCC) and intrahepatic cholangiocarcinoma (ICC). In the present review, a systematic outline of the current biomarkers of primary liver cancer is presented, from conventional blood biomarkers to histochemical and molecular biomarkers. Despite these advancements and multimodality treatments available for this heterogeneous malignancy, primary liver cancer still remains a difficult-to-treat cancer, with surgical methods being the first line curative treatment for this type of malignancy.

KEY WORDS liver cancer, biomarkers, hepatocellular carcinoma, intrahepatic cholangiocarcinoma

Bevezetés

A primer májdaganatok két leggyakrabban előforduló szövettani típusa a hepatocellularis carcinoma és az intrahepatikus cholangiocarcinoma. Mindkét daganattípus incidenciája és mortalitása világszerte emelkedő tendenciát mutat. A primer májdaganatok elsődleges kezelése, amennyiben a beavatkozás után megfelelő májfunkció és R0 resectio biztosítható, mindenképpen a sebészi resectio.

A hepatocellularis carcinoma leggyakrabban cirrhoticus májban alakul ki és ezen daganattípus kezelésének alapja a Barcelona Clinic Liver Cancer (BCLC) szerinti stádium. A hepatocellularis carcinoma esetében a máj állapotától és a tumormérettől függően szóba jöhet az abláció, vagy amennyiben a tumor mérete Mi-

Rövidítések

AFP	*alfa-fetoprotein*
AFU	*alfa-fukozidáz*
BRAF	*v-raf-rágcsálószarkóma virális onkogén homológ B1*
cAMP	*ciklikus adenozin-monofoszfát*
CTNNB1	*béta-katenin*
DCP	*dez-gamma-karboxi-protrombin*
DNS	*dezoxiribonukleinsav*
EGFR	*epidermalis növekedési factor receptor*
FGF	*fibroblastnövekedési faktor*
FGFR	*fibroblastnövekedési faktor receptor*
G-CSF	*granulocytakolónia stimuláló faktor*
GGT	*gamma-glutamil transzferáz*
HCC	*hepatocellularis carcinoma*
HER2	*humán epidermalis növekedési faktor receptor 2-es típusa*
HGF	*hepatocytanövekedési faktor*
IDH	*izocitrát-dehidrogenáz*
IL	*interleukin*
KRAS	*Kirsten patkány sarcoma vírus onkogén homológ*
mRNS	*hírvivő RNS*
PDL	*programozott sejthalál ligand*
RFA	*rádiófrekvenciás abláció*
TAE	*transarterialis embolizáció*
TGF	*transzformáló növekedési faktor*
TSC	*tuberous sclerosis*
VEGF	*vaszkuláris növekedési faktor*

lánói kritériumokon belül van, úgy májtranszplantáció is elvégezhető. A betegek mintegy 80%-ában a hepatocellularis carcinoma előrehaladott állapotban kerül felismerésre, ezeknél az eseteknél már csak a gyógyszeres kezelés jöhet szóba.

Az intrahepaticus cholangiocarcinoma ritkábban fordul elő, azonban klinikai lefolyása meglehetősen agresszív. A daganat nagyon gyakran előrehaladott állapotban, irrezekábilis stádiumban kerül felismerésre, ilyenkor már csak a gyógyszeres kezelés jöhet számításba.

A képalkotó vizsgálatok mellett biomarkerek széles köre segíti a primer májdaganatok korai felismerését, melyek nemcsak a terápiát befolyásolhatják, de előre jelezhetik a daganat rekurrenciáját valamint meghatározhatják a prognózist is.

Az alábbiakban részletesen tárgyaljuk a két leggyakoribb primer májdaganat, a hepatocellularis carcinomára és az intrahepaticus cholangiocarcinomara jellemző biomarkereket.

Hepatocellularis carcinoma

A hepatocellularis carcinoma (HCC) a leggyakoribb primer malignus májdaganat. A legutóbbi WHO osztályozás[1] alapján a HCC különböző morfológiai jellemzőihez sajátságos genetikai eltérések kapcsolódnak. A HCC morfomolekuláris osztályozása alapján az alábbi csoportok különíthetőek el:

- macrotrabecularis HCC, melyre a VEGF és az angiopoietin 2 expressziója és a TP53 és FGF19 amplifikációja jellemző,
- steatohepatitisre emlékeztető HCC altípus, melyre a CTNNB1 mutációja, az IL6 felülregulációja és a CRP expressziója jellemző,
- cirrhosus típus, melyre a TSC1/2 mutáció és a TGF-béta jelátvitel aktivációja jellemző,
- neutrophil granulocytákban gazdag altípus, G-CSF termelés jellemző,
- kromofób HCC, cAMP-dependens-kináz aktivációja jellemző.

Annak ellenére, hogy a HCC kialakulásában szerepet játszó molekuláris jelátviteli utak még nem teljesen feltérképezettek a biomarkerek széles köre jellemző e daganattípusra. Ezeket a biomarkereket négy csoportba oszthatjuk: (I) onkofetális és glikoprotein antigének, (II) enzimek és izoenzimek, (III) növekedési faktorok, (IV) molekuláris markerek.

(I) Onkofetális és glikoprotein antigének

Alfa-fetoprotein. Évtizedek óta standard HCC biomarkerként tartják számon. Specificitását csökkenti, hogy szérumszintje gyakran emelkedett akut és krónikus hepatitisben valamint csírasejtes tumorok esetében is.[2] A HCC-k egy része is termelhet AFP-t, így a cirrhoticus betegeknél az emelkedett szérumszint korrelációt mutat a HCC kialakulásával.[3] Mindemellett viszont az AFP szérumszintje nem korrelál olyan prognosztikus tényezőkkel, mint a tumorméret, stádium, progresszió továbbá a HCC-k egy részére nem jellemző az AFP szérumszint emelkedése.[4]

A lencse agglutininhez való kötődési kapacitás alapján a teljes AFP három különböző glikoformára osztható: AFP-L1, AFP-L2 és AFP-L3. Ezek közül az AFP-L3 az, amelyet kizárólag a hepatocellularis daganatsejtek termelnek. Az AFP-L3 magas koncentrációjához alacsonyan differenciált tumor és nagyobb tumorméret társul.[5]

Glipikán-3. A sejtmembránhoz horgonyzott heparán-szulfát-proteoglikán, amely a növekedési faktorokkal történő kölcsönhatásai révén modulálja ezek hatását. A sejtmembránhoz glikozil-foszfatidil-inozitol révén kötődik. Jelentőségét az adja, hogy a HCC-s betegek mintegy 40–53%-ában emelkedett a szérumszintje, sőt ezeknél a betegeknél mintegy 33%-nál sem az AFP-érték, sem a dez-gamma-karboxi-protrombin-érték emelkedett.[6,7]

Jól vagy közepesen differenciált HCC-k esetében a szolubilis glipikán-3 szenzitivitása magasabb a szérum AFP-nél, és a két biomarker együttes meghatározása az össz-szenzitivitást mintegy 50%-ról 72%-ra emeli. A glipikán-3-pozitivitás elsősorban a közepesen és rosszul differenciált tumoroknál volt megfigyelhető, melyhez rosszabb prognózis és alacsonyabb túlélés társul.[8]

(II) Enzimek és izoenzimek

Dez-gamma-karboxi-protrombin (DCP). A tumorsejtek termelik a K-vitamin-dependens karboxiláz rendszer szerzett poszttranszlációs hibája miatt. Jelentőségét az adja, hogy 100 ng/ml feletti DCP-érték meglehetősen valószínűsíti a HCC jelenlétét vagy a rekurrenciát. A DCP-szint normalizálódása ugyanakkor jól korrelál a sikeres resectióval. Az AFP- és DCP-szint együttes meghatározása növeli az egyedi tesztek érzékenységét. Ugyanakkor a DCP sokkal érzékenyebb és

specifikusabb, mint az AFP a hepatocellularis daganat és nem tumoros májbetegségek elkülönítésében.[9,10]

Gamma-glutamil-transzferáz. A szérumban jelenlevő GGT a szinuszoidokban elhelyezkedő Kupffer-sejtekből és epeúthámsejtekből származik és aktivitása fokozódik HCC szövetben. Tumorjelző szenzitivitása jelentősen fokozható, ha együttesen határozzuk meg a GGT-, AFP-és DCP-szinteket.[11]

Szérum-alfa-fukozidáz. Alfa-1-fukozidáz (AFU), az összes emlőssejtben jelen lévő liposzomális enzim, amely részt vesz a különböző fukóztartalmú fukoglikokonjugátumok lebontásában. A HCC előrejelzésében ígéretes tumormarkerként szerepelhet,[12,13] és cirrhoticus betegekben az AFU szintjének fokozatos emelkedése előrevetíti a HCC néhány éven belüli lehetséges megjelenését.

Humán karbonil-reduktáz. A humán karbonil-reduktáz-2 enzim a vesében és a májban is jelen van, és a tumorszövetben jelen levő reaktív alfa-dikarbonil és reaktív oxigéngyökök semlegesítésében van kiemelt szerepe.[14]

Golgi-foszfoprotein-2. Mint a neve is mutatja, a Golgi-apparátushoz kapcsolódó protein, a HCC kialakulását még az AFP-nél is érzékenyebben jelzi.[15]

(III) Növekedési faktorok és receptoraik

Transzformáló növekedési faktor-béta. A növekedési faktorok szupercsaládjába tartozik, és kiemelt szerepe van nemcsak a sejtnövekedésben, differenciációban és invázióban, de az angiogenezisben, valamint az immunrendszer szabályozásában is.

Összehasonlítva a környező májszövettel, a tumorszövetben a TGF-béta mRNS és protein szintje is magas, de nincs összefüggés a TGF-béta expressziós szintje és a hepatectomia utáni túlélés között.[16]

Epidermalis növekedési faktor receptor család. Négy transzmembrán tirozin-kináz-receptor tartozik ide: EGFR, Her-2, Her-3 és a Her-4 és az epidermalis növekedési faktorok családjába tartozó EGF, TGF-alfa és heparinkötő EGF-et képesek kötni.

A tumorresectio után az emelkedett EGFR expresszióhoz korai rekurrencia és alacsony betegségmentes túlélés társul.[17]

Hepatocytanövekedési faktor. A HGF széles spektrumú citokin, a máj embryonalis fejlődésében és regenerációjában is fontos szerepet tölt be. A HGF receptora a c-met, melynek fokozott expressziója a tumorsejteken invazív fenotípussal, fokozott metasztázisképzéssel és alacsonyabb teljes túléléssel jár.[18, 19]

Bázikus fibroblastnövekedési faktor. Szolubilis heparinkötő polipeptid, amelynek mitogén hatása az endothelsejtekre ismert. Szérumszintjének emelkedéséhez alacsony betegségmentes túlélés társul. A fibroblastnövekedési faktort célzottan gátló lenalidomide a HCC-k egy részében meglehetősen hatékony terápiás szernek bizonyult.[20,21]

(IV) Molekuláris markerek

A molekuláris markerek közül mindenképpen meg kell említenünk a keringő nukleinsavakat, az AFP mRNS vizsgálatát, a gamma-glutamil-transzferáz mRNS kimutatását, az inzulinszerű növekedési faktor mRNS vizsgálatát, de az albumin mRN- vizsgálata és a különböző miRNS-ek kimutatása is ígéretes kutatási területet jelent, és amennyiben a prospektív vizsgálatokban sikerül igazolni a daganat rekurrenciáját előrejelző szerepüket, úgy a jövőben kiemelt szerepük lehet a daganat kialakulásának és kiújulásának előrejelzésében.[22]

Cholangiocarcinoma

Az intrahepaticus cholangiocarcinoma malignus epithelialis daganat, amelyre biliaris differenciáció jellemző. Ritkábban fordul elő, mint a hepatocellularis carcinoma, a malignus primer májdaganatok 10–15%-át képezik. A prognózisuk meglehetősen rossz, és sajnos az esetek többségében a felfedezésre kerülő daganatok irrezekábilis stádiumban vannak. A gyógyszeres terápia nemcsak az irrezekábilis daganatok kezelésében kiemelt jelentőségű, de a rekurrens daganatok kezelésében vagy a műtét utáni utókezelésben is fontos szerepe van. A standard kemoterápiás kezelési protokollok mellett az utóbbi években egyre inkább előtérbe kerültek a molekuláris célpontokra ható terápiák, éppen ezért a cholangiocarcinomák diagnosztikus és prognosztikus biomarkerei is intenzív kutatások tárgya.[23]

A cholangiocarcinomak diagnosztikus és prognosztikus biomarkerei az alábbi csoportokba oszthatók: neminvazív biomarkerek (keringő nukleinsavak – szabad DNS, nem kódoló RNS, citokinek/proteinek, metabolitok, extracellularis vezikulumok, keringő tumorsejtek) és a tumorszövetben jelen levő biomarkerek.[24]

A daganatszövetből kimutatható biomarkerek kiemelt jelentőséggel bírnak, hiszen meghatározhatják a prognózist (teljes túlélést, tumorrekurrenciát) és az neoadjuváns terápiákra adott hatást.

A cholangiocarcinomákra meglehetősen kifejezett tumorheterogenitás jellemző. A leginkább érintett gének a DNS-hibajavítással (*TP53*), a növekedési jelátviteli utakkal *(KRAS, BRAF, SMAD4, FGFR2, PTPN3),* a kromatin-újrarendeződésben részt vevő *(KMTC2, ARID1A, PBRM1* és *BAP1)* és a fejlődésben szerepet játszó jelátviteli utakkal kapcsolatos (Notch és Wnt jelátviteli utak).[25-37]

Ezek közül kiemelendő a *FGFR2* gén, melynek fúziója vagy átrendeződése az intrahepaticus cholangiocarcinomak mintegy 5,5–13,6%-ában fordul elő. Jelentőségét az adja, hogy az egyéb primer májdaganatokban nem fordul elő, így specifikus az intrahepaticus cholangiocarcinomakra és terápiás célpontként is számításba jöhet. Az FGFR szerepet játszik a proliferációban, túlélésben, sejtmigrációban, sőt az angiogenezisben is.[32,33]

Az *IDH1*, valamint az *IDH2* mutációja szintén az intrahepaticus cholangiocarcinomákra jellemző, és az esetek mintegy 4,9–36%-ában mutatható ki. Az *IDH* mutációja a leukemogenezis során korai patogenetikai esemény, mely gátolja a haemopoetivus őssejtek differenciációját. Kísérletes körülmények között, azt találták, hogy az *IDH* mutáció megzavarja a májőssejtek hepatocytává történő differenciációját, ezáltal serkentve a progenitor sejtek expanzióját, melyek aztán addicionális onkogén hatások révén transzformálódnak.[38]

Az *IDH1* és *IDH2* gének olyan metabolikus enzimeket kódolnak melyek a citoplazmában és a peroxiszómában (*IDH1)* vagy a mitokondriumokban *(IDH2)* helyezkednek el és normál körülmények között az izocitrát alfa-ketoglutaráttá történő átalakításban vesznek részt. Az *IDH1*/*IDH2* funkcionyerő mutációja következtében az alfa-ketoglutarát 2-hidroxi-glutaráttá alakul át. A 2-hidroxiglutarát onkometabolitnak tekinthető, hiszen az intracellularis biokémiai folyamatokban nem vesz részt.39

Nagy áteresztőképességű technológiák felhasználásával 17 különböző cholangiocarcinoma sejtvonalból származó xenograftoknál azt tapasztalták, hogy az IDH-mutációt hordozó sejtek jó terápiás választ mutattak a multi-tirozin-kináz-gátló dasatinib kezelésre. A dasatinib ezekben a xenograftokban az IDH-mutációt hordozó tumorsejtek apoptózisát váltotta ki és következményes tumorregressziót eredményezett.40

A cholangiocarcinomák különböző rizikótényezői vagy etiológiai faktorai hozzájárulhatnak specifikus mutációk szelekciójához, melyek a továbbiakban a daganat kialakulását és progresszióját segítik. Ilyen például a *TP53* mutációja, mely a HBV talaján kialakult cholangiocarcinomak mintegy 58%-ában jelen van.41 A cholangiocarcinomák mutációs és génexpressziós profiljának meghatározása hozzájárulhat a betegség stratifikálásához és utat nyithat a személyre szabott terápiák számára. Az *IDH* mutációt hordozó vagy meghatározatlan genetikai hátterű tumorokkal szemben a *KRAS* és a *TP53* mutációjához alacsonyabb túlélés és gyakoribb tumorrekurrencia társul. Nemcsak a KRAS, de a BRAF mutációhoz és a *Her-2-amplifikációhoz* is rosszabb prognózis társul.[33,41]

Az intrahepaticus cholangiocarcinomak transzkriptomanalízise két különböző altípust különített el: az ún. inflammatorikus típus, melyre jellemző a gyulladással kapcsolatos gének expressziója, és az ún. proliferációs típus, melynek rosszabb a prognózisa és különböző onkogének aktivációja jellemző rá.[34]

A cholangiocarcinomas betegek teljes túlélését befolyásoló független tényezőnek bizonyult a fascin, az EGFR, a Mucin1, a Mucin4 és a p27. A CTL4 és a FOXP3 expressziója a rekkurenciamentes túléléssel korrelált.[42]

A cholangiocarcinomák fokozott IL33 expressziója korrelált a kedvező prognózissal, mind az intrahepaticus mind pedig a perifériás cholangiocarcinomák esetében, ugyanakkor a keringő IL33 kapcsolatosan jelen pillanatban még nem állnak adatok rendelkezésre.[43]

Terápiás lehetőségek

A májdaganatok kezelésében az elmúlt évtizedek alatt az egyéb malignus szolid tumorok és hematológiai betegségek ellátásához hasonlóan több lehetőség is elérhetővé vált. A kezelési eljárások között a sebészi, intervenciós radiológiai, kemoterápiás és immunterápiás eljárások egyaránt szerepelnek.

A terápia megválasztásában elsődleges szempont a tumor tipizálása, a pontos szövettani jellemzők ismerete. Ezt követően mérlegelendő minden esetben a sebészi megoldás, akár kiegészítve intraoperatív intervenciós radiológiai kezeléssel.

A műtéti beavatkozásnak megvannak a szigorú kritériumai, amennyiben az R0 resectio nem biztosított, a szisztémás kezelés részesítendő előnyben.

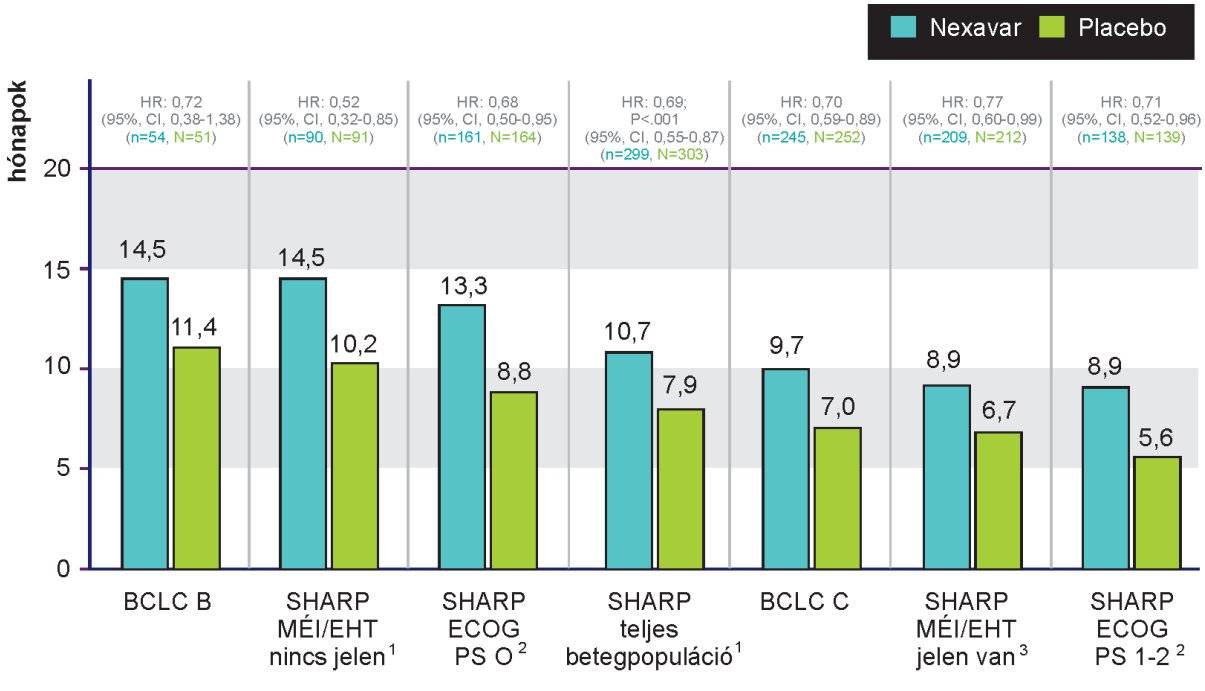
A szisztémás kezeléseket a tumor típusa, és az egyes típusok korszerű molekuláris biomarkereinek ismerete jelentősen befolyásolja. El kell különíteni a hepatocellularis carcinomat (HCC) valamennyi egyéb májdaganattól, mind az invazív beavatkozás megítélése, mind a szisztémás kezelés megválasztása szempontjából.

1. táblázat: A HCC kemoterápiás szerekkel történő kezelése és az objektív válaszadási arány

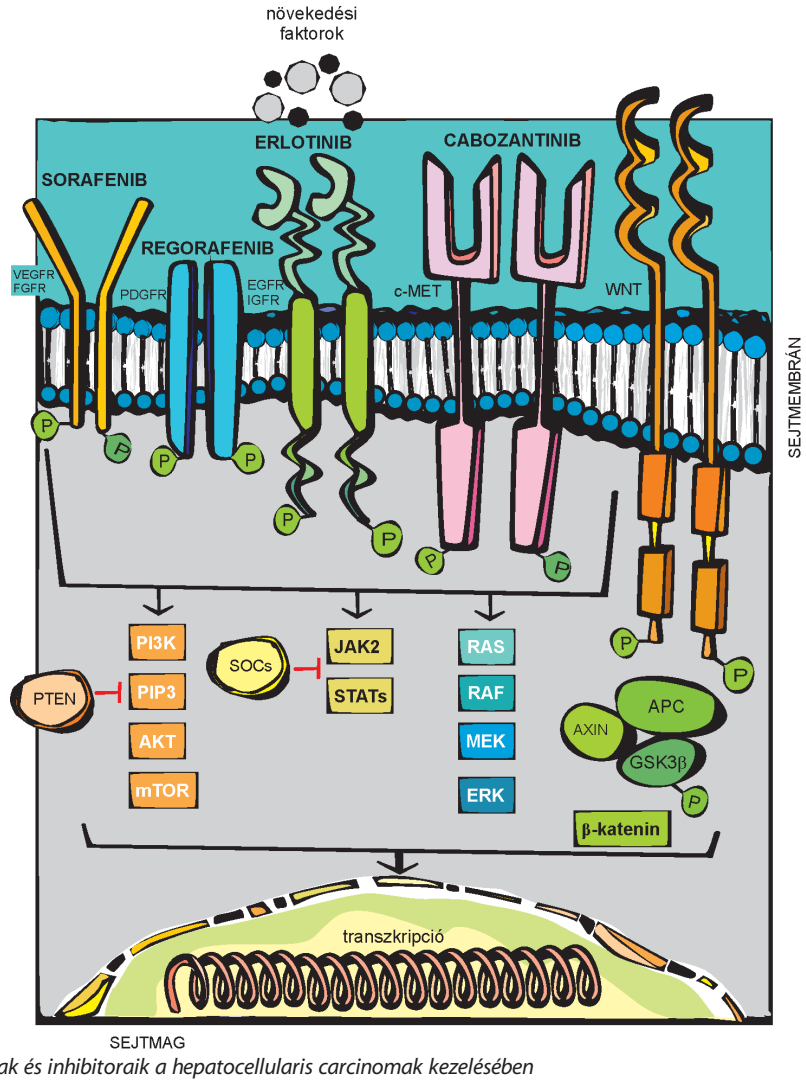
TRIAL	FÁZIS	N	OBJEKTÍV VÁLASZADÁSI ARÁNY	REFERENCIA
Szisztémás kemoterápia				
▸ Doxorubicin	2/3	203	10%	J Clin Oncol 2005; 23:2892-9.
▸ Doxorubicin kombináció (PIAF)	2/3	144	21%	J Natl Cancer Inst 2005; 97:1532-8.
▸ Ciszplatin	2	28	15%	Oncology 1993; 50:22-6.
▸ Epirubicin			11%	Chemotherapy 2001; 47:359-65.
▸ Mitoxantron			27%	J Hepatol 1985; 1:394-404.
▸ Irinotecan ▸ Paclitaxel, ▸ Gemcitabine, ▸ 5FU	2/3	376	<10%	Cancer 2001; 91:101-5. Br J Cancer 1998; 78: 34-9. Cancer 2002; 94:3186-91. Gastroenterology 1988; 94:453-6.
Antiandrogén kezelés (flutamide+leuproline)	3	30	a kontrollcsoporthoz képest előny nélkül	Hepatology 2004; 40:1361-9.
Interferon	3	35	<10%	Hepatology 2000; 31:54-8.
Octreotid	3	56	<5%	Hepatology 2002;3 6:687-9.
Seocalcitol	3	746	<5%	British J Cancer 2003; 89:252-57.

A HCC kezelésében a kemoterápia válaszadási aránya alacsony *(1. táblázat)* és terápiás áttörést jelentett a tirozin-kináz-gátlók bevezetése *(1. ábra)*. Az elért eredmények birtokában további EGFR- és VEGFR-gátlók vizsgálatára, bevezetésére került sor *(2. ábra)*.

Jelenlegi NCCN (National Comprehensiv Cancer Network) ajánlásban *1A evidenciaként* szerepelnek: sorafenib, lenvatinib, atezulizumab + bevacizumab. Progresszív betegség esetén további lehetséges terápia: regorafenib, carbozantinib, ramucirumab, lenvatinib,



1. ábra: A Nexavar terápia hatékonysága a hepatocellularis carcinoma kezelésében
BCLC: Barcelona Clinic Liver Cancer, SHARP: Sorafenib Hepatocellular Carcinoma Assessment Randomized Protocol, MÉI: makroszkópos érinvázió, EHT: extrahepaticus terjedés, ECOG PD: Eastern Cooperative Oncology Group performance status



2. ábra: Jelátviteli utak és inhibitoraik a hepatocellularis carcinomak kezelésében

nivolumab, nivolumab + ipilimumab, sorafenib, pembrozilumab.

Magyarországon a sorafenib törzskönyvezett és finanszírozott első vonalban (feltétele a szövettanilag igazolt HCC és Child Pugh A stádium), progresszió esetén a regorafenib.

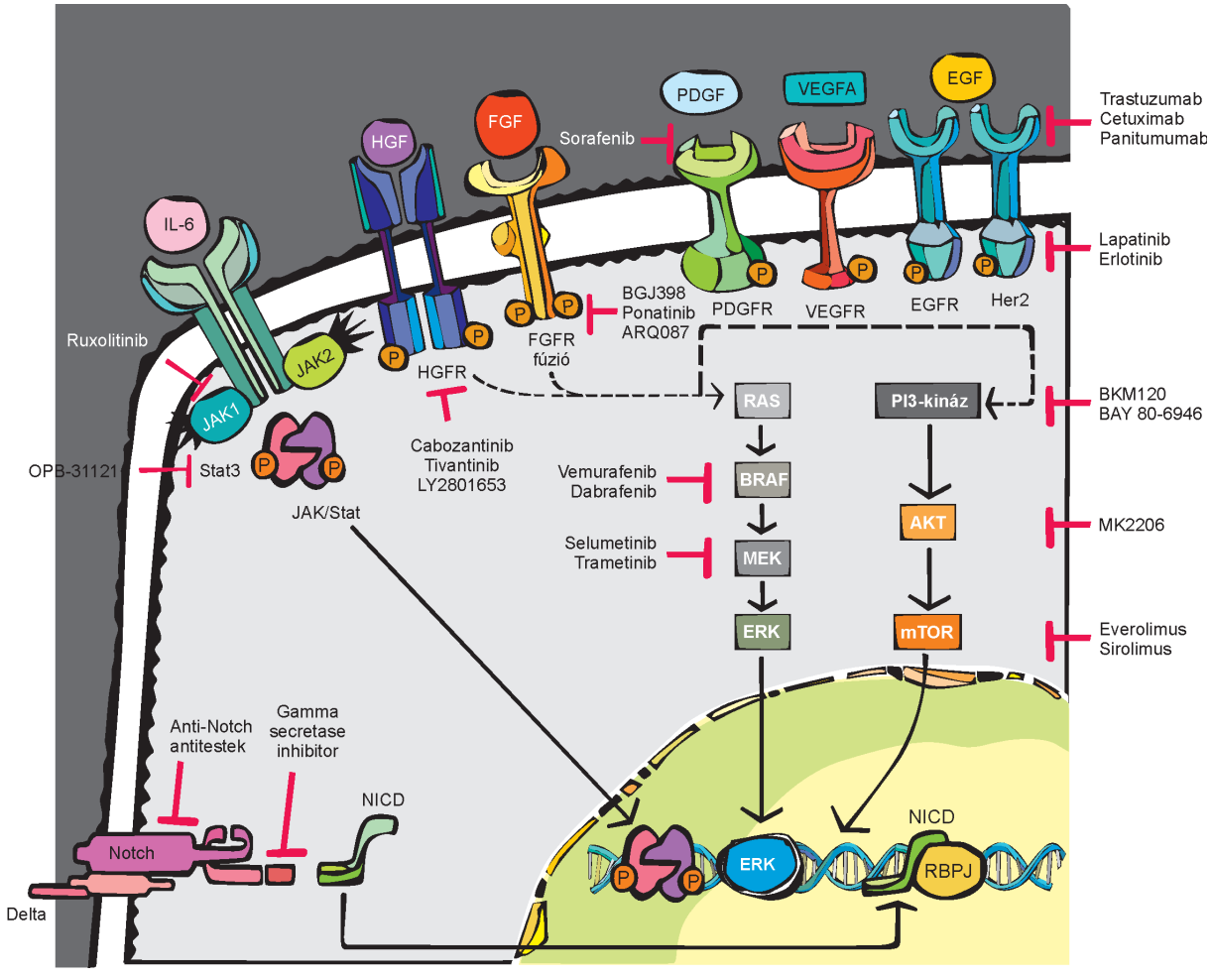
További progresszió esetén egyedi méltányossági engedéllyel alkalmazható PDL1-gátló immunterápia, ezekkel a szerekkel klinikai vizsgálatok zajlanak mind metasztatikus, mint adjuváns kezelésben.

A hazai gyakorlatban is különválasztandó a tiszta hepatocellularis carcinoma, a kevert hepatocellularis cholangiocarcinoma, illetve az epeúti tumor vagy cholangiocarcinoma. Szintén külön entitás a májban jelentkező különböző tumorok metasztázisai, így a kezelés megkezdése előtt kiemelt jelentősége van a differenciáldiagnosztikának.

Hepatocellularis carcinoma kezelése: amennyiben műtéti, illetve intervenciós radiológiai kezelés (transzarteriális embolizáció, TAE vagy radiofrekvenciás ablatio, RFA) nem jön szóba, úgy az első választandó szer a sorafenib. A sorafenib egy multikináz inhibitor, amely *in vitro* és *in vivo* körülmények között is antiproliferatív és antiangiogén hatásúnak bizonyult. Bevezetésének feltétele a szövettani verificatio, a megfelelő májműködés (Child-Pugh A stádium) és megfelelő ECOG status (0-2). Ezek mellett a sikeres kezelés kulcsa a mellékhatások ismerete, a beteg felkészítése, supportatio.

Progresszió vagy intolerancia esetén vezethető be másodvonalban a regorafenib.

A regorafenib egy orális daganatinaktiváló gyógyszer, amely erőteljesen gátol több protein-kinázt, ideértve a tumor-angiogenezisben (VEGFR1, -2, -3, TIE2),



3. ábra: A jelátviteli utak és inhibitorok a cholangiocarcinomak kezelésében

onkogenezisben (KIT, RET, RAF-1, BRAF, BRAFV600E), metasztázisképzésben (VEGFR3, PDGFR, FGFR) és tumorimmunitásban (CSF1R) részt vevő kinázokat is. A felírhatóság, mellékhatásprofil hasonló mindkét gyógyszer esetén.

Harmadvonalban egyedi méltányossági engedéllyel a PDL1-gátló jön szóba. Klinikai vizsgálatok zajlanak az immunterápia első-, másodvonalas vagy adjuváns alkalmazásáról. Az eredmények ígéretesek, a törzskönyvezése folyamatban van.[44, 45]

A cholangiocarcinoma kezelése: hatékony szerekről egyelőre nem számolhatunk be. Tekintettel a daganatspecifikus biomarkerek hiányára, a sokszor tünetmentes korai fázisra és a tumor terjedési jellemzőire, a rezekábilis stádiumban való felfedezés ritka.

Irrezekábilis palliatív ellátásban a daganat standard szisztémás kezelése gemcitabine + cisplatin kombinációval ajánlott. Másodvonalban alkalmazható hatékony kemoterápiáról nincs meggyőző adat. A molekuláris jellemzők feltérképezése segíthet a célzott terápiák kiválasztásában *(3. ábra)*. Immunterápiával egyelőre vizsgálatok zajlanak.[46] A májban gyakran előforduló metasztázisok ellátása a primer tumor szövettani jellemzői alapján történik, a májtumorok kezelési lehetőségeinek taglalása során a differenciáldiagnosztika jelentősége miatt van helye.

Irodalom

1. Paradis V, Fukuyama M, Park YN, Schirmacher P. Tumours of the liver and intrahepatic bile ducts. In: WHO classification of tumours, Digestive system. 2019; 215-64.
2. Wong RJ, Ahmed A, Gish R. Elevated Alpha-Fetoprotein. Clin Liver Dis 2015; 19:309-23.
3. Chen DS, Sung JL, Sheu JC. Serum α-fetoprotein in the early stage of human hepatocellular carcinoma. Gastroenterology 1984; 86:1404-9.
4. Wu JT. Serum alpha-fetoprotein and its lectin reactivity in liver diseases: a review. Annals of Clinical and Laboratory Science 1990; 20:98-105.

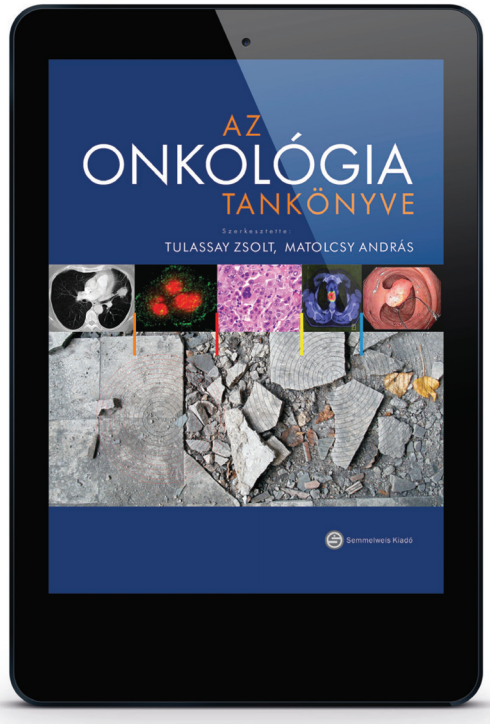
5. Khien VV, Mao HV, Chinh TT, Ha PT, Bang MH, Lace BV et al. Clinical evaluation of lentil lectin-reactive alpha-fetoprotein-L3 in histology proven hepatocellular carcinoma. International Journal of Biological Markers 2001; 16:105-111.
6. Capurro M, Wanless IR, Sherman M, Deboer G, Shi W, Miyoshi E et al. Glypican-3: a novel serum and histochemical marker for hepatocellular carcinoma. Gastroenterology 2003; 125:89-97.
7. Nakatsura T, Yoshitake Y, Senju S, Monji M, Komori H, Motomura Y, et al. Glypican-3, overexpressed specifically in human hepatocellular carcinoma, is a novel tumor marker. Biochemical and Biophysical Research Communications 2003; 306:16–25.
8. Shirakawa H, Suzuki H, Shimomura M, Kojima M, Gotohda N, Takahashi S et al. Glypican-3 expression is correlated with poor prognosis in hepatocellular carcinoma. Cancer Science 2009; 100:1403-7.
9. Weitz IC, Liebman HA. Des-γ-carboxy (abnormal) prothrombin and hepatocellular carcinoma: a critical review. Hepatology 1993; 18:990-7.
10. Marrero JA, Su GL, Wei W, Emick D, Conjeevaram HS, Fontana RJ, et al. Des-gamma carboxyprothrombin can differentiate hepatocellular carcinoma from non-malignant chronic liver disease in American patients. Hepatology, 2003; 37:1114-21.
11. Cui R, He J, Zhang F, Wang B, Ding H, Shen H, et al. Diagnostic value of protein induced by vitamin K absence (PIVKAII) and hepatomaspecific band of serum gamma-glutamyl transferase (GGTII) as hepatocellular carcinoma markers complementary to á-fetoprotein. British Journal of Cancer 2003; 88:1878-82.
12. Deugnier Y, David V, Brissot P, Mabo P, Delamaire D, Messner M, et al. Serum alpha-L-fucosidase: a new marker for the diagnosis of primary hepatic carcinoma? Hepatology. 1984; 4:889-92.
13. Wang K, Guo W, Li N, Shi J, Zhang C, Lau WY, et al. Alpha-1-fucosidase as a prognostic indicator for hepatocellular carcinoma following hepatectomy: a large-scale, long-term study Br J Cancer. 2014; 110:1811-9.
14. Liu S, Ma L, Huang W, Shai Y, Ji X, Ding L, et al. Decreased expression of the human carbonyl reductase 2 gene HCR2 in hepatocellular carcinoma. Cellular and Molecular Biology Letters 2006; 11:230-41.
15. Marrero JA, Romano PR, Nikolaeva O, Steel L, Mehta A, Fimmel CJ, et al. GP73, a resident Golgi glycoprotein, is a novel serum marker for hepatocellular carcinoma. Journal of Hepatology, 2005; 43:1007-12.
16. Okumoto K, Hattori E, Tamura K, Kiso S, Watanabe H, Saito K, et al. Possible contribution of circulating transforming growth factor-β1 to immunity and prognosis in unresectable hepatocellular carcinoma. Liver International 2004; 24:21-8.
17. Ito Y, Takeda T, Sakon M, Tsujimoto M, Higashiyama S, Noda K, et al. Expression and clinical significance of erb-B receptor family in hepatocellular carcinoma. British Journal of Cancer, 2001; 84:1377-383.
18. Korn WM. Moving toward an understanding of the metastatic process in hepatocellular carcinoma. World Journal of Gastroenterology, 2001; 7:777-8.
19. Osada S, Kanematsu M, Imai H, Goshima S. Clinical significance of Serum HGF and c-Met expression in tumor tissue for evaluation of properties and treatment of hepatocellular carcinoma. Hepato-Gastroenterology 2008; 55:544-9.
20. Poon RT, Ng IO, Lau C, Yu WC, Fan ST, Wong J. Correlation of serum basic fibroblast growth factor levels with clinicopathologic features and postoperative recurrence in hepatocellular carcinoma. American Journal of Surgery 2001; 182:298-304.
21. Safran H, Charpentier K, Dubel G, Soares G, Berz D, Shipley JL, et al. Lenalidomide for advanced hepatocellular cancer (HCC) in patients progressing on or intolerant to sorafenib. (Abstract #4159) 2010 Gastrointestinal Cancers Symposium, ASCO abstract.
22. Behne T, Copur MS. Biomarkers for hepatocellular carcinoma. Int J Hepatol 2012; 2012:859076.
23. Banales JM, Cardinale V, Carpino G, Marzioni M, Andersen JB, Invernizzi P et al. Expert consensus document: cholangiocarcinoma: current knowledge and future perspectives consensus statement from the European Network for the Study of Cholangiocarcinoma (ENS-CCA). Nat Rev Gastroenterol Hepatol 2016; 13:261-80.
24. Macias RIR, Kornek M, Rodrigues PM, Paiva NA, Castro RE, Urban S, et al. Diagnostic and prognostic biomarkers in cholangiocarcinoma. Liver Int 2019; Suppl 1:108-22.
25. Arnoletti JP, Zhu X, Almodovar A, Veldhuis PP, Sause R, Griffith E, et al. Portal venous blood circulation supports immunosuppressive environment and pancreatic cancer circulating tumor cell activation. Pancreas 2017; 46:116-23.
26. Ong CK, Subimerb C, Pairojkul C, Wongkham S, Cutcutache I, Yu W, et al. Exome sequencing of liver fluke-associated cholangiocarcinoma. Nat Genet 2012; 44:690-3.
27. Jiao Y, Pawlik TM, Anders RA, Selaru FM, Streppel MM, Lucas DJ, et al. Exome sequencing identifies frequent inactivating mutations in BAP1, ARID1A and PBRM1 in intrahepatic cholangiocarcinomas. Nat Genet 2013; 45:1470-3.
28. Chan-On W, Nairismägi ML, Ong CK, Lim WK, Dima S, Pairojkul C, et al. Exome sequencing identifies distinct mutational patterns in liver fluke-related and non-infection-related bile duct cancers. Nat Genet 2013; 45:1474-8.
29. Zou S, Li J, Zhou H, Frech C, Jiang X, Chu JS, et al. Mutational landscape of intrahepatic cholangiocarcinoma. Nat Commun. 2014; 5:5696.
30. Ross JS, Wang K, Gay L, Al-Rohil R, Rand JV, Jones DM, et al. New routes to targeted therapy of intrahepatic cholangiocarcinomas revealed by next-generation sequencing. Oncologist 2014; 19:235-42.
31. Borad MJ, Champion MD, Egan JB, Liang WS, Fonseca R, Bryce AH, et al. Integrated genomic characterization reveals novel, therapeutically relevant drug targets in FGFR and EGFR pathways in sporadic intrahepatic cholangiocarcinoma. PLoS Genet 2014; 10:e1004135.
32. Fujimoto A, Furuta M, Shiraishi Y, Gotoh K, Kawakami Y, Arihiro K, et al. Whole-genome mutational landscape of liver cancers displaying biliary phenotype reveals hepatitis impact and molecular diversity. Nat Commun 2015; 6:6120.

33. Nakamura H, Arai Y, Totoki Y, Shirota T, Elzawahry A, Kato M, et al. Genomic spectra of biliary tract cancer. Nat Genet 2015; 47:1003-10.
34. Sia D, Hoshida Y, Villanueva A, Roayaie S, Ferrer J, Tabak B, et al. Integrative molecular analysis of intrahepatic cholangiocarcinoma reveals 2 classes that have different outcomes. Gastroenterology 2013; 144:829-40.
35. Gao Q, Zhao YJ, Wang XY, Guo WJ, Gao S, Wei L, et al. Activating mutations in PTPN3 promote cholangiocarcinoma cell proliferation and migration and are associated with tumor recurrence in patients. Gastroenterology 2014; 146:1397-407.
36. Zender S, Nickeleit I, Wuestefeld T, Sörensen I, Dauch D, Bozko P, et al. A critical role for Notch signaling in the formation of cholangiocellular carcinomas. Cancer Cell 2013; 23:784-95.
37. Villanueva A, Alsinet C, Yanger K, et al. Notch signaling is activated in human hepatocellular carcinoma and induces tumor formation in mice. Gastroenterology. 2012; 143:1660-1669 e1667.
38. Saha SK, Parachoniak CA, Bardeesy N. IDH mutations in liver cell plasticity and biliary cancer. Cell Cycle 2014; 13:3176-82.
39. Losman JA, Kaelin WG Jr. What a difference a hydroxyl makes: mutant IDH, (R)-2-hydroxyglutarate, and cancer. Genes Dev 2013; 27:836-52.
40. Saha SK, Gordan JD, Kleinstiver BP, Vu P, Najem MS, Yeo JC, et al. Isocitrate dehydrogenase mutations confer dasatinib hypersensitivity and SRC dependence in intrahepatic cholangiocarcinoma. Cancer Discov 2016; 6:727-39.
41. Nepal C, O'Rourke CJ, Oliveira DVNP, Taranta A, Shema S, Gautam P, et al. Genomic perturbations reveal distinct regulatory networks in intrahepatic cholangiocarcinoma. Hepatology 2018; 68:949-63.
42. Ruys AT, Groot Koerkamp B, Wiggers JK, Klumpen HJ, ten Kate FJ, van Gulik TM. Prognostic biomarkers in patients with resected cholangiocarcinoma: a systematic review and meta-analysis. Ann Surg Oncol. 2014; 21:487-500.
43. Sawada R, Ku Y, Akita M, Otani K, Fujikura K, Itoh T, et al. Interleukin-33 overexpression reflects less aggressive tumour features in large-duct type cholangiocarcinomas. Histopathology. 2018; 73:259-72.
44. Finn RS, Ryoo BY, Merle P, Kudo M, Bouattour M, Lim HY, et al. Results of KEYNOTE-240: phase 3 study of pembrolizumab (Pembro) vs best supportive care (BSC) for second line therapy in advanced hepatocellular carcinoma (HCC). Journal of Clinical Oncology 2019; 37:4004-4004.
45. Roderburg C, Berres ML, Wree A, Loosen SH, Luedde T, Trautwein C. Excellent Response to Anti-PD-1 Therapy in a Patient with Hepatocellular Carcinoma Intolerant to Sorafenib. Visc Med 2019; 35:43-6.
46. Vogel A, Saborowski A. Cholangiocellular Carcinoma. Digestion. 2017; 95:181-5.

SEMMELWEIS KIADÓ SZAK- ÉS TANKÖNYVEI

Onkológia

Könyveink megvásárolhatók a Legendus Könyvesboltban, illetve a Líra Kereskedelmi hálózaton belül az egész országban, de egyre nagyobb igényt elégít ki webshopunk.



Matolcsy András, Tulassay Zsolt (szerk)

ONKOLÓGIA TANKÖNYVE

A tankönyv megírására a magyar onkológusok jeleseit sikerült együttműködésre felkérni. A közel száz kitűnő szerző közreműködésének eredményeként hiányt pótló, a korszerű onkológiai szemlélet és a gyakorlati ismeretek elsajátításához egyaránt nélkülözhetetlen alkotás született. A monográfia szerkesztésére a belgyógyászat és a patológia vezető egyéniségei vállalkoztak, két olyan orvosi terület szaktekintélyei, amely az onkológia vitathatatlan alapját jelentik. A korszerű onkológiai szemlélet meghatározóan belgyógyászati és patológiai ismereteken alapul. Ennek a gondolkodásmódnak az érvényesülése különleges erénye a tankönyvnek, hisz a szerkesztők objektív, átfogó szemlélettel az ismeretek fontosságának és az arányok gondos kialakításának igényével gondozták a kéziratot. Nemcsak az onkológia tanulását és a továbbképzést segíti, hanem minden olyan orvos számára hasznos ismereteket nyújt, aki munkája során daganatos beteggel találkozik. A daganatok gyakoriságának rohamos növekedése pedig az orvosi gyakorlat minden területén elkerülhetetlenné teszi ezt a találkozást.

668 oldal ■ **E-könyv ára: 6680 Ft**

Semmelweis Kiadó
1089 Budapest, Nagyvárad tér 4.
www.semmelweiskiado.hu

LEGENDUS KÖNYVESBOLT
1089 Budapest, Nagyvárad tér 4.
Tel.: 210-4408, 459-1500/56353
Nyitva tartás: H–Sz: 9.00–16.00,
Cs: 9.00–18.00, P: 9.00–14.00
E-mail: info@semmelweiskiado.hu

A tuboovarialis high-grade serosus carcinoma komplex patológiai diagnosztikája és célzott kezelése

Complex pathologic diagnosis and targeted therapy of tuboovarian high-gade serous carcinoma

Rókusz András[1], **Máté Szabolcs**[2]
[1] I. Sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet, Semmelweis Egyetem, Budapest
[2] Szülészeti és Nőgyógyászati Klinika, Semmelweis Egyetem
E-levél: rokusz.andras@med.semmelweis-univ.hu

ÖSSZEFOGLALÁS Az ovariumcarcinomák a legmagasabb mortalitással járó nőgyógyászati daganatok. Leggyakoribb típusuk a high-grade serosus carcinoma (HGSC), amely legtöbbször előrehaladott stádiumban kerül felfedezésre. A HGSC prekurzor léziója a petevezetékek fimbriális régiójában alakul ki. Jellemző molekuláris eltérése a *TP53* mutáció, ami diagnosztikus szempontból meghatározó módon aberráns p53 immunhisztokémiai expressziós mintázatot eredményez. Emellett a *HGSC*-k 50%-a homológ rekombinancia repair (HRR) deficienciát mutat, amit az esetek egy részben a *BRCA1* és *BRCA2* gének germinalis vagy szomatikus mutációja okoz. A BRCA mutáns státusszal a primer daganat és metasztázisainak morfológiája is korrelál. A HRR deficiens daganatok jól reagálnak a platinabázisú kemoterápiára, illetve a poli(ADP-ribóz) polimeráz (PARP) gátlószerekre. Utóbbiak az ovariumcarcinomák kezelésének új irányvonalát jelentik, alkalmazásuk indikációja az elmúlt években egyre bővül. A *BRCA* mutációanalízisnek így napjainkban már nem csak a daganat esetlegesen herediter jellegének megállapítása céljából, hanem terápiás és prognosztikus szempontból is nagy jelentősége van. A *BRCA* mutációanalízist a HGSC diagnózisának felállítása után minél hamarabb el kell végezni mind vérből, mind a daganat paraffinba ágyazott szöveti blokkjából. A mutációanalízis legszenzitívebb és költséghatékonyabb módja az új generációs szekvenálás.

KULCSSZAVAK high-grade serosus carcinoma, ovarium, *BRCA*, PARP-gátló, NGS

SUMMARY Ovarian cancer has the highest mortality rate among all gynaecological malignancies. The most common type of ovarian cancer is high-grade serous carcinoma (HGSC) which in most cases is diagnosed in an advanced stage. Its precursor lesion arises in the fimbrial region of the fallopian tube. The defining molecular feature of HGSC is mutation of the *TP53* gene, which – importanly for the histological diagnosis – results in aberrant p53 immunohistochemical expression. Fifty percent of all HGSC show deficent homologous recombination repair (HRR), partly caused by germinal or somatic *BRCA1* and *BRCA2* mutations. The morphology of the tumor and its metastases correlates with the *BRCA* mutation status. HRR-deficient tumors are platinum-sensitive and can be treated with poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitors. PARP inhibitors are a new group of chemoterapeutics used in ovarian cancer and their indication is expanding. Thus, nowadays *BRCA* mutation analysis is not only required to examine the possible hereditary nature of ovarian cancer but its result affects the treatment and prognosis as well. Ideally, BRCA mutation analysis is performed immediately after the diagnosis of HGSC both from peripheral blood and the histological blocks of the tumor. The most sensitive and cost-effective way of the analysis is new generation sequencing.

KEY WORDS high-grade serous carcinoma, ovary, *BRCA*, PARP inhibitor, NGS

A nőgyógyászati eredetű malignus betegségek közül az ovariumcarcinomák vezetnek leggyakrabban halálozáshoz, míg világszerte az összes nőket érintő daganatos megbetegedés között a nyolcadik leggyakrabban halálhoz vezető daganattípust jelentik.[1] Az ovariumcarcinomák 70%-a csak előrehaladott (FIGO III. vagy IV. stádiumú) stádiumban kerül felismerésre, 5 éves túlélésük 47,4%. Az előrehaladott stádiumú betegek 80%-ában a daganat kiújul és 5 éven belül halálhoz vezet.[2]

Az ovariumcarcinomák az aktuális WHO klasszifikáció szerint öt fő csoportba sorolhatók, ezek gyakoriságuk sorrendjében: high-grade serosus carcinoma (HGSC, az összes eset kb. 70%-a), világossejtes carcinoma (10–12%), endometrioid carcinoma (10–11%), low-grade serosus carcinoma (LGSC, 3–5%), és mucinosus carcinoma (3%).[3,4] Miután az előrehaladott stádiumú ovariumcarcinomák 89%-át a HGSC adja,[4] és célzott kezelési lehetőség is leginkább ebben a típusban elérhető, így a továbbiakban erre koncentrálunk.

Rövidítések

PARP	*poli(ADP-ribóz) polimeráz*
HGSC	*high-grade serosus carcinoma*
LGSC	*low-grade serosus carcinoma*
STIC	*serosus tubalis intraepithelialis carcinoma*
HRR	*homológ rekombinációs repair*
BER	*bázis excíziós repair*
PFS	*progressziómentes túlélés*
PFI	*progressziómentes időszak*
CRS	*chemotherapy response score*
MLPA	*multiplex ligációfüggő amplifikáció*

A HGSC patológiája

Az ovarium serosus carcinomáit 2004-ben osztották low-grade és high-grade típusokra, azelőtt ezekre a daganatokra nem létezett általánosan elfogadott patológiai grading rendszer.[5] A beosztás alapját a nuclearis atípia mértéke, illetve kisebb mértékben a mitotikus aktivitás (LGSC <12/10 HPF) képezi. Bár a terminológia ugyanannak a daganattípusnak két eltérő grade-jére utalna, valójában az LGSC és HGSC két teljesen különálló betegség, eltérő előalakokkal és molekuláris háttérrel. A HGSC-k a petevezeték fimbrialis régiójából erednek, legjellemzőbb molekuláris eltéréseik a *TP53* és *BRCA1*/2 mutációk. Ezzel szemben a LGSC-k legnagyobb része az ovarium serosus borderline tumoraiból alakul ki, gyakoribb visszatérő molekuláris eltérései a KRAS és BRAF mutációk. A HGSC definiálását nagyban elősegítette a WT1 immunhisztokémiai reakció elterjedése, amellyel a HGSC az esetek legnagyobb részében elkülöníthető az endometrioid és világossejtes ovariumcarcinomáktól (az ovarium serosus carcinomáinak döntő többsége WT1 pozitív, míg az endometrioid és világossejtes carcinomák döntő többsége WT1 negatív).[6]

Napjainkra elfogadottá vált, hogy az extrauterinalis HGSC-k legnagyobb része a petevezetékek fimbrialis régiójában kialakuló előalakból, a serosus tubalis intraepithelialis carcinomából (STIC) fejlődik ki.[6] Germinalis *BRCA1*/2 mutáns státuszú, profilaktus kétoldali petevezeték és petefészek eltávolításon átesett betegek 5%-ában a petevezeték STIC-et tartalmaz, ezzel szemben ovariumcarcinoma kialakulására alacsony kockázattal bíró betegekben STIC csak az esetek 0,17–0,6%-ában azonosítható.[6,7] A szövettani vizsgálat során az ovariumon belül elhelyezkedő HGSC mellett nagy jelentőséggel bír a petevezetékben elhelyezkedő STIC vagy mikroszkópos méretű invazív HGSC azonosítása, mivel a petevezeték érintettségét STIC esetén, invazív daganat hiányában is figyelembe kell venni a patológiai stádium megállapításánál, így pl. STIC jelenléte a petevezetékben az egyébként pT1a patológiai stádiumú HGSC-t (egy ovariumra korlátozódó daganat ép külső felszínnel) pT2a stádiumba helyezi át.[8] Mindezek miatt mind a profilaktikus salpingectomiák, mind az egyoldali, ovariumra korlátozódónak tűnő HGSC-k esetén fontos a patológiai indítás során a petevezetékek fimbriális végének teljes, részletes feldolgozása (SEE-FIM protokoll – Sectioning and Extensively Examining the FIMbriated end of the tube). Ennek során a fimbriális régió hosszanti irányban (a petevezeték lefutásával megegyező irányban) 2 mm vastag szeletekre vágva kerül beágyazásra. A teljes feldolgozást köve-

1. táblázat: A HGSC kiindulási helyének meghatározásához ajánlott kritériumok.[10]

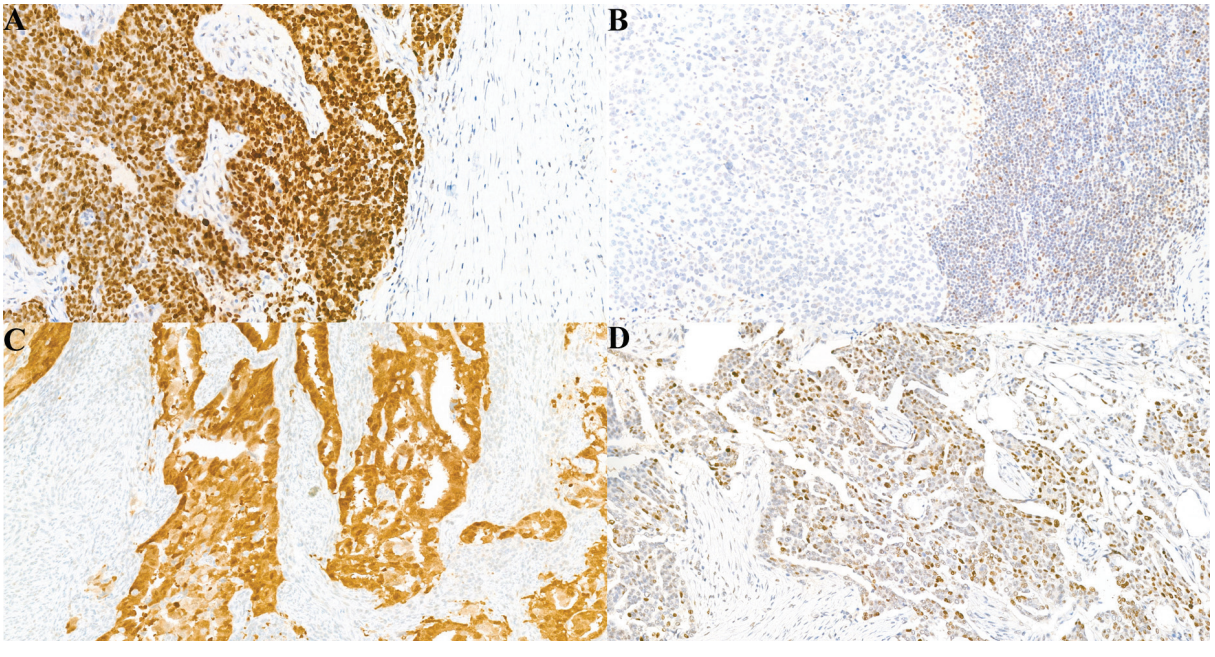
KRITÉRIUM	KIINDULÁSI HELY	MEGJEGYZÉS
STIC azonosítható	petevezeték	Függetlenül az ovarialis vagy peritonealis lokalizációjú daganat jelenlététől és méretétől
Invazív, a hámborítást érintő carcinoma azonosítható a petevezetékben STIC jelenlétével együtt vagy anélkül	petevezeték	Függetlenül az ovarialis vagy peritonealis lokalizációjú daganat jelenlététől és méretétől
A petevezeték részben vagy egészében inkorporálódott a tuboovarialis daganatos konglomerátumba	petevezeték	Függetlenül az ovarialis vagy peritonealis lokalizációjú daganat jelenlététől és méretétől
Makro- vagy mikroszkópos méretű ovariumdaganat, amely mellett sem STIC, sem invazív carcinoma nem azonosítható a petevezetékekben	ovarium	Mindkét petevezeték teljes hosszában azonosítható és SEE-FIM protokoll szerint lett feldolgozva függetlenül a peritonealis lokalizációjú daganat jelenlététől és méretétől
Mindkét petevezeték és ovarium daganatmentes (makro- és mikroszkóposan is), peritonealis HGSC mellett	peritoneum	Ez a diagnózis a 2014-es WHO-klasszifikáció szerint csak kemoterápiát megelőzően adható. Kemoterápiát követően lásd az alábbi pontokat.
HGSC diagnózisa született peritoneum/cseplesz biopsziából vagy citológiai mintából	tuboovarialis	Klinikopatológiai, köztük immunhisztokémiai módszerekkel ki kell zárni a lehetséges utánzó daganatokat, főként a serosus endometriumcarcinomát
Kemoterápiát követően residualis daganat jelen van	lásd a fenti kritériumok	
Kemoterápiát követően nem maradt vissza residualis daganat	tuboovarialis	

STIC: serosus tubalis intraepithelialis carcinoma. SEE-FIM: a petevezeték fimbriális régiójának részletes feldolgozása

tően is csak az ovarialis HGSC-k 10–60%-a mellett azonosítható STIC a petevezetékekben.[9] Ezt napjainkban a „precursor escape" elmélettel magyarázzák: a petevezetékekben léteznek olyan, STIC kialakulását megelőző intraepithelialis proliferációk (korai serosus proliferációk), amelyek már *TP53* mutációt hordoznak, de citológiailag még nem mutatják malignitás jeleit. Mind a korai serosus proliferációk, mind a STIC sejtjei képesek leválni a petevezeték felszínéről és megtapadni az ovarium vagy a hasfali peritoneum felszínén, majd ott tubalis érintettség nélkül kialakuló HGSC fejlődhet ki belőlük.[9] A jelenleg érvényes kritériumok alapján amennyiben akár STIC, akár invazív HGSC azonosítható a petevezetékekben, úgy a HGSC fő tömegének elhelyezkedésétől függetlenül tubalis eredetűnek kell tartani egy adott daganatot *(1. táblázat)*. Ovarialis kiindulásúnak tekintjük a daganatot, ha a petevezetékek részletes feldolgozás után is tumormentesek, míg primer peritonealis carcinomának, amikor sem a petevezetékek, sem az ovariumok nem tartalmaznak daganatot.[10] Ez utóbbi a kritériumok korrekt alkalmazása esetén rendkívül ritka diagnózis kell, hogy legyen. A HGSC kiindulási helyének meghatározása mindazonáltal leginkább elméleti jelentőségű, miután a petevezeték, az ovarium és a peritoneum carcinomáira azonos TNM stádiumbeosztás és kezelési protokollok érvényesek.

A HGSC jellemző molekuláris eltérései

A HGSC-kben más malignus daganatokhoz képest viszonylag ritkák a visszatérő mutációk.[11] A daganat definiáló molekuláris eltérése a *TP53* gén mutációja, ami az esetek 96–99%-ában azonosítható.[11,12] A *TP53* mutáció immunhisztokémiai vizsgálattal aberráns p53 expressziót eredményez, ami a HGSC szövettani diagnózisának egyik alappillére. Az aberráns p53 expressziós mintázat három különböző módon jelenhet meg: erős magpozitivitás a daganatsejtek legalább 80%-ában, a magpozitivitás komplett hiánya a daganatsejtekben vagy diffúz cytoplasmatikus pozitivitás erős magpozitivitás nélkül *(1. ábra)*.[12] Az aberráns expresszió mintázata korrelál a TP53 mutáció típusával: az esetek kb. kétharmadában előforduló diffúz erős magpozitivitás missense mutációkkal, az esetek kb. negyedét kitevő teljes expresszióvesztés (null fenotípus) nonsense mutációkkal, míg az igen ritka citoplazmatikus pozitivitás a nuclearis lokalizációs domaint érintő mutációkkal függ össze.[6,12] Érdemes megjegyezni, hogy a HGSC-k kb. 5%-a *TP53* mutáns státusz mellett is vad típusú p53 expressziót mutat immunhisztokémiai vizsgálattal. Ezekben az esetekben többnyire a fehérje megrövidülését eredményező mutációk detektálhatók. Az aberráns p53 immunhisztokémiai expresszió jól beállított reakció mellett közel 100%-ban szenzitív és

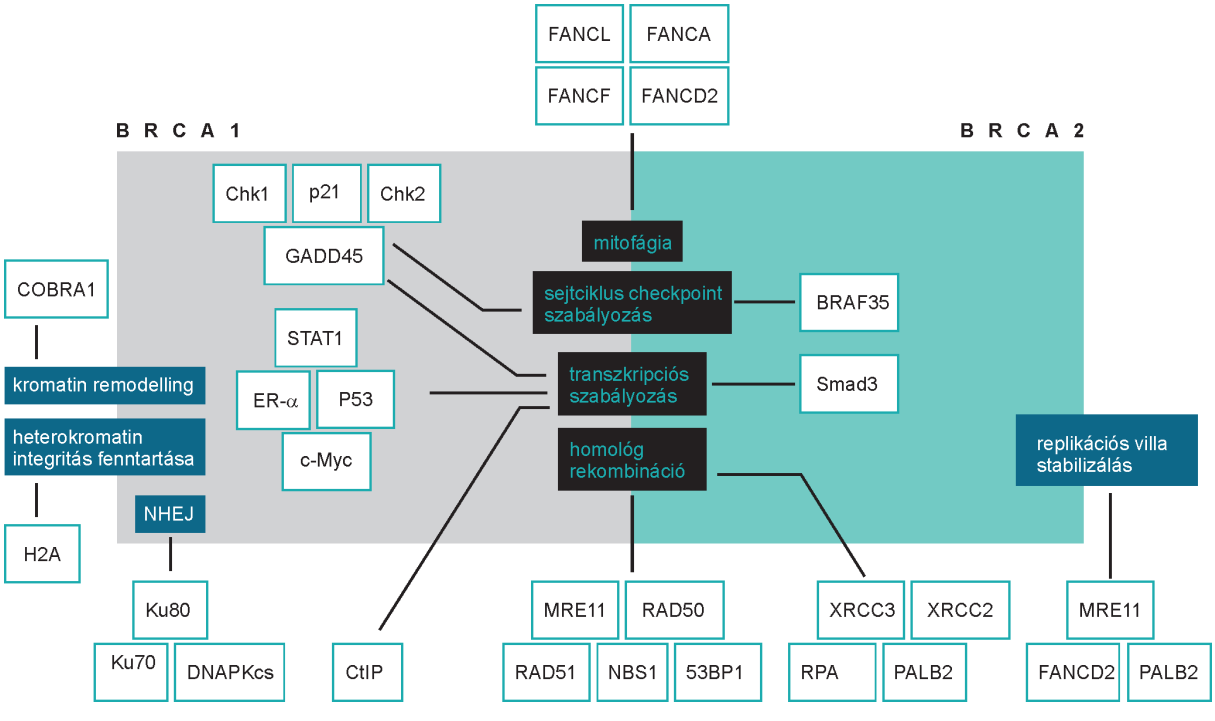


1. ábra: A p53 immunhisztokémiai reakció különböző expressziós mintázatai. ***A:*** *HGSC diffúz, erős magi p53-pozitivitással (aberráns expresszió).* ***B:*** *HGSC, a daganatsejtekben a p53 immunhisztokémiai reakció egyöntetűen negatív (aberráns expresszió; pozitív kontroll: a daganatmentes nyirokcsomó állomány lymphocytái vad típusú p53 expressziót mutatnak).* ***C:*** *serosus endometrium carcinoma diffúz citoplazmatikus p53-pozitivitással (aberráns expresszió; Dr. Vereczkey Ildikó szívességéből).* ***D:*** *LGSC vad típusú magi p53 expresszióval.*

specifikus *TP53* mutáció jelenlétére.[12] Aberráns expresszió hiányában a daganatsejtek vad típusra jellemző, variábilis intenzitású expressziót mutatnak. A p53 immunhisztokémiai reakció értékelése során nem helyes a „pozitív" és „negatív" terminológia használata, ehelyett az „aberráns" és a „vad típusú" expresszió kifejezések alkalmazása ajánlott. A reakció korrekt értékelése differenciáldiagnosztikai szempontból nagy jelentőséggel bír, mivel a HGSC-vel leggyakrabban összetéveszthető LGSC nem tartalmaz *TP53* mutációkat, így vad típusú p53 expressziót mutat *(1. ábra)*.

A HGSC-re a *TP53* mutációk mellett jellemzőek a *BRCA1* és *-2* gén mutációi. A *BRCA1* és *-2* gének a homológ rekombinációs repairben (HRR) játszanak szerepet, ami a duplaszálú DNS-törések kijavításának fő mechanizmusa *(2. ábra)*. A duplaláncú DNS-törések javításának hibája sejthalálhoz vagy malignus transzformációhoz vezethet. A 17-es kromoszóma hosszú karján elhelyezkedő *BRCA1* gén fehérjeterméke a DNS-károsodást érzékelő molekuláris komplex összeállításában játszik szerepet, míg a 13-as kromoszóma hosszú karján lokalizált *BRCA2* gén által kódolt fehérje a hibajavítást végző kulcsenzim, a RAD51 aktivitását szabályozza. Ezen kívül mindkét fehérje képes a DNS-hiba miatt leállt replikációs villa stabilizálására.[13] A *BRCA1/2* géneknek több mint 1000 variációja ismert a humán genomban, ezek közül számos variáns jelentősége ismeretlen.[13] Az eltérések gyakorisága földrajzi régiónként változik, leggyakoribb az európai és ausztrál lakosságban (17,6–29,8%), legritkább Ázsiában (9,4–21,7%).[14]

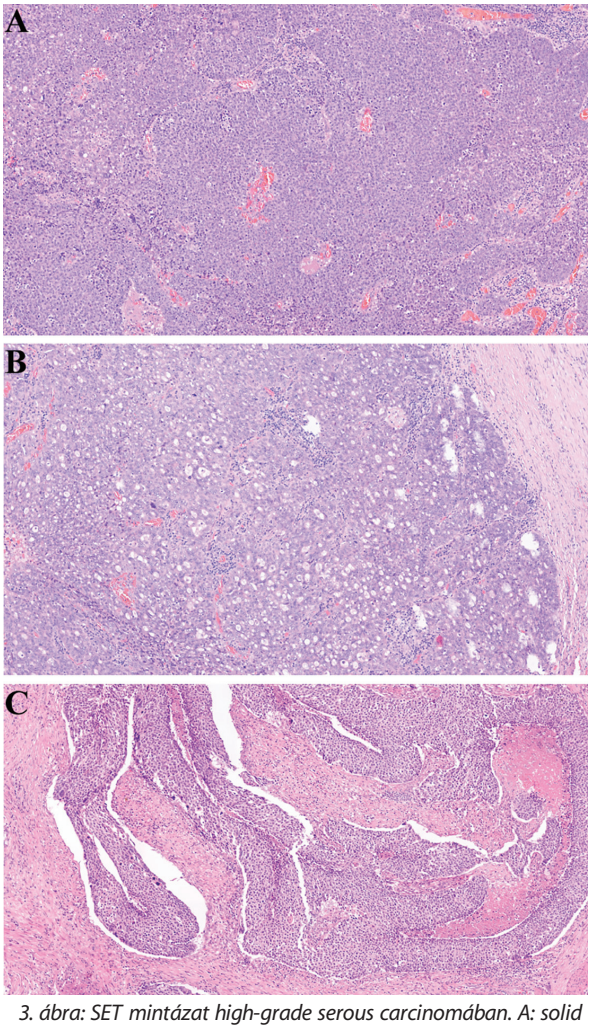
A legtöbb tumorszuppresszor génnel szemben a *BRCA1* és *-2* germinalis mutációi csak bizonyos szervekben hajlamosítanak malignus daganatok kialakulására. A *BRCA1/2* mutációk fontos rizikófaktorai elsősorban emlő és ovariumcarcinomák, illetve ritkábban pancreas-, prostata- és gyomorcarcinomák kialakulásának.[13] A *BRCA1/2* gének germinalis mutációi okozzák a familiáris emlő/ovarium carcinoma szindrómát. A kumulatív rizikó ovariumcarcinoma kialakulására *BRCA1* germinalis hordozókban 80 éves korig 44%, *BRCA2* germinalis hordozókban 17%,[15] szemben az átlagpopuláció 1,5%-os élettartam kockázatával.[16] Az összes ovariumcarcinoma 1–25%-a asszociált germinalis *BRCA1* és *-2* mutációkal,[17] míg szomatikus *BRCA1/2* mutáció az ovariumcarcinomák 5–11%-ában azonosítható.[16,18] A *BRCA* mutáns ovariumcarcinomák döntő többsége HGSC. Egyes tanulmányok más szövettani típusú (endometrioid, világossejtes) ovariumcarcinomákban is írtak le germinalis *BRCA* mutációkat,[18,19] de ezekben megkérdőjelezhető a szövettani tipizálás helyessége;[20] a centrális patológiai review-t is magukba foglaló tanulmányok eredményei alapján elképzelhető, hogy a germinalis BRCA mutációk jelenléte az ovariumcarcinomákon belül exkluzíven a HGSC-



2. ábra: A BRCA1 és BRCA2 gének funkciói és kapcsolatai más homológ rekombinációs repairben részt vevő génekkel.

re jellemző.[17,20] A mucinosus ovariumcarcinomákban nem fordulnak elő *BRCA* mutációk.[19] A jelenleg érvényes ESMO-ESGO guideline valamennyi nem mucinosus típusú ovariumcarcinomában előírja a *BRCA* mutációs státusz vizsgálatát.[21] A *BRCA1*/2 mutáns fenotípusú ovariumcarcinomák a *BRCA* vad típusú carcinomákoz képest jobban reagálnak a platinabázisú kemoterápiára és poli(ADP-ribóz) polimeráz (PARP) gátlószerekre, valamint jobb túlélési mutatókkal bírnak,[18] ez igaz mind a germinalis, mind a szomatikus mutációt tartalmazó daganatokra. Így az ovariumcarcinomák BRCA mutációs státusz meghatározásának az örökletes daganatszindróma szűrése mellett prediktív, prognosztikus és terápiás jelentősége is van.

A HGSC *BRCA* státuszára már a daganat szöveti képe is utalhat: a *BRCA* eltéréssel (mutációval vagy promoter hipermetilációval) asszociált daganatokban szignifikánsan magasabb a tumort infiltráló lymphocyták száma, gyakrabban alakul ki necrosis, magasabb a mitotikus aktivitás, valamint gyakoribb az ún. SET morfológia (a daganat >50%-ában solid, pseudoendometrioid vagy transitionalis carcinoma-szerű mintázat) *(3. ábra)*.[22] A HGSC metasztázisainak morfológiája is korrelál a *BRCA* mutációs státusszal: a *BRCA* eltérést tartalmazó daganatok áttéteiben az inváziós mintázat vagy pushing jellegű, vagy infiltratív esetben tisztán micropapillaris morfológiájú, míg a *BRCA* mutációt nem tartalmazó daganatok áttétei egyöntetűen infiltratív inváziós mintázatúak, változatos morfológiával (papillaris, mirigyes, cribriform és micropapillaris mintázat).[23]



3. ábra: SET mintázat high-grade serous carcinomában. A: solid szerkezet, B: pseudoendometrioid szerkezet, C: transitionalis sejtes (urothelsejtes) carcinomára emlékeztető szerkezet

PARP-gátlószerek

Ha a HRR mechanizmus akár a *BRCA1*/2, akár más szerepet játszó gének mutációi miatt hibát szenved, vagyis az érintett sejtekben HRR-deficiencia alakul ki, úgy egy másik DNS-hiba-javító mechanizmus, pl. a bázis excíziós repair (BER) kiesése gyakran a sejt halálához vezet.[24] Egy második hibajavító mechanizmus gátlásával mesterségesen előidézett sejthalált szintetikus letalitásnak nevezik. A klinikumban a HRR-deficiens daganatokban ezt a PARP enzimek gátlószereinek alkalmazásával érik el. A PARP enzimek a BER résztvevői. Ha működésük kiesik, úgy először spontán módon szimplaláncú DNS-törések, majd a replikációs villa összeomlása után duplaszálú DNS törések alakulnak ki, amelyeket a HRR-deficiens sejtek nem képesek kijavítani.[2] A PARP-gátlók emellett képesek csapdába ejteni a PARP enzimeket a DNS-en, és így gátolni a replikációt.[2] A csapdába ejtő képesség különbözik az egyes PARP-gátló gyógyszerek között, ez részben magyarázhatja a különböző PARP-gátlók némileg eltérő hatásprofilját. A klinikumban használt PARP-gátlók közé tartozik az olaparib, niraparib és a rucaparib, ezek közül hazánkban az olaparib és a niraparib érhető el.

HRR-deficiencia a *BRCA1*/2 mutációk mellett a HRR-ben szerepet játszó más gének (pl. *RAD51, ATM, ATR, CHEK1, CHEK2, NBN*) hibái miatt is létrejöhet.[18,24] Az így kialakuló, ún. BRCA-like fenotípus (más néven BRCAness) is érzékennyé teszi az ovariumcarcinomákat platinabázisú kemoterápiára, valamint PARP-gátló kezelésre. Érdekes módon a *BRCA1* promoter hipermetilációja a génexpresszió mértékének csökkenése ellenére nem jár hasonló eredményekkel.[26] A HGSC-k összesen kb. 50%-a mutat HRR-deficienciát.[11]

Az ovariumcarcinomák kezelése

Az ovariumcarcinomák standard elsővonalú terápiája a platina és taxol alapú kemoterápiával kiegészített sebészi kezelés. A HRR deficiens daganatok platinaérzékenységét magyarázza, hogy a platinabázisú kemoterápiás szerek duplaszálú DNS-töréseket indukálnak, amelyeket a HRR-deficiens daganatsejtek nem képesek kijavítani.[18] A HGSC-k 60–80%-a reagál jól az elsővonalú platinabázisú kezelésre[21] ezzel szemben a többi ovariumcarcinoma típus kevésbé kemoszenzitív, pl. a világossejtes carcinomák 11–27%-a, a LGSC-k csupán 2–5%-a reagál a platinabázisú terápiára; ez a tény is rámutat a helyes szövettani diagnózis jelentőségére.[27]

Optimális esetben a műtéti kezeléssel a beteg tumormentessé tehető a kemoterápia megkezdését megelőzően, de ez a gyakran igen előrehaladott állapotban diagnosztizált daganatok esetében nem mindig lehetséges. Fontos, hogy a műtétet lehetőleg tapasztalt nőgyógyászati daganatsebész végezze. Ideálisnak tekinthető a sebészi beavatkozás, ha nem marad hátra makroszkóposan látható daganatszövet a betegben.[28] A műtéti beavatkozás után visszamaradó daganatszövet mennyisége az ovariumcarcinomák legfontosabb prognosztikus faktora.[29] Amennyiben a daganat kiterjedtsége, vagy a beteg rossz általános állapota miatt nincs lehetőség primer műtéttel a daganatmentes állapot elérésére, úgy neoadjuváns kemoterápiát követően kell megkísérelni a citoreduktív sebészi beavatkozást (interval debulking). Az EORTC 55971, majd a 2015-ös CHORUS vizsgálatok eredményei alapján mind az összesített, mind a progressziómentes túlélési (PFS) adatok hasonlóak voltak előrehaladott stádiumú ovariumcarcinomás betegekben, ha primer sebészi ellátást követően kaptak 6 ciklus adjuváns kemoterápiát, vagy ha 3 ciklus neoadjuváns kemoterápiát követően történt a műtéti ellátás, majd ezután következett 3 ciklus adjuváns kemoterápia.[30]

Az elsővonalú platinabázisú kezelésre adott válasz alapján hagyományosan platinaérzékeny és platinarezisztens ovariumcarcinomákat különítenek el. Platinaérzékenynek számít a daganat, ha a kezelés befejezése után a progressziómentes időszak (PFI) legalább 6 hónap, platinarezisztensnek, ha kezelés végét követő 6 hónapon belül progrediál, míg platinarefrakternek, ha a progresszió a kezelés alatt következik be.[27] A jelenleg érvényes ESMO-ESGO irányelvek azonban túllépnek ezeken a definíciókon, miután 6 hónap hosszú PFI után is platinarezisztenssé válhat egy daganat, míg 6 hónapnál rövidebb PFI után is reagálhat másodvonalbeli platina kezelésre. Emellett a progeszszió észlelésének időpontja a kontroll vizsgálatok gyakoriságától és a progresszió megítélésének kritériumaitól is függ. Ezek miatt a rekurráló daganatok kezelésében jelenleg azt tekintik fő irányelvnek, hogy ismételt platinabázisú kezelés-e a legjobb opció (platina rechallenge).[21]

Az elmúlt évek eredményei, és főleg a PARP-gátlók kifejlesztése jelentősen átrajzolták az ovariumcarcinomák kezelési algoritmusát. Az első vonalban vagy adjuváns célból alkalmazott standard kemoterápiás kezelés sikerességét angiogenezisgátló (bevacizumab) és PARP-gátló terápiával lehet javítani. A bevacizumab a vascularis endothelialis növekedési faktor (VEGF) inhibíciója révén gátolja a daganatban az angiogenezist. A GOG 218 és ICON7 tanulmányok eredményei alapján a kezelés alkalmazásából elsősorban a residuummal operált betegek profitálnak, Magyarországon jelenleg a bevacizumab ezen indikációban érhető el.[21]

A különböző PARP-gátlókat először germinalis *BRCA* mutáns betegek rekurráló, platinaszenzitív ovariumcarcinomájának negyed- (olaparib), illetve harmadvonalú (rucaparib) terápiájaként törzskönyvezték. Ezt követően az olaparibot rekurráló, germinalis *BRCA* mutáns, platinaszenzitív ovariumcarcinoma fenntartó terápiájaként is engedélyezték. Napjainkban rekurráló, platinaszenzitív daganat esetén *BRCA* státusztól függetlenül lehet alkalmazni PARP-gátlókat (olaparib, niraparib, rucaparib); a legnagyobb javulás a PFS-ben a *BRCA* mutáns státuszú daganatok esetén várható.[2,31]

A másod- és harmadvonalban már hatékonyságukat bizonyított PARP-gátlók közül először az olaparib elsővonalú alkalmazásáról számoltak be. A SOLO1 studyban *BRCA*-mutáns high-grade serosus és high-grade endometrioid ovariumcarcinomák platinabázisú kemoterápiáját követően alkalmazták a fenntartó olaparib kezelést. Az olaparib hatására 70%-kal csökkent a progresszió vagy daganattal asszociált halálozás relatív rizikója a placebocsoporthoz képest.[32] A PRIMA study keretében a sikeres elsővonalú platinabázisú terápiát követően alkalmazott niraparib fenntartó kezelés nemcsak a *BRCA* mutáns, hanem a HRR-deficiens és a HRR-deficienciát nem mutató (HRR-proficiens) daganatok esetén is számottevő progressziómentes túlélési előnyt mutatott a standard terápiához képest.[33] A túlélési előny mértéke legmagasabb a BRCA mutáns, míg legalacsonyabb a HRR-proficiens daganatok esetén volt. Ezeknek az eredményeknek köszönhetően az újonnan diagnosztizált ovariumcarcinomás betegek-

ben amennyiben az elsővonalú platinabázisú kezelésre reagált a daganat, úgy fenntartó terápiaként a *BRCA* mutáns esetekben olaparib kezelés, illetve *BRCA* státusztól függetlenül niraparib kezelés adható.[31]

A PAOLA-1 study eredményei alapján BRCA mutáns, illetve HRR deficiens daganatok kezelésében a kemoterápia mellé adott PARP-gátló olaparib és angiogenezis gátló bevacizumab kombináció szignifikánsan meghosszabbította a PFS-t a kemoterápia és bevacizumab kombinációhoz képest, azonban ez a különbség a HRR-proficiens daganatok esetén nem volt megfigyelhető.[34] A kombináció alkalmazása a gyakorlatban azon esetekben várható, ahol a residuummal operált betegnél bevacizumab kezelést indítanak, majd a később megérkező molekuláris lelet alapján *BRCA* mutáció vagy HRR-deficiencia igazolódik.

A fenti terápiás kombinációk mindegyikét befogadta az Európai Gyógyszerügynökség (EMA) és a NEAK is.

Az ESMO-ESGO irányelvek alapján recidív daganat esetén nem jön szóba a platina rechallenge, ha a daganat progrediált az elsővonalú kezelés alatt (platinarefrakter daganat), korai tünetes relapszus következett be vagy ha nem tolerálta a beteg a platinabázisú terápiát. Ezekben az esetekben platinamentes kezelés javasolt, esetlegesen angiogenezis gátlókkal kombinációban. A többi esetben, ahol számítani lehet platinabázisú kezelés újbóli hatékonyságára, a tünetek súlyossága és a korábban alkalmazott kezelés módja döntenek a platinaalapú kezelés mellé adott kiegészítő terápiáról. Jelenleg mind a bevacizumab, mind a PARP-gátlók alkalmazását a betegség lefolyása során csupán egyszer támogatja evidencia, rechallenge csupán studyk keretében valósulhat meg. Amennyiben a beteg optimális műtétben részesült, neoadjuváns protokoll szerint kapta az ellátást vagy valamilyen egyéb okból nem részesült bevacizumab kezelésben, úgy a bevacizumab másodvonalban való alkalmazása célszerű. Különösen előnyös a bevacizumab alkalmazása, amennyiben akut panaszokat okozó ascites képével jelentkezik a kiújulás. Ellenjavallatát képezheti a bevacizumab alkalmazásának az üreges szervek falát (bél, hólyag) infiltráló tumor, mivel ilyenkor a gyakran halálos kimenettel járó bél vagy húgyhólyag perforáció esélye jelentősen megnő.[35]

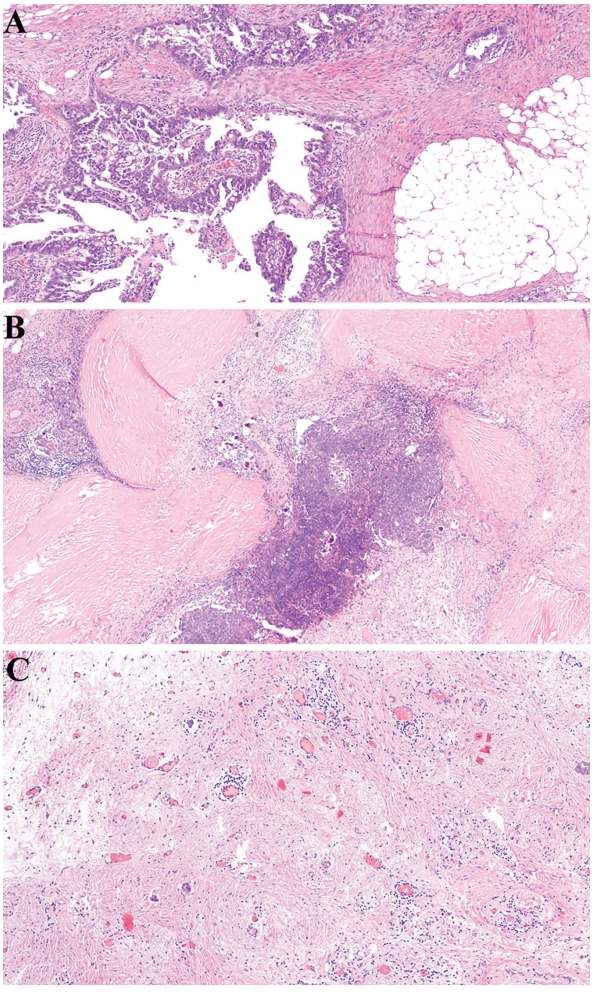
A platinabázisú kezelés által kiváltott terápiás válasz patológiai értékelése

Amennyiben a neoadjuváns kemoterápiát követően megtörténik a késleltetett sebészi beavatkozás, a patológiai feldolgozás során értékelni kell a daganat neoadjuváns kezelésre adott válaszának mértékét. Erre a célra egy háromosztatú skálát (Chemotherapy Response Score, CRS) fejlesztettek ki *(2. táblázat)*, ahol a CRS1-érték jelöli a csekély mértékben vagy egyáltalán nem reagáló daganatokat, míg a CRS3 kategóriába tartoznak a komplett vagy közel komplett regressziót mutató daganatok *(4. ábra)*. A CRS-t a csepleszben azonosított, kezelésre legkevésbé reagáló metasztázisban kell értékelni.[28] A score jól reprodukálhatónak bizonyult különböző patológusok között.[36] Egy közelmúlt-

2. táblázat: A neoadjuváns kemoterápiára adott válasz mértékének megítélésére használt score-rendszer (CRS). A score meghatározása a HGSC kezelésre legkevésbé reagáló cseplesz metastasisából történik

CRS1: Válaszreakció nincs vagy csekély mértékű válaszreakció
Nagyrészt viábilis daganat, amely csak kis mértékben vagy egyáltalán nem mutat regresszió-asszociált fibroinflammatorikus eltéréseket*. Ide tartoznak azok az esetek is, ahol nehéz különbséget tenni a regresszió és a daganat által indukált desmoplasticus stromareakció, illetve gyulladásos beszűrődés között.
CRS2: Számottevő válaszreakció mellett rendszeresen, könnyedén azonosítható viábilis daganatgócok
Multifokális vagy diffúz regresszióasszociált fibroinflammatorikus eltérések* mellett viábilis daganatos gócok (nodularis, lemezes vagy trabecularis mintázatban), illetve kiterjedt regresszió-asszociált fibroinflammatorikus eltérések* láthatók könnyedén azonosítható, multifokális reziduális daganattal.
CRS3: Komplett vagy közel komplett válasz residualis daganat nélkül VAGY minimális mennyiségű, szabálytalan elrendeződésű viábilis daganatos gócok (egyesével elhelyezkedő daganatsejtek, daganatsejt csoportok vagy 2 mm alatti átmérőjű nodulusok)
Nagyrészt regresszió-asszociált fibroinflammatorikus eltérések* vagy – ritka esetben – minimális vagy nem fellelhető residualis daganat inflammatorikus eltérések teljes hiánya mellett. Ajánlott különséget tenni a mikroszkópos méretű residualis daganat és az egyáltalán nem fellelhető residualis daganat között.

* regresszió-asszociált fibroinflammatorikus eltérések: fibrosis habos citoplazmájú histiocyták, vegyes gyulladásos sejtes beszűrődés és psammomatestek jelenlétével. Megkülönböztetendő a daganat által indukált desmoplasticus stromareakciótól és gyulladásos beszűrődéstől.



4. ábra High-grade serosus carcinoma cseplesz metastasisokból származó képek, neoadjuváns kemoterápiára adott különböző mértékű válasszal. ***A:*** *neoadjuváns kezelésre adott válasz gyakorlatilag nem látható (CRS1), a daganat környezetében desmoplasticus stroma figyelhető meg.* ***B:*** *neoadjuváns kezelésre adott közepes mértékű válasz (CRS2) látható, a nagyméretű viábilis daganatgóc mellett kiterjedten azonosíthatók regresszió-asszociált eltérések (habos cytoplasmájú histiocyták mezői lymphocytás beszűrődéssel, psammomatestekkel).* ***C:*** *neoadjuváns kezelésre adott kifejezett mértékű válasz (CRS3) látható, csupán mikroszkópos méretű viábilis daganatsejt csoportok azonosíthatók.*

ban megjelent metaanalízis szerint a CRS3 kategóriába sorolható daganatok hosszabb összesített és progressziómentes túléléssel bírtak a CRS1/2 csoporthoz képest, valamint szignifikánsan magasabb arányban bizonyultak platinaérzékenynek. A CRS3 kategórián belül is azokban az esetekben voltak szignifikánsan hosszabbak a túlélési adatok, ahol nem maradt vissza mikroszkópos méretű daganat sem a csepleszben. Emellett a CRS3 kategória szignifikánsan asszociált volt a daganat *BRCA1/2* mutánsú státuszával.[29] Mindezek alapján a CRS értéknek prediktív ereje van, ezért kiemelten fontos a patológiai feldolgozás során a cseplesz alapos vizsgálata. A College of American Pathologists (CAP) ajánlása szerint makroszkóposan látható daganatos gócok esetén 4–6 blokk indítása szükséges a csepleszből, míg makroszkóposan nem látható daganatos érintettség esetén 5–10 blokk indítása javasolt.

A platinarezisztenciának nincsen validált prediktív biomarkere.[21] Erre a jövőben egy jelölt lehet a HGSC-k kisebb hányadában leírt CCNE1 amplifikáció, ami mutuálisan exkluzív a germinalis *BRCA* mutációkkal, rosszabb prognózissal és platinarezisztenciával társul.[37]

BRCA1/2 mutációanalízis

A *BRCA1/2* gének nagy mérete és a gének teljes hosszán elhelyezkedő mutációk miatt a hagyományos szekvenálási technikák napjainkra időigényesnek és drágának számítanak, egyre inkább az új generációs szekvenálás (NGS) nyer teret.[14] Az NGS gyorsasága fontos szempont lehet a terápia tervezésében, pl. a PARP-gátló kezelés időben történő megkezdésében újonnan felfedezett ovariumcarcinoma esetén. A hagyományos szekvenálási módszerek használata azért sem ajánlott, mert szenzitivitásuk elmarad az NGS-hez képest, főleg az 50%-nél kevesebb tumorsejtet tartalmazó FFPE mintákban.[38] Az NGS előnye az is, hogy ezzel a módszerrel egyidőben számos gént tartalmazó paneleket lehet vizsgálni, így pl. egy mintából a *BRCA1* és *BRCA2* gének szekvenálása mellett egyidejűleg más, familiáris emlő/ovarium carcinoma szindróma kialakulásában szerepet játszó, alacsonyabb penetranciájú géneket (pl. *PALB2, CHEK2, ATM*), valamint más HRR-ben szerepet játszó gének vizsgálatát is meg lehet ejteni.[14] Az NGS mellett kiegészítő molekuláris vizsgálatként a nagyobb régiókat érintő átrendeződések detektálására a multiplex ligációfüggő amplifikáció (MLPA) módszere használható. Egy 1342 ovariumcarcinomában szenvedő beteget vizsgáló tanulmány a *BRCA* mutációk 3,6%- át szekvenálással nem, de MLPA-val ki lehetett mutatni.[19]

A *BRCA* mutációanalízist a nem mucinosus típusú ovariumcarcinoma diagnózisának felállítását követően minél hamarabb el kell indítani, hogy BRCA mutáns státusz és platinaérzékenység esetén az elsővonalú kezelés befejezésekor időben el lehessen kezdeni a fenntartó PARP-gátló kezelést.[39] A mutációanalízist egyidejűleg vérből és a tumorból készült formalin fixált, paraffinba ágyazott (FFPE) is el kell végezni. A germinalis mutációk tekintetében a tumorszövet vizsgálata kevésbé szenzitív a vérből történő analízishez képest, azon-

ban a tumorszövet vizsgálata lehetőséget nyújt a szomatikus mutációk azonosítására, amelyek PARP-gátló kezelés során szintén kedvezőbb prognózist jeleznek előre.[31] Az FFPE mintából történő vizsgálathoz olyan blokkot kell választani, amelyben a tumorsejtek aránya az összes sejthez képest legalább 15%, így biztossá tehető, hogy a tumorból származó DNS elégséges mennyiségű az esetleges szomatikus mutációk azonosításához.[38] Ha szükséges, makrodisszekció segítségével növelhetjük a tumorsejtek arányát a mutációanalízisre szánt mintában.

Intézetünkben a *BRCA1*/2 gének vérből és paraffinos mintákon végzett mutációanalízise NGS technikával folyik, emellett elérhető a HRR-ben részt vevő gének szélesebb körét *(ATM, BARD1, BRCA1, BRCA2, BRIP1, CDK12. CHEK1, CHEK2, FANCA, FANCL, NBN, PALB2, RAD51B, RAD51C, RAD51D, RAD54L, TP53)* vizsgáló panel is.

Új terápiás irányok

Az elmúlt években bevezetett immunellenőrzőpont-gátló szerek (PD1-, PD-L1-gátlók) az onkológia számos területén ígéretes eredményeket mutatnak. Ezzel szemben a monoterápiaként alkalmazott immunellenőrzőpont-gátló kezelésre a rekurráló ovariumcarcinomák csupán csak 8–15%-a reagál. A PARP-gátlók elméletben szinergista hatásúak az immunellenőrzőpont-gátlókkal, mivel a HRR-deficiens sejtekben a hibajavító mechanizmus hibái miatt fokozott mértékben keletkeznek szomatikus mutációk, így több neoantigén jön létre. Jelenleg is zajlanak klinikai vizsgálatok PARP-gátló és immunellenőrzőpont-gátló szerek együttes alkalmazásával.[25]

HR-proficiens tumorokban új irány lehet különböző terápiás szerekkel (antiangiogenetikus kezelés, PI3K-gátlók) HR-deficiencia indukálása és így *BRCA*-like fenotípus kialakítása.[25]

A PARP-gátlókra kialakuló rezisztencia hátterében többek között olyan másodlagos *BRCA* mutációk állhatnak, amelyek helyreállítják a HRR funkciót. *In vitro* vannak arra adatok, hogy a PI3K/AKT útvonal aktivációja elősegítheti a PARP-rezisztenciát, így felmerül a PARP és PI3K/AKT útvonal kettős gátlásának lehetősége.[41]

Irodalom

1. Seidman JD, Ronnett BM, Shih IM, Cho KR, Kurman RJ. Epithelial tumors of the ovary. In: Kurman RJ, Ellenson LH, Ronnett BM, eds. Blaustein's pathology of the female genital tract. 7th ed. Springer Nature Switzerland AG, 2019; 841-966.
2. Mullen MM, Kuroki LM, Thaker PH. Novel treatment options in platinum-sensitive recurrent ovarian cancer: A review. Gynecol Oncol, 2019; 152:416-25.
3. Stewart C, Ralyea C, Lockwood S. Ovarian cancer: An integrated review. Semin Oncol Nurs, 2019; 35:151-56
4. Köbel M, Kalloger SE, Huntsman DG, Santos JL, Swenerton KD, Seidman JD, et al. Differences in tumor type in low-stage versus high-stage ovarian carcinomas. Int J Gynecol Pathol, 2010; 29:203-11.
5. Malpica A, Deavers MT, Lu K, Bodurka DC, Atkinson EA, Gershenson DM, et al. Grading ovarian serous carcinoma using a two-tier system. Am J Surg Pathol, 2004; 28:496-504.
6. Singh N, McCluggage WG, Gilks CB. High-grade serous carcinoma of tubo-ovarian origin: recent developments. Histopathology, 2017; 71:339-56.
7. Zakhour M, Danovitch Y, Lester J, Rimel BJ, Walsh CS, Li AJ, et al. Occult and subsequent cancer incidence following risk-reducing surgery in BRCA mutation carriers. Gynecol Oncol, 2016; 143:231-35.
8. Singh N, Benson JL, Gan C, Anglesio M, Arora R, Faruqi AZ, et al. Disease distribution in low-stage tubo-ovarian high-grade serous carcinoma (HGSC): Implications for assigning primary site and FIGO stage. Int J Gynecol Pathol, 2018; 37:324-30.
9. Soong TR, Howitt BE, Horowitz N, Nucci MR, Crum CP. The fallopian tube, "precursor escape" and narrowing the knowledge gap to the origins of high-grade serous carcinoma. Gynecol Oncol, 2019; 152:426-33.
10. Singh N, Gilks CB, Hirschowitz L, et al. Primary site assignment in tubo -ovarian high -grade serous carcinoma: Consensus statement on unifying practice worldwide. Gynecol Oncol, 2016; 141:195-98.
11. Cancer Genome Atlas Research Network. Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma. Nature, 2011; 474:609 -15.
12. Köbel M, Piskorz AM, Lee S, Lui S, LePage C, Marass F, et al. Optimized p53 immunohistochemistry is an accurate predictor of TP53 mutation in ovarian carcinoma. J Pathol Clin Res, 2016; 2:247-58.
13. Singh AK, Yu X. Tissue-specific carcinogens as soil to seed BRCA1/2-mutant hereditary cancers. Trends Cancer, 2020; 6:559-68.
14. Zelli V, Compagnoni C, Cannita K, Capelli R, Capalbo C, Di Vito Nolfi M, et al. Application of next generation sequencing to the analysis of familial breast/ovarian cancer. High Throughput, 2020; 9:1.
15. Kuchenbaecker KB, Hopper JL, Barnes DR, Phillips KA, Mooij TM, Roos-Bloom MJ, et al. Risks of breast, ovarian, and contralateral breast cancer for BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. JAMA, 2017; 317:2402-16.
16. Vergote I, Banerjee S, Gerdes AM, van Asperen C, Marth C, Vaz F, et al. Current perspectives on recommendations for BRCA genetic testing in ovarian cancer patients. Eur J Cancer, 2016; 69:127-34.

17. Hanley GE, McAlpine JN, Miller D, Huntsman D, Schrader KA, Gilks CB, et al. A population-based analysis of germline BRCA1 and BRCA2 testing amon govarian cancer patients in an era of histotype-specific approaches to ovarian cancer prevention. BMC Cancer, 2018; 18:254.
18. Pennington KP, Walsh T, Harrell MI, Lee MK, Pennil CC, Rendi MH, et al. Germline and somatic mutations in homologous recombination genes predict platinum response and survival in ovarian, fallopian tube, and peritoneal carcinomas. Clin Cancer Res, 2014; 20: 764–775.
19. Zhang S, Royer R, Li S, McLaughlin JR, Rosen B, Risch HA, et al. Frequencies of BRCA1 and BRCA2 mutations among 1,342 unselected patients with invasive ovarian cancer. Gynecol Oncol, 2011; 121:353-57.
20. Schrader KA, Hurlburt J, Kalloger SE, Hansford S, Young S, Huntsman DG, et al. Germline BRCA1 and BRCA2 mutations in ovarian cancer: utility of a histology-based referral strategy. Obstet Gynecol, 2012; 120:235-40.
21. Colombo N, Sessa C, du Bois A, Ledermann J, McCluggage WG, McNeish I, et al. ESMO–ESGO consensus conference recommendations on ovarian cancer: pathology and molecular biology, early and advanced stages, borderline tumours and recurrent disease. Annals of Oncology, 2019; 30:672-705.
22. Soslow RA, Han G, Park KJ, Garg K, Olvera N, Spriggs DR, et al. Morphologic patterns associated with BRCA1 and BRCA2 genotype in ovarian carcinoma. Mod Pathol, 2012; 25:625–36.
23. Reyes MC, Arnold AG, Kauff ND, Levine DA, Soslow RA. Invasion patterns of metastatic high-grade serous carcinoma of ovary or fallopian tube associated with BRCA deficiency. Mod Pathol, 2014; 27:1405-11.
24. Konstantinopoulos PA, Spentzos D, Karlan BY, Taniguchi T, Fountzilas E, Francoeur N, et al. Gene expression profile of BRCAness that correlates with responsiveness to chemotherapy and with outcome in patients with epithelial ovarian cancer. J Clin Oncol, 2010;28:3555-61.
25. Veneris JT, Matulonis UA, Liu JF, Konstantinopoulos PA: Choosing wisely: Selecting PARP inhibitor combinations to promote anti-tumor immune responses beyond BRCA mutations. Gynecol Oncol, 2020; 156:488-97.
26. Hoppe MM, Sundar R, Tan DSP, Jeyasekharan AD. Biomarkers for Homologous Recombination Deficiency in Cancer. J Natl Cancer Inst, 2018; 110:704-13.
27. Friedlander M. Do all patients with recurrent ovarian cancer need systemic therapy? Cancer, 2019; 125:4602-08.
28. Böhm S, Faruqi A, Said I, Lockley M, Brockbank E, Jeyarajah A, et al. Chemotherapy response score: development and validation of a system to quantify histopathologic response to neoadjuvant chemotherapy in tubo-ovarian high-grade serous carcinoma J. Clin. Oncol, 2015; 33:2457-63.
29. Cohen PA, Powell A, Böhm S, Gilks CB, Stewart CJR, Meniawy TM, et al. Pathological chemotherapy response score is prognostic in tubo-ovarian high-grade serous carcinoma: A systematic review and meta-analysis of individual patient data. Gynecol Oncol, 2019; 154:441-48.
30. Kehoe S, Hook J, Nankivell M, Jayson GC, Kitchener H, Lopes T, et al. Primary chemotherapy versus primary surgery for newly diagnosed advanced ovarian cancer (CHORUS): an open-label, randomised, controlled, non-inferiority trial. Lancet, 2015; 386:249-57.
31. Tew WP, Lacchetti C, Ellis A, Maxian K, Banerjee S, Bookman M, et al. PARP Inhibitors in the Management of Ovarian Cancer: ASCO Guideline. J Clin Oncol, 2020; doi: 10.1200/JCO.20.01924.
32. Moore K, Colombo N, Scambia G, Kim BG, Oaknin A, Friedlander M, et al. Maintanace olaparib in patients with newly diagnosed advanced ovarian cancer. N Engl J Med 2018; 379:2495-2505.
33. González-Martín A, Pothuri B, Vergote I, Christensen RDP, Graybill W, Mirza MR, et al. Niraparib in patients with newly diagnosed advanced ovarian cancer. N Engl J Med 2019; 381:2391-2402.
34. Ray-Coquard I, Pautier P, Pignata S, Pérol D, González-Martín A, Berger R, et al. Olaparib plus bevacizumab as first-line maintenance in ovarian cancer. N Engl J Med 2019; 381:2416-28.
35. Simpkins F, Belinson JL, Rose PG. Avoiding bevacizumab related gastrointestinal toxicity for recurrent ovarian cancer by careful patient screening. Gynecol Oncol 2007; 107:118-23.
36. Said I, Böhm S, Beasley J, Ellery P, Faruqi AZ, Ganesan R, et al. The chemotherapy response score (CRS): inter-observer reproducibility in a simple and prognostically relevant system for reporting the histologic response to neoadjuvant chemotherapy in tuboovarian high-grade serous carcinoma Int J Gynecol Pathol, 2017; 36:172-79.
37. Chan AMY, Enwere E, McIntyre JB, Wilson H, Nwaroh C, Wiebe N, et al. Combined CCNE1 high-level amplification and overexpression is associated with unfavourable outcome in tubo-ovarian high-grade serous carcinoma. J Pathol Clin Res, 2020 doi: 10.1002/cjp2.168.
38. Capoluongo E, Ellison G, López-Guerrero JA, Penault-Llorca F, Ligtenberg MJL, Banerjee S, et al. Guidance statement on BRCA1/2 tumor testing in ovarian cancer patients. Semin Oncol, 2017; 44:187-97.
39. Neviere Z, De La Motte Rouge T, Floquet A, Johnson A, Berthet P, Joly F. How and when to refer patients to oncogenetic counseling in the era of PARP inhibitors. Ther Adv Med Oncol, 2020. doi: 10.1177/1758835919897530.
40. Gonzalez-Martín A, Sánchez-Lorenzo L. Immunotherapy with checkpoint inhibitors in patients with ovarian cancer: Still promising? Cancer, 2019; 125:4616-22.
41. Crusz SE, Miller RE. Targeted therapies in gynecological cancers. Histopathology, 2020; 76:157-70.

A központi idegrendszeri tumorok korszerű patológiai diagnosztikája – Diagnosztikai kihívások a központi idegrendszeri tumorok WHO klasszifikációjának 2016-os megjelenését követően

Advanced Pathological Diagnosis of Central Nervous System Tumors – Diagnostic Challenges following the 2016 Publication of the WHO Classification of Central Nervous System Tumors

Rajnai Hajnalka, Téglási Vanda, Scheich Bálint
I. Sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet, Semmelweis Egyetem, Budapest
E-levél: hajnalka.rajnai@med.semmelweis-univ.hu

ÖSSZEFOGLALÁS A központi idegrendszeri tumorok 2016-ban megjelent WHO klasszifikációja már integrált alapokon, tehát a morfológiai jegyekre, illetve a genetikai eltérésekre alapozva határozza meg a különböző primer központi idegrendszeri tumorcsoportokat. Azonban a WHO klasszifikáció megjelenése óta is – a molekuláris genetikai módszerek egyre nagyobb érzékenysége és áteresztőképessége következtében – egyre szélesebb körben kerülnek leírásra visszatérő molekuláris eltérések melyek specifikus tumorcsoportokat határoznak meg. Ezen eltérések mindennapi diagnosztikába való integrációja céljából jött létre a cIMPACT-NOW (the Consortium to Inform Molecular and Practical Approaches to CNS Tumor Taxonomy – Not Official WHO) konzorcium, mely rendszeres update-ekkel segíti az újonnan leírt entitások értelmezését. A legfontosabb megfigyelések a felnőtt és gyermekkori glialis, illetve a gyermekkori embryonalis tumor csoportokban történtek, úgymint az IDH vad típusú gliomák grade-elése, valamint a máshogy nem specifikálható embryonalis tumorok klasszifikációja. A jelen összefoglaló közleményben a legfontosabb genetikai biomarkerek kerülnek tárgyalásra, melyek befolyásolhatják és megkönnyíthetik a mindennapi diagnosztikai algoritmusokat a primer központi idegrendszeri tumorok tekintetében.

KULCSSZAVAK központi idegrendszeri tumorok, diffúz glioma, embryonalis tumor, medulloblastoma

SUMMARY The updated 2016 edition of the World Health Organization (WHO) Classification of Tumours of the Central Nervous System (CNS) already defines the different primary central nervous system tumor groups based on integrated genotypic and phenotypic parameters. However, since the introduction of the 2016 WHO classification, due to the increasing sensitivity and permeability of molecular genetic methods, recurrent molecular alterations that define specific tumor groups have been increasingly described. To integrate these mutations into day-to-day diagnostics, the cIMPACT-NOW (the Consortium to Inform Molecular and Practical Approaches to the CNS Tumor Taxonomy — Not Official WHO) consortium was established to help the interpretation of newly described entities with regular updates. The main observations were made in the adult and childhood glial and the childhood embryonic tumor groups, such as grading of IDH wild-type gliomas and classification of embryonic tumors, not otherwise specified. This summary discusses the most important genetic biomarkers that may influence and facilitate everyday diagnostic algorithms of primary CNS tumors.

KEY WORDS central nervous system neoplasms, diffuse glioma, embryonal tumors, medulloblastoma

Rövidítések

ATRT	*atípusos teratoid/rhabdoid tumor*
ATRX	*alpha thalassemia/mental retardation syndrome X-linked*
BCOR	*BCL6 Corepressor*
BRAF	*v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B*
BRCA	*Breast cancer type 1 susceptibility*
C19MC	*The chromosome 19 miRNA cluster*
CCTNB1	*Beta-catenin*
CDKN2A/B	*Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A/B*
CIC	*Capicua Transcriptional Repressor*
cIMPACT-NOW	*Consortium to Inform Molecular and Practical Approaches to CNS Tumor Taxonomy-Not Official WHO*
CNS	*Central Nervous System*
CpG	*Cytosine-phosphate-guanine*
DICER1	*Drosophila, Homolog Of, 1*
EGFR	*Epidermal growth factor receptor*
ETMR	*Embryonalis tumor többrétegű rosettákkal*
FGFR	*Fibroblast growth factor receptors*
FOXR2	*Forkhead Box R2*
GAB1	*GRB2 associated binding protein 1*
G-CIMP	*Cytosine-phosphate-guanine island methylator phenotype*
H3F3A	*H3 Histone Family Member 3A*
HIST1H3B/C	*Histone Cluster 1 H3 Family Member B/C*
IDH1/2	*Isocitrate-dehidrogenase 1/2*
L1CAM	*L1 cell adhesion molecule*
MAPK	*Mitogen-activated protein kinase*
MN1	*Meningioma 1*
NF-κB	*Members of the nuclear factor-□B*
NGS	*Next generation sequencing*
NF1	*Neurofibromatosis 1*
NUTM1	*NUT Midline Carcinoma Family Member 1*
PDGFRA	*Platelet-derived growth factor receptor alpha*
PF-EPN	*Posterior fossa ependymoma*
PTCH1	*Patched1*
PTEN	*Phosphatase and tensin homolog*
RB1	*Retinoblastoma 1*
RELA	*REL-associated protein*
SC-EPN	*Spinalis ependymoma*
SHH	*Sonic hedgehog pathway*
SMARCA4/BRG1	*SWI / SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin subfamily A member 4 / Brahma-related gene-1*
SMARCB1/INI1	*SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily B member 1 / Integrase Interactor 1*
SMO	*Smoothened*
ST-EPN	*Supratentorialis ependymoma*
SUFU	*Suppressor of fused protein*
TERT	*Telomerase reverse transcriptase*
WHO	*World Health Organization*
WNT	*Wingless pathway*
YAP1	*Yes-associated protein 1*

Bevezetés

A primer központi idegrendszeri tumorok klasszifikációja egészen a közelmúltig morfológiai, hisztológiai sajátosságokon alapult, az elmúlt évtizedben azonban jelentős paradigmaváltásra került sor e tekintetben a molekuláris genetikai módszerek fejlődésének köszönhetően. A tumoros betegségek genetikai hátterének feltárását célzó intenzív kutatások igazolták, hogy egyes tumorcsoportok visszatérő genetikai eltérésekkel asszociáltak. A 2016-ban megjelent központi idegrendszeri tumorok WHO klasszifikációjának 4. kiadása ezt figyelembe véve a szövettani sajátosságok mellett integrálta a mindennapi diagnosztikai kritériumok közé a tumorok molekuláris alapokon történő osztályozását. Ennek következtében új, eddig nem létező entitások definiálása (RELA fúziós ependymoma), valamint korábban más alapon osztályozott tumorcsoportok újratárgyalása és bővítése történt, a háttérben felfedezett visszatérő genetikai eltérés alapján (pl. H3 K27M mutáns diffúz középvonali glioma).[1-3] A felnőttkori központi idegrendszeri tumorok egyik legfontosabb csoportjának, a diffúz gliomáknak a beosztása is jelentős változáson esett át, mely során a tumortípusok egyértelmű elkülönítése molekuláris alapokra helyeződött.4 Emellett a gyermekkori primer központi idegrendszeri embryonalis tumorok klasszifikációja is teljes mértékben újraíródott a genetikai eltérések alapján. Megtörtént a leggyakoribb embryonalis tumor, a medulloblastoma szubklasszifikációja a háttérben meghúzódó jelátviteli útvonalak alapján, illetve teljesen új entitások kerültek bevezetésre, míg mások megszűntek.[5]

Az aktuálisan érvényes központi idegrendszeri tumorok WHO klasszifikációja 4. kiadásának megjelenése óta is számos entitás és diagnosztikai algoritmus került leírásra. Ezek egységesítésére alakult meg a cIMPACT-NOW konzorcium, mely biztosítja az aktuális kutatási eredmények klinikai és patológiai értelmezését és rendszeres iránymutatásokat tesz közzé a mindennapi diagnosztika tekintetében.[6-12]

Jelen összefoglaló közlemény azokra a diagnosztikai változásokra és új entitásokra fókuszál, melyek a központi idegrendszeri tumorok WHO klasszifikációjának 2016-os megjelenését követően kerültek felismerésre és leírásra, legfőképpen a felnőttkori gliomák és a gyermekkori embryonalis tumorok tekintetében.

Glialis tumorok

Felnőttkori diffúz gliomák

Diffúz gliomák minden életkorban kialakulhatnak, azonban felnőttkorban a leggyakoribbak. A sejteredet alapján megkülönböztetünk astrocyter és oligodendroglialis differenciációt mutató tumorokat. A diffúz gliomák diagnosztikájában nagy paradigmaváltást jelentett az izocitrát-dehidrogenáz enzimet kódoló gének (*IDH1* és *IDH2*) mutációinak leírása Grade II. és Grade III. astrocytomákban és oligodendrogliomákban, valamint a glioblastomák egy részében. Ennek eredményeképpen került karakterizálásra az *IDH1*/*IDH2* mutációt hordozó szekunder glioblastoma, mely alacsony grádusú astrocyter tumorok transzformációjának eredményeképpen alakul ki, valamint az *IDH1*/*IDH2* vad típusú, primer vagy *de novo* kialakuló glioblastoma.[13] Az oligodendrogliomák definiáló genetikai eltéréseként az 1p/19q codeletio már jóval korábban leírásra került.[14] Az *IDH1*/*IDH2* mutációt hordozó astrocyter tumorokat a *TP53* és alpha thalassemia / mental retardation *syndrome* X-linked (*ATRX*) gének funkcióvesztéssel járó mutációi jellemzik.[15]

Ennek megfelelően a 2016-os központi idegrendszeri tumorok WHO klasszifikációja a diffúz gliomákat 3 nagy csoportba sorolja az integrált diagnózis alapján: 1. diffúz astrocyter tumorok, *IDH* vad típus; 2. diffúz astrocyter tumorok, *IDH* mutáns és 3. oligodendrogliomák, *IDH* mutáns, 1p/19q codeletált *(1. ábra)*.[1]

IDH mutációt hordozó diffúz astrocyter tumorok

Gyakori és hosszú ideje fennálló probléma az *IDH* mutációt hordozó diffúz gliomák grádus meghatározása, melyet egyértelműen a 2016-os WHO klasszifikáció sem rendezett. A diffúz astrocyter tumorok WHO grade II-IV. besorolása továbbra is kevéssé jól definiált morfológiai alapokon történik, úgymint a mitotikus aktivitás, a sejtmagi atípia foka, illetve a microvascularis proliferáció és nekrózis jelenléte.[1] A grade II., illetve grade III. tumorok elkülönítésében továbbra sincsen konszenzus a mitotikus aktivitást, illetve a proliferációs indexet (Ki-67) illetően. A tumor grade jobb definiálására több kutatócsoport is megpróbált objektív, molekulárisan is definiálható markert keresni. Leírásra került erős prognosztikai faktorként a *CDKN2A*/B gén homozigóta delécióját, mely az IDH mutációt hordozó WHO grade II. diffúz astrocytomák 1–12%-ában, a WHO grade III. anaplasticus astrocytomák 6–20%-

ában, míg a WHO grade IV. glioblastomák 16–34%-ában mutatható ki.[6,16] Összefüggést mutatott a prognózissal a CDK4 amplifikáció és az alacsony szintű globális DNS metiláció (G-CIMP-low) is, azonban ezek prognosztikus értéke nem bizonyult annyira egyértelműnek, mint a *CDKN2A*/B gén homozigóta deléciója esetén.16,17 Ennek megfelelően az IDH mutáció mellett *CDKN2A*/B gén homozigóta deléciót hordozó astrocytomákban a hisztomorfológiai jellegzetességektől függetlenül javasolják a tumor WHO grade IV csoportba sorolását.[6]

IDH vad típusú diffúz astrocyter tumorok

Az *IDH* vad típusú glioblastoma a központi idegrendszer egyik leggyakoribb, felnőtteket érintő malignus tumora, mely rendkívül rossz prognózissal társul. Molekuláris genetikai eltérések széles spektrumát írták le ebben a betegcsoportban, többek között az epidermal growth factor receptor (EGFR), phosphatase and tensin homolog (*PTEN*), *TP53*, neurofibromatosis-1 (*NF1*), retinoblastoma 1 (*RB1*), platelet-derived growth factor receptor alpha (*PDGFRA*), és *CDKN2A*/B gének érintettségét, telomerase reverse transcriptase (*TERT*) promoter mutációkat és különböző kópiaszám eltéréseket, többek között kromoszóma 7 nyerést és kromoszóma 10 vesztést.[1] Továbbra is nehézséget jelent azonban a magas grade morfológiai jeleit nem mutató, *IDH* vad típusú astrocyter tumorok pontos besorolása, amelyek az esetek egy részében a primer glioblastoma klinikai viselkedését mutatják, hasonlóan kedvezőtlen prognózisúak. Ebben a betegcsoportban a genetikai hátteret áttekintve a cIMPACT-NOW konzorcium három genetikai eltérést határozott meg, amelyekből akár egy jelenléte esetén is kimondható az úgynevezett „diffúz astrocyter glioma, *IDH* vad típus, glioblastomára jellemző molekuláris jegyekkel (WHO Grade IV.)" diagnózis. Ez a három genetikai eltérés az *EGFR* amplifikáció, a 7. kromoszóma nyerés vagy 10. kromoszóma vesztés, illetve a TERT promoter mutáció.[7,18]

H3 K27M mutáns diffúz középvonali gliomák

A 2016-ban megjelent központi idegrendszeri tumorok WHO klasszifikációja önálló entitásként jelöli meg a H3 K27M mutációt hordozó diffúz középvonali gliomát (WHO grade IV.), mely gyermek- és fiatal felnőttkorban a híd, thalamus és gerincvelő területén fordul elő leggyakrabban. A mutáció a H3 Histone Family Member 3A (*H3F3A*) vagy a Histone Cluster 1 H3 Family Member B/C (*HIST1H3B*/C) génekben alakulhat ki és az ezt hordozó diffúz gliomák prognózisa rendkívül kedvezőtlen.[19] Ezt követően azonban számos közlemény jelent meg, melyekben H3 K27M mutációt írtak le ependymomákban, pilocytás astrocytomában és gangliogliomákban, ráadásul ezekben az esetekben nem feltétlen járt együtt kedvezőtlen prognózissal.[20-22] Ezek alapján a H3 K27M mutáció jelenléte alaposabb diagnosztikai körüljárást igényel, csak a klinikai, radiológiai és morfológiai adatokkal együttesen értelmezhető.

Egyéb astrocyter tumorok

Fiatal felnőttekben, illetve gyermekekben hemisphaerialis lokalizációban írták le a H3.3 G34 mutációt hordozó diffúz gliomát, mely *IDH* vad típusú, azonban a prognózisa kedvezőbb a H3.3 G34 negtaív, IDH vad típusú glioblastomáénál. Az esetek döntő többségében a H3.3 G34 mutáció mellé *ATRX* és TP53 érintettség is társul. A morfológia sok esetben glioblastomára típusos, máskor embryonalis tumorra jellemző jegyekkel bír, mely a differenciáldiagnózist jelentősen megnehezítheti[11,23] és ismételten felhívja a figyelmet a genetikai adatok beépítésének jelentőségére az integrált diagnosztikába.

2018-ban *Reinhardt és mtsai* felnőttkori, anaplasticus jegyeket mutató pilocytás astrocytomákat vizsgáltak DNS metilációs profil analízis segítségével. Ennek során kirajzolódott egy jól meghatározott betegcsoport, mely a pilocytás astrocytoma morfológiai jegyei és az arra jellemző genetikai eltérések mellett (MAPK jelátviteli útvonal eltérések, úgymint *BRAF*/*KIAA1549* fúzió, *BRAF* V600E mutáció, illetve NF1 és FGFR géneltérések) diffúz gliomáknál megszokott genetikai eltéréseket is hordozott. A tumorok nagy részében *CDKN2A*/B deléció, illetve *ATRX* mutáció volt észlelhető, *IDH* mutáció nélkül. Az új tumorcsoport prognózisa a felnőttkori pilocytás astrocytomákhoz képest jelentősen rosszabbnak, az *IDH* vad típusú glioblastomához képest viszont jobbnak bizonyult. Ezek alapján a lehetséges új entitást provizórikusan „Anaplasticus astrocytoma, piloid jegyekkel" névvel látták el, a leírások alapján WHO grade III.-nak megfelelő klinikai lefolyással bír.[11, 24]

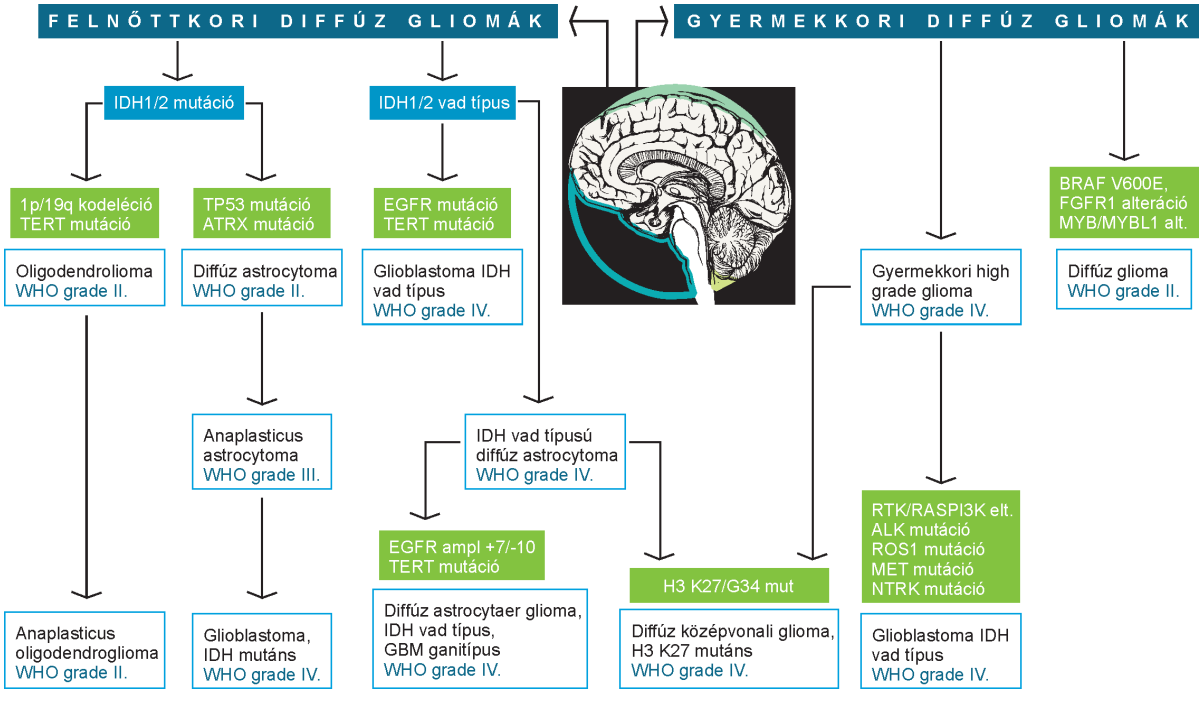
Gyermekkori glialis differenciációt mutató tumorok

A gyermekkori központi idegrendszeri tumorok körülbelül 50%-a glialis differenciációt mutat, melyek a hisztológia, a grade és a prognózis tekintetében széles spektrumot képviselnek. Ezek közül a leggyakoribb a

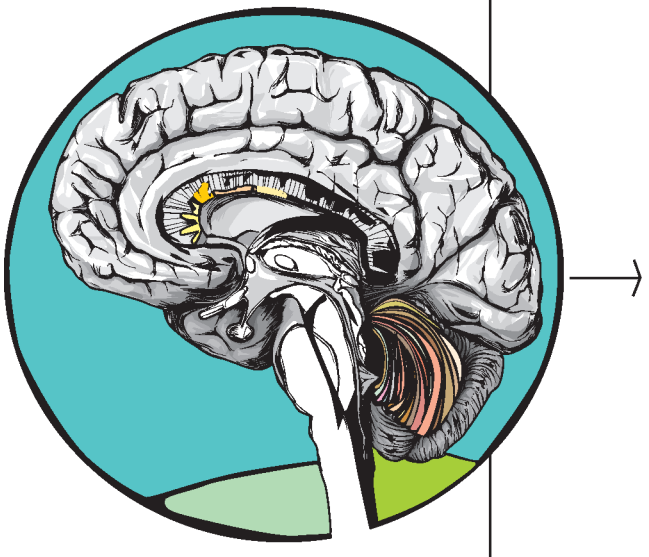
pilocytás astrocytoma (WHO grade I.), amely általában kedvező lefolyással jellemezhető és genetikai háttere jól ismert. Legfontosabb a MAPK jelátviteli útvonal fehérjéinek érintettsége, leggyakrabban a *BRAF/KIAA1549* transzlokáció (50–70%) és a *BRAF* V600E mutáció (5-10%) mutatható ki. Szintén a low-grade gyermekkori glialis tumorok közé tartozik a pleomorf xanthoastrocytoma (PXA) WHO grade I., melynek hátterében az esetek 70%-ában *BRAF* V600E mutációt írtak le.[1] Az IDH és H3 K27 vad típusú WHO grade II. diffúz gliomák gyermekkorban rendkívül ritkák, azonban genetikai hátterük egyre inkább tisztázódik. Ebben a csoportban gyakran kimutatható BRAF V600E mutáció, *FGFR1* alteráció, illetve MYB vagy MYBL1 átrendeződés. Ezekben az esetekben fontos a hasonló genetikai eltéréssel társuló, de jobb prognózisú, WHO grade I tumoroktól (pilocytás astrocytoma, PXA, dysembryoplasticus neuroepithelialis tumor, ganglioglioma) való elkülönítés, ami hisztológiai alapon lehetséges. Megjegyzendő, hogy az *FGFR1* alterációval járó tumorok morfológiailag oligodendrogniomа, míg a *MYB* vagy *MYBL1* átrendeződéssel társuló tumorok astrocytaer karaktert mutatnak.[25] A gyermekkori high-grade glialis tumorok döntő többsége H3 K27M mutáns középvonali glioma1, az ide nem sorolható esetek (gyermekkori glioblastoma, WHO grade VI.) molekuláris háttere rendkívül heterogén. A nem középvonali high grade gliomák patogenezisében többek között a RTK/RAS/PI3K jelátviteli útvonal elemei, továbbá histon modifikációban vagy kromatin remodellációban és sejtciklus szabályozásban résztvevő gének érintettségét írták le. A 3 évesnél fiatalabb korcsoportban jelentkező tumoroknál az esetek 40%-ában az *NTRK* gének érintettsége is azonosítható *(1. ábra)*.[26]

Ependymomák

Már a 2016-os központi idegrendszeri tumorok WHO klasszifikációja is külön entitásként kezeli a *RELA* fúziót hordozó ependymomákat,[1] azonban e



1. ábra: Felnőtt-, illetve gyermekkori diffúz gliomák klasszifikációja, valamint grade beosztása molekuláris eltérések alapján. Felnőttkori diffúz gliomák esetén a klasszifikációt az IDH1/IDH2 gének mutációinak jelenléte határozza meg. IDH1/2 mutáció jelenléte melletti 1p19q kodeléció esetén beszélhetünk oligodendrogliális differenciációt mutató tumorokról (WHO grade II-III.), míg ATRX és/vagy TP53 mutációk esetén astrocyter differenciációt mutató tumorokról (WHO grade II-IV). IDH1/2 vad típus esetén, high-grade morfológiai jegyek jelenléte mellett primer glioblastoma (WHO grade IV) diagnózis állítható fel, míg high-grade jegyek jelenléte nélkül, de EGFR amplifikáció vagy +7/-10 vagy TERT mutáció jelenléte esetén kimondható a „diffúz astrocyter glioma, IDH vad típus, glioblastomára jellemző molekuláris jegyekkel" (WHO grade IV.) diagnózis. A hiszton H3 K27M/G34V mutáció jelenléte és diffúz gliomára jellemző morfológia, valamint középvonali elhelyezkedés esetén mind a felnőtt, mind a gyermekkorra jellemző H3 K27M mutáns diffúz középvonali gliomáról (WHO grade IV) beszélünk. Gyermekkorra jellemző diffúz gliomák (WHO grade II.) esetén a BRAF V600E mutáció, FGFR1 alteráció, MYB/MYBL1 eltérések észlelhetők. Míg gyermekkori glioblastomákban az RTK/RAS/PI3K jelátviteli út eltérései, ALK mutáció, ROS1 mutáció, MET mutáció és NTRK mutáció mutatható ki.



SUPRATENTORIALIS EPENDYMOMÁK (ST-EPN)

I. RELA-C11orf95 fúziót hordozó ependymoma (WHO grade II-III.)
II. YAP1 fúziót hordozó ependymoma (WHO grade II-III.)
III. Subependymoma (WHO grade I.)

POSTERIOR FOSSA EPENDYMOMÁK (PF-EPN)

I. PF-EPN-A csoport, CIMP-pozitív (WHO grade II-III.)
II. PF-EPN-B csoport, CIMP-negatív (WHO) grade II-III.)
III. Subependymoma (WHO grade I.)

SPINALIS EPENDYMOMÁK (SC-EPN)

I. Ependymoma, *NF2* mutációval (WHO grade II-III.)
II. Myxopapillaris ependymoma (WHO grade I.)
III. Subependymoma (WHO grade I.)

2. ábra: Ependymomák klasszifikációja.
Metiláció és újgenerációs szekvenálás vizsgálatok alapján ependymomákban 9 tumoralcsoport különíthető el. Az alcsoportbeosztásnak az alapját a tumor lokalizáció képezi. Supratentoriális ependymomákban két genetikailag jól definiált altípus különíthető el, melyek a RELA-C11orf95 fúziót hordozó ependymoma és a YAP1 fúziót hordozó ependymoma (WHO grade II-III.). Emellett előfordulhat supratentorialisan subependymoma (WHO grade I.) is. A posterior fossa lokalizációban is megfigyelhető subependymoma jelenléte. Míg a másik két altípust a metilációs profilja különíti el, ennek megfelelően elkülönítjük a rosszabb prognózisú CpG hipermetilációt mutató (CIMP) PF-EPN-A altípust, és hypermetilációt nem mutató CIMP negatív ependymomákat (WHO grade II-III.). Spinalisan két WHO grade I. tumortípust észlelhetünk, ezek az úgynevezett myxopapillaris ependymoma és subependymoma. Spinalis lokalizációban is előfordulhatnak WHO grade IIIII. ependymomák, melyek hátterében gyakran NF2 mutáció állhat.

tumorcsoport klasszifikációja az elmúlt években jelentős változásokon ment keresztül. Ez elsősorban a klasszikus ependymomák (WHO grade II-III.) DNS metilációs profil analízisének és új generációs szekvenálás (NGS)-alapú vizsgálatának köszönhető, amelyek alapján 9, lokalizációfüggő (supratentorialis, infratentorialis és spinalis), sajátos genetikai, illetve metilációs profillal jellemezhető csoport különíthető el.[27] Ez az integrált diagnosztikus megközelítés a hisztológiai alapú grading-nél lényegesen nagyobb prognosztikus erővel bír *(2. ábra)*.

Supratentorialis ependymomák (ST-EPN)

A három supratentorialis altípusból kettő meghatározott, definiáló genetikai háttérrel rendelkezik. Az egyik a már a 2016-os WHO klasszifikációban is külön entitáskét szereplő *RELA-C11orf95* fúziót hordozó ependymoma (WHO grade II-III). Ez a genetikai eltérés a Members of the nuclear factor-κB (NF-κB) jelátviteli út konstitutív aktivációját eredményezi, továbbá gyakran társul homozigóta *CDKN2A*/B delécióval. A betegség klinikai lefolyása sokkal kedvezőtlenebb a többi ST-EPN-nel összehasonlítva, általában fiatal felnőttekben jelentkezik.[2] Diagnosztikájában segítséget nyújthat, hogy a RELA-C11orf95 fúzió jelenléte magas konkordanciát mutat az L1 cell adhesion molecule protein (L1CAM) expresszióval, mely immunhisztokémiai vizsgálattal kimutatható.[28] Az ST-EPN másik molekulárisan meghatározott altípusa a *YAP1* fúziót hordozó ependymoma (WHO grade II-III), melynek kórlefolyása a *RELA* fúziós ependymománál jóval kedvezőbb, ala-

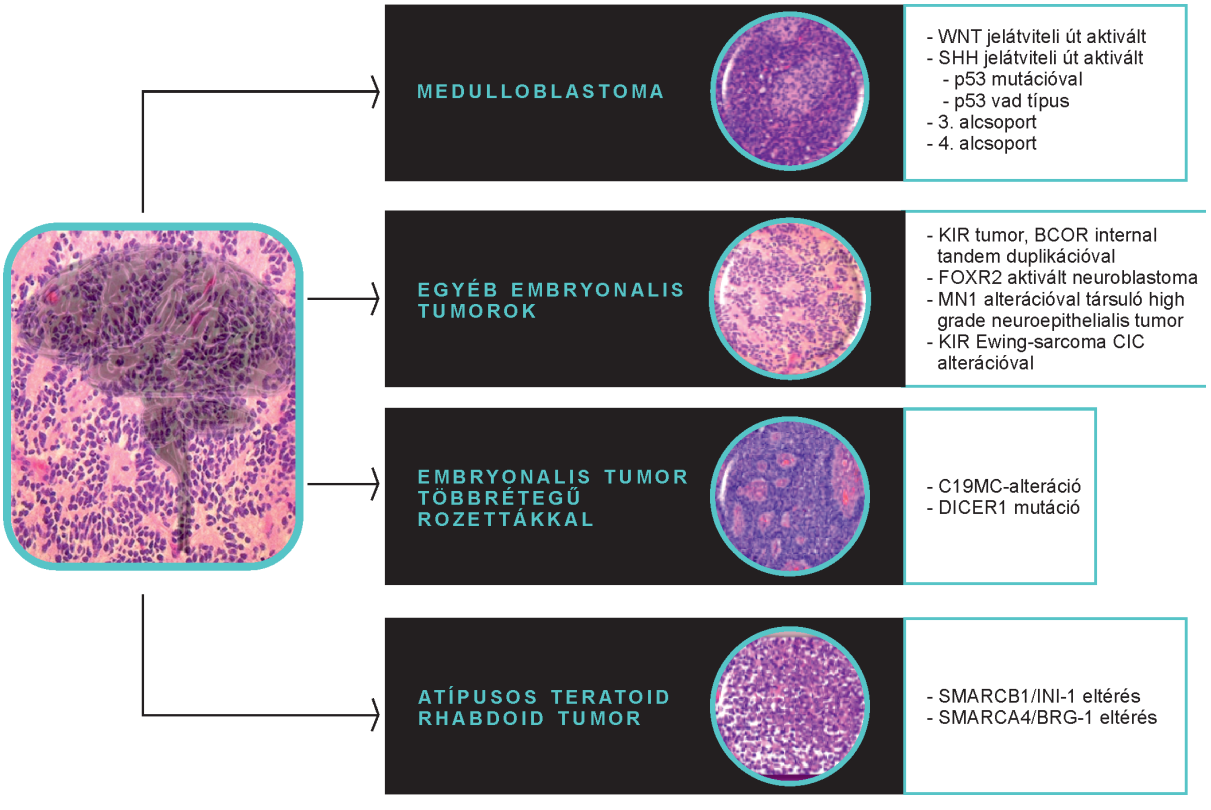
csonyabb arányban mutat recidívát (27). Az ST-EPN harmadik alcsoportjába a szövettani jegyek alapján jól karakterizálható subependymoma (WHO grade I) tartozik, mely genetikailag stabil, jó prognózisú tumor.[8,27]

Posterior fossa ependymomák (PF-EPN)

A posterior fossa ependymomák a supratentorialis tumorokkal ellentétben nem jellemezhetőek visszatérő genetikai eltérésekkel, azonban ebben a csoportban is három, jelentősen eltérő prognózisú altípus különíthető el a tumorok DNS metilációs profilja alapján. Az egyik altípus a ST-EPN-eknél már ismertetett subependymoma (WHO grade I.), mely ebben a lokalizációban is genetikai stabilitással jellemezhető. A másik két ependymoma alcsoportot (WHO grade II-III.) alapvetően a metilációs profil különbségei határozzák meg.[29] Ennek megfelelően a PF-EPN-A csoportba tartozó tumorok genetikailag stabil, azonban CpG hipermetilációt mutató, CpG island metilátor fenotípusú (CIMP-pozitív) ependymomák. Ezekben H3 K27 aminosav csökkent trimetilációja észlelhető (H3K27me3), mely ezáltal különböző tumorszupresszor gének csendesítését eredményezheti. A PF-EPN-A általában csecsemőkben, kisgyermekekben jelentkezik, a prognózisa kifejezetten kedvezőtlen.[30] A PF-EPN-B alcsoportba a CIMP negatív ependymomák tartoznak, melyek elsősorban idősebb gyermekekben, vagy fiatal felnőttekben jelentkeznek és a prognózisuk kevéssé kedvezőtlen.[8]

Spinalis ependymomák (SC-EPN)

A spinalis ependymomák mindhárom altípusa hasonló, döntően indolens prognózissal rendelkezik. Ebben a lokalizációban különösen gyakran alakul ki ependymoma (WHO grade I-II.) 2. típusú neurofibro-



3. ábra: Specifikus genetikai eltéréssel társuló embryonalis tumorok.
A leggyakoribb posterior fossara lokalizálódó embryonalis tumor a medulloblastoma, mely 4 alcsoportra osztható: WNT jelátviteli út aktivált, SHH jelátviteli út aktivált, 3. alcsoport, 4. alcsoport, melyek karakterisztikus genetikai eltérésekkel és morfológiával rendelkezhetnek. A supratentorialisan is megfigyelhető „Embryonalis tumor többrétegű rozettákkal" tumorban a 19 kromoszóma amplifikációja látható. Míg az atípusos teratoid rhabdoid tumor esetén SMARCB1/INI-1 vagy SMARCA4/BRG-1 mutációk mutathatók ki. A nem klasszifikálható embryonalis tumorok metilációs profilanalízise során 4 visszatérő eltéréssel definiált entitást tudtak meghatározni, melyek morfológiailag széles spektrumot ölelnek fel, ezek a: KIR tumor, BCOR internal tandem duplikációval, FOXR2 aktivált neuroblastoma, MN1 alterációval társuló high-grade neuroepithelialis tumor, primer KIR Ewing-sarcoma családba tartozó CIC alterációt mutató tumor.

matosisban szenvedő betegeknél, ennek megfelelően nagy arányban mutatható ki *NF2* mutáció.[31] A morfológiailag is jól jellemzett myxopapillaris ependymoma (WHO grade I.) esetén a hosszabb klinikai vizsgálatok alapján a cIMPACT-NOW konzorcium javasolja a WHO grade II csoportba történő áthelyezést.[8] Továbbá spinalis lokalizációban is megjelenhet az intracranialisan is ismert subependymoma (WHO grade I.). Érdemes megemlíteni, hogy az aktuális irodalomban megjelent egy ritka, azonban rendkívül rossz prognózissal, kiterjedt disszeminációval társuló spinalis ependymoma, melynek hátterében c-Myc amplifikáció mutatható ki.[32]

Embryonalis tumorok

A gyermekkori primer központi idegrendszeri embryonalis tumorok klinikai viselkedés tekintetében rendkívül széles spektrumot ölelnek fel, emiatt rendkívül fontos, hogy pontos diagnózis kerüljön felállításra, melyet azonban sokszor megnehezít az embryonalis tumorok rendkívül hasonló morfológiája. A 2016-os központi idegrendszeri tumorok WHO klasszifikációja elhagyta a korábban a non-medulloblastoma embryonalis tumorokra használt primitív neuroektodermalis tumor (PNET) megnevezést.[1] Ennek hátterében egyrészt speciális molekuláris genetikai háttérrel rendelkező entitások definiálása áll, másrészt zavaró volt a nem központi idegrendszeri PNET-el való összetéveszthetőség. A molekulárisan specifikus csoportba nem sorolható tumorokra a 2016-os WHO a „Központi idegrendszeri embryonalis tumor, máshogy nem klasszifikálható" kifejezést használja.[1] A központi idegrendszeri embryonalis tumorok definíció szerint a WHO grade IV. csoportba tartoznak *(3. ábra)*.

Medulloblastoma

A medulloblastoma az egyik leggyakoribb malignus gyermekkori központi idegrendszeri tumor, mely az esetek kb. 20%-át teszi ki.[33] Az utóbbi években végzett széleskörű molekuláris genetikai vizsgálatok feltárták, hogy egy kifejezetten heterogén tumorcsoportról van szó, különböző molekuláris háttérrel, kórlefolyással és prognózissal.[34,35] NGS és metilációs profil analízisek alapján négy nagy molekuláris alcsoport került meghatározásra, ezek a wingless (WNT)-aktivált, sonic hedgehog (SHH)-aktivált, 3. csoport és 4. csoport, melyeket a 2016-os WHO is átvett. Az alcsoportok elkülönítése immunhisztokémiai és molekuláris genetikai vizsgálatokkal lehetséges [béta-katenin, GRB2 associated binding protein 1 (GAB1), YAP1, p53], azonban az utóbbi két alcsoportot (3 és 4 alcsoport) hasonló prognózis és a nehezebb elkülönítés alapján együttesen non-WNT/non-SHH alcsoportnak hívjuk. Emellett a WHO klasszifikáció megtartotta a morfológiai alapú besorolást is, úgymint klasszikus, desmoplasticus noduláris, extenzív noduláris és anaplasticus/nagysejtes. A különböző morfológiai altípusok egyes molekuláris altípusokkal asszociáltak; például a desmoplasticus noduláris altípus gyakran a WNT aktivált genotípussal asszociált, továbbá az anaplasticus /nagysejtes morfológia leginkább a non-WNT/non-SHH alcsoportban jelentkezik. Fontos megjegyezni, hogy a négy nagy genetikai alcsoporton belül a metilációs vizsgálatok több kisebb, visszatérő metilációs és mutációs mintázattal rendelkező alcsoportot különítettek el, ennek megfelelően a beosztás a jövőben feltehetően bővülni fog, mely meghatározhatja és specifikusabbá teheti a terápiát.

WNT jelátviteli út aktivált medulloblastoma

A legritkább (10%) és a legjobb prognózissal bíró alcsoport, melynek hátterében a béta-katenin fehérjét kódoló *CCTNB1* gén szomatikus mutációja áll. Általában idősebb gyermekekben fordul elő, a cerebellum és a híd közötti szögletben.[36]

SHH jelátviteli út aktivált medulloblastoma

A medulloblastomák megközelítőleg 30%-át kitevő SHH aktivált medulloblastomákban az SHH jelátviteli útvonal csíravonali és szomatikus mutációi mutathatóak ki és bármely életkorban jelentkezhetnek, leggyakrabban a cerebellum állományában, legfőképpen a hemispheriumok területén. A leginkább érintett fehérjék a Patched1 (PTCH1), smoothened (SMO) és suppressor of fused (SUFU) proteinek. Különösen rossz a betegség prognózisa *SUFU* mutáció és *PTEN* deléció esetén, ilyenkor már a betegség korai stádiumában észlelhető KIR disszeminációval.[5] Emellett SHH aktivált medulloblastomás esetek kb. negyedében csíravonali *TP53* vagy *BRCA* mutáció is kimutatható, melyek megléte a prognózist tovább rontja.[37]

3. alcsoportú medulloblastoma

Az összes medulloblastomás eset kb. negyedét alkotó alcsoport szinte kizárólag gyermekekben fordul elő. Gyakran a középvonalban, a 4. kamrába dombo-

rodva helyezkedik el és rendkívül rossz prognózissal rendelkezik. Az esetek 20–25%-ában *MYC* amplifikáció, illetve 17q izokromoszóma mutatható ki. A esetek nagy részébenkorai recidíva és liquor általi disszemináció észlelhető.[38]

4. alcsoportú medulloblastoma

A leggyakoribb medulloblastoma altípus, amely szintén gyakran 4. kamrai tumorként jelentkezik és magas arányban mutathatók ki ebben a tumorcsoportban kromoszóma abnormalitások. Az esetek 80%-ában 17q izokromoszóma detektálható, emellett kisebb arányban *NMYC* amplifikáció is megfigyelhető.[39]

Egyéb embryonalis tumorok

Az egyéb, non-medulloblastoma embryonalis tumorcsoportba tartozik két, genetikailag jól definiált entitás; az atípusos teratoid/rhabdoid tumor (ATRT) és az embryonalis tumor többrétegű rozettákkal (Embryonal tumor with multilayered rosettes, ETMR). Emellett több morfológiai alcsoport is létezik, melyek egy része már a korábbi WHO kiadásokban is szerepelt; úgymint medulloepithelioma, KIR neuroblastoma, KIR ganglioneuroblastoma és ependymoblastoma.[40] Az utóbbi években egyre nagyobb teret hódító metilációs vizsgálatok, valamint transzkripciós profil analízis a máshogy nem osztályozható csoportból újabb entitásokat választottak le specifikus genetikai háttér alapján; úgymint „FOXR2 aktivált KIR neuroblastoma”, a „KIR high-grade neuroepithelialis tumor BCOR alterációval”, a „KIR Ewing-sarcoma család tumora CIC alterációval”, illetve a „KIR high-grade neuroepithelialis tumora MN1 alterációval”.[41]

Atípusos teratoid/rabdoid tumor (ATRT)

Viszonylag ritka (1–2%) embryonalis tumor, mely legfőképpen a 3 éves kor alatti korosztályt érinti. Az esetek kétharmada cerebellaris lokalizációjú, azonban gyakran jelentkezik supratentorialisan is. A prognózisa alapvetően rendkívül rossz, azonban a molekuláris háttér pontos feltárása felvetheti célzott terápiák lehetőségét.[42] A morfológiája kifejezetten diverz, a klasszikus rhabdoid sejtek mellett különféle, epithelialis, mesenchymalis és neuroepithelialis differenciációt is mutathat. A tumor hátterében a *SMARCB1* vagy *SMARCA4* gének biallelikus vesztése és/vagy a protein termék INI-1 vagy BRG-1 vesztése állhat. Az esetek 20–35%-ában a betegség hátterében csíravonali biallélikus mutáció áll, ezen betegek egy része rhabdoid tumor prediszpozíciós szindrómában szenved.[43] Az aktuális genetikai, epigenetikai és transzkripcionális vizsgálatok az ATRT csoportot 3 alcsoportra osztották, úgymint ATRT-SHH, ATRT-TYR és ATRT-MYC, mely tumorcsoportok a lokalizációban és beteg korcsoportban különbözhetnek.[44]

Embryonalis tumor többrétegű rozettákkal (ETMR)

Az ETMR-t 2009-ben írták le egy specifikus molekuláris eltéréssel jellemezhető embryonalis tumor altípusként.[45] A 2016-os WHO beosztás a háttérben álló genetikai eltérés alapján a korábban ependymoblastomaként és medulloepitheliomaként megnevezett tumorok egy részét is ebbe az embryonalis tumorcsoportba sorolta.[1] Az esetek nagy részében a tumor supratentorialisan jelentkezik, a kórlefolyás rendkívül agresszív. C19MC-alterációt mutató tumorok (mely az újabb vizsgálatok alapján az esetek 90%-ában látható) esetében korai neuronalis gének amplifikációja látható, mely magyarázza az agresszív kórlefolyást. Az ETMR-ek 10%-ában *DICER1* gén mutációt írtak le.[46]

Egyéb, specifikus genetikai eltéréssel karakterizált embryonalis tumorok

A „KIR embryonalis tumor, máshogy nem klasszifikálható” rendkívül diverz tumorcsoport, amelyen belül széleskörű metilációs és genetikai vizsgálata alapján négy molekulárisan jellemzett tumortípus került leírásra. Az egyik ezek közül a korábban embryonalis, vagy high-grade glialis tumorként karakterizált KIR tumor, BCOR internal tandem duplikációval. Morfológiailag jellemző lehet rá a high-grade glialis tumorokban is látható paliszád nekrózis és microvascularis proliferáció. A második tumortípus a *FOXR2* aktivált neuroblastoma, mely neuroblastos és neurocytás differenciációt mutathat. Emellett ide tartoznak az *MN1* alterációval társuló high-grade neuroepithelialis tumorok, melyek a korábbi astroblastoma csoporttal átfedést mutathatnak. A primer KIR Ewing-sarcoma családba tartozó *CIC* alterációt mutató tumorban a CIC gén fúziós partnere jellemzően a *NUTM1* fúziós partnerrel rendelkeznek a KIR területén.[11,41]

Következtetések

A központi idegrendszeri tumorok klasszifikációja a molekuláris genetikai vizsgálatok egyre szélesebb kö-

rű elérhetősége mellett egyre részletesebbé és specifikusabbá válik. Ennek következtében egyre több betegség esetén válik ismertté a háttérben álló specifikus molekuláris eltérés és kóros jelátviteli útvonal aktiváció, mely megalapozhatja és kiszélesítheti az általában rossz prognózissal rendelkező betegségek célzott terápiás lehetőségeit, illetve az eddiginél lényegesen pontosabb prognosztikai becsléseket tesz lehetővé.

Irodalom

1. Louis DN, Wiestler OD, Ohgaki H. WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. 2016: International Agency for Research on Cancer.
2. Parker M, Mohankumar KM, Punchihewa C, Weinlich R, Dalton JD, Li Y, et al. C11orf95-RELA fusions drive oncogenic NF-κB signalling in ependymoma. Nature, 2014; 506(7489):451-5.
3. Aihara K, Mukasa A, Gotoh K, Saito K, Nagae G, Tsuji S, et al. H3F3A K27M mutations in thalamic gliomas from young adult patients. Neuro Oncol, 2014; 16(1):140-6.
4. Parsons DW, Jones S, Zhang X, Lin JC, Leary RJ, Angenendt P, et al. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. Science, 2008; 321(5897):1807-12.
5. Taylor MD, Northcott PA, Korshunov A, Remke M, Cho YJ, Clifford SC, et al. Molecular subgroups of medulloblastoma: the current consensus. Acta Neuropathol, 2012; 123(4):465-72.
6. Brat DJ, Aldape K, Colman H, Figrarella-Branger D, Fuller GN, Giannini C, et al. cIMPACT-NOW update 5: recommended grading criteria and terminologies for IDH-mutant astrocytomas. Acta Neuropathol, 2020; 139(3):603-8.
7. Brat DJ, Aldape K, Colman H, Holland EC, Louis DN, Jenkins RB, et al. cIMPACT-NOW update 3: recommended diagnostic criteria for "Diffuse astrocytic glioma, IDH-wildtype, with molecular features of glioblastoma, WHO grade IV". Acta Neuropathol, 2018. 136(5):805-10.
8. Ellison DW, Aldape K.D, Capper D, Fouladi M, Gilbert MR, Gilbertson RJ, et al. cIMPACT-NOW update 7: advancing the molecular classification of ependymal tumors. Brain Pathol, 2020; 30(5):863-6.
9. Ellison DW, Hawkins C, Jones DTW, Onar-Thomas A, Pfister SM, Reifenberger G, et al. cIMPACT-NOW update 4: diffuse gliomas characterized by MYB, MYBL1, or FGFR1 alterations or BRAF(V600E) mutation. Acta Neuropathol, 2019; 137(4):683-7.
10. Louis DN, Giannini C, Capper D, Paulus W, Figarella-Branger D, Lopes MB, et al. cIMPACT-NOW update 2: diagnostic clarifications for diffuse midline glioma, H3 K27M-mutant and diffuse astrocytoma/ anaplastic astrocytoma, IDH-mutant. Acta Neuropathol, 2018; 135(4):639-42.
11. Louis DN, Wesseling P, Aldape K, Brat D.J, Capper D, Cree I.A, et al. cIMPACT-NOW update 6: new entity and diagnostic principle recommendations of the cIMPACT-Utrecht meeting on future CNS tumor classification and grading. Brain Pathol, 2020; 30(4):844-56.
12. Louis DN, Wesseling P, Paulus W, Giannini C, Batchelor TT, Cairncross JG, et al. cIMPACT-NOW update 1: Not Otherwise Specified (NOS) and Not Elsewhere Classified (NEC). Acta Neuropathol, 2018; 135(3):481-4.
13. Arita H, Narita Y, Yoshida A, Hashimoto N, Yoshimine T, and Ichimura K. IDH1/2 mutation detection in gliomas. Brain Tumor Pathol, 2015; 32(2):79-89.
14. Reifenberger J, Reifenberger G, Liu L, James CD, Wechsler W, Collins V.P. Molecular genetic analysis of oligodendroglial tumors shows preferential allelic deletions on 19q and 1p. Am J Pathol, 1994; 145(5):1175-90.
15. Sahm F, Reuss D, Koelsche C, Capper D, Schittenhelm J, Heim S, et al. Farewell to oligoastrocytoma: in situ molecular genetics favor classification as either oligodendroglioma or astrocytoma. Acta Neuropathol, 2014; 128(4):551-9.
16. Appay R, Dehais C, Maurage CA, Alentorn A, Carpentier C, Colin C, et al. CDKN2A homozygous deletion is a strong adverse prognosis factor in diffuse malignant IDH-mutant gliomas. Neuro Oncol, 2019; 21(12):1519-28.
17. Ceccarelli M, Barthel FP, Malta TM, Sabedot TS, Salama SR, Murray BA, et al. Molecular Profiling Reveals Biologically Discrete Subsets and Pathways of Progression in Diffuse Glioma. Cell, 2016; 164(3):550-63.
18. Stichel D, Ebrahimi A, Reuss D, Schrimpf D, Ono T, Shirahata M, et al. Distribution of EGFR amplification, combined chromosome 7 gain and chromosome 10 loss, and TERT promoter mutation in brain tumors and their potential for the reclassification of IDHwt astrocytoma to glioblastoma. Acta Neuropathol, 2018; 136(5):793-803.
19. Solomon DA, Wood MD, Tihan T, Bollen AW, Gupta N, Phillips JJ, et al. Diffuse Midline Gliomas with Histone H3-K27M Mutation: A Series of 47 Cases Assessing the Spectrum of Morphologic Variation and Associated Genetic Alterations. Brain Pathol, 2016. 26(5):569-80.
20. Gessi M, Capper D, Sahm F, Huang K, von Deimling A, Tippelt S, et al. Evidence of H3 K27M mutations in posterior fossa ependymomas. Acta Neuropathol, 2016; 132(4):635-7.
21. Joyon N, Tauziède-Espariat A, Alentorn A, Giry M, Castel D, Capelle L, et al. K27M mutation in H3F3A in ganglioglioma grade I with spontaneous malignant transformation extends the histopathological spectrum of the histone H3 oncogenic pathway. Neuropathol Appl Neurobiol, 2017; 43(3):271-6.
22. Hochart A, Escande F, Rocourt N, Grill J, Koubi-Pick V, Beaujot J, et al. Long survival in a child with a mutated K27M-H3.3 pilocytic astrocytoma. Ann Clin Transl Neurol, 2015; 2(4):439-43.
23. Gessi M, Gielen GH, Hammes J, Dörner E, Mühlen AZ, Waha A, et al. H3.3 G34R mutations in pediatric primitive neuroectodermal tumors of central nervous system (CNS-PNET) and pediatric glioblastomas: possible diagnostic and therapeutic implications? J Neurooncol, 2013; 112(1):67-72.
24. Reinhardt A, Stichel D, Schrimpf D, Sahm F, Korshunov A, Reuss DE, et al. Anaplastic astrocytoma with piloid features, a novel molecular class of IDH wildtype glioma with recurrent MAPK pathway, CDKN2A/B and ATRX alterations. Acta Neuropathol, 2018; 136(2):273-91.

25. Zhang J, Wu G, Miller CP, Tatevossian RG, Dalton J.D, Tang B, et al. Whole-genome sequencing identifies genetic alterations in pediatric low-grade gliomas. Nat Genet, 2013; 45(6):602-12.
26. Wu G, Diaz AK, Paugh BS, Rankin SL, Ju B, Li Y, et al. The genomic landscape of diffuse intrinsic pontine glioma and pediatric non-brainstem high-grade glioma. Nat Genet, 2014; 46(5):444-50.
27. Pajtler KW, Witt H, Sill M, Jones DT, Hovestadt V, Kratochwil F, et al. Molecular Classification of Ependymal Tumors across All CNS Compartments, Histopathological Grades, and Age Groups. Cancer Cell, 2015; 27(5):728-43.
28. Malgulwar PB, Nambirajan A, Pathak P, Faruq M, Rajeshwari M, Singh M, et al. C11orf95-RELA fusions and upregulated NF-κB signalling characterise a subset of aggressive supratentorial ependymomas that express L1CAM and nestin. J Neurooncol, 2018; 138(1):29-39.
29. Witt H, Mack SC, Ryzhova M, Bender S, Sill M, Isserlin R, et al. Delineation of two clinically and molecularly distinct subgroups of posterior fossa ependymoma. Cancer Cell, 2011. 20(2):143-57.
30. Mack SC, Witt H, Piro RM, Gu L, Zuyderduyn S, Stütz AM, et al. Epigenomic alterations define lethal CIMP-positive ependymomas of infancy. Nature, 2014; 506(7489):445-50.
31. Birch BD, Johnson JP, Parsa A, Desai RD, Yoon JT, Lycette CA, et al. Frequent type 2 neurofibromatosis gene transcript mutations in sporadic intramedullary spinal cord ependymomas. Neurosurgery, 1996; 39(1):135-40.
32. Swanson AA, Raghunathan A, Jenkins RB, Messing-Jünger M, Pietsch T, Clarke MJ, et al. Spinal Cord Ependymomas With MYCN Amplification Show Aggressive Clinical Behavior. J Neuropathol Exp Neurol, 2019; 78(9):791-7.
33. Weil AG, Wang AC, Westwick HJ, Ibrahim G.M, Ariani RT, Crevier L, et al. Survival in pediatric medulloblastoma: a population-based observational study to improve prognostication. J Neurooncol, 2017; 132(1): 99-107.
34. Kool M, Koster J, Bunt J, Hasselt NE, Lakeman A, van Sluis P, et al. Integrated genomics identifies five medulloblastoma subtypes with distinct genetic profiles, pathway signatures and clinicopathological features. PLoS One, 2008; 3(8):e3088.
35. Northcott PA, Jones DT, Kool M, Robinson GW, Gilbertson RJ, Cho YJ, et al. Medulloblastomics: the end of the beginning. Nat Rev Cancer, 2012; 12(12):818-34.
36. Ellison DW, Onilude OE, Lindsey JC, Lusher ME, Weston CL, Taylor RE, et al. beta-Catenin status predicts a favorable outcome in childhood medulloblastoma: the United Kingdom Children's Cancer Study Group Brain Tumour Committee. J Clin Oncol, 2005; 23(31):7951-7.
37. Waszak SM, Northcott PA, Buchhalter I, Robinson GW, Sutter C, Groebner S, et al. Spectrum and prevalence of genetic predisposition in medulloblastoma: a retrospective genetic study and prospective validation in a clinical trial cohort. Lancet Oncol, 2018; 19(6):785-98.
38. Bandopadhayay P, Bergthold G, Nguyen B, Schubert S, Gholamin S, Tang Y, et al. BET bromodomain inhibition of MYC-amplified medulloblastoma. Clin Cancer Res, 2014; 20(4):912-25.
39. Jones DT, Jäger N, Kool M, Zichner T, Hutter B, Sultan M, et al. Dissecting the genomic complexity underlying medulloblastoma. Nature, 2012; 488(7409):100-5.
40. Sin-Chan P, Li BK, Ho B, Fonseca A, Huang A. Molecular Classification and Management of Rare Pediatric Embryonal Brain Tumors. Curr Oncol Rep, 2018; 20(9):69.
41. Sturm D, Orr BA, Toprak UH, Hovestadt V, Jones DTW, Capper D, et al. New Brain Tumor Entities Emerge from Molecular Classification of CNS-PNETs. Cell, 2016; 164(5):1060-72.
42. Frühwald MC, Biegel J.A, Bourdeaut F, Roberts C.W, Chi S.N. Atypical teratoid/rhabdoid tumors-current concepts, advances in biology, and potential future therapies. Neuro Oncol, 2016; 18(6):764-78.
43. Biegel JA. Molecular genetics of atypical teratoid/rhabdoid tumor. Neurosurg Focus, 2006; 20(1):E11.
44. Torchia J, Picard D, Lafay-Cousin L, Hawkins C.E, Kim S.K, Letourneau L, et al. Molecular subgroups of atypical teratoid rhabdoid tumours in children: an integrated genomic and clinicopathological analysis. Lancet Oncol, 2015; 16(5):569-82.
45. Pfister S, Remke M, Castoldi M, Bai AH, Muckenthaler MU, Kulozik A, et al. Novel genomic amplification targeting the microRNA cluster at 19q13.42 in a pediatric embryonal tumor with abundant neuropil and true rosettes. Acta Neuropathol, 2009; 117(4):457-64.
46. Lambo S, Gröbner SN, Rausch T, Waszak S.M, Schmidt C, Gorthi A, et al. The molecular landscape of ETMR at diagnosis and relapse. Nature, 2019; 576(7786):274-80.

SEMMELWEIS KIADÓ SZAK- ÉS TANKÖNYVEI

Közegészségtan

Könyveink megvásárolhatók a Legendus Könyvesboltban, illetve a Líra Kereskedelmi hálózaton belül az egész országban, de egyre nagyobb igényt elégít ki webshopunk.

Tompa Anna

KÖRNYEZETI TOXIKOLÓGIA

A könyv bevezetője élvezetes betekintést ad a toxikológia tudományának fejlődésébe. Az általános toxikológia nagy fejezete a molekuláris mechanizmusok és a kategorizálható hatások szerint foglalja össze a mérgezéseket. Végül a részletes toxikológia az emberi test egyes szerveire koncentrál. A gördülékeny, lényegre koncentráló fejezeteket színes összefoglaló ábrák teszik érthetővé és olvasmányossá. A könyvet haszonnal forgathatja minden gyakorló orvos, családorvos, de a környezeti toxikológia számos szakmai terület, különösen a környezetvédelem szakemberei számára is tartalmaz aktualitásokat. Tekintettel a toxikológia tudományának látványos fejlődésére és a toxikológia univerzalitására, Tompa Anna könyvét nagy szeretettel ajánlom az Olvasó figyelmébe.

Kellermayer Miklós, egyetemi tanár

324 oldal ■ **Ára: 4000 Ft**

Semmelweis Kiadó
1089 Budapest, Nagyvárad tér 4.
www.semmelweiskiado.hu

LEGENDUS KÖNYVESBOLT
1089 Budapest, Nagyvárad tér 4.
Tel.: 210-4408, 459-1500/56353
Nyitva tartás: H–Sz: 9.00–16.00,
Cs: 9.00–18.00, P: 9.00–14.00
E-mail: info@semmelweiskiado.hu

VITRAKVI IGAZOLT NTRK GÉNFÚZIÓT TARTALMAZÓ SZOLID TUMOROK KEZELÉSÉRE ÉLETKORI HATÁR NÉLKÜL[1]

NTRK FÚZIÓ POZITÍVAKNÁL

POZITÍV EREDMÉNYEK[1]

AZ ELSŐ TUMOR-AGNOSZTIKUS, SZELEKTÍV TRK INHIBITOR [1-3]

73% ORR, melynek 67%-a 2 éven túl is fennáll [1*]

Terápiás javallatok:

A ***VITRAKVI*** monoterápiában alkalmazva, olyan, neurotrop tirozin-receptor-kináz (NTRK) génfúziót mutató szolid tumoros, felnőtt és gyermekgyógyászati betegek kezelésére javallott,

- akiknél a betegség lokálisan előrehaladott, metasztatikus vagy akiknél a műtéti reszekció valószínűleg súlyos morbiditást okozna és
- akiknél nem állnak rendelkezésre kielégítő kezelési lehetőségek.

NTRK - neurotrop tirozin-receptor-kináz **TRK** - tropomiozin-receptor-kináz

* Elemzési csoport szolid tumorokban, a primer központi idegrendszeri tumorokat kizárva

1. Hong DS, DuBois SG, Kummar S, et al. Larotrectinib in patients with TRK fusion-positive solid tumours: a pooled analysis of three phase 1/2 clinical trials Lancet Oncol 2020; 21: 531–40
2. Vitrakvi alkalmazási előírás, 2021. január 21.
3. Amatu A, Sartore-Bianchi A, Siena S. NTRK gene fusions as novel targets of cancer therapy across multiple tumour types. ESMO Open. 2016;1(2):e000023.

VITRAKVI▼ 25 mg és 100 mg kemény kapszula, 20 mg /ml belsőleges oldat
(EU /1/19/1385/001, EU /1/19/1385/002, EU /1/19/1385/ 003-004)

▼Ez a gyógyszer fokozott felügyelet alatt áll, mely lehetővé teszi az új gyógyszerbiztonsági információk gyors azonosítását. Az egészségügyi szakembereket arra kérjük, hogy jelentsenek bármilyen feltételezett mellékhatást.

Bővebb információért olvassa el a gyógyszer alkalmazási előírásait!

A hatályos "alkalmazási előírások" teljes szövegét megtalálja az Országos Gyógyszerészeti és Élelmezés-egészségügyi Intézet (www.ogyei.gov.hu/gyogyszeradatbazis/) honlapján.
A termék jelenleg Publikus Gyógyszertörzsben kihirdetett árral és TB támogatással nem rendelkezik.
Forgalomba hozatali engedély jogosultja: Bayer AG 51368 Leverkusen Németország.
Kérdéseivel forduljon a gyógyszer helyi forgalmazójához:
Bayer Hungária Kft. 1123 Budapest, Alkotás u. 50., www.bayer.co.hu Tel: 06-1-487-4100

VITRAKVI®
(larotrektinib) 25mg/10 mg kapszula
20mg/ml belsőleges oldat

PP-VIT-HU-0008-1-07/04/2021

Az NTRK génfúziók, mint szövet-agnosztikus biomarker szerepe különböző daganatok diagnosztikájában és célzott kezelésében

The role of NTRK gene fusions as tissue-agnostic biomarkers in the diagnostic and targeted therapy of different tumors

Lippai Zoltán, Sápi Zoltán
I. Sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet, Semmelweis Egyetem, Budapest
E-levél: sapi.zoltan.dr@gmail.com

ÖSSZEFOGLALÁS A neurotrofikus tropomiozin receptor tirozin-kináz (NTRK) géncsalád tagjai (NTRK1, NTRK2, NTRK3) által kódolt TrkA, TrkB, TrkC tropomiozin receptor tirozin-kináz fehérjék fiziológiásan alapvetően az idegsejtek fejlődéséért, éréséért, működéséért felelősek. Az NTRK gének eltérései leggyakrabban kromoszomális transzlokációk, új fúziós fehérjék létrejöttével jellemezhetők, melyek számos rosszindulatú daganat kialakulásához vezethetnek. Azok a daganatok, melyekre egyértelműen jellemzőek az NTRK génfúziók, igen ritkák, mint például az infantilis fibrosarcoma, a congenitalis mesoblastos nephroma vagy a secretoros carcinoma, míg a gyakran előforduló daganatokban (pl. vastagbélrák, tüdőrák) jóval ritkábban (csupán néhány százalékos előfordulással), de szintén találhatunk NTRK génfúziót. A legújabb, igen hatékony Trk-ellenes célzott kezelések miatt az NTRK fúziós gének diagnosztikája még nagyobb jelentőségűvé vált. A cikk összegezi mindazokat a diagnosztikai eljárásokat, melyeknek szerepe van az NTRK géneltérések felderítésében, valamint kitér röviden a célzott kezelési lehetőségekre.

KULCSSZAVAK daganatok, receptor tirozin-kináz, génfúzió, diagnózis

SUMMARY The neurotrophic tropomyosin receptor tyrosine kinase (NTRK) gene family members (NTRK1, NTRK2, NTRK3), encoding tropomyosin receptor tyrosine kinase proteins (TrkA, TrkB, TrkC) are responsible for the maturation, proliferation and maintenance of neurons. The genetic alterations of the NTRK family (caused mostly by chromosomal translocation) can lead to the development of several malignant tumors. These gene rearrangements are characteristic in some rare tumors such as infantile fibrosarcoma, congenital mesoblastic nephroma, secretory breast carcinoma and mammary analogue secretory carcinoma. However, we can detect them in very common malignancies (i.e.: colorectal carcinoma, lung cancer) too, but with low incidence rate (usually only in a few percent of the cases). Considering the newly discovered, highly selective Trk inhibitors, used with high overall response rate, we highlight the growing importance of an appropriate diagnostic approach for tumors harboring NTRK gene alterations. This review discusses the different diagnostic methods, that can be used to identify NTRK gene fusions and shortly summarizes the possibility of the NTRK targeted therapies.

KEY WORDS tumors, receptor protein-tyrosine kinase, gene fusion, diagnosis

A neurotrofikus tropomiozin receptor tirozin-kináz (NTRK) géncsalád

A neurotrofikus tropomiozin receptor tirozin-kináz *(NTRK)* géncsaládhoz három gén tartozik – *NTRK1* (1q23), *NTRK2* (9q21) és *NTRK3* (15q25). Mindhárom gén szerkezetében található leucinban gazdag ismétlődéseket tartalmazó extracelluláris régiót, immunglobulin-szerű fehérjét, transzmembrán régiót, illetve tirozin-kinázt kódoló szakaszok. Az *NTRK1* gén mint-

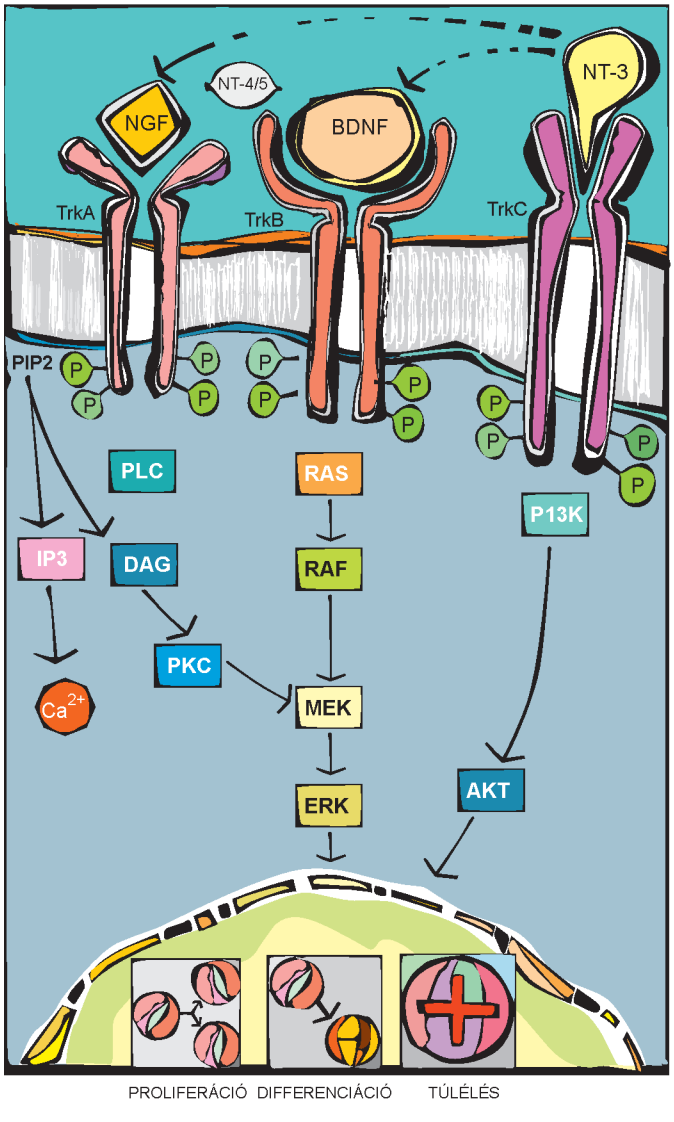
Rövidítések

AKT	*protein-kináz-B*
ALK	*anaplasztikus lymphoma kináz-receptor tirozin-kináz*
ATP	*adenozin-trifoszfát*
BDNF	*brain-derived neurotrophic factor / agyi eredetű neurotrofikus faktor*
CDKN2A/B	*ciklin-dependens kináz inhibitor – tumorszuppresszor gén*
DAG	*diacil-glicerol*
DNS	*dezoxiribonukleinsav*
EGFR	*epidermal growth factor receptor / epidermalis növekedési faktor receptor*
ERK	*extracellular signal-regulated kinase / extracelluláris szignál-regulált kináz*
IP3	*inozitol-trifoszfát*
MEK	*mitogén aktivált protein kináz kináz, extracelluláris szignál-regulált kináz kináz*
mRNS	*messenger ribonukleinsav*
NGF	*nerve growth factor / idegsejt-növekedési faktor*
NGS	*next generation sequencing / újgenerációs szekvenálás*
NT-3	*neurotrophin-3 / neurotrofin-3 - növekedési faktor*
NT-4/5	*neurotrofin-4/5-növekedési faktor*
PI3K	*foszfatidil-inozitol-3-kináz*
PIP2	*foszfatidilinozitol-bifoszfát*
PKC	*protein-kináz-C*
PLC	*foszfolipáz-C*
PTB	*phosphotyrosine binding / foszfotirozin kötő - domén adaptor fehérjéken*
RAF	*rapidly accelerated fibrosarcoma - protein-kináz*
Ras	*rat sarcoma – GTPáz*
RNS	*ribonukleinsav*
ROS1	*c-ros - receptor tirozin-kináz*
SH2	*Src homológ 2 - domén adaptor fehérjéken*

egy 21 kb hosszúságú. Az *NTRK2* és *NTRK3* gének 17-18-szor hosszabbak, köszönhetően az exonokat elválasztó, kivételesen nagy intronoknak. Az Ensembl genom adatbázis alapján mindezidáig az *NTRK1* gén 10, az *NTRK2* gén 8, az *NTRK3* gén 21 különböző splice variánsa került leírásra.[1, 2]

Az általuk kódolt fehérjék (rendre TrkA, TrkB, TrkC) plazmamembránban elhelyezkedő receptorok. A receptorok ligandjai a neurotrofinok (idegsejtekre ható növekedési faktorok). Leggyakrabban a receptort a saját, elsődleges ligandja aktiválja. A TrkA receptorhoz az NGF, a TrkB receptorhoz a BDNF, a TrkC receptorhoz az NT-3 neurotrofinok kapcsolódhatnak. Viszont valószínűsíthető az, hogy az egyes neurotrofinok nem csupán egyetlen receptortípust aktiválhatnak, és az egyes receptorokhoz nemcsak egyetlen fajta neurotrofin kapcsolódhat. Ez elsősorban a sejttípustól és a ligandkoncentrációtól függhet. Egy tanulmány szerint a TrkA receptort aktiválhatja az NT-3 neurotrofin is, továbbá a TrkB receptorhoz az NT-3, NT-4/5 ligandok is kötődhetnek. A ligand kötődése után receptor homodimerizáció, majd autofoszforiláció következik be. Az így létrejött foszforizált tirozint tartalmazó szakaszok, mintegy kötőhelyül szolgálnak olyan adaptor fehérjék számára, melyek SH2 vagy PTB doménnel rendelkeznek. Az adaptor molekulák kötődése révén egyes, már jól ismert jelátviteli utak – PI3K/AKT, RAS/MEK/ERK, PLC/PKC – aktiválódása következik be, s ezáltal a sejtciklus szabályozásában fontos transzkripciós faktorok és gének működése változik meg *(1. ábra)*.[3, 4]

A Trk fehérjék fontos szerepet játszanak az idegrendszer fejlődésében és működésében. Több alapvető



1. ábra: A Trk-receptoroktól induló jelátviteli útvonalak

idegrendszeri funkció szabályozásáért felelősek, mint például a fájdalom, termoreguláció (TrkA), memória, kognitív funkciók, hangulat, étvágy, testsúly (TrkB) és propriocepció (TrkC). Fiziológiásan a központi és perifériás idegrendszer idegsejtjei proliferációjának, differenciációjának, apoptózisának és sejtciklusának szabályozásában, szinaptikus plaszticitásának változásában és a neurodegeneráció megelőzésében van szerepük, de egyéb, nem neuronális sejtekben és szövetekben (például monocyta, lymphocyta, keratinocyta, prosztata, here, tüdő, csont, hasnyálmirigy, simaizom) is expresszálódik a Trk receptor valamelyik formája.[5,6]

Az *NTRK* gének eltérései és azok megjelenése különböző daganatokban

Az *NTRK* géneltérések kialakulásának ismert mechanizmusai

Az *NTRK* géneket érintő genetikai eltérések leggyakrabban kromoszomális transzlokáció következtében jönnek létre. Közös jellemzőjük az, hogy a karboxi-terminális (3' vég) tirozin-kinázt kódoló domén mindig intakt marad. Ennek megfelelően a töréspont szinte bárhol lehet (bár mindkét gén esetében főként

1. táblázat: Az NTRK gének leggyakoribb fúziós partnerei különböző daganatokban

3' NTRK GÉN	5' PARTNER GÉN	DAGANATTÍPUSOK
NTRK1	*MPRIP*	tüdőrák
	RABGAP1L	cholangiocarcinoma
	TPM3	tüdőrák, vastagbélrák, gyermekkori glioma, lágyrész-sarcoma, papillaris pajzsmirigyrák, mellrák, méhnyakrák, cholangiocarcinoma, infantilis fibrosarcoma, uterussarcoma
	TPR	papillaris pajzsmirigyrák, tüdőrák, uterus sarcoma, gyermekkori mesenchymalis tumor
	CHTOP	glioblastoma
	ARHGEF2	glioblastoma
	LMNA	Spitzoid neoplasma, vastagbélrák, tüdőrák, lágyrész-sarcoma, lipofibromatosis-szerű neurális tumor, mellrák, cholangiocarcinoma, húgyhólyagrák, appendix-adenocarcinoma, uterussarcoma
	AFAP1	glioblastoma
	SQSTM1	infantilis fibrosarcoma, tüdőrák, pajzsmirigyrák
	SSBP2	pajzsmirigyrák
	TRIM63	melanoma
NTRK2	*QKI*	astrocytoma
	BCR	glioma
	DAP2IP	vastagbélrák
	ETV6	akut myeloid leukaemia
	GNAQ	csont sarcoma
	NOS1AP	astrocytoma, glioma
	PRKAR2A	glioma
	RBPMS	lágyrész-sarcoma
NTRK3	*ETV6*	infantilis fibrosarcoma, congenitalis mesoblastos nephroma, emlő secretoros carcinomája, nyálmirigy secretoros carcinomája, akut lymphoid leukaemia, akut myeloid leukaemia, papillaris pajzsmirigyrák, glioma, inflammatoricus myofibroblastos tumor, mellrák, vastagbélrák, gastrointestinalis stromalis tumor, tüdőrák, melanoma, neuroendokrin tumor, sinonasalis adenocarcinoma, lágyrész sarcoma, Spitzoid neoplasma
	EML4	infantilis fibrosarcoma, congenitalis mesoblastos nephroma, glioma, pajzsmirigyrák
	BTBD1	glioma
	RBPMS	pajzsmirigyrák, uterussarcoma
	SPECC1L	uterussarcoma
	TFG	szoliter fibrosus tumor
	TPM4	lágyrész-sarcoma

intronok területén vannak), kivéve a tirozin-kinázt kódoló szakaszon (a tirozin-kinázt kódoló exonoktól 5' irányban van a töréspont). Az amino-terminális (5' vég) partner számos gén lehet. Mindezidáig közel 80 gén került leírásra, mint lehetséges partner az *NTRK* géneket érintő fúziós gének létrejöttében, a leggyakoribbak az *1. táblázatban* találhatók. Függetlenül a partnergéntől, a létrejövő fúziós gén által kódolt kiméra fehérje ligand-független, így folyamatos jelátviteli útvonal aktiváció figyelhető meg. A fúziós fehérje nem rendelkezik a normál Trk protein extracelluláris ligandkötő doménjével, így attól függetlenné válik a működése. A legtöbb partnergén rendelkezik dimerizációs doménnel. Viszont a dimerizációs doménnel nem rendelkező partnergének is folyamatos aktivációhoz vezetnek. Lehetséges, hogy az NTRK gének 5' szekvenciái között vannak olyanok, melyek autoinhibitorikus funkcióval rendelkeznek. Ezek elvesztése vezethet a fúziós fehérje aktivációjához. Ennek következtében a sejtciklus szabályozása zavart szenved, ami tumorgenezishez vezet.[7] Érdemes megjegyezni, hogy kiméra transzkriptum nem csupán gének fúziója következtében jöhet létre. Szomszédos gének cis-splicingja, illetve trans-splicing révén is kialakulhat fúziós transzkriptum.[8] Az *NTRK1* gén fúziós partnerei nagyobbrészt (körülbelül a 66%-uk) intrakromoszomális átrendeződés következtében kerül az *NTRK1* gén mellé, ellentétben az *NTRK2* és *NTRK3* génekkel, ahol (mindkét gén esetében 70% fölötti arányban) interkromoszomális transzlokáció révén alakul ki a fúzió.

Kópiaszám-eltérések (copy number variation) figyelhetők meg számos daganattípus esetében, többek között az emlőrákok és a tüdőrákok 12%-ában a cBioPortal adatai alapján.[9] *Bollig-Fischer és mtsai* *NTRK1* amplifikációt írtak le négy emlőrákos betegnél agyi áttétekkel, mely felveti annak a lehetőségét, hogy a nem megfelelően szabályozott Trk jelátvitel fontos szerepet játszhat az áttétképződésben.[10] A TrkA mRNS szintjét vizsgálva, mely egyes hasnyálmirigy-, petefészek-, nyelőcső-, húgyhólyag-, endometriumdaganatok, illetve phaechromocytomák esetében emelkedett volt, valószínűsíthető, hogy az *NTRK1* gén amplifikációjáról van szó.[11] Wilms-tumorban szenvedő betegeknél mért magasabb TrkB mRNS szint rövidebb relapszus nélküli túléléssel párosult.[12] A TrkA fehérje túltermelődés (overexpression) jobb, a TrkB fehérje és az azt aktiváló BDNF ligand túltermelődése rosszabb prognózisú neuroblastoma kialakulásához vezetett.[13] A cBioPortal adatai alapján deléciók is leírásra kerültek, bár jelentőségük most még ismeretlen. Az *NTRK1* gén in-frame delécióját találták akut myeloid leukaemiás betegeknél.[14, 15] Neuroblastoma kialakulásához vezetett az *NTRK1* gén alternatív splicingja (a transzkriptumból hiányzott a 6., a 7. és a 9. exon) révén létrejövő, folyamatosan aktív fehérje.[16] Számos pontmutáció (single nucleotide variant) ismert, bár ezek közül kevés bizonyult onkogénnek. A tüdőben észlelt neuroendokrin tumorok körülbelül 10%-ában írtak le az *NTRK2* vagy *NTRK3* gént érintő pontmutációt.[17] Az *NTRK* géneket érintő pontmutációkat írtak le az előrehaladott pajzsmirigyrákban szenvedő betegek 9%-ában.[18] Tekintettel arra, hogy az extracelluláris régiónak jelentős szerepe van a szabályozásban, annak bármiféle szerkezeti eltérése (deléció, splice variáns vagy egyéb mód útján) folyamatos jelátviteli aktivációhoz és így daganat kialakulásához vezethet.

Az NTRK génaberrációk tumorokban

Az *NTRK* géneltérések előfordulási gyakorisága tumorokban egyelőre még nem pontosan ismert. Egy kutatócsoport 1272 lágyrészdaganat vizsgálata során 8 esetben tudott kimutatni *NTRK1* (5) vagy *NTRK3* (3) génaberrációt DNS és RNS szekvenálás segítségével, valamint a CDKN2A/B tumorszuppresszor gén delécióját találták négy esetben a nyolcból, míg az összes vizsgált sarcoma csupán 14%-ában volt jelen ez az eltérés.19 Szintén DNS és RNS szekvenálást alkalmazva 2031 – huszonegy évesnél fiatalabb betegtől származó – daganatmintát vizsgáltak meg, mely során 9 (5 *NTRK1*, 4 *NTRK3*) *NTRK* génfúziót találtak, mindannyiszor mesenchymalis tumor volt a diagnózis. Ezekben az esetekben 3 alkalommal *CDKN2A*/B deléció is jelen volt.[20] Összesen 11 502 különféle tumor (tüdőrák, vastagbélrák, emlőrák, glioma, lágyrész sarcoma, pajzsmirigyrák, méhnyakrák) DNS és RNS szekvenálása nyomán 31 *NTRK* génfúziót (8 db *NTRK1*, 10 db *NTRK2*, 13 db *NTRK3*) detektáltak. Az 592 gén vizsgálatára alkalmas NGS panel segítségével az *NTRK* génfúziót tartalmazó daganatok 29%-ában (9 eset) nem volt más patogén genetikai eltérés.[21] Az *NTRK* géneltérések legnagyobb részét új generációs szekvenálással detektálják. Az egyre széleskörűbb elérhetőség és használat révén mind pontosabb képet kaphatunk a valós értékekről. Egyelőre az *NTRK* gént érintő változások előfordulási gyakoriságát mindezek alapján is csak becsülni tudjuk. Az összes daganat esetében körülbelül 1% alatti incidenciáról beszélhetünk.

Az *NTRK* fúzióval rendelkező tumorok mind a gyermekkorban, mind a felnőttkorban jelen vannak. Az elmúlt évek kutatási eredményei alapján arányait tekintve a gyermekkori daganatok kialakulásában jelentő-

sebb szerepe lehet az *NTRK* génfúzióknak, mint a felnőttkori tumorokéban.

Az *NTRK* géneltéréssel rendelkező tumorokat két nagy csoportra oszthatjuk aszerint, hogy milyen gyakran fordulnak elő egyes daganattípusoknál. Az első csoportba tartoznak azok a rendkívül ritka tumorok, melyeknél kifejezetten gyakran lehet *NTRK* géneltérést detektálni. Az emlő secretoros carcinomáiban és a nyálmirigy secretoros carcinomáiban több mint 90%-os gyakorisággal mutatható ki *ETV6-NTRK3* génfúzió.[22,23] Szintén ugyanez a fúzió van jelen majdnem az összes congenitalis mesoblastos nephroma bizonyos altípusaiban (celluláris, kevert), de már találtak *EML4-NTRK3* fúziót is.[24,25] Az infantilis fibrosarcomák 70–90%-ában detektálható *ETV6-NTRK3* génfúzió.[26] Egyes *ETV6-NTRK3* fúzió negatív infantilis fibrosarcomák esetén már leírtak *LMNA-NTRK1*, illetve *EML4-NTRK3* génfúziót is.[25,27,28] A nemrégiben új entitásként leírt lipofibromatosis-szerű neurális tumorok jelentős részében *NTRK1* génfúzió mutatható ki.[29] A másik csoportot azok a gyakori daganattípusok alkotják, melyeknél *NTRK* génaberrációt csak ritkán tudunk azonosítani. Papilláris pajzsmirigyrákoknál *NTRK1* fúziót állapítottak meg, több génpartnerrel is *(TFG, TPR, TPM3)*. Sugárzás-asszociált pajzsmirigyrákok esetében *ETV6-NTRK3* génfúziót írtak le. A gyermekkori papilláris pajzsmirigyrákok 25%-ában találtak NTRK génfúziót, míg a felnőttek esetében kevesebb, mint 10%-ban.[21,30] Gyermekkori gliomák 7%-ában, felnőttkori gliomák 2%-ában találtak NTRK fúziót.[31,32]

LMNA-NTRK1 génfúziót találtak már vastagbélrákban, tüdőrákban, melanomában, lágyrész-sarcomában, illetve a már említett lipofibromatosis-szerű neurális tumorban.[28, 33-36]

Nemrégiben került leírásra egy új differenciálatlan uterussarcoma-variáns, mely morfológiailag fibrosarcomára hasonlít. Négy esetben sikerült NTRK1 vagy NTRK3 génfúziót detektálni, DNS szekvenálás, RNS szekvenálás, FISH, illetve immunhisztokémia módszerekkel.[7]

Egyes lágyrész-sarcomákban, melyek myo/haemangiopericytás mintázattal rendelkeznek, *NTRK1* génfúziót mutattak ki, DNS és RNS szekvenálással, break-apart FISH módszerrel.[37]

Terápiás lehetőségek az *NTRK* géneltérést tartalmazó daganatokban

Az első *NTRK* gént 1986-ban fedezték fel, de csak az utóbbi 3-4 évben került a géncsalád a figyelem középpontjába.[38] Ennek oka a nemrég kifejlesztett, nagy hatékonysággal alkalmazott szelektív terápia megjelenése.

A jelenkor daganatterápiájában egyre nagyobb jelentőségűvé válik a daganatok genetikai profilozása és az így detektálható támadási pontok felismerése. A genetikai eltérések (pontmutáció, inzerció, deléció, amplifikáció), mint biomarkerek, előre jelzik az onkogén-targetált terápia hatásosságát. Receptor tirozin-kináz gének mutációja esetén bekövetkező folyamatos jelátviteli útvonal aktiváció gátlására tirozin-kináz inhibitorokat fejlesztettek már ki és alkalmaztak sikeresen. Például *EGFR* mutációval rendelkező nemkissejtes tüdőrákok esetén az *EGFR* tirozin-kináz-gátló terápia sokkal hatásosabb, mint a hagyományos kemoterápia.

Jelenleg is több Trk inhibitort vizsgálnak fázis 1 vagy fázis 2 vizsgálatokban. Ezek vagy specifikusak a Trk fehérjékre, vagy pedig multi-kináz-inhibitorként többféle tirozin-kináz működését is gátolják. Az eddigi két legismertebb és legnagyobb tapasztalattal használt gyógyszerek az entrectinib és a larotrectinib. Mindkét szer olyan szájon át adható kis molekula, mely már nanomólos koncentrációban képes hatását kifejteni. Mindkettő a Trk receptorok ATP-kötőhelyét blokkolja. Ezek az ATP-kötő helyek mindhárom receptorban nagyon hasonlók. Az entrectinib és a larotrectinib is mindhárom Trk fehérje működését gátolja, az entrectinib pedig további két receptor tirozin-kinázt, a ROS1-et és az ALK-ot is.

Doebele és munkatársai 2015-ben sikerrel alkalmaztak larotrectinibet (LOXO-101) egy *LMNA-NTRK1* génfúzióval rendelkező, tüdőbe többszörösen áttétet adó, lágyrész sarcomás betegben. A standard kemoterápia (sorafenib, epirubicin, doxorubicin) és a primer tumor (bal comb) műtéti eltávolítása után is progrediáló állapotú beteg mellkas CT-jén már számos tüdőáttét került leírásra, a legnagyobb 7 cm átmérőjű volt, és a jelentős mennyiségű pleuralis fluidum következtében súlyos nehézlégzése alakult ki. Négy hónapos larotrectinib kezelés után a beteg állapota jelentősen javult (nehézlégzése megszűnt, oxigén pótlásra a továbbiakban nem szorult), CA-125 szintje rendeződött, mellkas CT-jén szinte teljes remisszió képe ábrázolódott. Mellékhatások nem jelentkeztek. A larotrectinib *in vitro* hatásosságát igazolták három különböző sejtmodell (tüdőrákból származó *MPRIP-NTRK1* fúziót tartalmazó sejtek, vastagbélrák *TPM3-NTRK1* fúzióval rendelkező sejtjei, akut myeloid leukaemia *ETV6-NTRK3* fúziós sejtjei) proliferációs vizsgálatával, mely alapján a proliferáció dózisfüggő gátlását tapasztalták. A larotrectinib *in vivo* eredményességét bizonyították egérbe oltott

NTRK1 fúzióval rendelkező vastagbélrákos sejtek dózisfüggő proliferáció gátlásával.[19]

Drilon és munkatársai 55 olyan daganatos (17 különböző szövettani diagnózisú) beteget kezeltek larotrectinibbel, akiknél NTRK fúziót tudtak igazolni. Kortól és tumortípustól függetlenül kezelték őket, az egyetlen feltétel az NTRK fúzió jelenléte volt. A teljes válaszadási arány 75% volt. Egy év után a terápiára reagáló betegek 71%-ánál folytatták még a terápiát, így az összes beteg 55%-a volt progressziómentes. A terápiára adott válaszok függetlenek voltak a kortól, a partnergéntől, az érintett NTRK géntől, a daganattípustól. Az összes mellékhatás 93%-a volt grade 1 vagy grade 2 súlyosságú. Grade 3 súlyosságú nem kívánt hatás a betegek kevesebb, mint 5%-ában jelentkezett. Grade 4 vagy 5 súlyosságú mellékhatás nem volt. Nem volt olyan beteg, aki reagált a szerre, de azt le kellett volna állítani mellékhatás miatt. A stabil vagy progrediáló betegeknél a kináz domén többféle mutációját találták, melyek szerzett rezisztenciához vezettek.[39]

Mind az entrectinib, mind a larotrectinib jól tolerálható, kevés mellékhatást kifejtő szer. Elsősorban neuropszichiátriai mellékhatások jelentkezhetnek (fáradtság, szédülés, paresztézia, szorongás, tudatzavar), mert a Trk receptorok fiziológiásan az idegrendszer működésében játszanak szerepet. Ezeken kívül anémia, neutrophilia, májenzim-emelkedés jelenhet meg nem kívánt hatásként. A legtöbb mellékhatás grade 1-2 súlyosságú. A kezelt betegek mindösszesen 5%-ában jelentkezett grade 3–4 súlyosságú mellékhatás.[40]

Az Amerikai Élelmiszer- és Gyógyszerfelügyelet (Food and Drug Administration) 2018 novemberében jóváhagyta a larotrectinib alkalmazását NTRK géneltéréssel rendelkező tumorokban. Fontos kiemelni a tumoragnosztikus terápia jelentőségét, azaz egyáltalán nem szempont a szövettani diagnózis, csak az NTRK géneltérés igazolása szükséges,[41] ugyanakkor értelemszerűen szövettani diagnózis szükséges ahhoz, hogy elsősorban olyan daganatokat vizsgáljunk melyekben gyakoribb az *NTRK* géneltérés.

Az *NTRK* gén tirozin-kinázt kódoló doménjében bekövetkező másodlagos mutáció szerzett rezisztencia kialakulásához vezethet. Entrectinib alkalmazása több alkalommal is, dózisfüggő módon vezetett különböző másodlagos mutációkhoz. Ez azért lehet különösen fontos, mert egyes mutációk esetében a larotrectinib használata még hatékony lehet, viszont vannak olyan mutációk, ahol már a larotrectinib sem. Szerzett rezisztencia már larotrectinib kezelés során is kialakult. Az egyre több alkalommal leírt szerzett rezisztencia miatt további Trk targetált terápia kifejlesztésére lesz szükség. Ezért zajlik jelenleg második generációs Trk inhi-

2. táblázat: Az NTRK génfúzióval rendelkező daganatok esetében használható szelektív és multi-kináz inhibitorok

HATÓANYAG	TARGET GÉNEK
larotrectinib	*NTRK1, NTRK2, NTRK3*
entrectinib	*NTRK1, NTRK2, NTRK3, ALK, ROS1*
crizotinib	*NTRK1, ALK, ROS1, MET*
TSR-011	*NTRK1, NTRK2, NTRK3, ALK*
DS-6051b	*NTRK1, NTRK2, NTRK3, ROS1*
PLX7486	*NTRK1, NTRK2, NTRK3, CSF1R*
MGCD516	*NTRK1, NTRK2, NTRK3, DDR2, MET, KIT, KDR, PDGFR*
TPX-0005	*NTRK1, NTRK2, NTRK3, ALK, ROS1*
LOXO-195	*NTRK1, NTRK2, NTRK3*
ONO-5390556	nincs adat egyelőre
foretinib	*NTRK1, MET, KIT, FLT4, KDR, VEGFR, RON, AXL*
ponatinib	*NTRK1, ABL, FGFR, PDGFR, SRC, RET, KIT, FLT1*
nintedanib	*NTRK1, NTRK2, NTRK3, PDGFR, FGFR*
cabozantinib	*NTRK1, NTRK2, KDR, MET, RET, AXL, KIT, FLT1, FLT3, FLT4*
lestaurtinib	*NTRK1, NTRK2, NTRK3, JAK2, FLT3*
merestinib	*NTRK1, NTRK2, NTRK3, MET, AXL, ROS1, MKNK1, MKNK2, FL3, TEK DDR1, DDR2*
altiratinib	*NTRK1, NTRK2, NTRK3, MET, KDR, TIE2, VEGFR2*

bitorok kutatása, fejlesztése. Ezeket már többször is sikeresen alkalmazták első generációs tirozin-kináz inhibitorok okozta másodlagos rezisztenciát mutató daganatok esetében *(2. táblázat)*.[39-41]

A diagnosztika nehézségei

Az NTRK géneltérések identifikálása többféle diagnosztikai módszer alkalmazásával történhet. A leggyakrabban használt módszerek az immunhisztokémia, a fluoreszcens *in situ* hibridizáció (FISH), a reverz transzkripció-polimeráz láncreakció (RT-PCR), valamint az új generációs szekvenálás (NGS). Az immunhisztokémia, FISH és PCR módszerek egyszerre csak egy (vagy kevés) biomarker vizsgálatára képesek. Egyes klinikai esetekben ezek lehetnek a megfelelő a módszerek, de mindinkább a háttérbe szorulnak majd az új generációs szekvenálás elérhetővé válásával. Ahogy a daganatok terápiájában egyre jelentősebbé válik a genetikai elváltozások egyre pontosabb meghatározása (a felfedezett onkogén elváltozások és biomarkerek száma emelkedik), úgy lesz egyre nagyobb szükség olyan diagnosztikai eljárásokra melyekkel egyszerre több géneltérés vizsgálata is lehetséges. Ezzel egyre több génaberráció rutin detektálása is megtörténhet anélkül, hogy specifikusan kellene tesztelni egy-egy feltételezhető elváltozást, ugyanakkor a „cost-benefit" szempontokat is figyelembe véve a célzott meghatározások jó része továbbra is valószínűleg megmarad *(3. táblázat)*.

Immunhisztokémiai módszerek

A legtöbb laboratóriumban elérhető immunhisztokémia kifejezetten olcsó és gyors, valamint alkalmazásához elegendő lehet akár egyetlen metszet is. További előnyei közé tartozik, hogy nem szükséges speciális előkészítés, nem kell a minta nagyfokú tisztaságára törekedni. Alkalmazásának elve azon alapul, hogy a génátrendeződés miatt a fehérje fokozottan fog expresszálódni. Mindezidáig pan-Trk és TrkA antitesteket fejlesztettek ki és vizsgáltak. A pan-Trk antitest révén mindhárom Trk fehérje kimutatható. Az antitest a tirozin-kináz domén egyik epitópjához kötődik. *Hechtman és munkatársai*[21] olyan tumormintát vizsgáltak meg pan-Trk antitestet használva, melyekben

3. táblázat. Az NTRK génfúziók azonosításához alkalmazott laboratóriumi technikák, diagnosztikai metódusok

DIAGNOSZTIKAI MÓDSZEREK	ELŐNYÖK	HÁTRÁNYOK
immunhisztokémia	▸ költséghatékony ▸ nagyon széles körben elérhető ▸ kevés időt igényel ▸ kevés mintaanyagot igényel ▸ nem igényel különleges előkészítést ▸ fehérje expresszión alapul ▸ elfogadható szenzitivitás és specificitás ▸ magas negatív prediktív érték	▸ a vad típusú és a fúziós fehérje túltermelődése között nem tud különbséget tenni ▸ álpozitív (idegszöveti, simaizomszöveti differenciáció esetén) ▸ álnegatív (egyes *NTRK3* fúziók esetén) ▸ egyszerre egy vagy kevés biomarker vizsgálható
FISH	▸ költséghatékony ▸ széles körben elérhető ▸ nem igényel sok időt (kevesebb, mint egy hét) ▸ kevés mintaanyagot igényel ▸ elfogadható szenzitivitás (ha a töréspont az eddig ismert helyen van) és specificitás ▸ töréspont FISH során elegendő csak az egyik fúziós gén ismerete	▸ a három *NTRK* génre három különböző teszt kell (egyszerre kevés biomarker vizsgálható) ▸ álpozitív (lehet, hogy a DNS strukturális eltérését nem követi a funkció változása; ko-lokalizáció) ▸ álnegatív (*NTRK1* gén intrakromoszomális fúziója esetén) ▸ a partnergén ismeretlen marad
RT-PCR	▸ költséghatékony ▸ magas szenzitivitás és specificitás ▸ körülbelül egy hetet vesz igénybe	▸ RNS alapú ▸ ismerni kell mindkét gént, és a töréspontjaikat ▸ a célszekvencia ismerete szükséges (nem képes új fúziós génpartnereket detektálni) ▸ sokféle 5' fúziós génpartner lehetséges
NGS	▸ nem szükséges a partnergén ismerete ▸ képes új fúziós génpartnereket detektálni ▸ képes új töréspontokat detektálni ▸ képes egyszerre több gént vizsgálni ▸ többféle géneltérést is kimutat	▸ költségigényes ▸ laboratórium, felszerelés, gyakorlatigényes ▸ az eredményig, több mint két hét telik el ▸ a DNS alapú NGS használhatóságát az intronok mérete, felépítése korlátozhatja ▸ álpozitív (a DNS strukturális eltérését nem követi a funkció változása) ▸ az RNS alapú NGS elvégzésénél jó minőségű RNS-re van szükség

előtte DNS és RNS alapú szekvenálás segítségével NTRK génfúziót mutattak ki. Az így megvizsgált 21 mintából 20-nál tapasztaltak pozitivitást, ami 95%-os szenzitivitásnak felel meg. Továbbá megvizsgáltak 20 olyan mintát, melynél szekvenálással nem volt igazolható NTRK fúzió. Mindegyik eset negatív volt immunhisztokémiai módszerrel vizsgálva, így ez a módszer 100%-os specificitást adott.[42] *Rudzinski és munkatársai* pan-Trk antitestet használva 97%-os szenzitivitást (29/30) és 98%-os specificitást (47/48) igazoltak. TrkA antitestet vizsgálva 100%-os (26/26) szenzitivitást tapasztaltak (köztük voltak olyan esetek is, amelyek *NTRK2* vagy *NTRK3* génfúziót tartalmaztak), de a specificitás csak 63% volt. A 49 esetből összesen 14 mintában észleltek gyenge pozitivitást és további 4 esetben pedig közepes intenzitású festődést találtak.[43] A már fentebb hivatkozott *Gatalica és munkatársai* által vizsgált 4136 tumormintából 28 esetben detektáltak NTRK génfúziót, új generációs szekvenálással. Ebből a 28 esetből 21 alkalommal tapasztaltak pozitivitást pan-Trk immunhisztokémiát alkalmazva, ami csupán 75%-os szenzitivitásnak felel meg. Az *NTRK3* génfúziók 45%-a (5/11) lett negatív pan-Trk immunhisztokémiai módszerrel vizsgálva. Abból a 4108 tumorból, melynél nem lehetett *NTRK* génfúziót igazolni szekvenálással, 3942 eset immunhisztokémiai vizsgálattal is negatívnak bizonyult, ez 96%-os specificitást mutat.[21] Az *ETV6-NTRK3* fúzióval rendelkező tumoroknál – infantilis fibrosarcoma, congenitalis mesoblastos nephroma, secretoros carcinoma – a relatív alacsony szenzitivitás miatt a látott negatív eredmény könnyen álnegatív lehet, ezért ezekben az esetekben más módszer (például FISH) használata is szükséges. Pan-Trk antitest alkalmazása 100%-os negatív prediktív értéket mutatott 192 tumorminta vizsgálatát követően. Pozitívnak ítélték az immunhisztokémiai eredményt, ha a tumorsejtek legalább 5%-a mutatott akárcsak gyenge intenzitású festést is.[44] Összességében a pan-Trk antitest alkalmazása alapvetően célszerűnek tűnik, különösen annak eldöntésére, hogy további vizsgálatokra szükség van-e.

Tekintettel arra, hogy a Trk fehérje fiziológiásan többek között az idegszövetben és a simaizomszövetben is expresszálódik, előfordulhat, hogy immunhisztokémiai módszerrel pozitívnak bizonyultak olyan, egyébként NTRK fúzió negatív daganatok, melyek idegszöveti vagy simaizomszöveti differenciációt mutattak, például neuroblastoma, glioma, gastrointestinalis stromalis tumor.[45,46]

A legtöbb *NTRK* fúzióval rendelkező daganat esetében a festődés citoplazmatikus, de már több esetben is leírták a festődés különböző szubcelluláris lokalizációját, a génpartnertől függően. Például az *ETV6-NTRK3* fúzió esetén nukleáris (az ETV6 transzkripciós faktor, ezért a sejtmagon belül helyezkedik el), *LMNA-NTRK1* fúzió során perinukleáris (az LMNA gén által kódolt lamin a sejtmaghártya része), *TPM-NTRK* fúzió következtében pedig sejtmembránt érintő (a tropomiozin a citoszkeleton alkotóeleme) festődés lesz látható.45 Mindezek alapján az érintett sejtek festődési mintázata utalhat a partnergénre.

Fluoreszcens *in situ* hibridizáció

Kissé kevésbé széles körben elérhető, szintén kevés minta szükséges hozzá, és itt sem fontos a minta tisztasága. Az átfutási ideje általában kevesebb, mint egy hét. Használható fúziós próba, illetve töréspont próba. A fúziós próba esetén feltételeznünk kell mindkét gént, amely csak kivételes esetekben valósul meg. Például infantilis fibrosarcomában, congenitalis mesoblastos nephromábam, valamint secretoros carcinomában *ETV6-NTRK3* génfúziót várunk. De már leírásra kerültek *ETV6-NTRK3* fúzió negatív esetek is. További hátránya az álpozitivitás a véletlenszerű ko-lokalizáció miatt. A töréspont próba előnye, hogy nem kell ismernünk a partnergént. Elméletben lehet álnegatív, ha a töréspont érinti a gént, de az nem a két próba közötti szakaszon van. Továbbá lehet álnegatív vagy nehezen diagnosztizálható azokban az esetekben is, amikor intrakromoszomális transzlokáció révén jön létre a génfúzió. A FISH módszer egyik nagy hátránya, hogy bár strukturális elváltozást ki tudunk vele mutatni, azt nem követi feltétlenül mindig funkcionális eltérés, így nem biztos, hogy az így felfedezett elváltozás lesz az oka a daganat kialakulásának. Továbbá, ha mindhárom *NTRK* gént átfogóan meg akarjuk vizsgálni, akkor három különböző tesztre lesz szükség. Leggyakrabban az olyan ritka tumorok esetében használják, ahol az *NTRK* géneltérés rendkívül gyakori. Azokban a tumorokban, ahol a két gén fúziója karakterisztikus, fúziós próbát alkalmazhatunk. Ha viszont több 5' partnergén is valószínűsíthető, akkor érdemes töréspont próbát végezni.

Reverz transzkripció-polimeráz láncreakció

Az RT-PCR olyan RNS alapú vizsgálat, mely a fúziós transzkriptum detektálására képes. Ehhez a teszthez szükséges tudni mindkét érintett gént és azok töréspontjait is. Például a nyálmirigy secretoros carcinomáiban ETV6(exon5)-NTRK3(exon15) fúzió található a legtöbb esetben, de nem mindig.[47] A klinikai használ-

hatóságát korlátozza az NTRK fúziós partnerek diverzitása, és a töréspontok változatossága. További problémát jelentenek egyes preanalítikus tényezők (ischaemiás idő, fixálás, RNS extrakció), amelyek mind befolyásolhatják a vizsgálat használhatóságát. Ezért is szükséges a kinyert RNS minőség kontrollja. Egy alternatív RT-PCR módszer az NTRK gén transzkriptumának 3' és 5' expresszióbeli különbségét vizsgálja. A fúziós gén 5' génjének promoterével magasabb expressziója lesz a fúziós partner NTRK gén 3' végének, míg az NTRK 5' vége expressziója alacsony lesz, ha ennek a 3' partnere nem expresszálódik vagy csak alacsony szinten. Így a felborult NTRK 3'/5' arány alapján lehet következtetni géneltérésre, akár a fúziós partner ismerete nélkül is

Újgenerációs szekvenálás

Az NGS vizsgálatok a mintából nyert DNS vagy RNS segítségével akár a teljes genom, exom és transzkriptom analízisére képesek. Lehetséges olyan panel létrehozása is, amely csupán néhány gén vizsgálatára korlátozódik, és így magasabb szenzitivitás érhető el. A teljes genom szekvenálás ehhez képest csökkent szenzitivitású és sokkal nagyobb számítógépes analitikai forrásokat igényel. Ahogy a daganatok kezelésében egyre fontosabb a genetikai háttér mind pontosabb ismerete, annál inkább az a diagnosztikai modalitás kerül előtérbe, mely a lehető legkevesebb szövetminta felhasználásával a lehető legtöbb információt képes nyújtani. A DNS alapú NGS panelek fókuszálhatnak kevés vagy sok génre, akár teljes exom vagy teljes genom szekvenálásra is képesek. Ezen tesztek segítségével egyszerre akár több száz gén vizsgálata is történhet. Többféle géneltérés (pontmutáció, amplifikáció, deléció, inzerció, fúzió, mikroszatellita instabilitás) is azonosítható a vizsgálat segítségével. A DNS alapú NGS szenzitivitását befolyásolja az, hogy a panel egy adott fúzió töréspontját lefedi-e és az mekkora lefedettséget jelent. Az *NTRK2* és *NTRK3* géneknek csak az exon régiói vizsgálhatók, viszont a töréspont általában az intron régiókban szokott lenni, így az eredmény álnegatív lehet. Az intron régiók nagy mérete, illetve azok felépítése is korlátozhatja az eljárás használhatóságát. Ugyanis az intronok gyakran ismétlődő, repetitív szakaszai, illetve magas guanidin-citidin tartalma megnehezítik a vizsgálatot. Összességében elmondható, hogy az *NTRK2* és *NTRK3* fúziók detektálásának szenzitivitása korlátozott. Ami a specificitást illeti, itt is ugyanaz mondható el, ami a FISH-ről. A strukturális változás önmagában nem jelenti feltétlenül a funkció változását is. A DNS alapú NGS panelek nagy tisztaságú tumorszövetet igényelnek, és általában több mint két hét, amíg az eredmény megérkezik.[48]

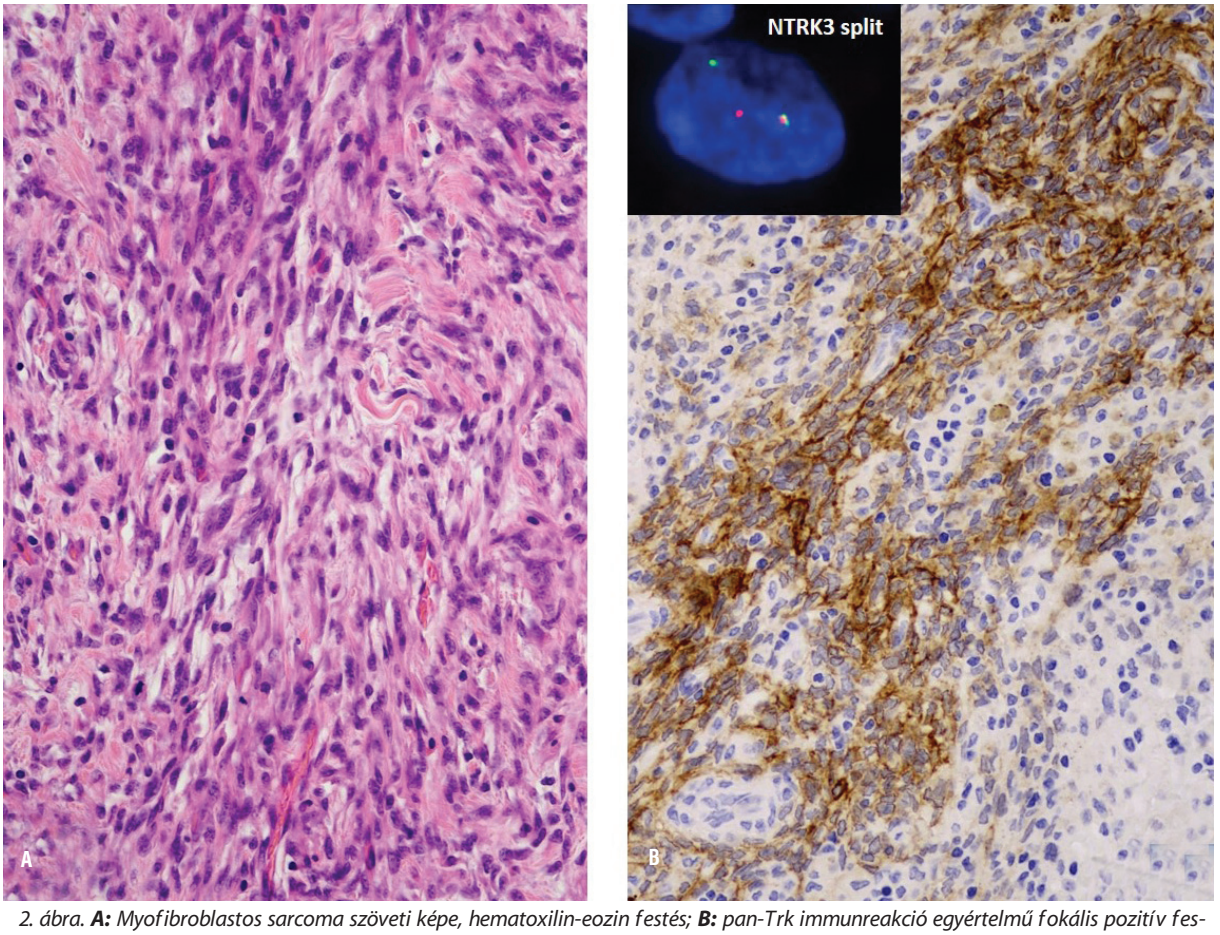
Az RNS alapú NGS legfőbb korlátja maga az RNS, amely nagyon labilis. A formalin fixált, paraffinba ágyazott szövetekben az RNS degradálódik az idő előrehaladtával. Az RNS izolálás különleges laboratóriumi körülményeket, felszerelést és nagy gyakorlatot igényel. Ennélfogva mindenképp szükséges a kinyert RNS kvantitatív és kvalitatív kontrollja. Már van olyan RNS alapú NGS eljárás, amely képes detektálni génfúziót csupán az egyik gén ismeretével. Az ún. anchored multiplex PCR segítségével a fúziós partnergén és a töréspont ismerete nélkül is lehetséges a fúziós transzkriptum detektálása. Egy „univerzális" adaptert ligálnak a transzkriptum 5' végéhez. Ezután egy génspecifikus primer hibridizálódik az *NTRK* gént kódoló szekvenciához, amíg egy másik „univerzális" primer hibridizálódik az újonnan ligált adapter szekvenciához. Az RNS szekvenálás előnyei a DNS szekvenáláshoz képest többek között a kisebb szekvenálási teher (az mRNS intronokat már nem tartalmaz), magasabb feltételezett szenzitivitás a fúziós transzkriptumok amplifikációja révén, illetve maga a tény, hogy a transzkriptumot az érintett gének és exonok alkotják, ezáltal az mRNS fokozott expressziója szinte biztosan fokozott fehérje termelődéshez vezet és így a daganat kialakulásának valódi oka lehet.[44]

A hibrid DNS/RNS alapú szekvenálás során rendkívül magas szenzitivitással (98–100%) és specificitással (96–100%) mutatható ki fúzió, splice variáns, inzerció, deléció, pontmutáció és kópiaszám-eltérés.

Egyes preanalítikus tényezők, legfőképp a nem megfelelő fixációs paraméterek (idő, hőmérséklet) nagy hatással lehetnek az immunhisztokémiai, illetve az RNS, de akár a DNS alapú vizsgálatok eredményeire is, minthogy álnegatív eredményeket adhatnak.[44]

Javasolható diagnosztikai algoritmus

A megfelelő diagnosztikai stratégia felépítéséhez szükséges figyelembe venni a már korábban leírt, különböző tumoroknál látott előfordulási gyakoriságokat, továbbá azt a tényt, hogy a legtöbb esetben más onkogén eltérések felderítése elkerülhetetlen lesz. Bár az ideális az lenne, ha minden esetben széleskörű NGS vizsgálat történne, ennek nincs realitása a magas költségek, a megfelelő laboratóriumi háttér és a szaktudás hiánya miatt. Azon entitásoknál, melyek jelentős há-



2. ábra. ***A:*** *Myofibroblastos sarcoma szöveti képe, hematoxilin-eozin festés;* ***B:*** *pan-Trk immunreakció egyértelmű fokális pozitív festődéssel; inzert) FISH reakció NTRK3 split/break-apart próbával. A szignálszétválás (különálló zöld és piros szignál) jelzi, hogy NTRK3 fúzió történt, a partnergén nem ismert.*

nyadánál mutatható ki *NTRK* fúziós gén, javasolt először pan-Trk antitesttel immunhisztokémiai vagy töréspont FISH vizsgálatot végezni (leggyakrabban az *ETV6-NTRK3* fúziót feltételezve), majd annak eredményétől függően érdemes szekvenálni. A legtöbb tumor esetében, melyek Trk expressziója alacsony, akárcsak az *NTRK* fúzió incidenciája is, alapvetően más targetálható onkogén eltéréseket is feltételezve, széleskörű NGS-vizsgálat javasolt (mely magában foglalja a nagyobb gyakoriságú feltételezett onkogéneket, de az *NTRK* géneket is). Azoknál a daganatoknál, melyeknél rutinszerűen nem történik szekvenálás, ajánlatos pan-Trk immunhisztokémiát végezni, és az így kiszűrt pozitív eseteket valamilyen molekuláris vizsgálatnak alávetni. Példaként említünk egy olyan saját esetet, ahol miofibroblasztos sarcoma esetén mintegy „előszűrésként" pan-Trk immunreakciót végeztünk, és miután ez pozitív lett, FISH reakcióval (split próba) igazoltuk az NTRK3 gén érintettségét *(2. ábra)*. Olyan tumoroknál, melyeknél a vad-típusú Trk expresszió magasabb, mint egyéb szövetekben (neuroendokrin tumorok, gastrointestinalis stromalis tumor, agyi tumorok), az immunhisztokémia álpozitív lehet, ezért érdemes egyből molekuláris vizsgálatot végezni.

Összefoglalás

Az *NTRK* génfúzió számos daganattípusban előfordul, néhány rendkívül ritka tumorban kifejezetten gyakori, míg számos gyakori tumorban az incidenciája 1% körül lehet. Az összességében alacsony incidenciájú génfúzió felismerésének a jelentősége a nemrégiben kifejlesztett terápiában rejlik. A nagyon hatékonynak bizonyult szelektív tirozin-kináz inhibitor és a többi, fejlesztés alatt álló szelektív- vagy multi-kináz-inhibitor révén az NTRK génfúzióval rendelkező tumorok kezelése meglehetősen ígéretesnek tűnik. A cikkben ajánlott diagnosztikai algoritmust alkalmazva a lehető leghatékonyabban találhatjuk meg azokat a daganatokat, melyekben van *NTRK* génfúzió.

Irodalom

1. Chao MV. Neurotrophin receptors: a window into neuronal differentiation. Neuron 1992; 9:583-93.
2. Reichardt LF. Neurotrophin-regulated signalling pathways. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2006; 361:1545-64.
3. Huang EJ, Reichardt LF. Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. Annu Rev Biochem. 2003; 72:609-42.
4. Vaishnavi A, Le AT, Doebele RC. TRKing down an old oncogene in a new era of targeted therapy. Cancer Discov. 2015; 5:25-34.
5. Nakagawara A. Trk receptor tyrosine kinases: a bridge between cancer and neural development. Cancer Lett. 2001; 169:107-14.
6. Chao MV. Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways. Nat Rev Neurosci. 2003; 4:299-309.
7. Chiang S, Cotzia P, Hyman DM, Drilon A, Tap WD, Zhang L, et al. NTRK fusions define a novel uterine sarcoma subtype with features of fibrosarcoma. Am J Surg Pathol. 2018; 42:791-8.
8. Chwalenia K, Facemire L, Li H. Chimeric RNAs in cancer and normal physiology. Wiley Interdiscip Rev RNA. 2017; 8:e1427.
9. Gao J, Aksoy BA, Dogrusoz U, Dresdner G, Gross B, Sumer SO, et al. Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. Sci Signal. 2013; 6:pl1.
10. Bollig-Fischer A, Michelhaugh SK, Wijesinghe P, Dyson G, Kruger A, Palanisamy N, et al. Cytogenomic profiling of breast cancer brain metastases reveals potential for repurposing targeted therapeutics. Oncotarget. 2015; 6:14614-24.
11. Narayanan R, Yepuru M, Coss CC, Wu Z, Bauler MN, Barrett CM, et al. Discovery and preclinical characterization of novel small molecule TRK and ROS1 tyrosine kinase inhibitors for the treatment of cancer and inflammation. PLoS One. 2013; 8:e83380.
12. Eggert A, Grotzer MA, Ikegaki N, Zhao H, Cnaan A, Brodeur GM, et al. Expression of the neurotrophin receptor receptor TrkB is associated with unfavorable outcome in Wilms' tumor. J Clin Oncol. 2001; 19:689-96.
13. Brodeur GM, Minturn JE, Ho R, Simpson AM, Iyer R, Varela CR et al. Trk receptor expression and inhibition in neuroblastomas. Clin Cancer Res. 2009; 15:3244-50.
14. Tomasson MH, Xiang Z, Walgren R, Zhao Y, Kasai Y, Miner T, et al. Somatic mutations and germline sequence variants in the expressed tyrosine kinase genes of patients with de novo acute myeloid leukemia. Blood. 2008; 111:4797-808.
15. Reuther GW, Lambert QT, Caligiuri MA, Der CJ. Identification and characterization of an activating TrkA deletion mutation in acute myeloid leukemia. Mol Cell Biol. 2000; 20:8655-66,
16. Tacconelli A, Farina AR, Cappabianca L, Desantis G, Tessitore A, Vetuschi A, et al. TrkA alternative splicing: A regulated tumor-promoting switch in human neuroblastoma. Cancer Cell. 2004; 6:347-60.
17. Marchetti A, Felicioni L, Pelosi G, Grammastro MD, Fumagalli C, Sciarrotta M et al. Frequent mutations in the neurotrophic tyrosine receptor kinase gene family in large cell neuroendocrine carcinoma of the lung. Hum Mutat. 2008; 29:609-16.
18. Iniguez-Ariza NM, Bible KC, Morris JC, Chintakuntlawar AV, Shridhar V, Smallridge RC, et al. NTRK1-3 point mutations in poor prognosis thyroid cancers. J Clin Oncol. 2017; 35:6087-6087.
19. Doebele RC, Davis LE, Vaishnavi A, Le AT, Estrada-Bernal A, Keysar S et al. An Oncogenic NTRK Fusion in a Patient with Soft-Tissue Sarcoma with Response to the Tropomyosin-Related Kinase Inhibitor LOXO-101. Cancer Discov. 2015; 5:1049-57.
20. Pavlick D, Schrock AB, Malicki D, Stephens PJ, Kuo DJ, Ahn H et al. Identification of NTRK fusions in pediatric mesenchymal tumors. Pediatr Blood Cancer. 2017; 64:e26433.
21. Gatalica Z, Xiu J, Swensen J, Vranic S. Molecular characterization of cancers with NTRK gene fusions. Mod Pathol. 2019; 32:147-53.
22. Tognon C, Knezevich SR, Huntsman D, Roskelley CD, Melnyk N, Mathers JA, et al. Expression of the ETV6-NTRK3 gene fusion as a primary event in human secretory breast carcinoma. Cancer Cell. 2002; 2:367-76.
23. Skalova A, Vanecek T, Sima R, Laco J, Weinreb I, Perez-Ordonez B, et al. Mammary analogue secretory carcinoma of salivary glands, containing the ETV6-NTRK3 fusion gene: a hitherto undescribed salivary gland tumor entity. Am J Surg Pathol. 2010; 34:599-608.
24. Rubin BP, Chen CJ, Morgan TW, Xiao S, Grier HE, Kozakewich HP et al. Congenital mesoblastic nephroma t(12;15) is associated with ETV6-NTRK3 gene fusion: cytogenetic and molecular relationship to congenital (infantile) fibrosarcoma. Am J Pathol. 1998; 153:1451-1458.
25. Church AJ, Calicchio ML, Nardi V, Skalova A, Pinto A, Dillon DA, et al. Recurrent EML4-NTRK3 fusions in infantile fibrosarcoma and congenital mesoblastic nephroma suggest a revised testing strategy. Mod Pathol. 2018; 31:463-73.
26. Knezevich SR, McFadden DE, Tao W, Lim JF, Sorensen PH. A novel ETV6-NTRK3 gene fusion in congenital fibrosarcoma. Nat Genet. 1998; 18:184-7.
27. Tannenbaum-Dvir S, Glade Bender JL, Church AJ, Janeway KA, Harris MH, Mansukhani MM, et al. Characterization of a novel fusion gene EML4-NTRK3 in a case of recurrent congenital fibrosarcoma. Cold Spring Harb Mol Case Stud. 2015; 1:a000471.
28. Wong V, Pavlick D, Brennan T, Yelensky R, Crawford J, Ross JS, et al. Evaluation of a congenital infantile fibrosarcoma by comprehensive genomic profiling reveals an LMNA-NTRK1 gene fusion responsive to crizotinib. J Natl Cancer Inst. 2015; 108:djv307.
29. Agaram NP, Zhang L, Sung YS, Chen CL, Chung CT, Antonescu CR, et al. Recurrent NTRK1 gene fusions define a novel subset of locally aggressive lipofibromatosis-like neural tumors. Am J Surg Pathol. 2016; 40:1407-16.
30. Prasad ML, Vyas M, Horne MJ, Virk RK, Morotti R, Liu Z, et al. NTRK fusion oncogenes in pediatric papillary thyroid carcinoma in northeast United States. Cancer. 2016; 122:1097-107.
31. Wu G, Diaz AK, Paugh BS, Rankin SL, Ju B, Li Y, et al. The genomic landscape of diffuse intrinsic pontine glioma

and pediatric non-brainstem high-grade glioma. Nat Genet. 2014; 46:444-50.

32. Ferguson SD, Zhou S, Huse JT, de Groot JF, Xiu J, Subramaniam DS, et al. Targetable gene fusions associate with the IDH wild-type astrocytic lineage in adult gliomas. J Neuropathol Exp Neurol. 2018; 77:437-442.
33. Sartore-Bianchi A, Ardini E, Bosotti R, Amatu A, Valtorta E, Somaschini A et al. Sensitivity to entrectinib associated with novel LMNA-NTRK1 gene fusion in metastatic colorectal cancer. J Natl Cancer Inst. 2015; 108:djv306.
34. Vaishnavi A, Capelletti M, Le AT, Kako S, Butaney M, Ercan D, et al. Oncogenic and drug sensitive NTRK1 rearrangements in lung cancer. Nat Med. 2013; 19:1469-72.
35. Wiesner T, He J, Yelensky R, Esteve-Puig R, Botton T, Yeh I, et al. Kinase fusions are frequent in Spitz tumors and spitzoid melanomas. Nat Commun. 2014; 5:3116.
36. Kohsaka S, Saito T, Akaike K, Suehara Y, Hayashi T, Takagi T, et al. Pediatric soft tissue tumor of the upper arm with LMNA-NTRK1 fusion. Hum Pathol. 2018; 72:167-73.
37. Haller F, Knopf J, Ackermann A, Bieg M, Kleinheinz K, Schlesner M, et al. Paediatric and adult soft tissue sarcomas with NTRK1 gene fusions: a subset of spindle cell sarcomas unified by a prominent myopericytic/haemangiopericytic pattern. J Pathol. 2016; 238:700-10.
38. Martin-Zanca D, Hugh SH, Barbacid M. A human oncogene formed by the fusion of truncated tropomyosin and protein tyrosine kinase sequences. Nature. 1986; 319:743-8.
39. Drilon A, Laetsch TW, Kummar S, DuBois SG, Lassen UN, Demetri GD et al. Efficacy of Larotrectinib in TRK Fusion-Positive Cancers in Adults and Children. N Engl J Med. 2018; 378:731-9.
40. Khotskaya YB, Holla VR, Farago AF, Mills Shaw KR, Meric-Bernstam F, Hong DS. Targeting TRK family proteins in cancer. Pharmacol Ther. 2017; 173:58-66.
41. Märkl B, Hirschbühl K, Dhillon C. NTRK-Fusions – A new kid on the block. Pathol Res Pract. 2019; 215:152572.
42. Hechtman JF, Benayed R, Hyman DM, Drilon A, Zehir A, Frosina D, et al. Pan-Trk Immunohistochemistry is an Efficient and Reliable Screen for the Detection of NTRK fusions. Am J Surg Pathol. 2017; 41:1547-1551.
43. Rudzinski ER, Lockwood CM, Stohr BA, Vargas SO, Sheridan R, Black JO et al. Pan-Trk Immunohistochemistry Identifies NTRK Rearrangements in Pediatric Mesenchymal Tumors. Am J Surg Pathol. 2018; 42:927-35.
44. Murphy DA, Ely HA, Shoemaker R, Boomer A, Culver BP, Hoskins I, et al. Detecting Gene Rearrangements in Patient Populations Through a 2-Step Diagnostic Test Comprised of Rapid IHC Enrichment Followed by Sensitive Next-Generation Sequencing. Appl Immunohistochem Mol Morphol. 2017; 25:513-23.
45. Solomon JP, Hechtman JF. Detection of NTRK Fusions: Merits and Limitations of Current Diagnostic Platforms. Cancer Res. 2019; 79:3163-8.
46. Feng J, Ebata K, Hansen F, Kivi L, Kriegshauser C, Morosini D, et al. TRK wild-type and fusion protein expression in solid tumors: Characterization by immunohistochemistry and in situ hybridization. Ann Oncol. 2018; 29:vi27.
47. Skalova A, Vanecek T, Simpson RH, Laco J, Majewska H, Baneckova M, et al. Mammary analogue secretory carcinoma of salivary glands: molecular analysis of 25 ETV6 gene rearranged tumors with lack of detection of classical ETV6-NTRK3 fusion transcript by standard RT-PCR: report of 4 cases harboring ETV6-X gene fusion. Am J Surg Pathol. 2016; 40:3-13.
48. Hsiao SJ, Zehir A, Sireci AN, Aisner DL. Detection of Tumor NTRK gene fusions to identify patients who may benefit from tyrosine kinase (TRK) inhibitor therapy. J Mol Diagn. 2019; 21:553-71.

SEMMELWEIS KIADÓ SZAK- ÉS TANKÖNYVEI

Belgyógyászat

Könyveink megvásárolhatók a Legendus Könyvesboltban, illetve a Líra Kereskedelmi hálózaton belül az egész országban, de egyre nagyobb igényt elégít ki webshopunk.

Vásárhelyi Barna (szerk.)

BEVEZETÉS A LABORATÓRIUMI MEDICINÁBA

A megbízható laboratóriumi vizsgálati eredmények, a képalkotó eljárások és az egyéb műszeres vizsgálatok adják az alapját a bizonyítékokon alapuló medicinának. A laboratóriumi medicina magában foglalja a klinikai laboratóriumi vizsgálatok teljes vertikumát, azok értelmezését, fejlesztését, valamint oktatását. Az általános orvosképzésen belül a laboratóriumi medicina tantárgy oktatásának célja, hogy a hallgatók elsajátítsák azt a szemléletet, melynek révén a későbbi gyógyító munka során a laboratóriumok felé célzottan jól definiált vizsgálati kérdéseket tudnak feltenni, a kapott eredményeket helyesen tudják értékelni és beépíteni a diagnosztikus algoritmusba. A laboratóriumok eredményei a korszerű gyógyítás, így a betegségek szűrése, a betegek kezelése, állapotmonitorozás számára elengedhetetlenek. A klinikai laboratóriumok feladata, hogy az emberi szervezetben előforduló anyagokat kimutassák és szintjüket meghatározzák. Minőségi és mennyiségi analitikai vizsgálatokat egyaránt végeznek.

A könyv ára: 4160 Ft ■ E-könyv ára: 3500 Ft

Könyvek E-könyvek Folyóiratok Apropó Poszter Box

Semmelweis Kiadó
1089 Budapest, Nagyvárad tér 4.
www.semmelweiskiado.hu

LEGENDUS KÖNYVESBOLT
1089 Budapest, Nagyvárad tér 4.
Tel.: 210-4408, 459-1500/56353
Nyitva tartás: H–Sz: 9.00–16.00,
Cs: 9.00–18.00, P: 9.00–14.00
E-mail: info@semmelweiskiado.hu

ÚJRADEFINIÁLTUK A TÚLÉLÉSI ESÉLYEKET.
MÉG TÖBB INDIKÁCIÓBAN.

KEYTRUDA®
(pembrolizumab)
25 mg/ml (100 mg/4 ml) koncentrátum oldatos infúzióhoz

KEYTRUDA 25 mg/ml koncentrátum oldatos infúzióhoz (a 4 ml-es, koncentrátumot tartalmazó injekciós üveg 100 mg pembrolizumabot tartalmaz). Javallatok: 1) *Melanoma malignum:* • Monoterápiában (Mt) az előrehaladott (nem reszekábilis vagy metasztatikus) melanomában szenvedő felnőttek kezelésére. • Mt-ban a III. stádiumú melanoma adjuváns kezelésére olyan felnőtteknél, akiknél nyirokcsomó érintettség is fennáll, és teljes reszekción estek át. **2)** *Metasztatikus, nem kissejtes tüdő carcinoma (NSCLC):* • Mt-ban elsővonalbeli kezelésként olyan felnőtteknél, akiknél a daganat PD-L1-et expresszál ≥50%-os TPS (Tumor Proportion Score) mellett, EGFR-pozitív tumor mutáció vagy ALK transzlokáció jelenléte nélkül. • Pemetrexeddel és platina-tartalmú kemoterápiával kombinálva, elsővonalbeli kezelésként olyan felnőtteknél, akiknek a daganata nem hordoz EGFR- vagy ALK-pozitív mutációkat. • Karboplatinnal és/vagy paklitaxellel vagy nab-paklitaxellel kombinálva, elsővonalbeli kezelésként metasztatizáló laphámsejtes NSCLC kezelésére. • Mt-ban, olyan felnőtteknél, akik korábban legalább egy kemoterápiás kezelést kaptak (ekkor az EGFR- vagy ALK-pozitív genomi tumor mutációval bíró betegeknek kapniuk kellett ezen mutációkra jóváhagyott terápiát is korábban) és a daganat PD-L1-et expresszál ≥1%-os TPS mellett. **3)** *Kiújuló vagy nem reagáló klasszikus Hodgkin-lymphoma (cHL) kezelésére Mt-ban:* • legalább 3 éves gyermekeknél vagy felnőtteknél, akik sikertelen autológ őssejt-transzplantáción (ASCT) estek át, vagy akik nem alkalmasak az ASCT-kezelésre és legalább két korábbi kezelést kaptak. **4)** *Lokálisan előrehaladott vagy metasztatikus urothelialis carcinoma kezelésére Mt-ban:* • Olyan felnőtteknél, akik korábban platina-tartalmú kemoterápiát kaptak. • Továbbá olyan felnőttek kezelésére, akik a ciszplatin-tartalmú kemoterápiás kezelésre alkalmatlanok, és akiknél a daganat CPS ≥ 10 kombinált pontszám mellett expresszál PD-L1-et. **5)** *Előrehaladott vesesejtes carcinoma (RCC) elsővonalbeli kezelésére axitinibbel kombinálva.* **6)** *Kiújuló vagy metasztatizáló fej-nyaki laphámsejtes carcinomában (HNSCC) szenvedő felnőttek kezelésére:* • Mt-ban, elsővonalbeli kezelésként, akiknél a daganat CPS ≥ 1 kombinált pontszám mellett expresszál PD-L1-et. • Platina és 5-fluorouracil (5-FU) tartalmú kemoterápiával kombinációban, elsővonalbeli kezelésként, akiknél a daganat CPS ≥ 1 kombinált pontszám mellett expresszál PD-L1-et. Mt-ban, akiknél a daganat a platina-tartalmú kemoterápia mellett vagy azt követően progrediál és ≥50%-os TPS mellett expresszál PD-L1-et. **7)** *Metasztatizáló, magas mikroszatellita instabilitású (MSI-H) vagy mismatch repair deficiens (MMR-d) colorectalis carcinoma (CRC) elsővonalbeli kezelésére felnőtteknél Mt-ban.* PD-L1-expressziót validált vizsgálattal igazolt PD-L1-meghatározás alapján ajánlott elvégezni. MSI-H/MMR-d-státuszt a CRC-s betegeknél validált vizsgálattal ajánlott meghatározni. **Adagolás:** 1 ml koncentrátum 25 mg pembrolizumabot (P) tartalmaz. A Mt-ban alkalmazott P javasolt adagja: 200 mg, 3 hetente vagy 400 mg, 6 hetente, amelyeket intravénás infúzióban, 30 perc alatt kell beadni. A kombinációs terápia részeként alkalmazott P javasolt adagja 200 mg, 3 hetente 30 perc alatt beadandó intravénás infúzióban. A P kemoterápiával kombinációban történő alkalmazásakor a P-t kell először beadni, utána pedig a kombinációban alkalmazott kemoterápiás készítményt annak alkalmazási előírása szerint. A P és axitinib kombinációjával kezelt RCC-ban szenvedő betegeknél alkalmazott axitinib adagolására vonatkozóan annak alkalmazási előírása az irányadó. P-bal kombinációban alkalmazva 6 hetente vagy ennél hosszabb időszakonként fontolóra vehető az axitinib dózisának emelése. A betegek P-bal történő kezelését progresszió észleléséig vagy elfogadhatatlan toxicitás jelentkezéséig szabad csak folytatni. Betegségük progressziójának megerősítéséig a kezelés folytatása javasolt azoknál a klinikailag stabil betegeknél, akiknél a betegség kezdeti progressziójára van bizonyíték. **Ellenjavallat:** A készítmény hatóanyagával vagy bármely segédanyagával szembeni túlérzékenység. **Figyelmeztetések:** A P-kezelés alatt előforduló, az immunrendszerrel összefüggő mellékhatások többsége reverzibilis, és a P-kezelés megszakításával, illetve kortikoszteroidok (kszt-ok) alkalmazásával és/vagy szupportív ellátással kezelhető volt. Immunrendszerrel összefüggő mellékhatások előfordultak a P utolsó adagja után is és érinthetnek több szervrendszert is. A feltételezett, immunrendszerrel összefüggő mellékhatások esetén megfelelő értékelésre van szükség az etiológia igazolásához, valamint az egyéb okok kizárásához. A P-kezelés alatt monitorozni szükséges az immunrendszerrel kapcsolatos mellékhatásokkal összefüggő panaszokat, tüneteket és laboratóriumi eltéréseket. További, részletes információk az alkalmazási előírás 4.4 pontjában. A P-kezelés növelheti a szervtranszplantáltak esetében a rejectio kockázatát, illetve allogén őssejt-transzplantáció komplikációinak potenciális kockázatát – ideértve a graft-versus-host betegséget (GVHD) is. **Betegkártya:** A készítményt felíró minden orvosnak ismernie kell az orvosoknak szóló tájékoztatót és kezelési irányelveket és ismertetnie kell a beteggel a P-kezelés kockázatait. A beteg minden egyes vénnyel együtt megkapja a Betegkártyát. **Különleges betegcsoportok:** *Dózismódosítás nem szükséges:* enyhe vagy közepesen súlyos vesekárosodásban, vagy enyhe májkárosodásban szenvedő betegek esetében. *Időskorúak:* Biztonságosság vagy hatásosság tekintetében összességében nem számoltak be az idős (≥65 év) és fiatalabb (<65 év) betegek közötti különbségekről. *Gyermekek:* A P biztonságosságát és hatásosságát 18 évesnél fiatalabb gyermekeknél nem vizsgálták, kivéve cHL esetén. **Főbb mellékhatások:** Klinikai vizsgálatokban a Mt-ban adott P biztonságosságát 6185, előrehaladott melanomában, reszekált, III. stádiumú melanomában (adjuváns terápia), NSCLC-ban, cHL-ban, urothelialis carcinomában, CRC-ben vagy HNSCC-ban szenvedő betegnél vizsgálták, ahol a leggyakoribb mellékhatásként a fáradtság (32%), a hányinger (21%), a hasmenés (21%) volt. A gyermekeknél megfigyelt biztonságossági profil általában hasonló volt a pembrolizumabbal kezelt felnőtteknél megfigyeltekhez. A Mt esetén jelentett mellékhatások többségének súlyossága 1. vagy 2. fokozatú volt. A kemoterápiával kombinációban adott P biztonságosságát 1067 NSCLC-ban vagy HNSCC-ben szenvedő beteg részvétele mellett vizsgálták, ahol a leggyakoribb mellékhatás a hányinger (50%), az anaemia (50%), a fáradtság (37%) volt. A 3–5. fokozatú mellékhatások előfordulási gyakorisága a P kombinációs terápia mellett NSCLC esetén 67%, míg az önmagában alkalmazott kemoterápia mellett 66% volt, illetve HNSCC esetén a P kombinációs terápia mellett 85%, míg a cetuximabbal kombinációban adott kemoterápia esetén 84% volt. Az axitinibbel kombinációban adott P biztonságosságát 429 előrehaladott RCC-ban szenvedő betegnél vizsgálták, ahol a leggyakoribb mellékhatás a hasmenés (54%), a hypertensio (45%), a fáradtság (38%) volt. A 3–5. fokozatú mellékhatások előfordulási gyakorisága a P kombinációs terápia esetén 76%, míg az önmagában alkalmazott szunitinib esetén 71% volt.

Felírás előtt kérjük, olvassa el a teljes alkalmazási előírást, különös tekintettel a pontos indikációkra (4.1), adagolásra és alkalmazásra (4.2), ill. a figyelmeztetésekre (4.4)! 09/03/2021 Keytruda – EMEA/H/C/003820 – II/0090

MSD

MSD Pharma Hungary Kft.
1095 Budapest, Lechner Ödön fasor 8., Telefon: 06-1-888-5300,
Fax: 06-1-888-5388, hungary_msd@merck.com

Lezárás dátuma: 2021. április 19.,
HU-KEY-00205

Az immuncheckpoint-gátlók biomarkereinek molekuláris diagnosztikai vizsgálata

Molecular diagnostic methodology of the immun checkpoint inhibitor biomarkers

Regős Eszter[1], **Lotz Gábor**[2]
[1] I. Sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet, Semmelweis Egyetem, Budapest
[2] II. Sz. Patológiai Intézet, Semmelweis Egyetem, Budapest
E-levél: regos.eszter@med.semmelweis-univ.hu

ÖSSZEFOGLALÁS Az immuncheckpoint-gátlók bevezetésük óta forradalmasították az onkológiai kezelést, számtalan betegnek nyújtva ezzel újabb terápiás lehetőségeket akár mono- akár kombinációs terápiában. A megfelelő terápia megválasztásában segítséget nyújtanak a különböző prediktív markerek, melyek az immunoonkológiában kezdetben a PD-L1 immunhisztokémiát jelentették, mára azonban az újabb szövetagnosztikus terápiák korában a mikroszatellita instabilitás és a tumor mutációs terhelés is a vizsgálandó markerek közé került. Cikkünkben áttekintjük a régi és újabb markerek molekuláris diagnosztikus módszertanát és esetleges buktatóit, valamint bemutatjuk a Semmelweis Egyetem két patológiai intézetében szerzett tapasztalatokat.

KULCSSZAVAK immuncheckpoint-gáltók, PD-L1, mikroszatellita instabilitás, TMB

SUMMARY Immune checkpoint inhibitors have revolutionized the oncology treatment since their introduction, providing patients with new therapeutic options in either mono- or combination therapy. Many predictive markers aid the choice of appropriate therapy, that initially represented only PD-L1 immunohistochemistry, but today, in the age of novel tissue agnostic therapies, microsatellite instability and tumor mutational burden are also at the point of interest. In our article, we review the molecular diagnostic methodology and possible pitfalls of old and new predictive markers, and we present the experiences of the two pathology institutes at Semmelweis University.

KEY WORDS immune checkpoint inhibitors, PD-L1, microsatellite instability, TMB

Bevezetés

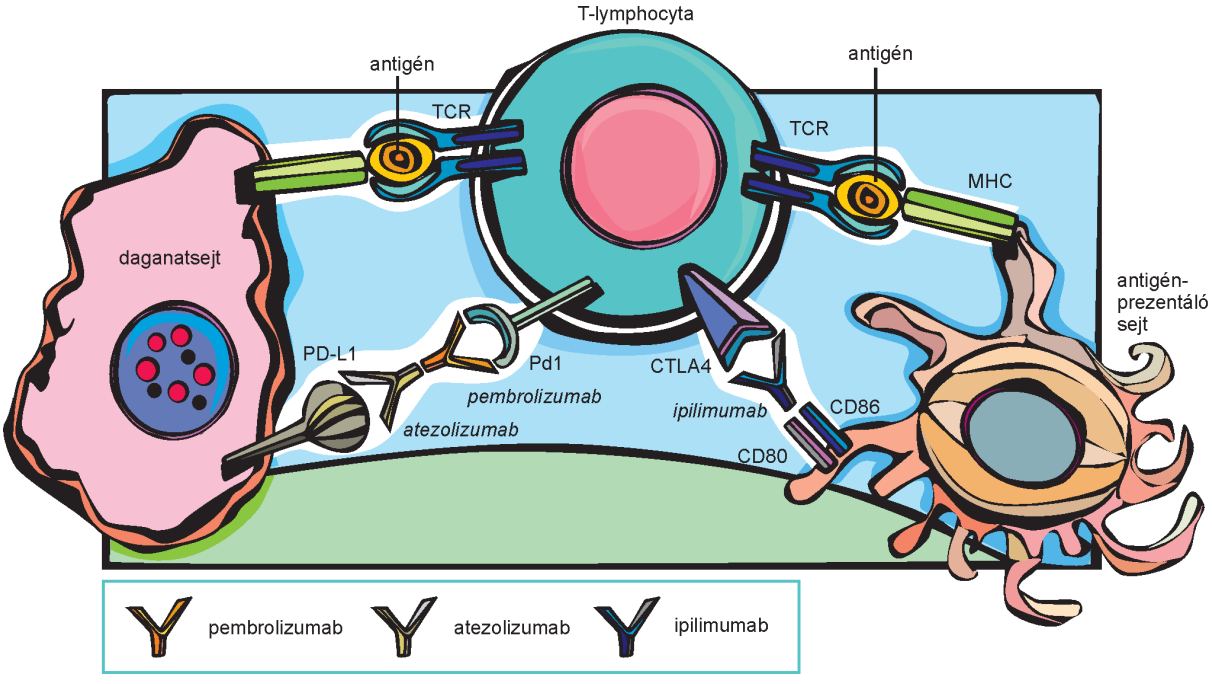
Az immunterápiák megjelenése óta a patológusok fontos feladata a kezelés hatásosságának előre jelzésére szolgáló prediktív markerek meghatározása. A kezdeti marker kutatások során a PD-L1 mennyiségi meghatározására összpontosítottak, később azonban a mikroszatellita instabilitás és legújabban a tumor mutációs terhelés (TMB, tumor mutational burden) is a mindennapi diagnosztika részévé vált. Jelen cikk célja, hogy az immuncheckpoint-gátlók működésének biológiai hátterét áttekintve összefoglaljuk a patológiai rutin diagnosztika módszertanát és annak esetleges buktatóit, valamit bemutassunk néhány a közeljövőben megjelenő újabb biomarkert.

Rövidítések

CPS	*Combined proportion score*
EMA	*European Medicines Agency*
FDA	*Food and Drug Administraion*
GEP	*T-cell inflamed gene expression profile*
IC	*Tumor infiltrating immune cells %*
MMR	*Mismatch repair*
NGS	*Next generation sequencing*
PD-L1	*Programmed death-ligand 1*
TC	*Tumor cell %*
TMB	*Tumor mutational burden*
TPS	*Tumor proportion score*
WES	*Whole exome sequencing*

Az immuncheckpoint-gátló gyógyszerek működésének biológiai háttere

Az immunsejtek fontos feladata az újonnan képződött daganatos szövet elpusztítása. A tumoros szövet eliminálásának első lépése, hogy az antigénprezentáló sejtek a tumoros sejtekből származó fehérjéket bemutatják az MHC receptorokon keresztül a T-sejt receptoroknak, melyek aktiválódnak, így pusztítva el a daganatos sejteket. Ezt a mechanizmust számtalan ko-receptor szabályozza, mely receptorok akár serkenthetik, illetve akár gátolhatják a fenti folyamatot, így az összes receptor hatásának eredője határozza meg az effektív immunválaszt.[1,2] A legismertebb inhibitor funkcióval rendelkező ko-receptor-ligand párok a



1. ábra: A daganatok eliminációjában szerepet játszó immunsejt-receptorok, valamint az ezeket gátló immuncheckpoint inhibitorok

CTLA4/CD86, valamint a PD1/PD-L1. Ezen gátló jelpályák immuntoleranciát alakítanak ki, így pl. a PD-L1-et hordozó daganatsejtek a tumor elleni T-sejtes választ blokkolják *(1. ábra)*, míg az antigénprezentáló sejtek PD-L1 expresszió is gátolja az effektor T-sejteket. Így a gátlás gátlása elven alapuló gyógyszerfejlesztések eredményeként ezen molekulák ma már a mindennapi rutinban használt immuncheckpoint-gátló gyógyszereink célpontjai.[3,4]

A daganatellenes immunválasz kiváltásában fontos szerepet játszanak a neoantigének, melyek megnövekedett mutációs terhelés hatására alakulnak ki. Minél nagyobb a mutációs terhelés egy daganatos szövetben, annál nagyobb valószínűséggel keletkeznek immunogén neoantigének a daganatos sejtek felszínén.[5] Azoknál a daganatoknál lehet várni megnövekedett mutációs terhelést, amelyek környezeti károsító ágensek idült expozíció hatására (pl. dohányzás, UV sugárzás) vagy a DNS hibajavító rendszerek (pl. mismatch fehérjék – MMR fehérjék, POLE) károsodása következtében alakulnak ki.[6]

Mikroszatellitáknak vagy „short-tandem repeat”-eknek olyan egy–hat bázishosszúságú szakaszokat nevezünk, melyek a gének nem kódoló, valamint kódoló régióiban egyaránt elhelyezkedhetnek. A DNS-polimeráz működése során fellépő hibák esetén a mutációk létrejötte kapcsán a mikroszatelliták hossza megváltozhat, és az MMR fehérjék szerepe ezen hibák korrekciója.[7] Négy fajta MMR fehérjét különítünk el, melyek heterodimer formában működő képesek: az MSH2 az MSH6-tal, míg az MLH1 a PMS2-vel képez heterodimert. A négy említett fehérjén túl mikroszatellita instabilitáshoz vezethet még az *EPCAM* gén mutációja is, mely az MSH2 expressziójának egyik szabályozó génje, és Lynch-szindrómás betegek egy része esetében ennek a génnek a funkcióvesztéssel járó mutációjával állunk szemben.[7,8]

PD-L1 immunhisztokémiai reakciók vizsgálatának módszertana

Kereskedelmi forgalomban több PD-L1 ellenes diagnosztikus antitest érhető el, melyeket a különböző gyógyszerek számos klinikai vizsgálatába vontak be. Az egyes ellenanyagok legfontosabb tulajdonságait az *1. táblázat* foglalja össze.

A PD-L1 immunhisztokémiai (IHC) tesztek első lépéseként meg kell vizsgálni a beküldött minta alkalmasságát. A minimális diagnosztikus pontossághoz általában legalább 100 (az SP142 esetében 50) viábilis daganatsejtet tartalmazó hagyományos, paraffinba ágyazott szövettani blokk vagy citológiai mintából készült sejtblokk szükséges. A jelenleg használt diagnosztikus IHC kit-ek keneteken nem alkalmazhatók. A másik fontos preanalitikai szempont, hogy az anyag

1. táblázat: Kereskedelmi forgalomban kapható PD-L1 antitestek és előhívórendszereik gyártó és gyógyszer típus szerint

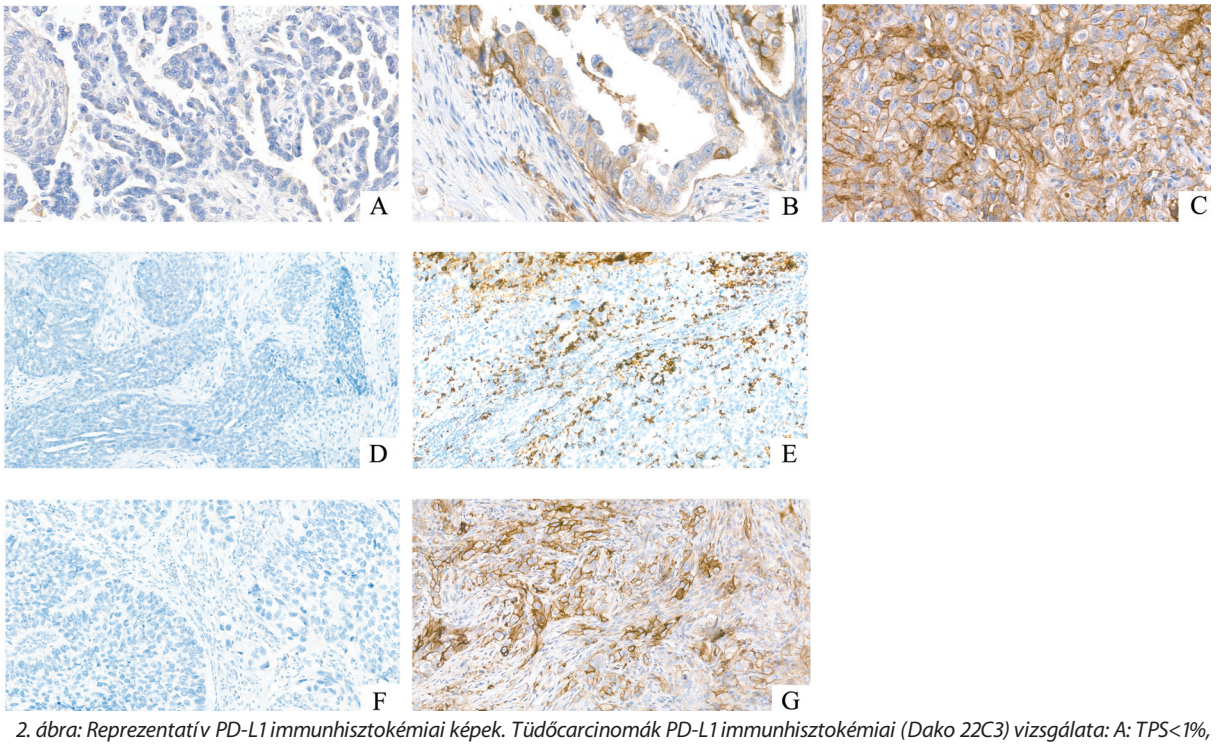
PRIMER ANTITEST KLÓNJA	PRIMER ANTITEST TÍPUSA	PD-L1 EPITÓP	ELŐHÍVÓ RENDSZER GYÁRTÓJA	HATÓANYAG
22C3	nyúl, monoklonális	ECM	Agilent (Dako)	pembrolizumab (Keytruda, MSD)
28-8	egér, monoklonális	ECM	Agilent (Dako)	nivolumab (Opdivo, BMS)
SP142	nyúl, monoklonális	ICM	Ventana	atezolizumab (Tecentriq, Roche)
SP263	nyúl, monoklonális	ICM	Ventana	durvalumab (Imfinzi, AstraZeneca)
73-10	nyúl, monoklonális	ICM	Agilent (Dako)	avelumab (Bavencio, Merck)

dekalcinálva volt-e. Minthogy számos daganat (pl. tüdő vagy emlő) csontáttét kapcsán kerül diagnosztizálásra, így az első elérhető szövettani minta is csontból származik. A feldolgozáshoz azonban elengedhetetlen az anyagból a mész eltávolítása, mivel enélkül a csontszövet metszetkészítéshez túl kemény. Dekalcináció céljára leggyakrabban a kelátképző EDTA vagy különböző savak használatosak, mely anyagok alkalmazása az ellenanyag által vizsgálni kívánt epitópot tönkreteheti. Kutatások kimutatták, hogy az EDTA kevésbé gyengíti a jelet, mint a sav tartalmú oldatok, azonban a pozitív daganatos sejtek arányának csökkenése EDTA esetén is megfigyelhető volt.[9] Ez a jelenség azért lényeges, mert azon betegek esetében, akiknek PD-L1 meghatározása egyéb szövettani minta hiányában más anyagból nem lehetséges, preanalitkai okok miatt álnegatív eredményt kaphatunk, mely a kezelés elmaradását eredményezheti.

Az egyes daganattípusok diagnosztikájához kapcsolt különböző ellenanyagok esetében eltérő kiértékelési szempontokat és score értéket kell megadni az adott terápia alkalmazásához. A PD-L1 értékek meghatározása során TPS (tumor proportion score), CPS (combined proportion score), TC (tumor cell %) és IC (tumor infiltrating immune cells %) adhatók meg. A TPS- és TC-érték esetén a PD-L1-pozitív daganatsejtek százalékos arányát adjuk meg az összes tumorsejt viszonylatában, míg CPS esetében a PD-L1-pozitív tumorsejtek és mononuclearis immunsejtek arányát a tumorsejtek függvényében.[10,11] Az IC-érték során a tumor stromájában PD-L1-pozitív reakciót mutató immunsejtek arányát adjuk meg tumoros szövet területére vetítve.[10,12]

Az egyes antitestek analitikai pontosságát több vizsgálat keretében is összehasonlították, melyek igazolták, hogy az egyes előhívási metodikák és a különféle diagnosztikus antitestek segítségével kapott eredmények a legtöbb esetben jó egyezést mutatnak, azonban nem minden score rendszer vizsgálatában találtak maradéktalan azonosságot, így a betegellátás kapcsán a legnagyobb prediktív haszonnal akkor járhatunk el, ha az adott indikációs körben a klinikai vizsgálat során használt, gyártói ajánlású ellenanyagot és pontrendszert használunk.[1, 13]

A Semmelweis Egyetem (SE) patológiai intézetei a PD-L1 diagnosztikai indikációs kör teljes spektrumának vizsgálatát nagy esetszámmal végzik. Az I. Sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézetben 2017. januártól 2020. júniusig terjedő időszakban összesen 2011 értékelhető vizsgálat történt a Dako 22C3 PD-L1 antitest felhasználásával. Az igénynövekedést jól mutatja, hogy míg 2017 elején havonta átlagosan 10–12 ilyen vizsgálatkérés érkezett, 2020-ban már átlagosan havi 80–90 PD-L1 immunhisztokémiai vizsgálatra került sor, melyeknek 94%-a tüdődaganatokból történt. Összegezve elmondható, hogy a vizsgált időszakban a Dako 22C3 antitesttel végzett vizsgálatok alapján a negatív (<1%), az 1–50% és az 50% feletti TPS csoportok közötti megoszlás a tüdőcarcinomák esetén 38–32–30% volt. A II. Sz. Patológiai Intézetben hasonló időszakban összesen 197 értékelhető PD-L1 vizsgálat történt, 22C3 antitesttel 54 NSCLC tüdőrák PD-L1 státusza került meghatározásra, melyekben a negatív (<1%), az 1–50% és az 50% feletti TPS csoportok megoszlása hasonló volt: 44–26–30%. Összességében elmondható, hogy mindkét intézetben a beküldött minták legalább 70%-ában sikerült terápiás konzekvenciával járó PD-L1-expressziót kimutatni. A két intézetben elvégzett urothelialis rákok esetében 17-ből 10 bizonyult pozitívnak CPS≥10 kritérium alapján, a fej-nyaki laphámrákokban



2. ábra: Reprezentatív PD-L1 immunhisztokémiai képek. Tüdőcarcinomák PD-L1 immunhisztokémiai (Dako 22C3) vizsgálata: A: TPS<1%, B: TPS 1-50%, C: TPS≥50%. Tripla negatív emlőcarcinomák PD-L1 immunhisztokémiai (Ventana SP142) vizsgálata: D: IC<1, E: IC≥1. Urothelialis carcinomák PD-L1 immunhisztokémiai (Dako 22C3) vizsgálata: F: CPS<10, G: CPS≥10

10-ből 5 eset volt CPS≥1 (elsővonalbeli kezelés) vagy TPS≥50% (másodvonal) szempontjából pozitív.

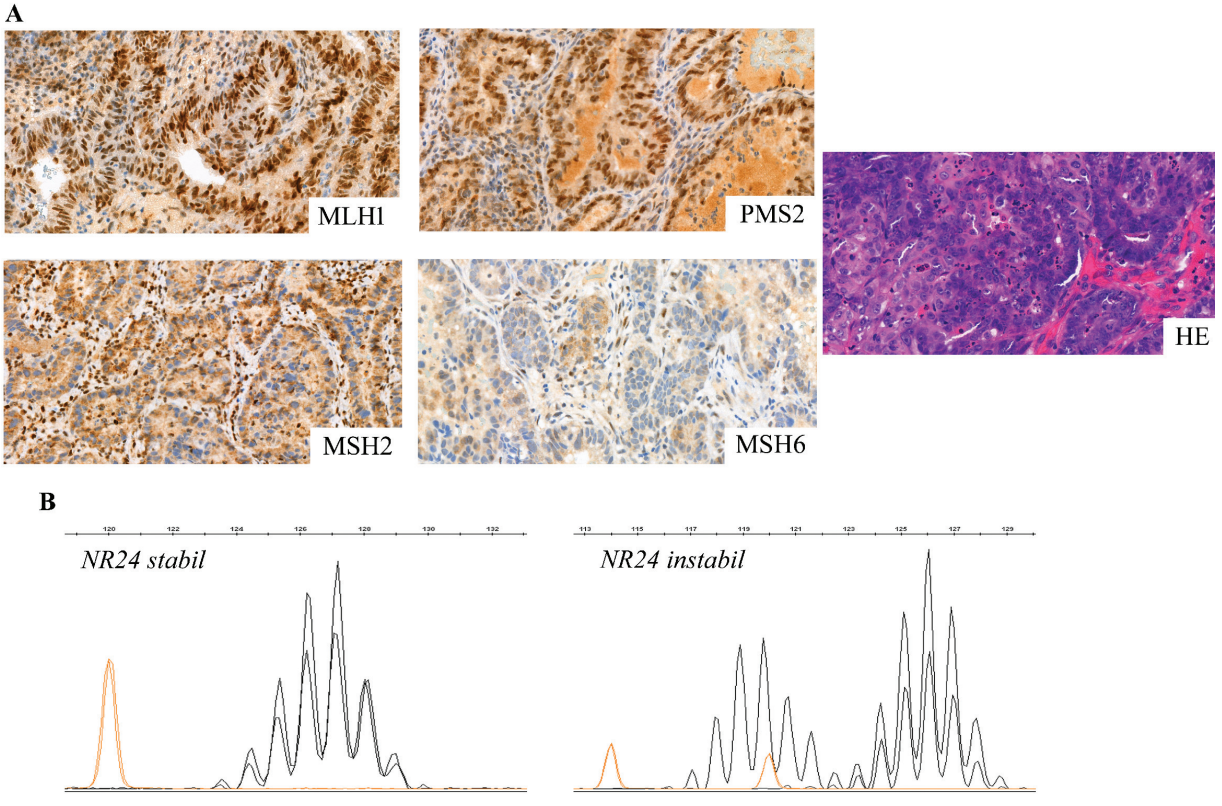
Mindkét intézetben a Dako 22C3 mellett elérhető a Ventana SP142 ellenanyag is, melyet elsősorban az urothelialis carcinoma és tripla negatív emlőrákok diagnosztikájában használunk az atezolizumab kezelésre adott prediktív markerként. Emlőcarcinomában PD-L1 vizsgálatot 2019 júniusa óta végzünk, mely idő alatt a két intézetben összesen 78 értékelhető vizsgálatot sikerült elvégezni. A kezelési diagnosztikus határt (IC≥1%) elérő expressziót az összes esetet tekintve 41,5%-ban tudtunk kimutatni, a két intézetben igen hasonló 40% és 43%-os arányban. A két intézet laboratóriumától összesen 23 esetben kértek urothelialis carcinomából SP142 PD-L1 meghatározást, melyekből 4 bizonyult IC >5% kritérium alapján pozitívnak.

A tüdő, emlő, valamint urothelialis daganatokból készült PD-L1 immunhisztokémiai reprezentatív ábráit lásd a *2. ábrában*.

Az előzőekben bemutatott, európai (EMA) törzskönyvezéssel bíró terápiák prediktív diagnosztikája mellett egyedi méltányossági kérelem alapján is számos PD-L1 expressziós vizsgálatot indikálnak az onkológusok, elsősorban az amerikai (FDA) jóváhagyással rendelkező daganatfajták esetében. Így a II. Sz. Patológiai Intézetben 22 colorectalis adenocarcinoma (2 pozitív TPS≥5% alapján), 12 gyomor adenocarcinoma (6 pozitív CPS≥1 alapján), 8 nyelőcső laphámrák (3 pozitív CPS≥10 alapján), 3 méhnyakrák (2 pozitív CPS≥1 alapján) vizsgálata mellett többek között melanomák, mesotheliomák, pancreas, ovarium, duodenum, endometrium adenocarcinomák, cholangio- és adrenocorticalis carcinomák esetében kértek PD-L1 vizsgálatot. Az I. Sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézetben a hasonló szövettani entitások mellett lágyrész- és csonttumorok széles spektrumából kértek PD-L1 vizsgálatot összesen 15 esetben, melyek közül nagymértékű pozitivitással egyetlen osteoblastos osteosarcoma esetén találkoztunk (CPS 60).

Mikroszatellita instabilitás vizsgálatának módszertana

A mikroszatellita instabilitás vizsgálatának a szolid tumorok esetében jelenleg három metodikai megközelítése lehetséges, mely eltérő árköltséggel és technikai feltételekkel jár. A mikroszatelliták vizsgálata régebben a Lynch-szindrómás esetek kiszűrése miatt volt fontos, azonban az FDA 2017. május 23-án elsőként szövetag-



3. ábra: ***A:*** *Mikroszatellita immunhisztokémiai vizsgálatok endometrioid carcinoma mintából. Megtartott MLH1 és PMS2 immunhisztokémiai reakciók mellett kiesett MSH2 és MSH6 magi reakciók láthatók.* ***B:*** *Mikroszatellita fragment vizsgálat során az NR24 reakció stabilitása esetén a normál szövetével megegyező fragmenthosszok detektálhatók, míg instabilitás esetén azoktól eltérő hossz figyelhető meg.*

nosztikus terápiaként engedélyezte a pembrolizumab terápia alkalmazását mikroszatellita instabil felnőtt és gyermek betegek esetében nem rezekálható, illetve metasztatikus daganatok esetében. A FDA további kísérődiagnosztika fejlesztéséhez nem kötötte az engedély megadását, mivel a mikroszatelliták vizsgálata a genetikai vizsgálatok kapcsán már megbízható módszertannal rendelkezett.[14]

A legkönnyebben és leggyorsabban elvégezhető vizsgálat a négy MMR fehérje immunhisztokémiai vizsgálata. A megőrzött MMR expresszió jeleként a négy fehérje sejtmagi pozitivitását várjuk, melynek értékelésében segítségünkre van a környező ép sejtek magjában belső pozitív kontrollként megjelenő reakció is *(3A ábra)* pozitivitása a daganatsejtekben nem detektálható, a heterodimer párok figyelembevételével az érintett fehérje alapján következtethetünk az érintett génre *(2. táblázat)*. Ha mindegyik fehérje megtartott magi pozitivitást mutat, akkor nagy valószínűséggel mikroszatellita stabil a daganatos szövet.[15] Előfordulhat az esetek kis részében, hogy a fehérjét kódoló génben olyan mutáció van, mely során a fehérje az immunogenitását megőrzi, tehát immunhisztokémiai reakcióval kimutatható, azonban funkcióját nem tudja ellátni.[7] Az immunreakciók kiértékelése azonban még ettől eltekintve sem nem mindig könnyű feladat. Egyrészt előfordulhatnak álnegatív esetek, főleg az MSH6 immunhisztokémiai reakció esetében, különösen, ha a daganat kemoirradatiot követően kerül vizsgálatra.[8,15] Amennyiben citoplazmatikus reakciót tapasztalunk magi reakció nélkül, azt elsősorban a fehérje magi transzportjának elmaradásával lehetne magyarázni, azonban ilyen esetekben a PCR reakció során a minta általában mikroszatellita stabilnak bizonyul,[8] ami elsősorban a nem megfelelő preanalitikai kezelés miatti aspecifikus antitestkötődés szerepét veti fel a citoplazmatikus pozitivitás hátterében. Ez is mutatja, hogy az immunhisztokémiai vizsgálatokkal talán a legnagyobb gondot a minták megfelelő fixáltsága, illetve annak hiánya okozza. A mikroszatellita immunhisztokémiai vizsgálatok során erősebb és megbízhatóbb reakciók várhatóak biopsziás mintákból, mint műtéti rezekátumokból.[8]

Lehetséges a mikroszatellita instabilitást PCR vizsgálattal is kimutatni, mely során az amplifikált mikroszatellita szakaszok hosszát vizsgáljuk elektroforézis-

sel vagy liquid kromatográfiás vizsgálattal. A mikroszatelliták PCR vizsgálata esetén lehetséges az ún. Bethesda-panel használata, mely során 2 mononukleotid és 3 dinukloetidot vizsgálunk, vagy alkalmazható a Promega cég által forgalmazott panel, mely során 5 mononukleotidot és 2 pentanukleotidot vizsgálunk. A fragmentek méretét a beteg normál szövetének mikroszatellita fragmentjével hasonlítjuk össze, mely lehet a betegtől származó vérminta vagy normál szövetet tartalmazó paraffinos blokk *(3B ábra)*.[16] A Bethesda és a Promega rendszerek esetén legalább két lókuszon talált eltérés esetén a tumort MSI-H (microsatellite instability-high) csoportba, míg egy lókuszon megfigyelt instabilitás esetén a daganat MSI-L (microsatellite instability-low) csoportba soroljuk. Amennyiben egyetlen lókuszon sem látható eltérés, akkor a daganat mikroszatellita stabilnak tekinthető (MSS).[17]

A Bethesda-panelek alkalmazását elsőként a vastagbéldaganatokra fejlesztették ki, így figyelembe kell venni annak korlátait is, amikor más daganatok esetén alkalmazzuk. Az immunhisztokémiai és a PCR vizsgálatok közötti legnagyobb korreláció a colorectalis daganatok esetén figyelhető meg (98%). Az endometrioid carcinomák esetén a konkordancia valamennyivel kisebb, kb. 94%. Diszkonkordancia főleg MSH6 és MSH2 kiesés esetén fordulhat elő.[18] *Kuismanen és munkatársai* Lynch-szindrómában szenvedő betegek colon- és endometriumcarcinomáit vetették össze, melynek vizsgálata során a páciensek endometrium daganatai esetében rövidebb „shift”-et tapasztaltak, mely a fragmentanalízis vizsgálatát megnehezítheti.[19] Az eredmények lehetséges eltérő volta miatt ha endometrioid carcinoma esetén a mikroszatellita instabilitás immunhisztokémiai vizsgálattal történő kiesését sikerül kimutatni, de a fragmentanalízis azt nem erősítette meg, érdemes újgenerációs szekvenálást végeztetni.

A harmadik megközelítés a mikroszatellita instabilitás meghatározása újgenerációs szekvenálással (NGS, next generation sequencing). A PCR fragment vizsgálatokkal ellentétben az NGS vizsgálat esetén akár száz különböző mikroszatellita összehasonlítására is mód van, melyek lehetnek mono-, di-, tri-, tetra- és pentamerek egyaránt. A bioinformatikai analízis során a mikroszatellita ismétlődések „read” hosszai általában a beteg normál szövetében (pl. nem-daganatos, tumor környéki szövet vagy vérminta) található mikroszatelliták hosszával vetik össze, vagy meglévő mikroszatellita adatbázisok alapján elemzik. Ezekhez olyan publikált és szabadon elérhető analitikai algoritmusok is rendelkezésre állnak, mint az mSINGS, az MSIsensor és a MANTIS.[18]

A mikroszatellita instabilitásának gyakorisága az egyes daganatokban eltérő lehet, de akár egyes populációkban ugyanazon daganat típusban sem biztosan mutatkozik ugyanolyan gyakoriság. A nemzetközi irodalmi adatok alapján gyakoribb az instabilitás endometrialis és colorectalis carcinomákban, míg pl. az osteosarcomák esetében gyakorlatilag nem találunk instabil daganatokat.[7] Áttekintve az SE I. Sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézetben 2018 júniusa és 2020 júniusa között elvégzett összesen 418 mikroszatellita vizsgálatot elmondható, hogy mikroszatellita instabilitás legnagyobb arányban a vékonybélre lokalizálódó adenocarcinomák esetén volt megfigyelhető (67%), melyet az endometrioid típusú endometriumcarcinomák követtek 33%-ban. Nagyobb arányban fordult még elő mikroszatellia instabilitás gyomor és colorectalis adenocarcinomákban (20 és 17%). A II. Sz. Patológiai Intézetben 434 MMR vizsgálatból 118 esetben volt mikroszatellita-instabilitásra utaló expresszió kiesés. A 292 colorectalis adenocarcinoma esetében 71 (24%), míg a 23 endometrialis rákból 12 (52%), továbbá a megvizsgált 11 gyomorrákból 4, a 10 pancreasrákból 2 bizonyult instabil fenotípusúnak, és mindkét vizsgált Vater-papilla adenocarcinoma esetében is instabilitásra utaló kiesés volt észlelhető, ami az I. Sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet adataival jó egyezést mutat. Több vizsgált daganattípus (pl. hepatocellularis carcinoma) esetén nem találtunk mikroszatellita-instabil esetet, mely magyarázható az alacsony esetszámmal, azonban populációs sajátságokkal is állhatnak a háttérben. Egy japán tanulmányban 55 hepatocellularis carcinomás beteg mintáját vizsgálva igen alacsony mikroszatellia instabilitási arányt sikerült igazolniuk, hasonlóan az intézeteinkben végzett vizsgálatokkal.[20]

Tumor mutációs terhelés (TMB, tumor mutational burden) vizsgálatának nehézségei

A tumor mutációs terhelés vizsgálata az immuncheckpoint-gátlók biomarkerei közül az egyik legújabb eszköz. Legfontosabb aktualitását az adja, hogy 2020. június 16-án az FDA szövetagnosztikus indikációban engedélyezte a pembrolizumab alkalmazását magas tumor mutációs terheléssel bíró, nem rezekálható vagy metasztatikus felnőtt és gyerekkori tumorok kezelésére, korábbi terápiás lehetőségeket kimerítő esetekben.

A tumor mutációs terhelést a tumoros szövet DNS-ében vizsgált mutációk megjelenésének arányaként lehetne definiálni, azonban az egyszerűnek tűnő megfogalmazás az egyes vizsgálati metodikák és platformok esetében részletekbe menően már korántsem jelenti ugyanazt a fogalmat. A TMB arany standardjának a teljes exomszekvenálás (WES, whole exome sequencing) tekinthető, mely során kb. 20 000 gént vizsgálnak meg, és ideális esetben a beteg saját normál mintájával vetik össze a kapott eredményeket, mely során a missense mutációkat veszik figyelembe.[21] Tekintettel azonban arra, hogy a WES egy igen költséges és időigényes vizsgálati metodika, jelenleg rutin diagnosztikában való alkalmazása nem életszerű, így a TMB meghatározására kisebb, néhány száz gént tartalmazó NGS paneleket használunk. Ilyen panelek közül kereskedelmi forgalomban kapható egyebek mellett a Roche FoundationOne (F1CDx), a Memorial Sloan Kettering (MSK-IMPACT) és az Illumina TruSight Oncology (TSO-500). Az F1CDx esetében 342, a daganatok biológiájában releváns gént vizsgálnak (kb. 0,8 megabázis vizsgált DNS tartalommal), melyben a kódoló missense mutáció mellett az inzercióval/delécióval járó (indel) mutációk jelenlétét is meghatározzák megabázis (Mb) párra viszonyítva. Az MSK-IMPACT rendszer 468 gént vizsgál, összesen 1,22 Mb szakaszt felölelve, mely szakaszokban a missense mutációk arányát határozzák meg egy megabázisra vetítve. Míg a Foundation Medicine platformja normál szöveti referenciaként adatbázisokat használ, addig az MSK vizsgálatok során általában a beteg saját referenciamintájával hasonlítják össze a kapott értékeket. Amennyiben az adott platformban a beteg saját referenciamintájával történik az összehasonlítás, úgy csökkenthető az álpozitív mutációk meghatározása, azonban ez nyilvánvalóan jelentős költségnövekedéssel jár.[21,22] Az Illumina Trusight 500-as paneljében 523 gént és 1,9 Mb DNS-t vizsgálva a TMB számításba a kódoló régióban fellelhető SNV-k mellett az indel eltéréseket is figyelembe veszik. *Mankor és munkatársai* megvizsgálták a WES és 7 különböző NGS panel által adott TMB eredményt, és akár 20–30%-os különbség is megfigyelhető volt az egyes platformok között, mely rávilágít az egyes assay-k közötti eltérő klasszifikációk okozta zavarokra. Ezen eltérések miatt szükséges lenne az egyes platformok közötti harmonizáció nemcsak a TMB definíció meghatározása tekintetében, hanem az egyes daganatokban alkalmazott határok megadásakor.[23,24] További gondot jelenthet, hogy minél kisebb NGS panelt alkalmazunk, annál nagyobb esélye van, hogy a TMB értéket túl- vagy alábecsüljük.[21] A TMB leggyakrabban alkalmazott definíciói a gének amplifikációit nem veszik figyelembe, mely jelenség a CD2.74 és PDCD.2LG4 gének esetén ismerten fogékonnyá teszi a Hodgkin-lymphomás és a mediastinalis nagy B-sejtes lymphomában szenvedő betegeket az immuncheckpoint-gátlókra.[22]

A TMB alkalmazása során figyelembe kell venni azt is, hogy a szomatikus mutációknak csak kis része fog majd olyan antigént eredményezni, mely az MHC receptorokon való megjelenéssel valódi immunogén választ képes létrehozni. Természetesen minél nagyobb a tumor mutációs terhelés annál nagyobb valószínűséggel képződnek immunogén hatással rendelkező neoantigének.[21] A képződött neoantigének minősége és immunogenitása is fontos szempont. Ismert, hogy a Merkel-sejtes carcinomák polyomavírussal asszociált csoportja kifejezetten jól reagál az immuncheckpoint-gátlóra, habár TMB arányuk inkább a közepes csoportba tartozik.[25,26]

Összességében elmondható, hogy a TMB valószínűleg inkább más prediktív markerekkel együtt fogja legjobban megjósolni az egyes daganatok immuncheckpoint-gátlókra adott válaszát.[27]

Egyéb, kutatások tárgyát képző prediktív markerek

T-sejt gén expressziós profil (GEP, T-cell inflamed gene expression profile)

A GEP 18 gén expressziós profilját jelenti és a daganatok stromájában lévő T-sejtek aktivációját hivatott meghatározni. A 18 gén kiválasztásának alapját az adta, hogy az tumorok kiváltását segítő hatások (pl. UV vagy dohányzás) hatására IFN-γ képződik, mely T-és NK-sejtek aktivációja mellett fokozza a PD-L1 expresszióját, ezzel gátolja az immunrendszer tumor elleni védekezését.[28] A GEP meghatározását RNS-alapú vizsgálattal a Nanostring nCounter platformon végezik, mely során olyan gének expresszióját vizsgálják, mint a LAG3, az IDO1 vagy különböző kemokin ligandok (pl. CXCL10, CXCL9).[28]

A Keynote-028-as vizsgálat során 20 különböző daganatban határozták meg a PD-L1 immunhisztokémiai, TMB és GEP értékeket. Ezen biomarkerek egymástól függetlenül, illetve kombinációban is jól korreláltak a pembrolizumab terápia eredményességével. További kutatások tárgya azonban, hogy az egyes biomarkerek milyen kombinációban alkalmazva milyen határérté-

kek mellett adják a legjobb predikciót a kezelés hatásosságára.[29]

PD-L2 immunhisztokémiai marker

A PD1 legismertebb ligandja a PD-L1, azonban hasonló immungátló hatás figyelhető meg a PD-L2 liganddal való kapcsolódása során is. A PD-L2 immunhisztokémiai kimutatása során nagyfokú ko-lokalizációt tapasztaltak a PD-L1-gyel mind a daganatos, mind a stromalis sejtek esetében és kevés daganatos sejt felszínén expresszálódott PD-L2 a PD-L1-negatív esetekben. Fej-nyaki laphámrákokat vizsgálva magasabb PD-L2 expresszió esetén jobb progressziómentes túlélés volt megfigyelhető, azonban a vizsgálat során a legjobb határértéket nem sikerült kiválasztani, az mindenképpen további vizsgálatok tárgyát képezi.[30]

Összefoglalva elmondható, hogy az immun-checkpoint-gátló kezelésekkel egy új fejezet vette kezdetét az onkológiában, amely számos, korábban nem, vagy csak nehezen gyógyítható daganatfajta hatásos kezeléséhez fog hozzájárulni. Azonban ehhez a prediktív diagnosztika fejlesztése és napi gyakorlatának precíz művelése elengedhetetlen, ami ismételten felhívja a figyelmet a patológia és a molekuláris patológia diagnosztikus és tudományos jelentőségére. A két patológiai intézet munkatársai eltökéltek abban, hogy az újabb és újabb prediktív markerek kimutatása az elérhető rutin diagnosztika részét képezze, ezzel segítve a klinikus kollégákat és a betegeket a legjobb terápia megválasztásában.

Irodalom

1. Lotz G, Smuk G, Kocsmár É, Kocsmár I and Tímár J. [Predictive diagnostics of the programmed cell death receptor 1 (PD-1) - programmed cell death ligand 1 (PD-L1) inhibitory therapies]. Magyar onkologia 2019; 63:183-91.
2. Seliger B. Basis of PD1/PD-L1 Therapies. J Clin Med 2019; 8:2168.
3. Mahoney KM, Rennert PD and Freeman GJ. Combination cancer immunotherapy and new immunomodulatory targets. Nat Rev Drug Discov 2015; 14:561-584.
4. Topalian SL, Taube JM, Anders RA and Pardoll DM. Mechanism-driven biomarkers to guide immune checkpoint blockade in cancer therapy. Nature reviews. Cancer 2016; 16:275-87.
5. Tunger A, Sommer U, Wehner R, Kubasch AS, Grimm MO, Bachmann MP, et al. The Evolving Landscape of Biomarkers for Anti-PD-1 or Anti-PD-L1 Therapy. J Clin Med 2019; 8:1534.
6. Naboush A, Roman CA and Shapira I. Immune checkpoint inhibitors in malignancies with mismatch repair deficiency: a review of the state of the current knowledge. J Investig Med 2017; 65:754-58.
7. Dudley JC, Lin MT, Le DT and Eshleman JR. Microsatellite Instability as a Biomarker for PD-1 Blockade. Clin Cancer Res 2016; 22:813-820
8. Richman S. Deficient mismatch repair: Read all about it (Review). Int J Oncol 2015; 47:1189-202.
9. Forest F, Cote G, Laville D, Da Cruz V, Dal Col P, Camy F, et al. Impact of delayed fixation and decalcification on PD-L1 expression: a comparison of two clones. Virchows Arch 2019; 475:693-9.
10. Schildhaus HU. [Predictive value of PD-L1 diagnostics]. Pathologe 2018; 39:498-519.
11. Roach C, Zhang N, Corigliano E, Jansson M, Toland G, Ponto G, et al. Development of a Companion Diagnostic PD-L1 Immunohistochemistry Assay for Pembrolizumab Therapy in Non-Small-cell Lung Cancer. Appl Immunohistochem Mol Morphol 2016; 24:392-7.
12. Herbst RS, Soria JC, Kowanetz M, Fine GD, Hamid O, Gordon MS, et al. Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients. Nature 2014; 515:563-7.
13. Tsao MS, Kerr KM, Kockx M, Beasley MB, Borczuk AC, Botling J, et al. PD-L1 Immunohistochemistry Comparability Study in Real-Life Clinical Samples: Results of Blueprint Phase 2 Project. J Thorac Oncol 2018; 13:1302-11.
14. Marcus L, Lemery SJ, Keegan P, Pazdur R. FDA Approval Summary: Pembrolizumab for the Treatment of Microsatellite Instability-High Solid Tumors. Clin Cancer Res 2019; 25:3753-8.
15. Caldés T, Godino J, Sanchez A, Corbacho C, De la Hoya M, Lopez Asenjo J, et al. Immunohistochemistry and microsatellite instability testing for selecting MLH1, MSH2 and MSH6 mutation carriers in hereditary non-polyposis colorectal cancer. Oncol Rep 2004; 12:621-629
16. Xicola RM, Llor X, Pons E, Castells A, Alenda C, Piñol V, et al. Performance of different microsatellite marker panels for detection of mismatch repair-deficient colorectal tumors. J Natl Cancer Inst 2007; 99:244-52.
17. Murphy KM, Zhang S, Geiger T, Hafez MJ, Bacher J, Berg KD, et al. Comparison of the microsatellite instability analysis system and the Bethesda panel for the determination of microsatellite instability in colorectal cancers. J Mol Diagn 2006; 8:305-11.
18. Dietmaier W, Büttner R and Rüschoff J. [Microsatellite instability: Review of methods and applications]. Pathologe 2019; 40:313-27.
19. Kuismanen SA, Moisio AL, Schweizer P, Truninger K, Salovaara R, Arola J, et al. Endometrial and colorectal tumors from patients with hereditary nonpolyposis colon cancer display different patterns of microsatellite instability. Am J Pathol 2002; 160:1953-8.
20. Yamamoto H, Itoh F, Fukushima H, Kaneto H, Sasaki S, Ohmura T, et al. Infrequent widespread microsatellite instability in hepatocellular carcinomas. Int J Oncol 2000; 16:543-7.
21. Chan TA, Yarchoan M, Jaffee E, Swanton C, Quezada SA, Stenzinger A, et al. Development of tumor mutation burden as an immunotherapy biomarker: utility for the

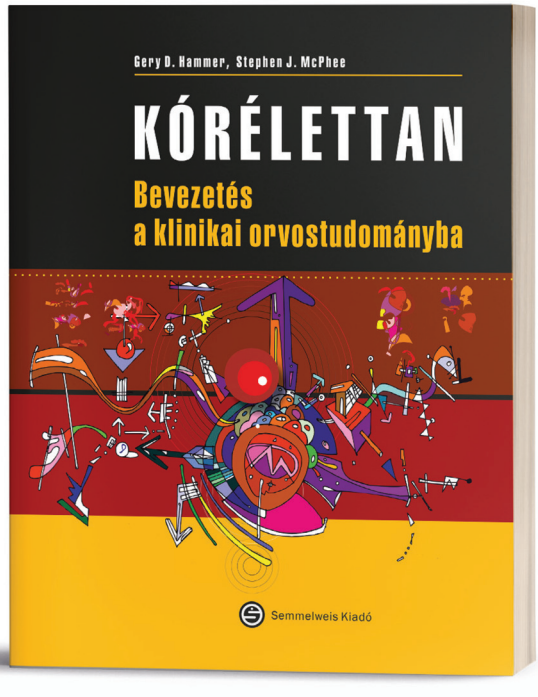
oncology clinic. Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology 2019; 30:44-56.

22. Sholl LM, Hirsch FR, Hwang D, Botling J, Lopez-Rios F, Bubendorf L, et al. The Promises and Challenges of Tumor Mutation Burden as an Immunotherapy Biomarker: A Perspective from the International Association for the Study of Lung Cancer Pathology Committee. J Thorac Oncol 2020; 1409-1424.
23. McNamara MG, Jacobs T, Lamarca A, Hubner RA, Valle JW and Amir E. Impact of high tumor mutational burden in solid tumors and challenges for biomarker application. Cancer treatment reviews 2020; 89:102084.
24. Mankor JM, Paats MS, Groenendijk FH, Roepman P, Dinjens WNM, Dubbink HJ, et al. Impact of panel design and cut-off on tumour mutational burden assessment in metastatic solid tumour samples. British journal of cancer 2020; 122:953-6.
25. Goh G, Walradt T, Markarov V, Blom A, Riaz N, Doumani R, et al. Mutational landscape of MCPyV-positive and MCPyV-negative Merkel cell carcinomas with implications for immunotherapy. Oncotarget 2016; 7:3403-15.
26. Yarchoan M, Hopkins A and Jaffee EM. Tumor Mutational Burden and Response Rate to PD-1 Inhibition. The New England journal of medicine 2017; 377:2500-01.
27. Goto Y. Tumor Mutation Burden: Is It Ready for the Clinic? Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology 2018; 36:2978-9.
28. Ayers M, Lunceford J, Nebozhyn M, Murphy E, Loboda A, Kaufman DR, et al. IFN-β-related mRNA profile predicts clinical response to PD-1 blockade. The Journal of clinical investigation 2017; 127:2930-40.
29. Ott PA, Bang YJ, Piha-Paul SA, Razak ARA, Bennouna J, Soria JC, et al. T-Cell-Inflamed Gene-Expression Profile, Programmed Death Ligand 1 Expression, and Tumor Mutational Burden Predict Efficacy in Patients Treated With Pembrolizumab Across 20 Cancers: KEYNOTE-028. Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology 2019; 37:318-27.
30. Yearley JH, Gibson C, Yu N, Moon C, Murphy E, Juco J, et al. PD-L2 Expression in Human Tumors: Relevance to Anti-PD-1 Therapy in Cancer. Clin Cancer Res 2017; 23:3158-67.

SEMMELWEIS KIADÓ SZAK- ÉS TANKÖNYVEI

Élettan/Kórélettan

Könyveink megvásárolhatók a Legendus Könyvesboltban, illetve a Líra Kereskedelmi hálózaton belül az egész országban, de egyre nagyobb igényt elégít ki webshopunk.



Gary D . Hammer, Stephen J. McPhee

KÓRÉLETTAN

Bevezetés a klinikai orvostudományba

A Kórélettan című könyv nemcsak a preklinikai tanulmányokkal birkózó orvos-, fogorvos-, és gyógyszerész-hallgatók számára jelent megkerülhetetlen forrást, hanem egyéb egészségügyi képzésekben is, amelyekben élettani/kórélettani tematikák szerepelnek, például a diplomás ápolók, a mentőtisztek, a dietetikusok, a gyógytornász-fizioterapeuták, a szülésznők, a védőnők, a laboratóriumi analitikusok képzése. A könyvet forrásként használók nemcsak rácsodákozhatnak gyakori betegségek váratlan ok-okozati összefüggéseire, hanem a logikus és patomechanizmus alapú betegség-klasszifikációkkal könnyebben rögzíthetnek alapvető kórélettani összefüggéseket.

- 20 esettanumány kérdésekkel és részletes, új információt is tartalmazó magyarázó megoldásokkal
- Gazdagon illusztrált, jól áttekinthető ábrák, összefoglaló táblázatok
- Szakasz-záró „Ellenőrző kérdések”
- Aktualizált szakirodalmi hivatkozások

800 oldal ■ Ára: 13 000 Ft

Könyvek E-könyvek Folyóiratok Apropó Poszter Box

Semmelweis Kiadó
1089 Budapest, Nagyvárad tér 4.
www.semmelweiskiado.hu

LEGENDUS KÖNYVESBOLT
1089 Budapest, Nagyvárad tér 4.
Tel.: 210-4408, 459-1500/56353
Nyitva tartás: H–Sz: 9.00–16.00,
Cs: 9.00–18.00, P: 9.00–14.00
E-mail: info@semmelweiskiado.hu

A tumorszövet metabolikus heterogenitása – anyagcsere-változások vizsgálati lehetőségei és jelentősége a daganatbiológiában

Metabolic heterogeneity in malignant tissues – the importance of bioenergetic alternatives in tumour biology

Sebestyén Anna[1], Petővári Gábor[1], Dankó Titanilla[1], Sztankovics Dániel[1], Vetlényi Enikő[1], Khoor András[2], Jeney András[1], Krencz Ildikó[1], Pápay Judit[1]

[1] I. Sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet, Semmelweis Egyetem, Budapest

[2] Laboratóriumi Medicina és Patológia Osztály, Mayo Klinika, Jacksonville, USA

E-levél: sebestyen.anna@med.semmelweis-univ.hu; hsebanna@gmail.com

ÖSSZEFOGLALÁS Az intratumorális heterogenitás, mint a tumor evolúció egyik legfontosabb eleme, napjaink talán legnagyobb kihívása a daganatok kezelésében. A daganatok jellegzetességei közé tartoznak az anyagcsere útvonalak átrendeződései is, aminek következménye, hogy a tumort alkotó sejtekben a metabolikus folyamatok aktivitása, azok aránya a szövet különböző területein eltérő lehet. A metabolikus heterogenitás és alkalmazkodás jellegzetességei, a megváltozó szerkezetű vagy mennyiségű anyagcseretermékek befolyásolják a terápiás kezelések hatásait, a betegség progresszióját. Az elmúlt évtizedben megjelent a daganatos sejtek metabolikus átprogramozásával, annak a daganatnövekedést elősegítő hatásával kapcsolatos eredményeket foglaljuk össze a közleményben. Ezekkel összefüggésben új markerek kerültek jellemzésre, amelyek nemcsak a diagnosztikában, a terápiás eredmények monitorozásában, hanem a daganatok kezelésében mint új terápiás célpontok is teret nyerhetnek. Számos metabolikus hatású, nem onkológiai kezelés esetében ismertük meg, hogy azok daganatnövekedést gátló hatással is rendelkezhetnek. A daganatok metabolikus változásainak térképezésében a genomikai és transzkriptomikai adatok kiegészülnek a metabolomikai, biokémiai és *in situ* metabolikus karakterizálás komplex eredményeivel. Ezeknek a jelenleg még inkább alapkutatási, de egyre növekvő számban klinikai vizsgálatoknak remélhetően pozitív terápiás következménye lesz.

KULCSSZAVAK alkalmazkodás, heterogenitás, metabolizmus, tumor

SUMMARY Intratumoral heterogeneity – as a key element of tumour evolution – represents one of the most complex ongoing challenge in the field of current cancer. Alterations are considered as hallmarks of cells. As a consequence, the activity and the ratio of metabolic processes can be highly various in tumour cells in different tissue areas. Therapeutic outcome and disease progression can be affected by metabolic heterogeneity and the features of adaptation capacity; furthermore, altered structures or amounts of metabolites are also denoted to be influencing factors. We summarised the results from the last decade dealing with the metabolic reprogramming and its tumour promoting effects in cancers. In line with these, new markers were characterised, which could be novel tools not only in diagnostics and monitoring, but in developing targeted therapies. It was revealed that several metabolic treatments (apart from oncological therapy) can have tumour growth inhibitory effects. Due to mapping metabolic alterations in tumour metabolism-related research, genomic and transcriptomic data are completed with the complex results obtained from metabolomic, biochemical and *in situ* metabolic characterisation. Hopefully, these currently mainly basic research projects and the increasing number of clinical studies will have therapeutic implements and success.

KEY WORDS adaptation, heterogeneity, metabolism, cancer

Rövidítések

2HG	*2-hidroxiglutarát*
3BP	*3-brómpiruvát*
ACC	*acetil-koenzim-A-karboxiláz*
ACSS2	*acetil-koenzim A-szintetáz 2*
AML	*akut myeloid leukaemia*
aKG	*α-ketoglutarát*
AMPK	*adenozin-monofoszfát-aktiválta kináz*
BPTES	*bisz-2-(5-fenilacetamido-1,3,4-tiadiazol-2-il) etil szulfid*
CPT1A	*karnitin-palmitoil-transzferáz 1A*
EMT	*epithelialis-mesenchymalis tranzíció*
FASN	*fatty acid synthase*
FH	*fumarát-hidratáz*
GABA	*gamma-amino-vajsav*
GAPDH	*glicerin-aldehid-3-foszfát-dehidrogenáz*
GLS	*glutamináz*
GLUT1	*glucose transporter-1*
HIF1/HIF1a	*hypoxia indukálta faktor 1α transzkripciós faktor*
HK2	*hexikonáz-2*
IDH	*izocitrát-dehidrogenáz*
IHC	*immunhisztokémia*
LAM	*lymphangioleiomyomatosis*
LDHA	*laktát-dehidrogenáz-A*
LC3	*Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3*
mTOR	*mammalian target of rapamycin*
MCT	*monokarboxilát transzporter*
OXPHOS	*oxidatív foszforiláció*
PDK	*piruvát-dehidrogenáz-kináz*
PFK	*foszfofruktokináz*
PI3K	*foszfoinozitol-3-kináz*
PKM2	*piruvát-kináz M2 izoforma*
RAPA	*rapamycin (mTORC1 inhibitor)*
SAM S-	*adenozilmetionin*
SDH	*szukcinát-dehidrogenáz*
SSADH	*szukcinát-szemialdehid-dehidrogenáz*
TCA	*citrátciklus*
TMZ	*temozolomide*
VEGFR	*vaszkuláris endothel növekedési faktor receptor*

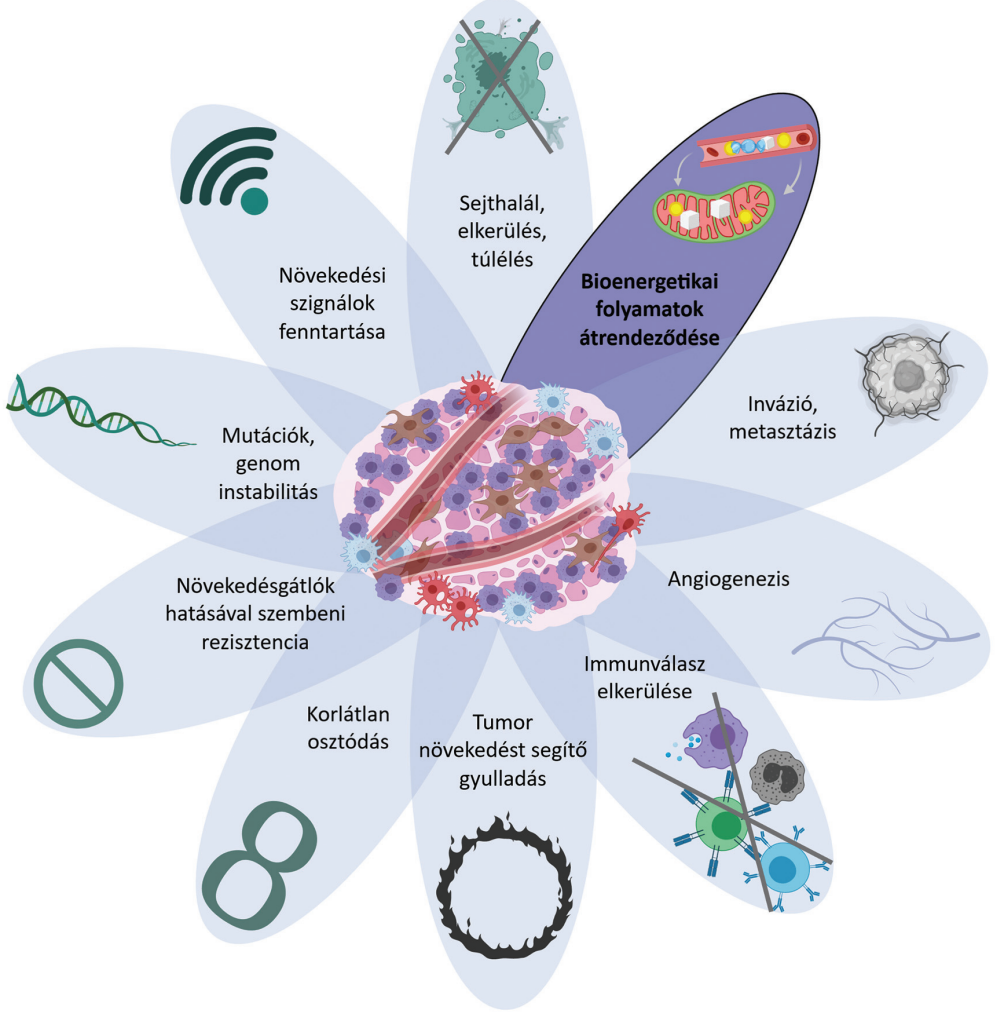
Köszönetnyilvánítás

Vizsgálataink különböző szakaszaiban kollaborációs partnereinknek, korábbi munkatársainknak és számos jelenlegi kollégánknak (Szoboszlai Norbert, Tretter László, Patócs Attila, Charles D. Burger, Mészáros Katalin, Hujber Zoltán, Hajdu Melinda, Raffay Regina, Kaminszky Zsuzsa, Kurucz Csilla, Nagy Noémi, Oláh Júlia, Sztodola András) munkájáért, segítségéért, illetve az intézeti projektjeinket támogató kutatási, egyetemi és intézeti forrásoknak (NKFI-FK 128404, MTA-Doktori pályázat, ÚNKP-19-3-1/3, ED_17-1-2017-00009 Nemzeti Bionika Projekt, NVKP_16-1-2016-0004 FIKP, illetve Semmelweis Egyetem FIKP Projekt) pedig a vizsgálatokhoz nyújtott támogatásért szeretnénk kifejezni köszönetünket.

Bioenergetikai változás mint a daganatsejtek jellegzetessége

Hanahan és *Weinberg* 2011-ben a tumorsejtek jellegzetességei közé sorolta a megváltozó bioenergetikai sajátságokat *(1. ábra)*.[1] Bár a daganatok eredetbeli, genetikai és szövettani sokféleségtől függetlenül hasonló anyagcsere útvonal-átrendeződésekkel rendelkeznek, a sejtekben a metabolikus folyamatok aktivitása, azok aránya a tumorszövet különböző területein eltérő lehet. Ez okozza a tumorszövet jellegzetes metabolikus heterogenitását, amelyet a szöveti mikrokörnyezet és az aktuális kezelés is befolyásol.

Az intratumorális heterogenitás mint a tumor evolúció egyik legfontosabb eleme, napjaink talán legnagyobb kihívása a daganatok kezelésében. Az újgenerációs szekvenálások igazolták az evolúcióbiológusok már több mint 50 éves feltevését, hogy a tumorszövet



1. ábra: A daganatos sejtek jellegzetességei között Hanahan és Weinberg összefoglalása szerint megtaláljuk a sejtek bioenergetikai folyamatainak átrendeződését is. Hanahan D és Weinberg A közleménye alapján készült, módosított ábra[1]

sejtjei rendkívül különbözőek (sokféle mutáció kombinációi). Az eltérő mutációk összessége nagyon hasonló szabályozási zavarokat okoz, amiben kitüntetett szerepe van a sejtek működését szabályozó jelátviteli hálózatok csomóponti aktivitásváltozásainak. Az új sejtek keletkezéséhez szükséges bioszintetikus folyamatokban (membránok, nukleinsavak és fehérjék szintézise) a daganatszövetnek optimalizálnia kell az erőforrások felhasználását. Ehhez alkalmazkodva a tumorsejtek átprogramozzák saját, de akár a mikrokörnyezetben lévő nem tumoros sejtek anyagcseréjét is, hogy növekedésükhöz felhasználják ezek erőforrásait (ez a metabolikus szimbiózis).[2]

Otto Warburg a metabolikus alkalmazkodás egyik elemét már az 1920-as években felismerte. A róla elnevezett Warburg-effektus lényege, hogy a tumorsejtek többsége a glükózt tejsavvá alakítja a rendelkezésre álló oxigén mennyiségétől függetlenül. Ilyenkor 1 mol glükóz lebontásával ugyan kevesebb ATP keletkezik, azonban a folyamat nagyon gyorsan biztosít energiát és építőelemeket a növekedéshez.[3] Az intracelluláris térben megjelenő tejsav (a savas környezet) mikrokörnyezeti hatásai pedig segítik pl. a lokális immunszuppressziót, a mátrixbontó enzimek aktiválását, a szöveti elemek lebontását, fokozzák a fibroblastok VEGF, az endothelsejtek VEGFR2 expresszióját, az érképződést, illetve a sejtek migrációs (metasztázisképző) képességét.[4]

A tumorsejtek fokozott glükózfelvételét, a tumornövekedés és a metasztázisok klinikai követésében hasznosíthatjuk. PET-CT vizsgálatokban a radiofarmakonok – leggyakrabban ^{18}F-fluoro-2-dezoxi-glükóz (FDG) – szöveti felhalmozódása segíti az intenzíven glükózt felvevő (Warburg/glikolitikus fenotípusú) tumorok feltérképezését, a kezelések eredményeinek klinikai követését. A daganatok metabolikus alkalmazkodásának többféle lehetőségét jól mutatja, hogy ez az eljárás a glükózt nem (vagy kevéssé) hasznosító daganatok – pl. prosztata-, egyes emlődaganatok stb. – esetében nem megfelelő, emiatt egyéb radionyomjelzők (pl. ^{11}C-acetát vagy ^{11}C- és ^{13}C-laktát) fejlesztése folyamatos.[5]

Bár az eddigi eredmények nem mutatnak egyetlen, a tumorokban kizárólagos metabolikus jellegzetességet, az elmúlt évtizedben a daganatos sejtek metabolikus átprogramozásának, az adott tumorszövetet alkotó sejtek metabolikus tulajdonságainak vizsgálatával olyan változások, markerek kerültek jellemzésre, amelyek nemcsak a diagnosztikában, a terápiás eredmények monitorozásában, hanem a daganatok kezelésében mint új terápiás célpontok is teret nyerhetnek. Számos metabolikus inhibitor esetén megismertük, hogy adott nem onkológiai kezelések daganatnövekedés-gátló hatással rendelkezhetnek.

Metabolikus alkalmazkodási stratégiák, metabolikus fenotípusok a daganatokban

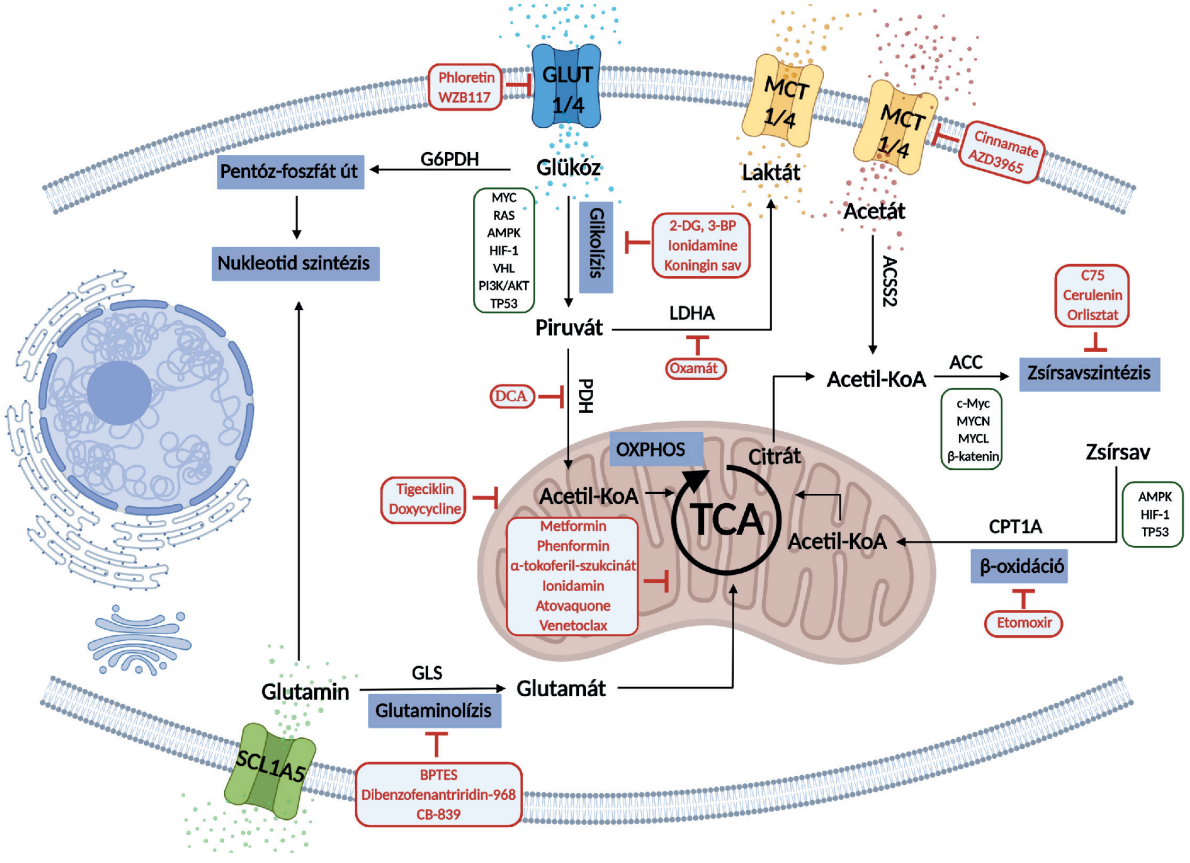
A Warburg-effektust *(glikolitikus fenotípus)* évekkel ezelőtt még a daganatok domináns metabolikus tulajdonságának tartották és összefüggésbe hozták a mitokondriális funkcióvesztéssel. Mára már tudjuk, hogy a tumorsejtek többségének mitokondriumai bioenergetikai szempontból épek (hiányukban a tumor más sejtektől átvéve is repopulálhatja ezeket), így képesek oxidatív foszforilációra (OXPHOS). Igazolódott az is, hogy intenzív növekedéskor a daganatsejtek többségére a glikolitikus fenotípus jellemző, azonban a sejtek egy része – és ezek a tumorprogresszió szempontjából a legveszélyesebb és legagresszívebb tumorsejtek lehetnek – ún. hibrid fenotípussal rendelkezik. Ezek a hibrid sejtek biztosítják a tumorszövet extrém metabolikus plaszticitását, így felelhetnek a terápiarezisztencia és a metasztázisok kialakulásáért.[6]

A metabolikus átrendeződések hátterében jól ismert onkogén szabályozási zavarokkal összefüggő transzporterek, enzimek expresszióváltozásait figyelhetjük meg. A glükóz, illetve a monokarboxilát transzporterek (GLUT, MCT) és a glikolízis enzimek (pl. PKM2, PFK, LDHA) expresszióját fokozó génregulációs változásokból (pl. *MYC, RAS, AMPK, HIF-1, VHL, PI3K, AKT, TP53*) sokféle kombináció jellemzi a magas glikolitikus aktivitású, FDG-PET-CT pozitív daganatokat. Nem véletlen, hogy a glikolízis gátlószerei mellett az étrendi- vagy életmódváltozások is kitüntetett figyelmet kaptak az elmúlt időben.[7]

Intenzív glikolíziskor a piruvát-kináz alacsony aktivitású (PKM2) és a laktát-dehidrogenáz A izoforma túlsúlya segíti a piruvát-laktát (piroszőlősav-tejsav) átalakulást, illetve a glikolitikus intermedierek hasznosítását. Ekkor a citrátciklusba (TCA) piruvátból származó acetil-koenzim-A (acetil-KoA) alig jut, így a TCA kiegyensúlyozott metabolit feltöltése (kata- és anaplerózis egyensúlya) felborulna. A glikolízis intermedierjei ennek ellenére biztosítják a szükséges energiát (ATP) és a szintetikus folyamatok építőköveit (pl. glükóz-6-foszfát, ribulóz-5-foszfát, dihidroxi-aceton). Előbbiek kiegyensúlyozásában számos TCA feltöltő mechanizmus játszhat szerepet. A glutaminolízis, a glutamin-glutamát–α-ketoglutarát útvonalon a citrátköri intermedierek akár 30–40%-át és jelentős mennyiségű ATP-t termelhet.[8] Az α-ketoglutarát (aKG) hozzá-

járulhat az ATP termeléséhez a mitokondriális oxidációban vagy reverz úton izocitrát-citrát átalakuláson át támogathatja a zsírsav- és a lipidszintézist. Előbbiek magyarázzák a proliferáló sejtek magas glutamin-igényét, amihez a glutamin-hasznosítás további funkciói is hozzájárulnak (fehérje- és nukleotidszintézis, N- és O-glikolizáció, bioenergetikai és transzamináz szubsztrát, antioxidáns glutation képződés – oxidatív stresszhatások kivédése).[9] Összességében a fehérjék lebontásából származó aminosavak, köztük a glutamin, a szervezet 10–15%-ának energiaellátását is adhatja, míg egyes aminosavak adott tumorsejtek számára esszenciálisak lehetnek. Az anyagcserefolyamatok tumorbiológiai jelentőségét hangsúlyozzák azok az adatok is, amelyek az epigenetikai szabályozási zavarokban emelik ki a treonin, a metionin és az S-adenozil metionin (SAM) szint fenntartásának hiszton- és DNS-metilációban játszott szerepét.[9] Energiaínségben nemcsak fehérjék és aminosavak, hanem zsírsavak és ketontestek reduktív karboxilációja, oxidációja is bekövetkezhet, és a reverz Warburg-effektus laktát visszaforgatásával is nyújt kapacitás lehetőséget.[10]

Az energiaelőállításban, tárolásban, membránok felépítésében és kapcsolódó szabályozásokban részt vesznek a lipidek és a zsírsavak. A lipidanyagcsere dinamikus alkalmazkodása a daganatos progresszióban fontos tényező, sok esetben biztosítja a sejtek metabolikus alkalmazkodását, plaszticitását. Nem meglepő, hogy a β-oxidáció és lipidszintézis szabályozásában onkogén és transzkripciós faktor útvonalak (c-Myc, MYCN, MYCL, β-katenin) vesznek részt. Egyre ismertebb az elhízás, a diabétesz és a metabolikus szindróma – mint lipidmetabolizmust is érintő kóros állapotok – daganatkialakulást segítő hatása. Például a lipidlebontó és -szintetikus folyamatok változásaival függnek össze az acetil-KoA karboxiláz (ACC) – zsírsavszintézis sebességmeghatározó enzime – és a karnitin-palmitoltranszferáz-1A (CPT1A) – zsírsavanyagcsere

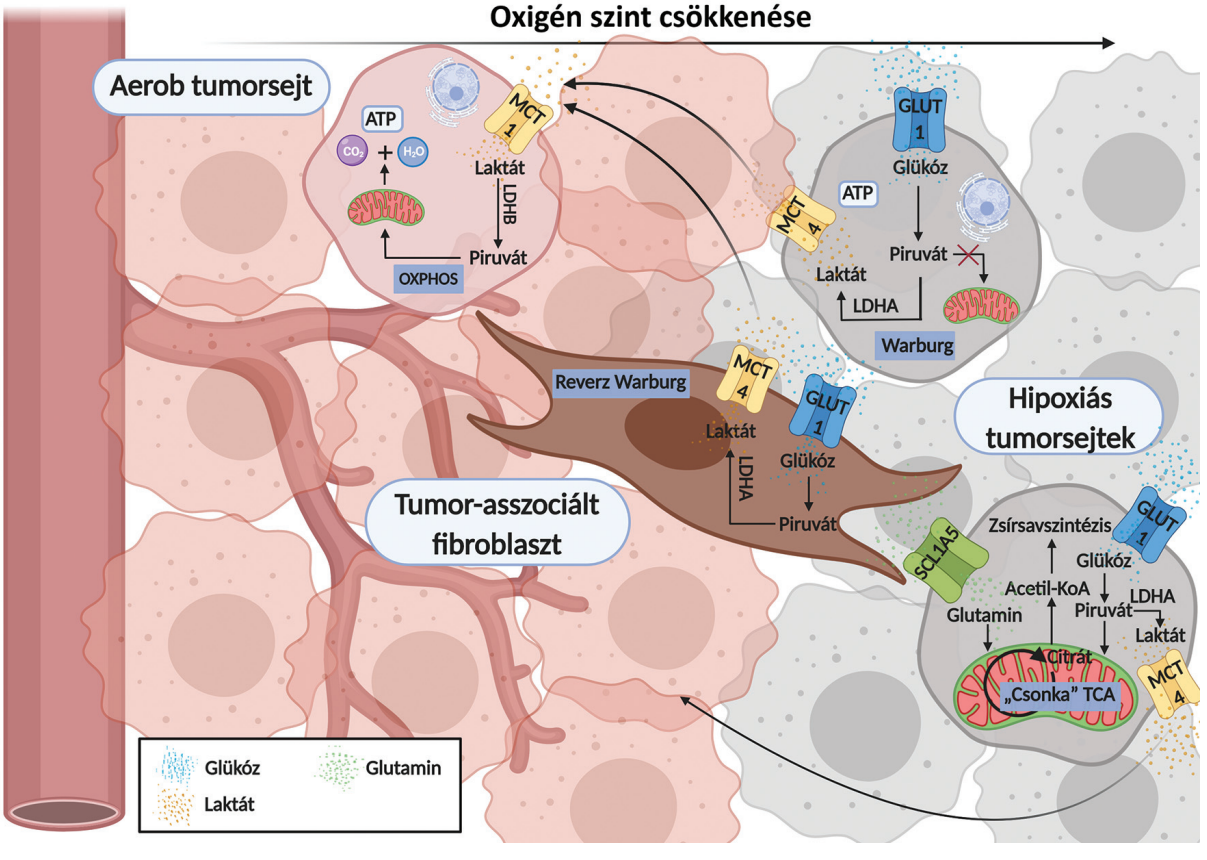


2. ábra: Különböző, a daganatsejtek anyagcsere-átrendeződéseiben jelentős metabolikus folyamatok és gátlóinak vázlatos összefoglalása a teljesség igénye nélkül. Az ábrán feltüntetett metabolikus fehérjék – LDHA: laktát-dehidrogenáz A; GLS: glutamináz; ACSS2: acetil-koenzim-A-szintetáz-2; ACC: acetil-koenzim-A-karboxiláz-2; MCT: monokarboxilát transzporterek; GLUT: glükóz transzporterek, G6PD: glükóz-6-foszfát-dehidrogenáz; SCL1A5: glutamin transzporter; CPT1A: karnitin-palmitoiltranszferáz-1A; PDH: piruvát-dehidrogenáz – különböző metabolikus folyamatokban (kék háttérben) játszanak szerepet, amelyek aktivitásában számos onko- és tumorszuppresszor génnek (példák fekete keretben) és fehérjéik aktivitás változásának van szerepe. A metabolikus útvonalak gátlószereit piros keretben tüntettük fel. További magyarázat a szövegben.

másik fontos enzime – mennyiségi és aktivitás változásai.[11]

Az OXPHOS fenotípusú sejtekben, oxigén jelenlétében a glikolízisben képződő piruvát belépve a mitokondriumba, acetil-KoA-n keresztül a TCA ciklusban alakul tovább különböző intermedierekké. A mitokondrium mátrixban $NADH^+ + H^+$ és FADH2 keletkezik, és az elektrontranszportláncban, a terminális oxidációban ATP keletkezik. Természetesen az előbbiekben bemutatott TCA-t feltöltő mechanizmusok, köztük a lipidbontás termékei vagy a glutaminolízis, a fehérjék, aminosavak bontása más intermediereken keresztül is bekapcsolódhatnak az oxidációba.

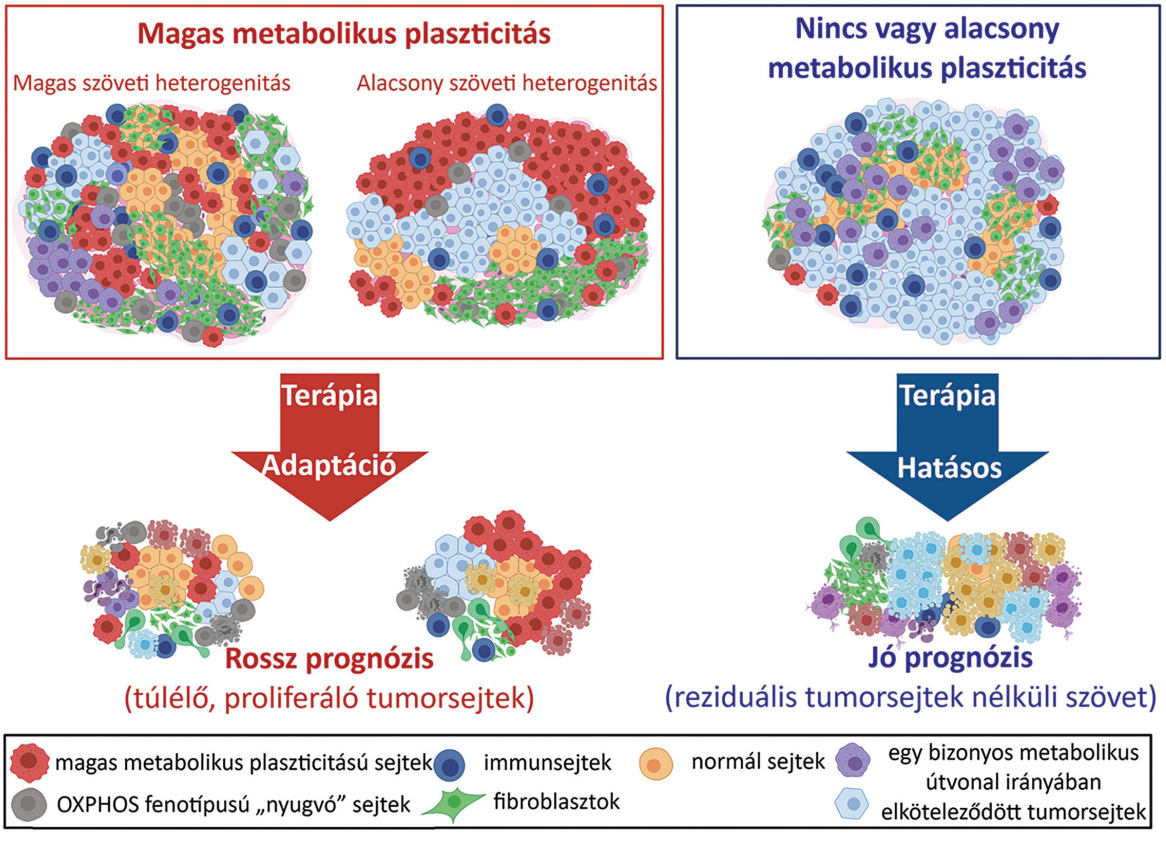
Ideális állapot a tumorsejtekben, ha a Warburg-glikolízis, a TCA-feltöltő és az OXPHOS mechanizmusok egyensúlyban vannak és egyaránt elérhetőek *(2. ábra)*. A legújabb elképzelések szerint a hibrid metabolikus fenotípusú sejtekben, jelentős aerob glikolízis és párhuzamosan OXPHOS is zajlik.[6,8] Egyes hipotézisek szerint az adott folyamatok gyors re- és inaktivációja történik ezekben a sejtekben, így a hibrid fenotípus inkább a metabolikus szimbiózis és a tumorszövet jellegzetessége *(3. ábra)*. A metabolikus fenotípusok kapcsán a nyugvó sejtek – és így az őssejtek – alacsonyabb metabolikus aktivitásáról sem szabad megfeledkeznünk. A tumorőssejtek metabolikus aktivitásáról számos tanulmány érhető el, és bár az adatok között ugyan vannak ellentmondások, az eredmények többsége az ős- és a nyugvó sejtek OXPHOS bioenergetikai hátterét támasztja alá. Ezeket az OXPHOS



3. ábra: Metabolikus szimbiózis. A metabolikus szimbiózisban az új sejtek keletkezéséhez szükséges energia és építőelemek biztosítása érdekében a daganatszövetnek optimalizálnia kell az erőforrások felhasználását. Ehhez alkalmazkodva a tumorsejtek átprogramozzák saját, de akár a mikrokörnyezetben lévő, nem tumoros sejtek anyagcseréjét is. A hypoxiás vagy pseudohypoxiás tumorsejtek nagymennyiségű glükózt vesznek fel, laktáttermelés közben az extracelluláris térben azonban a laktát sem vész el. Amellett, hogy a savas mikrokörnyezet legkülönbözőbb hatásaival segíti a tumorsejtek túlélését, más magasabb oxigénellátottságú sejtek számára mint energiaforrás is hozzáférhető (teljes oxidációja a reverz Warburg-effektus segítségével megtörténhet). Így összességében rendkívül hatékonyan hasznosítja a tumorszövet tápanyagforrásait; a gyors növekedésű területeken gyorsan energiát nyer a Warburg-effektus segítségével, és a citrátkör feltöltése is megtörténhet eközben egyéb C források felhasználása mellett (pl. glutamin – csonka citrátkör). A metabolikus szimbiózis úgy segíti a tumor növekedését, hogy alapvetően a tumorsejtek szelektív növekedési előnye mellett az erőforrások jól hasznosuljanak a szövetben („a tumorsejtek semmiképp ne szenvedjenek hiányt semmiben").

fenotípusú tumor őssejteket, „dormant” sejteket, a terápiarezisztencia kialakulásában játszott szerepüket egyre több tumortípusban vizsgálják.[2]

A növekvő tumor oxigénhiányos (hypoxiás) területei, a kezelések, a tumorsejtek keringésbe kerülése, az epithelialis-mesenhymalis átalakulás (EMT) és a metasztázisok esetében az új mikrokörnyezethez alkalmazkodás a sejtek anyagcsere-változása, metabolikus átprogramozása nélkül nem, vagy csak ritkán mehet végbe. Az alkalmazkodóképességet (plaszticitást) az onko- és szuppresszor gének (pl. *MYC, TP53, PTEN, TSC1/2*) vagy jelátviteli útvonalak (pl. PI3K/mTOR/Akt, Ras) szabályozatlan túlműködése segíti.[12,13] A hypoxia következménye a HIF1-α (HIF1) expresszió fokozódása, ami serkenti az angiogenezist (pl. VEGF), illetve párhuzamosan a glikolízis enzimek, a glükóztranszporterek expresszióját, a glutaminolízist, illetve a csonka citrátkör alapú zsírsavszintézist. Tápanyaghiány (ATP-szint csökkenése) aktiválja az AMP-aktivált protein-kinázt (AMPK), ami a lebontó folyamatokat támogatja, gátolja az mTOR-aktivitást, párhuzamosan beindítja a lizoszóma-biogenezist és az autofágiát. Előbbiek segítségével a tumorsejtek alacsonyabb metabolikus aktivitással, de túlélhetnek. Egyes tumorsejtekben a glikolitikus flux, a glutaminolízis, míg más sejtekben a glikolízis és párhuzamosan az OXPHOS



4. ábra: A metabolikus plaszticitás tumorbiológiai jelentősége. A legkülönbözőbb terápiákkal szemben kialakuló rezisztenciák egyik fontos tényezője a tumorok heterogenitása, köztük a metabolikus heterogenitása, ami a bioenergetikai alkalmazkodás feltételeit teremti meg. Ennek során azok a sejtek rendelkeznek szelektív előnnyel a normál és más tumorsejttel szemben, amelyekben a gyors és sokirányú metabolikus átrendeződés alapfeltételei adottak, a megfelelő enzimek azonnal rendelkezésre állnak. Sokszor az is segíti ebben a sejteket, hogy egy alacsonyabb metabolikus szinten hasznosítják a rendelkezésre álló, akár sejten belüli erőforrásaikat, így a környezet hatásaitól védettebben vészelik át az átmenetileg elvileg toxikus hatásokat, majd túlélve reaktiválódhatnak. Azokban a tumorokban, amelyek nem rendelkeznek csak többségében olyan tumorsejtekkel, amelyek akár genetikai hibáik miatt erősen elkötelezettek bizonyos metabolikus útvonalak irányába (pl. OXPHOS eltolódásra kevésbé gyorsan képesek), olyan mértékben csökkenhet az alkalmazkodásra képes tumorsejtek száma, amivel végül túlélni a tumorsejtek egyike sem képes, ez a metabolikus katasztrófa. Sajnos a rezisztens tumorok kialakulása közben a metabolikus adaptációs mechanizmusok is segítik, hogy sikertelen terápiák eredményeként a szelekciós nyomás hatására a tumorprogresszió szempontjából legveszélyesebb és legagresszívebb, metabolikusan plasztikus tumorsejtek túléljenek vagy metasztázis útján új környezetben jelenjenek meg. Így más terápiarezisztencia mechanizmusok gátlása mellett, a tumorszövet metabolikus plaszticitásának gátlása egy olyan „új” target, amivel érdemes számolni a jövőben.

lesz aktívabb, a zsírsavszintézis aktivitása pedig csökkenhet. A keringő tumorsejtekre leginkább az OXPHOS fenotípus és a kiegyensúlyozott redoxiállapot fenntartása jellemző.[14] A metasztatikus sejteknek ismét alkalmazkodniuk kell, pl. a májba, csontba metasztatizáló sejtek inkább Warburg-fenotípusúak, míg az agyi- és a tüdőmetasztázisokban az OXPHOS fenotípus jelentősebb.[15] Ezek a változások persze a tumorsejt típusától is függnek, de lehetőségeik széles spektruma a rezisztencia alapja lehet *(4. ábra)*.

Metabolit, onkometabolit koncentrációváltozások a daganatokban

Bizonyos funkcióvesztő vagy -nyerő enzim mutációk (pl. citrát-szintáz, akonitáz, fumarát-hidratáz – FH, szukcinát-dehidrogenáz – SDH, izocitrát-dehidrogenáz – IDH) az oxidációs folyamatokat súlyosan károsíthatják, hatásukra kóros mennyiségben felhalmozódhatnak egyes metabolitok. Például a fumarát-, a szukcinátszint emelkedése és a D-2-hidroxiglutarát (2HG) megjelenése olyan génregulációs zavarokhoz (metiláció, acetiláció), illetve HIF1 stabilizációhoz vezethet, amelyek a laktát hatásaihoz hasonló növekedési előnyt biztosítanak a sejteknek. Azokat az anyagcsere köztes termékeket (metabolitokat), amelyek mennyiségükben vagy szerkezetükben megváltozva segítik a tumornövekedést, *onkometabolitoknak* tekintjük. Az onko- vagy más metabolitok mennyiségi változásai jellegzetes képet adhatnak a metabolikus működésről, változásról.[16]

A definíció alapján a daganatos sejtek által termelt, a tumor mikrokörnyezetét befolyásoló nagymennyiségű **laktát** is onkometabolit. Szintjének emelkedése gyakori a legkülönbözőbb daganatos betegektől származó szérumokban vagy más testfolyadékokban (liquor, pleuralis folyadék stb.) is. Végstádiumú, cachexiás betegekben, a szervezet metabolikus összeomlásával párhuzamosan a betegek laktát szérumszintje akár extrém magas is lehet.[17]

A fent említett speciális onkometabolitok ritkább daganatok előfordulásával és adott anyagcsere-enzim mutációkkal függnek össze. Az izocitrát-dehidrogenáz enzimek (IDH1-3) aKG, CO2 és $NADH^+ + H^+$ keletkezését katalizálják. Mutációik eredményeként nem aKG, hanem 2HG keletkezik. A mutáns enzim NADPH-t fogyaszt, így hozzájárul a szabadgyök termeléshez is, illetve kompetitíven kötődve más enzimekhez, fokozza pl. a HIF1 mennyiségét, stabilitását, gátolja a hisztonés DNS-metilázok funkcióit, DNS-hipermetilációt, epigenetikai változásokat okoz. Az IDH mutációk astrocytomákban, oligodendrogliomákban, szekunder glioblastomákban gyakoribbak (~70–80%); a felnőttkori akut myeloid leukaemiák (AML) 15–20%-ában, a chondrosarcomák ~50%-ában jelenhetnek meg; míg pajzsmirigy-, colorectalis és cholangiocarcinomában ritkábbak. A jelenlegi kezelések mellett az *IDH* mutáció gliomák esetében a jobb, míg a többi daganattípusban rosszabb prognózissal társul. Az *SDH* funkcióvesztő mutáció következtében a szukcinát-fumarát átalakulás károsodik, eredményeként a **szukcinát** mint onkometabolit halmozódik fel, az előbb a 2HG-nál ismertetett hatások mellett, fokozott aszpartátszintézis is bekövetkezhet. Ez gastrointestinalis stromalis tumor, vesecarcinoma, paraganglioma vagy phaeochromocytoma kialakulásának esélyét fokozza az érintettekben. A citrátköri *FH* mutációit elsőként leiomyomatosisban és II-es típusú papilláris vesedaganatokban írták le, de szerepük lehet egyéb daganatok kialakulásában is. A funkciókiesés miatt felhalmozódó **fumarát** a szukcináthoz hasonlóan járul hozzá az onkogenikus változásokhoz.[16-18]

Az onkometabolitok termelése felhívhatja a figyelmet a daganatok megjelenésére vagy terápiás választ követő kiújulására, metasztázisára. A 2HG nemcsak AML-es betegek vérében, de gliomás betegek liquorjában is monitorozhatóvá teszi a mutáns *IDH* funkciógátló kezelések hatásait vagy az *IDH* mutáns malignus sejtek számának emelkedését.[19,20]

Az adott tumorszövetek metabolitkoncentráció viszonyainak elemzése fontos információkat adhat a daganatszövet metabolikus állapotáról, esetleg domináns metabolikus útvonalairól. Ha ismerjük adott daganatszövet jellegzetes kiindulási vagy az alkalmazott terápia esetén várható adaptációs anyagcsere-változásait, akkor azokat gátolva, metabolikus katasztrófát előidézve járulhatunk hozzá a terápiák sikeréhez.

Tumorsejtek anyagcseréjét befolyásoló hatóanyagok, metabolikus off-target hatások

A tumormetabolizmussal foglalkozó tanulmányok, fejlesztések növekvő száma egyre több lehetőséget ad arra, hogy a daganatok jellemző bioenergetikai útvonalait gátoljuk *(2. ábra)*.

Nagy figyelmet kaptak a **glikolízisgátlók**; a tumorsejtekben fokozottan expresszálódó, emelkedett aktivitást mutató transzporterek (pl. GLUT-gátlók: phloretin, WZB117; vagy MCT-gátlók: Cinnamate, AZD3965) vagy glikolitikus enzimek [HK2: 2-deoxi-D-glükóz, lonidamine; GAPDH: 3-brómpiruvát (3BP), koninginsav; LDHA: oxamát vagy PDK: diklóracetát] jó cél-

pontok lehetnek.[21] A WZB117 GLUT gátló + kemoterápiás szer kombinációk (ciszplatin, paclitaxel) szinergikus tumornövekedés-gátló hatásokat mutattak, a legsikeresebb vizsgálatok a GAPDH-gátló koninginsav és a piruvát analóg 3BP kezelések voltak. 2016-ban azonban minden glikolízisgátló fázisvizsgálatot leállítottak a súlyos mellékhatások miatt.[22] A glikolitikus fenotípusú sejtek esetében a laktát- és piruváttranszport, illetve az MCT-k gátlása (Cinnamate és AZD3965) mint lehetőség azonban még kihasználható, illetve más kezelések ismert bystander hatásán keresztül szükség szerint megvalósulhat (pl. mTOR-gátlók).[23]

A mitokondrium bioenergetikai gátlásának két koncepciója a légzési lánc oxidációs folyamatának, illetve a mitokondrium proteinszintézisének gátlása. Egyes antibiotikumok (pl. tetraciklinek) *in vitro* és *in vivo* modellekben hatásos tumornövekedés-gátló kezelések. A tigeciklin monoterápia és imatinib kombinációja toxikus pl. krónikus myeloid leukaemia őssejtekben;[24] míg emlődaganatos betegekben a doxycycline kezelés csökkentheti a daganatőssejtek számát, javítva ezzel a betegek prognózisát.[25] A légzési lánc komplex-I-et gátló metformin/phenformin preklinikai vizsgálatokban igazolt tumornövekedést-gátló hatása után több fázisvizsgálat is folyik.[26] A komplex-III-gátló arzén-oxidot az akut promyelocytás leukaemia terápiájába fogadta be az FDA. *Off-target* hatásai miatt a komplex-II-gátló E-vitamin-analóg α-tokoferil-szukcinát és a malériaellenes atovaquone tumornövekedés-gátló hatásai is fontosak lehetnek a jövőben. Emellett elektrontranszportláncot indirekt módon gátló (venetoclax) + glutaminolízisgátló kombinációkat is tesztelnek már jelenleg.[27]

A **glutaminázgátló** kezelések (BPTES, dibenzofenantriridin-968 és CB-839) a TCA anaplerózisát gátolják. A CB-839 specifikus glutaminázgátló preklinikai hatásosságát több szolid tumor fázisvizsgálatában (pl. glioblastoma, vesedaganat, tripla-negatív emlőrák) tesztelték.[28] A lipidanyagcsere-targetek közül az SREBP-1 transzkripciós faktor, illetve a CD36 (zsírsavfelvétel) funkciójának gátlása mutatott pozitív eredményeket, míg a lipidszintézis-inhibibitorok (C75, cerulenin, orlisztat) tumornövekedést gátló hatásai nem voltak egyértelműek. Kedvező mellékhatás profilja miatt ígéretes lehet az etomoxir (CPT1A-β-oxidációgátló), de az autofágia tumorsejtek túlélését befolyásoló hatásai is nagy figyelmet kapnak jelenleg (pl. chloroquine kombinációk). A vizsgálatok arra utalnak, hogy egy komplex szabályozási rendszeren belül a tumorok metabolikus állapotától függően a **zsírsavanyagcserét és az autofágia folyamatait gátló és fokozó kezelések** is szerepet kaphatnak a jövőben.[31]

Vannak **egyéb metabolikus hatású gátlószer** kezelések, idetartoznak pl. mutáns IDH enzim gátlók pl. az AG-221 (enasidenib) – IDH2; az AG-120 – IDH1; illetve AG-881 pan-IDH1/2 gátló szerek. Ezek közül egyelőre az enasidenib az AML relapszus kezelésében kapott FDA engedélyt 2017-ben.[32]

Az egyéb metabolikus gátlószerek közé sorolhatjuk a PI3K/Akt/mTOR gátló kezeléseket. Az mTOR (mammalian target of rapamycin) komplexek érzékelik a sejtek energia- és tápanyagellátottságát, integrálják a különböző növekedési faktorok jelátviteli hálózati hatásait, és ennek függvényében számos sejtfunkciót szabályoznak (növekedés, proliferáció, túlélés és anyagcsere). Az mTOR komplexek célfehérjéi részt vesznek katabolikus és anabolikus folyamatok szabályozásában, ezáltal nem meglepő, hogy a sejt anyagcseréjének szabályozásában is központi szerepük van. Emellett a legtöbb daganat esetében hiperaktivitásuk is ismert. A rapamycin származékait különböző indikációs területeken alkalmazzák az onkológiában (AML, előrehaladott vesecarcinoma, neuroendokrin tumorok, hasnyálmirigy-, emésztőrendszeri, tüdődaganatok). Az mTOR-gátlók fő alkalmazási területe különböző receptor tirozin-kináz és más tumorokban hiperaktivált útvonalak gátlóinak kombinációjával várható, kemoterápiás vagy célzott terápiás kezelés kombinációk vizsgálatai vannak folyamatban.[33] A metformin, illetve autofágia és az mTOR-inhibitorok kombinációjával is kezdődtek fáziskísérletek.[34,35] Az adatok szerint a metabolikus alkalmazkodás központi tényezőjeként az mTOR gátlása más metabolikus gátlószer vagy egyéb célzott kezelés kombinációkban a rezisztencia problémák áttörésében lehet sikeres.

Több további metabolikus folyamatot (lipidanyagcsere, autofágia, pentóz-foszfát út) gátló vagy aktiváló hatóanyag preklinikai és klinikai kipróbálása zajlik, nem daganatterápiás gyógyszerek tumornövekedés gátló off-target hatása válik ismertté. Az optimális addicionális kezelési lehetőségekhez, a megfelelő betegcsoportok kiválasztásához azonban meg kell ismerni a daganatok metabolikus heterogenitását, a tumorsejtek és a tumorszövet metabolikus adaptációs képességét. Az elmúlt évtizedben indult fejlődésnek a daganatok metabolikus változásainak térképezése, ami a genomikai és transzkriptomikai adatokat egészíti ki metabolomikai, biokémiai és *in situ* metabolikus karakterizálás komplex eredményeivel.

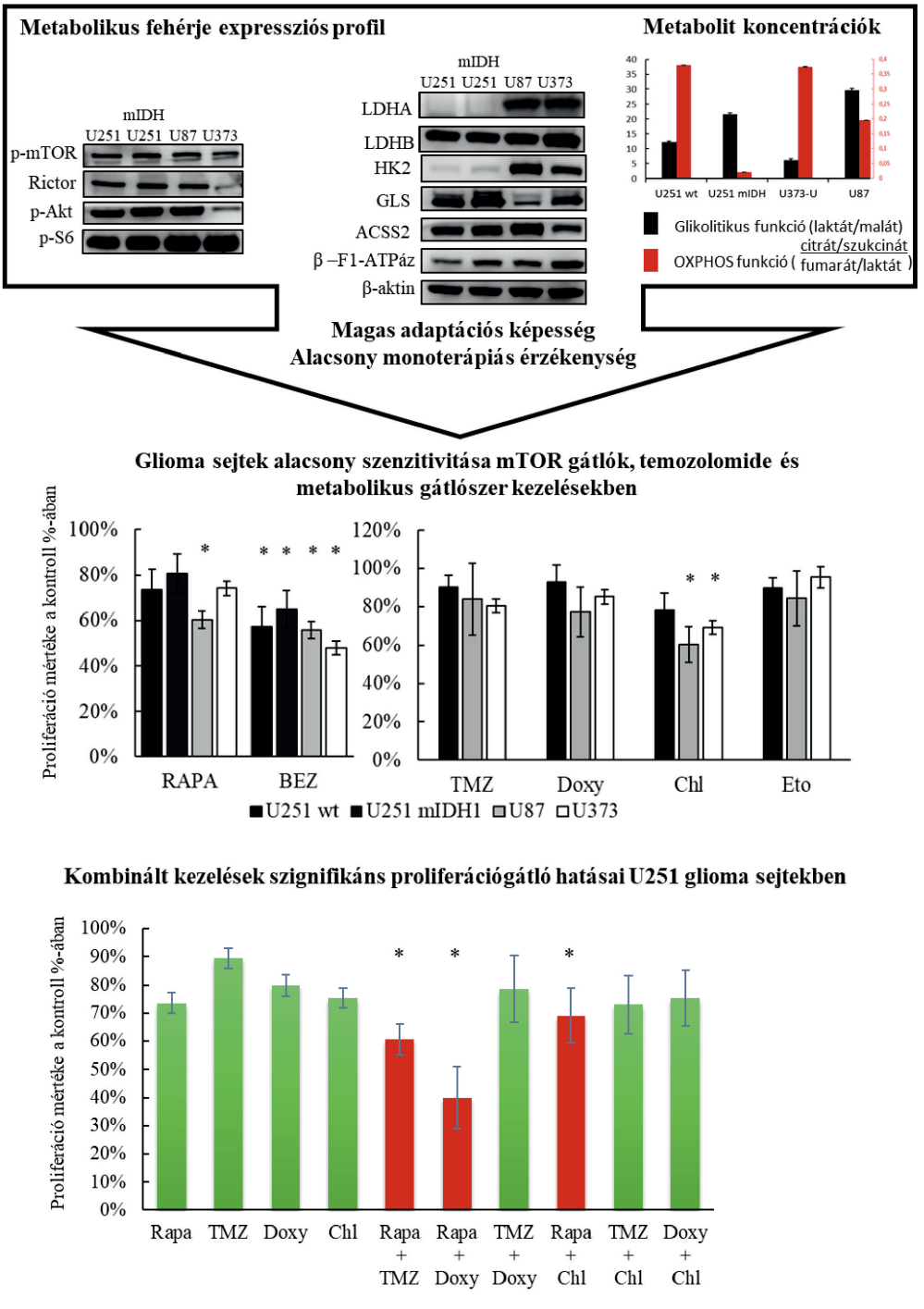
Daganatsejtek bioenergetikai és metabolomikai vizsgálata

A daganatprogresszió metabolikus változásainak megismeréséhez az orvosbiológiai, biokémiai/biofizikai ismeretek komplex értelmezésére van szükség. Ebben a különböző omikai területek, köztük a metabolomika, a mesterséges intelligencia- és a hálózatkutatás eszközei is szükségesek, amelyek kéz a kézben segíthetik a megfelelő biomarkerek, terápiás targetek és személyre szabott célzott kezelések fejlesztését. A metabolomikai vizsgálatok szűkebb értelmezése, a metabolitokat (mint anyagcseretermékeket) érintő folyamatok tudományos vizsgálatát; a metabolitok mennyiségének, mennyiségi és minőségi változásainak meghatározását jelenti. Akár egy sejtről szerzett genomikai, transzkriptomikai és proteomikai adatokat kiegészítve metabolomikai vizsgálattal aktuális képet kaphatunk a sejt fiziológiai állapotáról. A felvetés, hogy mindenkinek saját „anyagcsereprofilja" lehet, ami akár a testfolyadékból meghatározható, az 1940-es évekből ered.[36] Ezt követően az 1970-es évek technológiai fejlődése indította el az anyagcsereprofilok (kvali- és kvantitatív) meghatározásának lehetőségét (tömegspektrometria majd NMR, GC-, LC-MS MALDI-TOF stb.). 2007-ben a Humán Genom Projekthez hasonlóan elkészítették a humán metabolom térképet is, 2013-ra már több mint 80 000 metabolitot jellemeztek. A metabonomika – ahova a daganatok metabolikus jellemzése tartozik – a metabolomikának az a területe, amely a patofiziológiás ingerekre vagy genetikai módosításra bekövetkező dinamikus, sokparaméteres anyagcserevválaszok kvantitatív mérése.

A tumorok metabolikus jellemzése, biomarkerek keresése közben a metabolomikai mérések nagy segítséget nyújtanak daganatos és nem daganatos testfolyadékok, biológiai minták összehasonlító elemzésében. Eltérő mennyiségű vagy szerkezetű metabolitok mutathatók ki a betegek vérében, vizeletében, liquorjában, daganatszövet mintáiban a diagnózis felállításakor, a kezeléskor vagy relapszusok monitorozásakor, illetve a kiújult daganatban. A citrátköri, glikolitikus metabolitok vagy egyes onkometabolitok mennyisége jellemzi az adott sejtpopuláció metabolikus állapotát, anyagcsere-folyamatainak eltolódását. A laktát és egyes citrátköri metabolitok mennyiségének változása a glikolízis és az OXPHOS eltolódására utalhat. Jól kiválasztott metabolitok koncentrációjának, tömegspektrometriai mérésével *in vitro* vagy akár *in vivo* folyamatokban is nyomon követhetjük az anyagcsere-változásokat. Kísérleteinkben a folyamatokban részt vevő fehérjék, a szabályozásukat irányító gének expresszió és aktivitásváltozásait hasonlíthatjuk az eredményekhez. Vannak speciális lehetőségek is, pl. radioaktív vagy nehéz izotóppal jelölt biokémiai szubsztrátok segítségével követhetjük adott tápanyagokból meghatározott atomok beépülésének útvonalát, „lábnyomát". Meghatározhatjuk a sejtek vagy akár egy szervezet CO_2-termelését, O_2-fogyasztását vagy cukor-, acetát-, glutamin- vagy zsírsav-hasznosítását (^{13}C, ^{14}C-jelölt molekulák). Saját vizsgálatainkban a citrátkör/OXPHOS funkciójának jellemzéséhez többféle mérési módszert alkalmaztunk vagy dolgoztunk ki, illetve tumorszövetek (*in vivo* xenograft tumorok), szérumminták metabolitkoncentrációjának elemzésével is nyertünk adatokat, elsősorban az onkometabolitok terápiás kezelést követő változásaival kapcsolatban.[37] A metabolitkoncentráció-vizsgálatoknak sejt- vagy szövet-homogenizátum volt a kiindulása, melyekből a teljes sejt populáció O_2-fogyasztását, az extracelluláris tér savasodását, illetve a kibocsájtott CO_2 mennyiségét határoztuk meg. Ezekkel a tumorsejt-populáció vagy a tumorszövet *in situ* metabolikus heterogenitásáról kevés információt nyerhetünk. Utóbbi vizsgálatához egysejt analitikai technikákra (pl. áramlási citometria) vagy a tumorok morfológiai vizsgálatokkal kombinált elemzésére van szükség (MALDI-imaging). *In vitro* kísérleteinket kiegészítettük Seahorse mérésekkel (O_2-fogyasztás, extracelluláris savasodás), szubsztrát hasznosítást követő ^{13}C izotópok beépülésének követésével, ATP-szint, metabolikus enzimek mint fehérjék mennyiségi és aktivitás vizsgálatával. Metabolikus és terápiás tumornövekedés gátlást követően a metabolit koncentrációváltozásokkal összefüggő glikolitikus és citrátköri változásokat jellemeztünk *in vitro* és *in vivo*. Összehasonlító vizsgálataink (*in vitro* és xenograft, illetve humán szövetek) után olyan immunhisztokémiai (IHC) marker kombinációkat választottunk ki, amelyekkel a humán tumorszövetek, azok metabolikus heterogenitása, az eltérő metabolikus fenotípusú sejtek vagy a metabolikus adaptációt segítő bioenergetikai mechanizmusok háttere *in situ* jellemezhető. A következőkben saját munkáinkból mutatunk példákat a tumorok metabolikus jellemzésére.

Glioma sejtvonalak és biopsziás minták jellemzése

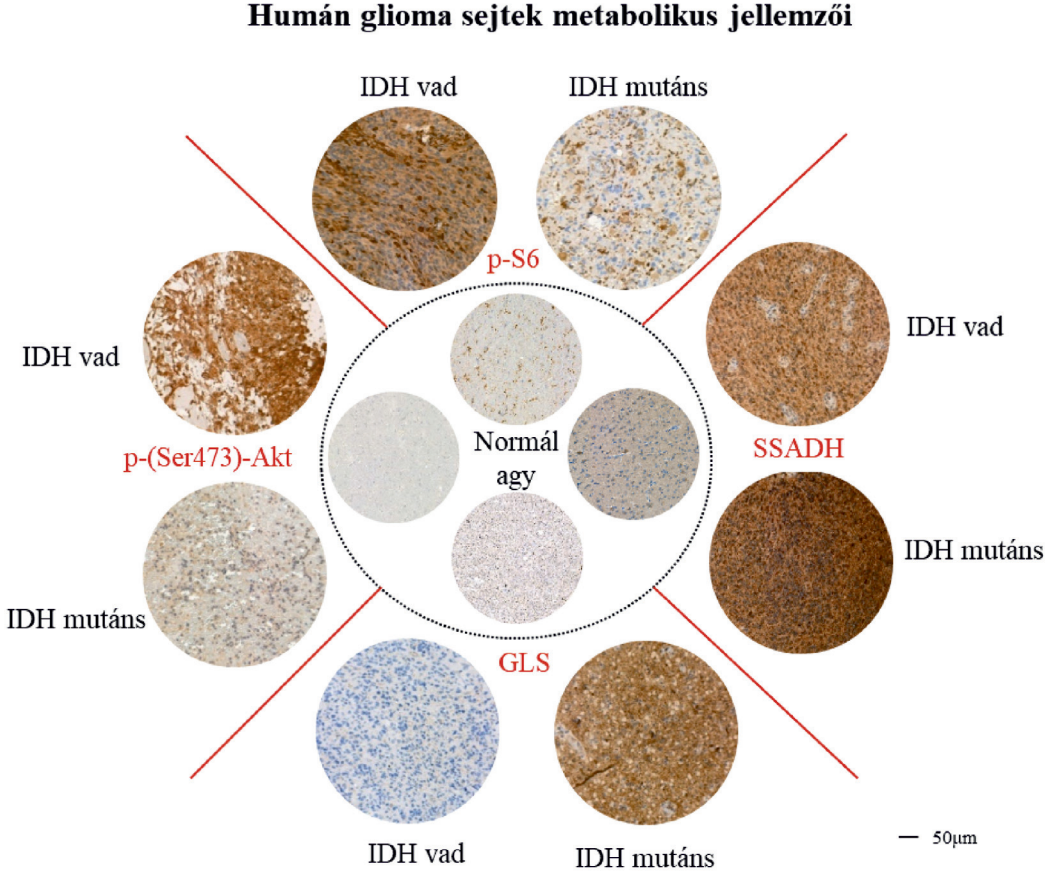
Humán glioma sejtvonalak metabolikus jellemzése és *in vitro* kezelések változásainak vizsgálata közben alátámasztottuk: a) vad és *IDH* mutáns gliomasejtek



*5. ábra: Humán glioma sejtvonalak metabolikus fehérje expressziós profilja és temozolomide, illetve metabolikus gátlószer érzékenységei in vitro. Glioma sejtekre (a vizsgált négy sejtvonalra) IDH mutációtól függetlenül jellemző a magas mTOR aktivitás és a metabolikus plaszticitással összefüggő más metabolikus fehérjék jelentős expressziója (Western blot eredmények – felső ábra). Az intracelluláris metabolit koncentrációk alapján az IDH vad típusú sejtvonalakban alapvetően kiegyensúlyozott metabolikus fenotípus, jelentős OXPHOS kapacitás, míg a mutáns sejtvonalban csökkent OXPHOS kapacitás figyelhető meg (jobb felső ábra). Előbbiekkel összefüggésben a sejtvonalak proliferációját (Alamar Blue proliferációs teszt – 72 h) az mTOR gátlók (Rapa – rapamycin 50 ng/ml; BEZ – NVP-BEZ235 duál mTOR inhibitor 1 μM), a temzolomide (TMZ 100 μM), illetve a vizsgált további metabolikus inhibitorok (doxycycline – Doxy 10 μM; chloroquine – Chl 50 μM; etomoxir – Eto 50 μM) monoterápiában in vitro jelentősen nem gátolták (középső ábra). Kombinációs kezelésekben (alsó ábra) azt figyeltük meg, hogy a doxycycline és a rapamycin szignifikánsan fokozta a temozolomide hatását, illetve a két különböző támadáspontú anti-metabolikus kezelés (rapamycin+doxycycline) kombinált hatásai is rendkívül jelentős tumornövekedés gátló hatást mutattak. (LDHA – laktát-dehidrogenáz A; LDHB – laktát-dehidrogenáz B; HK2 – hexokináz 2; GLS – glutaminináz; ACSS2 – acetil-koenzim A-szintetáz 2) *p<0,05.*

metabolikus különbségeit (kiegyensúlyozott metabolikus aktivitás, ami az IDH mutáns sejtekben módosul a 2HG termelés miatt); b) az *IDH* mutáns glioma sejtvonal 2HG termelésében a glutaminhasznosítás jelentős szerepét. Előbbieken túl ^{13}C jelzett szubsztrátvizsgálataink arra is felhívták a figyelmet, hogy: a) az acetát alternatív 2HG forrás az *IDH* mutáns sejtekben, illetve, b) a nem mutáns gliomasejtek jelentős gamma-aminovajsav (GABA) oxidációs kapacitással rendelkeznek, amiben a humán gliomaszövetekben kimutatható fokozott szukcinát-szemialdehid-dehidrogenáz (SSADH) expressziónak lehet szerepe. Vizsgálataink szerint a GABA-oxidáció 2HG jelenlétében az *IDH* mutáns sejtekben gátolt, ami összefügghet a két betegcsoport prognózisának, tumorainak biológiai viselkedés különbségeivel.[38]

A gliomasejtek metabolikus jellemzésekor megfigyeltük, hogy az intracelluláris metabolit arány különbségei bizonyos enzimek pl. a sejtekben kimutatható HK2, LDHA és GLS mennyiségével függnek össze. Az IDH mutáns sejtek esetében a magas GLS expresszió mellett alacsony LDHA expressziót és alacsony OXPHOS kapacitást figyeltünk meg, ami metabolikusan érzékennyé, kevésbé alkalmazkodó képessé teheti ezeket a sejteket. Temozolomide (TMZ), mTOR-gátló rapamycin (RAPA) és más metabolikus gátló monoterápiás kezelésekben az alacsony szenzitivitás mellett a metabolikus enzimek és az mTOR markerek változásait írtuk le. TMZ-rezisztens gliomasejtekben a TMZ kezelés mTOR aktivitásváltozást, autofágiával, illetve lipidoxidációval összefüggő változásokat okozott (FASN csökkent, CPT1A és LC3 emelkedett). Kombi-

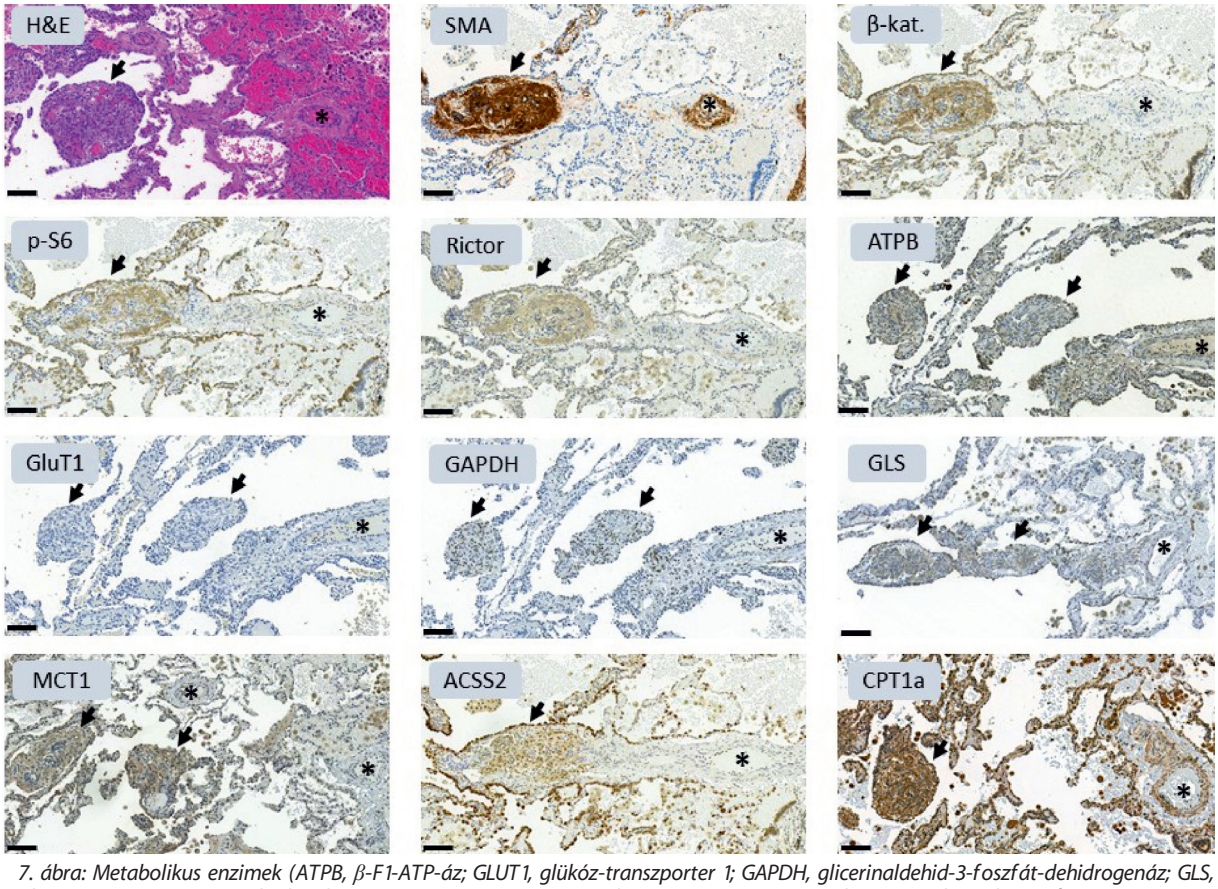


6. ábra: Potenciális terápiás jelentőségű metabolikus különbségek IDH vad és mutáns humán gliomákban. Több metabolikus enzim és az mTOR aktivitás markerek vizsgálata alapján a normál szövethez képest jelentősen emelkedett mTOR aktivitást (p-mTOR és p-S6) mutattunk ki valamennyi esetben. Az esetek nagy százalékában mTORC2 aktivitásra utaló emelkedett p-Ser473-Akt és Rictor expresszió is jellemezte az IDH vad típusú, rosszabb prognózisú gliomákat. Az IDH mutáns esetekben pedig fokozott glutamináz enzim (GLS) expressziót tapasztaltunk, ami a 2HG onkometabolit termeléssel függ össze. Végül a bemutatott és a gliomákban általánosan jellemző szukcinát-szemialdehid-dehidrogenáz (SSADH) fokozott expresszió metabolikus jelentősége, hogy alternatív szubsztráthasznosítási lehetőséget biztosít a glioma sejteknek. Az immunhisztokémiai reakcióban a másodlagos peroxidáz jelölt ellenanyagok előhívásához DAB kromogént (barna) majd hematoxilin háttérfestést alkalmaztunk, a metszetek digitalizálása után az értékelésekhez Panoramic Viewer programot használtunk (nagyítást feltüntettük).

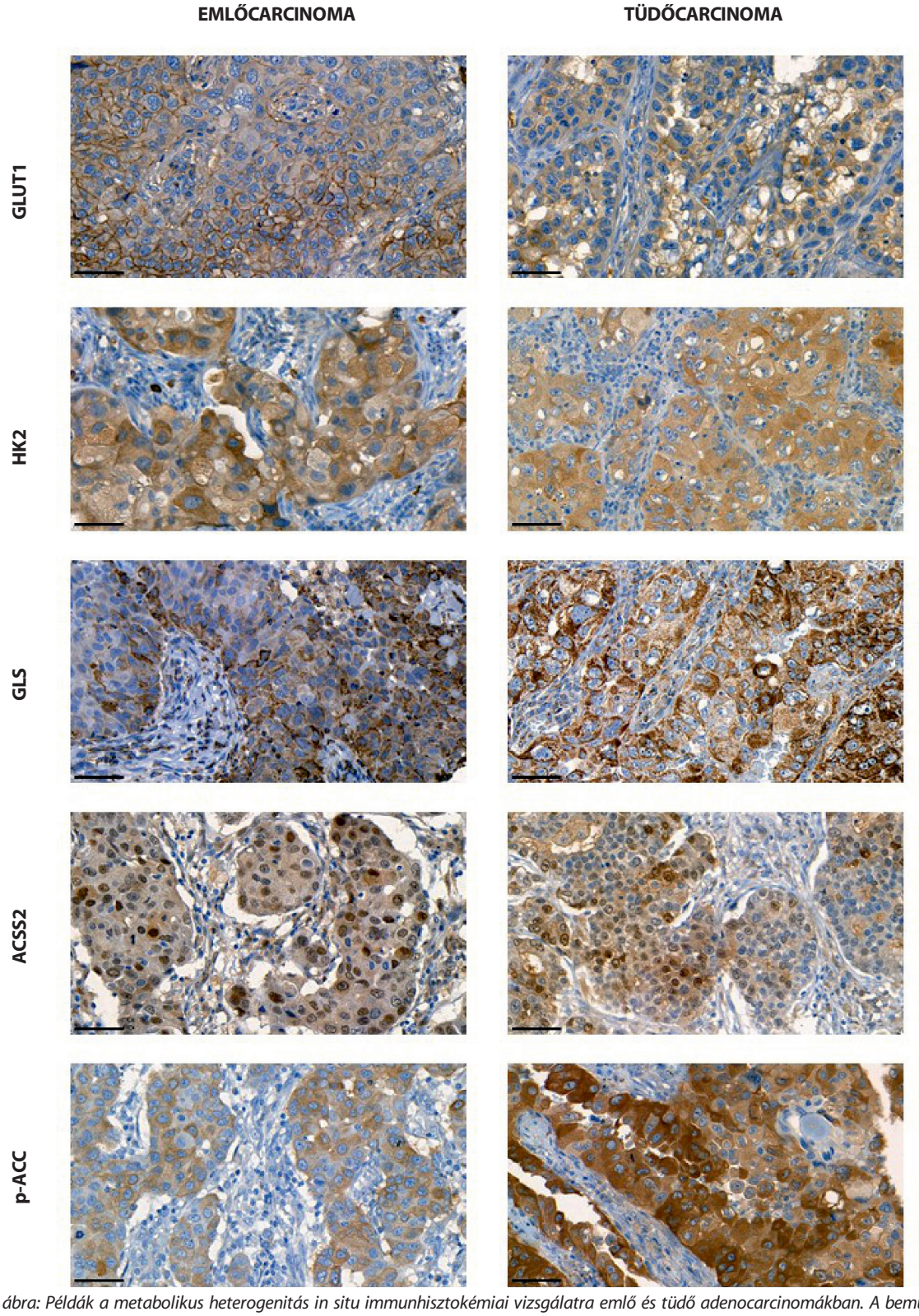
nációs kezelésekben a megnövekedett szenzitivitás hátterében a monoterápiás alkalmazkodással összefüggő útvonalak gátlása, a metabolikus adaptáció gátlása lehet. A TMZ kombinációk között a rapamycin ismert potenciális érzékenyítő hatása mellett, a doxycycline és chloroquine hatásait is megfigyeltük. Előbbi három kezelés kombinációi szignifikánsan csökkentették a gliomasejtek proliferációját TMZ-dal és más metabolikus gátlószerekkel kombinációban is *(5. ábra)*. Az egyik leghatásosabb kombinációt, a rapamycin + doxycycline kezelést több (közel 30) carcinoma sejtvonal esetében is vizsgáltuk, azok 2/3-ában hasonlóan effektív tumornövekedést gátló hatásokat figyeltünk meg.[39] Előbbiek alapján az adott sejtvonalakban megfigyelt fehérje expresszió különbségek jelentőségét humán gliomák IHC vizsgálatával erősítettük meg (*IDH* vad, illetve mutáns gliomák metabolikus jellemzése), kimutattuk: a) a gliomák jelentős SSADH expresszióját, b) *IDH* vad típusú gliomák jelentős mTOR-mTORC2 aktivitását, illetve c) *IDH* mutáns esetek extrém magas GLS fehérje expresszióját *(6. ábra)* (40). Eddigi vizsgálatainkat további metabolikus festésekkel és esetekkel kiegészítve még átfogóbb képet kaphatunk a gliomák potenciálisan akár targetálható *in situ* metabolikus jellegzetességeiről.

Más malignitások metabolikus heterogenitása

A lymphangioleiomyomatosis (LAM) a tüdő rendkívül ritka daganata, TSC1/2 mutációval és mTOR hiperaktivitással a háttérben. Munkánkban az ismert



7. ábra: Metabolikus enzimek (ATPB, β-F1-ATP-áz; GLUT1, glükóz-transzporter 1; GAPDH, glicerinaldehid-3-foszfát-dehidrogenáz; GLS, glutaminináz; MCT1, monokarboxilát-transzporter-1; ACSS2, acetil-KoA-szintetáz; CPT1A, karnitin-palmitoiltranszferáz-1A), mTOR-aktivitás (p-S6, Rictor) és LAM markerek (SMA, α simaizom aktin; β-katenin) expressziója lymphangioleiomyomatosisban. A bemutatott 39 éves nőbeteg egyike a vizsgált eseteinknek, kétoldali tüdőtranszplantációt követően az explantált tüdőben látható LAM nodulusokban (↙) és kontrollként a bronchialis és vaszkuláris (*) simaizomsejtekben mutatjuk be a fenti fehérjék expresszióját. A fokozott mTORC1-aktivitásra utaló emelkedett p-S6 expresszió mellett a Rictor (mTORC2 komplex karakterisztikus eleme) expressziója is magasabb a LAM-sejtekben, mint a kontroll simaizomsejtekben. Ez a LAM-sejtek mTORC2 aktivitásának jelentőségére hívja fel a figyelmet. A metabolikus fehérjék közül a GLUT1 és a β-F1-ATPáz expressziójában nem figyeltünk meg szignifikáns különbséget; a GLS, az MCT1, az ACSS2 és a CPT1a fokozott expressziója viszont arra utal, hogy a glutaminolízis, az acetát-hasznosítás és a zsírsavak β-oxidációja kiemelt fontosságú a LAM-sejtek metabolizmusában. A nagyításhoz megadott skála 100 μm, a reakcióban kromogénként DAB-ot (barna) használtunk.



8. ábra: Példák a metabolikus heterogenitás in situ immunhisztokémiai vizsgálatra emlő és tüdő adenocarcinomákban. A bemutatott reprezentatív képeken megfigyelhető a GLUT1 (glükóz-transzpoter-1), a HK2 (hexokináz-2, glikolízis enzim), a GLS (glutamináz), az ACSS2 (acetil-KoA-szintetáz-2, az acetáthasznosítás fontos enzime) és a p-ACC (az acetil-KoA karboxiláz AMPK által foszforilált, ezáltal inaktivált formája) heterogén festődési mintázata. A GLS a mitokondriális lokalizáció miatt jellegzetes granuláris festődést mutat. Az ACSS2 esetén a heterogenitás nemcsak a citoplazmatikus, hanem a magi expresszió esetén is megfigyelhető. Az ACSS2 a citoplazmában az acetát citrátköri hasznosításához járul hozzá, a sejtmagba traszlokálódva viszont különböző epigenetikai – elsősorban hiszton-acetilációval összefüggő – folyamatokban játszhat fontos szerepet. A nagyításhoz megadott skála 50 μm, a reakcióban kromogénként DAB-ot (barna) használtunk.

magas mTOR aktvitás mellett az esetek felében magas mTORC2 aktivitást igazoltunk. Eredményeink érdekessége, hogy ezzel összefüggésben alacsony glikolitikus enzim expressziók mellett, jelentős *in situ* GLS, CPT1A és MCT, valamint ACSS2 fehérje expressziót írtunk le, ami terápiásan is célozható glutamin és acetát hasznosítást jelent *(7. ábra)*.[41] Ez alátámasztja annak lehetőségét, hogy az mTOR-gátlók hatását egyes bioenergetikai folyamatok gátlása segítheti. A glioma és a LAM-sejtek *in situ* vizsgálataiban megfigyelt különbségek más daganatok intratumorális metabolikus heterogenitásában még kifejezettebb *(8. ábra)*, ezek jellemzése és a heterogenitás adott tumorok terápia rezisztenciájában játszott szerepe további vizsgálatokat igényel a jövőben.

Konklúzió

Adott tumorok metabolikus jellemzését, metabolikus támadáspontjainak meghatározását segítő, majd a metabolikus gátlószerek tumornövekedés-gátló hatásait tesztelő vizsgálatok, klinikai fázisvizsgálatok nagy számban indulnak. A tumormetabolizmussal foglalkozó közlemények száma, idézettsége nő, folyóirat szekciók és különszámok szerkesztése történik egyre nagyobb érdeklődés mellett a témakörben. Tumormetabolizmus konferenciák szerveződnek; társaságok, egyesületek és divíziók alakulnak Európa és világszerte. Reménykedhetünk, hogy a jövőben ezeknek a jelenleg még inkább alapkutatási, de egyre növekvő számban klinikai vizsgálatoknak hamarosan pozitív terápiás eredményei lesznek.

Irodalom

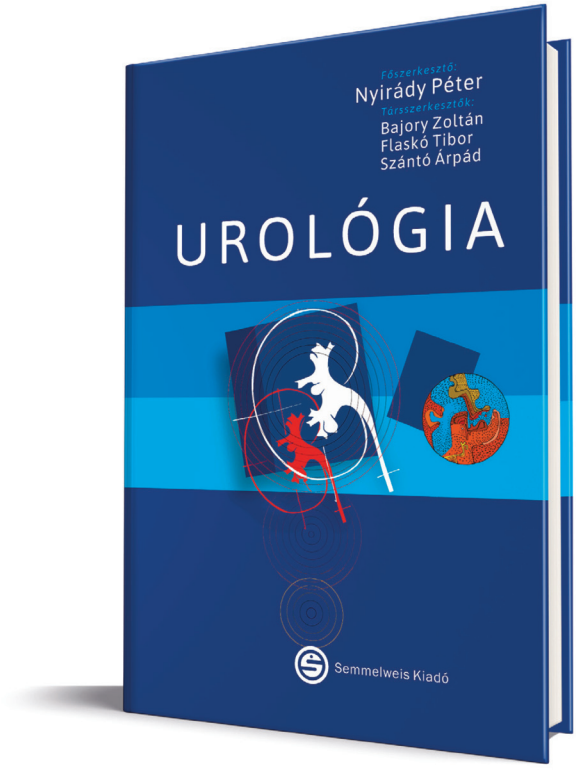
1. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. Cell. 2011; 144(5):646-74.
2. McGranahan N, Swanton C. Clonal Heterogeneity and Tumor Evolution: Past, Present, and the Future. Cell. 2017; 168(4):613-28.
3. Warburg O, Wind F, Negelein E. The metabolism of tumors in the body. J. Gen. Physiol. 1927; 8:519-30.
4. de la Cruz-López KG, Castro-Muñoz LJ, Reyes-Hernández DO, García-Carrancá A, Manzo-Merino J. Lactate in the Regulation of Tumor Microenvironment and Therapeutic Approaches. Front Oncol. 2019; 9:1143.
5. Verwer EE, Kavanagh TR, Mischler WJ, Feng Y, Takahashi K, Wang S, et al. [(18)F]Fluorocholine and [(18)F]Fluoroacetate PET as Imaging Biomarkers to AssessPhosphatidylcholine and Mitochondrial Metabolism in Preclinical Models of TSC and LAM. Clin Cancer Res. 2018; 24 (23):5925-38.
6. Jia D, Park JH, Jung KH, Levine H, Kaipparettu BA. Elucidating the Metabolic Plasticity of Cancer: Mitochondrial Reprogramming and Hybrid Metabolic States. Cells. 2018; 7(3):21.
7. Hoxhaj G, Manning BD. The PI3K-AKT network at the interface of oncogenic signalling and cancer metabolism. Nat Rev Cancer. 2020; 20(2):74-88.
8. Keenan MM, Chi JT. Alternative fuels for cancer cells. Cancer J. 2015; 21(2):49-55.
9. Vučetić M, Cormerais Y, Parks SK, Pouysségur J. The Central Role of Amino Acids in Cancer Redox Homeostasis: Vulnerability Points of the Cancer Redox Code. Front Oncol. 2017; 7:319.
10. Ward PS, Thompson CB. Metabolic reprogramming: a cancer hallmark even warburg did not anticipate. Cancer Cell. 2012; 21(3):297-308.
11. Cucchi D, Camacho-Muñoz D, Certo M, Pucino V, Nicolaou A, Mauro C. Fatty acids - from energy substrates to key regulators of cell survival, proliferation and effector function. Cell Stress. 2019; 4(1):9-23.
12. Lambert AW, Pattabiraman DR, Weinberg RA. Emerging Biological Principles of Metastasis. Cell. 2017; 168(4):670-91.
13. Saxton RA, Sabatini DM. mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. Cell. 2017; 168(6):960-76.
14. Herzig S, Shaw RJ. AMPK: guardian of metabolism and mitochondrial homeostasis. Nat Rev Mol Cell Biol. 2018; 19(2):121-35.
15. McGuirk S, Audet-Delage Y, St-Pierre J. Metabolic Fitness and Plasticity in Cancer Progression. Trends Cancer. 2020; 6(1):49-61.
16. Morin A, Letouzé E, Gimenez-Roqueplo AP, Favier J. Oncometabolites-driven tumorigenesis: From genetics to targeted therapy. Int J Cancer. 2014; 135(10):2237-48.
17. Khatami F, Payab M, Sarvari M, et al. Oncometabolites as biomarkers in thyroid cancer: a systematic review. Cancer Manag Res. 2019; 11:1829-41.
18. Frezza C. The role of mitochondria in the oncogenic signal transduction. Int J Biochem Cell Biol. 2014; 48:11-7.
19. Leather T, Jenkinson MD, Das K, Poptani H. Magnetic Resonance Spectroscopy for Detection of 2-Hydroxyglutarate as a Biomarker for IDH Mutation in Gliomas. Metabolites. 2017; 7(2):29.
20. Stein EM, DiNardo CD, Fathi AT, Pollyea DA, Stone RM, Altman JK, et al. Molecular remission and response patterns in patients with mutant-IDH2 acute myeloid leukemia treated with enasidenib. Blood. 2019; 133(7):676-87.
21. Liu Y, Cao Y, Zhang W, Bergmeier S, Qian Y, Akbar H, et al. A small-molecule inhibitor of glucose transporter 1downregulates glycolysis, induces cell-cycle arrest, and inhibits cancer cell growth in vitro and in vivo. Mol Cancer Ther. 2012; 11(8):1672-82.
22. Fan T, Sun G, Sun X, Zhao L, Zhong R, Peng Y. Tumor Energy Metabolism and Potential of 3-Bromopyruvate as an Inhibitor of Aerobic Glycolysis: Implications in Tumor Treatment. Cancers (Basel). 2019; 11(3):317.
23. Mossmann D, Park S, Hall MN. mTOR signalling and cellular metabolism are mutual determinants in cancer. Nat Rev Cancer. 2018; 18(12):744-57.

24. Kuntz EM, Baquero P, Michie AM, Dunn K, Tardito S, Holyoake TL, et al. Targeting mitochondrial oxidative phosphorylation eradicates therapy-resistant chronic myeloid leukemia stem cells. Nat Med. 2017; 23(10): 1234-40.
25. Scatena C, Roncella M, Di Paolo A, Aretini P, Menicagli M, Fanelli G, et al. Doxycycline, an Inhibitor of Mitochondrial Biogenesis, Effectively Reduces Cancer Stem Cells (CSCs) in Early Breast Cancer Patients: A Clinical Pilot Study. Front Oncol. 2018; 8:452.
26. Pryor R, Cabreiro F. Repurposing metformin: an old drug with new tricks in its binding pockets. Biochem J. 2015; 471(3):307-22.
27. Jacque N, Ronchetti AM, Larrue C, Meunier G, Birsen R, Willems L, et al. Targeting glutaminolysis has anti-leukemic activity in acute myeloid leukemia and synergizes with BCL-2 inhibition. Blood. 2015; 126(11):1346-56.
28. Matés JM, Di Paola FJ, Campos-Sandoval JA, Mazurek S, Márquez J. Therapeutic targeting of glutaminolysis as an essential strategy to combat cancer. Semin Cell Dev Biol. 2020; 98:34-43.
29. Zadra G, Ribeiro CF, Chetta P, Ho Y, Cacciatore S, Gao X, et al. Inhibition of de novo lipogenesis targets androgen receptor signaling in castration-resistant prostate cancer. Proc Natl Acad Sci U S A. 2019; 116(2):631-40.
30. Xu R, Ji Z, Xu C, Zhu J. The clinical value of using chloroquine or hydroxychloroquine as autophagy inhibitors in the treatment of cancers: A systematic review and meta-analysis. Medicine (Baltimore). 2018; 97(46):e12912.
31. Corbet C, Feron O. Emerging roles of lipid metabolism in cancer progression. Curr Opin Clin Nutr Metab Care. 2017; 20(4):254-60.
32. Abou Dalle I, DiNardo CD. The role of enasidenib in the treatment of mutant IDH2 acute myeloid leukemia. Ther Adv Hematol. 2018; 9(7):163-73.
33. Conciatori F, Ciuffreda L, Bazzichetto C, Falcone I, Pilotto S, Bria E, Cognetti F, Milella M. mTOR Cross-Talk in Cancer and Potential for Combination Therapy. Cancers (Basel). 2018; 10(1). pii:E23.
34. Khawaja MR, Nick AM, Madhusudanannair V, Fu S, Hong D, McQuinn LM, Ng CS, Piha-Paul SA, Janku F, Subbiah V, Tsimberidou A, Karp D, Meric-Bernstam F, Lu KH, Naing A. Phase I dose escalation study of temsirolimus in combination with metformin in patients with advanced/refractory cancers. Cancer Chemother Pharmacol. 2016; 77(5):973-7.
35. Haas NB, Appleman LJ, Stein M, Redlinger M, Wilks M, Xu X, et al. Autophagy Inhibition to Augment mTOR Inhibition: a Phase I/II Trial of Everolimus and Hydroxychloroquine in Patients with Previously Treated Renal Cell Carcinoma. Clin Cancer Res. 2019; 25(7): 2080-7.
36. Gates SC, Sweeley CC. Quantitative metabolic profiling based on gas chromatography. Clin Chem. 1978; 24(10):1663-73.
37. Jeney A, Hujber Z, Szoboszlai N, et al. Characterisation of bioenergetic pathways and related regulators by multiple assays in human tumour cells. Cancer Cell Int. 2016; 16:4.
38. Hujber Z, Horváth G, Petővári G, et al. GABA, glutamine, glutamate oxidation and succinic semialdehyde dehydrogenase expression in human gliomas. J Exp Clin Cancer Res. 2018; 37(1):271.
39. Petővári G, Hujber Z, Krencz I, et al. Targeting cellular metabolism using rapamycin and/or doxycycline enhances anti-tumour effects in human glioma cells. Cancer Cell Int. 2018; 18:211.
40. Petővári G, Dankó T, Krencz I, et al. Inhibition of Metabolic Shift can Decrease Therapy Resistance in Human High-Grade Glioma Cells. Pathol Oncol Res. 2020; 26(1):23-33.
41. Krencz I, Sebestyen A, Papay J, Jeney A, Hujber Z, Burger CD, Keller CA, Khoor A. In situ analysis of mTORC1/2 and cellular metabolism-related proteins in human Lymphangioleiomyomatosis. Hum Pathol. 2018; 79:199-207.

SEMMELWEIS KIADÓ SZAK- ÉS TANKÖNYVEI

Urológia

Könyveink megvásárolhatók a Legendus Könyvesboltban, illetve a Líra Kereskedelmi hálózaton belül az egész országban, de egyre nagyobb igényt elégít ki webshopunk.



Nyirády Péter (főszerk.)

UROLÓGIA

- A könyv teljes konszenzust képvisel a négy orvosegyetem urológia oktatásában.
- Célja a graduális és posztgraduális oktatás, az európai színvonalú tudás átadása a legkorszerűbb urológiai betegellátás érdekében.

Jelen tankönyv célja az orvostanhallgatók oktatásán túl, egy olyan magyar nyelvű könyv szerkesztése és megírása volt, mely alapjául szolgál az európai színvonalú tudás megszerzésében és segítséget nyújt szakorvos kollégáinknak is a legkorszerűbb betegellátásban.

Könyvünket abban a reményben indítjuk útjára, hogy forgatása közben, a kedves olvasó, értékelni fogja munkánkat és majd segítségül szolgál az urológia szépségeinek megismerésében és elmélyítésében. Szolgáljon ezen tudás a magyar betegek gyógyításának magas színvonalú művelésére

396 oldal ■ Ára: 7000 Ft

Semmelweis Kiadó
1089 Budapest, Nagyvárad tér 4.
www.semmelweiskiado.hu

LEGENDUS KÖNYVESBOLT
1089 Budapest, Nagyvárad tér 4.
Tel.: 210-4408, 459-1500/56353
Nyitva tartás: H–Sz: 9.00–16.00,
Cs: 9.00–18.00, P: 9.00–14.00
E-mail: info@semmelweiskiado.hu

Bélmikrobiom jelentősége daganatos betegségek kialakulásában, szűrésében és kezelésében

The significance of intestinal microbiome in the development, screening and treatment of cancer

Tóth Eszter[1], Novák János[1], Barna Boglárka[1,2], Szabó Dóra[3], Kiss Richárd[1,4]

[1] Medipredict Kft, Budapest

[2] Élettani, Szervezettani és Idegtudományi Tanszék, Szegedi Tudományegyetem, Természettudományi és Informatikai Kar, Szeged

[3] Orvosi Mikrobiológiai Intézet, Semmelweis Egyetem, Budapest

[4] I. Sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet, Semmelweis Egyetem, Budapest

E-levél: kiss.richard@med.semmelweis-univ.hu

ÖSSZEFOGLALÁS A szervezet mikrobiális közösségei már régebb óta ismertek, azonban részletes vizsgálatuk csak az újgenerációs szekvenálás elterjedésével vált lehetségessé. Ezen közösségek közül a bélmikrobiom szerepe a leginkább ismert, eltéréseit számos betegség esetében leírták, és az immunrendszert befolyásoló funkciója is igen kutatott terület. A bélmikrobiom diszbiózisa nem csak a lokális szöveti környezetre, hanem távoli szervekre is hatással van mikrobiális metabolitok termelésén és az immunrendszer modulációján keresztül, ezáltal számos szerv daganatos megbetegedésében is szerepet játszhat. A vastagbélben lokális pro-inflammatorikus hatás, genotoxikus hatású metabolitok termelése és a tumorellenes immunitás csendesítése révén szerepe lehet kolorektális carcinoma kialakulásában. A bakteriális eredetű antigének és metabolitok a portális vénába kerülve a májban is elősegíthetik a karcinogenezist, szisztémás keringésbe jutva pedig távoli szervek, mint például a tüdő daganatos megbetegedéseinek kialakulását is serkenthetik. A bélmikrobiom enzimatikus aktivitásából kifolyólag hormonok szintjét is befolyásolhatja, ezzel hozzájárulva például emlő vagy prosztata daganat kialakulásához. Bizonyos esetekben ismertek ugyan a betegségre jellemző mikrobiális mintázatok, a pontos összefüggések a daganat megjelenése és a mikrobiom eltérései között azonban még feltárásra várnak. A mikrobiom változásai hatással lehetnek továbbá a daganatellenes kezelések hatásosságára és toxicitásuk mértékére is. Mindezek alapján felmerül a mikrobiom moduláció lehetősége, mint kiegészítő kezelés, azonban ehhez további kutatások szükségesek.

KULCSSZAVAK mikrobiom, diszbiózis, karcinogenezis, metagenom

SUMMARY The detailed investigation of the human microbial communities has only become possible with the emergence of next generation sequencing. The role of the gut microbiome has been extensively investigated, its alterations have been described in multiple diseases, and its function of influencing the immune system is well known. Intestinal microbiome dysbiosis affects the local tissue environment as well as distant organs via the production of microbial metabolites and immunomodulation, thereby playing a role in carcinogenesis. In the colon, local pro-inflammatory effects, production of genotoxic metabolites, and silencing of antitumoral immunity contributes to the development of colorectal carcinoma. Bacterial antigens and metabolites can also promote carcinogenesis in the liver through the portal vein and they can also stimulate cancer development in distant organs such as the lung via the systemic circulation. Intestinal microbiome can also affect hormone levels; therefore, it can contribute to breast and prostate cancer development. In some cases, although the microbial patterns are characteristic of the disease, the nature of the correlations are unknown. Microbiome changes similarly affect the efficacy and toxicity of anti-tumor treatments. Based on the available information, modulation of the microbiome arises as a potential adjunct treatment, but further research is still needed.

KEY WORDS microbiome, dysbiosis, carcinogenesis, metagenome

Bevezetés

A fejlett molekuláris genetikai módszerek, így az újgenerációs szekvenálás (NGS) megjelenése új távlatokat nyitott a daganatos sejtek szomatikus és a betegségben érintettek csíravonali genetikai eltérései mellett a szervezetben élő mikroorganizmusok, illetve azok génjeinek vagyis a mikrobiom feltérképezésében is. A mikrobiomkutatás viszonylag fiatal tudományterületnek tekinthető, holott az emberi szervezettel együtt

Rövidítések

GVHD	*graft-versus host betegség*
HCC	*hepatocelluláris carcinoma*
LPS	*lipopoliszacharid*
MAMP	*mikrobaasszociált molekuláris mintázat*
NGS	*újgenerációs szekvenálás*
NKT	*természetes ölő T-sejt*
PDAC	*hasnyálmirigy duktális adenocarcinoma*
Th	*T helper sejt*
TLR	*Toll-like receptor*
Treg	*regulátor T-sejt*

élő komplex mikrobiális közösségekről évtizedekkel ezelőtt tudomást szereztünk. Az elmúlt években ez a terület egyre nagyobb figyelmet kap, a PubMed adatbázisában 2016–2020 között több mint 54 000 cikk született a témában.

A kutatások alapján a mikrobiom zavarai egyértelmű kapcsolatot mutatnak számos betegséggel, mint például a gyulladásos bélbetegségek, májbetegségek, pszichés rendelleneségek, autoimmun megbetegedések, metabolikus szindróma, illetve számos daganatos betegség.[1] Az eredmények alapján napjainkra egyértelművé vált, hogy bizonyos mikroorganizmusok növelhetik vagy adott esetben csökkenthetik egyes daganatok kialakulásának valószínűségét. Ezen kívül szolgálhatnak biomarkerként, illetve befolyásolhatják a daganatellenes kezelések hatásosságát, valamint a toxicitás mértékét is. Mindezen hatások a mikrobiom élettani szerepéből és immunrendszert befolyásoló tulajdonságaiból adódnak.

Mikrobiom jelentősége

Mikrobiális közösségek számos testtájon előfordulnak. Megtalálhatók a szájüreg és a hüvely nyálkahártyáján, a bőrön és a bélrendszerben egyaránt. A különböző lokációkban eltérő környezeti hatások érik a mikroorganizmusokat, ezért az egyes területeken más és más összetételű közösségek képesek fennmaradni mutualista kapcsolatot kialakítva a szervezettel. Összetételük az egyének között, egyazon anatómiai lokációban is nagy változatosságot mutat, a földrajzi helyzet, életmód, diéta és gyógyszerek egyaránt befolyásolják.[1] Ezen mikrobiális közösségek közül a bélmikrobiom a legintenzívebben kutatott.

Jelenleg még nem ismert, milyen az egészségesnek tekinthető bélmikrobiom összetétele, azonban ezen mikrobiális közösség kórosnak tekinthető állapotai egyre inkább körvonalazódnak. Kóros esetekben felborul az egyes fajok közötti egyensúly, vagyis diszbiózis alakul ki, melynek jellemzője a mikrobiális diverzitás csökkenése, illetve jelentős eltolódás a rezidens fajok arányában. Ennek a folyamatnak közismert példája a *Clostridioides difficile* infekció, melynek során jellemzően antibiotikus kezelés követően a rezidens fajok számának csökkenése a bél mikrokörnyezet változásához vezet, mely lehetővé teszi a *C. difficile* elszaporodását, ami pseudomembranosus colitishez vezethet.[2] A diszbiózis a béltraktusban gyulladásos jelátviteli útvonalakat aktiválhat, amely a lokális hatáson túl a szisztémás immunfunkciókat is befolyásolhatja, valamint a keringésbe jutó mikrobiális metabolitokon keresztül kihathat távoli szervek működésére is. Utóbbi esetre példa a cardiovascularis betegségek egy, az elmúlt években leírt metabolomikai biomarkere, a trimetilamin-oxid, melynek mennyiségére a bélmikrobiom direkt hatással van, ugyanis prekurzorát a bél mikroorganizmusai állítják elő diétával bevitt kolinból.[3]

Mivel a test normál működése sok ponton kapcsolódik a mikrobiomhoz, ha zavar lép fel a szervezetben, az hatással van a mikrobiom összetételére is; ezzel párhuzamosan, ha a mikrobiomot éri változás, az kihathat a szervezetünk működésére. Az ismert kapcsolódási pontoknál a legtöbb esetben nem tisztázott az ok-okozati összefüggés, vagyis nem egyértelmű, hogy a mikrobiális változás okozza a betegséget, vagy a betegség a mikrobiális változást. Jelenleg a bélmikrobiom legjelentősebbnek tűnő kapcsolódási pontjai az immunrendszerrel ismertek.

Mikrobiom szerepe az immunitásban

Számos bizonyíték utal arra, hogy a mikrobiom fontos szerepet játszik az immunitás formálásában és finomhangolásában. A bél mikrobiális közössége indukálja a kommenzalista bélflórával szembeni toleranciát, valamint részt vesz az immunrendszer „tanításában" is.

A veleszületett immunitás és a mikrobiom folyamatos interakcióban vannak egymással. Egérmodellben végzett kísérletek azt mutatják, hogy a mikrobiom összetétele, valamint a mikrobák béltraktuson belüli térbeli elhelyezkedése szabja meg a tolerogén vagy gyulladásos immunválasz kialakulását.[4]

A mikrobák felismerését a mintázatfelismerő receptorok teszik lehetővé, ahová például a *Toll-like* receptorok (TLR) vagy a Nod1 is tartoznak. A TLR2 receptoron kapcsolódó bakteriális szignálok, mint például a *Bacteroides fragilis* poliszacharid-A vagy a *Bifidobacterium breve*, gyulladásgátló jelátvitelt indukálnak és a regulátor T-sejtek (Treg) differenciálódását segítik elő.[4] A béltraktusból származó mikrobiális szignáloknak szisztémás hatása is van a természetes immunitás működésére. Például a bakteriális peptidoglikán átkerülhet a szisztémás keringésbe, ahonnan közvetlenül serkentheti a csontvelői neutrophil granulocyta érést a Nod1-receptor aktivációján keresztül.[5]

A szerzett immunitás szabályozásában is részt vesz a bél bakteriális közössége. Egerekben végzett kísérletek alapján az adaptív immunitás elemeinek korai éré-

se függ a mikrobiomtól, annak hiányában vagy nem megfelelő összetétele esetén immundefficienciák alakulnak ki.[6]

Az éretlen CD4+ T-sejtek differenciálódása során két fő típus keletkezhet: a *helper* (Th1, Th2, Th17) és a *regulátor* T-sejtek, melyek érésében fontos szerepe van a mikrobiomnak, melynek tagjai, azon belül is főleg a szegmentált fonalas baktériumok, indukálják a Th17-sejtek érését.[7] Steril egerekben, ahol a mikrobiom teljesen hiányzik, a Th1/Th2 egyensúly felborulása, Th2-túlsúly is megfigyelhető, amely allergiás betegségek esetén jellemző. Ismert továbbá, hogy a *Bacteroides fragilis* eredetű poliszacharid-A képes indukálni a Th1- és Treg-sejtek érését.[8] A B-sejtek érésének elsődleges helye felnőtt korban a csontvelő, azonban korai életszakaszban a bélfal lamina propriájában is végbemegy a B-sejt-differenciáció, ahol a kommenzalista bélbaktériumok szabályozása alatt áll, és amely folyamat befolyásolja a bél nyálkahártya későbbi immunoglobulin készletét is.[9]

A mikrobiom tagjai képesek tolerogén környezetet indukálni, ezzel biztosítva saját túlélésüket. Az egyes fajok direkt hatásán túl az általuk termelt mikrobiális metabolitok, mint például a butirát, is képesek csökkenteni a gyulladás mértékét. A homeosztázis fenntartása azonban ennél egy lényegesen bonyolultabb folyamat, amelynek szükséges része a kismértékű gyulladásos válasz. Például egészséges mikrobiom esetén az abból származó lipopoliszacharidok (LPS), valamint az epesó-dekonjugációból származó taurin egy gyulladásos kaszkádot indukál az NLRP6 inflammaszóma aktiválásán keresztül, amely hatására az epithelsejtek antimikrobiális peptidek és a pro-inflammatorikus interleukin-18 termelésébe kezdenek, így szabályozva a bélbaktériumok szaporodását. Amennyiben a mikrobiom összetétele megváltozik, a bélflóra által túltermelt biogén aminok gátolják ezt a jelátviteli kaszkádot, és a homeosztázis felborulása révén gyulladást eredményeznek.[10] A fent említett LPS talán a legismertebb bakteriális molekulák közé tartozik, a bélfalon átjutva szisztémás gyulladás kialakítására is képes, illetve egyes közlemények szerint támogathatja egyes tumorok metasztázis képzését.[11] Az LPS azonban csak a bélfal megnövekedett áteresztőképessége esetén juthat a véráramba, mely diszbiózis és gyulladás következményeként alakulhat ki.[12] A mikrobiom ezen lokális gyulladást és szisztémás immunválaszt moduláló hatása karcinogenezishez is vezethet.

Mikrobiom és a karcinogenezis

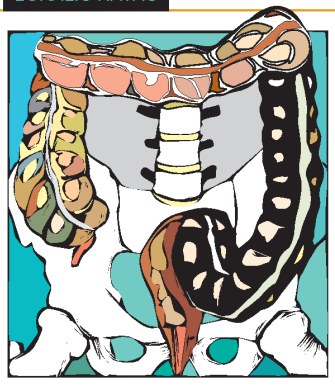
Daganatos betegségekre való hajlamot, illetve a már kialakult betegség előrehaladását elsősorban genetikai és a környezeti tényezők egymásra gyakorolt hatásai befolyásolják. A környezeti hatások néhány jól ismert összefüggésen kívül még tisztázásra várnak, ezek közé sorolhatók a szervezet mikrobiális közösségei is. A mikrobiom a daganatos betegségekre elsősorban a gyulladásos folyamatok modulálásán, genomikus stabilitás befolyásolásán és epigenetikai változások indukálásán keresztül fejti ki a hatását. Ez a hatás szintén lehet közvetlen vagy közvetett. Közvetlen hatás esetén a mikrobiom fizikai kapcsolatba kerül a szövettel és arra lokálisan hat, míg közvetett hatás során fizikailag távol lévő szövetekre/szervekre fejt ki hatást, például rendszerszintű gyulladásos folyamatok vagy metabolitok révén *(1. ábra)*.

A mikrobiom daganatkeltő hatására a legismertebb és legkorábban felfedezett példák a *Salmonella typhi* epeúti rákban és a *Helicobacter pylori* gyomorrákban. Utóbbi az Egészségügyi Világszervezet által I. osztályú karcinogénnek minősített, ugyanis lokális proinflammatorikus és direkt genotoxikus hatása miatt jelenléte gyomor adenocarcioma és mucosaasszociált lymphaticus szöveti lymphoma (MALT lymphoma) kialakulásához vezethet.[13] Újabb fajok szerepének igazolását a karcinogenezisben a molekuláris genetikai vizsgálómódszerek megjelenése tette lehetővé.

Mikrobiom vizsgálata

A mikrobiom és a szervezet kapcsolatának vagy éppen a mikrobiom betegségekben betöltött szerepének vizsgálatára többféle kísérleti elrendezés is használt. Mint minden tudományterületen, itt is fontos adatokat szolgáltatnak az állatkísérletekből származó eredmények. Az invazív beavatkozást nem igénylő kutatások – mint a széklet- vagy nyálminták vizsgálata – humán kohorszokat is használnak. Ilyenkor elsősorban egy bizonyos betegségben szenvedő, valamint egészséges alanyok mikrobiom összetételét hasonlítják össze, de szép számmal találhatunk longitudinális kutatásokból származó adatokat is, melyek a mikrobiom változását követik nyomon a betegség előrehaladtával. Mindkét kísérleti elrendezésből értékes információk nyerhetők, azonban az adatok értelmezése és a konklúziók leszűrése során fontos figyelembe vennünk a vizsgálati

LOKÁLIS HATÁS



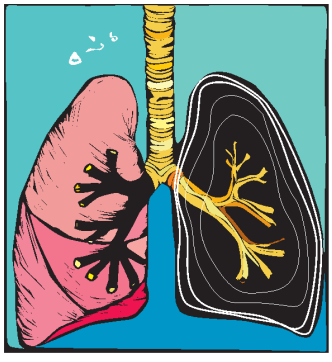
antitumorális immunfunkciók gyengítése

genotoxikus metabolitok termelése

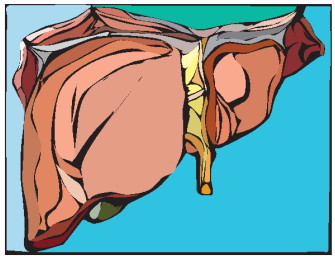
reaktív oxigén szabad gyökök termelése

krónikus gyulladásos állapot kialakítása

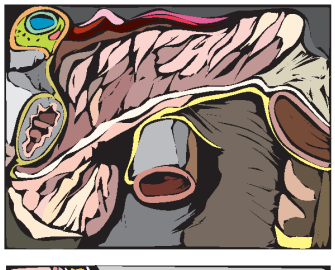
TÁVOLI HATÁS



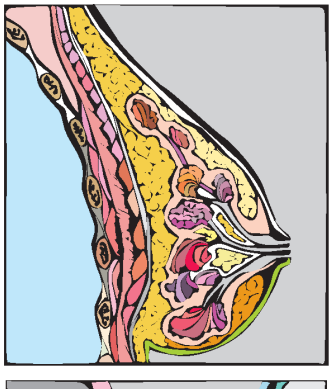
- LPS- és TNFα-hatást közömbösítő organizmusok szintjének csökkenése
- jellemző mikrobális mintázatok, de döntően ismeretlen mechanizmusok



- direkt bakteriális eredetű antigén és metabolithatás a portális vénán keresztül
- antitumorális immunfunkciók gyengítése



- jellemző mikrobális mintázatok, de döntően ismeretlen mechanizmusok



- keringő ösztrogénszint befolyásolása

- antiproliferatív hatású metabolitok csökkenése

1. ábra: Bélmikrobiom lokális és szisztémás hatásai a karcinogenezisre. A bélmikrobiom diszbiózisa különböző mechanizmusokon keresztül befolyásolja a daganatok kialakulását és fejlődését az egyes szervek, mint a vastagbél, tüdő, máj, hasnyálmirigy, emlő és prosztata esetében.

módszertant, mint például a mikrobiom tagjainak azonosítására használt technológiát.

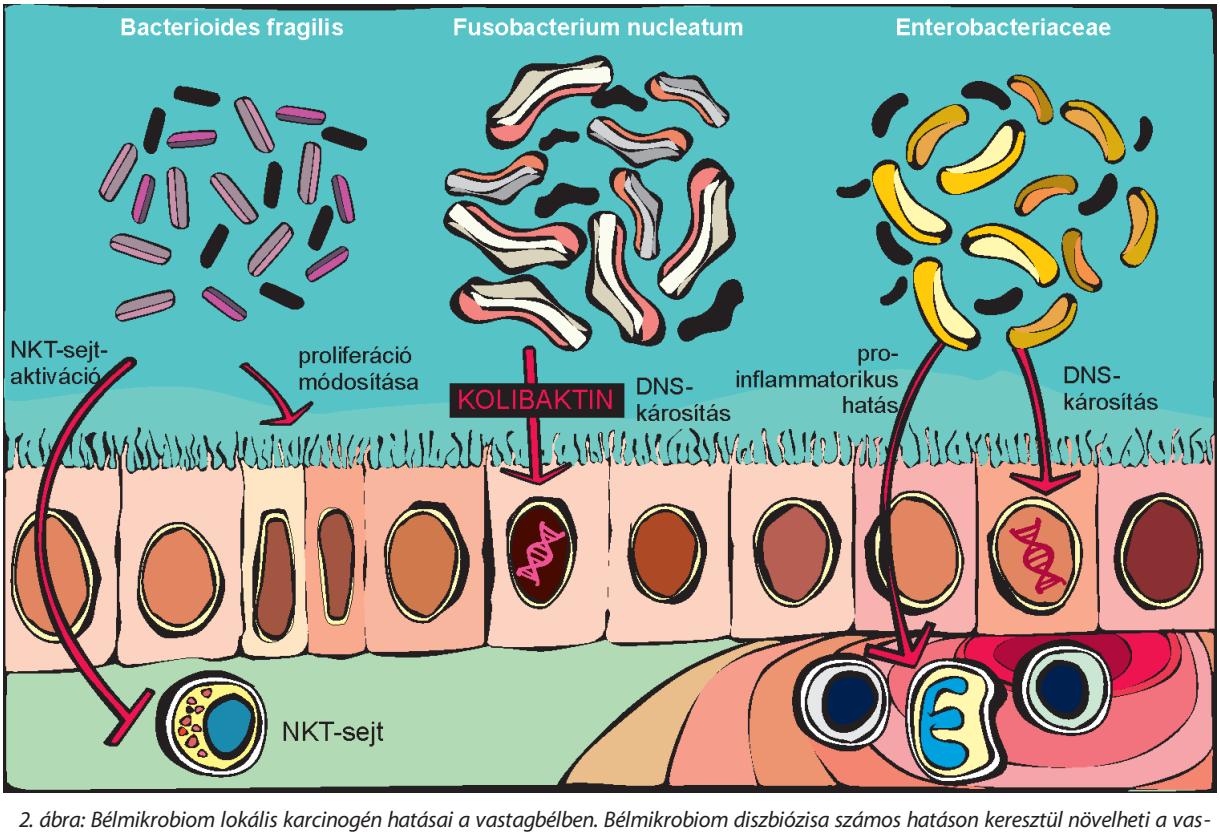
A bélmikrobiomot alkotó organizmusok 80%-a nem tenyészthető, tehát a hagyományos technikákkal nem azonosíthatók, azonban a molekuláris genetikai módszerek fejlődésével ezek a fajok is vizsgálhatóvá váltak. A baktériumok és archeák azonosításában a jelenleg leginkább elterjedt módszer a 16S riboszomális RNS szekvenálás. Ez a régió egy erősen konzervált és egy hipervariábilis genomi szakaszt is tartalmaz, mely lehetővé teszi az egyes mikroorganizmusok azonosítását, azonban legtöbb esetben csupán nemzetség szintig, így a vizsgálati módszer felbontása és a kapott eredmények részletessége alacsonynak tekinthető. Az NGS megjelenésével lehetőség nyílt a teljes közösség genomjának szekvenálására, vagyis a metagenom szekvenálásra, amellyel a mikrobiom minden tagjáról izolátum szintű adatok nyerhetők nagy bizonyosság mellett, valamint az így nyert adatok közvetlenül használhatók a közösség funkcionális elemzésére is.

A mikrobiális közösségek, így a mikrobiom vizsgálatában is a leginkább elterjedt mennyiségi mérőszám a relatív abundancia, mely a közösség tagjainak egymáshoz viszonyított (relatív) arányát határozza meg, vagyis a számszerű (abszolút) mennyiségről ez a mérőszám nem hordoz információt. A mikrobiomkutatásokban használt egyéb mérőszámok meghatározását, mint a diverzitás, összetétel és az egyes fajok jelenléte, ez a megközelítés is lehetővé teszi. A diverzitás, azaz a közösség sokféleségének vizsgálata, egyéni (alfa-diverzitás) vagy csoport szinten (béta-diverzitás) is megtörténhet. Az alfa-diverzitás és az összetétel elemzése rámutathat a közösség egyensúlyának eltolódására, tehát a diszbiózisra. A béta-diverzitás a vizsgálati csoportok, mint például beteg és egészséges csoport közötti különbséget tárja fel. A mikrobiom egyes daganattípusokra gyakorolt hatására is e mérőszámok alapján következtetünk.

Mikrobiom és egyes daganattípusok

Vastagbél

A colorectalis carcinoma (CRC) kialakulását befolyásoló tényezők között a bélmikrobiom szerepe csupán a közelmúltban merült fel. A CRC esetében a mikrobiom lokális hatása dominál a karcinogenezis indukálásában. A pontos mechanizmus néhány baktéri-



2. ábra: Bélmikrobiom lokális karcinogén hatásai a vastagbélben. Bélmikrobiom diszbiózisa számos hatáson keresztül növelheti a vastagbél karcinoma kialakulását, mint például genotoxikus és pro-inflammatórikus metabolitok termelése.

um esetében már tisztázott. A *Fusobacterium nucleatum* például gátolja a daganatos sejtek elpusztításában fontos természetes ölő T-sejtek (NKT) citotoxikus aktivitását, miközben a β-katenin útvonalon keresztül közvetlenül módosítja a hámsejtek proliferációját, így elősegítve a karcinogenezist.[14] Az enterotoxikus *Bacteroides fragilis* által termelt toxin DNS-károsodást, reaktív oxigén szabad gyök termelését és erőteljes Th17-es immunválaszt indukál, amelyek gyulladáshoz és tumorgenezishez vezetnek.[15,16] Az *Enterobacteriaceae* család tagjai által termelt kolibaktin például szintén DNS-károsodást idéz elő *(2. ábra)*.[17]

Feng és mtsai vizsgálataik során arra következtettek, hogy a CRC kialakulásában szerepet játszó bélflóratagok túlszaporodása a vörös húsok túlzott, valamint a zöldségek és gyümölcsök elégtelen mennyiségű fogyasztáshoz köthető.[18] Ezen fajok közül adenóma kialakulásához a *Bacteroides dorei* és a *B. massiliensis* relatív abundanciájának megemelkedése volt köthető, míg a carcinoma kialakulásához, *B. massiliensis, B. ovatus, B. vulgatus* és *Escherichia coli* jelentős emelkedése társult. Ezen felül mind az adenómás, mind a carcinomás betegek esetében igen alacsony volt a tejsav-termelő kommenzalista baktériumok (pl. a *Bifidobacterium* genusz fajai) aránya, melyek elősegíthetnék a vastagbél hámrétegének napi szintű megújulását, és megakadályoznák bizonyos patogének megtelepedését.

A daganat kialakulásában részt vevő fajok és mechanizmusok közül azonban közel sem ismerjük mindegyiket, a humán mintákkal foglalkozó, nagyobb mintaelemszámú vizsgálatok, melyek célja a CRC diagnosztikájában használható biomarkerek azonosítása, még rengeteg kérdést vetnek fel. Ezen döntően metagenom alapú vizsgálatok során genetikai és taxonómiai markereket is figyelembe véve lehetséges olyan mikrobiommintázatok meghatározása, melyek alapján sikerrel különíthetők el a CRC-s betegek az egészségesektől.[19]

Tüdő

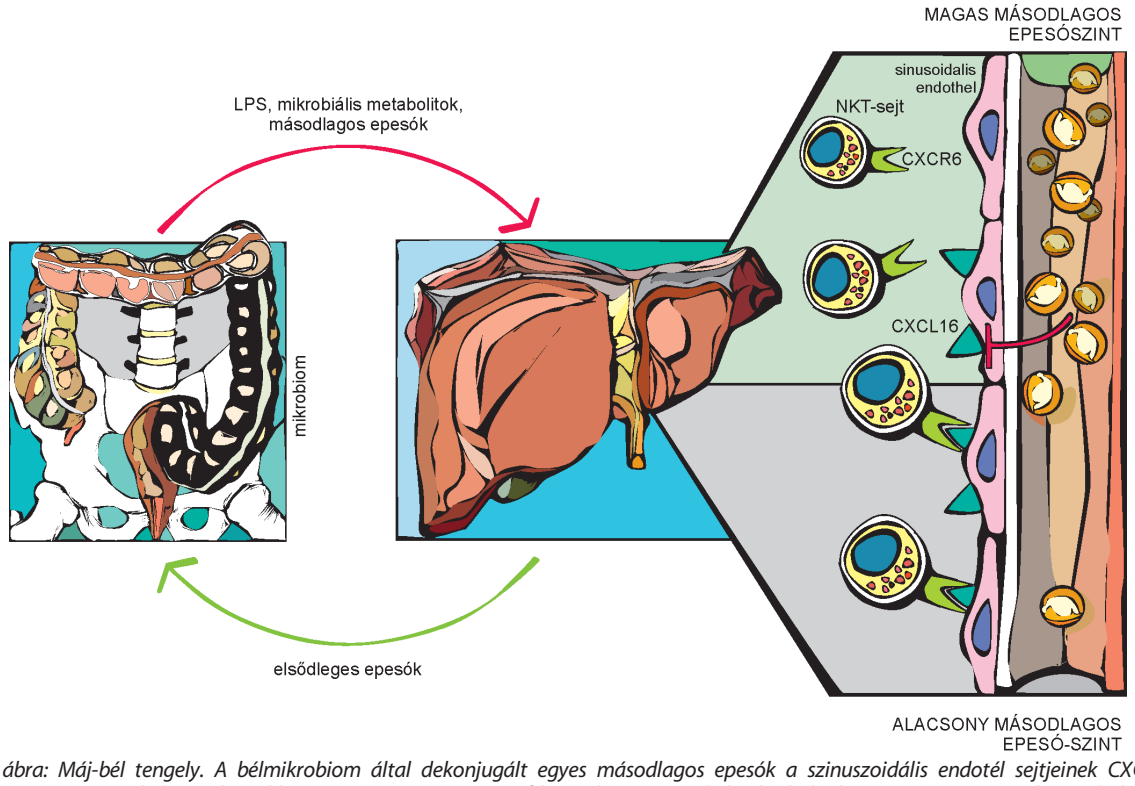
A bélmikrobiom és a tüdőtumorok kapcsolatát az elmúlt néhány évben kezdték el vizsgálni, a korábbi tanulmányok a tüdő saját mikrobiomjának szerepét elemezték a karcinogenezis folyamatában.[20,21] A témában eddig három publikáció jelent meg, a rendelkezésre álló adatok 16S rRNS szekvenálásból származnak, amelyekből a betegség kialakulása és a mikrobiom nemzetség szintű összefüggései vizsgálhatók.[22–24] Mindhárom vizsgálatban egységes eredmény, hogy a daganatos betegek bélflórájában az *Actinobacteria* relatív abundanciája lecsökkent, emellett két vizsgálat eredményei szerint a *Proteobacteria* törzs relatív abundanciája megnőtt.[23,24] Ezeken felül két publikáció eredményei azt mutatják, hogy a Bifidobacterium relatív abundanciája lecsökkent a daganatos betegekben.[22,24] A *Bifidobacterium* fajok képesek bizonyos karcinogének lebontására, valamint a LPS és TNFα által okozott gyulladás csökkentésére.[25,26] Nemrégiben igazolták, hogy a TNFα elősegíti a tüdőrák metasztáziskészségét az epithelium-mesenchyma átjárhatóságának növelésén keresztül.[27] *Liu és mtsai* három tumor biomarker, a citokeratin-19 fragment, a neuronspecifikus enoláz és carcinoembryonalis antigén, valamint a mikrobiom változásának összefüggését vizsgálták tüdőrákos betegekben.[23] A kis egyedszámú kohorszon végzett analízis bizonyos mikrobiális csoportoknál kapcsolatot mutatott a tumormarkerek jelenlétével, a három különböző tumormarker szintjével, valamint eltérő mikrobiális összetételt tárt fel a tüdőrákos és az egészséges kontrollcsoport mikrobiomja között.

Máj

A hepatocelluláris carcinoma (HCC) kialakulásában az elmúlt évek vizsgálatai alapján a bélmikrobiomnak is jelentős szerepe van. Mivel a máj a portalis vénán keresztül közvetlen kapcsolatban van a bélrendszerrel, így elsődleges célpontja a bélmikrobiomjából származó molekuláknak, mint a mikrobaasszociált molekuláris mintázatoknak (MAMP), vagy mikrobiális eredetű metabolitoknak. Normális esetben a bélfal megakadályozza a gyulladáskeltő MAMP-ok, mint például az LPS véráramba jutását, ezzel csökkentve a májra gyakorolt hatásukat. Ha azonban a bélfal áteresztőképessége megnő, például alkoholfogyasztás hatására, az a májban proinflammatorikus folyamatok beindulásához vezethet, ezzel növelve a cirrhosis és a HCC kialakulásának kockázatát.[28,29]

Amennyiben cirrhosis alakul ki, az a máj exokrin funkciójának változásán keresztül visszahat a mikrobiomra. Ilyen esetben a vékonybélben felszaporodnak az orális eredetű fajok, mint a *Veillonella* vagy *Streptococcus* nemzetségek tagjai. Ennek oka valószínűleg az, hogy a cirrhosis miatt a máj kevesebb epesót termel, így annak alacsonyabb koncentrációja mellett a vékonybél is alkalmas környezetté válik az orális fajok túlélésére.[30]

A bél mikrobiomjának metabolikus aktivitásából származó molekulák a májban közvetlenül is indukálhatják a karcinogenezist. A vékonybél bakteriális kö-



3. ábra: Máj-bél tengely. A bélmikrobiom által dekonjugált egyes másodlagos epesók a szinuszoidális endotél sejtjeinek CXCL16 expresszióját gátolják, amely csökkent természetes NKT-sejt infiltrációhoz vezet. A bél mikrobáktól származó LPS és egyéb metabolitok a portális vénán keresztül közvetlenül hatnak a májra.

zösségének egyik funkciója az elsődleges epesók dekonjugálása, így a visszaszívásra alkalmas másodlagos epesók termelése. Egyes másodlagos epesókról egérkísérletek során kiderült, hogy csökkentik a máj kapillárisokat bélelő endotél sejtek felszínén a CXCL16 expresszióját (míg az elsődleges epesók növelik), amely egyedüli ligandja az NKT-sejtek CXCR6 receptorának. Az NKT-sejtek szerepet játszanak a daganatellenes immunitásban, toborzásuk a CXCL16-on keresztül történik, tehát a csökkent ligand expresszió elősegítheti a HCC kialakulását *(3. ábra)*.[31]

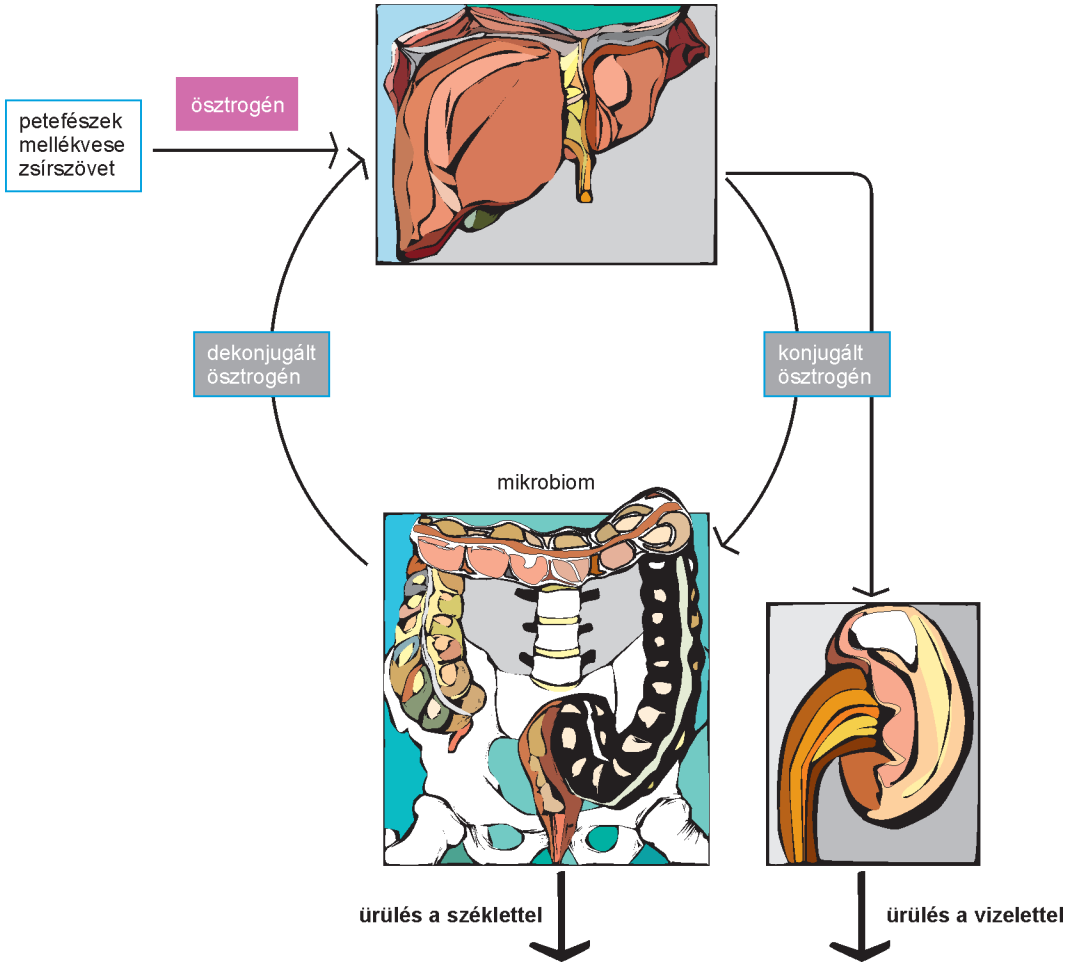
Hasnyálmirigy

A hasnyálmirigy ductalis adenocarcinoma (PDAC) esetében a bélmikrobiomon kívül a szájüreg és az intrapancreaticus mikrobiális közösségek változása is jelentőséggel bír. Mivel a hasnyálmirigy által termelt enzimek közvetlenül a bélbe ürülnek, a hasnyálmirigy állományában egy kis elváltozás is befolyásolhatja a mikrobiom összetételét és funkcióját. *Half és mtsai* kis esetszámú tanulmányukban 30 hasnyálmirigyrákos, 13 egészséges, 6 prekancerózus léziót hordozó és 16 nem-alkoholos zsírmájjal rendelkező izraeli beteg székletmikrobiom-vizsgálatát végezték el.[32] A megfigyelt eltérések variációja az egyes csoportokon belül igen nagy volt, azonban leírtak az adott csoportokra karakterisztikus változásokat, mint a *Bacteroidetes* és *Firmicutes* törzsek, valamint a *Veillonellaceae* és *Verrucomicrobiaceae* családok dúsulása és a *Clostridiacea*, *Lachnospiraceae* és *Ruminococcaceae* családok csökkent jelenléte a daganatos betegcsoportban a kontrollhoz képest.

Ren és mtsai 85 hasnyálmirigy-daganatos beteg és 57 egészséges kontroll székletmintáján végzett tanulmányuk során a diverzitás csökkenését figyelték meg.[33] *Half és mtsai* eredményeihez hasonlóan a kontrollhoz képest a *Bacteroidetes* relatív abundanciája szignifikánsan növekedett, míg a *Firmicutes* és a *Proteobacteria* csökkent. Hét nemzetség szignifikáns feldúsulását (*Prevotella, Veillonella, Klebsiella, Selenomonas, Hallella, Enterobacter* és *Cronobacter*) és kilenc nemzetség (*Gemmiger, Bifidobacterium, Coprococcus, Clostridium IV, Blautia, Flavonifractor, Anaerostipes, Butyricicoccus* és *Dorea*) relatív abundanciájának csökkenését figyelték meg.

Emlő és prosztata

A prosztata- és elmődaganatok kialakulásában egyaránt fontos szerepe van ösztrogénmediált hatásoknak. A bélmikrobiomra *Plottel és mtsai* írták le először az



4. ábra: Ösztrogén körforgás. A szervezet által termelt ösztrogén a májban konjugálódva deaktiválódik. A bélbaktériumok dekonjugációval újra aktivált formát hoznak létre, ami a keringésbe visszaszívódva képes receptorhoz kötni. Ha az ösztrobolom nem dekonjugálja az inaktív formát, az a széklettel ürül. A vérből a vese is kiválasztja a konjugált ösztrogént, ami vizelettel távozik.

ösztrobolom modellt, amely azon bakterialis gének összessége, amelyek az ösztrogén metabolizmusában részt vesznek.[34] Az ösztrobolom hozzájárul a normál ösztrogénháztartáshoz: a májban konjugálódó, így inaktiválódó ösztogén a bélbe kerül, ahonnan a széklettel ürül. Azonban, ha a mikrobiom által szekretált β-glukuronidáz dekonjugált formává alakítja a konjugált ösztrogént, akkor ez az aktív forma a bélből visszaszívódik a véráramba, és újra kapcsolódik az ösztrogénreceptorokhoz.[35] A mikrobiális közösség perturbációja vagy diszbiózis eredményeképp változhat az ösztrogéndekonjugáció folyamata, ami megemelkedett ösztrogénterhelésen keresztül hozzájárulhat az ösztrogénfüggő emlőrák kialakulásához,[36] valamint elősegítheti prosztatikus neoplázia megjelenését *(4. ábra)*.[37]

Az emlődaganatokat érintő további mikrobiális hatások főleg a bél mikroflóra metabolitjaihoz köthetők. Például a lenmag, napraforgómag, köménymag vagy szója lignánokat enterolignán, enterolakton és enterodiol metabolitokká alakítja, amelyeknek protektív hatása lehet az emlőrákkal szemben.[38] A másodlagos epesó, a litokólsav gátolja a daganat fejlődését, az epithelialis-mesenhymalis tranzíciót és így a metasztázisképzést. A csökkent mikrobiom diverzitás miatti metabolikus változás így hatással van az antiproliferatív metabolitokra, ami a mellrák progressziójához vezethet.[39]

Az antibiotikum-kezelés utáni diverzitáscsökkenés prosztatacarcinoma tekintetében is rizikófaktorként azonosították.[40] A diverzitás csökkenése azon kommenzalisták arányának csökkenésével jár, melyek rövid láncú zsírsavakat (például butirát, propionát és acetát) termelnek. Ezek a molekulák szabályozzák az apoptózist és sejtinváziót, így hatással lehetnek a karcinogenezisre.

Terápiás vonatkozások

A daganatok kezelésében használt kemo- és immunterápia hatásossága és toxicitása, valamint a mikrobiom közötti kapcsolat is egy igen érdekes és feltörekvő kutatási terület. A kapcsolat egyértelműen kétirányú: mikrobiom összetétele befolyásolhatja a kemoterápiás szerek hatásosságát, viszont ezek a készítmények hatással lehetnek a mikrobiom összetételére.

A bélmikrobiom kemoterápiára gyakorolt hatásának három fő klinikai kimenete lehet: 1, növeli a hatásosságot; 2, csökkenti a hatásosságot; 3, változtatja a toxicitást. Ezen hatások transzlokáción, immunmoduláción, metabolikus változáson, enzimatikus lebontáson, redukált diverzitáson és ökológiai variáción keresztül valósulnak meg, melyekre összefoglalóan „TIMER"-ként hivatkozik az irodalom. Ezeket a mechanizmusokat néhány kiragadott példával ismertetjük.

Transzlokációs és immunmodulációs mechanizmus ciklofoszfamid kezelés esetében figyelhető meg, amely az immunsejtek számának növekedését és a bélfal integritásának csökkenését okozza. Mint ahogy fentebb már tárgyaltuk, a Th17- és Th1-sejtek toborzását egyes Gram-pozitív baktériumok befolyásolják. Ebben az esetben a kezelés ezen baktériumok limfoid szervekbe való transzlokációját okozza, és így a baktériumok szabályozzák az immunválaszt. Ezen baktériumok hiányában a ciklofoszfamid kezelés hatásossága csökken.[41]

Metabolikus változás és enzimatikus lebontás például az irinotekán toxicitásában okozhat változást. Ezen készítmény gyakori mellékhatása a hasmenés, ami az irinotekán aktív metabolitjának, az SN-38-nak a toxikus hatása miatt alakul ki. Az SN-38 a májban glükuroniddal konjugálódik, így inaktiválódik, majd az epével a bélbe ürül. A bélbaktériumok β-glükuronidáz enzimei a glükuronid csoport eltávolításával újra aktiválják a metabolitot, így az toxikus hatása révén mellékhatás megjelenéséhez vezet.[42]

Relatív diverzitáson és ökológiai variáción alapuló mechanizmusra példa az ipilimumab kezelés, melynek során a betegek harmadánál lép fel kolitisz. Az ezzel szemben rezisztens betegeknél a *Bacteroidetes* törzs magasabb relatív abundanciáját figyelték meg. Akiknél kialakult a mellékhatás, ott a mikrobiális poliamin transzport és B-vitamin-szintézis hiánya volt azonosítható.[43]

A mikrobiom daganatellenes kezelések hatásosságát befolyásoló potenciálját talán az immunellenőrzőpont-gátló kezelések területén láthatjuk legmarkánsabban több daganattípus esetében is. Az első kutatás, mely felhívta a figyelmet a bélmikrobiom esetleges kiemelt szerepére, melanomás betegekben vizsgálta a PDL1-gátló kezelés hatásosságát kezelés előtt széles spektrumú antibiotikus terápiában részesülők esetében.[44] Eredményeik alapján az antibiotikum terápiában részesülő betegek teljes túlélése szignifikánsan rosszabb volt az antibiotikumot nem kapó betegekhez képest. Újabb tanulmányok immunellenőrzőpont-gátló kezelésben részesülő vesesejtes carcinomában és nem-kissejtes tüdőrákban szenvedő betegek esetében is igazolták az immunterápiát megelőző antibiotikus kezelés negatív hatását a teljes túlélésre.[45] Számos újabb preklinikai tanulmány tanulsága alapján különböző mikrobiom mintázatok figyelhetők meg a responder és non-responder csoportok között, melyek egérmodellen végzett kutatások szerint széklettranszplantációval megváltoztathatók, ezzel pedig a kezelés hatásossága is megváltozik.[44]

A mikrobiom hematológiai malignitások kezelésére is hatással van. Ezen a területen az egyik első közlemény szintén az antibiotikus kezeléshez köthető, 2009-ben van *Vliet és mtsai* antibiotikus profilaxisban részesülő akut myeloid leukaemiás gyermekekben írták le kemoterápia során a béltraktus fokozott kolonizációját, melyhez patogén mikroorganizmusok megjelenése társulhat.[46] Ezen felül Gram-pozitív kórokozók ellen antibiotikummal kezelt ciklofoszfamid terápiában részesülő krónikus lymphocytás leukaemiás és ciszplatinnal kezelt relabált lymphomás betegek terápiás válasz aránya és teljes túlélése alacsonyabbnak bizonyult egyes kutatások szerint.[45]

Végezetül említésre méltó, hogy az autológ őssejt-transzplantáció területén egyre több bizonyíték támasztja alá a bélmikrobiom jelentőségét. Graft-versus host betegség (GVHD) egérmodellen végzett vizsgálata során a diverzitás csökkenését, *Lactobacillales* rend expanzióját és a *Clostridiales*-eliminációt azonosították. A *Lactobacillales* eliminációja egérmodell mikrobiomjából a csontvelő-transzplantáció előtt súlyosbította a GVHD-t, azonban érdekes módon a predomináns *Lactobacillus* faj újra megtelepülése jelentős védelmet nyújtott a GVHD-val szemben.

A GVHD-ban szenvedő betegek mikrobiomjában az egérkísérleteknek megfelelő eltérések jelentek meg, továbbá röviddel a csontvelő transzplantációt követően kialakuló mikrobiális „káosz" potens rizikó faktornak bizonyult a későbbiekben kialakuló GVHD tekintetében.[47] A mikrobiom-diverzitás és a csontvelő-transzplantációt követő túlélés, illetve GHVD kialakulás közötti összefüggés nagy esetszámú multicentrikus vizsgálat is megerősítette. Egy három földrészre kiterjedő,

négy centrum mintegy 1362 betegének székletmintáit vizsgáló tanulmány alapján a transzplantációt követő magas diverzitás alacsonyabb halálozással jár. A transzplantációt megelőző alacsony diverzitás pedig kedvezőtlen prediktív markernek bizonyult a transzplantációhoz köthető mortalitás és a GVHD kialakulásának vonatkozásában.[48]

Egyes közlemények ezen jelenségeket a mikrobiom által termelt metabolitoknak tulajdonítják. Például az indol fontos a bél mucosa barrier funkciójának modulálásában és a hámsejtekben a pro- és antiinflammatorikus gének expressziójának szabályozásában. Az indol konjugátumának (3-indoxil-szulfát) alacsony szintje a vizeletben tíz nappal az ASCT után korrelált a transzplantációhoz köthető mortalitással és teljes túléléssel 1 évvel a beavatkozás után.[49]

Mindezen eredmények a mikrobiom biomarker funkciója mellett felvetik a lehetőségét a mikrobiomot befolyásoló kiegészítő kezelésnek, mely növelhetné a tumorellenes terápiák hatásosságát.

Diszkusszió

A mikrobiom szerepe a daganatos betegségek kialakulásában napról napra egyre világosabbá válik, azonban a pontos mechanizmus, mellyel befolyásolják vagy jelzik a tumorok kialakulását sok esetben még ismeretlen. Az eddigi eredmények alapján egyértelmű, hogy a bélmikrobiom hatással van az immunitásra, befolyásolja egyes daganatok kialakulásának valószínűségét, és hatással van a daganatellenes kezelésekre, ezáltal felmerül, hogy nem csupán biomarkerként, hanem terápiás célpontként is szerepe lehet.

A mikrobiom kedvező irányú modulációjára négy megközelítés lehetséges: széklettranszplantáció; probiotikumok; prebiotikumok; és célzott diéta. Az egyes módszerek előnyeit és hátrányait az *1. táblázat* összegzi. A területben rejlő lehetőségeket mutatja, hogy számos klinikai tanulmány vizsgálja ezen intervenciós módszerek hatását egyes tumorok kialakulásában, terápiás válasz befolyásolásában, kezeléshez társuló toxicitás módosításában *(1. táblázat)*.[50]

Az eddigi vizsgálatok alapján szervezetünk és a mikrobiom interakciója egy komplex, hálózathoz hasonlatos rendszert alkot, melynek további megértéséhez nem elégséges csupán a mikrobiomot vizsgálni. A további, mélyebb összefüggések feltárásához vezethet a metagenom alapú vizsgálati módszerek elterjedése, melyek a mikroorganizmusok pontos, faj szintű azonosítása mellett lehetővé teszik a virulenciafaktorgének kimutatását, ezzel funkcionális információt is szolgáltatva az adott mikrobiális közösségről. Számos esetben a mikrobiális eredetű, vagy a mikrobiom által módosított metabolitok állnak a betegséget, vagy terápiát módosító hatás mögött, így ezek vizsgálata, metabolomikai analízise további összefüggéseket fedhet fel. Mindezeken felül a teljes komplexitás feltérképezéséhez szükséges az egyén, mint gazdaszervezet részletes vizsgálata, mely kiterjed a genetikai háttérre, gyógyszerszedési szokásokra, diétára és környezeti faktorokra egyaránt, ugyanis ezen tényezők mind hatással lehetnek a mikrobiom összetételére. Mindezek figyelembevételével a mikrobiom vizsgálata és modulációja a

1. táblázat. Mikrobiom moduláció lehetőségei

	ELŐNYÖK	HÁTRÁNYOK	KLINIKAI TANULMÁNY
Széklet-transzplantáció	komplett mikrobiális ökoszisztéma átadása	költséges és nehezen hozzáférhető, beavatkozás kockázattal jár, egyéb betegségek is átadhatók	(NCT03341143) széklet transzplantáció és immunellenőrzőpont gátló együttes alkalmazása melanomában
Probiotikumok	egyszerűen alkalmazható, olcsó, elérhető	változó megtapadás versengő kommenzalisták esetén, csökkentheti a teljes diverzitást, nem megfelelő szabályozás és minőségellenőrzés	(NCT01410955) vastagbélrák irinotekán kezelés során fellépő toxikus mellékhatás mérséklése probiotikummal
Prebiotikumok	egyszerűen alkalmazható, olcsó, elérhető	teljes értékű ételek fontosabbak lehetnek, mint az izolált tápanyag-kiegészítők	(NCT03870607) kemo- és radioterápia hatásosságának növelése anális laphámcarcinomában pre- és probiotikumok alkalmazásával
Diéta	teljeskörű változás, mely egyéb kedvező hatásokkal is járhat	alacsony compliance, nehezen fenntartható, változó hatás	(NCT027663033) táplálékkiegészítő hatása allogén őssejt-transzplantációt követő akut GVHD kialakulására

jövőben hasznos kiegészítőjévé válhat a daganatos betegek komplex onkológiai kezelésének.

Irodalom

1. Cho I, Blaser MJ. The human microbiome: at the interface of health and disease. Nat. Rev. Genet. 2012; 13:260-70.
2. Smits WK, Lyras D, Lacy DB, Wilcox MH, Kuijper EJ. Clostridium difficile infection. Nat. Rev. Dis. Prim. 2016; 2:16020.
3. Janeiro MH, Ramírez MJ, Milagro FI, Martínez JA, Solas M. Implication of Trimethylamine N-Oxide (TMAO) in Disease: Potential Biomarker or New Therapeutic Target. Nutrients 2018; 10.
4. Chu H, Mazmanian SK. Innate immune recognition of the microbiota promotes host-microbial symbiosis. Nat. Immunol 2013; 14:668-75.
5. Clarke TB, et al. Recognition of peptidoglycan from the microbiota by Nod1 enhances systemic innate immunity. Nat. Med. 2010; 16:228-31.
6. Gensollen T, Iyer SS, Kasper DL, Blumberg RS. How colonization by microbiota in early life shapes the immune system. Science 2016; 352:539-44.
7. Tan TG, et al. Identifying species of symbiont bacteria from the human gut that, alone, can induce intestinal Th17 cells in mice. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2016; 113:E8141–E8150.
8. Dasgupta S, Erturk-Hasdemir D, Ochoa-Reparaz J, Reinecker H-C, Kasper DL. Plasmacytoid dendritic cells mediate anti-inflammatory responses to a gut commensal molecule via both innate and adaptive mechanisms. Cell Host Microbe 2014; 15:413-23.
9. Wesemann DR, et al. Microbial colonization influences early B-lineage development in the gut lamina propria. Nature 2013; 501:112-5.
10. Levy M, et al. Microbiota-Modulated Metabolites Shape the Intestinal Microenvironment by Regulating NLRP6 Inflammasome Signaling. Cell 2015; 163:1428-43.
11. Li S, et al. Lipopolysaccharide induces inflammation and facilitates lung metastasis in a breast cancer model via the prostaglandin E2-EP2 pathway. Mol. Med. Rep. 2015; 11:4454-62.
12. Chelakkot C, Ghim J, Ryu SH. Mechanisms regulating intestinal barrier integrity and its pathological implications. Exp. Mol. Med. 2018; 50:103.
13. Díaz P, Valenzuela Valderrama M, Bravo J, Quest AFG. Helicobacter pylori and Gastric Cancer: Adaptive Cellular Mechanisms Involved in Disease Progression. Front. Microbiol. 2018; 9:5.
14. Rubinstein MR, et al. Fusobacterium nucleatum promotes colorectal carcinogenesis by modulating E-cadherin/β-catenin signaling via its FadA adhesin. Cell Host Microbe 2013; 14:195-206.
15. Goodwin AC, et al. Polyamine catabolism contributes to enterotoxigenic Bacteroides fragilis-induced colon tumorigenesis. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2011; 108:15354-59.
16. Geis AL, et al. Regulatory T-cell Response to Enterotoxigenic Bacteroides fragilis Colonization Triggers IL17-Dependent Colon Carcinogenesis. Cancer Discov. 2015; 5:1098-109.
17. Nougayrède J-P, et al. Escherichia coli induces DNA double-strand breaks in eukaryotic cells. Science 2006; 313:848-51.
18. Feng Q, et al. Gut microbiome development along the colorectal adenoma-carcinoma sequence. Nat. Commun. 2015; 6:6528.
19. Yu J, et al. Metagenomic analysis of faecal microbiome as a tool towards targeted non-invasive biomarkers for colorectal cancer. Gut 2017; 66:70-8.
20. Hosgood HD. 3rd et al. The potential role of lung microbiota in lung cancer attributed to household coal burning exposures. Environ. Mol. Mutagen. 2014; 55:643- 51.
21. Tsay JCJ, et al. Airway Microbiota Is Associated with Upregulation of the PI3K Pathway in Lung Cancer. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2018; 198:1188–98.
22. Zhuang H, et al. Dysbiosis of the Gut Microbiome in Lung Cancer. Front. Cell. Infect. Microbiol. 2019; 9:112.
23. Liu F, et al. Dysbiosis of the Gut Microbiome is associated with Tumor Biomarkers in Lung Cancer. Int. J. Biol. Sci. 2019; 15:2381-92.
24. Zheng Y, et al. Specific gut microbiome signature predicts the early-stage lung cancer. Gut Microbes 2020; 11:1030–42.
25. Boesten RJ, et al. Bifidobacterium breve - HT-29 cell line interaction: modulation of TNF-α induced gene expression. Benef. Microbes 2011; 2:115-28.
26. Lim S-M, Kim D-H. Bifidobacterium adolescentis IM38 ameliorates high-fat diet-induced colitis in mice by inhibiting NF-κB activation and lipopolysaccharide production by gut microbiota. Nutr. Res. 2017; 41:86-96.
27. Shang G-S, Liu L, Qin YW. IL-6 and TNF-α promote metastasis of lung cancer by inducing epithelial-mesenchymal transition. Oncol. Lett. 2017; 13:4657–60.
28. Yu L-X, Schwabe RF. The gut microbiome and liver cancer: mechanisms and clinical translation. Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol. 2017; 14:527-39.
29. Pradere J-P, Troeger JS, Dapito DH, Mencin AA, Schwabe RF. Toll-like receptor 4 and hepatic fibrogenesis. Semin. Liver Dis. 2010; 30:232-44.
30. Qin N, et al. Alterations of the human gut microbiome in liver cirrhosis. Nature 2014; 513:59-64.
31. Ma C, et al. Gut microbiome-mediated bile acid metabolism regulates liver cancer via NKT cells. Science 2018; 360.
32. Half E, et al. Fecal microbiome signatures of pancreatic cancer patients. Sci. Rep. 2019; 9:16801.
33. Ren Z, et al. Gut microbial profile analysis by MiSeq sequencing of pancreatic carcinoma patients in China. Oncotarget 2017; 8:95176-91.
34. Plottel CS, Blaser MJ. Microbiome and malignancy. Cell Host Microbe 2011; 10:324-35.
35. Baker JM, Al-Nakkash L, Herbst-Kralovetz MM. Estrogen-gut microbiome axis: Physiological and clinical implications. Maturitas 2017; 103:45-53.
36. Shapira I, Sultan K, Lee A, Taioli E. Evolving concepts: how diet and the intestinal microbiome act as modulators of breast malignancy. ISRN Oncol. 2013; 2013:693920.
37. Sha S, Ni L, Stefil M, Dixon M, Mouraviev V. The human gastrointestinal microbiota and prostate cancer development and treatment. Investig. Clin. Urol. 2020; 61:S43-S50.

38. Falk RT, et al. Relationship of serum estrogens and estrogen metabolites to postmenopausal breast cancer risk: a nested case-control study. Breast Cancer Res. 2013; 15:R34.
39. Mikó E, et al. Lithocholic acid, a bacterial metabolite reduces breast cancer cell proliferation and aggressiveness. Biochim. Biophys. Acta. Bioenerg. 2018; 1859:958-74.
40. Boursi B, Mamtani R, Haynes K, Yang YX. Recurrent antibiotic exposure may promote cancer formation-Another step in understanding the role of the human microbiota? Eur. J. Cancer 2015; 51:2655-64.
41. Viaud S, et al. The intestinal microbiota modulates the anticancer immune effects of cyclophosphamide. Science 2013; 342:971-6.
42. Gupta E, et al. Metabolic fate of irinotecan in humans: correlation of glucuronidation with diarrhea. Cancer Res. 1994; 54:3723-5.
43. Dubin K, et al. Intestinal microbiome analyses identify melanoma patients at risk for checkpoint-blockade-induced colitis. Nat. Commun. 2016; 7:10391.
44. Routy B, et al. Gut microbiome influences efficacy of PD-1-based immunotherapy against epithelial tumors. Science (80-.) 2018; 359:91-7.
45. Pflug N, et al. Efficacy of antineoplastic treatment is associated with the use of antibiotics that modulate intestinal microbiota. Oncoimmunology 2016; 5:e1150399.
46. Van Vliet MJ, et al. Chemotherapy treatment in pediatric patients with acute myeloid leukemia receiving antimicrobial prophylaxis leads to a relative increase of colonization with potentially pathogenic bacteria in the gut. Clin. Infect. Dis. 2009; 49:262-70.
47. Jenq RR, et al. Regulation of intestinal inflammation by microbiota following allogeneic bone marrow transplantation. J. Exp. Med. 2012; 209:903-11.
48. Peled JU, et al. Microbiota as predictor of mortality in allogeneic hematopoietic-cell transplantation. N. Engl. J. Med. 2020; 382:822-34.
49. Weber D, et al. Low urinary indoxyl sulfate levels early after transplantation reflect a disrupted microbiome and are aßociated with poor outcome. Blood 2015; 126: 1723-8.
50. Helmink BA, Khan MAW, Hermann A, Gopalakrishnan V, Wargo JA. The microbiome, cancer, and cancer therapy. Nat. Med. 2019; 25:377-88.

A gyermekkori akut leukaemiák korszerű molekuláris diagnosztikája és kezelése

State-of-the-art molecular diagnostics and treatment of pediatric acute leukemia

Alpár Donát[1], Egyed Bálint[1,2], Krizsán Szilvia[1], Erdélyi Dániel[2], Bödör Csaba[1], Kovács Gábor[2]

[1] I. Sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet, HCEMM-SE Molekuláris Onkohematológia Kutatócsoport, Semmelweis Egyetem, Budapest

[2] II. Sz. Gyermekgyógyászati Klinika, Semmelweis Egyetem, Budapest

E-levél: alpar.donat@med.semmelweis-univ.hu

ÖSSZEFOGLALÁS A haemopoeticus rendszer működésének kóros elváltozása nyomán kialakuló leukaemiák a gyermekkor leggyakoribb rosszindulatú daganatos megbetegedései. A malignus transzformáció következtében megjelenő fokozott klonális sejtproliferáció lymphoid és myeloid érési vonalakat egyaránt érinthet, ebben az életkorban az esetek döntő többségében heveny kórlefolyással társulva. A leggyakoribb gyermekkori leukaemiatípus az akut lymphoblastos leukaemia (ALL), melynek kezelése az elmúlt évtizedekben látványos fejlődésen ment keresztül. Jelenleg a komplex, citosztatikum alapú onkoterápia ezen betegek körülbelül 80-90%-ánál vezet teljes gyógyuláshoz. Ugyanakkor az ALL-es betegek egy részénél, továbbá a klinikai ellátás tekintetében nagyobb kihívást jelentő akut myeloid leukaemiás betegeknél a modern hematológia új lehetőségeit is ki kell aknázni a remisszió eléréséhez és fenntartásához, melyben kiemelkedő szerepe lehet a közelmúltban elérhetővé vált célzott terápiás szereknek, úgynevezett molekuláris inhibitoroknak. Az optimális kezelés megválasztásához elengedhetetlen az adott beteg leukaemiás sejtpopulációjának alapos és átfogó, személyre szabott molekuláris karakterizálása, amely korszerű nagy áteresztőképességű technológiákkal ma már a mindennapi diagnosztikában is elvégezhető. Közleményünkben röviden áttekintjük a gyermekkori akut leukaemiák genetikai hátterének legfontosabb jellemzőit és vizsgálómódszereit, kitérve arra is, hogy a modern genomikai és transzkriptomikai vizsgálatok miként segítik a klinikai döntéshozatalt. Ezenkívül bemutatjuk a közelmúltban országos összefogással elindított Magyar Gyermekleukémia Molekuláris Profilozási Programot, aminek keretében biztosítani kívánjuk minden hazai leukaemiás gyermek számára a jelenleg elérhető legkorszerűbb molekuláris diagnosztikát, elősegítve ezáltal a leghatékonyabb terápiás stratégiák betegágy melletti alkalmazását.

KULCSSZAVAK gyermekkori leukaemia, molekuláris diagnosztika, célzott terápia

SUMMARY Leukemia emerging due to malfunction of the hematopoietic system represents the most common type of childhood malignancies. Unleashed clonal cell proliferation conferred by malignant transformation can affect the myeloid and/or lymphoid cell compartments; and in this age group, it is associated with an acute disease course in vast majority of cases. Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is the major type of pediatric leukemia. During the past decades, the treatment of ALL showed remarkable improvement with around 80-90% of patients currently achieving clinical recovery with complex cytotoxic oncotherapy. However, novel opportunities offered by modern hematology must be exploited in order to achieve and maintain remission in a subset off ALL patients as well as in acute myeloid leukemia which currently poses more difficult challenges for clinical management. Recent introduction of molecular inhibitors providing targeted therapies may have paramount importance in this regard. For optimal therapy selection, comprehensive molecular characterization of the leukemic cell population in individual patients is essential, which has also become feasible in routine diagnostics using high-throughput technologies. Here, we provide a brief overview of the main features and investigative methods of the genetic background of pediatric leukemia, also demonstrating how cutting-edge interrogation of the genomic and transcriptomic landscape can aid advanced clinical decision making. Furthermore, we introduce the Hungarian Pediatric Leukemia Molecular Profiling Program which has recently been established with the aim to provide state-of-the-art molecular diagnostics for all Hungarian children with leukemia, ultimately also facilitating the application of the most robust treatment strategies at the bedside.

KEY WORDS pediatric leukemia, molecular diagnostics, targeted therapy

Köszönetnyilvánítás

A közlemény az MTA Lendület programjának (LP-95021) és Bolyai János Ösztöndíj programjának (BO/00320/18/5), a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal NVKP_16-1-2016-0004, K16_119950, KH17-126718 és FK20_134253 pályázatainak, az Innovációs és Technológiai Minisztérium ÚNKP-20-3-II-SE-20 és ÚNKP-20-5-SE-22 kódszámú Új Nemzeti Kiválóság Program pályázatainak, az EU Horizon 2020 Kutatási és Innovációs Program 739593 számú pályázatának, valamint a Semmelweis Egyetem Kiegészítő Kutatási Kiválósági Ösztöndíjának (EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-00009) támogatásával készült.

Rövidítések

ALL	*akut lymphoblastos leukaemia*
allo-HSCT	*allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allogén vérképző őssejt-transzplantáció)*
AML	*akut myeloid leukaemia*
AMKL	*akut megakaryoblastos leukaemia*
array-CGH	*array comparative genomic hybridization (array komparatív genom hibridizáció)*
ATRA	*all-trans-retinoic acid (csupa-transz retinsav)*
CN-LOH	*copy neutral loss of heterozigosity (kópiaszám változással nem járó heterozigotaság vesztés)*
EFS	*event-free survival (eseménymentes túlélés)*
FDA	*U.S. Food and Drug Administration (Amerikai Élelmiszer- és Gyógyszerengedélyeztetési Hivatal)*
ITD	*internal tandem duplication (belső tandem duplikáció)*
MDS	*myelodysplasiás szindróma*
MLPA	*multiplex ligáció-függő szonda amplifikáció*
MRD	*minimális/mérhető reziduális betegség*
NGS	*next generation sequencing (újgenerációs szekvenálás)*
ORR	*overall response rate (teljes válaszarány)*
OS	*overall survival (teljes túlélés)*
PCR	*polymerase chain reaction (polimeráz láncreakció)*
Ph	*Philadelphia*
SNP	*single nucleotide polymorphism (egyedi nukleotid polimorfizmus)*
TKI	*tirozin-kináz-inhibitor*

Bevezetés

A baleseteket követően fejlett országokban a rosszindulatú daganatos megbetegedések felelősek legnagyobb mértékben az 1-18 éves korosztályban megfigyelhető mortalitásért.[1] A vérképző szervrendszer sejtjeinek malignus elváltozásából kialakuló haemopoeticus daganatok a leggyakoribb gyermekkori neoplasiák, melyek döntő többsége akut leukaemia formájában jelenik meg.[2] Az akut leukaemiás esetek száma a modern iparosodott társadalmakban enyhe emelkedést mutat, hazánkban jelenleg évente 70–80 új beteg kerül diagnosztizálásra.[3] A leukaemiás sejtek többnyire éretlen (prekurzor) lymphoid vagy myeloid fenotípussal rendelkeznek, esetenként kevert vagy érettebb fenotípust mutatva, mely leginkább attól függ, hogy a malignus transzformáció a haemopoeticus érési folyamat melyik fázisában vezet gátláshoz, ezáltal az érintett sejttípus aránytalan klonális felszaporodásához. A gyermekkori leukaemiás esetek 80%-a akut lymphoblastos leukaemiaként (ALL), 15%-a akut myeloid leukaemia formájában (AML) jelentkezik, míg ritkábban krónikus myeloid leukaemia, illetve juvenilis myelomonocytás leukaemia is előfordulhat ebben a korosztályban. Az ALL-es betegek 85%-ánál a leukaemiás sejtek prekurzor B-sejtes fenotípust mutatnak, 10–15%-ukban prekurzor T-sejtes fenotípus figyelhető meg.[4] Az ALL kezelése az elmúlt évtizedekben látványos fejlődésen ment keresztül, jelenleg a komplex, citosztatikum alapú onkoterápia ezen betegek körülbelül 80–90%-ánál vezet teljes gyógyuláshoz.[5] Az ALL-hez képest a gyermekkori AML terápiája napjainkban nagyobb kihívást jelent a klinikai ellátás számára, amit a betegek valamivel alacsonyabb, 65–70%-os 5 éves teljes túlélése (overall survival, OS) jelez.[6] Mindkét akut leukaemiatípusra jellemző, hogy a várható túlélés erősen függ attól, hogy az adott beteg az entitás mely alcsoportjába tartozik, azaz leukaemiája milyen fenotípusos, genomikai és transzkriptomikai paraméterekkel rendelkezik.

Közleményünkben röviden áttekintjük a gyermekkori akut leukaemiák legfontosabb genetikai és transzkriptomikai jellemzőit, valamint azokat a laboratóriumi módszereket, melyek jelenleg rendelkezésünkre állnak az egyes betegek mintáinak vizsgálatához. Ezenkívül betekintést nyújtunk abba, hogy a modern vizsgálatok miként segítik a klinikai döntéshozatalt, végül pedig bemutatjuk a közelmúltban általunk elindított Magyar Gyermekleukémia Molekuláris Profilozási Programot, aminek keretében biztosítani kívánjuk a legkorszerűbb molekuláris diagnosztikát a hazai leukaemiás gyermekek számára, ezáltal is elősegítve a legmegfelelőbb terápiás stratégiák betegágy melletti alkalmazását.

A gyermekkori akut leukaemiák genetikai háttere

A gyermekkori akut leukaemiák genetikailag heterogén megbetegedések, melyeknél számos visszatérő módon megjelenő primer aberráció határoz meg hivatalosan vagy előzetesen (provizórikusan) elfogadott genetikai alcsoportot *(1. táblázat)*.[7] A genetikai szubtípusokat definiáló eltérések többségének a betegek prognosztikai rizikócsoportba való besorolásában is meghatározó szerepe van, egy részük pedig prediktív értékkel is bír.

Az ALL, később pedig az AML genetikai vizsgálata kapcsán is számos olyan tanulmány született, melynek eredményei alátámasztják a gyermekkori akut leukaemiák kialakulásának többlépcsős modelljét ('two-hit' model). Eszerint a klinikailag manifeszt leukaemiához vezető folyamat már születést megelőzően elkezdődik, az első genetikai aberráció *in utero* jelenik meg, hatására pedig az érintett sejtből elindul egy limitált intenzitású proliferáció. Az így képződött rejtett, prae-leukaemiás populáció egyes sejtjeiben további, szelekciós előnyt nyújtó szekunder genetikai vagy epigenetikai aberrációk jelennek meg, melynek következményeként kialakul a leukaemiás kórkép.[8] Az *in utero* eredetet közvetve bizonyítják olyan adatok, melyek szerint ugyanazon típusú leukaemiában szenvedő

1. táblázat: A gyermekkori akut leukaemiák genetikai alcsoportjai

GENETIKAI ABERRÁCIÓ	GYAKORISÁG	5 ÉVES EFS (%)
ALL		
t(9;22)(q34.1;q11.2) *BCR-ABL1* génfúzió	2–4%	70–80
t(v;11q23) *KMT2A* gén átrendeződés	4%	30–40
t(12;21)(p13.2;q22.1) *ETV6-RUNX1* génfúzió	25%	80–95
hiperdiploiditás	20–30%	85–95
hipodiploiditás	1–2%	35–40
t(5;14)(q31.1;q32.3) *IGH-IL3*	<1%	27–30
t(1;19)(q23;p13.3) *TCF3-PBX1* génfúzió	5%	80–85
BCR-ABL1-like génexpressziós mintázat (provizórikus)	10–20%	75–85
21-es kromoszómán belüli amplifikáció (iAMP21) (provizórikus)	2–3%	40–50
AML		
t(8;21)(q22;q22.1) *RUNX1-RUNX1T1* génfúzió	10–12%	60–85
inv(16)(p13.1q22) vagy t(16;16)(p13.1;q22) *CBFβ-MYH11* génfúzió	10%	70–80
t(15;17)(q22;q21) *PML-RARA* génfúzió	2–10%	65–85
t(9;11)(p21.3;q23.3) *MLLT3-KMT2A* génfúzió	6–11%	20–75
t(6;9)(p23;q34.1) *DEK-NUP214* génfúzió	1–2%	25–40
inv(3)(q21.3q26.2) vagy t(3;3)(q21.3;q26.2) *GATA2, MECOM*	1–5%	<10
t(1;22)(p13.3;q13.3) *RBM15-MKL1* génfúzió	1–3%	45–60
NPM1 mutáció	8–10%	70–90
biallélikus *CEBPA* mutáció	5–10%	50–60
t(9;22)(q34;q11.2) *BCR-ABL1* génfúzió (provizórikus)	<1%	?
RUNX1 mutáció (provizórikus)	3%	<10

Rövidítés: EFS: eseménymentes túlélés (event-free survival)

monozigóta, monochorialis ikerpárok malignus sejtjei hajszálpontosan megegyező, leukemogenezissel összefüggő primer szomatikus genetikai markereket hordoznak.[9,10] Ennek nem kizárólagos, de legvalószínűbb magyarázata az, hogy a méhen belül megjelenő praeleukaemiás sejtcsoport a két magzat között gyakran megosztott vérkeringésen keresztül átjut a testvérbe, akiben így szintén megteremti az adott leukaemiatípus későbbi kialakulásának emelkedett kockázatát. Később további támogató adatokat szolgáltattak olyan tanulmányok, melyekben leukaemiás gyermekek egészséges monozigóta ikertestvéreinek pre-leukaemiás sejtjeiben is kimutatták a leukaemia kifejlődését iniciáló genetikai léziót.[11,12] Végül egyes klónspecifikus genetikai eltéréseknek a leukaemiás betegek születéskor archivált köldökzsinór vércseppjeiben való sikeres visszakeresése szolgáltatott közvetlen bizonyítékot a leukemogenezis primer aberrációinak *in utero* megjelenésére.[13,14]

A gyermekkori leukaemiák legnagyobb csoportját reprezentáló prekurzor B-sejtes ALL-ben a másodlagos genetikai aberrációk leginkább DNS kópiaszám változásokat, illetve mutációkat foglalnak magukban, melyek lymphoid transzkripciós faktorokat kódoló géneket, sejtciklus szabályozásban és tumorszuppresszióban szerepet játszó géneket, apoptózisregulátorokat, illetve epigenetikai szabályozó géneket érintenek.[15,16] A szekunder aberrációk száma és típusa genetikai alcsoportonként változó. A tipikusan egyéves kor alatt jelentkező, *KMT2A* génátrendeződéssel definiált szubtípus betegeiben például alig detektálható másodlagos eltérés, mely alapján feltételezhető, hogy a primer génfúzió jelenléte önmagában elegendő a leukaemia kialakulásához.[17] Ezzel szemben *ETV6-RUNX1* génfúziót hordozó betegekben átlagosan 6-7 DNS kópiaszám változással járó eltérés, főleg deléció mutatható ki diagnóziskor, mely valószínűsíti, hogy ebben az esetben a pri-

mer génfúzió mellett további aberrációk megjelenése is szükséges a betegség kialakulásához.[15] *BCR-ABL1* génfúzióval, illetve *BCR-ABL1*-like génexpressziós mintázattal rendelkező betegekre jellemző az *IKZF1* gén gyakori aberrációja, míg magas hiperdiploid kariotípussal rendelkező betegekben a másodlagos eltérések gyakran érintenek Ras jelátviteli útvonalban, illetve kromatin módosításban szerepet játszó géneket.[16,18,19] Diagnózishoz képest ALL relapszusakor az aberrációk számában emelkedés figyelhető meg, az egyes eltérések kombinációinak vizsgálata pedig segíthet felderíteni az eltérő időpontokban domináló leukaemiás sejtpopulációk közötti klonális kapcsolatot, evolúciós útvonalat is.[20,21] Ezenkívül egy közelmúltbeli átfogó, kombinált DNS- (genom-exom) és RNS-szekvenálást, valamint digitális PCR-t és xenograft modelleket is alkalmazó tanulmány szerzői az ALL progressziójában tipikusan érintett géneket csoportosítani tudták aszerint is, hogy melyek mutációi jelennek meg újonnan relapszuskor (pl. *NCOR2*, *USH2A*, *NT5C2*), illetve melyekben mutathatók ki eltérések már diagnóziskor is, többnyire szubklonális szinten (pl. *CREBBP*, *NOTCH1* és Ras jelátvitelben szereplő gének).[22]

Léteznek olyan gének, amelyek aberrációja mind az ALL, mind pedig az AML leukemogenezisében kimutatható. Régóta ismert entitás a bifenotípusos, azaz lymphoid és myeloid sejtfelszíni immunológiai markereket egyaránt expresszáló leukaemia, az utóbbi években pedig az is bebizonyosodott, hogy molekuláris genetikai alapon is elkülöníthetők átfedő lymphomyeloid entitások. Az akut myeloid/T-lymphoblastos leukaemiára például visszatérő eltérések jellemzők a *WT1*, *PHF6*, *RUNX1* és *BCL11B* génekben, a *RUNX1* mutált éretlen fenotípusú AML-es betegek pedig rosszul reagálnak az AML kezelésére előírt kemoterápiás sémákra.[23,24] A tisztán myeloid differenciáltságú gyermekkori akut leukaemia genetikai szempontból egy külön entitást képez a jóval gyakoribb felnőttkori AML-hez képest. Általánosságban elmondható a gyermekkori AML-ről, hogy a betegek 70-85%-ában mutathatók ki klonális numerikus vagy strukturális kromoszóma eltérések, amelyek közül egyes eltérések életkor-specifikus eloszlást mutatnak. Csecsemőkorú betegeknél elsősorban *KMT2A* génátrendeződés, valamint egyéb ritka, szinte kizárólag csecsemőkorban előforduló génfúziók (pl. *CBFA2T3-GLIS2*, *NUP98-KMT5A*) figyelhetők meg, míg az idősebb gyermekeknél (3–14 év) már gyakrabban mutatkozik a kedvező prognózissal járó t(8;21) és inv(16), valamint ezek a betegek nagyobb arányban rendelkeznek normál kariotípussal. Gyermekkorban az AML progresszióját irányító eltérések körülbelül fele olyan citogenetikai abnormalitás, amely a blasztok differenciációját gátolja, így valamely haemopoeticus transzkripciós faktor (pl. *CBFβ*, *RUNX1*) működését befolyásolja.[25] Hasonló életkor-specifikus összefüggések figyelhetők meg a mutációk szintjén is: a Ras-jelátviteli útvonalat érintő mutációk elsősorban csecsemőkorban dominálnak, míg az *NPM1* és *CEBPA* mutációk előfordulási gyakorisága az életkorral nő.[26]

A gyermekkori leukaemiákat több, egymásból elágazó módon fejlődő, egyedi genetikai tulajdonságokkal rendelkező szubklón és az így kialakult komplex szubklonális szerkezet jellemzi,[27] melyet később más malignitásokban is megfigyeltek.[28,29] A jelenség felfedezése, mint az számos korábbi haemopoeticus daganatokon végzett kutatás eredményeiről is elmondható, általánosan meghatározó hatásúnak bizonyult a tumorok fejlődésének, progressziójának és terápiás rezisztenciájának megértése szempontjából.[30] A gyermekkori leukaemiák genetikai hátterének és az egyes aberrációk következményeinek egyre részletesebb megismerése természetesen nagymértékben köszönhető a genetikai, genomikai és transzkriptomikai módszerek folyamatos, egyre gyorsuló fejlődésének is.

Molekuláris vizsgálómódszerek

A betegségre jellemző aberrációk változatos típusai miatt a gyermekkori leukaemiák genetikai karakterizálása komplex módszertant igényel, mely Magyarországon egészen a közelmúltig DNS-index mérést, kariotipizálást, valamint fluoreszcencia *in situ* hibridizációs és PCR-alapú vizsgálatokat foglalt magában. Hazai környezetben ez a módszertani megközelítés túlélte a microarray alapú technikák megjelenését, virágzását és hanyatlását, melynek oka nemcsak a költséghatékonyságban, hanem az egyes konvencionális módszerek egymást jól kiegészítő előnyeiben is keresendő. Az elmúlt évtizedben sok más daganatos megbetegedéshez hasonlóan, a gyermekkori leukaemiák kutatásában is megfigyelhető volt az újgenerációs szekvenálás (NGS) jelentős térnyerése, mely olyan mennyiségű és minőségű adatot képes szolgáltatni, ami alapján a módszer diagnosztikai munkafolyamatba való beépítése megkerülhetetlennek tűnik. Az NGS eredmények ALL és AML vonatkozásában is jelentősen tágították ismereteinket genom, epigenom és transzkriptum szinten egyaránt.[26,31–33] A gyermekkori akut leukaemiák vizsgálatához leggyakrabban használt módszereket a *2. táblázat* foglalja össze.

2. táblázat: A gyermekkori akut leukaemiák genetikai, genomikai és transzkriptomikai vizsgálómódszerei

MÓDSZER	VIZSGÁLAT CÉLJA – KIMUTATANDÓ ELTÉRÉS*
Genetika-genomika	
DNS index	aneuploidia kimutatás
Kariotipizálás	mono-/tri-/tetraszómia, valamint deléció, többlet-amplifikáció, transzlokáció, inverzió azonosítása teljes kariotípus szinten
FISH	mono-/tri-/tetraszómia, valamint deléció, többlet-amplifikáció, transzlokáció, inverzió célzott kimutatása
MLPA	deléció, többlet-amplifikáció, esetleg pontmutáció célzott kimutatása
array CGH	deléció, többlet-amplifikáció kimutatása teljes genom szinten
SNP-array	deléció, többlet-amplifikáció, valamint kópiaszám változással nem járó allélikus kiegyensúlyozatlanság (CN-LOH) kimutatása teljes genom szinten
PCR	pontmutáció, génátrendeződések DNS szintű célzott kimutatása
digitális droplet PCR	pontmutáció, deléció, többlet-amplifikáció DNS szintű célzott kimutatása
Sanger-szekvenálás	pontmutáció, kisméretű inszerciók és deléciók célzott kimutatása
NGS	
Teljes genom szekvenálás	genetikai eltérések átfogó vizsgálata teljes genom szinten
Exom szekvenálás	genetikai aberrációk feltérképezése a kódoló régióban
Célzott genom szekvenálás	klinikailag releváns genetikai aberrációk célzott DNS-szintű kimutatása
Transzkriptomika	
RT-PCR	génfúziók specifikus kimutatása RNS-szinten, célzott génexpressziós vizsgálatok
NGS	
Teljes transzkriptum szekvenálás	génexpressziós mintázatok és splice variánsok felderítése, genetikai aberrációk egyszerűsített szűrése teljes transzkriptum szinten
Célzott transzkriptum szekvenálás	génexpressziós változások és genetikai aberrációk egyszerűsített, célzott szűrése RNS-szinten

Rövidítések: FISH, fluoreszcencia *in situ* hibridizáció; MLPA: multiplex ligáció-függő szonda amplifikáció; array CGH: array komparatív genom hibridizáció; SNP: egyedi nukleotid polimorfizmus; CN-LOH: kópiaszám változással nem járó heterozigotaság vesztés); PCR: polimeráz láncreakció; LOH: loss of heterozygosity; NGS: újgenerációs szekvenálás (next generation sequencing).
* A táblázat az egyes módszerek leggyakoribb alkalmazásait mutatja be. Speciális, többnyire kutatási célú alkalmazásokat nem tartalmaz.

Új hatóanyagok és klinikai döntéshozatal a korszerű leukaemia-genomikai vizsgálatok tükrében

A molekuláris genetika vizsgálómódszereinek utóbbi években tapasztalt robbanásszerű fejlődéséhez fel kellett zárkóznia az onkoterápiás gyógyszerkutatásoknak és a gyakorlati betegellátásnak is. Ismeretanyagunk az akut leukaemiák genetikájáról és biológiájáról olyan mértékben megnövekedett, hogy egy adott betegre és annak betegségprogressziójára történő kiterjedt alkalmazása már adatbányász-technikákat igényel.[34,35] A genomikai eredmények klinikai gyakorlatba, terápiás irányelvekbe való beillesztése hosszadalmas folyamat, hiszen ezen a szinten már csak a kellően meggyőző evidenciáknak van helye. Az elmúlt évek tapasztalata alapján a következő, gyakorlati jelentőségű kérdések merülnek fel a modern gyermekleukaemia-ellátás genomikai-transzkriptomikai információkra építkező fejlesztése kapcsán:

- Hogyan javítható a betegek rizikóstratifikációja, az eltérő intenzitású kezelést kijelölő rizikócsoportok kritériumainak meghatározása?
- Milyen mértékben kaphat teret az új célzott kis molekulájú inhibitorok alkalmazása? Mely betegeknek javasolhatók az *on-label* vagy akár *off-label* készítmények?
- Érdemes-e követni a mutációs profil kezeléshez társuló dinamikus változásait, kihasználhatjuk-e ezt a terápiában?

A gyermekkori akut leukaemiák ellátása részletes nemzetközi egyeztetést követően megfogalmazott kemoterápiás protokollok alkalmazásával történik a világ fejlett országaiban. Ezek döntő többsége az elmúlt évtizedekben három prognosztikai csoportba osztotta a betegeket, úgymint alacsony, közepes és magas rizikójú ágakba. Jelentős részben a különböző genetikai szubtípusok túléléselemzéseivel nyert információknak köszönhető,[21,26,36,37] hogy a protokollok megújításakor időről időre központi téma a rizikócsoportok számának növelése, például nagyon alacsony vagy nagyon magas rizikóágak létrehozásával, részben genetikai faktorokra is alapozva. A jelenségre tekinthetünk úgy, mint a precíziós onkológia térnyerésére: távlatokban gondolkodva elképzelhető, hogy a klinikai irányelvek jövőbeli folyamatos revíziójával egyre több rizikócsoport kerül meghatározásra, egészen addig, amíg egy csoportba szinte csak egyetlen beteg tartozik majd. Ez a jelenleg még utópisztikus gondolat jelentené a személyre szabott medicina szoros értelemben vett megvalósulását.

A gyermekkori ALL genetikai alapú stratifikációjában felhasználható például a kiemelkedően jó prognózist kilátásba helyező *ETV6-RUNX1* génfúzió, az *ETV6-RUNX1*-like génexpressziós mintázat, a *DUX4* génátrendeződés, valamint a magas hiperdiploid kariotípus, míg jellemzően kedvezőtlen kimenetellel jár a Philadelphia-transzlokáció (*BCR-ABL1* génfúzió), a 21-es kromoszóma intrakromoszómális amplifikációja (iAMP21), az *IKZF1*^{plus} csoportot definiáló DNS kópiaszám profil és a *TCF3-HLF* génfúzió *(3. táblázat)*. Az *IKZF1*^{plus} konstelláció és – kisebb mértékben – önmagában az *IKZF1* allélikus hiánya is összefügg a rövidebb

3. táblázat. Genetikai alcsoportok mint a legújabb molekuláris indikációs körök és betegstratifikációs vezérpontok gyermekkori akut leukaemiákban

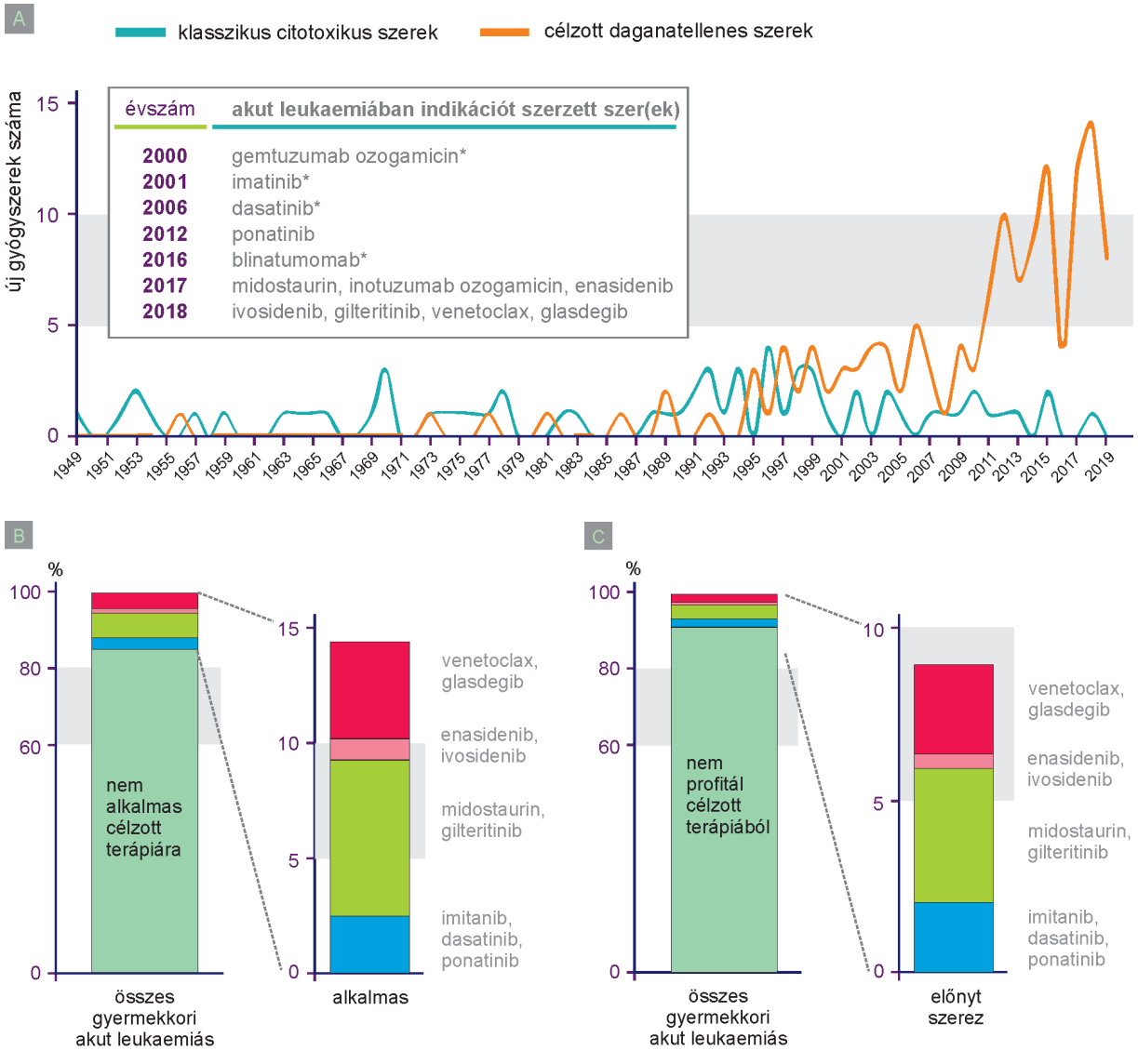
GENETIKAI ALCSOPORT	CÉLZOTT LEUKAEMIAELLENES SZER(EK) VAGY LEHETSÉGES RIZIKÓBESOROLÁSI SZEMPONT	REF.
ALL		
Ph+ *(BCR-ABL1)*	TKI, Aurora-kináz (alisertib)	[45]
TCF3-PBX1	PI3Ki (idelalisib), kemoterápiára reagál	[46]
TCF3-HLF	terápiarezisztens betegség, BCL2i (venetoclax)	[47]
KMT2A-átrendeződés	FLT3i (quizartinib), DOT1L-i (pinometostat), proteasoma-inhibitor (bortezomib), HDACi ± DNMTi rossz indukciós válasz esetén allo-HSCT	[48]
ETV6-RUNX1, ETV6-RUNX1-like, *DUX4*-átrendeződés (gyakori a koincidens *ERG*del)	kiváló prognózis miatt redukált intenzitású kezelés	[49]
MEF2D-átrendeződés	HDACi (panabinostat), proteasoma-inhibitor (bortezomib)	[50]
ZNF384-átrendeződés	FLT3i (sunitinib)	[51]
NT5C2-eltérés	tiopurin-rezisztenciával jár, relapszusra jellemző eltérés	[52]
CREBBP-eltérés	kortikoszteroid-rezisztenciával jár	[53]
Hipodiploid	BCL2i (venetoclax), allo-SCT	[54]
Magas hiperdiploid	közvetlen alacsony rizikócsoportba sorolás	[31]
iAMP21	közvetlenül magas rizikócsoportba sorolás	[55]
NOTCH1+	PSEN1i (β-szekretáz komplex gátlása)	[56]
IKZF1^{plus}	*IKZF1* eltérés esetén a FAKi más szereket potencíroz magas rizikócsoportba sorolás (kis MRD-vel is)	[57]
MYC-átrendeződés	rezisztens betegség, intenzív terápiát igényel	[58]
NUP214-ABL1 génfúzió/amplifikáció	TKI	[41]
onkogének (pl. *TAL1, LYL1, LMO1, TLX1 TLX3*) aktivációja *TCR* génekhez történő transzlokáció által	változó, de jelentős prognosztikai szerep	[59]
CDKN2A/*CDKN2B* deléciók	CDK4/CDK6i (palbociclib)	[60]
KMT2A-ENL átrendeződés	T-sejtes ALL-ben az *MLL* transzlokációja ellenére nem rossz a prognózis, az allo-SCT is elkerülhető	[61]

Ph-like prekurzor B-sejtes ALL		
ABL-osztály *(ABL1, ABL2, CSF1R, PDGFRA, PDGFRB)*	dasatinib	[62,63]
CRLF2-átrendeződés (*IGH-CRLF2, P2RY8-CRLF2, CRLF2*^{mut})	USP9Xi, HDACi (givinostat), ruxolitinib	
JAK2/EPOR-osztály *(JAK2, EPOR, PAX5)*	JAKi (ruxolitinib)	
Ras/MAPK-osztály *(NRAS, KRAS, PTPN11, NF1)*	MEKi (trametinib)	
Ritka kinázfúziók *(NTRK3, FGFR1, PTK2B, TYK2, DGKH, LYN)*	NTRKi (larotrectinib, NTRK3), ALKi/ROS1i (crizotinib, *NTRK3*), ponatinib (*FGFR1*), FAKi (*PTK2B*), TYK2i (*TYK2*)	
IKZF1-eltérés Ph-like betegekben	retinoidok adása előnyös, mert potencírozza a TKI-k hatását	
AML		
KMT2A-átrendeződés	DOT1Li (pinometostat); kimondottan csecsemő- és kisgyermekkorra jellemző; prognosztikai jelentősége a partnergéntől függ (pl. t(1;11): kedvező prognózis, t(10;11): kedvezőtlen prognózis)	[64–66]
NUP98-NSD1	CDK6i (palbociclib), BCL2i (navitoclax); kedvezőtlen prognózis; magas relapszus ráta; 80–90%-nál egyidejűleg *FLT3*-ITD mutáció	[67–69]
CBF-AML (inv(16): *CBFβ-MYH11*, t(8;21): *RUNX1-RUNX1T1*)	10–40%-ban KIT^{mut}, ekkor KITi (dasatinib) közvetlenül alacsony rizikójú csoportba sorolás	[70]
PML-RARA	ATRA, arzén-trioxid; kedvező prognózis	[71]
FLT3-aktiváló mutációk (köztük új, gyermekspecifikus típusok) ▸ *FLT3*-ITD + *NPM1*^{mut} (*DNMT3A*^{mut} nélkül) ▸ *FLT3*-ITD + *WT1*^{mut} vagy *NUP98-NSD1*	FLT3i (midostaurin, crenolanib, gilteritinib, lestaurtinib, quizartinib, sorafenib) ▸ koincidenciájuk prognosztikailag kedvező; a kimenetel jobb, mint az *FLT3*-ITD^{neg} esetekben ▸ gyakran sikertelen indukció, kedvezőtlen prognózis, közvetlenül magas rizikócsoportba sorolás (allo-HSCT)	[26]
IDH1/*IDH2* mutációk	IDHi (enasidenib, ivosidenib); gyermekkori AML-ben lényegesen ritkább, mint a felnőtt korban	[72]
NPM1^{mut}	kedvező prognózis (magas allélarányú *FLT3*-ITD mutáció hiányában)	[73,74]
CEBPA^{mut}	kedvező prognózis biallélikus mutáció esetén	[75]
-5/del(5q); -7/del(7q)	kedvezőtlen prognózis	[76]
RUNX1^{mut}	kedvezőtlen prognózis	[77]
GATA1^{mut}	fokozott érzékenység citarabin iránt; elsősorban Down-szindrómához asszociált myeloid leukaemiában fordul elő	[77]
MYST3-CREBBP	1 hónapnál fiatalabb csecsemőknél spontán remissziót is megfigyeltek már	[78]
CSF3R^{mut}	*CEBPA* mutációt hordozó betegeknél magasabb relapszusráta	[79]
inv(3)(q21.3q26.2) vagy t(3;3)(q21.3;q26.2) *GATA2, MECOM*	kedvezőtlen prognózis	[80]
DEK-NUP214	kedvezőtlen prognózis; 40%-nál egyidejűleg *FLT3*-ITD mutáció	[81]
MNX-ETV6	kedvezőtlen prognózis; kizárólag 2 éves kor alatt fordul elő	[82]
CBFA2T3-GLS2	kedvezőtlen prognózis; AMKL-ben gyakori; kizárólag 3 éves kor alatt fordul elő	[83]
Ras/MAPK-osztály (*NRAS, KRAS, PTPN11, NF1)*	MEKi (trametinib)	[84]

Rövidítések: ALL: akut lymphoblastos leukaemia; AMKL: akut megakaryoblastos leukaemia; AML: akut myeloid leukaemia; Ph: Philadelphia; TKI: tirozin-kináz-inhibitor; allo-HSCT: allogén vérképző őssejt-transzplantáció; MRD: minimális/mérhető reziduális betegség; ITD: internal tandem duplication, belső tandem duplikáció; ATRA: all-trans-retinoic acid, csupa-transz-retinsav.

eseménymentes túléléssel, amelyet egy magyarországi betegeket vizsgáló közelmúltbeli tanulmányunkban mi is megerősítettünk.[21] Egyes eltéréseket továbbá összefüggésbe hoztak a kemoterápiában alkalmazott citotoxikus szerekre mutatott rezisztenciával (*CREBBP*-eltérés esetén kortikoszteroidra, *NT5C2*-eltérés esetén 6-merkaptopurinra adott csökkent válasz, *3. táblázat*).

Gyermekkori AML-ben gyakoriságuk miatt kiemelendők a *NUP98* génátrendeződéssel, illetve az *FLT3* speciális aktiváló mutációjához (internal tandem duplication, ITD) társuló, *WT1*-eltéréssel járó kórképek *(3. táblázat)*, amelyek rossz prognózist vetítenek előre és minden esetben allogén vérképző őssejt-transzplantáció irányába terelik a klinikai ellátást. Kemorezisztenciával, antraciklinekkel szembeni csökkent érzékenységgel hozzák összefüggésbe a felnőttkori AML-ben korai klonális eseményként számon tartott *DNMT3A* mutációt,[38] ez az eltérés azonban gyermekkorban nagyon ritkán fordul elő.[26]



1. ábra: Kis molekulájú célzott daganatgátló anyagok megjelenése és jelentősége a gyermekkori akut leukaemiák korszerű kezelésében. ***A:*** *Az Amerikai Élelmiszer- és Gyógyszerengedélyeztetési Hivatal (FDA) által törzskönyvezett új daganatellenes szerek számának évenkénti eloszlása. Külön görbe jelöli a klasszikus citotoxikus (kék) és a célzott daganatellenes (narancs) szereket. Az engedélyezett hatóanyagok robbanásszerű emelkedéséből jól látható a molekulárisan célzott terápia térnyerése az utóbbi években. A táblázatbetét az akut leukaemiákra törzskönyvezett célzott terápiás szereket foglalja össze, közülük a gyermekkorban is on-label hatóanyagok csillaggal (*) kerültek megjelölésre.* ***B:*** *A halmozott oszlopdiagram összefoglalja az akut leukaemiákban genetikai alapon on-label célzott terápiás készítmények indikációs kritériumainak megfelelő betegek arányát az akut leukaemiás gyermekpopulációban.* ***C:*** *Az oszlopdiagram az akut leukaemiás gyermekek azon hányadát jelöli, akik a feltüntetett kis molekulájú inhibitorokra jó választ adnak, így a B ábrához képest azokat a betegeket emeli ki, akik valóban terápiás előnyhöz jutnak.*

A célzott daganatgátlás hatása a gyógyszeripar tevékenységére korábban soha nem látott méreteket ölt: az Amerikai Élelmiszer- és Gyógyszerengedélyeztetési Hivatal (FDA) a 2010-es években több kis molekulájú inhibitort törzskönyvezett, mint az azt megelőző hat évtizedben összesen *(1A ábra)*. A hatóanyagok széles körű klinikai gyakorlatba történő bevezetése ugyan hosszadalmas tanulmányokat igényel, kizárólag a gyermekkori leukaemiákat tekintve, világszinten jelenleg 60-nál is több olyan klinikai vizsgálat van folyamatban, amelyben molekuláris genetikai kritériumok teljesülésére alapozva tesztelnek célzott terápiás készítményt.[39] A törzskönyvbe vett indikációs köröket figyelembe véve jelenleg összesen 12 célzott daganatellenes szer van elfogadva az Egyesült Államokban akut leukaemiák kezelésére (*on-label* indikáció), ebből 3 immunterápiás készítmény, gyermekkorra pedig a mai napig mindössze 4 kapott indikációt (*1A ábra* szöveges része). Megvizsgáltuk, hogy ezen belül a 9 genetikai indikációjú hatóanyagot szakirodalmi leírások alapján a gyermekkori akut leukaemiás populáció mekkora hányadán lehetne alkalmazni *(1B ábra)*, és mekkora az aránya azoknak, akik a hatóanyagoknak köszönhetően várhatóan terápiás előnyhöz is jutnának *(1C ábra)*. Az eredmény napjainkban még alacsony kihasználhatóságot mutat: a betegek összesen 14,4%-a teljesíti valamelyik indikációs kritériumot, és a teljes akut leukaemiás gyermekpopuláció összesen 8,9%-a profitálhat a célzott szerekből. Megjegyzendő továbbá, hogy a vizsgált hatóanyagokra adott teljes válaszarány (overall response rate, ORR) széles skálán, 40 és 85% között mozog. Ez nem jelenti azt, hogy nem is várható ezeknek az arányszámoknak a növekedése, egyelőre azonban számos kis molekulájú inhibitor csak preklinikai vizsgálatokban, azaz betegeredetű tumormintákból képzett xenograftokon, illetve sejtvonalakon végzett kísérletekben bizonyult hatékonynak, vagy más daganatos megbetegedésben került törzskönyvezésre. A *3. táblázatban* feltüntetett célzott biológiai terápiás lehetőségek nagyobb része is egyelőre csak ilyen adatokon nyugszik, nem betegeken folytatott klinikai tanulmányok eredményein. Az amúgy elfogadható prognózisú betegeknél ezeknek a gyermekkorra nem törzskönyvezett, gyermekkori dozírozási információ nélküli szereknek az alkalmazása nem jön szóba, kényszerhelyzetben azonban használatuk mérlegelhető. Gyakori jelenség, hogy ezeknek a hatóanyagoknak az indikációs köre idővel bővül, ezzel több tumortípusnál is alkalmazhatóvá válnak. Kiemelkedő figyelmet érdemelnek a tirozin-kináz-inhibitorok (TKI), amelyek évek óta részét képezik a *BCR/ABL1*+ ALL-es gyermekek protokoll szerinti kezelésének. Ebben a betegcsoportban a TKI áttörésszerű előrelépést hozott, a korábban csak vérképző őssejt-transzplantációval kezelhető betegek ma több esetben sejtterápia nélkül is gondozhatók. Újabban további genetikai alcsoportokban is felmerült a TKI-k használata. Meglepően gyors és tartós dasatinib-válaszról számoltak be *NUP214-ABL1*-pozitív T-sejtes és *NCOR1-LYN*-pozitív *BCR/ABL1*-szerű (Ph-like) ALL-es betegekben.[40,41] A rendszerint kedvezőtlen prognózisú, kemoterápiára rosszul reagáló Ph-like ALL érdekessége, hogy az aberráns gének alapján további alosztályokra tagolható *(3. táblázat)*, és az elkülönített 5 alosztály mindegyikében más-más célzott terápiás szer alkalmazása vethető fel, jelenleg off-label indikáció keretében. Kiemelendő még az az AML-ben tapasztalt jelenség, hogy az egyes genomikai-transzkriptomikai eltérések megjelenése különböző életkorokban lényegesen eltérő. A *KMT2A*- és *NUP98* génátrendeződések például tipikus gyermekkori aberrációk, míg az *IDH1* és *IDH2* vagy a *DNMT3A* mutációi felnőttkorban jelennek meg.[42] Ennek következménye, hogy a felnőtt AML-es betegekre kifejlesztett célzott terápiás szerek nehezen illeszthetők be a gyermekek kezelési protokolljába.

Akut leukaemiás betegeknél ismert jelenség a csíravonalbeli, a *de novo* betegségre jellemző, illetve a relabált betegségre jellemző örökítőanyag egymáshoz viszonyított jelentős eltérése, tehát a mutációs profil, illetve azzal párhuzamosan a biológiai viselkedés időbeli változása.[43,44] A relapszuskori klonális mutációk gyakran olyan szubklónokra vezethetők vissza, amelyek már a *de novo* betegség diagnózisakor is jelen voltak a betegben. A legújabb irodalmi adatok számos klinikailag is hasznos információval szolgálnak a relapszushoz vezető *(driver)* mutációs mechanizmusokkal kapcsolatban:[22]

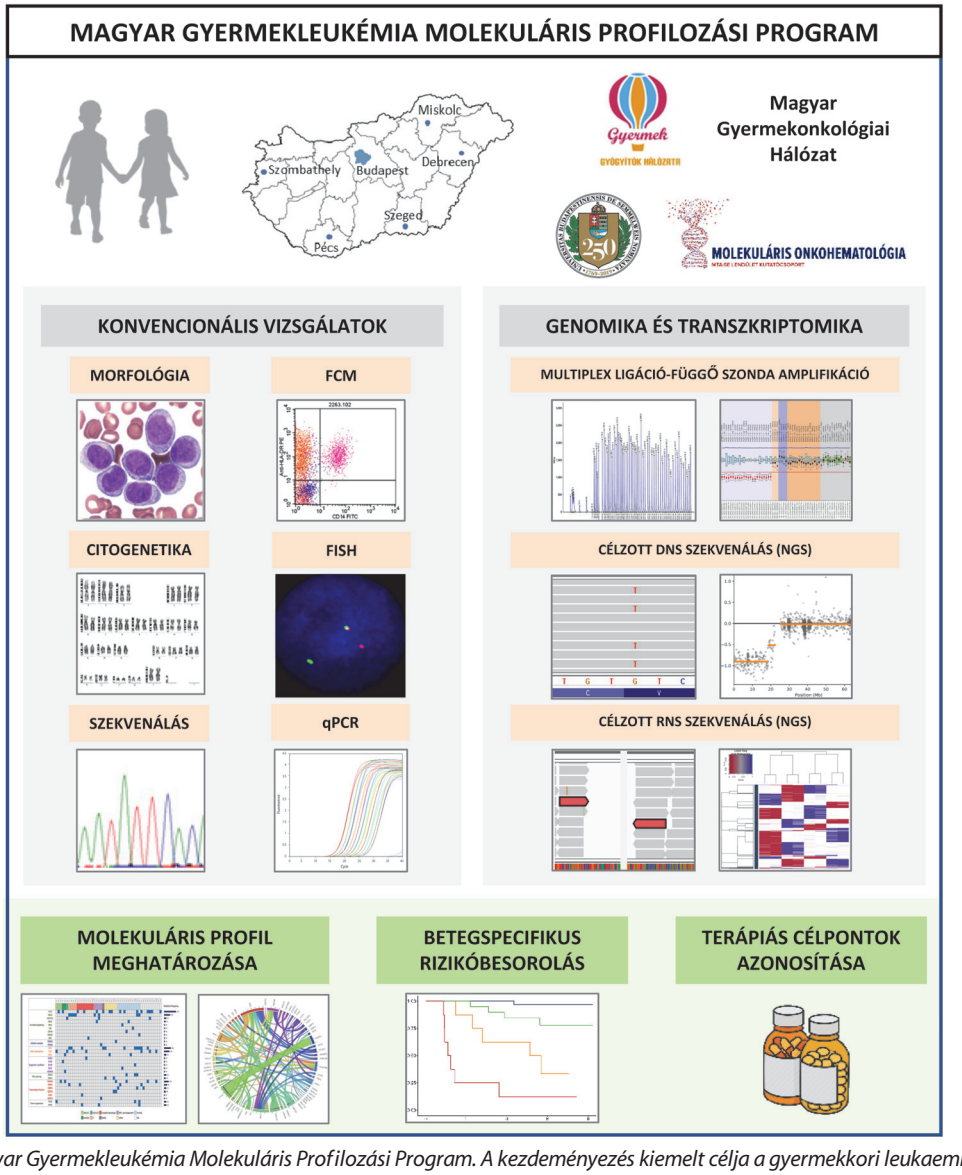
- A szekunder leukaemiák, beleértve az eredeti betegségtől lényegesen eltérő immunfenotípusú, ún. lineage-shift eseteket is, leggyakrabban egy archaikus klónból alakulnak ki, nem pedig független, újabb elsődleges leukemogenezissel.
- A hipermutáció relabált ALL-es betegekben általános jelenség, ami neoepitópok prezentációjával jár. Az érintett blasztsejtek potenciálisan érzékennyé válhatnak immunellenőrzőpont-inhibitorokkal szemben – ennek alapos vizsgálata azonban még nem kezdődött el.
- Mivel az ALL kiújulásakor megjelennek kizárólag a relapszusra specifikus, jellemző géneltérések is (pl. *NCOR2*, *USH2A*, *NT5C2* variánsai), ezek célzott ke-

resése és követése a *de novo* betegségperiódusban előrejelezhet egy később bekövetkező relapszust.

Mindezek arra utalnak, hogy az akut leukaemiás megbetegedések időbeli követése szempontjából a minimális/mérhető reziduális betegség (MRD) számszerűsítése mellett kiemelkedően fontos a leukaemia részletes genomikai-transzkriptomikai karakterizálása, mely terápia releváns információt nyújthat a betegek precíziós kezeléséhez.

„Magyar Gyermekleukémia Molekuláris Profilozási Program"

Az akut leukaemiás gyermekek számára a gyógyulási esélyek további növekedése a korábban bemutatott, fejlett laboratóriumi technikák klinikopatológiai diagnosztikába való hatékony bevezetésétől várható. A 2019-es évben ebből a célból indítottuk útjára a Magyar Gyermekleukémia Molekuláris Profilozási Programot, amely egy országos összefogás keretében biztosítja a hazai leukaemiás gyermekek mintáinak korábbinál



2. ábra. Magyar Gyermekleukémia Molekuláris Profilozási Program. A kezdeményezés kiemelt célja a gyermekkori leukaemiában szenvedő betegek diagnosztikus és relapszuskor vett csontvelő mintáinak átfogó genomikai és transzkriptomikai karakterizálása annak érdekében, hogy klinikailag releváns aberrációk azonosításával elősegítsük a betegek hatékonyabb rizikóbesorolását, illetve molekuláris inhibitorok alkalmazását lehetővé tevő célpontokat azonosítsunk az egyes betegekben. A Program a Magyar Gyermekonkológusok és Gyermekhematológusok Társaságának kezdeményezése nyomán, az összes hazai gyermekhematológiai központ részvételével és támogatásával valósul meg. A citogenetikai vizsgálatokat a II. Sz. Gyermekgyógyászati Klinika Genetikai Részlege, a genomikai és transzkriptomikai vizsgálatokat az I. Sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet Molekuláris Onkohematológiai Laboratóriuma végzi.

3. ábra. A Magyar Gyermekleukémia Molekuláris Profilozási Program keretében eddig azonosított genetikai aberrációk. ***A:*** *Multiplex ligációfüggő szonda amplifikációval kimutatott, DNS kópiaszám-változással járó aberrációk gyermekkori ALL-ben szenvedő betegek csontvelőmintáiban.* ***B:*** *DNS alapú újgenerációs mélyszekvenálással detektált mutációk gyermekkori ALL-ben szenvedő betegek csontvelőmintáiban.* ***C:*** *RNS alapú újgenerációs szekvenálással azonosított génfúziók gyermekkori ALL-ben szenvedő betegek csontvelőmintáiban.* ***D:*** *DNS alapú újgenerációs mélyszekvenálással detektált mutációk gyermekkori MDS/AML-ben szenvedő betegek csontvelőmintáiban.*

jóval részletesebb molekuláris patológiai vizsgálatát *(2. ábra)*. A kombinált DNS és RNS alapú, többségében újgenerációs szekvenálási technikát alkalmazó vizsgálatok olyan részletgazdag és átfogó képet nyújtanak az egyes leukaemiákról, mely lehetővé teszi a betegek nemzetközileg elvárt pontosságú prognosztikai besorolását, illetve segíti az esetlegesen alkalmazható, célzott terápiás stratégia hatékony kiválasztását. A Program keretében eddig 126 beteg diagnosztikus és/vagy relapszus idején vett mintáját vizsgáltuk meg, az azonosított eltérésekről a *3. ábra* nyújt áttekintést. Szándékaink szerint a kezdeményezés módszertani háttere a közeljövőben tovább bővül, többek között lehetővé téve a minimális/mérhető reziduális betegség még pontosabb és megbízhatóbb meghatározását is.

Összefoglalás

A gyermekkori akut leukaemiában szenvedő betegek kezelése óriási fejlődésen ment keresztül az elmúlt évtizedekben. Az újonnan elérhető célzott terápiák tovább javíthatják a betegek egy részének túlélését, alkalmazásukhoz azonban a citogenetikai, molekuláris citogenetikai és hagyományos molekuláris genetikai vizsgálatok mellett szükség van a betegminták modern genomikai és transzkriptomikai módszerekkel való analízisére is. Ezt teszi lehetővé a közelmúltban életre hívott Magyar Gyermekleukémia Molekuláris Profilozási Program, mely korszerű molekuláris diagnosztikai vizsgálatot biztosít a hazai leukaemiás gyermekek számára, ezáltal elérhetővé téve számukra a terápiás lehetőségek korábbinál szélesebb repertoárját.

Irodalom

1. Asselin BL. Epidemiology of childhood and adolescent cancer. In: Kliegman RM, Stanton BF, St Geme JW, Schor NF, eds. Nelson Textbook of Pediatrics. 20th ed. Philadelphia: Elsevier, 2016; 2416-8.
2. Howlader N, Noone AM, Krapcho M, Miller D, Bishop K, Kosary CL et al. SEER Cancer Statistics Review.Internet Bethesda, MD; Available from: https://seer.cancer.gov/csr/1975_2014/
3. Garami M, Schuler D, Jakab Z. Az Országos Gyermektumor Regiszter jelentősége a gyermekonkológiai ellátásban. Orv Hetil 2014; 155:732-9.
4. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. Blood 2009; 114:937-51.
5. Teachey DT, Pui CH. Comparative features and outcomes between paediatric T-cell and B-cell acute lymphoblastic leukaemia. Lancet Oncol 2019; 20:e142–54. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045(19)30031-2
6. Rubnitz JE. How I treat pediatric acute myeloid leukemia. Blood 2012; 119:5980-8.
7. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. Blood 2016; 127:2391-405.
8. Greaves M. Darwin and evolutionary tales in leukemia. Hematology 2009; 2009:3-12.
9. Ford AM, Bennett CA, Price CM, Bruin MCA, Van Wering ER, Greaves M. Fetal origins of the TEL-AML1 fusion gene in identical twins with leukemia. Proc Natl Acad Sci U S A 1998; 95:4584-8.
10. Alpar D, Wren D, Ermini L, Mansur M, van Delft F, Bateman C, et al. Clonal origins of ETV6-RUNX1+ acute lymphoblastic leukemia: studies in monozygotic twin. Leukemia 2015; 29:839-46.
11. Hong D, Gupta R, Ancliff P, Atzberger A, Brown J, Soneji S, et al. Initiating and cancer-propagating cells in TEL-AML1–associated childhood leukemia. Science 2008; 319:336-9.
12. Bateman C, Alpar D, Ford A, Colman S, Wren D, Morgan M, et al. Evolutionary trajectories of hyperdiploid ALL in monozygotic twins. Leukemia 2015; 29:58-65.
13. Wiemels J, Cazzaniga G, Daniotti M, Eden O, Addison G, Masera G, et al. Prenatal origin of acute lymphoblastic leukaemia in children. Lancet 1999; 354:1499-503.
14. Wiemels JL, Xiao Z, Buffler PA, et al. In utero origin of t(8;21) AML1-ETO translocations in childhood acute myeloid leukemia. Blood 2002; 99:3801-5.
15. Mullighan CG, Goorha S, Radtke I, Miller CB, Coustan-Smith E, Dalton JD, et al. Genome-wide analysis of genetic alterations in acute lymphoblastic leukaemia. Nature 2007; 446:758-64.
16. Iacobucci I, Mullighan CG. Genetic basis of acute lymphoblastic leukemia. J Clin Oncol 2017; 35:975-83.
17. Dobbins SE, Sherborne AL, Ma YP, Bardini M, Biondi A, Cazzaniga G, et al. The silent mutational landscape of infant MLL-AF4 pro-B acute lymphoblastic leukemia. Genes, Chromosomes Cancer 2013; 52:954-60.
18. Mullighan C, Su X, Zhang J, Radtke I, Phillips LAA, Miller CB, et al. Deletion of IKZF1 and prognosis in acute lymphoblastic leukemia. N Engl J Med 2009; 360:470-80.
19. Paulsson K, Lilljebjörn H, Biloglav A, Olsson L, Rissler M, Castor A, et al. The genomic landscape of high hyperdiploid childhood acute lymphoblastic leukemia. Nat Genet 2015; 47:672-6.
20. Mullighan CG, Phillips LA, Su X, Ma J, Miller CB, Shurtleff SA, et al. Genomic analysis of the clonal origins of relapsed acute lymphoblastic leukemia. Science 2008; 322:1377-80.
21. Kiss R, Gángó A, Benard-Slagter A, Egyed B, Haltrich I, Hegyi L, et al. Comprehensive profiling of disease-relevant copy number aberrations for advanced clinical diagnostics of pediatric acute lymphoblastic leukemia. Mod Pathol 2020; 33:812-24.
22. Waanders E, Gu Z, Dobson SM, Antić Ž, Crawford JC, Ma X, et al. Mutational landscape and patterns of clonal evolution in relapsed pediatric acute lymphoblastic leukemia. Blood Cancer Discov 2020; 1:1-16.

23. Gutierrez A, Kentsis A. Acute myeloid/T-lymphoblastic leukaemia (AMTL): a distinct category of acute leukaemias with common pathogenesis in need of improved therapy. Br J Haematol 2018; 180:919-24.
24. Bond J, Krzywon A, Lhermitte L, Roumier C, Roggy A, Belhocine M, et al. A transcriptomic continuum of differentiation arrest identifies myeloid interface acute leukemias with poor prognosis. Leukemia 2020; https://www.nature.com/articles/s41375-020-0965-z.
25. de Rooij J, Zwaan C, van den Heuvel-Eibrink M. Pediatric AML: From biology to clinical management. J Clin Med 2015; 4:127-49.
26. Bolouri H, Farrar JE, Jr TT, Ries RE, Lim EL, Alonzo TA, et al. The molecular landscape of pediatric acute myeloid leukemia reveals recurrent structural alterations and age-specific mutational interactions. Nat Med 2018; 24:103-12.
27. Anderson K, Lutz C, van Delft F, Bateman C, Guo Y, Colman S, et al. Genetic variegation of clonal architecture and propagating cells in leukaemia. Nature 2011; 469:356-61.
28. Gerlinger M, Rowan A, Horswell S, Larkin J, Endesfelder D, Gronroos E, et al. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. N Engl J Med 2012; 366:883-92.
29. Alpar D, Barber L, Gerlinger M. Genetic intratumor heterogeneity. In: Gray S, eds. Epigenetic Cancer Therapy. Elsevier, 2015; 571-93.
30. Greaves M. Leukaemia 'firsts' in cancer research and treatment. Nat Rev Cancer 2016; 16:163-72.
31. Gu Z, Churchman ML, Roberts KG, et al. PAX5-driven subtypes of B-progenitor acute lymphoblastic leukemia. Nat Genet 2019; 51:296-307.
32. Coccaro N, Anelli L, Zagaria A, Specchia G, Albano F. Next-generation sequencing in acute lymphoblastic Leukemia. Int J Mol Sci 2019; 20:2929.
33. Cai SF, Levine RL. Genetic and epigenetic determinants of AML pathogenesis. Semin Hematol 2019; 56:84-9.
34. Easton J, Gonzalez-Pena V, Yergeau D, Ma X, Gawad C. Genome-wide segregation of single nucleotide and structural variants into single cancer cells. BMC Genomics 2017; 18:906.
35. Ma X, Edmonson M, Yergeau D, Muzny DM, Hampton OA, Rusch M, et al. Rise and fall of subclones from diagnosis to relapse in pediatric B-acute lymphoblastic leukaemia. Nat Commun 2015; 6:1-12.
36. Hamadeh L, Enshaei A, Schwab C, et al. Validation of the United Kingdom copy-number alteration classifier in 3239 children with B-cell precursor ALL. Blood Adv 2019; 3:148-57.
37. O'Connor D, Enshaei A, Bartram J, Hancock J, Harrison CJ, Hough R, et al. Genotype-specific minimal residual disease interpretation improves stratification in pediatric acute lymphoblastic leukemia. J Clin Oncol 2018; 36:34-43.
38. Guryanova OA, Shank K, Spitzer B, et al. DNMT3A mutations promote anthracycline resistance in acute myeloid leukemia via impaired nucleosome remodeling. Nat Med 2016; 22: 1488-95.
39. U.S. National Libray of Medicine ClinicalTrials.gov. Internet Available from: https://clinicaltrials.gov
40. Dai H-P, Yin J, Li Z, Yang C-X, Cao T, Chen P. Rapid molecular response to Dasatinib in a pediatric relapsed acute lymphoblastic leukemia with NCOR1-LYN fusion. Front Oncol 2020; 10:1-6.
41. Deenik W, Beverloo H, van der Poel-van de Luytgaarde S, Wattel M, van Esser J, Valk P, et al. Rapid complete cytogenetic remission after upfront dasatinib monotherapy in a patient with a NUP214-ABL1-positive T-cell acute lymphoblastic leukemia. Leukemia 2009; 23:627-9.
42. Lonetti A, Pession A, Masetti R. Targeted therapies for pediatric AML: Gaps and perspective. Front Pediatr 2019; 7:1-11.
43. Farrar JE, Schuback HL, Ries RE, Wai D, Hampton OA, Trevino LR, et al. Genomic profiling of pediatric acute myeloid leukemia reveals a changing mutational landscape from disease diagnosis to relapse. Cancer Res 2016; 76:2197-205.
44. Li B, Brady SW, Ma X, Shen S, Zhang Y, Li Y, et al. Therapy-induced mutations drive the genomic landscape of relapsed acute lymphoblastic leukemia. Blood 2020; 135:41-55.
45. Okabe S, Tauchi T, Tanaka Y, Ohyashiki K. Therapeutic targeting of Aurora A kinase in Philadelphia chromosome-positive ABL tyrosine kinase inhibitor-resistant cells. Oncotarget 2018; 9:32496-506.
46. Eldfors S, Kuusanmäki H, Kontro M, Majumder MM, Parsons A, Edgren H, et al. Idelalisib sensitivity and mechanisms of disease progression in relapsed TCF3-PBX1 acute lymphoblastic leukemia. Leukemia 2017; 31:51-7.
47. Fischer U, Forster M, Rinaldi A, Risch T, Sungalee S, Warnatz H-J, et al. Genomics and drug profiling of fatal TCF3-HLF-positive acute lymphoblastic leukemia identifies recurrent mutation patterns and therapeutic options. Nat Genet 2015; 47:1020-9.
48. Winters AC, Bernt KM. MLL-rearranged leukemias — an update on science and clinical approaches. Front Pediatr 2017; 5:1-21.
49. Li J-F, Dai Y-T, Lilljebjörn H, Shen S-H, Cui B-W, Bai L, et al. Transcriptional landscape of B cell precursor acute lymphoblastic leukemia based on an international study of 1,223 cases. Proc Natl Acad Sci U S A 2018; 115:11711-20.
50. Gu Z, Churchman M, Roberts K, Li Y, Liu Y, Harvey RC, et al. Genomic analyses identify recurrent MEF2D fusions in acute lymphoblastic leukaemia. Nat Commun 2016; 7:13331.
51. Griffith M, Griffith OL, Krysiak K, Skidmore ZL, Campbell KM, Lesurf R, et al. Comprehensive genomic analysis reveals FLT3 activation and a therapeutic strategy for a patient with relapsed adult B-lymphoblastic leukemia. Exp Hematol 2016; 44:603-13.
52. Moriyama T, Liu S, Li J, Meyer J, Zhao X, Yang W, et al. Mechanisms of NT5C2-mediated thiopurine resistance in acute lymphoblastic leukemia. Mol Cancer Ther 2019; 18:1887-95.
53. Mullighan CG, Zhang J, Kasper LH, Lerach S, Payne-turner D, Phillips LA, et al. CREBBP mutations in relapsed acute lymphoblastic leukaemia. Nature 2011; 471:235-9.
54. Diaz-Flores E, Comeaux EQ, Kim KL, Melnik E, Beckman K, Davis KL, et al. Bcl-2 Is a therapeutic target for hypodiploid B-lineage acute lymphoblastic leukemia. Cancer Res 2019; 79:2339-51.

55. Harrison CJ, Moorman A V, Schwab C, Carroll AJ, Raetz EA, Devidas M, et al. An international study of intrachromosomal amplification of chromosome 21 (iAMP21): cytogenetic characterization and outcome. Leukemia 2014; 28:1015-21.
56. Habets RA, Bock CE De, Serneels L, Lodewijckx I, Verbeke D, Nittner D, et al. Safe targeting of T cell acute lymphoblastic leukemia by pathology-specific NOTCH inhibition. Sci Transl Med 2019; 11:eaau6246.
57. Marke R, van Leeuwen FN, Scheijen B. The many faces of IKZF1 in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. Haematologica 2018; 103:565-74.
58. Sakaguchi K, Imamura T, Ishimaru S, et al. Nationwide study of pediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia with chromosome 8q24/MYC rearrangement in Japan. Pediatr Blood Cancer 2020; 67:1-8.
59. Van Vlierberghe P, Ferrando A. The molecular basis of T cell acute lymphoblastic leukemia. J Clin Invest 2012; 122:3398-406.
60. Carrasco Salas P, Fernández L, Vela M, Bueno D, González B, Valentín J, et al. The role of CDKN2A/B deletions in pediatric acute lymphoblastic leukemia. Pediatr Hematol Oncol 2016; 33:415-22.
61. Rubnitz JE, Camitta BM, Mahmoud H, Raimondi SC, Carroll AJ, Borowitz MJ, et al. Childhood acute lymphoblastic leukemia with the MLL-ENL fusion and t(11;19)(q23;p13.3) translocation. J Clin Oncol 1999; 17:191-6.
62. Tran TH, Loh ML. Ph-like acute lymphoblastic leukemia. Hematology 2016; 1:561-6.
63. Tasian SK, Loh ML, Hunger SP. Philadelphia chromosome-like acute lymphoblastic leukemia. Blood 2017; 130:2064-72.
64. Stein EM, Garcia-Manero G, Rizzieri DA, Tibes R, Berdeja JG, Savona MR, et al. The DOT1L inhibitor pinometostat reduces H3K79 methylation and has modest clinical activity in adult acute leukemia. Blood 2018; 131:2661-9.
65. Chen Y, Kantarjian H, Pierce S, Faderl S, O'Brien S, Qiao W, et al. Prognostic significance of 11q23 aberrations in adult acute myeloid leukemia and the role of allogeneic stem cell transplantation. Leukemia 2013; 27:836-42.
66. Balgobind B V., Raimondi SC, Harbott J, Zimmermann M, Alonzo TA, Auvrignon A, et al. Novel prognostic subgroups in childhood 11q23/MLL-rearranged acute myeloid leukemia: Results of an international retrospective study. Blood 2009; 114:2489-96.
67. Schmoellerl J, Barbosa I, Eder T, Brandstoetter T, Schmidt L, Maurer B, et al. CDK6 is an essential direct target of NUP98-fusion proteins in acute myeloid leukemia. Blood 2020; 136:387-400.
68. Kivioja JL, Thanasopoulou A, Kumar A, Kontro M, Yadav B, Heckman CA. Dasatinib and navitoclax act synergistically to target NUP98-NSD1+/FLT3-ITD+ acute myeloid leukemia. Leukemia 2019; 33:1360-72.
69. Akiki S, Dyer SA, Grimwade D, Ivey A, Abou-Zeid N, Borrow J, et al. NUP98-NSD1 fusion in association with FLT3-ITD mutation identifies a prognostically relevant subgroup of pediatric acute myeloid leukemia patients suitable for monitoring by real time quantitative PCR. Genes Chromosomes Cancer 2013; 52:1053-64.
70. Paschka P, Schlenk RF, Weber D, Benner A, Bullinger L, Heuser M, et al. Adding dasatinib to intensive treatment in core-binding factor acute myeloid leukemia – results of the AMLSG 11-08 trial. Leukemia 2018; 32:1621-30.
71. von Neuhoff C, Reinhardt D, Sander A, et al. Prognostic impact of specific chromosomal aberrations in a large group of pediatric patients with acute myeloid leukemia treated uniformly according to trial AML-BFM 98. J Clin Oncol 2010; 28:2682-9.
72. Stein EM, DiNardo CD, Fathi AT, et al. Molecular remission and response patterns in patients with mutant-IDH2 acute myeloid leukemia treated with enasidenib. Blood 2019; 133:676-87.
73. Brown P, McIntyre E, Rau R, Meshinchi S, Lacayo N, Dahl G, et al. The incidence and clinical significance of nucleophosmin mutations in childhood AML. Blood 2007; 110:979-85.
74. Hollink IHIM, Zwaan CM, Zimmermann M, Arentsen-Peters TCJM, Pieters R, Cloos J, et al. Favorable prognostic impact of NPM1 gene mutations in childhood acute myeloid leukemia, with emphasis on cytogenetically normal AML. Leukemia 2009; 23:262-70.
75. Hollink IHIM, van den Heuvel-Eibrink MM, Arentsen-Peters STCJM, et al. Characterization of CEBPA mutations and promoter hypermethylation in pediatric acute myeloid leukemia. Haematologica 2011; 96:384-92.
76. Harrison CJ, Hills RK, Moorman A V., Grimwade DJ, Hann I, Webb DKH, et al. Cytogenetics of childhood acute myeloid leukemia: United Kingdom Medical Research Council Treatment Trials AML 10 and 12. J Clin Oncol 2010; 28:2674-81.
77. Yamato G, Shiba N, Yoshida K, Hara Y, Shiraishi Y, Ohki K, et al. RUNX1 mutations in pediatric acute myeloid leukemia are associated with distinct genetic features and an inferior prognosis. Blood 2018; 131:2266-70.
78. Classen CF, Behnisch W, Reinhardt D, Koenig M, Möller P, Debatin K-M. Spontaneous complete and sustained remission of a rearrangement CBP (16p13)-positive disseminated congenital myelosarcoma. Ann Hematol 2005; 84:274-5.
79. Maxson JE, Ries RE, Wang Y-C, Gerbing RB, Kolb EA, Thompson SL, et al. CSF3R mutations have a high degree of overlap with CEBPA mutations in pediatric AML. Blood 2016; 127:3092-4.
80. Balgobind B V., Lugthart S, Hollink IH, Arentsen-Peters STJCM, Van Wering ER, De Graaf SSN, et al. EVI1 overexpression in distinct subtypes of pediatric acute myeloid leukemia. Leukemia 2010; 24:942-9.
81. Sandahl JD, Coenen EA, Forestier E, Harbott J, Johansson B, Kerndrup G, et al. t(6;9)(p22;q34)/DEK-NUP214-rearranged pediatric myeloid leukemia: An international study of 62 patients. Haematologica 2014; 99:865-72.
82. von Bergh A, van Drunen E, van Wering E, van Zutven L, Hainmann I, Lönnerholm G, et al. High incidence of t(7;12)(q36;p13) in infant AML but not in infant ALL, with a dismal outcome and ectopic expression of HLXB9. Genes Chromosomes Cancer 2006; 45:731-9.
83. Noort S, Zimmermann M, Reinhardt D, et al. Prognostic impact of t(16;21)(p11;q22) and t(16;21)(q24;q22) in pediatric AML: A retrospective study by the I-BFM study group. Blood 2018; 132):1548-92.
84. Borthakur G, Popplewell L, Boyiadzis M, et al. Activity of the oral mitogen-activated protein kinase kinase inhibitor trametinib in RAS-mutant relapsed or refractory myeloid malignancies. Cancer 2016; 122:1871-9.

SEMMELWEIS KIADÓ SZAK- ÉS TANKÖNYVEI

Társadalomtudományok / Neurológia

Könyveink megvásárolhatók a Legendus Könyvesboltban, illetve a Líra Kereskedelmi hálózaton belül az egész országban, de egyre nagyobb igényt elégít ki webshopunk.

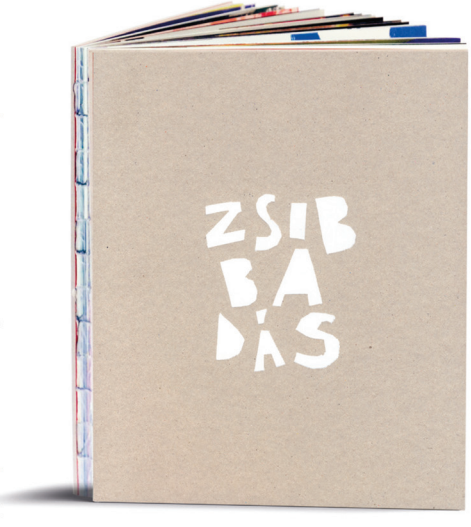
Pim van Lommel

VÉGTELEN TUDAT

A halálközeli élmények tudományos olvasata

A holland Pim van Lommel (1943) kardiológusként tevékenykedett 1977 és 2003 között. Miután a halálközeli élményekről készült első tanulmánya megjelent a tekintélyes *The Lancet* c. orvosi lapban (2003), Dr. van Lommel felhagyott kardiológusi pályájával, hogy idejét a halálközeli élményekről való további kutatásoknak és világszerte tartott előadásainak szentelje. A könyv Hollandiában bestseller lett 2007-ben, jelenleg a 24. kiadását éli.

372 oldal ■ Ára: 3800 Ft



Zsemberi-Szígyártó Miklós

ZSIBBADÁS

Könyv a pánikbetegségről

Könyv művészi kifejezése a pánikbeteg érzéseiről, küzdelmeiről, az átélés megtanulásáról pánikbetegeknek és a nem pánikbetegeknek (családtagoknak, barátoknak, járókelőknek, orvosoknak...) – a megértésért, az elfogadásért, a segítségnyújtásért vagy csak úgy a nagyvilág felé.

936 oldal ■ Ára: 9800 Ft

Könyvek E-könyvek Folyóiratok Apropó Poszter Box

Semmelweis Kiadó
1089 Budapest, Nagyvárad tér 4.
www.semmelweiskiado.hu

LEGENDUS KÖNYVESBOLT
1089 Budapest, Nagyvárad tér 4.
Tel.: 210-4408, 459-1500/56353
Nyitva tartás: H–Sz: 9.00–16.00,
Cs: 9.00–18.00, P: 9.00–14.00
E-mail: info@semmelweiskiado.hu

ONCOLOGY

Takeda Pharma Kft.,
1138 Budapest, Népfürdő u. 22., Magyarország
Tel: +36-1-270-7030 / Fax: +36-1-239-0968
C-APROM/HU/NINL/018
Lezárás dátuma: 2021.03.30

TP53 diszfunkciós myeloma multiplex és kezelési lehetőségei

Treatment of multiple myeloma with *TP53* disfunction

Kozma András[1], Hardi Apor[2], Ceglédi Andrea[2], Matula Zsolt[1], Bors András[1], Andrikovics Hajnalka[1], Varga Gergely[3], Mikala Gábor[2]

Dél-pesti Centrumkórház, Országos Hematológiai és Infektológiai Intézet, Budapest

[1] Molekuláris Genetikai Laboratórium

[2] Hematológiai és Őssejt-Transzplantációs Osztály

[3] Semmelweis Egyetem, Belgyógyászati és Hematológiai Klinika

E-levél: gmikala@dpckorhaz.hu

ÖSSZEFOGLALÁS A rosszindulatú daganatok, így a myeloma multiplex kezelési eredményei egy adott szövettani (al)típuson belül is jelentős heterogenitást mutatnak, melynek hátterében az egyes tumorok eltérő genetikai háttere áll. A közelmúlt tudományos fejlődése rávilágított, hogy a TP53 tumorszuppresszor gén működészavara nagyfokú terápiarezisztenciát eredményezhet. Közleményünkben az érdeklődő klinikus számára bepillantást nyújtunk a p53 fehérje komplex sejtbiológiai szerepébe, molekuláris és citogenetikai eltéréseinek következményeibe, lehetőséget adva az érkező genetikai leletek jobb megértéséhez. Ezt követően pedig áttérünk a mutáns vagy haploinszufficiens p53-t hordozó myelomás betegek jelenleg még kiábrándító kezelési eredményeire, a jelen és a jövő terápiás lehetőségeinek kritikai analízisére.

KULCSSZAVAK p53, tumorszuppresszor, del(17p), myeloma multiplex, terápiarezisztencia

SUMMARY Treatment results of malignant tumors, including multiple myeloma show great divergence even within the same histological (sub)type. Basis of this phenomenon is the different genetic background of individual tumors. Recent scientific advance highlighted the fact that dysfunction of the tumor suppressor gene TP53 results in extensive therapy-resistance. In this review, we attempt to provide a cell biology oriented insight for clinician readers aimed at appreciating the complex biological role of protein p53, the consequences of its molecular and cytogenetic alterations; to better appreciate the received laboratory results. Afterwards, treatment results of myeloma patients with mutant or haploinsufficient TP53 are detailed, together with the critical analysis of presently available disappointing and possibly more effective future therapeutic options.

KEY WORDS p53, tumor suppressor, del(17p), multiple myeloma, therapy resistance

Bevezetés

A myeloma multiplex a terminálisan differenciált B-sejtek rosszindulatú elfajulása, a leggyakoribb elsődlegesen csontvelői malignoma, a második legnagyobb incidenciájú hematológiai rosszindulatú daganat. A thalidomid 1999-es terápiás bevezetésével kezdve a betegség gyógykezelése gyökeresen átalakult, az „új”

Rövidítések

ALL	*akut lymphoid leukaemia*
AML	*akut myeloid leukaemia*
CCF	*tumorsejtfrakció*
CLL	*krónikus lymphocytás leukaemia*
CTD	*C-terminális regulátordomén*
DNS	*dezoxiribonukleinsav*
DBD	*DNS-kötő domén*
DLBCL	*diffúz nagy B-sejtes lymphoma*
FDA	*Amerikai Élelmiszer- és Gyógyszerengedélyeztetési Hivatal*
FISH	*fluoreszcencia in situ hibridizáció*
HDACi	*hiszton-deacetiláz-gátló szer*
IHC	*immunhisztokémia*
IMID	*immunmodulátor szer*
kDa	*kilodalton*
LDH	*laktát-dehidrogenáz*
MDM2	*Mouse double minute 2*
MGP	*Myeloma Genome Project*
MLPA	*multiplex ligációfüggő szondaamplifikáció*
MRD	*minimális, mérhető reziduális betegség*
NES	*nukleáris export szignál*
NGS	*újgenerációs szekvenálás*
NLS	*nukleáris lokalizációs szignál*
OS	*összesített túlélés*
PARP	*poli(ADP-ribóz) polimeráz*
PFS	*progressziómentes túlélés*
PI	*proteaszóma-gátló szer*
PRD	*prolingazdag domén*
R-ISS	*módosított nemzetközi prognosztikai rendszer*
RNS	*ribonukleinsav*
SDS	*nátrium-dodecil-szulfát*
SIRT1	*sirtuin 1*
SV40	*Simian virus 40*
TP53	*tumorprotein-53*
TAD	*transzaktiváló domén*
TD	*tetramerizációs domén*

myelomaellenes szerek bevezetésével a hagyományos citosztatikus szerek terápiás jelentősége lecsökkent, miközben a betegség túlélése látványosan javult. Az új szerek közé tartoznak az immunmodulátor szerek (IMID-ek), a proteaszómagátlók (PI), a hisztondeacetiláz-gátlók (HDACi) és a monoklonális antitestek. Bár a myelomás betegek csoportszintű progressziómentes (PFS) és teljes túlélése (OS) jelentősen megnövekedett, az elért klinikai előny nem egyenletes, az ún. nagy rizikójú betegségben szenvedő páciensek kezelése terén elért előrelépés csak mérsékeltnek mondható.

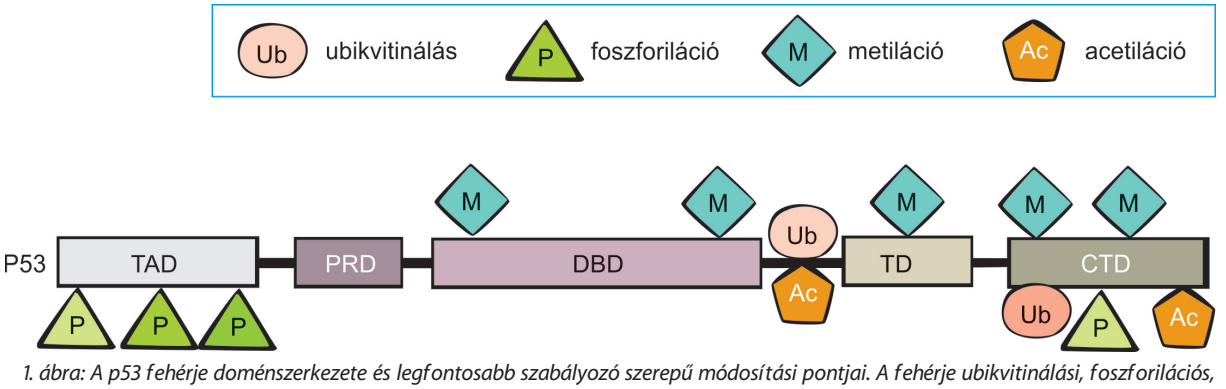
Jelen irányelveink szerint a módosított nemzetközi prognosztikai rendszer (R-ISS)[1] a legkiterjedtebben alkalmazható módszer a kedvezőtlen kórjóslatú betegek azonosítására. Az R-ISS egyik kulcspontja a nagy rizikót jelző citogenetikai eltérések azonosítása, míg a β2-mikroglobulin- és az albuminértékek a tumortömeget, az LDH-érték pedig a tumorsejtek proliferativitását jellemzik. Kedvezőtlen citogenetikai prognózis előhírnökei a t(4;14) vagy t(14;16) transzlokációk vagy a 17-s kromoszóma p karjának deléciója [del(17p)]. A score nem tartalmazza, de kiemelt fontosságúak még 1q és 1p kromoszóma régiókat érintő anomáliák, illetve a *TP53* gén mutációi. Utóbbi a del(17p) kromoszóma-aberráció legfontosabb célgénje. Összefoglalónkban a „genom őrének" is nevezett p53 fehérje működésének majd diszfunkciójának bemutatását követően ismertetjük a *TP53* működésében megzavart myeloma kezelésében az eddig elért terápiás eredményeket és a jövő terápiás lehetőségeit.

A p53 fehérje szerkezete és működése

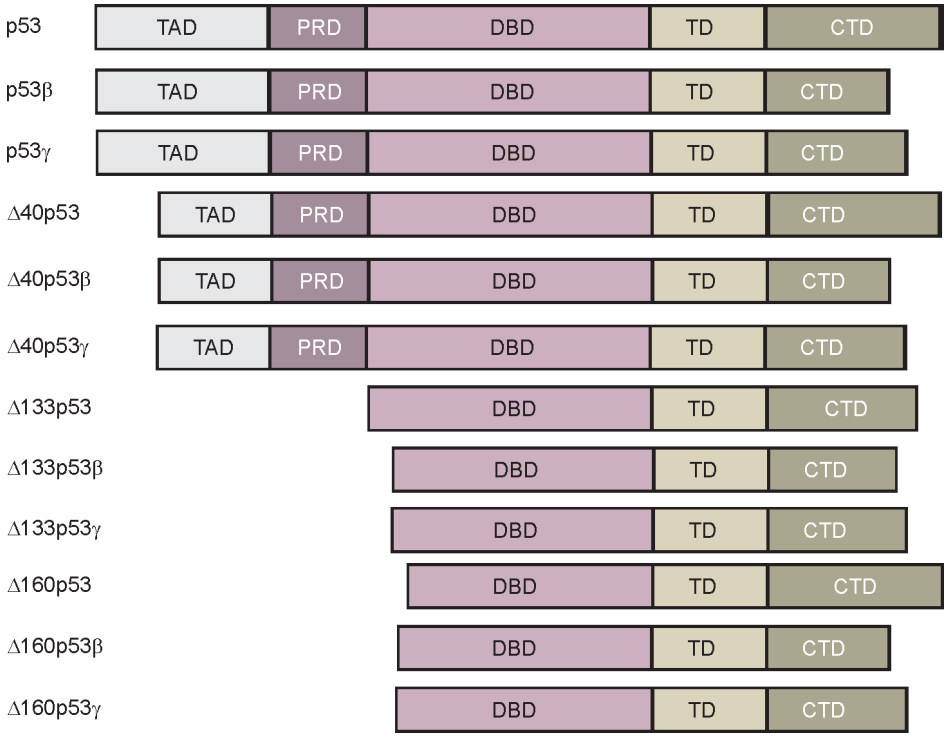
A p53 fehérje felfedezésére 1979-ben, SV40 polyomavírussal transzformált egérsejtek vizsgálata kapcsán került sor, mint egy, a vírus T- (tumor)- antigénjéhez kötődő sejtfehérje.[2] Világossá vált, hogy az SDS akrilamidgélen 53 kDa molekulatömegűnek mért (ma már tudjuk, hogy nem ekkora, valójában 43.7 kDa-os) fehérje tumorszuppresszorként működik és a vírus T-antigénje (többek között) ezt a hatást iktatja ki és biztosítja a vírus szaporodásához szükséges proliferatív sejtbiológiai környezetet. 40 év elteltével ma már általánosan elfogadott, hogy a p53 talán a legfontosabb tumorszuppresszor fehérje, de patobiológiai szerepe myeloma multiplexben és annak terápiás válaszában is folyamatosan növekvő jelentőségű.[3,4,5]

A p53 fehérje egy több doménből, 393 aminosavból álló foszfoprotein, mely fiziológiás szerepét homotetramer formában képes betölteni. A fehérje-monomerben hat fő domén és két szignálpeptid különíthető el: két N-terminális transzaktiváló domén (TAD), egy prolingazdag domén (PRD), a központi DNS-kötő domén (DBD), melyet a nukleáris lokalizációs szignál (NLS), majd tetramerizációs domén (TD), a nukleáris export szignál (NES) és a C-terminális regulátordomén (CTD) követ *(1. ábra)*. A helyzetet bonyolítja, hogy a fenti leírás a teljes hosszúságú p53 fehérjére vonatkozik, de az emberi *TP53* gén 11 exonból áll és nem kevesebb, mint 12 alternatívan újraszerkesztett és drámaian eltérő sejtbiológiai tulajdonságot mutató p53(x) izoforma termelődése lehetséges *(2. ábra)*. A teljes hosszúságú C-terminussal rendelkező p53 fehérje az a-p53 izoforma, melyből a „közbeszédben" az a általában elhagyásra kerül. Az egyéb izoformák funkcionális tulajdonságai részletesebb megismerése céljából utalunk a szakirodalomra.[6]

A p53 fehérje tumorellenes hatásait transzkripciótól függő és attól független módon is képes kifejteni, sokrétű szerepet játszik a sejt jelátviteli mechanizmusainak szabályozásában, melyek közül kiemelhető a



1. ábra: A p53 fehérje doménszerkezete és legfontosabb szabályozó szerepű módosítási pontjai. A fehérje ubikvitinálási, foszforilációs, metilációs és acetilációs pontjait az ábra sematikusan illusztrálja. Az egyes módosítások között interakciók állnak fenn: a homogén módosítások (pl. két foszforiláció) egymás hatását jellemzően erősítik, míg a heterogén módosítások (pl. ubikvitinálás vagy acetiláció azonos helyen) általában kompetíciót mutatnak. TAD: N-terminális transzaktivációs domének, PRD: prolingazdag domén, DBD: DNS-kötő domén, TD: tetramerizációért felelős domén és nukleáris export-szignál, CTD: C-terminális szabályozó domén



2. ábra: A humán p53 fehérje és izoformái. A 11 exonból álló gén három alternatív promotert használ és két pozícióban alternatív RNS-újraszerkesztésre is lehetőséget biztosít, összesen 12 különböző izoforma-fehérje szintézisét teszi lehetővé. A D40p53 izoformák a 2. exon alternatív kiszerkesztésének eredményei, belőlük hiányzik az MDM2 interakciós domén és a fő aktiváló foszforilációs helyek, de oligomerizációra képes. A D133p53 izoformákból nemcsak a transzaktivációs domén, hanem a DNS-kötő domén egy része is hiányzik, a fehérje mégis paradox működőképes: a p53 függő apoptózist és G1 szintű átmenetet gátolja, de a G2 szintű apoptózist nem. A D160p53 izoformák sejtélettani hatása a p53 mutánsokéhoz hasonló.

DNS-károsodás kijavítása, a sejtdifferenciáció és apoptózis, a sejt öregedése és a stresszhelyzetekre adott válaszreakció, melyek mind a p53 aktivációjához vezetnek.[5]

TP53 diszfunkció más malignus betegségekben

Publikált vizsgálati eredmények szerint – diagnóziskor – az emberi rosszindulatú daganatok mintegy 50%-ában mutatható ki TP53 diszfunkció (deléció, mono- vagy biallélikus mutáció). A Cancer Genome Atlas adatbázis szerint – melyben 33 különböző vizsgálat mintegy 10 ezer tumorát dolgozták fel – a *TP53* deléciók gyakorisága 15,9%, a mutációk 15,2%-os, míg a biallélikus inaktiváció az esetek 22,02%-ában azonosítható (ismét hangsúlyozva, hogy diagnóziskor vett tumormintákban).[7] Leggyakrabban az ovarium cystadenocarcinomájában, uterus- és tüdőrákokban (kb. 90%), míg legritkábban paragangliomában (0.5%) észlelhető a *TP53* abnormalitása. Más vizsgálók az ovarium-, a pancreas-, az emlő- és a kissejtes tüdődaganatokban hangsúlyozzák a p53 eltérések jelentőségét. Kilenc megbetegedésben a TP53 mutációk kedvezőtlen prognosztikai hatása igazolt: ide tartozik a tüdő-adenocarcinoma, a hepatocellularis carcinoma, a fej-nyak laphámrák, az akut myeloid leukaemia és a világos sejtes veserák.[7]

Mind a sejtvonalak, mind pedig a betegminták vizsgálata kapcsán egyértelmű, hogy a *TP53* monoallélikus delécióját jelentősen lecsökkent génexpressziót és fehérjeszintézist eredményez (haploinszufficiencia). Az egyik *TP53* allélt érintő deléció mellett jellemzőnek mondható a másik *TP53* allél misszenz (aminosavcserével járó) mutációjának a megjelenése, így a beteg sejtben már csak mutáns p53 fehérje képződik. Ezt a mechanizmust számos daganatban leírták. Az egyik *TP53* allél vesztése (delécióját) mellett a másik allél mutációja 25–37%-os gyakorisággal mutatható ki, de viszonylag gyakran előfordul kettős (mindkét allélt érintő) mutáció is.[8] A malignus daganatokban észlelhető TP53 mutációk 80%-a a DNS-kötő domént érinti és misszenz mutáció. Közülük 8 emelhető ki, mely sokféle daganatban előfordul és bizonyosan túlélési előnyt nyújt a tumorsejt számára: R175, V157F, Y220C, G245, R248, R249, R273 és R282.[9] A p53 fehérje szintjének csökkenését eredményezheti az MDM2 fehérje ex-

presszziójának fokozódása is, mely számos daganattípusban tumorbiológiai „driver” alapmechanizmus.[10]

A TP53-expresszió csökkentésének egy másik lehetőségét az olvasási keret elcsúszásával járó nonszenz mutációk jelentik, melyek a mutációk 10%-át képviselik: ilyenkor egy korai stop kodon jön létre, ami a génátíródás korai leállásához vezet, csonkolt fehérje képződését eredményezve.

Solid tumorokkal szemben a hematológiai malignitásokban a *TP53* működésváltozás viszonylag ritkább, különösen igaz ez diagnóziskori mintákra, daganatellenes kezelés szelekciós hatására viszont az eltérés lényegesen gyakoribbá válik. Diffúz nagy B-sejtes lymphomában (DLBCL) és akut myeloid leukaemiában (AML) a *TP53* diszfunkció mintegy 10–50% gyakoriságú. A biallélikus inaktivációt DLBCL-ben egy tanulmányban 13%-os gyakoriságúnak találták, míg a deléció vagy a monoallélikus mutációk (20–20%) is jellemzőek lehetnek. Krónikus lymphocytás leukaemiában (CLL) a gyakorisága 8% körüli a diagnóziskor, de prolymphocytás transzformációban sokkal gyakoribb, 50% körüli.[11]

17p deléció myeloma multiplexben

A myeloma multiplex sejtjeiben a citogenetikai eltérések csaknem minden esetben kimutathatók. Prognosztikai hatásuk elemzését nehezíti, hogy nincsen egységes konszenzus arról, hogy a tumorsejtek hány százalékának pozitivitása (cancer cell fraction, CCF) jelent klinikailag is jelentős érintettséget. Ez a probléma különösen sújtja a 17p deléció hatásának értékelését, míg a transzlokációk esetében a helyzet kevésbé ellentmondásos.

Újonnan diagnosztizált és visszaeső myelomában a 17p delécióra vonatkozó publikált adatokat az *1. táblázat* mutatja be. Az IFM99 klinikai vizsgálatban az elsők között vizsgálták CD138 szelektált tumorsejteken a FISH-sel detektálható del(17p) prognosztikai hatását.[12] Az eltérés a betegek 11%-ában volt kimutatható, rövidült progressziómentes és teljes túléléshez vezetett. Ebben a vizsgálatban a szelektált plazmasejtek medián 75%-a hordozta a 17p deléciót és a vizsgálók a 60% feletti érintettséget (CF >0,6) tartották a rossz prognózis meghatározójának.[12] Ezt követően a vizsgálatok többségében sok szerző már 20% feletti érintettséget is pozitívnak tartott, míg más vizsgálók kitartottak a 60%-os érintettség jelentősége mellett. A helyzetet bonyolítja, hogy egyes tanulmányokban 20% alatti limitet határoztak meg és volt olyan vizsgálat, ahol már 1%-os érintettség is a pozitivitás jeleként értékelődött.[13] Ezen metodikai különbségek hatására a különböző, még hasonló betegpopulációkat elemző tanulmányok eredményei sem összehasonlíthatók: míg az újonnan diagnosztizált myelomában a del(17p) eltérést hordozó myelomások medián progressziómentes túlélése – szokásos kezelés mellett – 15 hónapnak volt mondható, a teljes tartomány nagyon széles, 4 és 26 hónap között terült el. Mivel az eredmények így nem kizárólag az alkalmazott terápiától függnek, elemző összehasonlításuk igen nehéz, mindenesetre a delécióval nem rendelkező myelománál várható PFS-érték felénél is kevesebb. A szubklonális 17p-eltérések szisztematikus analízisét a Myeloma Genome Project (MGP) kísérelte meg.[14] Ebben a vizsgálatban az 55%-os érintettséget találták határvonalnak: efelett nagyrizikójúnak és kedvezőtlen kimenetelűnek tartották a betegséget (605 újonnan diagnosztizált beteg analízisekor: PFS 14 hónap, OS 36 hónap). Alacsony CCF esetén (<0,55) az eredmények kedvezőbbek voltak (PFS 24 hónap, OS 84 hónap). Három klinikai vizsgálat metaanalízise is megerősítette az 55%-os detektálási határvonal klinikai relevanciáját.[15]

Visszaeső és refrakter myeloma multiplex esetén a del(17p) eltérés gyakran megjelenik, mint új progressziós esemény. A Mayo Klinika munkatársai 76 olyan myelomás beteg adatát elemezték, ahol diagnóziskor nem, csak progressziókor volt a del(17p) FISH-eltérés kimutatható.[16] A FISH-eltérés átlagosan 3 évvel a diagnózis után jelent meg, medián 2 terápiás vonalat követően. A progressziómentes és teljes túlélés rövidebb lett, mint az eltérést nem mutató kontroll betegcsoportban. Relabált betegségben a del(17p) eltérést hordozó myelomások medián progressziómentes túlélése rendkívül heterogén, a fentebb leírtaknak megfelelően mind a detekciós küszöbtől, mind a terápia típusától függ, a teljes publikált PFS tartomány 3,4–21,4 hónap között terül el.[16]

Összefoglalóan megállapítható, hogy a FISH del(17p) eltérés minden klinikai helyzetben kedvezőtlen következményű, magas tumorsejt-pozitivitási frakció esetén a korai progresszió és terápiarezisztencia rizikója kiemelkedően magas.

Monoallélikus *TP53* mutáció myeloma multiplexben

A szekvenálási technikák fejlődése következményeként számos tanulmány kísérelte meg a *TP53* mutációk prognózisra gyakorolt hatásának elemzését myelomában is.

1. táblázat: A del17p eltérés publikált vizsgálatai újonnan diagnosztizált és (a vastag vonal alatt) relabált myeloma multiplexben (az egyes publikációk elérhetőségét doi azonosítóval adtuk meg)

VIZSGÁLAT PUBLIKÁCIÓJA (DOI)	BETEG-SZÁM	DEL17P PREVALENCIA	MÓDSZER	POZITIVITÁS TARTOMÁNYA	NAGY RIZIKÓRA MEGÁLLAPÍTOTT CCF	MEDIÁN PFS (HÓNAP)	MEDIÁN OS (HÓNAP)
10.1182/blood-2004-04-1363	105	9,5% (n=10)	FISH	18–95%	-	7,9	14.7
10.1182/blood-2006-08-040410	532	11% (n=58)	FISH	32–94%	≥60%	14,6	22.4
10.3324/haematol.2009.016436	289	105 (n=29)	FISH	-	60–70%	3 év: 27%	3 év: 50%
10.3324/haematol.2010.023697	92	57% (n=54)	FISH	-	≥60%	-	-
10.1002/gcc. 20899	85	100% (n=85)	FISH	-	-	14,7	26.6
10.1158/1078-0432.CCR-14-2576	333	6,6% (n=22)	FISH	25–100%	>50%	4	16
10.1056/NEJMoa 1505654	646	32% (n=206)	FISH	-	>1 sejt	-	-
10.3324/haematol.2017.168872	779	10% (>20%, n=76) 8%(>40%, n=62) 7%(>60%, n=51) 4%(>80%, n=34)	FISH	>20, >40, >60, >80% határérték vizsgálata	≥20%	3 év: 61%	3 év: 67%
10.1038/leu. 2017.179	1905	9% (n=175)	MLPA		-	HR: 1,57	HR: 2,10
10.1182/blood-2018-06-857250	1777	10,8% (n=192)	MLPA		>20%	-	
10.1002/ajh.24487	145	23,4% (n=34)	FISH	-	-	8	21
10.1038/s41408-019-0191-y	310	100% (n=317)	FISH	8–100%	>20 vs. <20% >30 vs. <30% >40 vs. <40% >50 vs. <50% >60 vs. <60%	19,2 vs. 32,5 18,8 vs. 30,8 18,3 vs. 30,8 17,3 vs. 30,3 16,8 vs. 28,3	45,3 vs. NR 45,2 vs. 89,6 45,2 vs. 89,6 44,8 vs. 58,3 38,1 vs. 58,3
10.1182/blood-2018-10-880831	605 235 108	100% (n=605) 100% (n=235) 100% (n=108)	FISH FISH NGS	30–80%	>55%	14,3 17 26	36.1 32 36
10.1182/bloodadvances 2018028530	228	33% (n=65)	FISH	9-100%	-	23,0 (5,4 a detektálás után)	68,2 (18,1 a detektálás után)
10.1038/bcj.2017.76	188	22.3% (n=42)	FISH	-	-	-	-
10.1016/j.leukres.2010.05.002	85	22% (n=17)	FISH	-	>10%	5,4 vs. 5.0	11,5 vs. 15
10.1309/AJCPHC85 DGAXZDBE	88	15% (n=13) 13% (n=11)	FISH IHC	10–90%	>10%	3,4 vs. 11 3,4 vs. 11	12,1 vs. 28,8 7,2 vs. 28,8
10.1182/blood-2017-06-791228	552	10% (n=69)	FISH	>5, >20,>60% vizsgálata	-	21,4 vs. 9,7 21,4 vs. 6,7 15.7 vs. 5,1	NA

Rövidítések: CCF: cancer cell fraction; FISH: fluoreszcencia *in situ* hibridizáció; IHC: immunhisztokémia; MLPA: multiplex ligation-dependent probe amplification; NGS: újgenerációs szekvenálás; OS: összesített túlélés; PFS: progresszió-mentes túlélés; NA: nincsen adat

Újonnan diagnosztizált myelomában a *TP53* mutációk az esetek mindössze 3-8%-ban detektálhatók.[17] Más daganatokhoz hasonlóan, a *TP53* mutációk a gén bármely szakaszán előfordulhatnak, de koncentrálódnak a DNS-kötő régióban. Bár a *TP53* mutációk onkológiai driverként funkcionálnak myelomában, a monoallélikus *TP53* mutációt eddig nem sikerült független prognosztikus tényezőként bizonyítani ebben a betegségben. Ennek oka valószínűleg az, hogy frontline kezelés előtt viszonylag ritkán detektálhatók ezek a mutációk, és ritkaságuk akadályozza a statisztikai szignifikanciához szükséges esetszám elérését.

Az MGP vizsgálatban 33/605 esetben találtak TP53 mutációt diagnóziskor és ennek nem volt teljes túlélést tekintve kimutatható negatív hatása.[14] Valószínűleg nagyobb betegszám és hosszabb követés szükséges a monoallélikus *TP53* mutációk valódi jelentőségének tisztázására. Ugyanakkor figyelemre méltó, hogy még ebben a viszonylag nagy betegszámú vizsgálatban is a *TP53* mutációk szubklonálisaknak bizonyultak, egyéb mutációk mellett a myelomás klónok fennmaradásában és (extramedullaris?) terjedésében fontos additív szerepet játszhatnak. Jellemző, hogy a kezelések hatására a *TP53* mutációt hordozó klónok szelekciós előnyre tesznek szert, arányuk nő, előrevetítve a következő vonallal szembeni rezisztenciát.[15]

Biallélikus *TP53* inaktiváció myelomában

Már korai tanulmányok felhívták a figyelmet arra a biológiai helyzetre, hogy egy 17p allél elvesztését követően a másik allélon elhelyezkedő *TP53* gén mutációja a p53 funkció teljes elvesztéséhez vezet. A kis betegszámok miatt ezek a korai tanulmányok nem tudták a biallélllikus és a monoallélikus inaktiváció prognosztikai különbözőségét bizonyítani. Más betegségekhez hasonlóan (pl. CLL), egy 779 újonnan diagnosztizált myelomás beteg anyagát vizsgáló tanulmányban (72 p53 gén-deletált eset alapján) azt találták, hogy szignifikáns korreláció van a deléciók és a mutációk megjelenése között.

Ezen a ponton kell megemlítenünk a Myeloma Genom Projekt által bevezetett „double hit” myeloma fogalmát, mely molekuláris szempontból kissé zavaró definíciót követ.[18] Ezt a szerzők által definiált és validált (újonnan diagnosztizált myelomában szenvedő) „double hit” betegcsoportot két genetikailag eltérő alcsoport alkotja: 1. a *TP53* biallélikus inaktivációja jellemezte (6–7%) csoport és a 2. a >4 kópia 1q21 amplifikáció mellett ISS 3 stádiumú (3–4%) betegcsoport. A publikált analízisekben a két csoport aggregált eredményei szerepelnek: 15,4 hónap PFS és 20,7 hónap OS (így nem könnyen azonosíthatók a *TP53* kettős találatot hordozó betegek). Ebben a vizsgálatban a biallélikus *TP53* inaktivált csoport szignifikánsan rövidebb PFS-t mutatott, mint a monoallélikus del(17p) csoport (18 hónapos értékek: PFS 36% vs. 76%; OS 58% vs. 90%).[19] Lényeges azonban, hogy ebben az összehasonlításban a del(17p) szempontjából minor szubklónokat is bevettek, nem pedig a szokásos CCF >0,5–0,5 határértéket alkalmazták. Ugyanakkor úgy tűnik, hogy a határérték valódi eltérő biológiai viselkedést tükröz: a második allél *TP53* mutációját mutató 28 betegből 27 esetben olyankor mutatták ki, amikor a CCF>0,55 volt.

Indirekt mechanizmusokkal kialakuló *TP53* diszfunkció

A TP53 fehérje funkciójának vesztése nemcsak a *TP53* gént kódoló DNS-szakaszt közvetlenül érintő változások következtében alakulhat ki, hanem epigenetikus, poszttranszkripciós és fehérjeszintű szabályozási pontokon is bekövetkezhet katasztrofális hiba.

A DNS-metiláció az egyik legismertebb epigenetikus szabályozó folyamat, mely a p53 expresszió szabályozásában is szerepet játszik. A *TP53* promoter régiójának CpG szigeten bekövetkező metilációja régóta ismert és számos daganatban bizonyított jelentőségű (Ewing-sarcoma, glioblastoma, ALL, de myelomában is kimutatott).[20] A DNS-metiláció megváltoztatására végzett ún. demetiláló kezelés (pl. azacytidin alkalmazása) ALL-ben aktiválta a p53 jelátvitelt és az apoptózis fokozódásához vezetett.[21] Hasonló eredményeket myeloma sejtvonalakon is találtak.[22] Olyan *TP53* delécios myelomában (p53 WT/-), ahol p53 fehérje-expresszió nem volt kimutatható, a nem deletált másik allél promoter-hipermetilációját találták, mely felelős lehet az épen maradt gén inaktiválásáért.[23]

A microRNS-ek olyan kis nemkódoló RNS-molekulák, melyek a génexpresszió poszttranszkripciós szabályozásában játszanak szerepet. A közelmúlt kutatásai rámutattak, hogy a p53 expresszió szabályozásában több ponton is belépnek:[24] a p53 fehérje szabályozza számos microRNS transzkripcióját, expresszióját és érését és viszont, miRNS-ek a TP53 mRNS 3’ UTR régiójához kötődve a TP53 mRNS degradációját és transzlációjának gátlását okozzák.[25] Myelomában is vizsgálták a fenti RNS-szintű interakciót: a miR-25 és miR-30d mennyisége myelomában csökkent,[26] myelomasejtekbe bevitelük a p53 célmolekulák aktivációján keresztül apoptózishoz vezetett. A t(4;14) transzlokációs myelomában a miR-125a-5p expressziója fokozott, mely di-

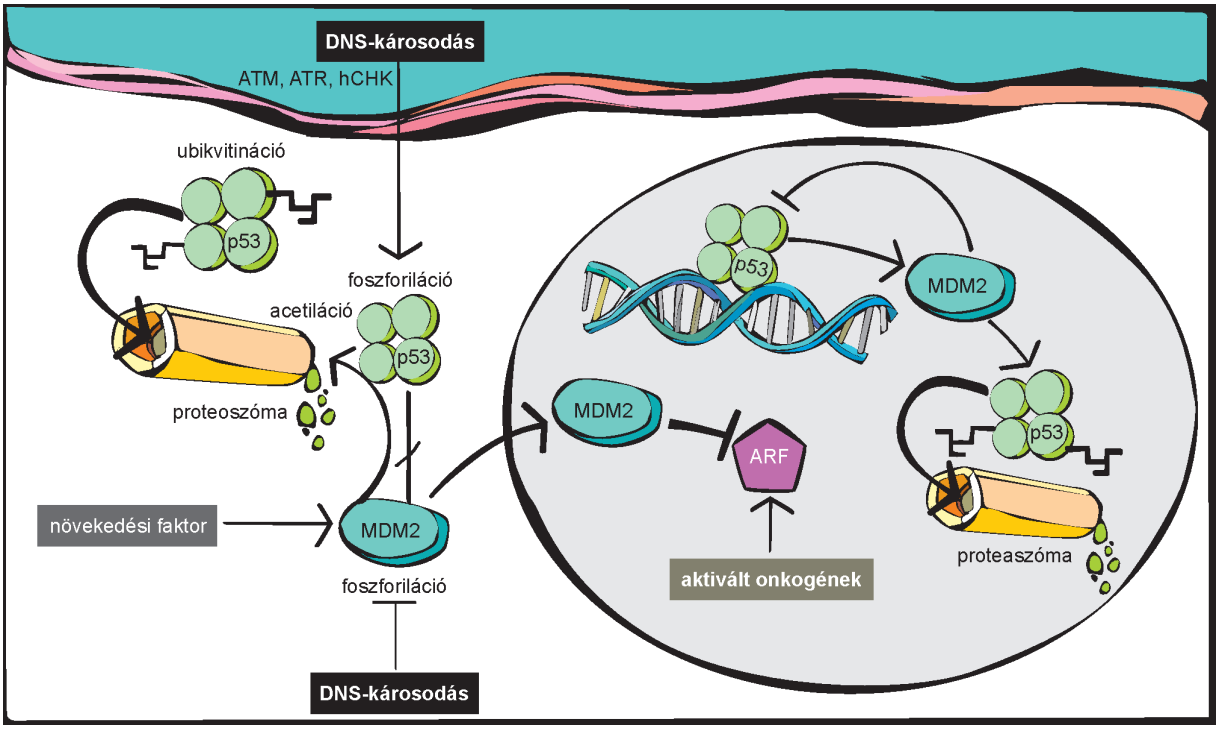
rekt gátolja a p53 mRNS működését.[27] Több, myelomában is deregulált miRNS-ről más betegségekben már bebizonyosodott, hogy a TP53 3' UTR szabályozói (pl. miR15a/miR-16-1 CLL-ben).[28]

A p53 fehérje egy rövid életű, a sejtekben folyamatosan termelődő és gyorsan lebomló fehérje. Legfontosabb fehérjeszintű szabályozója az MDM2 fehérje.[10] Az MDM2 p53-ra gyakorolt hatása sokrétű: a fehérje facilitálja a p53 sejtmagból a citoplazmába történő transzportját, ubikvitin-ligáz aktivitásánál fogva a p53 fehérje proteaszómában történő lebontását idézi elő, akadályozza és gátolja a p53 fehérje transzaktiváló hatásait. Normális sejtekben az MDM2 folyamatosan alacsony p53 fehérjeszintet tart fenn a képződött p53 fehérje folyamatos ubikvitin-függő degradációja által *(3. ábra)*. A sejtet érő stresszfolyamatok következtében a p53 és az MDM2 kapcsolata megszakad, a p53 fehérje stabilizálódik és elvégzi funkcióját. Az MDM2 magas szintű expressziója plazmasejtes leukaemiában és egyes myeloma sejtvonalakban ismert onkogén hatású a p53 funkció gátlása révén.[29] Sajnos az MDM2-gátlás mutáns p53 fehérje esetén nem jár klinikailag hasznosítható eredménnyel.

A microRNS-ek a p53 fehérje fehérjeszintű regulátorainak szabályozása révén is hatni képesek a p53 funkcióra. Például a miR-34a a SIRT1 fehérje gátlója: ez a fehérje pedig a p53 deacetilálásáért felelős, mellyel gátolja annak transzaktiváló hatását. MiR-34a kifejeződés hatására a p53 útvonalak aktivációja következik be. Myelomában ez különösen fontos lehet, mert a betegség kezelésében alapvető szerepű dexamethason hatására expressziója indukálódik. A miR-192, -194 és -215 RNS-ek expressziója csökkenti az MDM2 fehérje expresszióját, viszont ők maguk a p53 fehérje transzkripciós szintű aktiváló szabályozása alatt állnak, p53 diszfunkció esetén ez a hatás kieshet.

A *TP53* diszfunkciós myeloma multiplex jelenlegi terápiás ajánlásai

A *TP53* diszfunkciós myeloma kezelésére jelenleg egyetlen határozott és széleskörűen elfogadott irányelv sincsen. Az ajánlások korlátozott érvényének okai az előzőekben széleskörűen bemutatásra kerültek. Ugyanakkor, mivel az eltérések visszaeső myelomában különösen gyakoriak és a modern kezelések mellett fo-



3. ábra: A p53-MDM2 kölcsönhatás. A p53 és az MDM2 fehérjék autoregulációs kört tartanak fenn. A p53 fokozza az MDM2 expresszióját, míg az MDM2 gátolja a p53 aktivitását: gátolja a transzkripciós aktivitását, fokozza nukleáris exportját és serkenti a fehérje lebontását. A DNS-károsodás vagy egyes onkogének aktivációja a p53 fehérje aktivációjához vezet. DNS-károsodás hatására a p53 fehérje foszforilálódik, ami megakadályozza az MDM2 fehérjéhez kapcsolódását. Aktivált onkogének az ARF fehérje aktivációját eredményezik, ami akadályozza a p53 fehérje MDM2-függő degradációját.

lyamatosan növekvő gyakoriságúak, az alacsonyabb evidenciaszintű javaslatokat is érdemes áttekinteni.

Ami a publikált adatok alapján igen valószínű az 1. a proteaszómagátló (bortezomib) alapú indukció és fenntartás hatásossága,[30] illetve 2. a kettős (tandem) transzplantáció előnyös volta.[31] Ezeket az elveket a hazai gyakorlatban is próbáljuk általában alkalmazni, azonban az újabb szerekkel kapcsolatban az adatok kevésbé világosak. Az utóbbi évek nagy klinikai vizsgálatai hajlamosak voltak a gyakoribb nagyrizikójú FISH csoportokat [t(4;14), t(14;16) és del(17p)] egybevonni, ami lehetetlenné teszi a 17p alcsoport eredményeinek a külön értékelését. Sajnos nagyon valószínű, hogy ezeknek a vizsgálatoknak a nagyrizikójú és hosszú túlélői leginkább a t(4;14) csoportból kerülnek ki, ami szintén heterogén, egy újabb prognosztika score alapján a t(4;14) betegeknek csak 29%-a valóban nagyrizikójú.[32] Ezzel együtt valószínű, hogy az újabb szerek (carfilzomib, daratumumab, ixazomib, pomalidomid) mind képesek valamit javítani ennek a rossz prognózisú csoportnak a klinikai viselkedésén, de hogy pontosan mit várhatunk, az nem világos. Bár az adatok ellentmondásosak, a lenalidomid alig hatásos p53 diszfunkciós myelomában,[33] ezért önálló alkalmazása nem javasolt, a thalidomid monoterápia pedig nagy vizsgálatban bizonyítottan árthat ennek a betegpopulációnak, ezért egyértelműen kerülendő.[34] Általánosan elfogadott elv, hogy nagyrizikójú csoportban az a beteg, aki képes MRD negativitást elérni, a prognózisa attól fogva közelít a standard rizikójúhoz, ezért ez terápiás célnak tekintendő. Az azonban nem világos, hogy a 17p deletált/mutáns eseteknél ez milyen gyakorisággal érhető el és mennyire releváns a napi gyakorlat szempontjából.

Régebbi tapasztalat, hogy a dexamethason nagy dózisban adva hatékony a *TP53* eltérést mutató esetekben is, azonban ez hosszú távon nem működőképes stratégia a toxicitás miatt.[35] A bendamustin esetében is vannak adatok p53-független tumorellenes aktivitásra,[36] de a klinikai tapasztalat szerint az így elért remissziók rövidek.

A selinexor egy új gyógyszercsoport, a szelektív nukleáris transzport gátló molekulák csoportjának első tagja, számos célmolekula mellett többek között a p53 fehérje sejtmagmembránon való átjutását is képes akadályozni, ezzel biztosítva a hatékony, apoptózisindukcióra képes p53-szintet a magban akkor is, ha a fehérjemolekula expresszió alacsony.[37] Kedvező, hogy dexamethasonnal a selinexor klinikailag jelentős szinergizmust mutat, mely a törzskönyvezett terápiás kombináció.[38] Újabb molekula ebben az osztályban az eltanexor, melynek mellékhatás-profilja kedvezőbbnek tűnik.[39]

Szintén érdekes és terápiásan releváns megfigyelés, hogy a t(11;14) transzlokált myeloma-csoportban a BCl2 gátló venetoclax hatékony készítmény lehet, még akkor is, ha jelen van a *TP53* utat inaktiváló deléció és/vagy mutáció.[40] Ez azért különösen fontos megfigyelés, mert a t(11;14) gyakran jelentkezik TP53 eltérésekkel együtt olyan nagyrizikójú helyzetekben, mint pl. plazmasejtes leukaemiában vagy myeloma többedik relapsusa esetén.

A TP53 diszfunkciós daganatsejtek Achilles-sarkai: a jövő terápiás lehetőségei

A 17p régió deléciójával érintett kromoszómarégió nemcsak a *TP53* fehérje szintéziséért felelős. A *TP53* génlókusz közvetlen szomszédja az mRNS-ek szintéziséért felelős RNS-polimeráz-II komplex legnagyobb alegységét kódoló gén (*POLR2A*). Számos daganatsejtben igazolt, hogy a *TP53* delécióval együtt a *POLR2A* gén is hemizigótává válik, egyik kópiája elvész.[41] Míg a *TP53* fehérje mennyiségi szabályozása poszt-transzkripcionális és poszttranszlációs, a *POLR2A* kifejeződése a gén kópiaszámával arányos. A hemizigóta del(17p) tumorsejtek *in vitro* igen érzékenyek az RNS-polimeráz-gátló α-amanitin gombaméreggel szemben. Bár a gyilkos galóca mérgét legfeljebb antitest-drog-konjugátumokban használhatjuk gyógyításra, indirekt módon az RNS-polimerázt gyógyszeresen támadhatjuk: a fehérje szintézisét szabályozó E3 ligáz Ring-Box 1 fehérje gátlása TP53-deletált kasztráció-rezisztens prosztatarákban ígéretes klinikai kutatás tárgyát képezi.[41]

Misszenz mutációk esetén esetleg hatásos lehet APR-246 néven vizsgált kismolekula, amit myelodisplasia kezelésére az FDA két vizsgálat alapján már gyorsított eljárásra be is fogadott.[42,43] Ez a gyógyszer a *TP53* mutáns és inaktivált formáit képes reaktiválni. A nonszenz mutációk esetében is folynak kísérletek gyógyszerekkel, melyek képesek a beépült stop-kodonon átléptetni az RNS transzkripciós komplexet.[44]

A p53-deficiens daganatsejtek proliferatív előnyét a G1/S sejtciklus-ellenőrzőpont elvesztése okozza, DNS-károsodás esetén a sejtek genomintegritása teljesen a G2/M ellenőrzőponttól függ. Önmagában hatástalan genotoxikus stressz (irradiáció vagy DNS-károsító citosztatikumok) és egyes kinázok (pl. ATR, Chk1, PLK1, Wee1) egyidejű gátlása esetén a p53-deficiens sejtek nagyfokú érzékenységet mutatnak.[45] A p38MAPK útvonal is igen fontos a p53-deficiens sejtek DNS-károso-

dást követő túlélésében. DNS-károsodást követően ezek útvonal gátlása mitotikus katasztrófához és tumorregresszióhoz vezethet.[46]

Myeloma multiplexre jellemző a tumorsejtek genominstabilitása, mely növekedési előnyt biztosít és drogrezisztenciához is vezethet. Ugyanakkor ez a biológiai helyzet terápiás lehetőségekre is felhívja a figyelmet. Egy ilyen lehetőség a proteaszómagátlást követően kialakuló poli(ADP-ribóz) polimeráz (PARP) inhibitorokra való indukált érzékenység.[45] Proteaszómagátlók jelenlétében in vitro a myelomasejtek nem képesek a DNS-töréseket kijavítani és ez sejthalálhoz vezet. A proteaszómagátló és PARP-inhibitor kombináció klinikai tesztelése folyamatban van.

Záró gondolatok

A p53 fehérje a sejt életének egyik legfontosabb tumorszuppresszor hatású fehérjéje. Fontosságát igen bonyolult szabályozása is alátámasztja, de ez a bonyolultság számos hibára, kisiklási lehetőségre ad módot. Más tumorokhoz hasonlóan myeloma multiplexben is egyre többet tudunk a p53 fehérje szerepéről és ez befolyásolja terápiás törekvéseink irányát is. Jelenleg a súlyosan károsodott p53 diszfunkciós myelomás betegeink terápiás eredményei kiábrándítók, de bízunk benne, hogy a legújabb terápiás lehetőségeink e területen is meghozzák a várva várt áttörést.

Irodalom

1. Palumbo A, Avet-Loiseau H, Oliva S, Lokhorst HM, Goldschmidt H, Rosinol L, et al. Revised International Staging System for Multiple Myeloma: A Report From International Myeloma Working Group. J Clin Oncol 2015; 33:2863-9.
2. Lane DP and Crawford LV. T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. Nature 1979; 278:261-3.
3. Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B and Harris CC. p53 mutations in human cancers. Science 1991; 253:49-53.
4. Finlay CA, Hinds PW and Levine AJ. The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation. Cell 1989; 57:1083-93.
5. Herrero AB, Rojas EA, Misiewicz-Krzeminska I, Krzeminski P and Gutierrez NC. Molecular Mechanisms of p53 Deregulation in Cancer: An Overview in Multiple Myeloma. Int J Mol Sci 2016; 17:2003.
6. Zhang YX, Pan WY and Chen J. p53 and its isoforms in DNA double-stranded break repair. J Zhejiang Univ Sci B 2019; 20:457-66.
7. Li VD, Li KH and Li JT. TP53 mutations as potential prognostic markers for specific cancers: analysis of data from The Cancer Genome Atlas and the International Agency for Research on Cancer TP53 Database. J Cancer Res Clin Oncol 2019; 145:625-36.
8. Lode L, Eveillard M, Trichet V, Soussi T, Wuilleme S, Richebourg S, et al. Mutations in TP53 are exclusively associated with del(17p) in multiple myeloma. Haematologica 2010; 95:1973-6.
9. Baugh EH, Ke H, Levine AJ, Bonneau RA and Chan CS. Why are there hotspot mutations in the TP53 gene in human cancers? Cell Death Differ 2018; 25:154-60.
10. Kubbutat MH, Jones SN and Vousden KH. Regulation of p53 stability by Mdm2. Nature 1997; 387:299-303.
11. Malcikova J, Tausch E, Rossi D, Sutton LA, Soussi T, Zenz T, et al. ERIC recommendations for TP53 mutation analysis in chronic lymphocytic leukemia-update on methodological approaches and results interpretation. Leukemia 2018; 32:1070-80.
12. Avet-Loiseau H, Attal M, Moreau P, Charbonnel C, Garban F, Hulin C, et al. Genetic abnormalities and survival in multiple myeloma: the experience of the Intergroupe Francophone du Myelome. Blood 2007; 109:3489-95.
13. Lonial S, Dimopoulos M, Palumbo A, White D, Grosicki S, Spicka I, et al. Elotuzumab Therapy for Relapsed or Refractory Multiple Myeloma. N Engl J Med 2015; 373:621-31.
14. Thakurta A, Ortiz M, Blecua P, Towfic F, Corre J, Serbina NV, et al. High subclonal fraction of 17p deletion is associated with poor prognosis in multiple myeloma. Blood 2019; 133:1217-21.
15. Shah V, Johnson DC, Sherborne AL, Ellis S, Aldridge FM, Howard-Reeves J, et al. Subclonal TP53 copy number is associated with prognosis in multiple myeloma. Blood 2018; 132:2465-9.
16. Lakshman A, Painuly U, Rajkumar SV, Ketterling RP, Kapoor P, Greipp PT, et al. Impact of acquired del(17p) in multiple myeloma. Blood Adv 2019; 3:1930-8.
17. Owen RG, Davis SA, Randerson J, Rawstron AC, Davies F, Child JA, et al. p53 gene mutations in multiple myeloma. Mol Pathol 1997; 50:18-20.
18. Walker BA, Mavrommatis K, Wardell CP, Ashby TC, Bauer M, Davies F, et al. A high-risk, Double-Hit, group of newly diagnosed myeloma identified by genomic analysis. Leukemia 2019; 33:159-70.
19. Ashby C, Boyle E, Tytarenko RG, Wang H, Rosenthal A, Patel P, et al. Long-Term Follow-up Identifies Double Hit and Key Mutations As Impacting Progression Free and Overall Survival in Multiple Myeloma. Blood 2018; 132:110.
20. Chim CS, Liang R, Leung MH and Kwong YL. Aberrant gene methylation implicated in the progression of monoclonal gammopathy of undetermined significance to multiple myeloma. J Clin Pathol 2007; 60:104-6.
21. Vilas–Zornoza A, Agirre X, Martín-Palanco V, Martín-Subero JI, San José-Eneriz E, Garate L, et al. Frequent and Simultaneous Epigenetic Inactivation of TP53 Pathway Genes in Acute Lymphoblastic Leukemia. PLOS ONE 2011; 6:e17012.
22. Teoh PJ, Chung TH,Sebastian S, Choo SN, Yan J, Ng SB, et al. p53 haploinsufficiency and functional abnormalities in multiple myeloma. Leukemia 2014; 28:2066-74.
23. Hurt EM, Thomas SB, Peng B and Farrar WL. Reversal of p53 epigenetic silencing in multiple myeloma permits

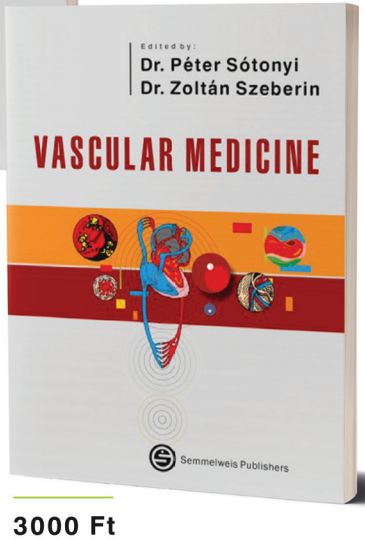
apoptosis by a p53 activator. Cancer Biol Ther 2006; 5:1154-60.
24. Liu J, Zhang C, Zhao Y and Feng Z. MicroRNA Control of p53. J Cell Biochem 2017; 118:7-14.
25. Schwerk J and Savan R. Translating the Untranslated Region. J Immunol 2015; 195:2963-71.
26. Kumar M, Lu Z, Takwi AA, Chen W, Callander NS, Ramos KS, et al. Negative regulation of the tumor suppressor p53 gene by microRNAs. Oncogene 2011; 30:843-53.
27. Leotta M, Biamonte L, Raimondi L, Ronchetti D, Di Martino MT, Botta C, et al. A p53-dependent tumor suppressor network is induced by selective miR-125a-5p inhibition in multiple myeloma cells. J Cell Physiol 2014; 229:2106-16.
28. Pekarsky Y and Croce CM. Role of miR-15/16 in CLL. Cell Death Differ 2015; 22:6-11.
29. Teoh G, Urashima M, Ogata A, Chauhan D, DeCaprio JA, Treon SP, et al. MDM2 protein overexpression promotes proliferation and survival of multiple myeloma cells. Blood 1997; 90:1982-92.
30. Sonneveld P, Schmidt-Wolf IG, van der Holt B, El Jarari L, Bertsch U, Salwender H, et al. Bortezomib induction and maintenance treatment in patients with newly diagnosed multiple myeloma: results of the randomized phase III HOVON-65/ GMMG-HD4 trial. J Clin Oncol 2012; 30:2946-55.
31. Cavo M, Salwender H, Rosiñol L, Moreau P, Petrucci MT, Blau IW, et al. Double Vs Single Autologous Stem Cell Transplantation After Bortezomib-Based Induction Regimens For Multiple Myeloma: An Integrated Analysis Of Patient-Level Data From Phase European III Studies. Blood 2013; 122:767.
32. Perrot A, Lauwers-Cances V, Tournay E, Hulin C, Chretien M-L, Royer B, et al. Development and Validation of a Cytogenetic Prognostic Index Predicting Survival in Multiple Myeloma. Journal of Clinical Oncology 2019; 37:JCO.18.00776.
33. Chen MH, Qi CX, Saha MN and Chang H. p53 nuclear expression correlates with hemizygous TP53 deletion and predicts an adverse outcome for patients with relapsed/refractory multiple myeloma treated with lenalidomide. Am J Clin Pathol 2012; 137:208-12.
34. Boyd KD, Ross FM, Tapper WJ, Chiecchio L, Dagrada G, Konn ZJ, et al. The clinical impact and molecular biology of del(17p) in multiple myeloma treated with conventional or thalidomide-based therapy. Genes Chromosomes Cancer 2011; 50:765-74.
35. Smolej L. The role of high-dose corticosteroids in the treatment of chronic lymphocytic leukemia. Expert Opin Investig Drugs 2012; 21:1009-17.
36. Roue G, Lopez-Guerra M, Milpied P, Perez-Galan P, Villamor N, Montserrat E, et al. Bendamustine is effective in p53-deficient B-cell neoplasms and requires oxidative stress and caspase-independent signaling. Clin Cancer Res 2008; 14:6907-15.
37. Subhash VV, Yeo MS, Wang L, Tan SH, Wong FY, Thuya WL, et al. Anti-tumor efficacy of Selinexor (KPT-330) in gastric cancer is dependent on nuclear accumulation of p53 tumor suppressor. Sci Rep 2018; 8:12248.
38. Bahlis NJ, Sutherland H, White D, Sebag M, Lentzsch S, Kotb R, et al. Selinexor plus low-dose bortezomib and dexamethasone for patients with relapsed or refractory multiple myeloma. Blood 2018; 132:2546-54.
39. Fischer MA, Friedlander SY, Arrate MP, Chang H, Gorska AE, Fuller LD, et al. Venetoclax response is enhanced by selective inhibitor of nuclear export compounds in hematologic malignancies. Blood Advances 2020; 4:586-98.
40. Slomp A and Peperzak V. Role and Regulation of Pro-survival BCL-2 Proteins in Multiple Myeloma. Front Oncol 2018; 8:533.
41. Li Y, Liu Y, Xu H, Jiang G, Van der Jeught K, Fang Y, et al. Heterozygous deletion of chromosome 17p renders prostate cancer vulnerable to inhibition of RNA polymerase II. Nat Commun 2018; 9:4394.
42. Sallman DA, DeZern AE, Garcia-Manero G, Steensma DP, Roboz GJ, Sekeres MA, et al. Phase 2 Results of APR-246 and Azacitidine (AZA) in Patients with TP53 mutant Myelodysplastic Syndromes (MDS) and Oligoblastic Acute Myeloid Leukemia (AML). Blood 2019; 134:676.
43. Cluzeau T, Sebert M, Rahmé R, Cuzzubbo S, Walter-petrich A, Lehmann che J, et al. APR-246 Combined with Azacitidine (AZA) in TP53 Mutated Myelodysplastic Syndrome (MDS) and Acute Myeloid Leukemia (AML). a Phase 2 Study By the Groupe Francophone Des Myélodysplasies (GFM). Blood 2019; 134:677.
44. Zhang M, Heldin A, Palomar-Siles M, Öhlin S, Bykov VJN and Wiman KG. Synergistic Rescue of Nonsense Mutant Tumor Suppressor p53 by Combination Treatment with Aminoglycosides and Mdm2 Inhibitors. Frontiers in Oncology 2018; 7:323.
45. Neri P, Ren L, Gratton K, Stebner E, Johnson J, Klimowicz A, et al. Bortezomib-induced "BRCAness" sensitizes multiple myeloma cells to PARP inhibitors. Blood 2011; 118:6368-79.
46. Nikkila J, Kumar R, Campbell J, Brandsma I, Pemberton HN, Wallberg F, et al. Elevated APOBEC3B expression drives a kataegic-like mutation signature and replication stress-related therapeutic vulnerabilities in p53-defective cells. Br J Cancer 2017; 117:113-23.

SEMMELWEIS KIADÓ SZAK- ÉS TANKÖNYVEI

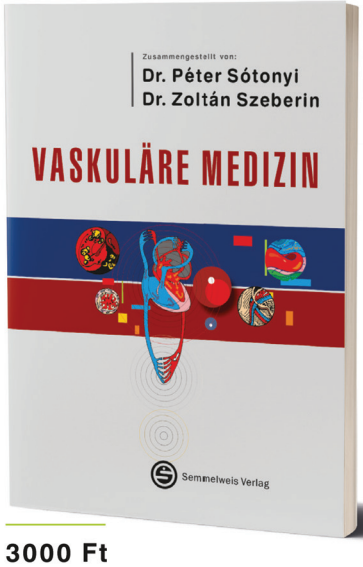
Belgyógyászat

Könyveink megvásárolhatók a Legendus Könyvesboltban, illetve a Líra Kereskedelmi hálózaton belül az egész országban, de egyre nagyobb igényt elégít ki webshopunk.

1800 Ft



3000 Ft



3000 Ft

Sótonyi Péter, Szebeni Zoltán (szerk)

VASZKULÁRIS MEDICINA

Az egyetemi jegyzet egyik fő célja a figyelem felhívása arra, hogy az érbetegek ellátása komplex, interdiszciplináris szemléletet igényel, ahol az érsebészet, az angiológia és az intervencionális radiológia mellett tulajdonképpen minden más klinikai szakmát meg kell szólítania a kezelőorvosnak. A szigorló kollégáknak a vaszkuláris medicina területén is el kell jutniuk egy olyan tudásszintre, mely alapján célirányos kérdéseket tudnak feltenni a szakorvosnak és az arra kapott válaszokat megértik. A jó kérdésfeltevés már magában hordozza a jó (használható) válaszokat. Erre csak az a hallgató képes, aki az adott tárgy elméleti és gyakorlati tudásával is rendelkezik és a kérdés megfogalmazásának pillanatában tudja, hogy milyen lehetséges válaszokra számíthat. Így a kérdésre adott választ nemcsak átlátja, hanem annak alapján a megfelelő diagnosztikus és terápiás lépéseket végre is tudja hajtani.

Megvásárolható magyar, német és angol nyelven

Könyvek E-könyvek Folyóiratok Apropó Poszter Box

Semmelweis Kiadó
1089 Budapest, Nagyvárad tér 4.
www.semmelweiskiado.hu

LEGENDUS KÖNYVESBOLT
1089 Budapest, Nagyvárad tér 4.
Tel.: 210-4408, 459-1500/56353
Nyitva tartás: H–Sz: 9.00–16.00,
Cs: 9.00–18.00, P: 9.00–14.00
E-mail: info@semmelweiskiado.hu

Tasigna®
(nilotinib)

Terápiaváltás
a mély válaszokért

Lendületes rajt
CML-ben

-1 log
CHR

-2 log
CCyR

-3 log
MMR

-4 log
MR$^{4.0}$

-4,5 log
MR$^{4.5}$

Gyógyszerinformációk:*

Tasigna® 150 mg kemény kapszula (112×): ATC-kód: L01XE08;
EU törzskönyvi szám: EU/1/07/422/006.
Br. fogy.ár: 738 826 Ft; **EÜ 100% 36/a kiemelt tám:** 738 526 Ft;
EÜ kiemelt tér. díj: 300 Ft

Tasigna® 200 mg kemény kapszula (112×): ATC-kód: L01XE08;
EU törzskönyvi szám: EU/1/07/422/006.
Br. fogy.ár: 866 709 Ft; **EÜ 100% 36/b kiemelt tám:** 866 409 Ft;
EÜ kiemelt tér. díj: 300 Ft

*www.neak.gov.hu · Az árváltozások tekintetében kérjük, ellenőrizze a www.neak.gov.hu honlapon található információkat. Bővebb információért olvassa el a gyógyszer alkalmazási előírását!

A hatályos "alkalmazási előírás" teljes szövegét megtalálja az Országos Gyógyszerészeti és Élelmezés-egészségügyi Intézet (www.ogyei.gov.hu/gyogyszeradatbazis/) vagy az Európai Gyógyszerügynökség (www.ema.europa.eu) honlapokon. Az aktuális árak tekintetében kérjük, ellenőrizze a www.neak.gov.hu honlapon található információkat. Elérési útvonal: http://www.neak.gov.hu; szakmának; gyógyszer/gyse/gyógyfürdő; egészségügyiszakembereknek; publikus gyógyszertörzs; végleges; Publikus gyógyszertörzs – lakossági tájékoztató.

HU2010147805 • Lezárás dátuma: 2020.10.14.

NOVARTIS
Novartis Hungária Kft.
H-1114, Budapest, Bartók Béla út 43–47.
Tel.: +36 1 457 6500; Fax: +36 1 457 6600

Molekuláris genetikai vizsgálatok jelentősége krónikus myeloid leukaemiában

Significance of molecular genetic testing in chronic myeloid leukemia

Kiss Richárd[1]*, Jenei Alex[1], Fatima Abdul Kader[1], Demeter Judit[2], Bödör Csaba[1]

[1] HCEMM-SE Molekuláris Onkohematológia Kutatócsoport, I. Sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet, Semmelweis Egyetem, Budapest

[2] Belgyógyászati és Onkológiai Klinika, Semmelweis Egyetem, Budapest

E-levél: kiss.richard@med.semmelweis-univ.hu

ÖSSZEFOGLALÁS A krónikus myeloid leukaemia (CML) a modern onkológia mintabetegsége. A CML-re jellemző kóros BCR-ABL1 fehérjét célzó tirozin-kináz-gátló (TKI) kezelés forradalmasította a betegség terápiáját, ezzel egy rendkívül jól kezelhető, krónikus kórképpé szelídítve azt. A CML páratlanul hatékony kezelését fejlett molekuláris genetikai módszerek is segítik, lehetővé téve a terápia hatékonyságának pontos követését, a relapszus idejekorán történő felismerését, valamint a megfelelő következő vonalbeli kezelés kiválasztását. Az elmúlt években felmerült a terápiamentes remisszió (TFR) lehetősége is, mely TKI kezelésre rendkívül jól reagáló, tartósan remisszióban lévő betegek mintegy felében sikerrel kivitelezhető, azonban a TFR klinikai kritériumaiban a nemzetközi ajánlások még nem egységesek. Intézetünkben az elmúlt 17 évben több mint 13,000 BCR-ABL1 mennyiségi meghatározást végeztünk, valamint 157 terápia rezisztens esetben végeztünk szekvenálás. Az általunk vizsgált betegcsoportban a TFR egyik kritériumának megfelelő mély molekuláris válasz arány 61%-volt. A jövőben várhatóan a terápiás stratégia további fejlődésével, valamint a TFR biológiai hátterével kapcsolatos ismereteink bővülésével egyre szélesebb körben lesz lehetőség a terápia tartós felfüggesztésére.

KULCSSZAVAK krónikus myeloid leukaemia, BCR-ABL1, TKI-terápia, molekuláris monitorozás, terápiamentes remisszió

SUMMARY Chronic myeloid leukemia (CML) is a model disease of modern precision oncology. Tyrosine kinase inhibitor (TKI) treatment targeting the pathological BCR-ABL1 protein characteristic of the disease has revolutionized the therapy of CML, thus taming it into an easily treatable, chronic disease. Unparalleled efficacy in the treatment of CML is also aided by advanced molecular genetic techniques, allowing accurate monitoring of treatment efficacy, early detection of relapse, and selection of appropriate next-line therapy in case of treatment resistance. In recent years, the possibility of treatment free remission (TFR) has also emerged, which can be successfully achieved in about half of patients in long-term remission who respond well to TKI, but international recommendations for TFR are not yet uniform. In our institution, we have performed more than 13,000 BCR-ABL1 quantifications in the last 17 years, as well as sequencing 157 therapy-resistant cases. In our group of patients, the deep molecular response rate, which is one of the major criteria for TFR, was 61%. In the future, it is expected that with the further development of the therapeutic strategy and the expansion of our knowledge about the biological background of TFR, there will be an increasing possibility of permanent suspension of therapy.

KEY WORDS chronic myeloid leukemia, BCR-ABL1, TKI therapy, molecular monitoring, treatment free remission

Köszönetnyilvánítás

Köszönjük a következő hematológiai centrumoknak orvosainak a betegminták küldését és a szakmai együttműködést: Bács-Kiskun Megyei Kórház, Kecskemét; Bajai Szent Rókus Kórház, Baja; Békés Megyei Központi Kórház, Békéscsaba; Belgyógyászati és Hematológiai Klinika, Semmelweis Egyetem, Budapest; Belgyógyászati és Onkológiai Klinika, Semmelweis Egyetem, Budapest; Borsod-Abaúj-Zemplén Megyei Központi Kórház és Egyetemi Oktatókórház, Miskolc; Csolnoky Ferenc Kórház, Veszprém; Debreceni Egyetem Klinikai Központ, Debrecen; Fejér Megyei Szent György Kórház, Székesfehérvár; Hatvan Albert Schweitzer Kórház - Rendelőintézet, Hatvan; Hetényi Géza Megyei Kórház, Szolnok; Honvédkórház, Budapest; Jósa András Oktatókórház, Nyíregyháza; Karolina Kórház és Rendelőintézet, Mosonmagyaróvár; Keszthelyi Kórház, Keszthely; Magyar Imre Kórház, Ajka; Markhot Ferenc Oktatókórház és Rendelőintézet, Eger; Markusovszky Egyetemi Oktatókórház, Szombathely; Országos Onkológiai Intézet, Budapest; Pándy Kálmán Kórház, Gyula; Petz Aladár Egyetemi Oktató Kórház, Győr; Somogy Megyei Kaposi Mór Oktatókórház, Kaposvár; Soproni Erzsébet Oktató Kórház, Sopron; Szent Borbála Kórház, Tatabánya; Szent Margit Kórház, Budapest; Szent Pantaleon Kórház, Dunaújváros; Szent-Györgyi Albert Klinikai Központ, Szegedi Tudományegyetem, Szeged; Toldy Ferenc Kórház és Rendelőintézet, Cegléd; Uzsoki Utcai Kórház, Budapest; és Vaszary Kolos Kórház, Esztergom.

Rövidítések

CML	*krónikus myeloid leukaemia*
DMR	*mély molekuláris válasz*
ESMO	*European Society of Medical Oncology*
ELN	*European Leukemia Net*
EMR	*korai molekuláris válasz*
FDA	*amerikai Élelmiszer- és Gyógyszerengedélyeztetési Hivatal*
IS	*nemzetközi skála*
KD	*kináz domén*
MMR	*major molekuláris válasz*
NCCN	*National Comprehensive Cancer Network*
OS	*teljes túlélés*
PFS	*progressziómentes túlélés*
RQ-PCR	*valós idejű PCR*
TFR	*terápiamentes remisszió*
TKI	*tirozin-kináz-gátló*

Bevezetés

A krónikus myeloid leukaemia (CML) páratlanul hatásos tirozin-kináz-gátló (TKI) kezelése paradigmaváltást jelentett az onkológiában, és ezzel megnyitotta az utat a malignus kórképek genetikai hátterének feltérképezés és célzott terápiája előtt. Napjainkban a CML kezelésében számos különböző TKI elérhető, melyek különböző mellékhatásprofillal rendelkeznek, a BCR-ABL1 fehérje eltérő régióihoz kötődnek, így különböző rezisztencia mutációk esetében hatásosak.

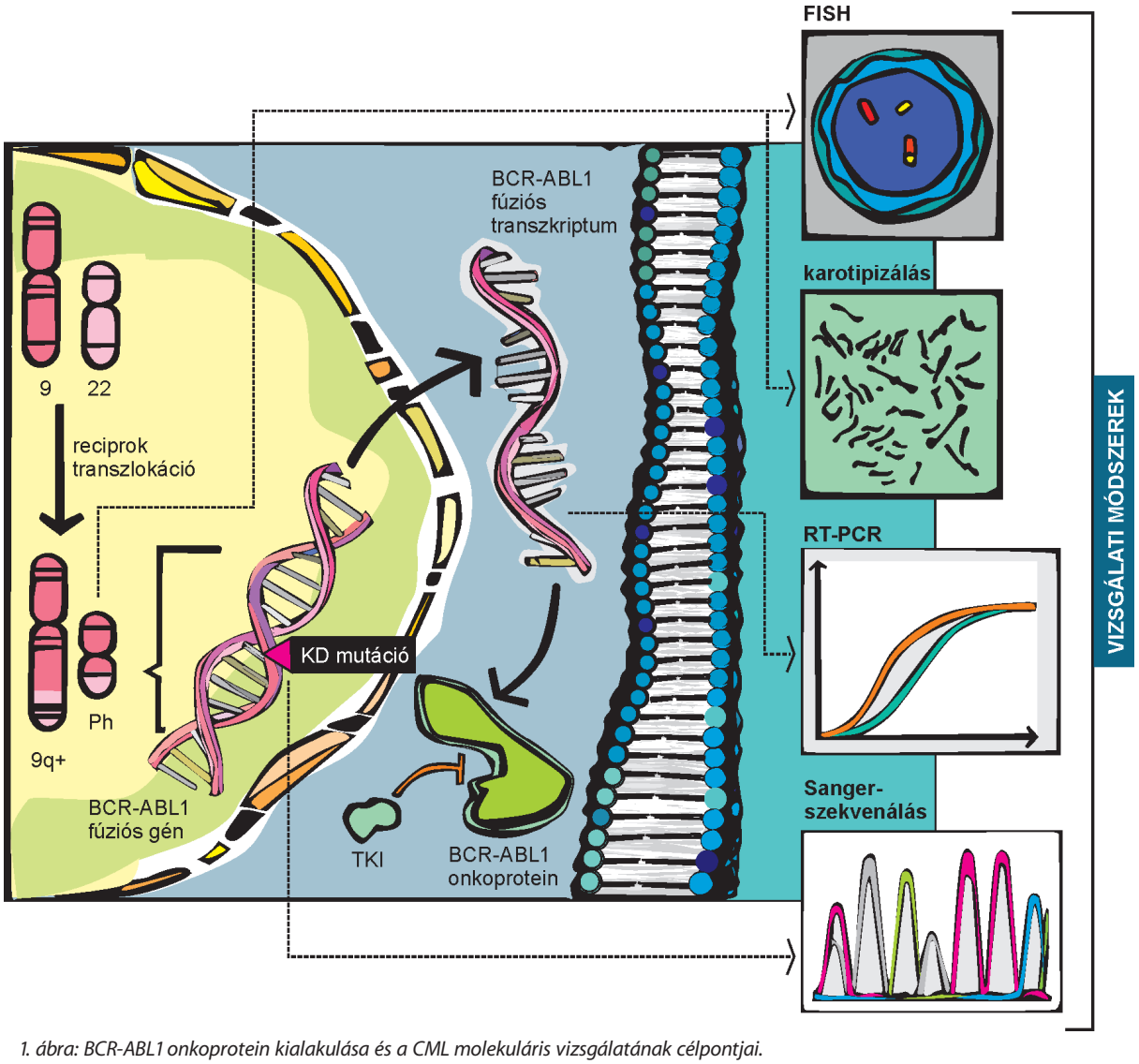
Az első generációs TKI, az imatinib esetében már több mint 20 éves kezelési tapasztalat áll rendelkezésre. Az imatinib mellékhatásprofilja igen kedvező, és elsővonalas TKI-ként továbbra is széles körben alkalmazott. Ugyan a molekuláris válasz gyorsasága tekintetében mindhárom úgynevezett második-generációs TKI (nilotinib, dasatinib és bosutinib) felülmúlja az imatinibet, hatásukra az összesített túlélés nem nőtt tovább, így az imatinib megtartotta szerepét az elsővonalbeli kezelések közt. A második generációs TKI-k viszont bizonyították, hogy elsővonalbeli alkalmazásuk esetén a molekuláris válasz gyorsabban jön létre, így mindhárom szert elsővonalas gyógyszerként is törzskönyvezték a krónikus fázisú CML kezelésében. Napjainkra nilotonib kezeléssel összefüggésben valós lehetőséggé vált a terápia tartós felfüggesztése, krónikus fázisú betegség, típusos *BCR-ABL1* fúziós transzkriptum, 5 évig tartó kezelést követően létrejött tartós (legalább 2 éves) mély molekuláris válasz és optimális molekuláris kontroll-lehetőség esetén. Mindez a gyógyszer alkalmazási előiratába is belekerült. Ma hazánkban elsővonalas gyógyszerként adható TKI-k az első generációs imatinib, és a három második-generációs TKI közül kettő, a nilotinib és a dasatinib. Ezen TKI-k mellékhatásprofilja – bizonyos közös vonások mellett – egymástól jelentősen különbözik, és éppen ez adja a CML kezelésében a finomhangolás lehetőségét, azt eredményezve, hogy a CML-es betegek túlélése nem különbözik az átlagos populációétól.

Ma már a CML-es betegeket túlélését nem a leukaemia, hanem más kísérőbetegségeik határozzák meg.[1] Ugyanakor az is igaz, hogy a TKI kezelésekkel szemben jelentős arányban alakul ki intolerancia vagy rezisztencia. Ezen betegek számára egyedi kérvénnyel van lehetőség hozzájutni egy harmadikgenerációs TKI-hoz, a ponatinibhez, amely krónikus, akcelerált vagy blasztos fázisú CML-ben is alkalmazható két második-generációs TKI-val (dasatinib vagy nilotinib) szembeni rezisztencia, vagy intolerancia esetén. A ponatinib különleges sajátossága ezen kívül, hogy ez az egyetlen TKI, amely a T315I rezisztencia mutációval szemben is hatásos, és az eddigi vizsgálatok alapján remélhető, hogy a szer cardiovascularis toxicitása az adag csökkentésével tartósan mérsékelhető.

A 2021-es évre más kérvényezési eljárással, de elérhetővé vált egy új molekuláris támadáspontú szer, az asciminib (ABL001) is. Az asciminib az ABL1 miristoil zsebét veszi célba, és így *BCR-ABL1* rezisztenciamutáció fennállása esetén is hatásos lehet. Ezt a szert az amerikai Élelmiszer- és Gyógyszerengedélyeztetési Hivatal (FDA) egyelőre kísérleti jelleggel engedélyezte részben két vagy több TKI-val szemben rezisztens, krónikus fázisú CML-ben szenvedő betegek számára, illetve abban az esetben, ha a krónikus fázisú CML-es betegben T315I mutációt mutattak ki. Finanszírozás tekintetében kedvező, hogy az imatinib generikumai évek óta elérhetők, hatásosságuk pedig az eredeti készítménnyel megegyező.

A terápiás és monitorozási lehetőségek bővülésével változott a kezelés célja is. A tartós remisszió mellett egyre inkább előtérbe került a kezelés tartós felfüggesztése, vagyis az úgynevezett terápia mentes remisszió (TFR) elérése. Ennek fényében a molekuláris monitorozás kiemelt jelentőséget kap, ugyanis a betegségre jellemző *BCR-ABL1* fúziós transzkriptum valós idejű kvantitatív PCR (RQ-PCR) reakcióval történő érzékeny mennyiségi kimutatása, és az eredmények kifejezése egy standardizált nemzetközi skálán (IS) a betegség hatékony kezelésének és a TFR elérésének egyaránt alapkövetelménye.[2]

A CML kezelésére és monitorozására vonatkozó legfrissebb európai és nemzetközi ajánlások a TKI terápia során molekuláris mérföldköveket határoznak meg, melyek elérése esetén optimális válaszról, vagy elhibázásuk esetén terápiás kudarcról beszélünk. Mindennek célja a kezelés hatékonyságának maximalizálása, vagyis a tartós és mély molekuláris válasz elérése, a terá-



1. ábra: BCR-ABL1 onkoprotein kialakulása és a CML molekuláris vizsgálatának célpontjai.
A 9-es és 22-es kromoszómák reciprok transzlokációja során kialakuló Philadelphia kromoszóma G-sávos kariotipizálással és FISH vizsgálattal egyaránt kimutatható. A BCR-ABL1 fúziós gén egyes mutációi, mely Sanger szekvenálással meghatározhatók, bizonyos TKI-k hatástalanságához vezethetnek. A fúziós transzkriptum RQ-PCR-rel történő mennyiségi meghatározásával pedig a kezelés hatásossága értékelhető. TKI: tirozin-kináz-gátló, RQ-PCR: valós idejű PCR

piás kudarc idejekorán történő felismerése, ezzel is növelve a TFR-t potenciálisan elérő betegek arányát.[3]

Molekuláris monitorozás

A CML-re jellemző *BCR-ABL1* fúzió, vagyis a 9-es és 22-es kromoszómák reciprok transzlokációja révén kialakuló Philadelphia kromoszóma csontvelői mintából történő konvencionális G-sávos kariotipizáláson alapuló kimutatásának napjainkban csak a diagnózis felállításakor, az atípusos töréspontal rendelkező betegek azonosításában van jelentősége *(1. ábra)*. A 22-es kromoszómán lévő *BCR* gén töréspontjának helye szerint a reciprok transzlokáció többféle *BCR-ABL1* fúziós gén kialakulásához vezethet. A leggyakoribb esetben a BCR gén 13-as vagy 14-es exonja és az *ABL1* gén a2-es exonja között jön létre a fúzió. Az így keletkezett génekre e13a2 és e14a2-ként hivatkozunk (ún. major töréspont). Az esetek körülbelül mintegy 5%-ában fordul elő az e19a2 fúzió (minor töréspont), ami egy nagyobb molekulaméretű *BCR-ABL1* fúziós protein kialakulásához vezet. Ritkán előfordul még az e1a2 fúzió (mikrotöréspont), de ez lézió gyakrabban társul Philadelphia-pozitív akut lymphoblastos leukeaemiákkal.

Az egyes transzkriptumok prognosztikai jelentőségét a hosszú távú kimenetel szempontjából már számos tanulmány vizsgálta. Major töréspont során kialakuló

e13a2 és e14a2 gének esetében egyaránt kedvező prognózis várható, azonban az atípusos minor- és mikrotöréspontok kimutatása nehézséget jelenthet a betegség monitorozásában.[4]

A molekuláris monitorozás során a *BCR-ABL1* gén termékének mennyiségét RQ-PCR módszerrel vizsgáljuk. A fúziós transzkriptum mennyiséget egy kontroll gén mennyiségéhez viszonyítva a nemzetközi skálán fejezzük ki, ezáltal a világ különböző laboratóriumaiban mért értékek összehasonlíthatóvá válnak. Ahhoz, hogy egy labor a RQ-PCR vizsgálattal meghatározott *BCR-ABL1* szintet a nemzetközi skálán fejezhesse ki, rendelkeznie kell egy laboratórium-specifikus konverziós faktorral, amit standard mennyiségű *BCR-ABL1*-et tartalmazó minta körkontrollja során lehet meghatározni. A konverziós faktor alkalmazásával kiküszöbölhetők az eredményt befolyásoló laboratóriumspecifikus tényezők, mint az eltérő reagensek, mérőműszerek és mintakezelési technikákból adódó változások.

A kontroll génhez viszonyítva a BCR-ABL1^{IS}-szint a kezelés kezdetén általában 100% körüli érték. Ehhez képest 3 nagyságrendnyi csökkenést (0,1%) nevezzük major molekuláris válasznak (MMR) vagy MR3.0-nak. Az ún. mély molekuláris válaszok a *BCR-ABL1* transzkriptum szint további csökkenésével jönnek létre: négy nagyságrendnyi csökkenés esetén MR4.0-ről

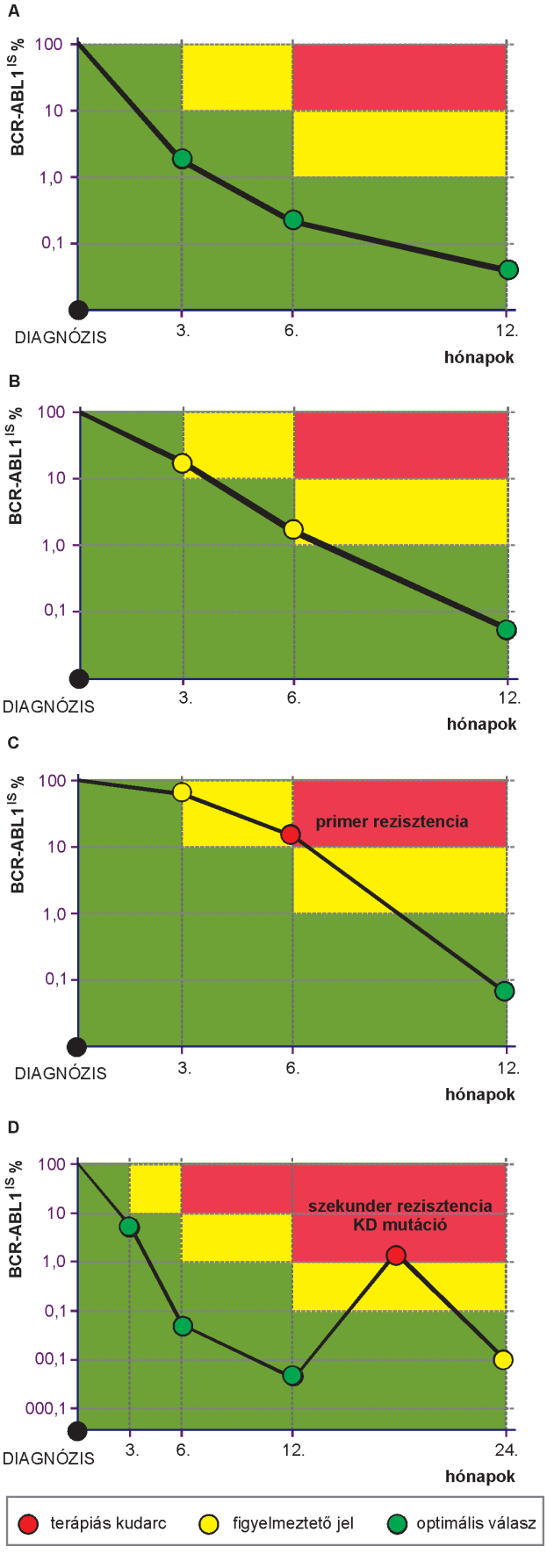
1. táblázat: Nemzetközi ajánlások által meghatározott molekuláris monitorozási mérföldkövek

		OPTIMÁLIS VÁLASZ	FIGYELMEZTETŐ JEL	TERÁPIÁS KUDARC
3. hónap				
	ELN	BCR-ABL1^{IS} ≤ 10%	BCR-ABL1^{IS} > 10%	Nincs hematológiai válasz
	NCCN	BCR-ABL1^{IS} ≤ 10%	BCR-ABL1^{IS} > 10%	-
	ESMO	BCR-ABL1^{IS} ≤ 10%	BCR-ABL^{1IS} > 10%	Nincs hematológiai válasz
6. hónap				
	ELN	BCR-ABL1^{IS} < 1%	BCR-ABL1^{IS} 1–10%	BCR-ABL1^{IS} > 10%
	NCCN	BCR-ABL1^{IS} ≤ 10%	-	BCR-ABL1^{IS} > 10%
	ESMO	BCR-ABL1^{IS} < 1%	BCR-ABL1^{IS} 1–10%	BCR-ABL1^{IS} > 10%
12. hónap				
	ELN	BCR-ABL1^{IS} ≤ 0,1%	BCR-ABL1^{IS} 0,1–1%	BCR-ABL1^{IS} > 1%
	NCCN	BCR-ABL1^{IS} < 1%	BCR-ABL1^{IS} 1–10%	BCR-ABL1^{IS} > 10%
	ESMO	BCR-ABL1^{IS} < 0,1%	BCR-ABL1^{IS} 0,1–1%	BCR-ABL1^{IS} > 1%
18. hónap				
	ESMO	BCR-ABL1^{IS} < 0,01%	BCR-ABL1^{IS} 0,1–1%	-
Bármikor 12. hónapon túl				
	ELN	BCR-ABL1^{IS} ≤ 0,1%	Komplex kariotípus, Ph-negatív CML	Komplett hematológiai válasz elvesztése
				MMR elvesztése
				KD mutáció
				BCR-ABL1^{IS} > 1%
	NCCN	BCR-ABL1^{IS} < 0,1%	BCR-ABL1^{IS} 0,1–1%	
Klinikai megfontolások				
		Terápiás válasz és mellékhatások monitorozása	Compliance és gyógyszerinterakciók	Compliance és gyógyszerinterakciók
		Terápia folytatása	Mutációanalízis megfontolása	Mutációanalízis megfontolása
				TKI váltás amennyiben nem áll fent complience probléma vagy gyógyszerinterakció

ELN: European LeukemiaNet, ESMO: European Society for Medical Oncology, KD: kináz domén, MMR: major molekuláris válasz, NCCN: National Comprehensive Cancer Network

(BCR-ABL1 ≤ 0,01%); 4,5 nagyságrendnyi csökkenés esetén MR4.5-ről (BCR-ABL1^{IS} ≤ 0,0032%); 5 nagyságrendnyi csökkenés esetén MR5.0-ről (BCR-ABL1^{IS} ≤ 0,001%) beszélünk. A korábban alkalmazott komplett molekuláris válasz kategória (CMR) ma már nem használatos, ugyanis tényleges komplett válasz nem érhető el, csak az adott vizsgálati módszer érzékenysége melletti *BCR-ABL1*-negativitás. Ezért negatív eredmény esetében csupán az adott RQ-PCR vizsgálat érzékenysége melletti negativitásról beszélhetünk. Ennek megfelelően, negatív vizsgálati eredmény esetében, a kontroll gén kópiaszáma nyújt információt az adott mérés érzékenységéről. Ezáltal a különböző szintű molekuláris válaszok (MR 4.0, MR 4.5, MR 5.0) pontos meghatározásához szükséges az adott mintában meghatározott kontroll gén kópiaszáma. BCR-ABL1^{IS}-negativitás mellett MR 4.0-ről beszélhetünk, ha a standard gén kópiaszáma >10 000, MR 4,5-ről, ha >32 500, és MR 5.0-ről, ha >100 000. Így lényegében az MR 5.0 azt jelenti, hogy 100 000 vizsgált sejt közül egy sem tartalmazott *BCR-ABL1* fúziós gént, viszont 5 nagyságrendnyi molekuláris válasz mellett is milliós nagyságrendben lehetnek jelen leukeaemiás sejtek a szervezetben, ami a hosszú távú molekuláris monitorozás jelentőségére mutat rá.

Fontos megjegyezni, hogy a RQ-PCR eredmények idővel némileg fluktuálhatnak, részben laboratóriumi technikai okokból. Amennyiben egy követési mintában a transzkriptumszint minimum ötszörösére növekszik, és a beteg elveszíti az MMR-t, a vizsgálatot gyakrabban kell elvégezni, a beteget pedig a compliance-t illetően ki kell kérdezni. A mindennapi gyakorlatban a vizsgálatot leginkább befolyásoló tényező a minta minősége. Az RNS degradációja csökkenti a módszer érzé-



2. ábra: Terápiás válasz értékelése a BCR-ABL1^{IS}-szint alapján.
***A:** Megfelelő terápiás válaszhoz társuló optimális BCR-ABL1^{IS}-szintek a kezelés első évében.* ***B:** Figyelmeztető jelnek minősülő BCR-ABL1^{IS}-szint a kezelés 3. és 6. hónapjában, majd optimális válasz a 12. hónapra.* ***C:** Terápiás kudarcnak minősülő BCR-ABL1^{IS}-szint, majd TKI-váltást követően optimális válasz a 12. hónapra.* ***D:** Optimális terápiás válaszokat követően MMR elvesztése KD mutáció következtében, majd TKI váltást követően újra MMR. TKI: tirozinkináz-gátló, MMR: major molekuláris válasz, KD: kináz domén*

kenységét, ezért kiemelt fontosságú a rövid transzportidő, mely nem lehet több, mint 12–24 óra.[5] A BCR-ABL1^{IS} mennyiségi meghatározásában egyéb módszerek is elérhetőek, mint a digitális PCR és a DNS alapú Q-PCR, azonban ezek a módszerek, bár némiképpen növelhetik a szenzitivitást, nem terjedtek el a klinikai gyakorlatban.[6, 7]

Minden első vonalban alkalmazott TKI esetében a kezelésre kialakuló, adott időpontban mért molekuláris válasz mélysége fontos prognosztikus faktor, így ezen időpontokban a nemzetközi ajánlások bizonyos mérföldköveket határoznak meg a kezelés során, vagyis a terápia sikerességének megítélésekor a BCR-ABL1^{IS} szintet adott időpontokban kell elemezni, vagyis a 3., 6. és 12. hónapban *(1. táblázat)*.[8] Az időfüggő terápiás mérföldkövek jelentőségét már számos klinikai tanulmány megerősítette, melyek a *European Leukemia Net* (ELN), a *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN) és a *European Society of Medical Oncology* (ESMO) ajánlások alapját képezték.[9-11] Ezek alapján a terápiás válaszok 3 fő csoportba sorolhatók: „optimális válasz", „figyelmeztető jel" és „terápiás kudarc". „Optimális válasz" esetén számíthatunk a legkedvezőbb, hosszú távú kimenetelre, vagyis tartós és mély remisszióra. „Terápiás kudarc" esetében, néhány kivételes esettől eltekintve, szükséges a kezelés módosítása a betegség progressziójának és akcelerációjának elkerülése végett. „Terápiás kudarc" esetén a BCR-ABL1-kináz domén (KD) mutációanalízisét kell elvégezni, mely a TKI rezisztencia leggyakoribb okaként ismert.[12] A „figyelmeztető jel" kategóriába eső (korábban szuboptimális válasz) betegeknél az optimális stratégia továbbra is kérdéses, különösképpen a korai, 3. és 6. havi mérések alkalmával. Az egyes terápiás válaszok értékelésére a *2. ábra* szolgáltat példákat.

Korai molekuláris válasz (EMR)

A kezelésre nem megfelelően válaszoló, így kedvezőtlen prognózisra számító betegek minél hamarabb történő azonosítása számos kutatás tárgyát képezte. A korai prognosztikus markerek közül a korai molekuláris válasz (EMR) jelentőségét, melyet hagyományosan a 3. hónapban mért BCR-ABL1^{IS} ≤ 10%-ként definiálunk, már több tanulmány is megerősítette. Ez a molekuláris mérföldkő prediktívnek bizonyult a kedvezőbb teljes túlélés (OS), a progressziómentes túlélés (PFS), és az MMR elérése tekintetében elsővonalbeli imatinib kezelésben részesülő betegeknél.[13, 14] Az EMR prediktív továbbá a későbbi lehetséges TFR-re is, ugyanis az EMR-t el nem érő betegeknek van a legkisebb esélyük tartós és mély molekuláris válasz elérésére, mely a TFR előfeltétele.[15]

Az EMR jelentősége második generációs TKI kezelés esetében is bizonyított. Az ENESTnd tanulmány eredményei alapján az EMR-t elérő betegek szignifikánsan nagyobb arányban értek el az MR4.5-t a kezelés 5. évére, valamint az OS és PFS is kedvezőbbnek bizonyult.[16] A SPIRIT2 vizsgálat dasatinib csoportjának adatai alapján az EMR-t el nem érő betegek szignifikánsan kisebb arányban érték el az MMR-t és az MR4.5-t a kezelés 24 hónapjára.[14] A DASASION tanulmány 5 éves adatai szerint az EMR-t elérő betegek szignifikánsan nagyobb valószínűséggel érték el az MR4.5-t, ritkábban fordult elő transzformáció, és kedvezőbbek voltak a túlélési mutatóik.

Ugyan az EMR elérése egy egyértelműen fontos prediktív faktor, jelenleg nem támasztja alá elég bizonyíték a terápiaváltást ilyen esetben, ugyanis néhány beteg, aki nem éri el az EMR-t, terápiaváltás nélkül is kedvező választ alakít ki a későbbiekben.[17] Az NCCN ajánlása szerint a 3. havi BCR-ABL1^{IS}-szintet óvatossággal kell értékelni, amennyiben az érték kis mértékben nagyobb 10%-nál, különösen akkor, ha a diagnóziskor mért szinthez képest meredek csökkenés tapasztalható.[10] A 3. és 6. hónapban mért eredmények kombinálásával pontosabban azonosíthatók lehetnek a kedvezőtlen prognózisú betegek, azonban ez a megközelítés késleltetheti a hatásosabb kezelésre való korai váltást.[18, 19]

Egy másik módszer, az EMR el nem érő betegek további differenciálásra a BCR-ABL1^{IS} csökkenés kinetikájának meghatározása. Egy vizsgálat szerint azon EMR-t nem elérő betegek, akiknél a BCR-ABL1^{IS} felezési ideje kevesebb, mint 76 nap, jobb prognózissal rendelkeztek, mint a lassabb csökkenés mellett EMR kudarcú betegek.[15] Ezenfelül a CML IV tanulmányban is kedvezőbb OS és PFS értékekkel voltak jellemezhetők azon betegek, akik a kezelés 3. hónapjára legalább fél nagyságrend csökkenést értek el a BCR-ABL1^{IS}- szintben.[20]

Major molekuláris válasz (MMR)

Az ELN- és ESMO-ajánlásai a 12. hónapban legalább MMR-szintű (0,1% BCR-ABL1^{IS}) választ tartanak optimálisnak, azonban az NCCN-ajánlása eltér ettől, és elfogadja az 1%-os választ is ebben az időpontban. En-

nek a diszkrepanciának a hátterében ellentmondó kutatási eredmények állnak. Az IRIS vizsgálat hosszú követési idejű eredményei alapján a 12. hónapban az MMR-t elérő betegek 10 éves OS értéke valóban kedvezőbb volt, és a CML IV vizsgálat 10 éves követési adatai szintén kedvezőbb OS-t, PFS-t és későbbi DMR elérési arányt mutattak ki.[21]

Ugyan a DASASION vizsgálatban 3 éves követés mellett kedvezőbb volt a 12. hónapban MMR-t elérő betegek PFS-e, ez nem bizonyult statisztikailag szignifikánsnak.[22] Továbbá, a 12. hónapban az 1%-os válasz elérése prediktív volt a teljes túlélésre, függetlenül az MMR státusztól.[22] Hasonló eredményről számolt be egy ausztrál tanulmány, melyben a 12. hónapban elért 1%-os válasz korrelált az 5 éves túléléssel, míg az MMR elérése nem mutatott semmilyen statisztikai korrelációt. Egy második generációs TKI-k elsővonalbeli alkalmazását vizsgáló tanulmány szerint az eseménymentes túlélés hasonlóan kedvező volt azon betegeknél, akik a 12. hónapra elérték az 1%-os BCR-ABL1^{IS}-szintet, függetlenül az MMR státuszuktól.[23] A CML IV vizsgálat adatainak további elemzése során megerősítették a 12. és 15 havi 1%-os szint jelentőségét. Az eredmények szerint a „terápiás kudarc" meghatározásának optimális ideje MMR-elérése szempontjából a 2,5 év, ezzel támpontot adva azon betegek kezelésében, akik tartósan a „figyelmeztető jelnek" minősülő tartományba esnek.[24]

Ugyan a 12. havi MMR jelentősége a várható túlélés tekintetében ellentmondásos, a korai MMR egyértelműen prognosztikus a későbbi DMR elérésére, mely kiemelten fontos a TFR szempontjából. A CML IV vizsgálat adatai alapján az MMR elérésének ideje szorosan összefügg a későbbi legalább MR4.5 szintű válasz elérési arányával. A 3. hónapnál ez 83,3%, 6. hónapban 69,2%, 12. hónapban 56,7%, 18 hónapban pedig csupán 51,1% volt.[25] Ezzel szemben a 12. hónapra 0,1–1% közötti választ elérő betegek MR4.5 szintű választ 14,5%-ban értek el, míg azoknál, akik ezt a választ csak a 18. hónapban érték el, ez 5%-volt.[25] Ezen eredményeket egy ausztrál kutatócsoport is megerősítette, valamint eredményeik szerint az MMR korai elérése nem csupán az MR4.5 válasz kumulatív incidenciájával, hanem a válasz tartósságával is összefügg, mely szintén kritikus tényezője a TFR-nek.[15]

A BCR-ABL1^{IS}-szint RQ-PCR-rel való meghatározása az ajánlások szerint nem kötelező a diagnózis felállításakor, ugyanakkor a fúziós transzkriptum csökkenésének mértéke hasznos prognosztikus marker lehet, így ajánlott a vizsgálatot elvégezni.[15, 20] A TKI kezelés megkezdését követően 3 havonta, majd az MMR elérést követően 3–6 havonta kell meghatározni a BCR-ABL1^{IS}-szintet.[9, 11] A gyakoribb molekuláris monitorozás (3–4 vizsgálat évente) egyes eredmények szerint magasabb TKI compliance-szel társul, ezzel sugallva, hogy a 3 havonta végzett vizsgálat növeli az adherenciát.[26] Ennek alapján ajánlott lehet a legtöbb esetben fenntartani a 3 havonta történő vizsgálati gyakoriságot, különösképpen az MMR elérése ellenére compliance-problémára gyanús, a TFR-re aspiráló, valamint az új TKI-ra váltó betegeknél.

Ezen felül bizonyos esetekben szükséges lehet ennél is gyakoribb vizsgálatra, így terhesség miatti TKI felfüggesztés esetében, a TFR első 6 hónapjában, valamint a 6 hónapon túli TFR-ben a DMR elvesztését követően havonta érdemes BCR-ABL1^{IS} meghatározást végezni.[3]

Mély molekuláris válasz (DMR)

A molekuláris válasz mélysége a tartós remisszó és a TFR egyik legfontosabb tényezője. A „teljes molekuláris válasz" kifejezés napjainkban már nem használatos, ugyanis a BCR-ABL1^{IS} kimutathatósága megfelelő terápiás válasz esetén gyakorta csak a minta minőségétől és a vizsgálat változó érzékenységétől függ, így legtöbbször mély molekuláris válaszról, vagy DMR-ről beszélünk, mely alatt legalább MR4.0 szintű választ értünk.[7]

Már a kezelés első vonalában alkalmazott potensebb, 2. generációs TKI-k meggyorsíthatják a DMR elérését, és növelhetik az azt elérő betegek százalékos arányát. Az ENESTnd vizsgálat tízéves követési adatai azt mutatták, hogy az imatinib-kezelt csoport 31%-a érte el az MR4.5-öt, míg a nilotinib kar 54%-a érte el ekkorra ezt a szintű molekuláris választ.

Hasonló eredményeket figyeltek meg a DASISION vizsgálat öt éves eredményeiben, ahol a dasatinib kezelés magasabb MR4.5 arányhoz társult, mint imatinib esetében (42% vs 33%).[27] A nagy dózisú imatinibbel (azaz napi 800 mg, szemben a napi 400 mg-mal) hasonló MR4.5 arány érhető el, mint a második generációs TKI-kkel, bár a magasabb dózis több nemkívánatos mellékhatás megjelenéséhez társul, így manapság ritkán alkalmazzák.[28] Ettől függetlenül a TKI kiválasztásában a DMR elérése érdekében mérlegelni kell a terápiás toxicitást, ugyanis mindegyik gyógyszer viszonylag egyedi mellékhatás profillal rendelkezik. Azoknál a betegeknél, akik nem tartják a TFR-t kiemelt prioritás-

nak (azaz idősek és jelentős társbetegségben szenvedők), az MMR elérése megfelelő terápiás végpont lehet, és ennek figyelembevételével a terápia kiválasztása testreszabható.

A frontvonalbeli imatinibbel történő DMR elérésének elmulasztása miatt a második vonalbeli terápiára való áttérés sikeres stratégia lehet. Az ENESTnd vizsgálat 48 hónapos elemzése kimutatta, hogy azoknál a betegeknél, akik imatinib kezelés során nem értek el mély molekuláris választ, a nilotinibre való áttérés jelentősen megnövelte az MR4.5 elérésének valószínűségét.[29]

Azoknál az imatinib-kezelt betegeknél, akiknél a legjobb válasz az 1% BCR-ABL1^{IS}, a nilotinibre való áttérés szintén MR4.5-et indukálhat, valamint az imatinib-intolerancia vagy kudarc után dasatinibra történő átállás is lehetővé teheti az MR4.0 elérését és az esetleges sikeres TFR-kísérleteket.[30]

Mutációanalízis

A TKI kezelés során fellépő „terápiás kudarc" hátterében az esetek többségében a BCR-ABL1 KD mutációi állnak. Ilyenkor a következő vonalban alkalmazott TKI-t minden esetben szekvenálás során azonosított mutációs profil alapján kell kiválasztani *(2. táblázat)*.[31]

A KD mutációinak meghatározására jelenleg a Sanger-szekvenálás a standardnak tekintett módszer, azonban ez a metodika viszonylag alacsony érzékenységű, a mintában legalább 10–20% Philadelphia-pozitív sejtnek kell jelen lennie. Az esetek többségében ez az érzékenység megfelelő a BCR-AB1^{IS} transzkriptum szint emelkedéséhez vezető rezisztens klónok domináns mutációinak meghatározásához.[32]

A mutációanalízist a TKI leállítását megelőzően levett mintából kell elvégezni. Ennek oka, hogy a TKI leállítása után a mutációk gyorsan detektálhatatlanná válhatnak a szelekciós nyomás megszűnésével újra expandálódó, vad típusú KD-t hordozó leukaemiás sejtek miatt. Az érzékenyebb technikák, például a tömegspektrometria, a digitális droplet PCR és az újgenerációs szekvenálás javíthatják a kimutatási határt akár 0,2%-ra, azonban ezek a módszerek még nem állnak széles körben rendelkezésre, valamint a csupán magas érzékenységű módszerekkel kimutatható mutációk klinikai jelentősége megkérdőjelezhető.

A KD domén mutációkat csak az imatinib rezisztens betegek mintegy felében lehet azonosítani, és a betegek nem mindig reagálnak a megfelelően kiválasztott szerre, ami sok esetben más rezisztencia útvonalak jelenlétére utal.

2. táblázat: TKI-kkal szembeni rezisztenciához vezető BCR-ABL1 KD mutációk

TKI	BCR-ABL1 KD REZISZTENCIA MUTÁCIÓ
Imatinib	M237V, I242T, M244 V, K247R, L248V, G250E, G250R, Q252R, Q252H, Y253F, Y253H, E255K, E255V, E258D, W261L, L273M, E275K, E275Q, D276G, T277A, E279K, V280A, V289I, V289I, V289A, E292Q, E292V, I293V, L298V, F311L, F311I, T315I, F317L, F317V, F317I, F317C, Y320C, L324Q, Y342H, M343T, A344V, A350V, M351T, E355D, E355G, E355A, F359V, F359I, F359C, F359L, D363Y, L364I, A365V, A366G, L370P, V371A, E373K, V379I, A380T, F382L, L384M, L387F, L387V, M388L, H396R, H396P, H396A, A397P, S417F, S417Y, I418S, I418V, A433T, S438C, E450K, E450G, E450A, E450V, E453G, E453A, E453K, E453V, E453Q, E459K, E459V, E459G, E459Q, M472I, P480L, F486S
Dasatinib	V299L, T315I, T315A, F317L, F317V, F317I, F317C
Nilotinib	Y253H, E255K, E255V, T315I, F359V, F359I, F359C
Bosutinib	E255V, E255K, V299L, T315I
Ponatinib	T315M, T315L

TKI: tirozin-kináz-gátló, KD: kináz domén

Terápiamentes remisszió (TFR)

A TFR biztonságosságát és kivitelezhetőségét a TKI kezelésre jól reagáló betegek körében már számos klinikai vizsgálat igazolta, így napjainkra beépült a CML kezelésének szakmai irányelveibe, mint terápiás cél a páciensek egy részénél.[9, 10] A sikeres TFR kapcsán a CML kezelésének költségei drasztikusan csökkenthetők. Ezt példázza, hogy a Euro-SKI tanulmányban csak a gyógyszerköltségen megtakarított összeg mintegy 22 millió euró volt. A költségcsökkentésen túl azonban a TFR a betegek életminőségének jelentős javulásához is vezethet a TKI terápia mellékhatásainak megszűnése révén.[33]

Különböző vizsgálatok alapján a TFR a bevont betegek mintegy 40–60%-ánál sikeres. A terápia felfüggesztését követően relabáló betegek esetében a korábban alkalmazott TKI újbóli bevezetésével a betegség feletti kontroll hamar visszanyerhető. Mindez azon betegek körében áll fenn, akik a TKI kezelésre rendkívül jól válaszoltak, melynek legerősebb mutatója a DMR. Az egyik első TFR vizsgálatban, melyben a beválasztási kritérium 2 éves MR5.0 szintű molekuláris válasz volt,

a terápiát pedig BCR-ABL1^{IS}-szint egy nagyságrend növekedése esetén indították újra, a betegek 43%-a mutatott TFR-t a 6. hónapban, és ez az arány a 60. hónapra is csak 38%-ra esett vissza.[34] Hasonló eredményeket írtak le az ausztrál TWISTER tanulmányban is, ahol a belépési kritérium 2 évig kimutathatatlan BCR-ABL1^{IS} szint volt; itt a 24 hónapos sikeres TFR arány 47%-nak bizonyult.[35]

A későbbi TFR vizsgálatok kritériumai már kevésbé voltak szigorúak, mind a beválogatás, mind terápia újrakezdésének tekintetében. Az A-STIM vizsgálatban, mely az MMR elvesztését tekintette a TKI újrakezdés feltételeként, a TFR arány a 36. hónapban 61% volt. A Euro-Ski tanulmányban, mely jelenleg az eddigi legnagyobb TFR vizsgálat, az egy évig legalább MR4 szintű választ mutató betegek 50%-a volt MMR-ben, vagy annál mélyebb válaszban, a TFR 24. hónapjában. Mindebből arra következtethetünk, hogy az MMR a TKI folytatásának biztonságos küszöbértéke lehet.[36] Bár a TKI felfüggesztése előtti elérendő molekuláris válasz optimális szintje és ideje még nem tisztázott, az eredmények szerint legalább 24 hónapos DMR esetén magas TFR arány érhető el.[37]

A második generációs TKI-k felfüggesztése kapcsán magasabb arányú TFR-ről számol be a nemzetközi irodalom, mely az MMR gyorsabb elérésével, és a magasabb DMR elérési aránnyal állhat összefüggésben. Ennek megfelelően az ENESTnd vizsgálat 10 éves követési adatai alapján az elsővonalbeli nilotinib kezelés során 17%-kal több beteg teljesítette a TFR kritériumait.[38]

A legfrissebb ELN-ajánlás a következőket tekinti a TFR optimális feltételeinek: legalább 5 éves DMR, ebből legutóbbi 3 év legalább MR4.0 vagy 2 év MR4.5 szintű válasz. Az egyes nemzetközi szakmai kollégiumok ajánlásai némiképp eltérnek egymástól, főleg a DMR mélységének és tartósságának tekintetében, melyek a TFR kritériumainak legjelentősebb változóinak tűnnek *(3. táblázat)*.

Molekuláris monitorozás TFR-ben

A DMR eléréséhez és fenntartásához, ezáltal a TFR-hez is feltétlenül szükséges a legalább MR4.5 szintű molekuláris válasz kimutatására alkalmas, az eredményeket a nemzetközi skálán kifejező, negativitás esetén pedig a vizsgálat mélységét is megadó RQ-PCR alapú vizsgálathoz való biztos hozzáférés.[39]

A TFR tanulmányokban túlnyomórészt havi rendszerességgel végeztek BCR-ABL1^{IS} meghatározást az első 6-12 hónapban, ugyanis a molekuláris relapszus a TKI felfüggesztését követően főként az első 6 hónapban alakul ki. Ezt követően ritkább, vagyis 2–3 havonta végzett monitorozás is elégséges, mivel a késői molekuláris relapszusok ritkán fordulnak elő. Amennyiben a monitorozás során emelkedés tapasztalható a BCR-ABL1^{IS}-szintben, havonta kell transzkriptumszint meghatározást végezni, ugyanis a TFR 3. hónapjában az MR4.5 elvesztése előre jelezheti a TFR tényleges kudarcát a későbbiekben, azonban a betegek egy része DMR és MMR között fluktuáló transzkriptum szint mellett is TFR-ben marad.[40] Noha a késői relapszusok ritkák, ilyen esetekben is előfordul, hogy a betegek elveszítették az MMR-t, és újra alkalmazni kell a TKI-kezelést, így a látszólagos tartós TFR ellenére is folytatni kell a molekuláris monitorozást 3–6 havi gyakorisággal a TFR első évét követően is.

Minden nemzetközi ajánlásban közös ugyanakkor az előrehaladott állapotú betegek kizárása, valamint a TFR első 6 hónapjában havi rendszerességgel végzett, legalább MR4.5 szintű válasz kimutatására alkalmas, RQ-PCR vizsgálat előírása *(3. táblázat)*.

TKI-kezelés TFR kudarcot követően

Az MMR elvesztése, vagyis molekuláris relapszus esetében a TKI újbóli alkalmazása mellett 1–2 hónapos gyakorisággal érdemes monitorozni a BCR-ABL1^{IS}-szintet. Ezen esetekben a betegek döntő többsége továbbra is érzékeny a korábban alkalmazott TKI-re, KD mutációról csak elvétve találhatók közlések.[41, 42] A nemzetközi irodalomban máig csupán egyetlen esetben számoltak be sikertelen TFR-t követő blasztos krízisről, mely az imatinib újraindítását követő 9. hónapban jelentkezett annak ellenére, hogy a beteg visszanyerte az MMR-t (36).

A betegek többsége gyorsan válaszol az újraindított kezelésre, a STOP 2G TKI-vizsgálat eredményei szerint az MMR újbóli elérésének medián ideje 2 hónap, a DMR-é pedig 3 hónap.[40] További TFR vizsgálatok hasonló eredményekkel szolgáltak, azonban bár a betegek többsége valóban gyorsan újra eléri az MMR-t és DMR-t, egy kis csoport esetében előfordul, hogy ez nem sikerül.[33, 34, 36, 41, 43, 44] Ilyenkor, amennyiben a kezelés újraindítását követően 6–12 hónappal sem sikerül elérni az MMR-t, KD mutáció elemzésre és TKI váltásra van szükség.

3. táblázat: Nemzetközi tanulmányokban megfolgalmazott TFR-kritériumok

	HUGHES			ESMO	NCCN	FRANCIA CML MUNKA-CSOPORT	ELN
	2016			2017	2017	2018	2020
	ZÖLD	SÁRGA	PIROS				
BCR-ABL1 transzkript	típusos, mérhető	atípusos, mérhető	nem mérhető	típusos, mérhető	típusos, mérhető	E13a2, e14a2, e13a2 + e14a2	típusos, mérhető
CML kórtörténet	krónikus fázis	rezisztencia vagy KD mutáció	akcelerált vagy blastos fázis	krónikus fázis	krónikus fázis	krónikus fázis	krónikus fázis
Sokal score	nem magas	magas	-	nem magas	-	-	
Elsővonalbeli TKI-re adott válasz	optimális	figyelmeztető jel	kudarc	optimális	nincs rezisztencia	Nincs progresszió, rezisztencia, szuboptimális vagy figyelmeztető válasz	Minimum: nincs előzetes rezisztencia (kivéve intolerancia első vonalbeli TKI-re)
DMR	≤MR4.5	≤MR4.0	>MR4.5	≤MR4.5	≤MR4.0	≤MR4.5	≤MR4.0
DMR hossza	≥2 év	1-2 év	<1 év	≤MR4.5≥2 év	≥2 év	≥2 év	Optimális: >3 év ha MR4.0, >2 év ha MR4.5
							Minimum: >5 év (>4 év 2. generációs TKI-vel)
TKI kezelés hossza	≥8 év	3-8 év	<3 év	≥5 év	≥3 év	≥5 év	Optimális: >5 év
							Minimum: ≥MR4.0 >2 év
Megszakítási feltétel	-	-	-	-	MMR elvesztése	MMR elvesztése	MMR elvesztését követően 4 hét
Monitorozási gyakoriság	Havonta az első 6 hónapban			Havonta az első fél évben	Havonta az első 12 hónapban	Havonta az első 6 hónapban	Havonta az első 6 hónapban
	2-3 havonta ezt követően			6 hetente a második félévben	6 hetente a 13-24. hónap között	Kéthavonta az 7–12. hónap között	2 havonta a 7–12. hónapban
				3 havonta ezt követően	3 havonta ezt követően	3 havonta a második évben	3 havonta ezt követően
						3–6 havonta ezt követően	

ELN: European LeukemiaNet, ESMO: European Society for Medical Oncology, KD: kináz domén, MMR: major molekuláris válasz, NCCN: National Comprehensive Cancer Network, TFR: terápiamentes remisszió

TFR sikerességének prediktív markerei

A TFR sikerességét számos tényező képes előre jelezni, ilyen a TFR előtti TKI kezelés hossza is. A STIM vizsgálat adatai alapján a legalább 54 hónapos imatinib kezelés esetében alacsonyabb a molekuláris relapszus kockázata TFR során, mely eredményt számos más klinikai vizsgálat is igazolta.[33, 34, 42, 44] Ezzel szemben az

imatinib-rezisztencia a hatékony második generációs TKI-kezelés ellenére is csökkenti a sikeres TFR esélyét.[30, 40]

A TKI előtti korszakban megalkotott prognosztikai modellek, például a Sokal score továbbra is hasznosak a betegség viselkedésének jellemzésére, így a TFR sikerének előre jelzésére is használhatók. Ezért az alacsony Sokal score ritkább molekuláris relapszushoz társul TFR során, azonban ez az összefüggés nem állt fenn minden vizsgálatban.[33-35, 45]

A DMR hossza szintúgy összefüggésben áll a TFR sikerével, ahogyan azt a EURO-SKI vizsgálat is leírta, továbbá az eredmények szerint minden DMR-ben töltött év 3%-kal növeli a valószínűségét annak, hogy a beteg TFR 6. hónapjában is még legalább MMR-ben marad.[41]

Bár egyetlen egyéni változó sem képes pontosan megjósolni a TFR sikerét, mindet figyelembe kell venni a TFR kísérletei előtt, és a betegeknek a TKI leállítása előtt tanácsot kell adni a molekuláris relapszus kockázatáról.

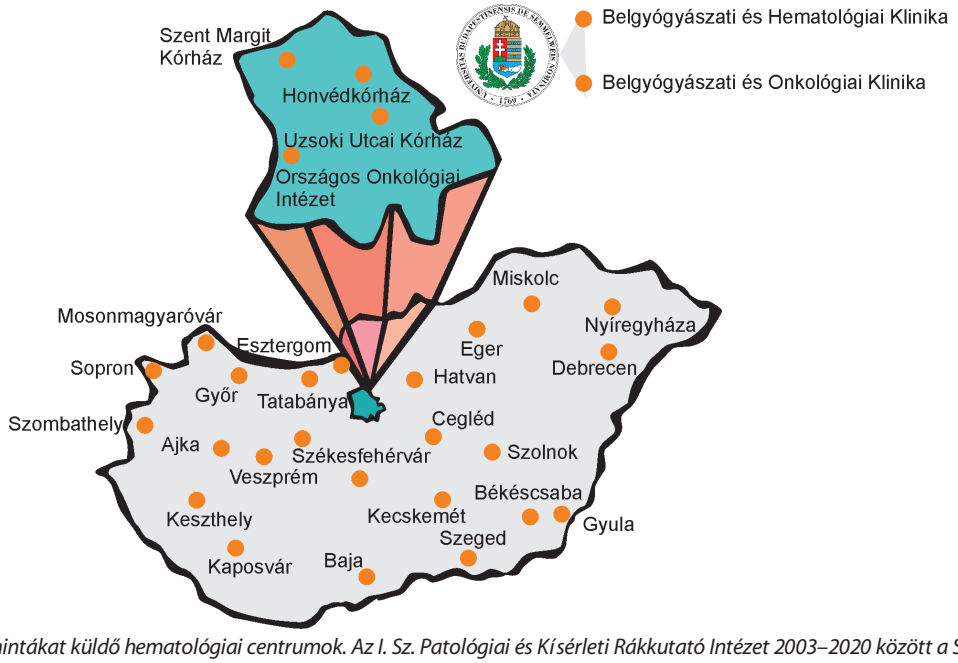
TFR kapcsán fellépő nehézségek

A TFR-re alkalmas betegek körültekintő kiválasztása kulcsfontosságú a terápiafelfüggesztés sikerességi rátájának növelése, és az azzal járó esetleges káros hatások csökkentése szempontjából. A TFR során különös figyelmet kell fordítani az atípusos transzkripttummal rendelkező betegekre, ugyanis amennyiben a monitorozást végző laboratórium nem képes azt kimutatni, vagy tévesen a major töréspontot vizsgálják, a relapszus a hematológiai tünetek megjelenéséig rejtve maradhat.[42] Minden beteg esetében fontos a megbízható laboratóriumi háttér, amely képes gyors átfutási idő mellett a BCR-ABL1^{IS} eredmények megadására, így molekuláris relapszus esetén lehetséges a gyors intervenció, megelőzve ezzel a hematológiai remissziót.

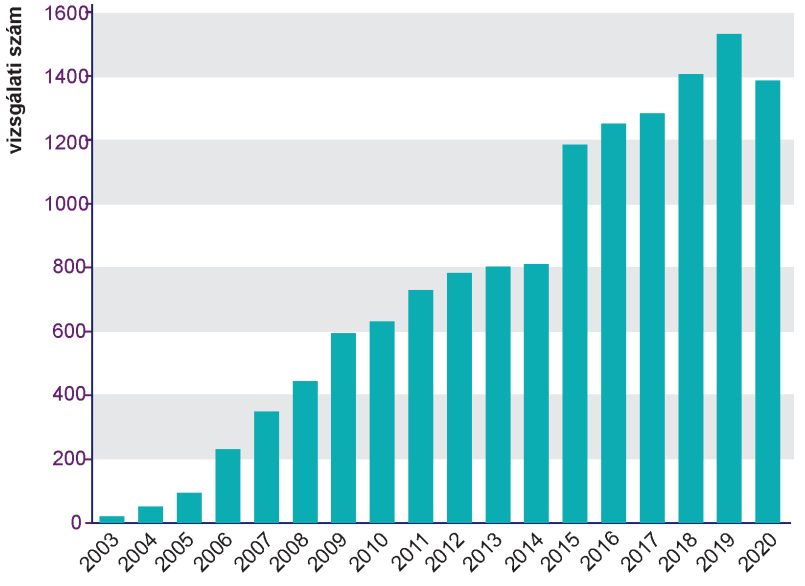
Jelentős kérdés még a betegek compliance-e, ugyanis a javasolt monitorozási ütemterv betartásával minimalizálhatók a késleltetett beavatkozásból eredő komplikációk, így fontos a TFR-t megkísérlő betegek szoros kontrollja.[39]

Saját tapasztalatok

A Semmelweis Egyetem I. Sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézetben a BCR-ABL1 vizsgálat 2003-as bevezetése országszerte 30 hematológiai centrumból származó, 1413 beteg 13 568 mintáján végeztünk BCR-ABL1^{IS}-szint meghatározást *(3. ábra)*. A vizsgálatok száma évről-évre szigorú-monoton növekedést mutatott *(4. ábra)*. A 2020-as évben fordult elő először, hogy a megelőző évnél kevesebb vizsgálati minta érkezett, mely feltehetően a SARS-CoV-2 járványnak tudható be. A minták 70,5%-ban azonosítottunk kimutat-



3. ábra: Betegmintákat küldő hematológiai centrumok. Az I. Sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet 2003–2020 között a Semmelweis Egyetem belgyógyászati klinikáin túl további 28 hematológiai centrumból kapott mintát BCR-ABL1-szint meghatározásra az ország különböző régióiból.



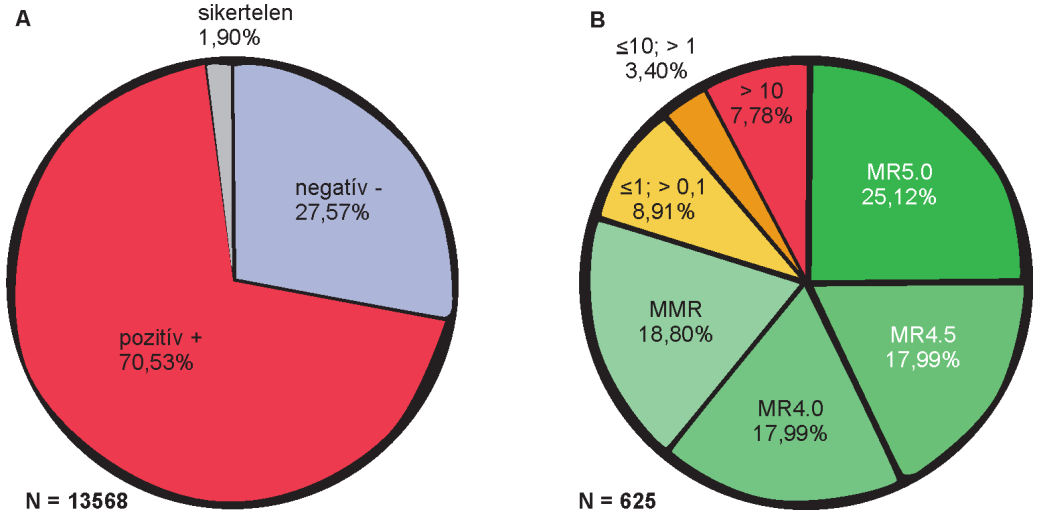
4. ábra: BCR-ABL1^{IS} -vizsgálatok az évek során. A BCR-ABL1^{IS} -meghatározások számában a vizsgálat 2003-as bevezetése óta évről-évre folyamatos növekedés tapasztalható, mely tendenciában csupán a 2020-as év jelentett törést, feltehetően a SARS-CoV-2-járvány következtében.

ható BCR-ABL1 transzkriptumot, 27,6%-ban negatív BCR-ABL1 szint mellett a referencia gén mennyisége alapján határoztuk meg a molekuláris válasz mélységét. Az összesített sikertelenségi ráta 1,9% volt, melynek leggyakoribb oka valószínűleg a minták RNS tartalmának degradálódása volt *(5. ábra/A)*.

A 2020-as évben BCR-ABL1IS szinttel rendelkező, aktívan monitorozott, mintegy 625 beteg mintájának vizsgálatakor 79,9%-ban mutattunk ki legalább MMR szintű molekuláris választ, 17,9%-ban MR4.0, 17,9%-ban MR4,5, 25,12%-ban pedig MR5.0 szintű molekuláris választ azonosítottunk *(5. ábra/B)*.

Összegzés

A CML kezelését forradalmasító első TKI, az imatinib FDA engedélyezése óta immáron 20 év telt el. Napjainkra a kezelés első vonalában is számos TKI elérhetővé vált, így lehetséges a páciens komorbiditásainak, illetve a választott terápiás végpontnak megfelelő kezelés kiválasztása. Az érzékeny molekuláris genetikai módszereken alapuló monitorozás segítségével a terápia rezisztencia idejekorán észlelhető, valamint a rezisztencia mutációk meghatározása révén az adott eltérés jelenléte mellett is hatékony következő vonalbeli



5. ábra: BCR-ABL1^{IS} -vizsgálatok összesített eredményei. A: A BCR-ABL1^{IS}-vizsgálatok 70,53%-ában azonosítottunk kimutatható BCR-ABL1 transzkriptumot 1,9%-os sikertelenségi ráta mellett. B: A 2020-as évben monitorozott betegek 79,9%-a volt legalább MMR-ben, míg a legalább MR4.0 szintű mély molekuláris válasz aránya 61,1%-nak bizonyult.

kezelés választható. Mindezek alapján tekinthető a CML a modern onkológia modellbetegségeként, azonban továbbra is példaként szolgál, ugyanis a TFR-en keresztül látótérbe került a kuratív kezelés lehetősége. Jelenleg a terápia felfüggesztése az igen tartós és mély molekuláris válaszban lévő betegek csak mintegy felében társul tartós remisszióval. Máig feltáratlan kérdés, hogy mi jelenti a különbséget a terápia felfüggesztésére adott válaszban. Egyes vizsgálatok szerint az NK sejtek mennyiségének, immunfenotípusának, a killer immunoglobulin-like receptor polimorfizmusainak egyaránt szerepe lehet ezekben a különbségekben. Egy teljes exom szekvenálási vizsgálatban felmerült továbbá a PARP9, CYP1B1, ALPK2 és IRF1 génekben hordozott mutációk szerepe, valamint a CML őssejtek miR-126 mikro-RNS expressziós szintjének jelentősége.[46-50]

A sikeres TFR kialakításában szerepet játszó további tényezők felismerése és a betegek fejlett molekuláris módszerekkel támogatott személyre-szabott kezelése a CML-ben szenvedők egyre szélesebb körében fogja lehetővé tenni a TFR elérését. Ezáltal a jövőben remélhetőleg a CML-ről nem csak mint egy jól kezelhető, hanem gyógyítható betegség beszélhetünk.

Irodalom

1. Júlia G-W, Orsolya M, Gábor K, Balázs S, Hanna E, Richárd K, et al. Újdonságok és tapasztalatok a krónikus myeloid leukaemia tirozin-kináz-gátló kezelésében. Magyar Onkológia 2017; 61:67-74.
2. Kiss R, Király PA, Gaál-Weisinger J, Marosvári D, Gángó A, Demeter J, et al. A krónikus myeloid leukaemia molekuláris monitorozásának aktuális kérdései. Magyar Onkológia 2017; 61:57-66.
3. Shanmuganathan N and Hughes TP. Molecular monitoring in CML: how deep? How often? How should it influence therapy? Blood 2018; 132:2125-33.
4. Jain P, Kantarjian H, Patel KP, Gonzalez GN, Luthra R, Kanagal Shamanna R, et al. Impact of BCR-ABL transcript type on outcome in patients with chronic-phase CML treated with tyrosine kinase inhibitors. Blood 2016; 127:1269-75.
5. Branford S, Cross NC, Hochhaus A, Radich J, Saglio G, Kaeda J, et al. Rationale for the recommendations for harmonizing current methodology for detecting BCR-ABL transcripts in patients with chronic myeloid leukaemia. Leukemia 2006; 20:1925-30.
6. Mori S, Vagge E, le Coutre P, Abruzzese E, Martino B, Pungolino E, et al. Age and dPCR can predict relapse in CML patients who discontinued imatinib: the ISAV study. American journal of hematology 2015; 90:910-4.
7. Cross NC, White HE, Colomer D, Ehrencrona H, Foroni L, Gottardi E, et al. Laboratory recommendations for scoring deep molecular responses following treatment for chronic myeloid leukemia. Leukemia 2015; 29:999-1003.
8. Guo JQ, Lin H, Kantarjian H, Talpaz M, Champlin R, Andreeff M, et al. Comparison of competitive-nested PCR and real-time PCR in detecting BCR-ABL fusion transcripts in chronic myeloid leukemia patients. Leukemia 2002; 16:2447-53.
9. Hochhaus A, Baccarani M, Silver RT, Schiffer C, Apperley JF, Cervantes F, et al. European LeukemiaNet 2020 recommendations for treating chronic myeloid leukemia. Leukemia 2020; 34:966-84.
10. Radich JP, Deininger M, Abboud CN, Altman JK, Berman E, Bhatia R, et al. Chronic Myeloid Leukemia, Version 1.2019, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. J Natl Compr Canc Netw 2018; 16:1108-1135
11. Hochhaus A, Saussele S, Rosti G, Mahon FX, Janssen J, Hjorth-Hansen H, et al. Chronic myeloid leukaemia: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. Ann Oncol 2017; 28 Suppl 4:iv41-iv51
12. Soverini S, Branford S, Nicolini FE, Talpaz M, Deininger MW, Martinelli G, et al. Implications of BCR-ABL1 kinase domain-mediated resistance in chronic myeloid leukemia. Leukemia research 2014; 38:10-20.
13. Hanfstein B, Muller MC, Hehlmann R, Erben P, Lauseker M, Fabarius A, et al. Early molecular and cytogenetic response is predictive for long-term progression-free and overall survival in chronic myeloid leukemia (CML). Leukemia 2012; 26:2096-102.
14. Marin D, Hedgley C, Clark RE, Apperley J, Foroni L, Milojkovic D, et al. Predictive value of early molecular response in patients with chronic myeloid leukemia treated with first-line dasatinib. Blood 2012; 120:291-4.
15. Branford S, Yeung DT, Ross DM, Prime JA, Field CR, Altamura HK, et al. Early molecular response and female sex strongly predict stable undetectable BCR-ABL1, the criteria for imatinib discontinuation in patients with CML. Blood 2013; 121:3818-24.
16. Hochhaus A, Saglio G, Hughes TP, Larson RA, Kim DW, Issaragrisil S, et al. Long-term benefits and risks of frontline nilotinib vs imatinib for chronic myeloid leukemia in chronic phase: 5-year update of the randomized ENESTnd trial. Leukemia 2016; 30:1044-54.
17. Branford S, Yeung DT, Parker WT, Roberts ND, Purins L, Braley JA, et al. Prognosis for patients with CML and >10% BCR-ABL1 after 3 months of imatinib depends on the rate of BCR-ABL1 decline. Blood 2014; 124:511-8.
18. Kim DD, Hamad N, Lee HG, Kamel-Reid S and Lipton JH. BCR/ABL level at 6 months identifies good risk CML subgroup after failing early molecular response at 3 months following imatinib therapy for CML in chronic phase. American journal of hematology 2014; 89:626-32.
19. Bonifacio M, Binotto G, Maino E, Calistri E, Marin L, Scaffidi L, et al. Imatinib-treated chronic myeloid leukemia patients with discordant response between cytogenetic and molecular tests at 3 and 6 month time-points have a reduced probability of subsequent optimal response. Haematologica 2015; 100:e299-301.
20. Hanfstein B, Shlyakhto V, Lauseker M, Hehlmann R, Saussele S, Dietz C, et al. Velocity of early BCR-ABL transcript elimination as an optimized predictor of outcome in chronic myeloid leukemia (CML) patients in chronic phase on treatment with imatinib. Leukemia 2014; 28:1988-92.

21. Hehlmann R, Lauseker M, Saußele S, Pfirrmann M, Krause S, Kolb HJ, et al. Assessment of imatinib as first-line treatment of chronic myeloid leukemia: 10-year survival results of the randomized CML study IV and impact of non-CML determinants. Leukemia 2017; 31:2398-406.
22. Jabbour E, Kantarjian HM, Saglio G, Steegmann JL, Shah NP, Boqué C, et al. Early response with dasatinib or imatinib in chronic myeloid leukemia: 3-year follow-up from a randomized phase 3 trial (DASISION). Blood 2014; 123:494-500.
23. Jabbour E, Kantarjian HM, O'Brien S, Shan J, Quintás-Cardama A, Garcia-Manero G, et al. Front-line therapy with second-generation tyrosine kinase inhibitors in patients with early chronic phase chronic myeloid leukemia: what is the optimal response? Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology 2011; 29:4260-5.
24. Saussele S, Hehlmann R, Fabarius A, Jeromin S, Proetel U, Rinaldetti S, et al. Defining therapy goals for major molecular remission in chronic myeloid leukemia: results of the randomized CML Study IV. Leukemia 2018; 32:1222-8.
25. Hehlmann R, Muller MC, Lauseker M, Hanfstein B, Fabarius A, Schreiber A, et al. Deep molecular response is reached by the majority of patients treated with imatinib, predicts survival, and is achieved more quickly by optimized high-dose imatinib: results from the randomized CML-study IV. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology 2014; 32:415-23.
26. Goldberg SL, Chen L, Guerin A, Macalalad AR, Liu N, Kaminsky M, et al. Association between molecular monitoring and long-term outcomes in chronic myelogenous leukemia patients treated with first line imatinib. Current medical research and opinion 2013; 29:1075-82.
27. Cortes JE, Saglio G, Kantarjian HM, Baccarani M, Mayer J, Boque C, et al. Final 5-Year Study Results of DASISION: The Dasatinib Versus Imatinib Study in Treatment-Naive Chronic Myeloid Leukemia Patients Trial. Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology 2016; 34:2333-40.
28. Kalmanti L, Saussele S, Lauseker M, Müller MC, Dietz CT, Heinrich L, et al. Safety and efficacy of imatinib in CML over a period of 10 years: data from the randomized CML-study IV. Leukemia 2015; 29:1123-32.
29. Hughes TP, Leber B, Cervantes F, Spector N, Pasquini R, Clementino NCD, et al. Sustained deep molecular responses in patients switched to nilotinib due to persistent BCR-ABL1 on imatinib: final ENESTcmr randomized trial results. Leukemia 2017; 31:2529-31.
30. Okada M, Imagawa J, Tanaka H, Nakamae H, Hino M, Murai K, et al. Final 3-year Results of the Dasatinib Discontinuation Trial in Patients With Chronic Myeloid Leukemia Who Received Dasatinib as a Second-line Treatment. Clin Lymphoma Myeloma Leuk 2018; 18:353-360.e351.
31. O'Hare T, Eide CA and Deininger MW. Bcr-Abl kinase domain mutations, drug resistance, and the road to a cure for chronic myeloid leukemia. Blood 2007; 110:2242-9.
32. Soverini S, Hochhaus A, Nicolini FE, Gruber F, Lange T, Saglio G, et al. BCR-ABL kinase domain mutation analysis in chronic myeloid leukemia patients treated with tyrosine kinase inhibitors: recommendations from an expert panel on behalf of European LeukemiaNet. Blood 2011; 118:1208-15.
33. Saussele S, Richter J, Guilhot J, Gruber FX, Hjorth-Hansen H, Almeida A, et al. Discontinuation of tyrosine kinase inhibitor therapy in chronic myeloid leukaemia (EURO-SKI): a prespecified interim analysis of a prospective, multicentre, non-randomised, trial. The Lancet. Oncology 2018; 19:747-57.
34. Etienne G, Guilhot J, Rea D, Rigal-Huguet F, Nicolini F, Charbonnier A, et al. Long-Term Follow-Up of the French Stop Imatinib (STIM1) Study in Patients With Chronic Myeloid Leukemia. Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology 2017; 35:298-305.
35. Ross DM, Branford S, Seymour JF, Schwarer AP, Arthur C, Yeung DT, et al. Safety and efficacy of imatinib cessation for CML patients with stable undetectable minimal residual disease: results from the TWISTER study. Blood 2013; 122:515-22.
36. Rousselot P, Charbonnier A, Cony-Makhoul P, Agape P, Nicolini FE, Varet B, et al. Loss of major molecular response as a trigger for restarting tyrosine kinase inhibitor therapy in patients with chronic-phase chronic myelogenous leukemia who have stopped imatinib after durable undetectable disease. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology 2014; 32:424-30.
37. Takahashi N, Kyo T, Maeda Y, Sugihara T, Usuki K, Kawaguchi T, et al. Discontinuation of imatinib in Japanese patients with chronic myeloid leukemia. Haematologica 2012; 97:903-6.
38. Kantarjian HM, Hughes TP, Larson RA, Kim DW, Issaragrisil S, le Coutre P, et al. Long-term outcomes with frontline nilotinib versus imatinib in newly diagnosed chronic myeloid leukemia in chronic phase: ENESTnd 10-year analysis. Leukemia 2021; 35:440-53.
39. Hughes TP and Ross DM. Moving treatment-free remission into mainstream clinical practice in CML. Blood 2016; 128:17-23.
40. Rea D, Nicolini FE, Tulliez M, Guilhot F, Guilhot J, Guerci-Bresler A, et al. Discontinuation of dasatinib or nilotinib in chronic myeloid leukemia: interim analysis of the STOP 2G-TKI study. Blood 2017; 129:846-54.
41. Hochhaus A, Masszi T, Giles FJ, Radich JP, Ross DM, Gómez Casares MT, et al. Treatment-free remission following frontline nilotinib in patients with chronic myeloid leukemia in chronic phase: results from the ENESTfreedom study. Leukemia 2017; 31:1525-31.
42. Mahon FX, Boquimpani C, Kim DW, Benyamini N, Clementino NCD, Shuvaev V, et al. Treatment-Free Remission After Second-Line Nilotinib Treatment in Patients With Chronic Myeloid Leukemia in Chronic Phase: Results From a Single-Group, Phase 2, Open-Label Study. Ann Intern Med 2018; 168:461-70.
43. Imagawa J, Tanaka H, Okada M, Nakamae H, Hino M, Murai K, et al. Discontinuation of dasatinib in patients with chronic myeloid leukaemia who have maintained deep molecular response for longer than 1 year (DADI trial): a multicentre phase 2 trial. Lancet Haematol 2015; 2:e528-35.

44. Lee SE, Choi SY, Song HY, Kim SH, Choi MY, Park JS, et al. Imatinib withdrawal syndrome and longer duration of imatinib have a close association with a lower molecular relapse after treatment discontinuation: the KID study. Haematologica 2016; 101:717-23.
45. Kumagai T, Nakaseko C, Nishiwaki K, Yoshida C, Ohashi K, Takezako N, et al. Dasatinib cessation after deep molecular response exceeding 2 years and natural killer cell transition during dasatinib consolidation. Cancer science 2018; 109:182-92.
46. Ilander M, Olsson-Stromberg U, Schlums H, Guilhot J, Bruck O, Lahteenmaki H, et al. Increased proportion of mature NK cells is associated with successful imatinib discontinuation in chronic myeloid leukemia. Leukemia 2017; 31:1108-16.
47. Vigón L, Luna A, Galán M, Rodríguez-Mora S, Fuertes D, Mateos E, et al. Identification of Immunological Parameters as Predictive Biomarkers of Relapse in Patients with Chronic Myeloid Leukemia on Treatment-Free Remission. J Clin Med 2020; 10:42-63.
48. Caocci G, Martino B, Greco M, Abruzzese E, Trawinska MM, Lai S, et al. Killer immunoglobulin-like receptors can predict TKI treatment-free remission in chronic myeloid leukemia patients. Experimental hematology 2015; 43:1015-1018.e1011
49. Smirnikhina SA, Lavrov AV, Chelysheva EY, Adilgereeva EP, Shukhov OA, Turkina A, et al. Whole-exome sequencing reveals potential molecular predictors of relapse after discontinuation of the targeted therapy in chronic myeloid leukemia patients. Leuk Lymphoma 2016; 57:1669-76.
50. Zhang B, Nguyen LXT, Li L, Zhao D, Kumar B, Wu H, et al. Bone marrow niche trafficking of miR-126 controls the self-renewal of leukemia stem cells in chronic myelogenous leukemia. Nature medicine 2018; 24:450-62.

IMBRUVICA®

FOLYAMATOS KONTROLLT BIZTOSÍT AZ ELSŐVONALAS, NEM MUTÁLT IGHV GÉNNEL RENDELKEZŐ CLL-ES BETEGEKNEK:

5 éves PFS

67%[1]*

Kontrollálja a betegséget IMBRUVICA®-val

Rövidített alkalmazási előírás

IMBRUVICA® 140 mg kemény kapszula, IMBRUVICA® 140 mg, 280 mg, 420 mg, 560 mg filmtabletta

Bővebb információért olvassa el a gyógyszer Alkalmazási előírását! A hatályos Alkalmazási előírás teljes szövegét megtalálja az Országos Gyógyszerészeti és Élelmezés-egészségügyi Intézet (www.ogyei.gov.hu/gyogyszeradatbazis/) honlapján.

Az IMBRUVICA® kizárólag orvosi rendelvényhez kötött gyógyszer (Sz). Az IMBRUVICA® törzskönyvi számai: 140 mg kemény kapszula 90× kiszerelés: EU/1/14/945/001, 120× kiszerelés: EU/1/14/945/002; 140 mg filmtabletta, 28× kiszerelés: EU/1/14/945/007; 280 mg filmtabletta, 28× kiszerelés: EU/1/14/945/009; 420 mg filmtabletta, 28× kiszerelés: EU/1/14/945/011; 560 mg filmtabletta, 28× kiszerelés: EU/1/14/945/012. A forgalomba hozatali engedély jogosultja: Janssen-Cilag International NV, Belgium, képviselete: Janssen-Cilag Kft., H-Budapest, 1123 Nagyenyed u. 8-14. Tel.: +36 1 884 2858.

Az IMBRUVICA® a 9/1993. NM rendelet 7/b9, 7/b10 valamint 7/b12 indikációs pontjai alapján tételes beszerzés alá eső hatóanyagot tartalmazó készítmény, a felhasználásra jogosult intézmények számára a Nemzeti Egészségbiztosítási Alapkezelő központi közbeszerzés keretében szerzi be, illetve az egyes intézmények által felhasználható kvótákat ugyancsak a Nemzeti Egészségbiztosítási Alapkezelő osztja fel az intézmények között. Kiszerelésenként a bruttó fogyasztói ára: IMBRUVICA® 140 mg kemény kapszula 90×: 1 815 140 Ft; 120×: 2 490 829 Ft. IMBRUVICA® filmtabletta: 140 mg 28×: 565 427 Ft; 280 mg 28×: 1 129 813 Ft; 420 mg 28×: 1 694 200 Ft; 560 mg 28×: 2 258 587 Ft. Az esetleges árváltozásról kérjük, tájékozódjon a www.neak.gov.hu honlapról!

KI=konfidencia intervallum;
CLL=krónikus lymphocytás leukemia;
HR=kockázati arány;
PFS=progressziómentes túlélés

* Medián PFS-t nem érték el IMBRUVICA-val nem mutált vagy mutált IGHV génnel rendelkező betegek esetén sem (HR: 0,632; 95% KI: 0,262-1,525). Medián utánkövetési idő: 60 hónap.[1]

Az IMBRUVICA® monoterápiában a CLL elsővonalas kezelésében, illetve monoterápiában vagy rituximab+bendamusztin kombinációban olyan CLL-es betegek kezelésére javallott, akik már legalább egy korábbi terápiában részesültek. Az IMBRUVICA® monoterápiában relapszáló/refrakter MCL-es betegek számára javallott, illetve olyan WM-ben szenvedő betegeknek, akik már legalább egy korábbi terápiában részesültek, vagy kemo-immunoterápiára alkalmatlan, korábban nem kezelt WM betegek számára.[2]

1. Tedeschi A, et al. Five-year follow-up of patients receiving ibrutinib for first-line treatment of chronic lymphocytic leukaemia. Oral presentation at the 24th Annual Congress of the European Hematology Association (EHA); 13-16 June 2019; Amsterdam, Netherlands. EHA Library. Tedeschi A. Jun 14, 2019; 267308; S107

2. IMBRUVICA® alkalmazási előírás. Elérhető: www.ema.europa.eu

Az IMBRUVICA® fejlesztése a Pharmacyclics együttműködésével valósult meg. A forgalomba hozatali engedély tulajdonosa a Janssen-Cilag Kft; ennek az anyagnak a felelős kiadója a Janssen-Cilag Kft.

© Pharmacyclics 2019 © Janssen Pharmaceutica NV. 2019.

pharmacyclics® An AbbVie Company

Janssen Oncology

PHARMACEUTICAL COMPANIES OF Johnson&Johnson

CP-128835
2019.12.05.

imbruvica® (ibrutinib) tabletta

Megbízható tapasztalatok

A krónikus lymphocytás leukaemia genetikai háttere és személyre szabott terápiája

Genetic landscape and targeted therapy of chronic lymphocytic leukemia

Kotmayer Lili[1], **Balogh Alexandra**[2], **Gróf Stefánia**[1], **Gángó Ambrus**[1], **Bödör Csaba**[1]

[1] HCEMM-SE Molekuláris Onkohematológia Kutatócsoport, I. Sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet, Semmelweis Egyetem, Budapest

[2] Belgyógyászati és Onkológiai Klinika, Semmelweis Egyetem, Budapest

E-levél: kotmayer.lili@med.semmelweis-univ.hu

ÖSSZEFOGLALÁS A krónikus lymphocytás leukaemia (CLL) terápiája az onkohematológia dinamikus fejlődésének köszönhetően az elmúlt években jelentős változásokon ment keresztül. A citogenetikai és molekuláris genetikai vizsgálati módszerek fejlesztéseivel párhuzamosan számos olyan genetikai eltérést ismerhettünk meg, melyek fontos szerepet töltenek be a kórkép patogenezisében, valamint prognosztikai és prediktív markerként közvetlenül befolyásolják a CLL kórlefolyását és kezelését. A kedvezőtlen prognózissal társuló genetikai eltérések, mint a 17p kromoszómarégió deléciója, a *TP53* gén mutációi, valamint a mutációt nem hordozó *IGHV* gén rutinszerű vizsgálata összetett rizikóbesorolások megjelenését eredményezte CLL-ben, melyek a prognosztikai jelentőség mellett alapjaiban rajzolták át a kórkép terápiáját. Az általuk azonosítható magas rizikójú betegek számára a hagyományos kemoterápiás és kemoimmunoterápiás kezelések mellett napjainkban olyan célzott terápiás gyógyszerek váltak hozzáférhetővé, mint a BTK-gátló ibrutinib és a BCL2-inhibitor venetoclax, melyekkel a korábban kedvezőtlen prognózisú betegcsoportokban is átütő eredmények érhetők el. A genetikai defektusok azonosítására alkalmas vizsgálati módszerek mindemellett jelenleg már a terápiarezisztenciáért felelős mutációk detektálásában és monitorozásában is fontos szerepet töltenek be, így a CLL genetikai hátterének komplex feltérképezése a kórkép modern diagnosztikája és kezelése során egyaránt elengedhetetlen.

KULCSSZAVAK krónikus lymphocytás leukaemia, célzott terápia, prognosztikai markerek

SUMMARY Dynamic evolution of today's oncohematology has revolutionized the treatment of chronic lymphocytic leukemia (CLL). In line with the recent development of cytogenetic and molecular methods, several distinct genetic alterations were found to be associated with adverse disease prognosis with many of them directly affecting the therapeutic choices for CLL. Screening for genetic abnormalities conferring adverse prognosis, such as the deletion of chromosomal region 17p, *TP53* mutations and unmutated *IGHV* status led to the development of risk stratification models changing the fundamental principles of CLL therapy. Patients harboring adverse prognostic genetic alterations defined by these algorithms fail to respond to standard chemotherapeutic and chemoimmunotherapeutic regimes but novel targeted therapies such as the BTK inhibitor ibrutinib and BCL2 inhibitor venetoclax have achieved remarkable results in these high-risk patient groups. Besides of their important role in risk stratification models and therapeutic decisions, ultra-sensitive molecular methods can now also be used for monitoring the efficacy of targeted therapies as well as to timely detect the emergence of distinct gene mutations associated with therapy resistance in CLL. These cytogenetic and novel molecular methods contribute greatly to our understanding of CLL's genetic background and are now essential to the modern diagnostics and therapy of this disease.

KEY WORDS chronic lymphocytic leukemia, targeted therapy, prognostic markers

Az elmúlt évtizedben robbanásszerű fejlődés ment végbe a hematológiai malignitások genetikai hátterének megismerésében, amely a diagnosztikai, prognosztikai és terápiás eszköztár bővülését hozta magával. Kiemelten igaz ez a krónikus lymphocytás leukaemia (CLL) genetikai hátterének megismerésére, melyben bár egyes napjainkban is vizsgált citogenetikai eltérések progresszióra és túlélésre gyakorolt jelentősége már

Rövidítések

BCL2	*B-sejtes lymphoma 2 protein*
BCR	*B-sejt receptor*
BTK	*Bruton-féle tirozin-kináz*
CLL	*krónikus lymphocytás leukaemia*
ddPCR	*digitális droplet PCR*
ERIC	*European Research Initiative on CLL*
FC	*fludarabin-cyclophosphamid*
FDA	*Amerikai Élelmiszer és Gyógyszerügynökség*
FISH	*fluoreszcens in situ hibridizáció*
IGHV	*immunglobulin gén*
MLPA	*multiplex ligációfüggő szondaamplifikáció*
NGS	*újgenerációs szekvenálás*
RFC	*rituximab-fludarabin-cyclophosphamid*
R/R CLL	*relabáló/refrakter CLL*
SMH	*szomatikus hipermutáció*
TP53	*tumor protein 53*
VAF	*variáns allélfrekvencia*
WES	*teljes exomszekvenálás*
WGS	*teljes genomszekvenálás*

régóta ismert, az azonosított genetikai variánsok a terápiás döntéshozatalban egészen a közelmúltig nem játszottak fontos szerepet. Az elmúlt évek újgenerációs tanulmányainak köszönhetően azonban feltárult előttünk a CLL genomja és a változatos hatásmechanizmusú célzott gyógyszerek kifejlesztése napjainkban már a CLL-es betegcsoport jelentős részében lehetővé teszi a személyre szabott kezelés alkalmazását.[1-4] Összefoglaló közleményünkben röviden áttekintjük a CLL diagnosztikáját, a hagyományosan alkalmazható kemoimmunoterápiás modalitásokat, valamint részletesebben ismertetjük a prognosztikai és prediktív szempontból jelentős genetikai markereket és a CLL molekuláris célzott terápiájának fegyvertárát.

A CLL klinikai megjelenése és diagnosztikája

A CLL a leggyakrabban előforduló felnőttkori leukaemia a fejlett országokban, Magyarországon évente mintegy 300–500 új esetettel. A CLL az érett B-lymphocytákat érintő malignitás, melyben a korlátlan proliferációs képességüknek köszönhetően CD5 és CD19 sejtfelszíni markereket hordozó klonális B-sejtek szaporodnak fel a perifériás vérben, a csontvelőben és a nyirokszervekben. A kórkép jellemzően az idősebb korosztályt érinti, a betegek medián diagnóziskori életkora 72 év, amely kifejezett férfi dominanciával társul, és az esetek túlnyomó részében sporadikusan jelenik meg, családi halmozódást ritkán mutat.[5-7]

A CLL klinikai megjelenése nagyon változatos, a betegek jelentős részében a perifériás vérben mérhető lymphocytosistól eltekintve a betegség akár évekig tünetmentes maradhat, míg másoknál már a diagnózis időpontjában megfigyelhetők a szerteágazó klinikai tünetek. A klinikai manifesztációval járó esetekben az emelkedett fehérvérsejtszám mellett gyakori tünet a nyirokcsomó-megnagyobbodás, amely jellemzően már a kórkép kezdeti stádiumában jelen van, és amely több klinikai rizikóbecslő algoritmus részét képezi (Rai- és Binet-féle osztályozások).[7-9] A betegség progressziójával párhuzamosan lép- és májmegnagyobbodás, valamint a jellegzetes B-tünetek (láz, éjszakai verejtékezés, fogyás) is jelentkezhetnek. A nem megfelelően funkcionáló daganatos B-sejtek gátolják az immunrendszer egészséges működését, ezáltal a CLL-es betegeknél gyakoribbak az elhúzódó, gyakran atípusos fertőzések, valamint egyes autoimmun folyamatok is (autoimmun anaemia, thrombocytopenia), melyek sok esetben a betegség első alarmírozó tünetei lehetnek. Mindemellett a gyorsan osztódó tumorsejtek miatt az egészséges vérképzés kiszorulhat a csontvelőből, melynek következtében a betegség későbbi stádiumaiban több sejtvonalat érintő eltérések, leggyakrabban anaemia és thrombocytopenia alakulhat ki, tovább súlyosbítva a klinikai képet.

A heterogén klinikai megjelenés miatt a CLL diagnózisa a szakmai irányelvek alapján a perifériás vérben mérhető 5×10^9/l-t meghaladó keringő lymphocytaszám, valamint az áramlási citometriával igazolt klonalitás jelenlétén alapszik, a klinikai tünetek nem szerepelnek a diagnosztikus kritériumok között.[10, 11] A csontvelőmintából vagy nyirokcsomó-biopsziából végzett patológiai vizsgálatok segíthetik a diagnózist, ezért a rutin diagnosztikai panelben alkalmazott perifériás vérkenet és a perifériás vérből végzett áramlási citometriás mérések mellett egyes esetekben szintén az elvégzendő vizsgálatok közé tartoznak. A nyirokcsomóból származó core-biopszia a CLL mellett a kis lymphocytás lymphoma (SLL) differenciáldiagnózisa során is hasznos kiegészítő vizsgálatként szolgálhat, hiszen utóbbi entitás egyedül perifériás vér érintettségében tér el a CLL-től.[7] A laboratóriumi paraméterekben tapasztalható eltérések közül kiemelendő az LDH szérumszint-emelkedés, valamint a megnövekedett β2-mikroglobulin szérumszint, mely utóbbi paraméter a CLL-IPI rizikóbecslő algoritmusban is (CLL-IPI) vizsgálandó eltérés.[12] Az emelkedett szérum β2-mikroglobulin- és LDH-szint nem minden beteg esetében azonosítható eltérések, jelenlétük agresszívebb kórlefolyásra és kedvezőtlenebb prognózisra utal, ezért elsősorban a betegség előrehaladott stádiumaiban figyelhetők meg.

Kemoterápia és kemoimmunoterápia CLL-ben

A CLL szerteágazó klinikai megjelenését jól szemlélteti, hogy a betegek jelentős hányadában a kórkép indolens lefolyású és az esetek mintegy harmadában évekig nem igényel terápiát („watch and wait” stratégia), azonban a betegek egy további részének agresszív betegséggel kell szembenéznie. A gyors progresszióval és gyakori relapsusokkal társuló relabáló/refrakter CLL (R/R CLL), valamint az igen kedvezőtlen prognózisú Richter-transzformáció azonnali terápiás beavatkozást igényel, de egy éveken keresztül stabil betegség újonnan induló, lassú progressziója esetén is szükségessé válhat a betegség kezelése.[13] A kezelést igénylő esetekben az újonnan megjelenő markáns klinikai tünetek és

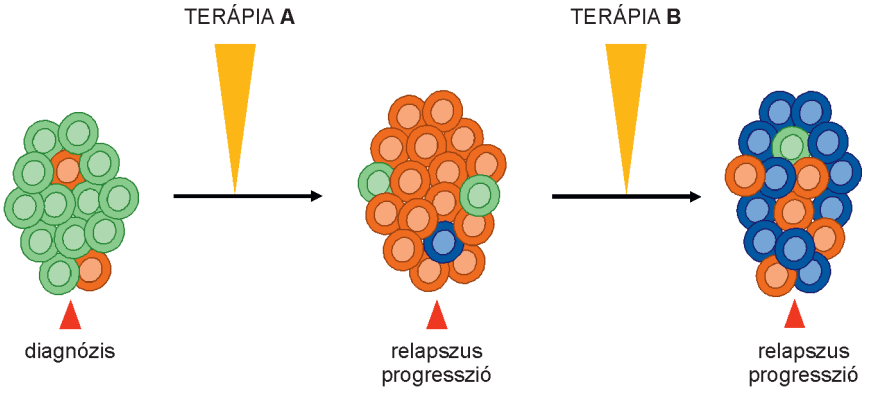
az állapotromlás jelentik a legfontosabb terápiás indikációt. A CLL korábban ismertetett klinikai manifesztációi közül a hematológiai eltérések (súlyos, csontvelő-infiltráció okozta anaemia, thrombocytopenia, szteroidrefrakter immuncytopenia) mellett a leggyakrabban a gyorsan növekedő nyirokcsomók, máj- és lépmegnagyobbodás, rapidan emelkedő lymphocytaszám, valamint a betegség aktivitására utaló B-tünetek indokolhatják a kezelés megkezdését, illetve korábban kezelésben részesülő beteg esetén a terápiaváltást.

A CLL terápiája során a jó állapotú, fiatal és kedvezőtlen genetikai eltérést nem hordozó betegek esetében a kemo-, illetve kemoimmunoterápiás szerek szerepelnek elsővonalban választandó modalitásként. A kórkép első szisztémás kezelését az 1950-es években bevezetett alkiláló ágensek (chlorambucil, cyclophosphamid) és a szteroidok jelentették, melyek antimetabolitokkal (fludarabin) együtt, kombinált terápiaként alkalmazva kerültek be a terápiás protokollokba. A számos hatóanyag és kombináció közül a fludarabin–cyclophosphamid (FC) kombinált terápia a két szer szinergista hatásának köszönhetően olyannyira felülmúlta a korábban elérhető kemoterápiák hatékonyságát, hogy az FC kombináció napjainkban is a CLL kemoterápiájának alapját képezi.[14]

A következő áttörést az immunterápia megjelenése jelentette a CLL kezelése során. Az anti-CD20 monoklonális antitest rituximab és a korábban is alkalmazott FC kombinációja (RFC) a teljes túlélés tekintetében meghaladta az FC kombináció hatékonyságát, valamint alkalmazásával elsőként elérhetővé vált a tartós teljes remisszió is.[15] A rituximab, amely az első B-lymphocyták CD20 sejtfelszíni markere ellen kifejlesztett humanizált antitest, direkt és immunmediált módon is akadályozza a CD20 antigént expresszáló sejtek túlélését, nagyban hozzájárulva ezzel az RFC erős daganatellenes hatásához, melynek köszönhetően a kombináció 2009 óta a fiatal, jó állapotú CLL-es betegek elsővonalbeli kezelési módjává vált.

A jelenleg is alkalmazott RFC mellett az elmúlt időszakban további kemo- és immunterápiás szerek (bendamustin, alemtuzumab) jelentek meg a CLL kezelésében, alternatívát nyújtva ezzel az agresszívebb RFC kombinációt rosszul toleráló betegcsoportok számára. Mindemellett a rituximab sikerét követően napjainkban már másod- és harmadvonalbeli anti-CD20 antitestek (ofatumumab, obinutuzumab) is elérhetővé váltak, melyek kedvezőbb mellékhatásprofiljuknak és nagyobb specificitásuknak köszönhetően jelentősen hozzájárulnak a rosszabb állapotú, úgynevezett „slow-go” betegek redukált intenzitású kemoimmunoterápiájának sikeréhez.[16]

Bár a CLL-ben alkalmazott kemoimmunoterápia a betegek többségénél hatékony kezelési módot jelent, az esetek egy kis hányadában az adekvát terápia ellenére is progresszió figyelhető meg, melynek pontos mechanizmusát a CLL genetikai hátterének feltérképezésével ismerhettük meg. A kemoterápiás szerek által a tumorsejt-populációra gyakorolt pozitív szelekciós hatás a rátermettebb, túlélést elősegítő genetikai eltéréseket hordozó sejtek számára szelekciós előnyt jelent, melyek ennek köszönhetően dominánssá válnak és kemorezisztens betegség kialakulásához vezetnek *(1. ábra)*.[17] A terápia indukálta klonális evolúció és a hatására létrejövő terápiarezisztencia sokáig kedvezőtlen prognózissal társult, azonban a későbbiekben ismerte-



1. ábra: A terápia indukálta klonális evolúció folyamata CLL-ben. A különböző kemoimmunoterápiás kezelési vonalak által kifejtett pozitív szelekciós nyomás hatására a kiindulási tumorsejtpopulációban kis arányban jelen lévő, szubklonális genetikai eltéréseket hordozó CLL-es sejtek aránya a szelekciós előnynek köszönhetően megnő. A szubklón expanzióját követően a CLL az eredetitől eltérő genetikai profillal jellemezhető. [Kotmayer Lili, Rektori pályázat (2019) alapján módosítva]

tett molekuláris célzott terápiák megjelenése átütő eredményeket hozott ezen korábban nehezen kezelhető esetekben is.

Prognosztikai és prediktív markerek CLL-ben

Citogenetikai eltérések

A CLL patogenezisében fontos szerepet betöltő citogenetikai eltérések prognosztikai jelentősége a célzott terápiák térnyerésének köszönhetően egyre inkább előtérbe kerül. A citogenetikai vizsgálati módszerekkel, kariotipizálással és fluoreszcens *in situ* hibridizációval (FISH) azonosítható aberrációk, melyek az összes megbetegedés mintegy 80%-ában detektálhatók, a klinikai paraméterek mellett szintén fontos információt szolgáltatnak a CLL várható kórlefolyásáról. *Döhner és mtsai* 2000-ben egy olyan prognosztikai modellt írtak le, melyben a betegek az egyes citogenetikai eltérések hordozása alapján egymástól jól elkülönülő prognosztikai alcsoportokba sorolhatók.[13] Az általuk definiált betegcsoportokban a progresszió és a teljes túlélés időtartama négy független citogenetikai eltérés jelenlétével mutat szoros összefüggést, melyek a 11q, 13q és 17p kromoszómarégiók deléciója, valamint a 12-es kromoszóma triszómiája.

A citogenetikai prognosztikus markerek közül egyedüliként a 13q deléció bizonyult a léziót nem hordozó normál kariotípusnál kedvezőbb eltérésnek, míg a 12-es kromoszóma triszómiája intermedier prognózist jelent. Az algoritmus alapján a 11q és 17p régiók vesztései társulnak a legrövidebb teljes túléléssel, mivel az ezen a kromoszómakarokon elhelyezkedő *BIRC3*, *ATM* és *TP53* tumorszupresszor gének deléciói az apoptózis elmaradásához és a tumorsejtek fokozott túléléséhez vezetnek.[3] A kedvezőtlen prognózisú eltérések közül jelentőségét tekintve kiemelendő a 17p kromoszómarégió deléciója, amely a *TP53* diszfunkciók csoportjába tartozik, és amely a gyors progresszió mellett a terápia indukálta klonális evolúció miatt rövid időn belül kemorezisztens CLL kialakulásához vezet.

Az egyes citogenetikai léziók prognosztikai jelentősége mellett az eltérések együttes előfordulása is független prognosztikai marker CLL-ben, a 3 vagy több citogenetikai abnormalitás jelenléte kedvezőtlen prognózissal társul. Az úgynevezett komplex kariotípus esetén a teljes túlélés időtartamát a FISH-sel azonosított eltérések száma is befolyásolja, így a több lézió hordozása rövidebb túléléshez és gyors progresszióhoz vezet.[18] Bár a komplex kariotípus független kedvezőtlen prognosztikai marker, vizsgálata jelenleg nem része a rutin diagnosztikai paneleknek, mivel a FISH próbákkal egyszerre csak limitált számú eltérés detektálható, azonban a CLL kutatásában elterjedt a vizsgálata.

A CLL genetikai hátterének feltérképezésével a citogenetikai léziók mellett számos további molekuláris eltérést ismerhettünk meg, melyek hordozása szintén módosítja a betegség prognózisát és amelyek szintén hozzájárulnak a CLL-ben megfigyelhető rendkívül heterogén klinikai lefolyás létrejöttéhez. Ezeket a genetikai eltéréseket a napjainkban alkalmazott integrált prognosztikai modell foglalja magába és a továbbiakban részletesen is bemutatásra kerülnek.[19]

IGHV mutációs státusz

A kórlefolyást befolyásoló és prediktáló faktorok közül kiemelendő az immunglobulin gén (*IGHV*) mutációs státusza, amely az egyik legfontosabb prognosztikai marker. A B-sejtek érési folyamatának utolsó lépéseként az *IGHV* gén nukleotidsorrendje a follikulusok csíracentrumában lejátszódó szomatikus hipermutáció (SMH) során számos ponton megváltozik, módosítva ezzel a keletkező fehérje térszerkezetét. A fiziológiásan is végbemenő SMH-nak köszönhetően a módosult IGHV lehetővé teszi a specifikusabb antigénfelismerést, valamint nagyságrendekkel növeli a felismert antigének számát.[20]

CLL-ben a többi érett B-sejtes malignitástól eltérően a folyamat az esetek mintegy 50%-ában nem megy végbe és az *IGHV* gén szekvenciája a CLL-es tumorsejtekben megegyezik a csíravonalbeli DNS nukleotidsorrendjével. Amennyiben az *IGHV* az SMH elmaradása miatt minimum 98%-os csíravonali homológiát mutat, mutációt nem hordozó IGHV-ról (unmutated IGHV, IGHV-U) beszélünk, amely polireaktív B-sejt-receptor és túlaktivált jelátviteli útvonal létrejöttéhez vezet, fokozva ezzel a CLL sejtek proliferációs készségét. 97% alatti csíravonali homológia mutált IGHV-t (IGHV-M) jelent, melynek hordozása a kedvezőtlen prognózisú IGHV-U jelenlététől eltérően a kedvezőbb kórlefolyású csoportba sorolja a betegeket. A 97–98% közötti átmeneti zóna az úgynevezett borderline IGHV (IGHV-B), amely intermedier prognózissal társul.[20]

Az eltérő IGHV mutációs státuszok a kórlefolyás módosítása mellett közvetlenül is befolyásolják a terápiás döntéseket. Az IGHV-M gént hordozó betegek kitűnően reagálnak a korábban ismertetett kemoimmunoterápiás rezsimekre, melyekkel ebben a beteg-

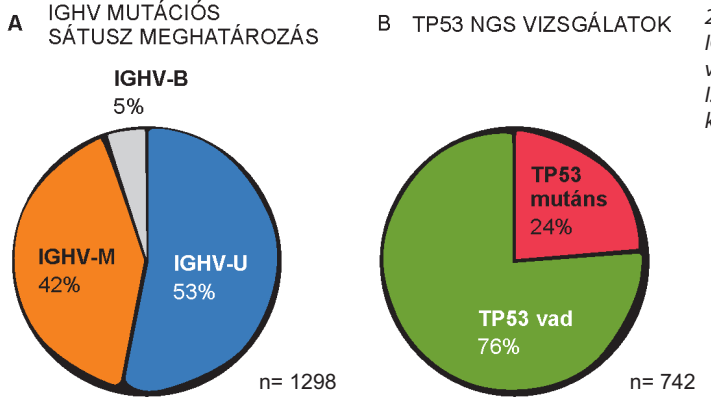
populációban akár mérhető reziduális betegség (measurable residual disease, MRD) nélküli remisszió is elérhető.[21, 22] Ezzel szemben a kedvezőtlen prognózisú IGHV-U betegcsoportban gyakori az R/R CLL előfordulása, amely a hagyományos kezelési modalitások mellett rövidebb teljes túlélést eredményez. Az IGHV-U betegek számára napjainkban már elérhető célzott terápia, mely az elmúlt években alapjaiban rajzolta át a kedvezőtlen prognózisú betegcsoportok kezelését és amelyet a későbbiekben részletesen is bemutatunk.

Mivel az IGHV mutációs státusz közvetlenül befolyásolhatja a terápiás döntéseket, meghatározása jelenleg már a CLL modern kezelésének elengedhetetlen része. A monoklonális csíravonali homológia a betegség lefolyása alatt állandó, mértéke nem változik, ezért a mutációs státuszt a terápia során a „European Research Initiative on CLL" (ERIC) nemzetközi ajánlásainak megfelelően elegendő egyszer meghatározni.[20] Intézetünkben az *IGHV* mutációs státusz meghatározása 2017 óta elérhető, melynek köszönhetően az elmúlt 4 évben 28 magyarországi onkohematológiai centrumból származó összesen 1298 beteg mintáján végeztük el a vizsgálatot. A nemzetközi viszonylatban is jelentős mintaszám 53%-ában IGHV-U, 42%-ában IGHV-M immunglobulint azonosítottunk, az esetek fennmaradó részében pedig az IGHV-B alcsoportba tartozó szekvenciát detektáltuk Sanger-szekvenálással, az ERIC nemzetközi ajánlásnak megfelelően *(2A ábra)*.

A CLL molekuláris háttere

A citogenetikai léziók és az IGHV mutációs státusz mellett olyan molekuláris eltérések is ismertek, melyek CLL-ben további prognosztikai és prediktív markerekként alkalmazhatók. Az elmúlt évtizedben a teljes genom- és exomszekvenálást (whole genome sequencing, WGS és whole exome sequencing, WES) alkalmazó tanulmányoknak köszönhetően megismerhettük a CLL genetikai hátterét, melynek kompexitása elmarad a szolid tumorokban és más hematológiai entitásokban tapasztaltaktól.[1, 3, 4, 23] A leggyakoribb betegség-asszociált visszatérő mutációk CLL-ben a *NOTCH1*, *ATM*, *SF3B1*, valamint a *TP53* géneket érintő eltérések.[3, 23] Ezen driver mutációk közül a legkorábban azonosított genetikai léziók a *NOTCH1* gén mutációi voltak, melyek az esetek mintegy 10%-ában detektálhatók.[4] A *NOTCH1* egy transzkripciós faktort kódol, amely a sejtproliferáció jelátviteli útvonalának szabályozásáért felelős. A gén 34-es exonját érintő frameshift mutációk megakadályozzák a keletkező fehérje ubiquitinmediált degradációját, amely a *NOTCH1* intracelluláris felhalmozódásához vezet.[24] A *NOTCH1* eltérései kedvezőtlen prognózissal társulnak, valamint egyes specifikus IGHV alcsoportokhoz hasonlóan (subset CLL#8 IGHV) fokozzák a Richter-transzformációra való hajlamot.[24-26]

A *TP53* gén mutációi a legtöbb szolid és hematológiai malignitáshoz hasonlóan CLL-ben is előfordulnak, hordozásuk igen kedvezőtlen prognózissal társul. A „genom őrzőjének" is nevezett *TP53* kiemelt szerepet játszik a DNS-károsodás által indukált apoptózis létrehozásában és szabályozásában, ezáltal az egyik legfontosabb tumorszupresszorunk. A gént érintő defektusok gátolják az átíródó fehérje normális működését, amely DNS-károsodás esetén a sejtciklus felfüggesztésének elmaradásához vezet. A *TP53*-defektusok két csoportra oszthatók, melyek közül a gén lókuszát tartalmazó 17p kromoszómarégió delécióját a citogenetikai eltérések között már ismertettük. A *TP53*-diszfunkciók másik csoportját a gént érintő mutációk alkotják, melyek közül leggyakrabban aminosavcserével járó missense mutációk fordulnak elő, de frameshift, nonsense, valamint splice site mutációk is ismertek, melyek a gén valamennyi exonját érinthetik.[27-29]



2 ábra: A hazai CLL-es betegpopuláció mintáin végzett IGHV mutációs státusz meghatározások (A) és TP53 NGS vizsgálatok (B) száma a Semmelweis Egyetem I. Sz. Patológiai és Rákkutató Intézetben, 2017–2021 között.

CLL-ben a *TP53*-diszfunkciók erős prediktív faktorok, melyek vizsgálata a közvetlen terápiás relevancia miatt elengedhetetlen. Mivel a DNS-károsodásra adott válasz károsodik, a *TP53*-defektust hordozó betegek igen kedvezőtlenül reagálnak a konvencionális kemoimmunoterápiákra. Mindemellett a kemoterápia indukálta szelekciós nyomás hatására a *TP53*-defektust hordozó szubklónok szelekciós előnyhöz jutnak és ezáltal a kemorefrakter CLL sejtek aránya jelentősen megnő, amely korábban igen kedvezőtlen prognózist jelentett.[23] A *TP53*-defektust hordozó betegek terápiája az ismertetett mechanizmusok miatt sokáig nagy kihívást jelentett, azonban a *TP53*-független célzott terápiák megjelenése ezekben az esetekben is hatalmas áttörést hozott.[30] A CLL-ben előforduló klonális és szubklonális *TP53* mutációk vizsgálatára ezen közvetlen terápiás jelentőség miatt kiemelten szükség van, detektálásukhoz jelenleg a nemzetközi ERIC ajánlásának megfelelően már hazánkban is az érzékeny újgenerációs szekvenálást (NGS) alkalmazzuk, mellyel a gén teljes kódoló régiójában előforduló eltérések azonosíthatók.[31, 32] A *TP53*-at érintő mutációk NGS-vizsgálata jelenleg már az összes hazai CLL-es beteg számára elérhető. 2018-tól kezdve az ERIC nemzetközi ajánlásnak megfelelően NGS alkalmazásával végezzük a diagnosztikus méréseket a gén valamennyi exonjának célzott szekvenálásával, folyamatosan növekvő mintaszámmal. A cikk írásának időpontjában összesen 742 beteg esetében végeztük el a TP53 szekvenálást, melyből az esetek 23,3%-ában azonosítottunk patogén variánst *(2B ábra)*. Mivel a kemoterápia hatására a TP53 defektust hordozó klónok aránya változik, a gén NGS-vizsgálatát valamennyi kezelési vonal előtt érdemes újból elvégezni.

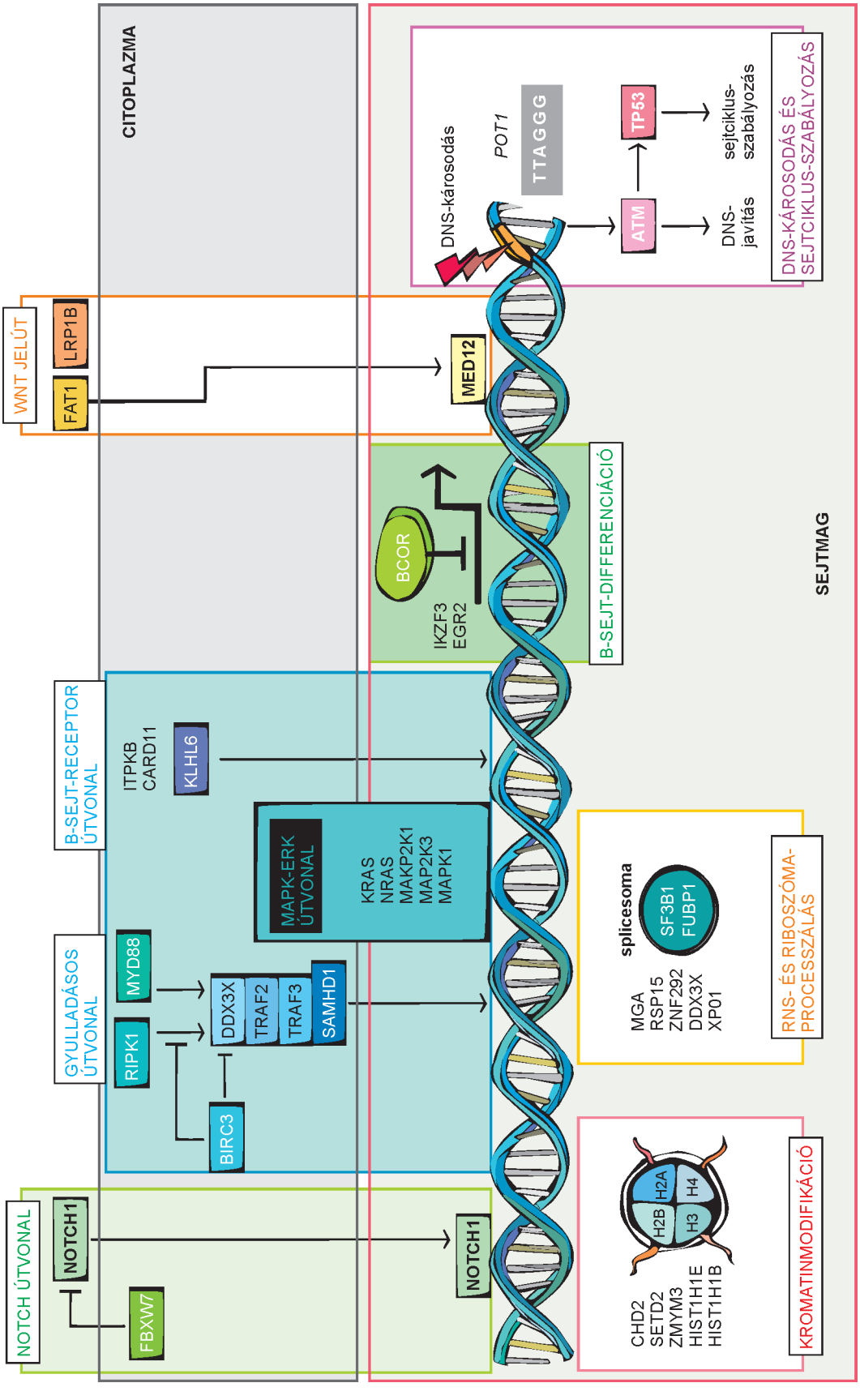
A *NOTCH1* és *TP53* mutációk mellett CLL-ben a különböző jelátviteli útvonal tagjainak mutációi is gyakori driver eltéréseknek számítanak, melyek közül klinikai relevancia és gyakoriság alapján kiemelendők a *MYD88* és *BIRC3* géneket érintő eltérések. Mindkét gén az NF-κB jelátviteli útvonal regulálásában játszik szerepet. A *MYD88* által kódolt transzkripciós faktor funkcionyerő mutációi, melyek kizárólag IGHV-M esetekben fordulnak elő, ligandkötés nélkül is folyamatos aktivációs szignált közvetítenek a downstream NF-κB jelátvitel tagjai felé, amely konstitutív NF-κB aktivitáshoz vezet.[3] A *BIRC3* mutációk a jelátvitel negatív regulátoraként működő BIRC3 fehérje funkcióját károsítják, amely ezáltal szintén fokozott NF-κB működést eredményez.[4, 23]

Az ismertetett gének eltérései a CLL legfontosabb visszatérő driver mutációi, azonban érdekes módon még ezen leggyakrabban azonosítható léziók gyakorisága sem haladja meg a 15%-ot a teljes CLL-es betegpopulációban.[3, 4, 23] A heterogén genetikai háttér vizsgálatát célzó WES és WGS tanulmányok számos további, a CLL patogenezisében résztvevő gén és jelátviteli útvonal érintettségét írták le, melyek közül kiemelendők az *SF3B1*, DDX3X és *XPO1* gének mutációi, amelyek a spliceoszóma-működés és az RNS-processzálás fontos regulátorai.[4, 23] A CLL-ben érintett intracelluláris jelátviteli útvonalakat és a résztvevő géneket a *3. ábra* szemlélteti.

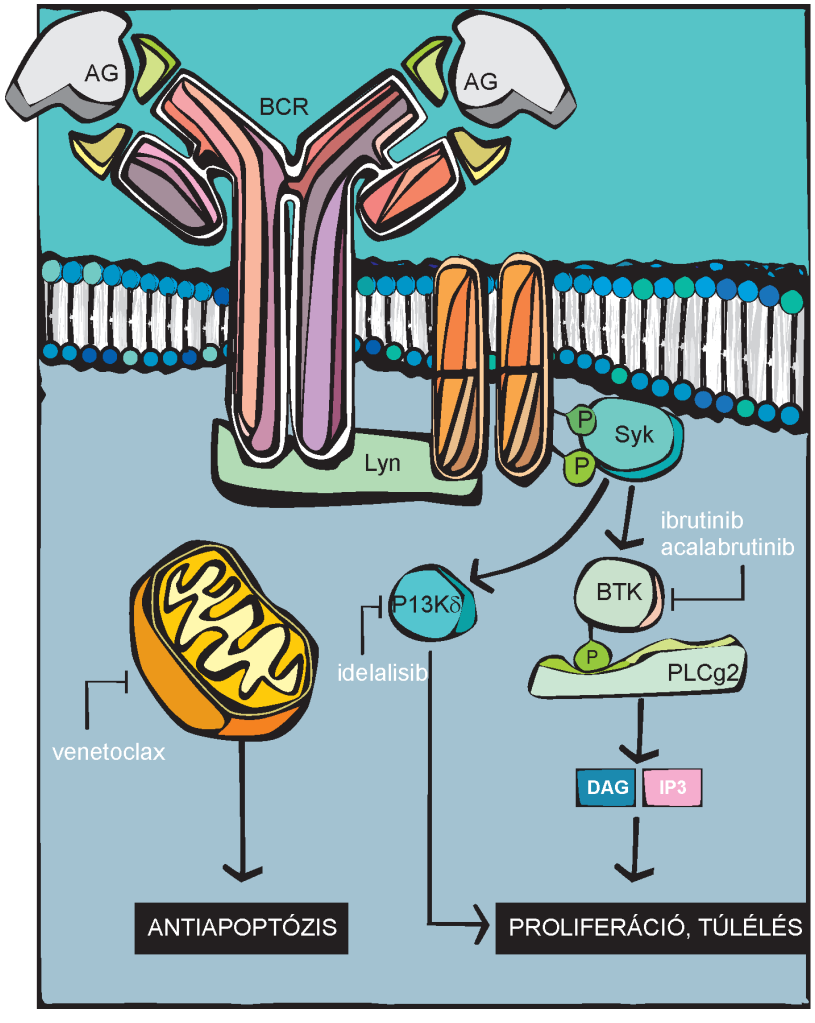
Bár az újonnan leírt nagyszámú mutáció CLL patogenezisében betöltött szerepe sok gén esetében ismert, klinikai jelentőségük sok esetben továbbra sem teljesen feltérképezett. Ennek ellenére napjainkban egyre több gén mutációs státusza kerül be a CLL-ben hagyományosan alkalmazott prognosztikai és prediktív faktorok közé, melyek közül számos eltérés már közvetlen terápiás relevanciával rendelkezik.[19, 33, 34] Ezen mutációk vizsgálata különösen a célzott terápiák megjelenésének köszönhetően a molekuláris patológia egyik fontos területévé vált, hiszen a kedvezőtlen prognózisú eltérések detektálásával azonosítható az a magas rizikójú betegcsoport, akik a legtöbbet profitálnak a CLL-ben elérhető új, célzott terápiák alkalmazásából.

Célzott terápiás lehetőségek CLL-ben

A CLL genetikai hátterének megismerése az új, célzott terápiák fejlesztésében is hatalmas áttörést hozott, melynek köszönhetően a korábban csak prognosztikai és prediktív jelentőségű citogenetikai eltérések vizsgálata napjainkban már közvetlen klinikai relevanciával is rendelkezik. Az adekvát terápiaválasztáshoz jelenleg már elengedhetetlen egyes molekuláris eltérések vizsgálata, hiszen a korábban ismertetett mutációk hordozása a citogenetikai léziók jelenlététől függetlenül a CLL-ben alkalmazható célzott terápiás gyógyszerek indikációit képezi. A CLL kezelésében elérhető kis molekulasúlyú gátlószerek között hatásmechanizmusuk alapján két nagy csoportot különíthetünk el, melyek a B-sejt-receptor (BCR) jelátviteli útvonal gátlószerei (Bruton-féle tirozin-kináz-inhibitorok, foszfatidilinozitol-3-kináz-δ-inhibitorok, Syk-inhibitorok), valamint az antiapoptotikus B-sejtes lymphoma 2 (BCL2) fehérje inhibitorai. Ezen készítmények, melyek forradalmasították a korábban nehezen kezelhető, kemorefrakter R/R CLL terápiáját, a magas rizikójú genetikai eltérés típusától függetlenül rendkívül hatásosnak bizonyultak a kedvezőtlen prognózisú betegcsoportokban és a ko-



3. ábra: A teljes genom- és exomszekvenálással végzett tanulmányok során azonosított visszatérő mutációt hordozó gének CLL-ben. Az ábrán a kórképben leggyakrabban érintett gének funkcióik és intracelluláris lokalizációjuknak megfelelően csoportosítva láthatók. [Marosvári és mtsai. Hematológia–Transzfuziológia (2016) alapján módosítva]



4. ábra: A CLL kezelésében jelenleg alkalmazott célzott terápiás készítmények és molekuláris célpontjaik. A B-sejt receptor (BCR) jelátviteli útvonalon ható szerek közül kiemelendő az irreverzibilis BTK-gátló ibrutinib, valamint a PI3Kδ-inhibitor idelalisib, amely az ibrutinibrezisztenciát mutató betegek esetében fontos terápiás alternatívát jelenthet a közeljövőben. A venetoclax az antiapoptotikus BCL2 gátlószereként a BCR útvonaltól független hatásmechanizmussal fokozza a CLL-es sejtek apoptózisát. AG: antigén; BCR: B-sejt-receptor

rábban ismertetett terápia indukálta klonális evolúció leküzdésében. A CLL terápiájában jelenleg elérhető célzott terápiás készítményeket és azok molekuláris célpontjait a *4. ábra* szemlélteti.

BTK-inhibitorok

A BCR jelátviteli útvonal tagjai közül kiemelendő a Bruton-féle tirozin-kináz (BTK), amely fontos szerepet tölt be mind a B-sejt-érés folyamatában, mind az antigénstimulációra adott proliferációs válasz koordinálásában és melynek CLL sejtekben mérhető magas expressziója ideális gyógyszercélponttá teszi a fehérjét. Mindennek köszönhetően az első sikeres célzott terápiát CLL-ben a BTK-inhibitor ibrutinib jelentette, amely hazánkban már 2014 óta elérhető.[35-37] Az ibrutinib mellett a közelmúltban egy új BCR jelátviteli útvonalon ható szer is engedélyeztetésre került: a BTK-inhibitor acalabrutinibet az Amerikai Élelmiszer és Gyógyszerügynökség (U.S. Food and Drug Administration, FDA) után 2020 júliusában az Európai Gyógyszerügynökség (European Medicines Agency, EMA) is törzskönyvezte R/R CLL kezelésében.[38, 39]

Az ibrutinib kovalens kötéssel kapcsolódik a BTK fehérje aktív centrumában elhelyezkedő 481-es ciszteinhez (C481), melynek következtében irreverzibilisen gátolja az enzim foszforilációját és ezáltal a további downstream jelátvitelt.[17] A BTK-gátlás következményeképpen a mintegy túlélési szignálként funkcionáló BCR jelátviteli út blokkolódik, amely apoptózist indukál a gátolt sejtekben. A direkt hatás mellett az ibrutinibterápiának számos további, „off-target” következménye ismert, így például a gyógyszer hatására a CLL-es sejtek migrációs és adhéziós képessége is szignifikánsan csökken.[40, 41] Az ibrutinib közvetett módon gátolja továbbá a PI3K/PKB és NF-κB útvonalakat is, melyek következtében a MAPK kaszkád aktivitása csökken, tovább gátolva ezzel a CLL-es sejtek aktiváció-

1. táblázat: A CLL diagnosztikája során vizsgált független prognosztikai markerek és az egyes eltérések vizsgálatának indikációi [Kotmayer Lili, Rektori pályázat (2019) alapján módosítva]

GENETIKAI LÉZIÓ	JELENTŐSÉG	MÓDSZER	VIZSGÁLAT ELVÉGZÉSÉNEK INDIKÁCIÓJA
IGHV mutációs státusz	mutált IGHV: jó prognózis	Sanger-szekvenálás	első kezelési vonal előtt/ progresszió esetén
TP53 pontmutációk	kedvezőtlen prognózis	NGS	első kezelési vonal előtt/ progresszió esetén
del(11)q	kedvezőtlen prognózis	FISH	minden kezelési vonal előtt
del(13q)	jó prognózis	FISH	minden kezelési vonal előtt
del(17p)	kedvezőtlen prognózis	FISH	minden kezelési vonal előtt
+12	intermedier prognózis	FISH	minden kezelési vonal előtt
komplex kariotípus	kedvezőtlen prognózis	G-sávos kariotipizálás/MLPA	klinikai tanulmányokban

+12: 12-es kromoszóma triszómiája; del: deléció; FISH: fluoreszcens in situ hibridizáció; IGHV: immunglobulin nehéz lánc variáblilis régió gén; MLPA: multiplex ligációfüggő szondaamplifikáció; NGS: új generációs szekvenálás; *TP53*: tumorszuppresszor protein 53 gén

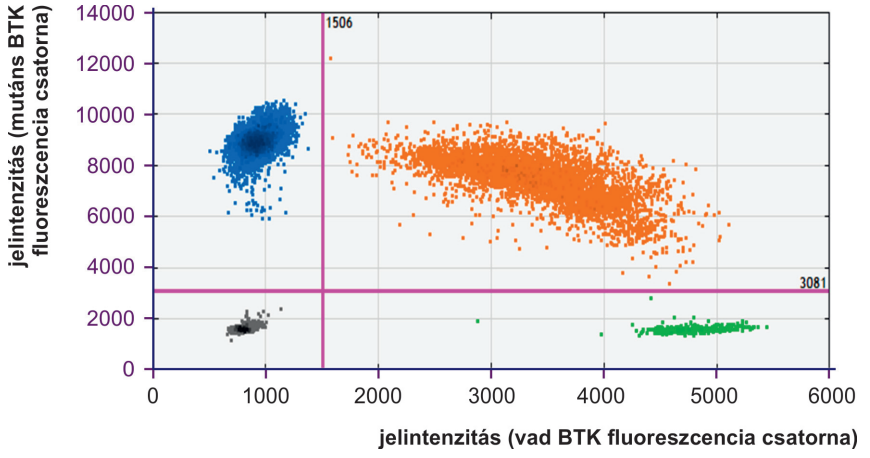
ját és proliferációs készségét *in vitro* és *in vivo* egyaránt.[42, 43] A CLL sejtekre gyakorolt közvetlen hatása mellett az ibrutinib azok mikrokörnyezetében, valamint az immunsejteken indukált válaszreakciókkal is hozzájárul a CLL-es sejtszám csökkenéséhez.[44] Érdekes jelenség az ibrutinibterápia első hónapjaiban a perifériás vérben észlelhető átmeneti lymphocytosis, amely a lymphocyták „homing" folyamatában részt vevő kemokinek felszabadulásának gátlása miatt jön létre.[44]

Az orálisan adagolható ibrutinib a korábban nem látott eredményeknek és a kedvező mellékhatásprofilnak köszönhetően forradalmasította a kedvezőtlen prognózisú genetikai eltéréseket hordozó, R/R CLL terápiáját, azonban a látványos sikerek ellenére a betegek egy részénél rezisztencia alakul ki. Az ibrutinibrezisztencia hátterében rendszerint a *BTK* és az attól downstream elhelyezkedő *PLCG2* gének eltérései azonosíthatók, melyek a BCR jelátviteli útvonal reaktivációjához vezetnek.[45, 46] A BTK mutáció közül kiemelendők a C481-es kodon báziscseréi, melyek között a leggyakoribb C481S aminosavcserén kívül a C481R, C481F, C481Y és C481T mutációk is előfordulnak, amelyek mind az ibrutinib és a BTK közötti kovalens kötés létrejöttét akadályozzák. Az aktív centrumon kívül eső mutációk az ibrutinib BTK iránti affinitását csökkentik, melyek indirekt módon szintén rezisztencia kialakulását eredményezik.[37, 45]

Bár a rezisztens esetek száma lassan növekszik, jelenleg már az ibrutinib mellett progrediáló CLL-es betegek számára is van elérhető terápia. A második generációs irreverzibilis BTK-inhibitor acalabrutinib, amely az ibrutinibnél aktívabb és szelektívebb BTK-gátlást tesz lehetővé, szintén az aktív centrumban elhelyezkedő C481 aminosavhoz kötődik, ezért az ibrutinib terápiát követő rezisztencia kezelésére nem alkalmas, azonban egyes új fejlesztésű nonkovalens BTK-inhibitorokkal ígéretes eredményeket értek el ibrutinibrezisztens CLL kezelésében.[47] A rezisztencia leküzdésére további lehetséges megoldást jelenthet a jelátviteli útvonalban a BTK-tól downstream elhelyezkedő enzimek gátlása, amely a Lyn és Syk inhibitoraival (dasatinib, fostamatinib, cerdulatinib) együtt a PLCG2 BTK-független aktiválását is akadályozza.[47] A számos potenciális target és gátlószer ellenére a BCR jelátviteli úton ható célzott terápiák helyett a klinikai gyakorlatban az ibrutinibrezisztens esetek kezelésére egy eltérő hatásmechanizmusú készítmény, a venetoclax terjedt el, amely az apoptózis facilitálásával segíti a CLL-es sejtek eliminációját.

BCL2-gátlás

Az apoptózis alapvető élettani jelenségként a szükségtelen sejtek eliminációját szolgáló folyamat, amely azonban a daganatos megbetegedésekben igen gyakran károsodást szenved, melynek következtében a hibás genetikai információt hordozó tumorsejtek kontrollálatlan proliferációba kezdenek.[48] Az anti- és pro-apoptotikus szingálok érzékeny intracelluláris egyensúlyának fenntartói a kaszpázok, melyek az apoptózis szabályozó kaszkádjaként a halálreceptorok (extrinsic út) és a celluláris stress (intrinsic út) által közvetített szignálok hatására is aktiválódhatnak. Mindkét útvonalban fontos szerepet játszanak a BCL2 fehérjecsalád



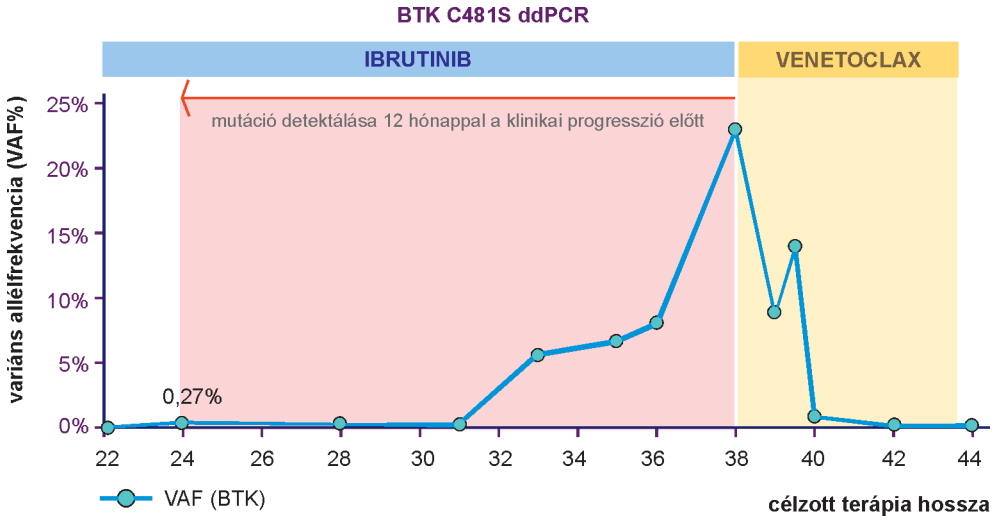
5. ábra: Az ábrán a digitális droplet PCR (ddPCR) kiértékelést követő eredményei láthatók, „dot plot" megjelenítésben. Az x tengelyen a vad típusú BTK génhez tartozó fluoreszcens jel intenzitása, az y tengelyen pedig a BTK C481S mutációhoz rendelt fluoreszcens jelintenzitás ábrázolódik. A csak vad BTK-t tartalmazó dropleteket zöld, a mutáns BTK-t tartalmazó dropleteket kék színnel jelöltük. A két csoport arányából meghatározható a mutáció variáns allélfrekvenciája, melyből következtethetünk az eltérést hordozó sejtek arányára a vizsgálati mintában.

tagjai, melyek a mitokondrium külső membrán integritásának szabályozását végzik. A fehérjecsalád legfontosabb tagja az antiapoptotikus BLC2, amely CLL-ben gyakran overexpressziót mutat és amely onkogenikus hatását az apoptotikus útvonal gátlásán keresztül fejti ki.[49] A BCL2 a fehérjecsalád proapoptotikus effektor tagjai, a BAX és BAK fehérjék homo-oligomerizációját gátolva felfüggeszti azok külső mitokondriális membrán perforáló hatását. Az effektor fehérjék mellett a BCL2 az úgynevezett „csak BH3 homológ" doménnel rendelkező fehérjéket is gátolja, melyek a BAX/BAK aktivációjáért és az antiapoptotikus proteinek direkt gátlásáért felelősek. A BCL2 a további antiapoptotikus fehérjékkel (BCL-XL, MCL-1, BCL-W) együtt a proapoptotikus fehérjék szekvesztrációjával gátolják azok apoptózist kiváltó hatásait, melynek következtében a BCL2 overexpressziót mutató tumorsejtek érzéketlenné válnak az őket érő apoptotikus szignálokra.[13, 49]

A CLL-es sejtekben kóros overexpressziót mutató BCL2 gátlása az apoptózis folyamatának helyreállításával a leukaemiás sejtek számának gyors csökkenését idézi elő, melynek köszönhetően a BCL2-inhibitor venetoclax rövid időn belül az R/R CLL kezelésének ígéretes lehetőségévé vált. Az FDA által 2019 nyarán törzskönyvezett venetoclax a BCL2 szelektív gátlószere, amely a BH3-mimetkumok csoportjába tartozik.[50, 51] A BH3-mimetikumok az antiapoptotikus fehérjék, így a BCL2 hidrofób, BH3 domént kötő árkához kapcsolódva gátolja azok proapoptotikus fehérjékre gyakorolt szekvesztráló hatását. Az apoptózis indukciója mellett a venetoclaxnak több, a BCL2-gátlástól független off-target hatása is ismert, melyek közül kiemelendő a mitokondriális oxidatív foszforiláció (OXPHOS) és a citrátkör gátlása, amely metabolikus újraprogramozás hátterében az integrált stresszválasz, valamint egyes transzkripciós faktorok szerepe igazolódott.[52]

A venetoclax a szerteágazó proapoptotikus hatásainak, valamint kedvező mellékhatásprofiljának köszönhetően az ibrutinibhez hasonlóan nagy előrelépést jelentett az R/R CLL betegcsoport terápiájában. A BCL2-inhibitor venetoclax 2019 óta már hazánkban is elérhető, R/R CLL-ben rituximabbal, elsővonalbeli terápiaként obinutuzumabbal való kombinációban.[53, 54] A venetoclax terápia előnye a kemoterapeutikumok nélkül is elérhető MRD-negativitás, amely megteremti a fix időtartamú terápia lehetőségét, és melynek monitorozásához szükséges laboratóriumi háttér, az NGS és áramlási citometriai vizsgálatok Intézetünkben rendelkezésünkre állnak.

A kedvezőtlen prognosztikai eltérések jelenlététől függetlenül alkalmazható szer a korábban ismertetett ibrutinibrezisztens esetek terápiája mellett első választandó célzott terápiaként is elérhető, azonban a venetoclax bevezetése óta eltelt rövid idő alatt egyes betegeknél már megfigyelhető a gyógyszerrel szembeni rezisztencia.[55] Bár a pontos mechanizmus a venetoclaxrezisztens esetek kis száma miatt még nem teljesen feltérképezett, a folyamat hátterében gyakran azonosíthatók a *BCL2* mutációi, melyek közül gyakoriság szempontjából kiemelendők a fehérje 101-es glicin aminosavának valinra történő cseréjével járó pontmutációk.[56] A további, *BCL2* gént érintő báziscserék mellett ritkán a



6. ábra: Az ábrán a BTK C481S mutáció variáns allélfrekvenciájának (VAF) változása látható ibrutinib- és venetoclaxterápia mellett egy beteg követéses mintáiban. Az x tengelyen a célzott terápia hossza látható, hónapokban kifejezve. Az y tengelyen az egyes időpontokból származó mintákban mért BTK C481S VAF-értékeket ábrázoltuk. A mintákban a BTK mutáció már 12 hónappal a klinikai progressziót megelőzően detektálható volt. A betegnél a klinikai progresszió miatt venetoclax-kezelésre tértek át, melynek hatására a BTK C481S mutáció VAF-értéke drasztikusan lecsökkent.

proapoptotikus BCL-XL overexpressziója is detektálható, amely a szintén ritkán előforduló MCL-1 amplifikációkkal együtt a gátolt *BCL2*-t megkerülve vezetnek az apoptózis felfüggesztéséhez.[57, 58]

A CLL molekuláris genetikai hátterének korszerű vizsgálata

A CLL genetikai hátterének vizsgálata, amely a betegség modern diagnosztikája és a betegkövetés során is nagy jelentőséggel bír, a molekuláris vizsgálati módszerek dinamikus fejlődésének köszönhetően az elmúlt években jelentős változásokon ment keresztül. Az alkalmazott módszerek szenzitivitásának növekedésével a korábban is vizsgált prognosztikai markerek mellett jelenleg már a célzott terápiákkal szembeni rezisztenciamutációk is nagy érzékenységgel detektálhatók, segítve ezzel a kezelések hatékonyságának monitorozását.

Bár a kutatásban elterjedt WES és WGS jelentős mértékben hozzájárult a CLL genetikai hátterének megismeréséhez, alkalmazásuk elsősorban magas költségük és időigényük miatt még nem került be a mindennapi diagnosztikai algoritmusokba. További érdekes és a genetikai háttér vizsgálata során egyre nagyobb teret nyerő eljárás a multiplex ligációfüggő szondaamplifikáció (MLPA), amely a CLL-ben előforduló kiegyensúlyozatlan kópiaszám-eltérések detektálására alkalmas módszer. Az MLPA a WES és WGS vizsgálatokhoz hasonlóan elsősorban a kutatásban terjedt el, ahol a komplex kariotípus meghatározására használható. A CLL diagnosztikájában történő alkalmazását elsősorban az eredmények bizonytalan interpretációja akadályozza, azonban az egyre több kópiaszám-eltérés klinikai relevanciájának megismerésével a módszer feltehetőleg a kutatás mellett a diagnosztikában is egyre jobban előtérbe kerül majd.[59]

A nehézségek ellenére a molekuláris patológia számos módszert átemelt a kutatási területről a rutin diagnosztikába, így például a CLL-ben prognosztikai jelentőséggel bíró citogenetikai eltérések vizsgálatára során hagyományosan alkalmazott FISH és az IGHV mutációs státusz meghatározása során használt Sanger-szekvenálás mellett a legújabb ajánlások alapján a *TP53* gén mutációinak azonosítására jelenleg már NGS eljárásokat (célzott szekvenálás) alkalmazunk.[32] Az NGS-sel történő vizsgálat a *TP53* mutációk detektálása során kiemelt jelentőségű, hiszen a korábban Sanger-szekvenálással végzett vizsgálatok során a szubklonális *TP53*-eltérések nem kerültek felismerésre, pedig a nagyszámú betegmintán végzett tanulmányok alapján a kis variáns allélfrekvenciával (VAF) azonosítható mutációk a klonális eltérésekkel egyenértékűek, hordozásuk kedvezőtlen prediktív marker.[23]

Az NGS alkalmazása mellett a CLL vizsgálata során hazánkban is egyre inkább előtérbe kerül a digitális droplet PCR (ddPCR) használata, mellyel a kórképben előforduló rezisztenciamutációk vizsgálhatók.

A ddPCR kiértékelését követő dot plot-ot az *5. ábra* szemlélteti. ddPCR alkalmazásával a korábban ismertetett célzott terápiás gyógyszerekkel szembeni rezisztencia hátterében álló mutációk akár 0,001%-os szenzitivitással detektálhatók, amely lehetővé teszi az ibrutinib/venetoclax rezisztens CLL szubklónok azonosítását akár több hónappal a klinikai progressziót megelőzően. Mindemellett a mutációk VAF-jának monitorozásával a kezelés hatékonysága és a terápiaváltás hatására bekövetkező változások is nyomon követhetők *(6. ábra)*.

Intézetünkben a rezisztenciamutációk vizsgálatát jelenleg ddPCR alkalmazásával végezzük, melynek köszönhetően a nagyszámú vizsgált betegminta közül eddig összesen 40 esetben azonosítottuk az ibrutinibrezisztenciához vezető *BTK* C481S mutációt. Bár a mutáció detektálása esetén a perifériás vérből izolált mintákban a nemzetközi és hazai adatok alapján nem indokolt az ibrutinibterápia felfüggesztése, az eltérés megjelenése felhívhatja a figyelmet egy esetlegesen bekövetkező relapszus létrejöttére, amely szükségessé teheti a betegek gyakori utánkövetését. Bár a mutáció rendszeres monitorozására jelenleg még nincs nemzetközileg elfogadott ajánlás, a kutatócsoportunk előzetes adatai alapján az eltérést hordozó betegek közel 80%-ában várható a manifeszt ibrutinibrezisztencia klinikai megjelenése. A venetoclaxrezisztens esetek túlnyomó részéért felelős *BCL2* G101V aminosavcserét eddig egy esetben, a második leggyakoribb *BCL2* D103Y cserét pedig további 4 beteg esetében azonosítottuk, ami a venetoclaxrezisztens betegek kis száma miatt nemzetközileg is figyelemreméltó eredménynek mondható.

A CLL-ben prognosztikai és prediktív biomarkerek, valamint a célzott terápiák hatékonyságának monitorozására alkalmas eltérések vizsgálata több molekuláris módszer egyidejű alkalmazásával lehetséges. Intézetünkben, amely a cikk írásakor az egyetlen ERIC által akkreditált laboratórium hazánkban, jelenleg már valamennyi bemutatott vizsgálat rendelkezésünkre áll, mellyel a hazai CLL-es betegek jelentős részének modern, szakszerű ellátása biztosítható.

A vizsgálatok rövid ismertetéséből az is jól látható, hogy a CLL modern diagnosztikája a hagyományos vizsgálati modalitások mellett napjainkban már a nagy áteresztőképességű és szenzitív molekuláris genetikai módszerek alkalmazására épül, melyek segítségével nem csak a közvetlen klinikai relevanciával bíró prognosztikai és prediktív markerek detektálhatók, hanem a célzott terápiák hatékonysága is megbízhatóan monitorozható. Mindez a folyamatos gyógyszerfejlesztésekkel és az új célzott terápiákkal együtt alapjaiban rajzolta át a korábban nehezen kezelhető R/R CLL betegek terápiáját, melynek köszönhetően ezen betegcsoport számára olyan kezelési lehetőségek váltak széleskörben elérhetővé, melyek minden eddiginél hosszabb túlélést és jobb életminőséget eredményeznek.

Irodalom

1. Landau DA, Carter SL, Stojanov P, McKenna A, Stevenson K, Lawrence MS, et al. Evolution and impact of subclonal mutations in chronic lymphocytic leukemia. Cell 2013; 152:714-26.
2. Landau DA, Tausch E, Taylor-Weiner AN, Stewart C, Reiter JG, Bahlo J, et al. Mutations driving CLL and their evolution in progression and relapse. Nature 2015; 526:525-30.
3. Puente XS, Pinyol M, Quesada V, Conde L, Ordonez GR, Villamor N, et al. Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. Nature 2011; 475:101-5.
4. Wang L, Lawrence MS, Wan Y, Stojanov P, Sougnez C, Stevenson K, et al. SF3B1 and other novel cancer genes in chronic lymphocytic leukemia. The New England journal of medicine 2011; 365:2497-506.
5. Hallek M, Shanafelt TD and Eichhorst B. Chronic lymphocytic leukaemia. Lancet 2018; 391:1524-37.
6. Matolcsy A, Udvardy M, Kopper L. Hematológiai betegségek atlasza. In: (editors). Budapest, Medicina Könyvkiadó Rt., 2006.
7. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, et al. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. In: (editors). Lyon, International Agency for Research on Cancer, 2017; 587
8. Rai KR, Sawitsky A, Cronkite EP, Chanana AD, Levy RN and Pasternack BS. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. Blood 1975; 46:219-34.
9. Binet JL, Auquier A, Dighiero G, Chastang C, Piguet H, Goasguen J, et al. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. Cancer 1981; 48:198-206.
10. Hallek M. Chronic lymphocytic leukemia: 2015 Update on diagnosis, risk stratification, and treatment. Am J Hematol 2015; 90:446-60.
11. Eichhorst B, Robak T, Montserrat E, Ghia P, Hillmen P, Hallek M, et al. Chronic lymphocytic leukaemia: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. Ann Oncol 2015; 26 Suppl 5:v78-84.
12. International CLLIPIwg. An international prognostic index for patients with chronic lymphocytic leukaemia (CLL-IPI): a meta-analysis of individual patient data. Lancet Oncol 2016; 17:779-90.
13. Dohner H, Stilgenbauer S, Benner A, Leupolt E, Krober A, Bullinger L, et al. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. N Engl J Med 2000; 343:1910-6.
14. Eichhorst BF, Busch R, Hopfinger G, Pasold R, Hensel M, Steinbrecher C, et al. Fludarabine plus cyclo-

phosphamide versus fludarabine alone in first-line therapy of younger patients with chronic lymphocytic leukemia. Blood 2006; 107:885-91.

15. Hallek M. Chronic lymphocytic leukemia: 2020 update on diagnosis, risk stratification and treatment. Am J Hematol 2019; 94:1266-87.
16. Robak T, Robak E. New anti-CD20 monoclonal antibodies for the treatment of B-cell lymphoid malignancies. BioDrugs 2011; 25:13-25.
17. Malcikova J, Stano-Kozubik K, Tichy B, Kantorova B, Pavlova S, Tom N, et al. Detailed analysis of therapy-driven clonal evolution of TP53 mutations in chronic lymphocytic leukemia. Leukemia 2015; 29:877-85.
18. Baliakas P, Jeromin S, Iskas M, Puiggros A, Plevova K, Nguyen-Khac F, et al. Cytogenetic complexity in chronic lymphocytic leukemia: definitions, associations, and clinical impact. Blood 2019; 133:1205-16.
19. Rossi D, Rasi S, Spina V, Bruscaggin A, Monti S, Ciardullo C, et al. Integrated mutational and cytogenetic analysis identifies new prognostic subgroups in chronic lymphocytic leukemia. Blood 2013; 121:1403-12.
20. Rosenquist R, Ghia P, Hadzidimitriou A, Sutton LA, Agathangelidis A, Baliakas P, et al. Immunoglobulin gene sequence analysis in chronic lymphocytic leukemia: updated ERIC recommendations. Leukemia 2017; 31:1477-81.
21. Condoluci A, Rossi D. Genetic mutations in chronic lymphocytic leukemia: impact on clinical treatment. Expert Rev Hematol 2019; 12:89-98.
22. Takács F, Kardos I, Czeti Á, Aczél D, Illés S, Balogh A, et al. [The role of minimal residual disease in chronic lymphocytic leukemia]. Hematológia-Transzfuziológia 2020; 53:17-22.
23. Nadeu F, Delgado J, Royo C, Baumann T, Stankovic T, Pinyol M, et al. Clinical impact of clonal and subclonal TP53, SF3B1, BIRC3, NOTCH1, and ATM mutations in chronic lymphocytic leukemia. Blood 2016; 127:2122-30.
24. Fabbri G, Rasi S, Rossi D, Trifonov V, Khiabanian H, Ma J, et al. Analysis of the chronic lymphocytic leukemia coding genome: role of NOTCH1 mutational activation. J Exp Med 2011; 208:1389-401
25. Rossi D, Rasi S, Fabbri G, Spina V, Fangazio M, Forconi F, et al. Mutations of NOTCH1 are an independent predictor of survival in chronic lymphocytic leukemia. Blood 2012; 119:521-9.
26. Stilgenbauer S, Schnaiter A, Paschka P, Zenz T, Rossi M, Dohner K, et al. Gene mutations and treatment outcome in chronic lymphocytic leukemia: results from the CLL8 trial. Blood 2014; 123:3247-54.
27. Leroy B, Ballinger ML, Baran-Marszak F, Bond GL, Braithwaite A, Concin N, et al. Recommended Guidelines for Validation, Quality Control, and Reporting of TP53 Variants in Clinical Practice. Cancer Res 2017; 77:1250-60.
28. Blagosklonny MV. p53 from complexity to simplicity: mutant p53 stabilization, gain-of-function, and dominant-negative effect. FASEB J 2000; 14:1901-7.
29. Muller PA and Vousden KH. p53 mutations in cancer. Nat Cell Biol 2013; 15:2-8.
30. Campo E, Cymbalista F, Ghia P, Jager U, Pospisilova S, Rosenquist R, et al. TP53 aberrations in chronic lymphocytic leukemia: an overview of the clinical implications of improved diagnostics. Haematologica 2018; 103:1956-68.
31. Pospisilova S, Gonzalez D, Malcikova J, Trbusek M, Rossi D, Kater AP, et al. ERIC recommendations on TP53 mutation analysis in chronic lymphocytic leukemia. Leukemia 2012; 26:1458-61.
32. Malcikova J, Tausch E, Rossi D, Sutton LA, Soussi T, Zenz T, et al. ERIC recommendations for TP53 mutation analysis in chronic lymphocytic leukemia-update on methodological approaches and results interpretation. Leukemia 2018; 32:1070-80.
33. Mansouri L, Cahill N, Gunnarsson R, Smedby KE, Tjonnfjord E, Hjalgrim H, et al. NOTCH1 and SF3B1 mutations can be added to the hierarchical prognostic classification in chronic lymphocytic leukemia. Leukemia 2013; 27:512-4.
34. Schnaiter A, Paschka P, Rossi M, Zenz T, Buhler A, Winkler D, et al. NOTCH1, SF3B1, and TP53 mutations in fludarabine-refractory CLL patients treated with alemtuzumab: results from the CLL2H trial of the GCLLSG. Blood 2013; 122:1266-70.
35. Pan Z, Scheerens H, Li SJ, Schultz BE, Sprengeler PA, Burrill LC, et al. Discovery of selective irreversible inhibitors for Bruton's tyrosine kinase. ChemMedChem 2007; 2:58-61.
36. Maddocks K, Jones JA. Bruton tyrosine kinase inhibition in chronic lymphocytic leukemia. Semin Oncol 2016; 43:251-9.
37. Aczél D, Mátrai Z, Kiss R, Balogh A, lllés S, Bodor C, et al. [Ibrutinib resistance in chronic lymphocytic leukemia]. Hematológia-Transzfuziológia 2019; 52:136-48.
38. Sharman JP, Egyed M, Jurczak W, Skarbnik A, Pagel JM, Flinn IW, et al. Acalabrutinib with or without obinutuzumab versus chlorambucil and obinutuzmab for treatment-naive chronic lymphocytic leukaemia (ELEVATE TN): a randomised, controlled, phase 3 trial. Lancet 2020; 395:1278-91.
39. Ghia P, Pluta A, Wach M, Lysak D, Kozak T, Simkovic M, et al. ASCEND: Phase III, Randomized Trial of Acalabrutinib Versus Idelalisib Plus Rituximab or Bendamustine Plus Rituximab in Relapsed or Refractory Chronic Lymphocytic Leukemia. J Clin Oncol 2020; 38:2849-61.
40. Cheng S, Ma J, Guo A, Lu P, Leonard JP, Coleman M, et al. BTK inhibition targets in vivo CLL proliferation through its effects on B-cell receptor signaling activity. Leukemia 2014; 28:649-57.
41. Seiler T, Dreyling M. Bruton's tyrosine kinase inhibitors in B-cell lymphoma: current experience and future perspectives. Expert Opin Investig Drugs 2017; 26:909-15.
42. Herman SE, Gordon AL, Hertlein E, Ramanunni A, Zhang X, Jaglowski S, et al. Bruton tyrosine kinase represents a promising therapeutic target for treatment of chronic lymphocytic leukemia and is effectively targeted by PCI-32765. Blood 2011; 117:6287-96.
43. Herman SE, Mustafa RZ, Gyamfi JA, Pittaluga S, Chang S, Chang B, et al. Ibrutinib inhibits BCR and NF-kappaB signaling and reduces tumor proliferation in tissue-resident cells of patients with CLL. Blood 2014; 123:3286-95.
44. Niemann CU, Herman SE, Maric I, Gomez-Rodriguez J, Biancotto A, Chang BY, et al. Disruption of in vivo

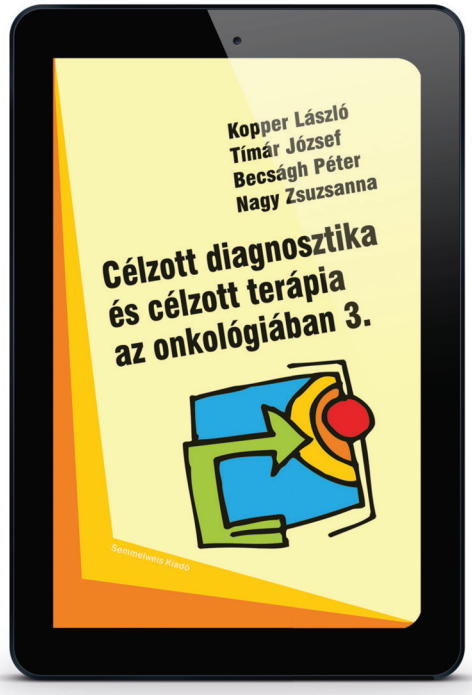
Chronic Lymphocytic Leukemia Tumor-Microenvironment Interactions by Ibrutinib—Findings from an Investigator-Initiated Phase II Study. Clin Cancer Res 2016; 22:1572-82.

45. Woyach JA, Furman RR, Liu TM, Ozer HG, Zapatka M, Ruppert AS, et al. Resistance mechanisms for the Bruton's tyrosine kinase inhibitor ibrutinib. N Engl J Med 2014; 370:2286-94.
46. Liu TM, Woyach JA, Zhong Y, Lozanski A, Lozanski G, Dong S, et al. Hypermorphic mutation of phospholipase C, gamma2 acquired in ibrutinib-resistant CLL confers BTK independency upon B-cell receptor activation. Blood 2015; 126:61-8.
47. Liu L, Shi B, Wang X, Xiang H. Strategies to overcome resistance mutations of Bruton's tyrosine kinase inhibitor ibrutinib. Future Med Chem 2018; 10:343-56.
48. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. Cell 2011; 144:646-74.
49. Lampson BL, Davids MS. The Development and Current Use of BCL-2 Inhibitors for the Treatment of Chronic Lymphocytic Leukemia. Curr Hematol Malig Rep 2017; 12:11-9.
50. Fischer K, Al-Sawaf O, Bahlo J, Fink AM, Tandon M, Dixon M, et al. Venetoclax and Obinutuzumab in Patients with CLL and Coexisting Conditions. N Engl J Med 2019; 380:2225-36.
51. Yalniz FF and Wierda WG. Targeting BCL2 in Chronic Lymphocytic Leukemia and Other Hematologic Malignancies. Drugs 2019; 79:1287-304.
52. Roca-Portoles A, Rodriguez-Blanco G, Sumpton D, Cloix C, Mullin M, Mackay GM, et al. Venetoclax causes metabolic reprogramming independent of BCL-2 inhibition. Cell Death Dis 2020; 11:616.
53. Seymour JF, Kipps TJ, Eichhorst B, Hillmen P, D'Rozario J, Assouline S, et al. Venetoclax-Rituximab in Relapsed or Refractory Chronic Lymphocytic Leukemia. N Engl J Med 2018; 378:1107-20.
54. Al-Sawaf O, Zhang C, Tandon M, Sinha A, Fink AM, Robrecht S, et al. Venetoclax plus obinutuzumab versus chlorambucil plus obinutuzumab for previously untreated chronic lymphocytic leukaemia (CLL14): follow-up results from a multicentre, open-label, randomised, phase 3 trial. Lancet Oncol 2020; 21:1188-200.
55. Stilgenbauer S, Eichhorst B, Schetelig J, Hillmen P, Seymour JF, Coutre S, et al. Venetoclax for Patients With Chronic Lymphocytic Leukemia With 17p Deletion: Results From the Full Population of a Phase II Pivotal Trial. J Clin Oncol 2018; 36:1973-80.
56. Blombery P, Anderson MA, Gong JN, Thijssen R, Birkinshaw RW, Thompson ER, et al. Acquisition of the Recurrent Gly101Val Mutation in BCL2 Confers Resistance to Venetoclax in Patients with Progressive Chronic Lymphocytic Leukemia. Cancer Discov 2019; 9:342-53.
57. Lucas F, Larkin K, Gregory CT, Orwick S, Doong TJ, Lozanski A, et al. Novel BCL2 mutations in venetoclax-resistant, ibrutinib-resistant CLL patients with BTK/PLCG2 mutations. Blood 2020; 135:2192-5.
58. Blombery P. Mechanisms of intrinsic and acquired resistance to venetoclax in B-cell lymphoproliferative disease. Leuk Lymphoma 2020; 61:257-262
59. Kiss R, Papp G, Krizsán S, Kotmayer L, Gángó A, Nagy N, et al. [Screening for genomic copy number alterations in chronic lymphocytic leukemia using multiplex ligation-dependent probe amplification]. Hematológia-Transzfuziológia 2018; 51:31-40.

SEMMELWEIS KIADÓ SZAK- ÉS TANKÖNYVEI

Közegészségtan

Könyveink megvásárolhatók a Legendus Könyvesboltban, illetve a Líra Kereskedelmi hálózaton belül az egész országban, de egyre nagyobb igényt elégít ki webshopunk.



Becságh Péter, Kopper László, Nagy Zsuzsanna, Tímár József

CÉLZOTT DIAGNOSZTIKA ÉS CÉLZOTT TERÁPIA AZ ONKOLÓGIÁBAN 3.

A daganatos betegségek még mindig köztünk vannak, és az elsőszámú közellenségek közé számítanak. Reményeink szerint a molekuláris változások minél jobb ismerete olyan terápiához fog vezetni, amely nemcsak az élet tartamát hosszabbítja meg, hanem a minőségét is emeli.

A harmadik kiadást megélt szakkönyv szerkezetében hasonlít az elődeihez, megismertet a daganatos sejtek hibás szabályozásával (mint célpontokkal) és az onkológiai „piac” résztvevőivel, régebbiekkel és újabbakkal, sőt a vizsgálat alatt állókkal is (amelyekkel a célpontokat próbáljuk minél eredményesebben eltalálni).

Az elmúlt néhány évben számos tapasztalatot szereztünk, amelyek nemegyszer stratégiai változtatást eredményeztek, gondoljunk a rezisztencia problémájára vagy a több génes panelek, a teljes genom vizsgálatának térhódítására. Ezek is elnyerik megérdemelt helyüket.

E-könyv ára: 2500 Ft

Könyvek E-könyvek Folyóiratok Apropó Poszter Box

Semmelweis Kiadó
1089 Budapest, Nagyvárad tér 4.
www.semmelweiskiado.hu

LEGENDUS KÖNYVESBOLT
1089 Budapest, Nagyvárad tér 4.
Tel.: 210-4408, 459-1500/56353
Nyitva tartás: H–Sz: 9.00–16.00,
Cs: 9.00–18.00, P: 9.00–14.00
E-mail: info@semmelweiskiado.hu

MYLOTARG™
(gemtuzumab ozogamicin) POR, OLDATOS INFÚZIÓHOZ VALÓ KONCENTRÁTUMHOZ

MYLOTARG

ERŐSÍTÉS AZ AML KEZELÉSÉBEN

MYLOTARG HOZZÁADÁSÁVAL HOSSZABB REMISSZIÓ ÉRHETŐ EL AZ ÖNMAGÁBAN ALKALMAZOTT STANDARD KEMOTERÁPIÁHOZ KÉPEST[1]

Terápiás javallat:

A MYLOTARG daunorubicinnel (DNR) és a citarabinnal (AraC) végzett kombinációs kezeléshez javasolt azon 15 év feletti betegeknél, akiket korábban nem kezeltek de novo CD33-pozitív akut myeloid leukemiával (AML), kivéve az akut promyelocytás leukemiát (APL)[1] (lásd az Alkalmazási előírás 4.4 és 5.1 pontja).

A MYLOTARG szignifikánsan meghosszabbította az eseménymentes túlélést (EFS) és a relapszusmentes túlélést* (RFS) a korábban nem kezelt de novo AML-ben szenvedő betegeknél, a daunorubicinnel és citarabinnal végzett standard kombinációs kemoterápiás kezeléshez képest.[1]

*Az RFS másodlagos végpont volt. Az ALFA-0701 vizsgálatban csak az EFS és az RFS hozott szignifikáns eredményt.

Hivatkozás:

1. MYLOTARG Alkalmazási előírás, 2020. november 27.

Bővebb információért olvassa el a gyógyszer alkalmazási előírását, amely az alábbi linken hozzáférhető: https://www.ema.europa.eu/documents/product-information/mylotarg-epar-product-information_hu.pdf
A szöveg ellenőrzésének dátuma: 2020. november 27.
Ár és támogatási információk: A készítmény jelenleg nem támogatott. Az aktuálisan érvényes árért kérjük, keresse fel az Nemzeti Egészségbiztosítási Alapkezelő honlapját (www.neak.gov.hu).

Kiadhatóság: (I): rendelőintézeti járóbeteg-szakellátást vagy fekvőbeteg-szakellátást nyújtó szolgáltatók által biztosított körülmények között alkalmazható gyógyszer.

MYLOTARG: 5 mg por, oldatos infúzióhoz való koncentrátumhoz
Hatóanyag: 5 mg gemtuzumab ozogamicin.
Forgalombahozatali engedélyszám: EU/1/18/1277/001

▽ Ez a gyógyszer fokozott felügyelet alatt áll, mely lehetővé teszi az új gyógyszerbiztonsági információk gyors azonosítását. Az egészségügyi szakembereket arra kérjük, hogy jelentsenek bármilyen feltételezett mellékhatást.

Pfizer Gyógyszerkereskedelmi Kft.
1123 Budapest, Alkotás u. 53. MOM Park "A" épület | Tel.: 06-1-488-3700 | www.pfizer.hu

PP-MYL-HUN-0007 | Lezárás dátuma: 2021. február 12.

Pfizer

Az akut myeloid leukaemia korszerű molekuláris diagnosztikája és célzott kezelése

Recent advances in molecular diagnostics and targeted therapy of acute myeloid leukemia

Krizsán Szilvia[1], Hegyi Lajos[1], Masszi Tamás[2], Bödör Csaba[1]

[1] HCEMM-SE Molekuláris Onkohematológia Kutatócsoport, I. Sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet, Semmelweis Egyetem, Budapest

[2] Belgyógyászati és Hematológiai Klinika, Semmelweis Egyetem, Budapest

E-levél: krizsan.szilvia@med.semmelweis-univ.hu

ÖSSZEFOGLALÁS Az akut myeloid leukaemia (AML) a nyugati világban a második leggyakrabban előforduló leukaemia típus, melyre a heveny kórlefolyás jellemző. Míg az elmúlt évtizedekben a legtöbb hematológia malignitás kezelésében látványos javulás volt figyelhető, addig az AML kezelésének terén csak viszonylag szerény előrelépés történt, így napjainkban is komoly kihívás elé állítja a hematológusokat az AML-es betegek kezelése. A molekuláris biológiai vizsgálómódszerek robbanásszerű fejlődésének köszönhetően közelebb jutottunk az AML genomszintű feltérképezéséhez. Mindezek révén ma már ismert, hogy az AML genetikai szempontból rendkívül heterogén kórkép, amelyre komplex klonális architektúra és dinamikus klonális evolúció jellemző. A mutációk által érintett gének transzkripciós faktorokat, hiszton-modifikációt szabályozó fehérjéket, szignáltranszdukciós faktorokat, RNS-splicing faktorokat, sejtciklus-szabályozókat, tumorszuppresszor géneket, DNS-metilációt szabályozó fehérjéket és a kohezin komplex tagjait kódolják. Ezen újonnan megismert genetikai eltéréseknek diagnosztikus és prognosztikus jelentőségük van, így mára már a nemzetközi ajánlások részét képezik. A betegség kezelése napjainkban is az intenzív kemoterápiás kezelésen és az allogén csontvelő őssejt transzplantáción nyugszik, azonban az elmúlt években több új, célzott kezelést biztosító kis molekulájú gyógyszert törzskönyveztek az AML gyógyítására. Az AML diagnosztikája, rizikóbesorolása és kezelése terén is jelentős előrelépések történtek, amelyek révén egyre közelebb jutunk ahhoz, hogy az AML-es betegek esetében is elérhetővé váljon az individuális genetikai profilozáson alapuló személyre szabott kezelés.

KULCSSZAVAK akut myeloid leukaemia, molekuláris diagnosztika, célzott terápia, prognózis

SUMMARY Acute myeloid leukemia (AML) is the second most common leukemia type in the western world, characterized by rapid progression. In recent years, with the rapid advent of molecular biological techniques, our understanding of the molecular pathogenesis of hematological malignancies, including AML, has been growing rapidly. It has become clear that AML is a genetically heterogeneous and complex disease characterized by complex clonal architecture and dynamic clonal evolution. Recurrent gene mutations can be classified into distinct functional categories as transcription factors, epigenetic modifiers (DNA methylation and chromatin modification), signaling pathways, spliceosome complex, tumor suppressors, cell cycle regulators and cohesin complex. Some recurrent mutations are now incorporated in the diagnostic algorithms, while others provide relevant clinical information. The main treatment of AML is still based on intensive chemotherapy and allogeneic stem cell transplantation, however in the last years novel targeted therapies have been approved. Recent advances in the diagnosis and management of AML may shift the paradigm of AML treatment by replacing the traditional one-size-fits-all approach with a more personalized treatment strategy based on the molecular characterization of the leukemic cells.

KEY WORDS acute myeloid leukemia, molecular diagnostics, targeted therapy, prognosis

Köszönetnyilvánítás

Köszönjük a következő hematológiai centrumoknak és a klinikus kollégáknak a betegminták küldését és a szakmai együttműködést az elmúlt évtizedben: Semmelweis Egyetem Belgyógyászati és Hematológiai Klinika, Semmelweis Egyetem Belgyógyászati és Onkológiai Klinika, Bács-Kiskun Megyei Kórház, Békés Megyei Központi Kórház Pándy Kálmán Tagkórház, Borsod-Abaúj-Zemplén Megyei Központi Kórház és Egyetemi Oktatókórház, Csolnoky Ferenc Kórház, Fejér Megyei Szent György Kórház, Jósa András Oktatókórház, Karolina Kórház és Rendelőintézet, Magyar Honvédség Egészségügyi Központ, Markhot Ferenc Oktatókórház és Rendelőintézet, Markusovszky Egyetemi Oktatókórház, Országos Onkológiai Intézet, Petz Aladár Egyetemi Oktató Kórház, Szent Borbála Kórház, Toldy Ferenc Kórház és Rendelőintézet, Uzsoki Utcai Kórház és Vaszary Kolos Kórház.

Rövidítések

ALL	*akut lymphoblastos leukaemia*	*CBF*	*core binding factor*
AML	*akut myeloid leukaemia*	*CEBPA*	*CCAAT/Enhancer Binding Protein Alpha*
BCL2	*B-sejtes lymphoma 2 protein*	*ELN*	*Európai Leukaemia NET*

EMA	*European Medicines Agency (Európai Gyógyszerügynökség)*
FDA	*U.S. Food and Drug Administration (Amerikai Élelmiszer- és Gyógyszerengedélyeztetési Hivatal)*
FISH	*fluoreszcens in situ hibridizáció*
IDH	*izocitrát-dehidrogenáz*
ITD	*internal tandem duplication (belső tandem duplikáció)*
MDS	*myelodysplasiás szindróma*
MRD	*minimális/mérhető maradék betegség*
NGS	*next generation sequencing (újgenerációs szekvenálás)*
NPM1	*nucleophosmin 1*
PCR	*polymerase chain reaction (polimeráz láncreakció)*
R/R	*relabáló/refrakter*
RUNX1	*Runt related transcription factor 1*
TKD	*tirozin-kináz domén*
TP53	*tumor protein 53*
WHO	*World Health Organization (Egészségügyi Világszervezet)*

A molekuláris biológia robbanásszerű fejlődésének és az újgenerációs szekvenálás (NGS) térhódításának köszönhetően az elmúlt évtizedben lehetőség nyílt az akut myeloid leukaemia (AML) genomjának széles körű feltérképezésére. Az NGS-sel azonosított genetikai eltérések nagy száma és változatos kombinációja alapján nyilvánvalóvá vált, hogy az AML genetikailag sokkal heterogénebb, mint azt korábban gondoltuk. Az újonnan azonosított genetikai eltérések közül több helyet kapott a betegség osztályozásában, vagy prognosztikus jelentősége miatt a rizikóstratifikáció részévé vált, míg egyes mutációkkal szemben célzott gyógyszerek kifejlesztésére került sor. Összefoglaló közleményünkben röviden áttekintjük az akut myeloid leukaemia genetikai hátterének legfontosabb jellemzőit, kiemelve a klinikai szempontból legfontosabb prognosztikus markereket. Emellett betekintést nyújtunk abba, hogy a modern genomikai vizsgálatok miként segítik a klinikai döntéshozatalt, valamint kitérünk az új célzott terápiákra is.

Az AML klinikai megjelenése és diagnosztikája

Az akut myeloid leukaemia (AML) a második leggyakoribb leukaemia típus a krónikus lymphocytás leukaemiát követően, míg a myeloid neoplazmák közül az AML fordul elő leggyakrabban. Hazánkban jelenleg évente 300–350 új AML-es esetet diagnosztizálnak. Az AML incidenciája az életkorral párhuzamosan nő, a betegek medián életkora diagnóziskor 68 év, azonban fontos kiemelni, hogy az AML bármely életkorban kialakulhat.[1]

Az AML a hemopoetikus őssejtek és progenitor sejtek klonális megbetegedése, melyre a differenciálódásban gátolt éretlen sejtek kontroláltalan proliferációja jellemző. A betegség legfőbb tüneteit, mint a visszatérő fertőzéseket, lázat, fáradékonyságot és vérzékenységet az okozza, hogy a leukaemiás sejtek kiszorítják a normál hemopoézist a csontvelőből, amely következményes anémiával, neutropeniával és thrombocytopeniával jár. Az AML-re heveny kórlefolyás jellemző, olyannyira, hogy kezelés nélkül néhány héten vagy hónapon belül a beteg halálához vezethet.

Az esetek döntő többségében az AML *de novo* alakul ki, azonban a betegek 20–25%-ánál szekunder módon jön létre myelodysplasiás szindróma talaján, myeloproliferatív neoplazma transzformációja révén, illetve kemoterápiát vagy sugárkezelést követően.[2-4] Az utóbbit terápiaindukált AML-nek nevezik, és leggyakrabban az emlődaganat, valamint a lymphoproliferatív betegségek kezelése után alakul ki.[3, 5]

Az AML döntően sporadikus kórkép, azonban ritkán megfigyelhető öröklődő familiáris formája, amelynek hátterében csíravonali mutációkat detektáltak többek közt a *RUNX1*, *GATA2*, *CEBPA*, *DDX41*, *ANKRD26*, *ETV6*, *SAMD9* és *SAMD9L* génekben.[4, 6] E mutációk jelenléte különböző klinikai képpel társulhat, és korai felismerésük elengedhetetlenül fontos a kezelési stratégia megtervezéséhez, valamint az esetlegesen érintett családtagok kiszűrése és szoros követése szempontjából.

Kórlefolyását tekintve az AML az egyik legrosszabb prognózisú hematológia malignitás, az összes leukaemiatípus közül az AML-nek a legmagasabb a mortalitása.[1] Napjainkban a 60 évnél fiatalabb betegek 35–40%-a, míg a 60 év felettiek csupán 5–15%-a gyógyul meg.[7] Fontos hangsúlyozni, hogy a várható túlélést az életkoron túl jelentősen befolyásolja a beteg általános állapota és kísérőbetegségei, az intenzív kemoterápiára való alkalmasság, valamint, hogy a leukaemia milyen fenotípusos, genomikai és transzkriptomikai paraméterekkel rendelkezik. Mindezen tényezők ismerete elengedhetetlenül fontos a pontos rizikóbecsléshez és az ezen alapuló rizikóadaptált kezeléshez.[8]

Az AML diagnózisa hisztológiai, citológiai, áramlás citometriai, citogenetikai és molekuláris genetikai vizsgálatokon alapul. A diagnózis felállításához a perifériás vérben vagy a csontvelőben 20% feletti blasztarány szükséges. Bizonyos transzlokációk esetén [t(15;17), t(8;21), inv(16), t(16;16)] 20% alatti blasztarány esetén is kimondható az AML diagnózisa.[4] Az AML diagnózisakor az áramlási citometriai vizsgálattal határozzák meg a leukaemiás sejtek fenotípusát és mennyiségét.

A multiparaméteres áramlási citometria azonban nem csupán a diagnózis alkotásban tölt be fontos szerepet, hanem a remisszió megítélésében, valamint a reziduális betegség kvantifikálásában és a relapszusok korai felismerésében is.

Az AML klasszifikációja még napjainkban is döntően a citogenetikai eltéréseken nyugszik, melyet az Egészségügyi Világszervezet (World Health Organization, WHO) legfrissebb, 2016-os osztályozása is jól tükröz. A WHO klasszifikációban a citogenetikai eltérések mellett helyet kapnak még a morfológia eltérések is, amelyek a korábban alkalmazott French-American-British osztályozáson alapszanak *(1. táblázat)*. A 2008-as verzióhoz képest előrelépést jelentett, hogy az *NPM1* és a *CEBPA* mutációk is helyet kaptak az osztályozási rendszerben, valamint a *RUNX1* mutáció, mint provizórikus entitás került be a legújabb osztályozásba.[4] A kariotipizálás, valamint a FISH vizsgálat létjogosultságát alátámasztja, hogy az AML-es betegek közel felénél lehet kimutatni valamilyen, a betegség patogenezisében bizonyítottan szerepet játszó kromoszóma eltérést, amely a betegség kórlefolyását is jelentősen befolyásolhatja.[9]

1. táblázat: Az akut myeloid leukaemia és társult neoplasmák 2016-os WHO osztályozása

AML, visszatérő genetikai eltérésekkel	
	AML, t(8;21)(q22;q22.1); *RUNX1-RUNX1T1*
	AML, inv(16)(p13.1q22) vagy t(16;16)(p13.1;q22); *CBFβ-MYH11*
	APL, t(15;17); *PML-RARA*
	AML, t(9;11)(p21.3;q23.3); *MLLT3-KMT2A*
	AML, t(6;9)(p23;q34.1); *DEK-NUP214*
	AML, inv(3)(q21.3q26.2) vagy t(3;3)(q21.3;q26.2); *GATA2, MECOM*
	AML, (megakaryoblastos) t(1;22)(p13.3;q13.3); *RBM15-MKL1*
	AML, *NPM1* mutációval
	AML, biallélikus *CEBPA* mutációval
	Provizórikus entitások: AML, *BCR-ABL1*
	Provizórikus entitások: AML, *RUNX1* mutációval
AML, myelodysplasiás vonásokkal	
AML, terápia indukálta	
„Másként nem osztályozható” AML	
	AML, minimálisan differenciált
	AML, érés jelei nélkül
	AML, érés jeleivel
	Akut myelomonocytás leukaemia
	Akut monoblastos/monocytás leukaemia
	Akut erythroleukaemia
	Akut megakaryoblastos leukaemia
	Akut basophil leukaemia
	Akut panmyelosis myelofibrosissal
Myeloid sarcoma	
Myeloid proliferáció Down-szindrómához kötötten	
	Átmeneti abnormális myelopoesis
	Down-szindrómához asszociált myeloid leukaemia

AML: akut myeloid leukaemia, APL: akut promyelocytás leukaemia, WHO: Egészségügyi Világszervezet

Molekuláris genetikai eltérések AML-ben és prognosztikai jelentőségük

Az Európai Leukaemia NET (ELN) 2017-es ajánlása iránymutatást nyújt az AML-es betegek genetikai alapú rizikóbesorolásában *(2. táblázat)*.[10] Az AML-es betegek ~20%-a hordoz kedvező prognózisú citogenetikai eltérést, amely elsősorban a fiatal, *de novo* AML-ben szenvedő betegekben fordul elő.[11] Jó prognózissal járnak az ún. CBF („core binding factor”) leukaemiák: *RUNX1-RUNX1T1* génfúziót eredményező t(8;21)(q22;q22) átrendeződés, illetve az inv(16)(p13.1;q22) vagy t(16;16)(p13.1;q22) *CBFβ-MYH11* génfúzióval. A CBF leukaemiás betegek kemoterápiás kezeléssel jó eséllyel gyógyíthatók.[12]

Amennyiben a betegnél három vagy több kromoszóma eltérés detektálható, melyek közül egyik sem tartozik a visszatérő genetikai eltérések közé, akkor ún. komplex kariotípus áll fenn. A betegek 10–12%-ánál lehet kimutatni komplex kariotípust, amely kedvezőtlen prognózissal társul és elsősorban idősebb betegekben, illetve MDS-asszociált és terápiaindukált AML-ben fordul elő.[13] Különösen kedvezőtlen a prognózisa azoknak a komplex kariotípussal rendelkező betegeknek, akiknél a *TP53* gén mutációja is kimutatható.[14]

Az AML-es betegek mintegy 40–50%-a nem hordoz kromoszóma-eltérést, úgynevezett normális kariotípussal (NK) rendelkeznek, amely intermedier rizikót jelent.[9, 10] Mindazonáltal a normál kariotípusú betegek kórlefolyása rendkívül heterogén lehet, így esetükben kiemelten fontossá vált olyan molekuláris markerek azonosítása, amelyek segíthetnek a rizikóbecslésben és terápiatervezésben.[9]

A molekuláris biológia robbanásszerű fejlődésének köszönhetően lehetőség nyílt arra, hogy a NK-AML genetikai hátterét is feltérképezzék. A valaha volt első teljes genom szekvenálást is egy NK-AML-es beteg mintáján végezték el 2008-ban *Ley és munkatársai*.[15] Az újgenerációs szekvenálás elterjedésével olyan kutatások

valósulhattak meg, mint a „The Cancer Genome Atlas Research Network” vizsgálata, melynek keretei között 200 AML-es beteg mintáját vizsgálták meg: 50 betegnél teljes genom-, míg 150 betegnél teljes exom szekvenálást végeztek. A vizsgálat során 23 gént azonosítottak, melyek visszatérő mutációt hordoztak, míg további 237 génben mutattak ki mutációt legalább kettő betegnél.[16] A nagyszabású „The Cancer Genome Project” 1540 AML-es beteg bevonásával végzett vizsgálatának eredményeit 2016-ban publikálták. A munkacsoport kimutatta, hogy a betegek 96%-ában jelen volt legalább egy driver mutáció, míg a betegek 86%-ában kettő vagy több driver mutációt is találtak. Összesen 76 génben és genomi régióban detektáltak mutációkat, mely alapján a betegek 80%-át 11 genetikai alcsoportba lehetett besorolni.[17] A fent említett vizsgálatokban azonosított mutációkat hordozó fehérjék funkciójuk alapján számos funkcionális csoportba sorolhatóak:

- transzkripciós faktorok *(CEBPA, RUNX1)*,
- sejtciklus szabályozók *(NPM1)*,
- tumorszuppresszorok *(TP53, WT1, PHF6)*,
- epigenetikai szabályozók *(DNMT3A, IDH1, IDH2, TET2)*,
- szignáltranszdukciós faktorok *(FLT3, RAS, KIT, PTPN11)*,
- hisztonmodifikációt szabályozó fehérjék *(MLL, ASXL1, EZH2)*,
- kohezin-komplex tagjai *(STAG2, SMC3, SMC1A, RAD21)*,
- RNS-splicing faktorok *(SRSF2, SF3B1, U2AF1)*.

Ezen mutációk közül többnek prognosztikai jelentősége van, így helyett kaptak a ELN 2017-es rizikóbesorolásban *(1. és 2. ábra)*.

A NK-AML-ben a leggyakoribb genetikai eltérés az *NPM1* (nucleophosmin 1) gén mutációja, a betegek 48–64%-ánál lehet kimutatni.[18] Az NPM1 egy foszfoprotein, mely képes lokalizációját a citoplazma és a sejtmag között folyamatosan változtatni. Szerepet játszik a riboszóma biogenezisében, mitózis során a centroszóma duplikációjában, a sejtproliferációban és az apoptózisban. Az *NPM1* leggyakoribb mutációja egy 4 bázispárnyi inzerció a 12-es exon területén, amely hatására az aminosavsorrend úgy módosul, hogy nukleáris export szignál jön létre, így a fehérje tartósan citoplazmatikus lokalizációt mutat.[19] Bizonyított, hogy az *NPM1* mutáció önmagában kedvező prognózissal jár, azonban *FLT3*-ITD és *NPM1* mutáció egyidejű fennállása esetén a várható prognózis függ az *FLT3*-ITD mutáns/vad allélaránytól. Amennyiben a betegben NPM1 mutáció van jelen és az FLT3-ITD allélaránya kevesebb mint 0,5, abban az esetben a beteg a kedvező prognózisú csoportba sorolható, ha viszont a mutáns allél aránya magasabb mint 0,5 abban az esetben az intermedier prognózisú csoportba tartozik a beteg.[10]

Az *ASXL1* (additional sex combs like transcriptional regulator 1) gén által kódolt fehérje az epigenetikai szabályozásban vesz részt. Funkcióvesztő mutációja a betegek 5–17%-ánál fordul elő, döntően idősebb betegekben, valamint szekunder módon kialakult AML-es betegekben fordul elő.[7] A *TP53* (tumor protein 53) klasszikus tumorszuppresszor génként a sejtciklus szabályozásában és a DNS hibajavítási folyamataiban játszik szerepet. Mutációját az AML-es betegek 6–8%-ánál lehet kimutatni, gyakrabban fordul elő idősebb életkorú betegekben, valamint szekunder AML-ben.[7,14] A *RUNX1* (runt-related transcriptional

KEDVEZŐ

- t(8;21)(q22;q22.1); *RUNX1-RUNX1T1*
- inv(16)(p13.1q22) vagy t(16;16)(p13.1;q22); *CBFβ-MYH11*
- Mutált *NPM1*, *FLT3*-ITD mutáció nélkül (vagy alacsony allélaránnyal)
- Biallélikus *CEBPA* mutáció

INTERMEDIER

- Mutált *NPM1*, *FLT3*-ITD mutációval (magas allélarány)
- Vad típusú *NPM1*, *FLT3*-ITD mutáció nélkül (vagy FLT3-ITD mutáció alacsony allélaránnyal)
- t(9;11)(p22;q23); *MLLT3-KMT2A*
- Egyéb citogenetikai eltérés, mely más rizikócsoportba nem sorolható

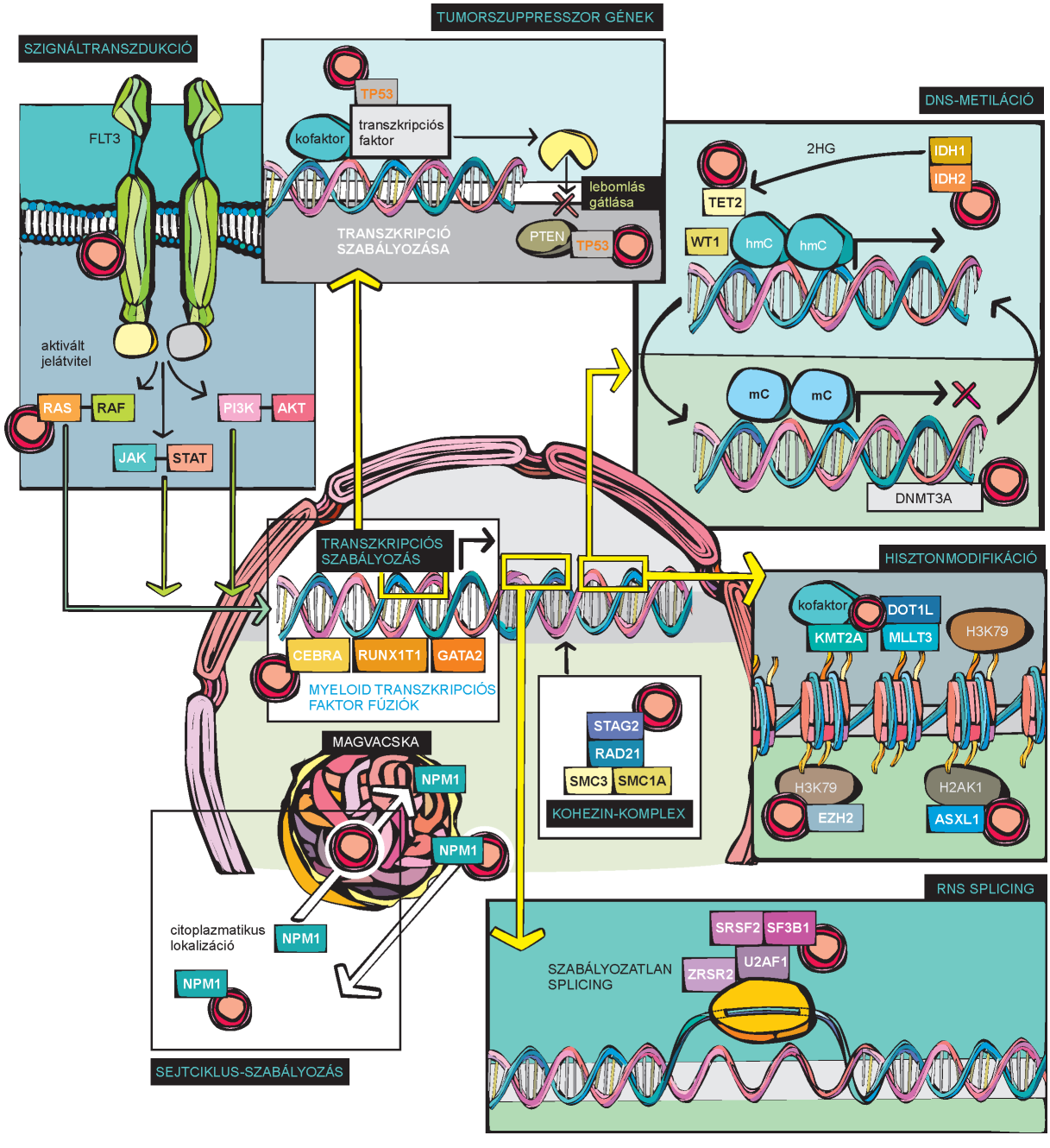
KEDVEZŐTLEN

- inv(3)(q21;q26.2) vagy t(3;3)(q21.3;q26.2); *GATA2, MECOM (EVI1)*
- t(6;9)(p23;q34); *DEK-NUP214*
- t(v;11)(v;q23.3); *KMT2A* génátrendeződés
- t(9;22)(q34.1;q11.2); *BCR-ABL1*
- -5 vagy del(5q); -7; -17 vagy abn(17p)
- komplex kariotípus**, monoszómiás kariotípus***
- vad típusú *NPM1*, *FLT3-ITD* mutációval (magas allélaránnyal)
- *RUNX1* mutáció
- *ASXL1* mutáció
- *TP53* mutáció

1. ábra: AML citogenetikai és molekuláris genetikai alapú rizikóbesorolása az ELN 2017-es ajánlás alapján. Az ELN 2017-es ajánlása értelmében a betegeket kedvező, intermedier és kedvezőtlen prognosztikai csoportba lehet besorolni. A 2010-es verzióhoz képest előrelépést jelent, hogy három kedvezőtlen prognózissal járó génmutáció (ASXL1, RUNX1, TP53) is bekerült az ajánlásba, így még precízebb rizikóbecslésre nyílik lehetőség.
** alacsony allélarány: mutáns/vad allélarány <0,5; magas allélarány: mutáns/vad allélarány ≥0,5*
*** 3 vagy több független kromoszóma eltérés, visszatérő transzlokációk kizárása mellett*
**** 1 kromoszóma monoszómiája (a nemi kromoszómák kivételével) mellett legalább 1 addicionális monoszómia vagy strukturális kromoszómaaberráció*

factors 1) gén egy transzkripciós faktort kódol, mely szerepet játszik a hemopoetikus sejtek differenciálódásának szabályozásában. A *RUNX1* mutációval járó AML 2016-ban mint provizionális entitás került felvételre a WHO klasszifikációs rendszerbe.[4] Mutációját a betegek 5–15%-ánál lehet kimutatni, főleg idősebb életkorban fordul elő.[7, 10] Az *ASXL1*, a *TP53* és a *RUNX1* mutációk kedvezőtlen prognózissal járnak.[10]

A *CEBPA* (CCAAT/enhancer binding protein alpha) gén egy myeloid sejtekre jellemző transzkripciós faktort kódol, mely a DNS CCAAT motívumaihoz kötődve a génátírás szabályozásában játszik szerepet. Döntően a neutrofil granulocyták differenciációjáért felelős. A *CEBPA* mutációi leggyakrabban az N- és a C-terminális régiót érintik. Az esetek 35%-ában csak az egyik régióban fordul elő mutáció, míg 65%-ban mindkét régió érintett, ezt nevezzük biallélikus mutációnak. AML-



2. ábra: Akut myeloid leukaemiában mutációk által leggyakrabban érintett fehérjék funkcionális csoportjai

ben szenvedő betegek 6–10%-ánál, míg NK-AML-es betegek 15–18%-ánál lehet kimutatni a *CEBPA* gén mutációját.[7, 20] A *CEBPA* mutáció kedvező prognózisú eltérés, azonban ez csak biallélikus mutációra igaz.[10]

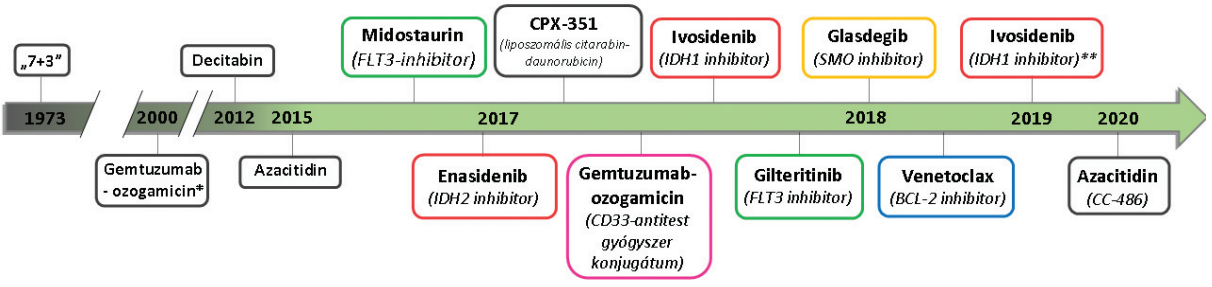
A 2017-es ELN rizikóbesorolás jelentős előrelépés volt az AML rizikóstratifikációjában, hiszen a fent említett molekuláris genetikai eltérések bekerültek az ajánlásba. Felmerül azonban, hogy a rizikóbecslést tovább lehetne finomítani, hiszen 2017 óta már további genetikai eltérésekről igazolták, hogy prognosztikai jelentőségük van. Eisfeld és munkatársai eredményeik alapján felvetették, hogy a *BCOR*, a *SETBP1*, az *IDH2*, a *ZRSR2* és a *WT1* kerüljön be az ELN rizikóbesorolásába.[21] Kimutatták ugyanis, hogy *BCOR* vagy SETBP1 mutációt hordozó kedvező prognózisú, nem CBF-AML-es betegek, illetve *IDH2* mutációt hordozó kedvezőtlen prognózisú betegek kórlefolyásuk alapján az intermedier prognózisú csoportba sorolandók. Azok a betegek, akik vagy *ZRSR2* mutációt, vagy *NPM1* mutációval egyidejűleg *WT1* mutációt is hordoznak a kedvezőtlen rizikócsoportba tartoznak, hiszen ezeknek a betegeknek a 3 éves betegségmentes (DFS) túlélése szinte megegyezik a kedvezőtlen rizikójú betegekével (DFS: 11% és 5% vs. 10%). Érdemes még kiemelni azt a megfigyelésüket, mely szerint a magas allélarányú *FLT3*-ITD mutáció semlegesítheti az *NPM1* pozitív prognosztikai hatását, ugyanis nem volt szignifikáns különbség megfigyelhető betegségmentes- és teljes túlélés szempontjából a vad típusú és a mutált *NPM1* esetén.[21]

Minimális/mérhető reziduális betegség

A diagnóziskor elvégzett genetikai vizsgálatok alapján történő rizikóbesoroláson túlmenően fontos figyelembe venni a terápiára adott választ is. A kezelés hatásosságának megítélésében még napjainkban is részben az 1956-ban megalkotott kritériumrendszerre támaszkodunk. A betegek kezelésének célja a komplett remisszió elérése, amelyen 5% alatti blasztarányt értünk teljes csontvelői regeneráció mellett. Fontos azonban kiemelni, hogy a komplett remisszióba jutott betegekben is gyakran alakul ki relapszus, ami arra utal, hogy a kemoterápiás kezelés ellenére sem sikerül a leukaemiás sejtek teljes eradikációja. A morfológiai módszerek nem elég érzékenyek az alacsony számban jelenlévő leukaemiás sejtek kimutatására. A mikroszkópos detektálhatóság szintje alatti, polimerázláncreakcióval (PCR) vagy áramlási citometriával detektálható leukaemiát nevezik minimális/mérhető reziduális betegségnek (MRD). A terápiás válasz felmérésében és a relapszusok korai felismerésében fontos szerepe van az MRD kimutatásának. Az MRD monitorozás történhet áramlási citometriai vizsgálattal, mely során az ún. leukaemia asszociált immunfenotípusú (LAIP) sejteket azonosítják, valamint PCR is, amely során az *NPM1* mutációt, valamint a *CBFB-MYH11, RUNX1-RUNX1T1, BCR-ABL1, PML-RARA* fúziós gének expresszióját lehet nyomon követni.[10, 22] A legújabb ajánlásokban már szerepet kap az MRD pozitivitás a rizikó-stratifikációban, azonban ellentétben a krónikus myeloid leukaemiával, ahol világszerte standardizált módon történik az MRD monitorozása, az AML esetében ilyen szintű harmonizáció még nem történt, azonban az ELN MRD munkacsoportja több ilyen irányú törekvést tett az elmúlt években.[10, 23]

Célzott terápiás lehetőségek AML-ben

Az AML genetikai szempontból rendkívül heterogén kórkép, azonban ez a sokszínűség a terápiás repertoárban sokáig nem tükröződött. Az AML-es betegek terápiájának alapjául jelenleg is az 1973-ban leírt ún. „7+3” kezelés szolgál, amely citarabin hét napos folyamatos infúziójából és három napos rövid daunorubicin infúzióból áll. Kivételt képez ez alól az akut promyelocytás leukaemia (APL), amely altípusnál a differenciálódást serkentő csupa-transz retinsav (ATRA) és az arzén-trioxid jelenti a kezelés alappillérét. Míg az elmúlt évtizedekben a legtöbb hematológiai malignitás kezelésében jelentős előrelépések történtek a célzott terápiák bevezetésével, AML-ben azonban csak közel négy évtized elteltével törzskönyveztek új gyógyszereket *(3. ábra)*. A 2010-es években engedélyeztek két intravénásan vagy szubkután alkalmazható hipometiláló szert, az azacitidint (Vidaza®) és a decitabint (Dacogen®), melyek közül az azacitidin (Onureg®) már per os alkalmazható formában is elérhető az USA-ban 2020 szeptembere óta.[12] Az AML patogenezisében fontos szerepet játszik a DNS-metiláció és a hiszton modifikáció diszregulációja, ezért ígéretes terápiának tűnt az epigenetikai kezelés. Habár a hipometiláló szerek nem hoztak igazán áttörő sikert, azonban tolerálható toxicitás mellett javítják az idős, komorbiditásokkal terhelt betegek túlélését.[24] 2018-ban törzskönyveztek egy régi szert „új köntösben”: a CPX-351 (Vyxeos®) citarabin és daurorubicin rögzített dózisú kombinációja liposzomális formában, amelyet terápiaindukált AML-ben vagy MDS-asszociált AML-ben szenvedő betegek kezelésére lehet alkalmazni.[25]



3. ábra: Az AML kezelésére az FDA által engedélyezett gyógyszerek. Amerikai Élelmiszer- és Gyógyszerengedélyeztetési Hivatal (FDA) által törzskönyvezett AML kezelésére alkalmazható készítmények idővonalon ábrázolva. Az AML kezelésében a molekulárisan célzott terápia térnyerése a 2017-es évtől figyelhető meg. Az FLT3-inhibitorok közül a midostaurin elsővonalban alkalmazható, míg a gilteritinib R/R betegek kezelése törzskönyvezték. Az IDH-inhibitorokat eredetileg csak R/R AML kezelésére hagyták jóvá, azonban 2019 óta az ivosidenib elsővonalban is adható.
** a gemtuzumab-ozogamycin forgalmazását 2010-ben visszavonták a mellékhatások miatt és a klinikai hatékonyság hiánya miatt, azonban a randomizált klinikai vizsgálatok metaanalízise alapján új indikációval csökkentett dózisban 2017-ben újra jóváhagyta az FDA*
*** új indikáció jóváhagyása értelmében újonnan diagnosztizált betegeknek is adható*

Az AML-es betegek kezelésében a fordulópontot a 2017-es év hozta el, hiszen több évtizedes várakozást követően törzskönyvezték az első célzott terápiát, amelyet azóta további gyógyszerek követettek. Az új terápiák között megtalálhatók olyanok, amelyek egy adott mutációt céloznak (FLT3-inhibitorok, IDH1/2-inhibitorok) vagy speciális jelátviteli útvonalat gátolnak (SMO-inhibitor, BCL-2 inhibitor), illetve toxinnal konjugált antitest is (gemtuzumab-ozogamycin). Az alábbiakban röviden áttekintjük az elmúlt években törzskönyvezett célzott kezeléseket.

FLT3-inhibitorok

Az FLT3 egy III. típusú receptor tirozin-kináz, amelynek konstitutív aktivációját okozó mutációja az AML-es betegek mintegy harmadában mutatható ki.[17] Az aktiválódott FLT3 a PI3K/AKT, a MAPK és a PKC jelátviteli útvonalakon keresztül szabályozza a hemopoetikus őssejtek és progenitor sejtek proliferációját és differenciálódását.[26] Az *FLT3* mutációknak két típusát lehet elkülöníteni: az *FLT3* mutációk 70–80%-áért felelős juxtamembrán domént érintő ún. belső tandem duplikációt (ITD), valamint a tirozin-kináz domént (TKD) érintő mutációt, amely jóval ritkábban fordul elő.[27] Az *FLT3-ITD* mutáció rossz prognózissal társul, gyakori a primer rezisztencia a hagyományos kemoterápiás kezeléssel szemben, valamint nagyobb arányban lép fel relapszus, különösen magas mutáns/vad allélarány esetén.[10] Ezzel szemben az *FLT3-TKD* mutáció prognosztikus értéke kevésbé tisztázott.[27] Az FLT3 receptor gátlása igen vonzó célpont, mivel a szignalizáció gátlása a sejtciklus leállását és apoptózist indukál *FLT3-ITD* vagy *TKD* mutáns receptorokat expresszáló leukaemiás sejtekben.[28]

Az első törzskönyvezett FLT3-inhibitor a **midostaurin** (Rydapt®) volt: 2017-ben mind az Amerikai Élelmiszer- és Gyógyszerengedélyeztetési Hivatal (FDA), mind pedig az Európai Gyógyszerügynökség (EMA) jóváhagyta a fázis III RATIFY klinikai vizsgálat eredményei alapján.[29] A midostaurin az első generációs receptor tirozin-kináz-gátlók családjába tartozik, amelyek kevésbé specifikusak, ugyanakkor multikináz-inhibitor aktivitással rendelkeznek, így a midostaurin az FLT3 receptor mellett gátolja a KIT, PDGFRα/β és a protein-kináz-C család tagjait is. A midostaurin egyes típusú FLT3 inhibitor, így ITD és TKD mutáció esetén is alkalmazható.[29] Indukciós és konszolidációs kemoterápiás ciklusok 8–21. napján per os alkalmazható, ezen felül Európában fenntartó kezelésként monoterápiában is adható.

Az első generációhoz képest a második generációs FLT3 inhibitorok jóval hatékonyabbak és szelektívebbek, miközben kedvezőbb mellékhatás profillal rendelkeznek. A második generációs inhibitorok közül eddig a **gilteritinib**et (Xospata®) törzskönyvezték monoterápiaként R/R *FLT3* mutációt hordozó betegek kezelésére. A fázis III ADMIRAL klinikai vizsgálat eredményei alapján a gilteritinib monoterápia gyakrabban eredményezett komplett remissziót, valamint a betegek teljes túlélése is jelentősen hosszabb volt, mint a hagyományos mentő kezelés esetén.[30]

A fent említett két gyógyszeren kívül egyéb FLT3 inhibitorokkal is zajlanak klinikai vizsgálatok, amelyek több irányba is folynak: konvencionális kemoterápia kiegészítéseként, új célzott terápiával vagy hipometi-

láló szerekkel kombinációban, valamint allogén őssejt transzplantációt követően fenntartó kezelésként alkalmazva monoterápiában vagy kombinációkban.[31-34]

Az onkohematológiában elsőként a krónikus myeloid leukaemiában ismerték fel, hogy a molekuláris célzott terápia alkalmazásakor a betegek egy részénél terápiás rezisztencia alakul ki. Hasonló tendenciát lehet megfigyelni az FLT3-inhibitorokkal is. Terápiás rezisztenciához több mechanizmus is vezethet, például, ha rezisztenciát okozó új mutációk alakulnak ki, vagy az ezt hordozó klón kerül túlsúlyba (F691L és N676D mutációk a leggyakoribbak), vagy ha a FLT3 jelátviteli útvonalának downstream effektoraiban, például a RAS család tagjaiban *(NRAS, PTPN11, CBL)* jön létre mutáció.[35-37] Emellett FLT3-inhibitor alkalmazásakor a major klón eltűnésével szelekciós előnyhöz jutó szubklón is felelős lehet a relapszus kiindulásáért.[35]

IDH-inhibitorok

Az IDH inhibitorok kifejlesztése igazi sikertörténetnek tekinthető, hiszen AML-ben az első *IDH* mutáció leírását követően kevesebb mint egy évtizeddel később az FDA már törzskönyvezett rá célzott terápiát. Az AML-es betegek 6-16%-ában mutatható ki *IDH1* mutáció, mely döntően a mutációs forrópontot jelentő 132-es kodont érinti, míg az *IDH2* mutációja a betegek 8-19%-ában fordul elő és leggyakrabban a 140-es és a 172-es kodonokat érinti.[17, 38-40] Az IDH1 a citoszólban, míg az IDH2 a mitokondriumban található enzim, amely a TET2 kofaktorául szolgáló alfa-ketoglutarát előállításáért felelős, így közvetett módon szerepet játszik a DNS-metilációs mintázat szabályozásában. Az *IDH1*/2 gének funkcióyneréses mutációja következtében alfa-ketoglutarát helyett 2-hidroxiglutarát onkometabolit képződik, amely gátolja a myeloid progenitor sejtek differenciálódását.[41] A per os alkalmazható kis molekulájú IDH-inhibitorok célzott oki terápiát biztosítanak: az enzim aktív részéhez kötődve csökkentik az alfa-ketoglutarát 2-hidroxiglutarát átalakulást. Az FDA 2017-ben törzskönyvezte az *IDH2* inhibitor **enasidenib**et (Idhifa®), majd 2018-ban az *IDH1* inhibitor **ivosidenib**et (Tibsovo®) *IDH* mutációt hordozó R/R betegek kezelésére. 2019 óta elsővonalban is adható az ivosidenib olyan *IDH1* mutációt hordozó betegeknek, akik 75 éven felüliek vagy kísérőbetegségeik miatt nem alkalmasak intenzív kemoterápiás kezelésre.[42] Fontos azonban kiemelni, hogy az *IDH* inhibitorokat csak az FDA engedélyezte, Európában egyelőre nem elérhetőek, mivel a gyártók visszavonták a forgalomba hozatali engedély iránti kérelmet.

Érdemes megemlíteni, hogy az *IDH1*/2 mutációt hordozó sejtek BCL2-dependensek, ezáltal racionálisnak tűnik esetükben BCL2-inhibitor alkalmazása.[43] A Fázis III VIALE-A klinikai vizsgálat eredményei ezt a feltevést alátámasztották, hiszen intenzív kemoterápiára nem alkalmas, *IDH1*/2 mutált betegeknél a BCL2-inhibitor venetoclax és az azacitidin kombinációjával a komplett remisszió aránya 75,4%, míg azacitidin monoterápia esetén csupán 10,7% volt.[44, 45]

Gemtuzumab ozogamycin

A **gemtuzumab ozogamycin** (GO) (Mylotarg®) egy olyan antitest-gyógyszer konjugátum, amely anti-CD33 monoklonális antitestből és az ehhez kapcsolt calicheamicin citotoxikus ágensből áll. A GO-t 2000–2010 között forgalmazták, eredetileg idős CD33-pozitív relabált betegek kezelésére alkalmazták monoterápiában, azonban a gyógyszert gyártó cég visszavonta a nem megfelelően megtervezett klinikai vizsgálatokból levont következtetések miatt.[46] 2014-ben öt randomizált klinikai vizsgálat metaanalízise kimutatta, hogy a GO csökkenti a relapszus rizikóját és hosszabb teljes túléléssel jár elsősorban kedvező prognózisú citogenetikai eltérés esetén, ugyanakkor kedvezőtlen prognózisú citogenetika esetén a GO alkalmazása nem járt terápiás előnnyel.[47] Mindezek alapján 2017 szeptemberében újra engedélyezték a GO-t csökkentett dózisban újonnan diagnosztizált CD33-pozitív AML-es betegek indukciós és konszolidációs kezelésére kombinációban és monoterápiában is, valamint R/R CD33-pozitív AML-es betegek monoterápiás kezelésére.[46]

Glasdegib

A **glasdegib** (Daurismo®) a Hedgehog (Hh) szignáltranszdukciós útvonal inhibitora. A G-fehérje-kapcsolt receptor Smoothened-hez (SMO) kötődve gátolja annak aktivációját, ezáltal csökkenti a glióma-asszociált onkogén (GLI) transzkripciós faktor aktivitását és a downstream szignalizációt. A hedgehog jelátviteli útvonal fiziológiás körülmények között elsősorban az embryonalis fejlődésben játszik szerepet, azonban hematológia malignitásokban leírták, hogy a Hh útvonal szignalizációja szerepet játszik a leukaemiás őssejt populáció fenntartásában.[48] A Hedgehog jelátviteli útvonal gátlásával a relapszus kialakulásáért felelős (és gyakran a hagyományos kemoterápiával és a célzott terápiával szemben rezisztens) leukaemiás őssejtek célzott elpusztítása nyílik mód. A glasdegibet újonnan diagnosztizált, intenzív kemoterápiás kezelésre nem al-

kalmas AML-es betegek kezelésére engedélyezték alacsony dózisú citarabinnel kombinációban alkalmazva.[49]

Venetoclax

A **venetoclax** (Venclyxto®) a BCL2 (B-cell lymphoma 2) antiapoptotikus fehérjének szelektív inhibitora, amely közvetlenül a BCL-2 BH3 kötőhelyéhez kapcsolódik, leszorítva a BH3 motívumot tartalmazó proapoptotikus fehérjéket.[50] Míg krónikus lymphoid leukaemiában a BCL2 fokozott expressziója mutatható ki, AML-ben ez nem figyelhető meg, viszont több tanulmányban is igazolták, hogy AML-ben a leukaemiás sejtek túlélésében jelentős szerepet játszhat a BCL2. [51] A klinikai vizsgálatok sikeresen alátámasztották ezt a hipotézist, így az FDA 2018-ban gyorsított eljárásban engedélyezte a venetoclaxot hipometiláló szerekkel vagy alacsony dózisú citarabinnal kombinálva olyan újonnan diagnosztizált betegeknek, akik 75 éven felüliek vagy kísérőbetegségeik miatt nem alkalmasak intenzív kemoterápiás kezelésre.[52]

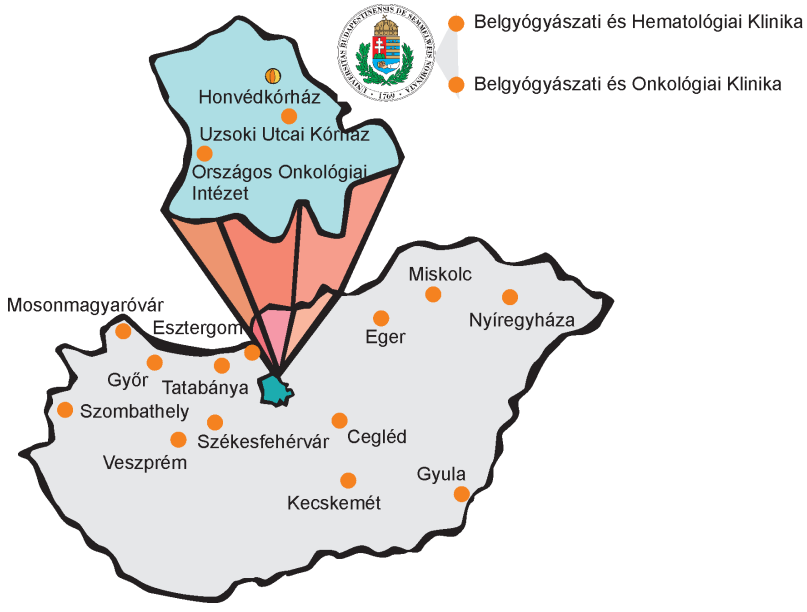
Új irányok az AML kezelésében

A ClinicalTrials.gov weboldal adatai alapján az elmúlt két évtizedben AML-es betegek bevonásával 167 gyógyszerrel összesen 397 fázis II klinikai vizsgálatot végeztek el. A jelenleg zajló klinikai vizsgálatok egy igen jelentős hányadának racionális meggondolásból elsősorban az a célja, hogy megtalálják a már törzskönyvezett gyógyszerek optimális kombinációját.[53] Számos új hatásmechanizmusú gyógyszerrel, illetve egyéb kórképben már engedélyezett gyógyszerekkel zajlanak ígéretesnek tűnő klinikai vizsgálatok (pl. crenolanib – 2. generációs FLT3-inhibitor, sorafenib – 1. generációs FLT3-inhibitor, eprenetapopt (APR-246) – TP53-aktivátor, entospletinib – spleen tyrosine kinase inhibitor, bortezomib – proteoszómainhibitor, vorinostat – hiszton-deacetiláz-gátló).[53] Új lehetőség az AML-es betegek immunterápiája is. Eddig a monoklonális antitestek közül egyedül a GO törzskönyvezett, de számos egyéb antigén ellen irányuló konjugált és nemkonjugált antitesttel zajlanak fázis I klinikai vizsgálatok (pl. magrolimab – CD47-ellenes monoklonális antitest, daratumumab – CD38-ellenes monoklonális antitest, flotetuzumab – CD123 x CD3 DART bispecifikus antitest).[53]

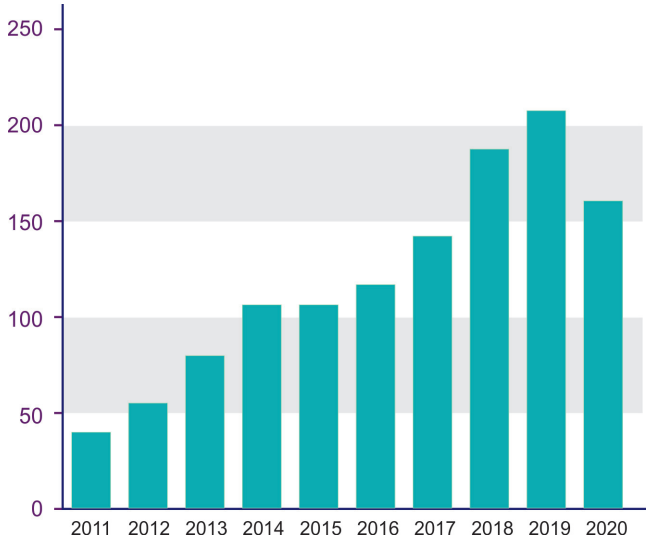
Az elmúlt években több olyan klinikai vizsgálatot is indítottak AML-ben, ahol biomarker alapján részesülnek a betegek kezelésben.[54, 55] Az első ilyen vizsgálatot a „Leukemia and Lymphoma Society” indította el 2016-ban „Beat AML Master Trial” néven. A klinikai vizsgálatba kizárólag 60 éven felüli betegeket vontak be, akik az individuális genetikai profiljuk alapján részesültek személyre szabott célzott kezelésben. A vizsgálat elsődleges célkitűzése az volt, hogy minden beteg esetében 7 napon belül megtörténjen a genetikai profil meghatározása, mely alapján algoritmus használatával kerülnek besorolásra a betegek az egyes terápiás karokra. A klinikai vizsgálatban új terápiák hatékonyságát is vizsgálják, melyeket akár egymással kombinációban is alkalmaznak, ebből a szempontból is eltér ez az ún. „ernyő”-vizsgálat a hagyományos klinikai vizsgálatoktól. A vizsgálatban összesen 11-féle kezelést alkalmaznak, melyek között olyan új gyógyszerek is szerepelnek, mint a SYK inhibitor entospletinib, a Nedd8 inhibitor pevonedistat és a CD33-ellenes monoklonális antitest BI 836858. Előzetes eredmények alapján a vizsgálatban részt vevő 395 beteg 94,7%-ánál 7 napon belül el tudták végezni a genetikai profil meghatározását.[55] Külön kiemelendő emellett, hogy a terápia megkezdésének 7 napos késleltetése nem befolyásolta a betegek túlélését. Erre vonatkozóan eddig csak retrospektív adatok álltak rendelkezésünkre, azonban a Beat AML Master Trial prospektív módon is igazolta ez a megfigyelést.[56]

Saját tapasztalat

A Semmelweis Egyetem I. Sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet Onkohematológiai Központjába az elmúlt 10 évben több mint 1200 AML-es betegtől érkezett vizsgálati az ország 18 hematológiai centrumából *(4. ábra)*. Az intézetünkben újonnan diagnosztizált AML-es betegek száma megközelítőleg folyamatos növekedést mutatott egészen 2020-ig, amikor is a megelőző évhez képest kevesebb AML-es beteget diagnosztizáltunk, mely összefügghet a SARS-CoV-2 pandémiával *(5. ábra)*. 964 betegnél került sor citogenetikai vizsgálatra, amely alapján kedvező prognózisú csoportba a betegek 13%-a (n=122), az intermedier csoportba 65%-a (n=628), míg a kedvezőtlen csoportba 22%-a (n=214) tartozott *(6. ábra)*. A betegek 48%-a (n=463) normális kariotípusú volt. A molekuláris genetikai vizsgálatok közül az *FLT3-ITD* és *NPM1* vizsgálatokat 2008 óta, a CEBPA mutációanalízist 2014 óta, míg az *FLT3-TKD*, *IDH1* és *IDH2* mutációk vizsgálatát 2018



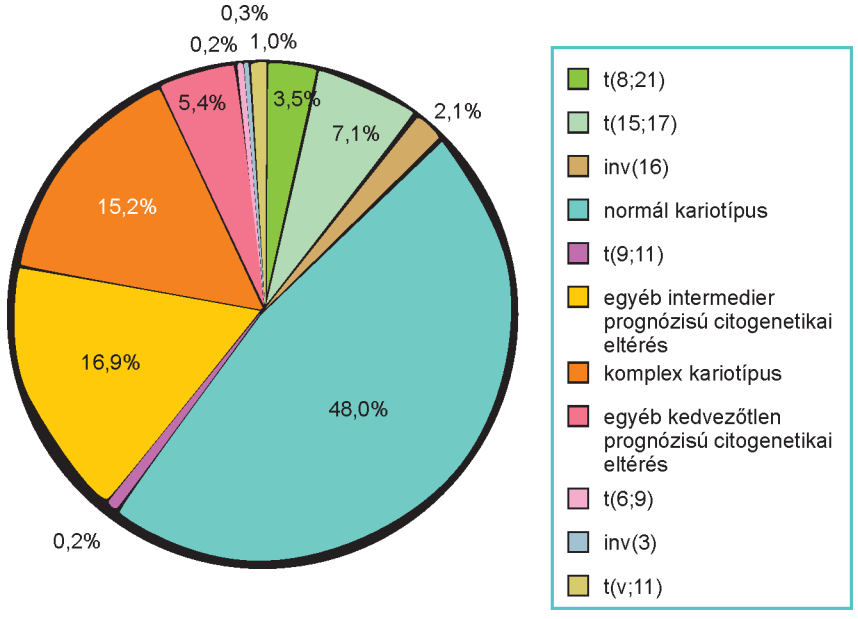
4. ábra: Betegmintákat küldő hematológiai centrumok. Az I. Sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet Onkohematológiai Centrumába az elmúlt 10 évben a Semmelweis Egyetem belgyógyászati klinikáin túl országszerte 16 hematológiai centrumból érkezett vizsgálati minta.



5. ábra: Az I. Sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézetbe újonnan diagnosztizált AML-es betegek száma az elmúlt tíz évben. Az intézetünkben újonnan diagnosztizált AML-es betegek száma az elmúlt tíz évben szinte folyamatos növekedést mutatott egészen 2020-ig, amikor az előző évhez képest 23%-os csökkenés volt megfigyelhető (feltehetően a COVID-19-pandémia miatt).

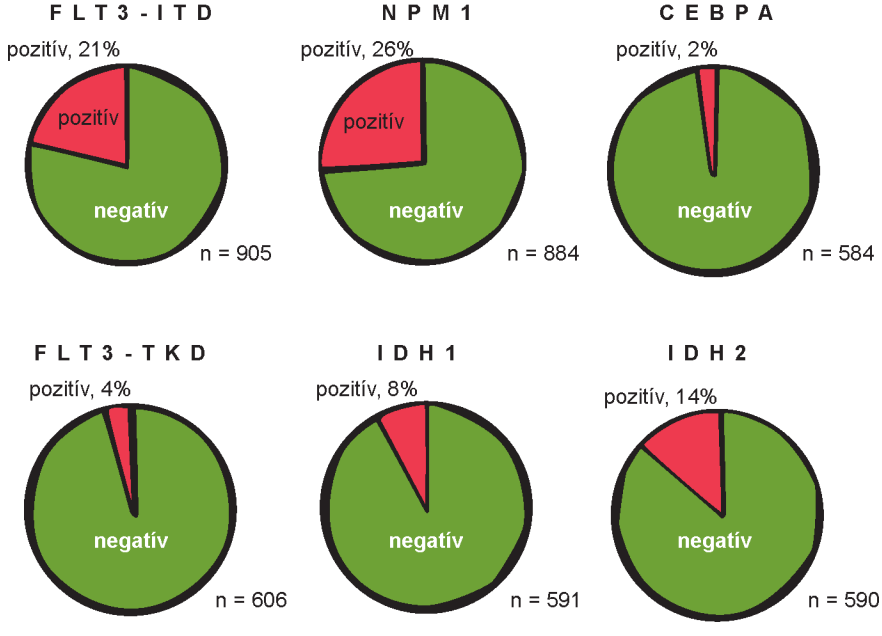
ősze óta végezzük rutinszerűen. Az általunk vizsgált betegpopulációban megfigyelhető mutációk gyakorisága a *7. ábrán* látható.

A pontos rizikóbecsléshez és a megfelelő terápia megválasztásához számos kromoszomális és molekuláris genetikai eltérés vizsgálata szükséges, amelyek egyedi vizsgálata időigényes és költséges folyamat a hagyományos technikákkal. Éppen ezért jelent kiváló lehetőséget az AML diagnosztikájában az NGS alkalmazása, hiszen ezáltal az összes klinikai szempontból releváns gén egyidejűleg vizsgálható. Intézetünkben eddig több mint kétszáz AML-es beteg NGS vizsgálatát végeztük el. Ennek eredményei közül az ELN 2017-es rizikóbesorolás szempontjából érdekes 80, a citogenetikai vizsgálat alapján intermedier prognózissal bíró beteg esetét érdemes kiemelni *(8. ábra)*. A rutinszerűen vizsgált *FLT3-ITD*, *NPM1* és *CEBPA* mutációs státusz alapján kedvező prognózisú 31 beteg 29%-ánál, míg az intermedier prognózisú 49 beteg 30%-ánál detektáltunk *ASXL1*, *RUNX1* vagy *TP53* mutációkat, amelyek

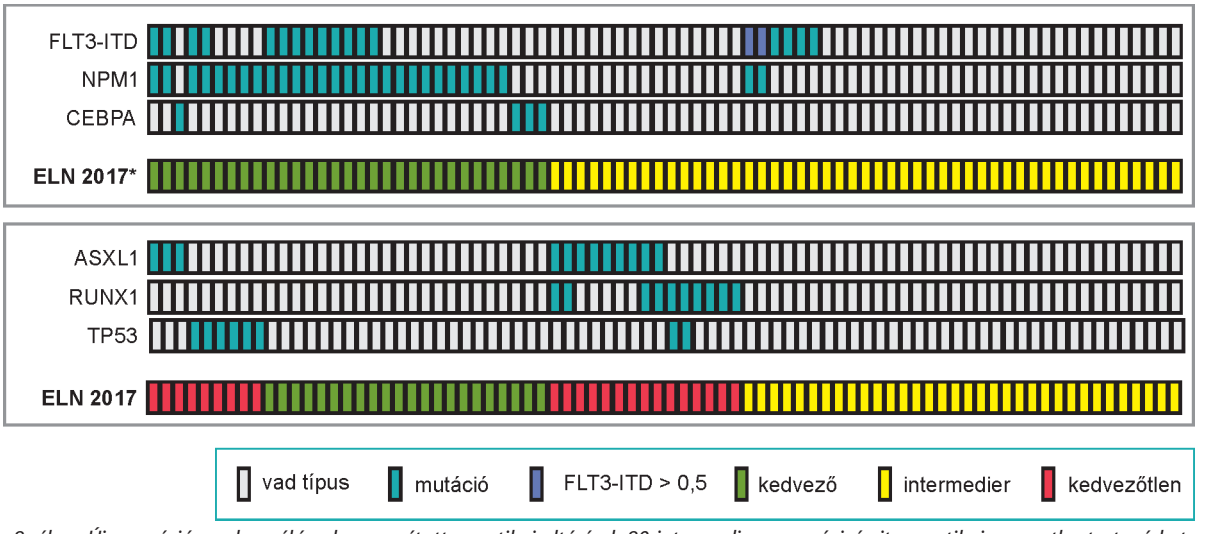


6. ábra: Citogenetikai eltérések a vizsgált betegcsoportban (n=964). A kedvező prognosztikai csoportba tartozó eltérések zöld, az intermedier sárga, míg a kedvezőtlen vörös színnel jelöltek. A t(6;9), az inv(3) és a t(v;11) kedvezőtlen prognózisú és relatíve ritka genetikai eltéréseket a vöröstől eltérő színnel jelöltek a könnyebb áttekinthetőség végett.

kedvezőtlen prognózissal járnak. Vizsgálatunk eredményei alapján az NGS alkalmazásával potenciálisan a betegek harmadánál lehetőség nyílna a nemzetközileg elvárt pontosságú prognosztikai besorolásra. Az elmúlt évben kutatócsoportunk egy saját fejlesztésű eljárást is kidolgozott, amely alkalmas az AML komplex genetikai jellemzésére. Az elkövetkező időszak rendkívül fontos lépése lesz az AML NGS-alapú molekuláris diagnosztika finanszírozásának megteremtése.



7. ábra: Intézetünkben rutinszerűen vizsgált génekben detektált mutációk gyakorisága. A betegekben leggyakrabban az NPM1 (26%), az FLT3-ITD (21%) és az IDH2 (14%) mutációját lehetett kimutatni. A CEBPA mutációk esetében csak a kedvező prognózist jelentő biallélikus mutációt tűntettük fel az ábrán.



8. ábra: Újgenerációs szekvenálással azonosított genetikai eltérések 80 intermedier prognózisú citogenetikai csoportba tartozó beteg esetén. A hőtérképen az oszlopok egy-egy beteget jelölnek. Ha az ELN 2017 rizikóbesorolásból csak a rutinszerűen vizsgált citogenetika eltéréseket, valamint az FLT3-ITD, NPM1 és CEBPA mutációs státuszt vesszük figyelembe (ELN 2017), akkor a kedvező prognosztikai csoportba 31 beteg tartozik, míg az intermedier csoportba 49 beteg. Azonban, ha figyelembe vettük az ELN 2017 rizikóbesorolásba újonnan bekerült ASXL1, RUNX1 és TP53 mutációs státuszát az NGS vizsgálat eredményei alapján, akkor az általunk vizsgált betegek 30%-ánál (24/80) volt kimutatható mutáció a fent említett három génben, amely alapján a betegek a kedvezőtlen rizikócsoportba sorolandók. Az újgenerációs szekvenálási vizsgálat alkalmazása pontosabb rizikóbecslést tett lehetővé. ELN: Európai Leukaemia NET*

Összegzés

Az akut myeloid leukaemiában szenvedő betegek kezelésében jelentős előrelépések történtek az elmúlt években. A pontos rizikóbesoroláshoz és a megfelelő terápiás stratégia megválasztásához azonban átfogó genomikai és transzkriptomikai karakterizálás szükséges, amelyhez a citogenetikai és a hagyományos molekuláris genetikai vizsgálatok mellett szükséges a betegminták modern genomikai módszerekkel való analízise is. A betegek nemzetközileg elvárt pontosságú prognosztikai besorolásához a vizsgálandó gének száma folyamatosan növekszik, és ezzel a tendenciával a hagyományos Sanger-szekvenálással nem lehet lépés tartani. Emiatt napjainkban egyre több laboratórium tér át az NGS alkalmazására, hiszen az ún. célzott újraszekvenálással (génpanelek vizsgálatával) valamennyi klinikailag releváns gén vizsgálatára lehetőség nyílik gyors és költséghatékony módon. Intézetünkben az akut leukaemiák NGS vizsgálata egyelőre a gyermekeknél vált a rutin diagnosztika részévé a Magyar Gyermekleukémia Molekuláris Profilozási Program keretében, azonban várakozásaink szerint a közeljövőben a felnőtt betegek diagnosztikájában is alkalmazásra kerül.

Irodalom

1. Howlader N NA, Krapcho M, Miller D, Brest A, Yu M, Ruhl J, Tatalovich Z, Mariotto A, Lewis DR, Chen HS, Feuer EJ, Cronin KA. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2017, National Cancer Institute. Bethesda, MD, https://seer.cancer.gov/csr/1975_2017/, based on November 2019 SEER data submission, posted to the SEER web site, April 2020. 2020; https://seer.cancer.gov/archive/csr/1975_2017/
2. Granfeldt Ostgard LS, Medeiros BC, Sengelov H, Norgaard M, Andersen MK, Dufva IH, et al. Epidemiology and Clinical Significance of Secondary and Therapy-Related Acute Myeloid Leukemia: A National Population-Based Cohort Study. J Clin Oncol 2015; 33:3641-9.
3. Hulegardh E, Nilsson C, Lazarevic V, Garelius H, Antunovic P, Rangert Derolf A, et al. Characterization and prognostic features of secondary acute myeloid leukemia in a population-based setting: a report from the Swedish Acute Leukemia Registry. Am J Hematol 2015; 90:208-14.
4. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. Blood 2016; 127:2391-405.
5. Fianchi L, Pagano L, Piciocchi A, Candoni A, Gaidano G, Breccia M, et al. Characteristics and outcome of therapy-related myeloid neoplasms: Report from the Italian network on secondary leukemias. Am J Hematol 2015; 90:E80-85.
6. Bluteau O, Sebert M, Leblanc T, Peffault de Latour R, Quentin S, Lainey E, et al. A landscape of germ line mutations in a cohort of inherited bone marrow failure patients. Blood 2018; 131:717-32.

7. Dohner H, Weisdorf DJ and Bloomfield CD. Acute Myeloid Leukemia. N Engl J Med 2015; 373:1136-52.
8. Raska A, Krizsán S, Nagy Z, Demeter J, Bödör C and Tárkányi I. Akut myeloid leukaemiával 2007–2017 között a Semmelweis Egyetem I. Sz. Belgyógyászati Klinikán kezelt betegek adatainak elemzése. Hematológia-Transzfuziológia 2019; 52:215-24.
9. Marcucci G, Mrozek K and Bloomfield CD. Molecular heterogeneity and prognostic biomarkers in adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics. Curr Opin Hematol 2005; 12:68-75.
10. Dohner H, Estey E, Grimwade D, Amadori S, Appelbaum FR, Buchner T, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. Blood 2017; 129:424-47.
11. Grimwade D, Hills RK, Moorman AV, Walker H, Chatters S, Goldstone AH, et al. Refinement of cytogenetic classification in acute myeloid leukemia: determination of prognostic significance of rare recurring chromosomal abnormalities among 5876 younger adult patients treated in the United Kingdom Medical Research Council trials. Blood 2010; 116:354-65.
12. Kantarjian H, Kadia T, DiNardo C, Daver N, Borthakur G, Jabbour E, et al. Acute myeloid leukemia: current progress and future directions. Blood Cancer J 2021; 11:41.
13. Mrozek K. Cytogenetic, molecular genetic, and clinical characteristics of acute myeloid leukemia with a complex karyotype. Semin Oncol 2008; 35:365-77.
14. Haferlach C, Dicker F, Herholz H, Schnittger S, Kern W and Haferlach T. Mutations of the TP53 gene in acute myeloid leukemia are strongly associated with a complex aberrant karyotype. Leukemia 2008; 22:1539-1541
15. Ley TJ, Mardis ER, Ding L, Fulton B, McLellan MD, Chen K, et al. DNA sequencing of a cytogenetically normal acute myeloid leukaemia genome. Nature 2008; 456: 66-72.
16. Cancer Genome Atlas Research N, Ley TJ, Miller C, Ding L, Raphael BJ, Mungall AJ, et al. Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. N Engl J Med 2013; 368:2059-74.
17. Papaemmanuil E, Gerstung M, Bullinger L, Gaidzik VI, Paschka P, Roberts ND, et al. Genomic Classification and Prognosis in Acute Myeloid Leukemia. N Engl J Med 2016; 374:2209-21.
18. Estey E and Dohner H. Acute myeloid leukaemia. Lancet 2006; 368:1894-1907.
19. Colombo E, Alcalay M and Pelicci PG. Nucleophosmin and its complex network: a possible therapeutic target in hematological diseases. Oncogene 2011; 30:2595-609.
20. Ifj. Nagy B, Gángó A, Rejtő L, Krizsán S, Ujfalusi A and Antal-Szalmás P. CEBPA-mutációk vizsgálata és prognosztikai jelentőségük akut myeloid leukaemiában. Hematológia-Transzfuziológia 2019; 52:11-17.
21. Eisfeld AK, Kohlschmidt J, Mims A, Nicolet D, Walker CJ, Blachly JS, et al. Additional gene mutations may refine the 2017 European LeukemiaNet classification in adult patients with de novo acute myeloid leukemia aged <60 years. Leukemia 2020; 34:3215-3227
22. Ngai LL, Kelder A, Janssen J, Ossenkoppele GJ and Cloos J. MRD Tailored Therapy in AML: What We Have Learned So Far. Front Oncol 2020; 10:603636.
23. Schuurhuis GJ, Heuser M, Freeman S, Bene MC, Buccisano F, Cloos J, et al. Minimal/measurable residual disease in AML: a consensus document from the European LeukemiaNet MRD Working Party. Blood 2018; 131:1275-91.
24. Maiti A, DiNardo CD, Daver NG, Rausch CR, Ravandi F, Kadia TM, et al. Triplet therapy with venetoclax, FLT3 inhibitor and decitabine for FLT3-mutated acute myeloid leukemia. Blood Cancer J 2021; 11:25.
25. Lancet JE, Uy GL, Cortes JE, Newell LF, Lin TL, Ritchie EK, et al. CPX-351 (cytarabine and daunorubicin) Liposome for Injection Versus Conventional Cytarabine Plus Daunorubicin in Older Patients With Newly Diagnosed Secondary Acute Myeloid Leukemia. J Clin Oncol 2018; 36:2684-92.
26. Gilliland DG and Griffin JD. The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia. Blood 2002; 100:1532-1542
27. Bacher U, Haferlach C, Kern W, Haferlach T and Schnittger S. Prognostic relevance of FLT3-TKD mutations in AML: the combination matters—an analysis of 3082 patients. Blood 2008; 111:2527-37.
28. Kindler T, Lipka DB and Fischer T. FLT3 as a therapeutic target in AML: still challenging after all these years. Blood 2010; 116:5089-102.
29. Stone RM, Mandrekar SJ, Sanford BL, Laumann K, Geyer S, Bloomfield CD, et al. Midostaurin plus Chemotherapy for Acute Myeloid Leukemia with a FLT3 Mutation. N Engl J Med 2017; 377:454-64.
30. Perl AE, Martinelli G, Cortes JE, Neubauer A, Berman E, Paolini S, et al. Gilteritinib or Chemotherapy for Relapsed or Refractory FLT3-Mutated AML. N Engl J Med 2019; 381:1728-40.
31. Burchert A, Bug G, Fritz LV, Finke J, Stelljes M, Rollig C, et al. Sorafenib Maintenance After Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Acute Myeloid Leukemia With FLT3-Internal Tandem Duplication Mutation (SORMAIN). J Clin Oncol 2020; 38:2993-3002.
32. Xuan L, Wang Y, Huang F, Fan Z, Xu Y, Sun J, et al. Sorafenib maintenance in patients with FLT3-ITD acute myeloid leukaemia undergoing allogeneic haematopoietic stem-cell transplantation: an open-label, multicentre, randomised phase 3 trial. Lancet Oncol 2020; 21:1201-12.
33. Burchert A. Maintenance therapy for FLT3-ITD-mutated acute myeloid leukemia. Haematologica 2021; 106:664-70.
34. Rollig C, Serve H, Noppeney R, Hanoun M, Krug U, Baldus CD, et al. Sorafenib or placebo in patients with newly diagnosed acute myeloid leukaemia: long-term follow-up of the randomized controlled SORAML trial. Leukemia 2021; doi: 10.1038/s41375-021-01148-x
35. Leung AY, Man CH and Kwong YL. FLT3 inhibition: a moving and evolving target in acute myeloid leukaemia. Leukemia 2013; 27:260-8.
36. Piloto O, Wright M, Brown P, Kim KT, Levis M and Small D. Prolonged exposure to FLT3 inhibitors leads to resistance via activation of parallel signaling pathways. Blood 2007; 109:1643-52.
37. Daver N, Cortes J, Ravandi F, Patel KP, Burger JA, Konopleva M, et al. Secondary mutations as mediators of resistance to targeted therapy in leukemia. Blood 2015; 125:3236-45.

38. DiNardo CD, Ravandi F, Agresta S, Konopleva M, Takahashi K, Kadia T, et al. Characteristics, clinical outcome, and prognostic significance of IDH mutations in AML. Am J Hematol 2015; 90:732-6.
39. Kövy P, Kozma A, Bors A, Meggyesi N, Ádám E, Borsy A, et al. Új terápiás célpont akut myeloid leukaemiában: izocitrát dehidrogenáz 1 és 2 mutációk. Hematológia-Transzfuziológia 2019; 52:106-14.
40. Krizsán S, Dénes Z, Gángó A, Gerecs B, Demeter J, Nagy Z, et al. Visszatérő genetikai eltérések vizsgálata akut myeloid leukaemiában az új célzott terápiák tükrében. Hematológia-Transzfuziológia 2019; 52:96-105.
41. Ward PS, Patel J, Wise DR, Abdel-Wahab O, Bennett BD, Coller HA, et al. The common feature of leukemia-associated IDH1 and IDH2 mutations is a neomorphic enzyme activity converting alpha- ketoglutarate to 2-hydroxyglutarate. Cancer Cell 2010; 17:225-34.
42. Short NJ, Konopleva M, Kadia TM, Borthakur G, Ravandi F, DiNardo CD, et al. Advances in the Treatment of Acute Myeloid Leukemia: New Drugs and New Challenges. Cancer Discov 2020; 10:506-25.
43. Chan SM, Thomas D, Corces-Zimmerman MR, Xavy S, Rastogi S, Hong WJ, et al. Isocitrate dehydrogenase 1 and 2 mutations induce BCL-2 dependence in acute myeloid leukemia. Nat Med 2015; 21:178-84.
44. Pollyea DA, Dinardo CD, Arellano ML, Pigneux A, Fiedler W, Konopleva M, et al. Results of Venetoclax and Azacitidine Combination in Chemotherapy Ineligible Untreated Patients with Acute Myeloid Leukemia with IDH 1/2 Mutations. Blood 2020; 136:5-7.
45. DiNardo CD, Jonas BA, Pullarkat V, Thirman MJ, Garcia JS, Wei AH, et al. Azacitidine and Venetoclax in Previously Untreated Acute Myeloid Leukemia. N Engl J Med 2020; 383:617-29.
46. Norsworthy KJ, Ko CW, Lee JE, Liu J, John CS, Przepiorka D, et al. FDA Approval Summary: Mylotarg for Treatment of Patients with Relapsed or Refractory CD33-Positive Acute Myeloid Leukemia. Oncologist 2018; 23:1103-8.
47. Hills RK, Castaigne S, Appelbaum FR, Delaunay J, Petersdorf S, Othus M, et al. Addition of gemtuzumab ozogamicin to induction chemotherapy in adult patients with acute myeloid leukaemia: a meta-analysis of individual patient data from randomised controlled trials. Lancet Oncol 2014; 15:986-96.
48. Irvine DA, Copland M. Targeting hedgehog in hematologic malignancy. Blood 2012; 119:2196-204.
49. Cortes JE, Heidel FH, Hellmann A, Fiedler W, Smith BD, Robak T, et al. Randomized comparison of low dose cytarabine with or without glasdegib in patients with newly diagnosed acute myeloid leukemia or high-risk myelodysplastic syndrome. Leukemia 2019; 33:379-89.
50. Vogler M, Walter HS and Dyer MJS. Targeting anti-apoptotic BCL2 family proteins in haematological malignancies - from pathogenesis to treatment. Br J Haematol 2017; 178:364-79.
51. Vo TT, Ryan J, Carrasco R, Neuberg D, Rossi DJ, Stone RM, et al. Relative mitochondrial priming of myeloblasts and normal HSCs determines chemotherapeutic success in AML. Cell 2012; 151:344-55.
52. DiNardo CD, Pratz K, Pullarkat V, Jonas BA, Arellano M, Becker PS, et al. Venetoclax combined with decitabine or azacitidine in treatment-naive, elderly patients with acute myeloid leukemia. Blood 2019; 133:7-17.
53. Cucchi DGJ, Polak TB, Ossenkoppele GJ, Uyl-De Groot CA, Cloos J, Zweegman S, et al. Two decades of targeted therapies in acute myeloid leukemia. Leukemia 2021; 35:651-660
54. Collignon A, Hospital MA, Montersino C, Courtier F, Charbonnier A, Saillard C, et al. A chemogenomic approach to identify personalized therapy for patients with relapse or refractory acute myeloid leukemia: results of a prospective feasibility study. Blood Cancer J 2020; 10:64
55. Burd A, Levine RL, Ruppert AS, Mims AS, Borate U, Stein EM, et al. Precision medicine treatment in acute myeloid leukemia using prospective genomic profiling: feasibility and preliminary efficacy of the Beat AML Master Trial. Nat Med 2020; 26:1852-858.
56. Bertoli S, Berard E, Huguet F, Huynh A, Tavitian S, Vergez F, et al. Time from diagnosis to intensive chemotherapy initiation does not adversely impact the outcome of patients with acute myeloid leukemia. Blood 2013; 121:2618-26.

SEMMELWEIS KIADÓ SZAK- ÉS TANKÖNYVEI

Onkológia / Ápolás - hospice ellátás

Könyveink megvásárolhatók a Legendus Könyvesboltban, illetve a Líra Kereskedelmi hálózaton belül az egész országban, de egyre nagyobb igényt elégít ki webshopunk.

Vadász Pál

AZ ÁLTALÁNOS MELLKASSEBÉSZET TANKÖNYVE

E-könyv ára: 2500 Ft ■ Könyv ára: 1000 Ft

Kásler Miklós

A KOMPLEX ONKODIAGNOSZTIKA ÉS ONKOTERÁPIA IRÁNYELVEI

E-könyv ára: 3150 Ft ■ Könyv ára: 700 Ft

Hegedűs Katalin

A PALLIATÍV ELLÁTÁS ALAPJAI

E-könyv ára: 2000 Ft ■ Könyv ára: 1500 Ft

Kalabay László

A DAGANATOS BETEGEK GONDOZÁSA

E-könyv ára: 1200 Ft ■ Könyv ára: 600 Ft

Könyvek E-könyvek Folyóiratok Apropó Poszter Box

Semmelweis Kiadó
1089 Budapest, Nagyvárad tér 4.
www.semmelweiskiado.hu

LEGENDUS KÖNYVESBOLT
1089 Budapest, Nagyvárad tér 4.
Tel.: 210-4408, 459-1500/56353
Nyitva tartás: H–Sz: 9.00–16.00,
Cs: 9.00–18.00, P: 9.00–14.00
E-mail: info@semmelweiskiado.hu

VENCLYXTO®▽
venetoklax tabletta

ÁTÜTŐ ERŐ

A CLL KEZELÉSÉNEK TELJES SPEKTRUMÁBAN TARTÓS BETEGSÉGKONTROLL A KEZELÉSMENTES IDŐSZAKBAN IS[1,2]

TÉTELES FINANSZÍROZÁSBAN ELÉRHETŐ[3]*

1L CLL VENCLYXTO + obinutuzumab

12 ciklusig tartó fix idejű terápia[1]

Becsült PFS arány 3 éves utánkövetés alapján:
VenG 81,9% (95% CI: 76,5–87,3)
vs. GC 49,5% (95% CI: 42,4–56,6)[1]

2L+ CLL VENCLYXTO + rituximab

24 hónapos fix idejű terápia[1]

Medián PFS 5 éves utánkövetés alapján:
VenR 53,6 hónap (95% CI: 48,4–57,0)
vs. BR 17 hónap (95% CI: 15,5–21,7)[2]

PFS=Progressziómentes túlélés, VenR=venetoklax+rituximab, VenG=venetoklax+obinutuzumab, BR=bendamusztin+rituximab, GC=obinutuzumab+klorambucil

1. VENCLYXTO® Alkalmazási előírás. www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/venclyxto-epar-product-information_hu.pdf

2. Kater PA et al. Five-Year Analysis of Murano Study Demonstrates Enduring Undetectable Minimal Residual Disease (uMRD) in a Subset of Relapsed/Refractory Chronic Lymphocytic Leukemia (R/R CLL) Patients (Pts) Following Fixed-Duration Venetoclax-Rituximab (VenR) Therapy (Tx). Session 642, Abstract 125, ASH 2020.

3. Magyar Közlöny, 222. Szám. Letöltve: 2019. december 30.

▽ Ez a gyógyszer fokozott felügyelet alatt áll, mely lehetővé teszi az új gyógyszerbiztonsági információk gyors azonosítását. Az egészségügyi szakembereket arra kérjük, hogy jelentsenek bármilyen feltételezett mellékhatást.

Venclyxto 10 mg filmtabletta, Venclyxto 50 mg filmtabletta, Venclyxto 100 mg filmtabletta (venetoklax)
Bővebb információért olvassa el a gyógyszer alkalmazási előírását!
https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/venclyxto-epar-product-information_hu.pdf
Forgalomba hozatali engedély jogosultjának helyi képviselete: AbbVie Kft., 1095 Budapest, Lechner Ödön fasor 7. Telefonszám: +36 1 455 8600.

* A Venclyxto/obinutuzumab kombinációs terápia jelenleg közfinanszírozásban nem részesül. A Venclyxto/rituximab kombinációs kezelés, valamint a Venclyxto monoterápia 2020. január 15-től a 9/1993 NM Rendelet 7/b13. indikációs pontja alapján tételes finanszírozás alá eső kezelés. A közfinanszírozás alapjául elfogadott árak: Venclyxto 10 mg (14x): 23 139 Ft (térítési díj: 23 139Ft); Venclyxto 50 mg (7x): 56 288 Ft (térítési díj: 56 288 Ft); Venclyxto 100 mg (7x): 111 536 Ft (térítési díj: 111 536 Ft); Venclyxto 100 mg (14x): 222 033 Ft (térítési díj: 222 033 Ft); Venclyxto 100 mg (112x): 1 771 412 Ft, (térítési díj: 1 771 412 Ft). Forrás: www.neak.gov.hu. Az aktuális árak megtalálhatók a www.neak.gov.hu oldalon.

HU-VNCCLL-210001
Lezárás dátuma: 2021. 02. 05.

abbvie

A diffúz nagy B-sejtes lymphoma legújabb molekuláris klasszifikációja és ennek terápiás vonatkozásai

New molecular classifications and their therapeutical consequence of diffuse large B-cell lymphoma

Timár Botond
HCEMM-SE Molekuláris Onkohematológia Kutatócsoport, I. Sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet, Semmelweis Egyetem, Budapest
E-levél: timar.botond@med.semmelweis-univ.hu

ÖSSZEFOGLALÁS A diffúz nagy B-sejtes lymphomák (DLBCL) érett B-sejtekből álló magas malignitású neoplasiák, amelyek klinikailag is sokszínű, heterogén csoportot alkotnak. A nagy B-sejtes lymphomák jelenlegi legfrissebb, az Egészségügyi Világszervezet (WHO) által kiadott 2016-os klasszifikációja *(1. táblázat)*[1] is számos alcsoportot különít el. A szervspecifikus altípusok mellett vírusfertőzéssel, krónikus gyulladással asszociált, jellegzetes visszatérő genetikai eltérésekkel asszociált formák, tovább nem klasszifikálható átmeneti entitások vannak. A nagy B-sejtes lymphomák egy jelentős része azonban továbbra is az ún. tovább nem osztályozható csoportba (DLBCL, NOS – „not otherwise specified") tartozik. Ez a csoport az összes non-Hodgkin-lymphoma (NHL) esetek 25–30%-át teszi ki, amellyel így az egyik leggyakoribb felnőttkori lymphoma típus, de fejlődő országok esetén ez az arány még ennél is magasabb lehet.[1] Az utóbbi évek klinikai tanulmányaiban nem sikerült túlélésbeli előnyt kimutatni a standard kemoimmunoterápiás kezelések célzott terápiás szerekkel történő kiegészítésével, melynek hátterében a DLBCL heterogenitása, illetve a jelenlegi klasszifikációs rendszerek pontatlansága állhat. A legújabb molekuláris alapú, multiplatformos analíziseknek köszönhetően jelentős előrelépés történt a csoportosítás terén, amelyek részben a már futó, részben a jövőben induló klinikai vizsgálatok tervezésére is kihatnak, és amelyek segítségével közelebb kerülhetünk a célzott terápia megvalósításához, végső soron pedig az eddigieknél jóval magasabb gyógyulási arányhoz.

KULCSSZAVAK lymphoma, DLBCL, molekuláris klasszifikáció, terápia

SUMMARY The diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) is a clinically heterogeneous, high grade neoplasia composed of mature B-cells. The current WHO classification (2016, 4th edition, 2nd revision) of the large B-cell lymphomas recognises many separate entities *(Table 1.)*.[1] There are several organ specific variants, as well as subtypes associated with viral involvement, chronic inflammation, recurrent genetic alterations and entities that show intermediate features and not further classifiable. However, most of the large B-cell lymphomas still belong to the so called diffuse large B-cell lymphoma, NOS (not otherwise specified) group. These lymphomas account for approx. 25-30% of all non-Hodgkin lymphoma cases and are therefore the most frequent lymphoma types in adults. In recent clinical trials no survival benefit was found with the addition of targeted therapies to standard of care chemoimmunotherapy, which may be due to the underlying heterogeneity of DLBCL and the inaccuracy of current classification systems. Recently, new multiplatform analysis of molecular genetic changes led to new molecular based classifications of this entity. These new classifications are already in use in several past or ongoing or planned future clinical trials in the hope that they may lead to a better patient selection for a more precise targeted therapy which would increase the overall survival of these patients.

KEY WORDS lymphoma, DLBCL, molecular classification, therapy

Rövidítések

ABC	*aktivált B-sejtes*
BTK	*Bruton's Tyrosine Kinase*
CARD11	*Caspase Recruitment Domain-containing protein 11"*
CCG	*candidate cancer genes"*
CLUMPS	*Clustering of Mutations in Protein Structures – protein-struktúra alapú mutáció halmozódás*
COO	*cell of origin – sejteredet*
DA-EPOCH-R	*dose adjusted etoposide, prednisone, vincristine, cyclophosphamide, doxorubicin, rituximab*
DEL	*„double" expresszor lymphoma, együttes BCL2 és MYC expresszió*
DHITsig	*double hit signature – double hit lymphomára jellemző expressziós profil*
DLBCL	*diffúz nagy B-sejtes lymphoma*
DLBCL, NOS	*diffúz nagy B-sejtes lymphoma, másként nem besorolt*
EBV	*Epstein–Barr-vírus*
EFS	*event free survival – eseménymentes túlélés*
FDA	*Food and Drug Administration – amerikai Élelmiszer- és Gyógyszerengedélyeztetési Hivatal*
FFPE	*formalin-fixált paraffinba ágyazott minta*
FL	*follicularis lymphoma*
GCB	*centrum germinatívum B-sejtes*
GEP	*gene expression profile – génexpressziós profil*
HGBL	*high grade B-sejtes lymphoma*
HGBL-DH/TH	*high grade B-sejtes lymphoma, double-hit/triple hit*
HGBL-DH/TH-BCL2	*high grade B-sejtes lymphoma, double-hit/triple hit, MYC és BCL2 eltéréssel*
IPI	*international prognostic index – nemzetközi prognosztikus index*
IRAK2	*Interleukin-1 Receptor-Associated Kinase 2*
IRF4/MUM1	*Interferon Regulatory Factor 4 / Multiple Myeloma 1*
JAK	*Janus kinases*
MALT1	*Mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma translocation protein 1*
MYD88	*Myeloid Differentiation Primary Response 88*
NCCN	*National Comprehensive Cancer Network*
NF-kappaB	*Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*
NHL	*non-Hodgkin lymphoma*
OS	*overall survival – teljes túlélés*
PCNSL	*primer központi idegrendszeri lymphomák*

PFS	*progression free survival – progressziómentes túlélés*	*R-hyper-CVAD*	*hiperfrakcionált Rituximab, Cyclophosphamide, Vincristine, Doxorubicin, Dexamethasone*
PI3K	*Phosphoinositide 3-Kinase*	*SCNA*	*Somatic Copy Number Alteration – szomatikus kópiaszámeltérés*
PMBCL	*primer mediastinalis nagy B-sejtes lymphomák*	*STAT*	*signal transducer and activator of transcription proteins"*
PTLD	*poszt-transzplantációs lymphoproliferatív betegségek*	*SV*	*structural variant – strukturális variáns*
R/R DLBCL	*relabáló/refrakter diffúz nagy B-sejtes lymphoma*	*TLR*	*Toll-Like Receptor*
R-CHOP	*Rituximab, cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, prednisone*	*WES*	*whole exome sequencing – teljes exom szekvenálás*
R-CODOX-M/ VAC	*Rituximab, cyclophosphamide, vincristine, doxorubicin, high-dose methotrexate / ifosfamide, etoposide, high-dose cytarabine*	*WHO*	*World Health Organisation – Egészségügyi Világszervezet*

1. táblázat: A nagy B-sejtes lymphomák WHO osztályozása

Diffúz nagy B-sejtes lymphoma (DLBCL), NOS*		
	Morfológiai variánsok:	
		Centroblastos
		Immunoblastos
		Anaplasticus
		Egyéb, ritka variánsok
	Molekuláris szubtípusok (sejteredet szerinti):	
		Centrum germinatívum B-sejt típus (GCB-DLBCL)
		Aktivált B-sejt típus (ABC-DLBCL)
Egyéb nagy B-sejtes lymphoma entitások		
	T-sejt/histiocyta gazdag nagy B-sejtes lymphoma	
	Primer központi idegrendszeri DLBCL	
	Primer cutan DLBCL, „leg-type"	
	EBV pozitív DLBCL, NOS	
	Krónikus gyulladás asszociált DLBCL	
	Lymphomatoid granulomatosis	
	Nagy B-sejtes lymphoma, IRF4 génátrendeződéssel	
	Primer mediastinalis nagy B-sejtes lymphoma	
	Intravascularis nagy B-sejtes lymphoma	
	ALK-pozitív nagy B-sejtes lymphoma	
	Plasmablastos lymphoma	
	HHV8-pozitív DLBCL	
	Primer effúzionális lymphoma	
High-grade B-sejtes lymphoma (HGBL)		
	High-grade B-sejtes lymphoma MYC és BCL2 és/vagy BCL6 génátrendeződéssel	
	High-grade B-sejtes lymphoma, NOS	
B-sejtes lymphoma, nem klasszifikálható		
	B-sejtes lymphoma, nem klasszifikálható, DLBCL és klasszikus Hodgkin lymphoma közötti átmeneti tulajdonságokkal	

*NOS – „not otherwise specified" – másként nem osztályozható

Bevezetés

A diffúz nagy B-sejtes lymphomában szenvedő betegek nagyjából kétharmada reagál jól az első vonalbeli kemoimmunoterápiákra, ezek a betegek meg is gyógyulnak, míg a betegek egyharmadában primer terápia refrakter vagy relabáló betegség alakul ki, melynek lényegesen kedvezőtlenebb a prognózisa. A különböző terápiákra adott változatos klinikai kimenetel is utalhat a háttérben meghúzódó genetikai sokszínűségre. Jelenleg több klasszifikációs séma is használatban van, amelyek közül a már régóta használt nemzetközi prognosztikus indexnek (IPI) még mindig jelentős szerepe van a klinikai rizikóbesorolásnál, de az IPI-n kívül a sejteredet (cell of origin – COO) meghatározásnak, a különböző „double-hit”/„triple-hit” lymphomákat (DHL/THL) kiszűrő módszereknek is nagy a jelentőségük. Az utóbbi két és fél évben több kísérlet született a DLBCL-ek genetikai eltéréseit figyelembe vevő modern, még precízebb osztályozások kialakítására, melyeknek a mindennapos használatba történő bevonásával az egyes esetek prognózisa és terápiákra adott válasza pontosabban előre jelezhető.

Morfológiai osztályozás

A nagy B-sejtes lymphomák WHO szerinti klasszifikációja ma is még a tumorsejtek morfológiája, immunfenotípusa és egyes genetikai eltérései alapján történik. A diagnosztika során fontos felderíteni az általános tüneteket, a kóroki szempontból jelentős anamnesztikus adatokat (korábbi malignitások, megelőző kemo- vagy radioterápia, illetve autoimmun, vagy immundeficienciával járó kórképek jelenlétét). Annak ellenére, hogy praktikus lenne pusztán molekuláris alapokra helyezett diagnózisokat adni és a tumorokat is e szerint osztályozni, ez a morfológiai vizsgálatok nélkül gyakorta vezetne pontatlansághoz. A diffúz nagy B-sejtes lymphoma (DLBCL, NOS) diagnózisa egy kizárásos folyamat végeredménye, ahol a tumormorfológiát, a fenotípust, valamint a már az előzőekben is említett anamnesztikus adatokat figyelembe véve, egyes specifikus nagy B-sejtes entitásokat és további B-sejtes neoplasiákat kell kizárni. A teljesség igénye nélkül ide tartoznak a jellegzetes szövettani képet mutató primer mediastinalis nagy B-sejtes lymphomák (PMBCL), az EBV-pozitív DLBCL-ek, a pleomorph és blastoid köpenysejtes lymphomák, a poszt-transzplantációs lymphoproliferativ betegségek (PTLD), a primer központi idegrendszeri lymphomák (PCNSL), de az indolens lymphomák transzformációja során kialakuló magas malignitású folyamatok is. A specifikus DLBCL entitások aránya az összes nagy B-sejtes lymphoma nagyjából 10%-át teszik ki. A „maradék” 90% a tovább nem osztályozható diffúz nagy B-sejtes lymphoma (DLBCL, NOS), aminek morfológiája leggyakrabban centroblastos, immunoblastos és anaplasticus lehet, bár jelentősebb prognosztikai információt a morfológiai kép általában nem hordoz.

A „double-hit” és „triple-hit” B-sejtes lymphomák elkülönítésének jelentősége

A jelenlegi WHO klasszifikáció (2016) minden *MYC* transzlokációval együtt *BCL2* és/vagy *BCL6* transzlokációt is mutató úgynevezett „double-hit” vagy „triple-hit” aggresszív B-sejtes lymphomát (DHL, THL) önálló diagnosztikus kategóriaként definiál „high-grade” B-sejtes lymphoma (HGBL) *MYC* és *BCL2* és/vagy *BCL6* génátrendeződéssel vagy „high-grade” B-sejtes lymphoma – double-/triple-hit néven. A DLBCL diagnosztikájában első lépésként ezen HGBL-DH/TH entitások kizárására kell a hangsúlyt fektetni a rosszabb prognózis miatt. *MYC* átrendeződés a DLBCL-ek 10–15%-ában detektálható. Az önállóan előforduló *MYC* átrendeződés az esetek 5%-át teszi. A *MYC* átrendeződéshez társuló *BCL2* érintettség (HGBL-DH-*BCL2*) 6%-ot, a MYC mellett a *BCL6* gén átrendeződésével járó esetek pedig 1%-ot tesznek ki. A TH-esetek szintén 1%-ra tehetők.[2] Eleinte a DH/TH folyamatok kezelésére alkalmazott kemoterápiák (rituximabbal vagy anélkül), nem mutattak szignifikáns túlélésbeli különbséget (2 éves túlélés alacsonyabb mint 50%), így ezen entitások kezelésére intenzívebb sémákkal próbálkoztak (pl. DA-EPOCH-R, R-hyper-CVAD, R-CODOX-M/IVAC).[3] Megemlítendő, hogy egyetlen klinikai vizsgálat sem bizonyította egyértelműen az intenzívebb kemoterápiás kombinációk előnyét ebben az alcsoportban.[4] Figyelemre méltó, hogy az újabb tanulmányokban, ahol a DH/TH genetikai eltérések kimutatására minden esetben elvégezték a fluoreszcens *in situ* hibridizációs (FISH) vizsgálatot, az 5 éves progressziómentes túlélés (PFS) a HGBL-DH/TH esetekben R-CHOP (rituximab, cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, prednisone) használata mellett a 60%-ot is elérte.[5, 6] Ennek feltehetően az az oka, hogy korábban a DH/TH esetek felderítésére végzett FISH vizsgálatokat csak az agresszívebbnek tűnő morfológiai esetekben végezték el és így a DH/TH esetek egy része diagnosztizálatlan maradt. A DLBCL-ek rutin kivizsgálása során ezért kiemelt jelentősége van ennek

a vizsgálatnak és a mai ajánlások szerint minden egyes esetben el kellene végezni.

DLBCL, NOS diagnózis esetén a génexpressziós profil analízis alapján meghatározott sejteredet („cell of origin" – COO) szubtípust is meghatározzuk.

Sejteredet (COO) meghatározás génexpressziós profil és immunhisztokémia alapján

Az első jelentősebb lépést a DLBCL komplexitásának feltárásában a génexpressziós profil meghatározás (GEP) jelentette. A 2000-es évek elején a cDNS-alapú microarray vizsgálatok eredményének analízise vezetett a DLBCL két fő sejteredet típusának azonosításához. A „centrum germinativum B-sejt" géncsoport expressziójához hasonlító csoportot centrum germinativum típusú DLBCL-nek (GCB-DLBCL), az in vitro aktivált B-sejtek expressziós profiljára utaló csoportot pedig aktivált B-sejt típusú DLBCL-nek (ABC-DLBCL) nevezték el. A két domináns csoporton felül volt egy harmadik csoport is, amely a nem klasszifikálható („unclassified") nevet kapta. A GCB-szerű alcsoportba tartozó eseteknél például a 2p kromoszómán található *c-REL* gén amplifikációját lehetett gyakrabban megfigyelni és jellemző volt a csoportra a centrum germinativum asszociált B-sejt fejlődéssel összekötött felszíni fehérjéket kódoló gének fokozott expressziója, így a *CD10*, *BCL6* géneké is. Az ABC-szerű csoportba tartozó eseteknél a keringő, aktivált B-sejtekre jellemző gének expresszió volt megfigyelhető. Az ABC-DLBCL kialakulásában két fő mechanizmus játszik szerepet, amelyek közül az egyik az NF-κB jelátviteli út konstitutív aktivációja, a másik a terminális plazmasejt irányú differenciáció blokkja. Így a csoportra az NF-κB útvonal célgénjeinek expressziója és az *IRF4*/*MUM1, FLIP* és *BCL2* gének expressziója is jellemző volt.[7] A vizsgálat máig nagy jelentőségét az adja, hogy az alcsoportok klinikai lefolyása jelentős eltérést mutat és mind a rituximab előtti, antraciklin alapú kemoterápia (ABC-alcsoport 35%-os, GCB-alcsoport 60%-os 5 éves túlélés), mind a később használatos elsővonalbeli R-CHOP esetén (45%- és 80%-os 3 éves túlélés, ABC-, illetve GCB-alcsoport) is megmaradt a különbség a két csoport között.[8]

A microarray alapú sejteredet klasszifikáció magas költsége, laborintenzív jellege tette szükségessé az immunhisztokémiai (IHC) alapú módszerek kidolgozását. A felállított algoritmusok száma az évek során folyamatosan gyarapodott, de reprodukálhatóságuk, prognosztikai értékük és a GEP-pel való gyengébb korrelációjuk miatt jelentőségük máig vitatott. A legszélesebb körben a Hans-féle algoritmus terjedt el, ami a CD10, BCL6 és MUM1 antigének expressziója alapján határoz meg centrum germinativum típusú (GCB), illetve az ABC-szerű és „unclassified" mintákat magába foglaló, non-GCB csoportokat. Ezekkel az algoritmusokkal kapott sejteredet a továbbra is arany-standardnak számító GEP besorolással nem mutat teljes átfedést.[9] Az immunhisztokémiai vizsgálat szenzitivitása ~70% körüli a GCB- és ~90% körüli a non-GCB csoport esetén.[10] Az immunhisztokémia hátrányai közé tartozik, hogy a különböző módszerek között kifejezetten alacsony konkordancia volt megfigyelhető.[11]

Néhány vizsgálat a *MYC* és *BCL2* fehérjéket fokozottan expresszáló („double expressor" lymphoma (DEL)), de *MYC* és *BCL2* átrendeződés nélküli DLBCL-ek rosszabb túlélését mutatták ki. Ezek az esetek gyakrabban a non-GCB csoportból kerülnek ki, de rosszabb kimenetelük feltehetően független a COO besorolástól. A standard és az intenzívebb kezelésre adott válaszokban azonban jelentős különbség eddig nem volt kimutatható, így elkülönítésük jelentősége ma még kérdéses.[12]

Nanostring / sejteredetet meghatározó molekuláris módszerek

Az GEP alapú klasszifikációt nehezebben követő immunhisztokémiai besorolás helyett, a GEP analízisnél gyorsabb és olcsóbb megoldásként jöhet szóba az mRNS transzkriptumok kvantitatív elemzésére alkalmas NanoString nCounter rendszer, ami egy magas szenzitivitást és reprodukálhatóságot biztosító eljárás. DLBCL esetén a friss fagyasztott minták mellett a könnyebben hozzáférhető formalinfixált paraffinba ágyazott mintákon (FFPE) is elvégezhető vizsgálat 20 gén (15 gén + 5 „housekeeping" gén) expressziója alapján a gének abszolút expressziójából és súlytényezőkből egy ún. „linear predictor score" (LPS) értéket ad meg. Az LPS alacsony értéke a GCB csoportra, magas értéke pedig az ABC csoportra jellemző. Ha az LPS köztes értéket mutat, a minta ABC/GCB szerint nem besorolható, és az „unclassified" csoportba kerül. A hagyományos GEP analízissel összehasonlítva a friss fagyasztott mintákon a sejteredetet tekintve 95% feletti az egyezés.[13]

COO klasszifikáción alapuló klinikai vizsgálatok

Ahogy az egyre pontosabb és megbízhatóbb sejteredet meghatározás közelebb kerül a mindennapi alkalmazás lehetőségéhez, megjelentek GCB és ABC alcso-

portokra specifikus terápiás lehetőségeket célzó klinikai kutatások. Ilyen lehetőségeket rejthet az ABC-DLBCL-ben konstitutív aktivitást mutató NF-κB jelátviteli út, ami az NF-κB aktivitást szabályozó proteaszóma inhibitor bortezomib, BTK-inhibitor ibrutinib és a komplex hatásmechanizmusú lenalidomid potenciális ABC-specifikus alkalmazását veti fel.

Elsővonalbeli kezelést illetően a rossz prognózisú non-GCB csoportban új célzott kemoterápiás szerek alkalmazásával több klinikai kutatás is javulást mutatott ki.[14] Egy fázis I/II vizsgálatban bortezomib (az NF-κB inhibitor IκBα degradációját csökkenti) bevezetésével rituximabbal (R) kiegészített szisztémás kemoterápia mellé non-GCB populációban a GCB-DLBCL-es betegcsoport PFS és OS értékeihez hasonló eredményeket sikerült elérni.[15] Újabban viszont a REMoDL-B fázis III vizsgálat, COO-tól függetlenül sem tudott mérhető PFS-t elérni a bortezomib hozzáadásával, pedig a vizsgálat során a COO besorolás a pontosabb teljes transzkriptom génexpressziós profil analízis alapján történt.[16]

A PHOENIX fázis III, placebokontrollált kutatás ibrutinibbel kiegészített R-CHOP kombináció hatékonyságát vizsgálta korábban kezeletlen, Hans-algoritmus alapján non-GC DLBCL-es betegeken. A GEP vizsgálatok újgenerációs szekvenálás (Next Generation Sequencing, NGS) alapú EdgeSeq eljárással történtek. Az elvárásokkal ellentétben az immunhisztokémiával meghatározott non-GC és a GEP-pel meghatározott ABC szubpopulációkban az R-CHOP kezelés ibrutinibbel való kiegészítése nem javította a terápia hatékonyságát. További analízisek viszont azt mutatták, hogy jelentős összefüggés van a betegek életkora és a kezelés hatékonysága között. A 60 év alatti betegpopulációban az ibrutinib és R-CHOP közös alkalmazása megnyúlt eseménymentes túlélést (EFS), progressziómentes túlélést (PFS) és teljes túlélést (OS) eredményezett. A súlyos mellékhatások aránya a 60 év alatti és fölötti populációban egyaránt magasabb volt a placebo és a csak R-CHOP kezelésben részesült populációhoz képest. Ez a 60 év alattiak körében nem befolyásolta az R-CHOP ciklusok számát, ellenben az idősebb korosztályok esetén a hozzáadott ibrutinib által megnövekedett mellékhatások száma több esetben is az R-CHOP kezelés felfüggesztéséhez vezetett.[17]

A lenalidomiddal kiegészített R-CHOP terápia (R2CHOP) az ECOG-ACRIN1412 újonnan diagnosztizált DLBCL-es betegeken végzett fázis II randomizált vizsgálata a progressziómentes túlélést tekintve szignifikáns javulást mutatott.[18] További két R2CHOP terápiát alkalmazó fázis II kinikai vizsgálat a non-GC csoport kétéves teljes túlélésének GCB sejteredetű DLBCL-hez való felzárkóztatását érte el (a sejteredet meghatározás mindkét vizsgálat során immunhisztokémiával történt).[19,20] A lenalidomiddal kiegészített R-CHOP terápia hatékonyságát génexpressziós profil alapján elkülönített újonnan diagnosztizált ABC-DLBCL-es populáción vizsgáló fázis III ROBUST klinikai vizsgálat jelenleg is folyamatban van.[21] A lenalidomid a 2020-as NCCN (National Comprehensive Cancer Network) ajánlások között FDA (Amerikai Élelmiszer- és Gyógyszerengedélyeztetési Hivatal) engedélyezett opcionális első vonalbeli konszolidációs terápiás szerként szerepel 60 és 80 éves kor közötti betegek számára.

A fázis Ib/II CAVALLI vizsgálatban a kemoimmunterápiát a *BCL2*-gátló venetoclax adásával egészítették ki. A vizsgált esetekben a COO szubtípus meghatározás mellett a *BCL2* és MYC magas expresszióját is figyelembe véve határozták meg ezek prediktív értékét. Az eredményeket a régebbi GOYA kísérlettel összevetve azt találták, hogy a klinikai kimenetel a double expresszor lymphomákban (DEL) jobb lett, de nem volt különbség a GCB/non-GCB csoportok között. Ugyanakkor a különböző vizsgálatok közötti összehasonlítást mindig érdemes fenntartásokkal kezelni és a kérdés megválaszolásához új tanulmányokat tervezni.[22]

Relabáló, betegség reftakter DLBCL (R/R DLBCL) kezelése

A jelentősen kevesebb rendelkezésre álló klinikai adatmennyiség miatt relabáló DLBCL-ben nehezebb meghatározni a sejteredet terápiás jelentőségét. Az ABC-szerű alcsoportok első vonalbeli terápiára mutatott kedvezőtlen válasza a relabáló populációban annak arányosan magasabb reprezentáltságát sugallja, de ez egyes kutatások fényében megkérdőjelezhető.[14] Egy fázis I/II klinikai vizsgálatban R/R DLBCL-es betegeken vizsgálták az ibrutinib monoterápia alkalmazását, ahol a COO alcsoport meghatározás génexpressziós profil (GEP) vizsgálattal történt. Az ABC alcsoportban 37%-ban volt kiváltható teljes- vagy részleges válasz, míg a GCB alcsoportban ez csupán 5% volt.[23] A lenalidomid R/R ABC-DLBCL-ben való alkalmazásának előnyeit számos kutatás alátámasztotta már.[14]

Az előzőekben említett korai (fázis I/II) tanulmányok mutattak biztató eredményeket, de a COO alapú fázis III vizsgálatoknak nem sikerült kielégítő terápiás különbségeket kimutatni a vizsgált csoportokban. Ennek oka feltehetően az, hogy a COO klasszifikációk nem kellően pontosak és a terápia szempontjából fontos genetikai eltéréseket nem tükrözik. Részben a fenti

sikertelenségek miatt további GEP alapú és újabb molekuláris genetikai alapú klasszifikációs rendszerek kerültek kidolgozásra.

További génexpresszió alapú klasszifikációk

A sejteredet (COO) alapú besoroláson kívül más transzkriptomikai klasszifikációra is történtek kísérletek. Génexpressziós vizsgálattal az alapvetően kedvezőbb prognózisú GCB-DLBCL-eken belül elkülöníthető egy ún. „DHITsig" csoport, melynek génexpressziós profilja a kedvezőtlen prognózisú HGBL-DH/TH-BCL2 lymphomákra jellemző.[24] A GEP jellemzők alapján az összes vizsgált, FISH-sel igazolt HGBL-DH/TH-BCL2 eset „DHITsig" szubtípusba került egy nagyjából hasonlóan nagy mintaszámú DLBCL, NOS eset (non-HGBL-DH/TH-BCL2) mellett. Fontos megjegyezni, hogy a „DHITsig" csoportba sorolt HGBL-DH/TH-BCL2, illetve FISH-sel igazolható transzlokációval nem rendelkező esetek hasonló túlélést mutattak R-CHOP kezelés után. Génexpressziós profilozással a FISH alapú teszteléshez képest a rossz prognózisú GCB sejteredetű HGBL esetek aránya mintegy megkétszereződik. Újabb eredmények arra is rámutatnak, hogy a *MYC* és *BCL2* gének átrendeződései a „DHITsig" pozitív esetek ~20%-ában FISH-sel ki nem mutatható módon, ún. kriptikus eltérésként lehetnek jelen, ami alapján ennek a csoportnak a molekuláris alapú elkülönítése pontosabb képet adhat a GCB-DLBCL alcsoporton belüli agresszívebb kimenetelt mutató esetekről.[25] A „DHITsig" alcsoporttal nagyban átfedő, a DLBCL és Burkitt-lymphomákhoz (DLBCL/BL) hasonló génexpressziós tulajdonságokkal rendelkező, rossz prognózisú alcsoport is azonosítható GEP-pel, amelyet molekuláris „high-grade" DLBCL-nek (MHG-DLBCL) neveznek.[26] Ezekre az eredményekre épülő frissebb tanulmányban az MHG-DLBCL alcsoportba tartozó esetek új generációs szekvenálásával (NGS) olyan gyakoribb genetikai eltérések kerültek azonosításra (többek között a *MYC* génben megfigyelt mutációk), amelyek follicularis lymphomára (FL), illetve transzformált FL-ra jellemzőek. Az eredmények felvetik, hogy a HGBL-DH-BCL2 és a csak *BCL2* génátrendeződést mutató (single hit) DLBCL-ek FL-ból, esetleg a FL prekurzor lézióból alakulhatnak ki.[27] A „DHITsig" és MHG-DLBCL-eknek a genetikai háttere nagyon hasonló: halmozottan figyelhetők meg mutációk az epigenetikai módosítókban, így az *EZH2*-ben és *CREBBP*-ben. Egyes Burkitt-lymphomában (BL) gyakoribb mutációk, így a *DDX3X* és a *BCL7A* eltérései is gyakoribbak ebben a csoportban, ugyanakkor más specifikusabb BL-re jellemző eltérések nem figyelhetők meg (pl. *ID3, TCF3*),[28] ami a két entitás (DLBCL és BL) közötti tulajdonságokat hordozó szubtípusra utal. Ezen eredmények alapján az eddigi HGBL-DH/TH és GCB-DLBCL entitások közötti határokat érdemes lehet újra definiálni.

További génexpressziós vizsgálatok mind a GCB, mind az ABC csoportban megfigyelhető újabb molekuláris profilokat azonosítottak, amelyek a tumor mikrokörnyezettel vannak összefüggésben és amik a betegség kimenetelével is korrelációt mutatnak. A prognosztikailag kedvezőbb csoportot alkotó „stromal-1" expressziós profil aktív immunrendszert, újraprogramozott stromalis sejteket és extracelluláris mátrixot takar. A kevésbé kedvező kimenetelt mutató „stromal-2" csoport fokozott angiogenezissel és érsűrűséggel jellemezhető. Az eredmények arra utalnak, hogy a metabolikus és mikrokörnyezeti hatások is jelentős mértékben hozzájárulnak a DLBCL-ek patogeneziséhez. Ezeket a molekuláris profilokat viszont csak újabban sikerült könnyebben kivitelezhető platformokra helyezni, amik segítségével lehetővé vált a betegek szelekciója és ezáltal a megfelelő terápiás módszer kiválasztása.[29,30]

A DLBCL genetikai eltérései és mutációs profilja

A sejteredet (COO) meghatározás részleges magyarázattal szolgált arra, hogy miért reagálnak a betegek különböző módon a DLBCL kezelésének egyik lehetséges célzott terápiájára, a B-sejt-receptor jelátviteli út inhibitorára, az ibrutinibre.[23] Ugyanakkor a COO alapú elkülönítés nem ad teljes magyarázatot arra, hogy miért ilyen heterogén az akár R-CHOP-ra, akár a célzott terápiára adott válasz és a betegség kimenetele. A génexpressziós analízisek elsősorban a tumor fenotípusára utaló eltéréseket mutatnak ki, így nem adják vissza azt a genetikai sokszínűséget, amellyel a DLBCL jellemezhető.

A DLBCL kialakulásában szereplő eltérések okai lehetnek kromoszomális transzlokációk, az aberráns szomatikus hipermutáció által generált génmutációk, alacsony frekvenciájú sporadikus pontmutációk, strukturális variánsok (SV) és kópiaszám eltérések (SCNA). A legújabb tanulmányok integrált genetikai és matematikai modellezéssel próbálják a DLBCL-eket, részben sejteredet meghatározástól függetlenül, osztályozni. Ilyen osztályozást javasoltak 2018-ban Schmitz és munkatársai (National Cancer Institute, USA – NCI), valamint Chapuy és munkatársai (Harvard, USA), akik

a DLBCL genetikai altípusait teljes exom (WES), transzkriptom- és célzott amplikonszekvenálással, valamint DNS-kópiaszám-analízissel határozták meg.[31-33] A két csoport alapvetően hasonló, de egymásnak teljesen nem megfeleltethető genetikai klasszifikációját egy harmadik kutatócsoportnak sikerült tovább finomítani.[34]

Schmitz és munkatársai a genetikai eltérések együttes előfordulásai alapján olyan algoritmust állítottak fel, amin keresztül négy kiemelkedő genetikai alcsoportba sorolhatók a DLBCL-ek, amit a csoport később kiegészített továbbiakkal: MCD (*MYD88* és *CD79B* mutációkkal), BN2 (*BCL6* fúzió és *NOTCH2* mutációval), N1 (*NOTCH1* mutációval), EZB MYC+, illetve EZB MYC- (*EZH2* mutáció, *BCL2* transzlokációval és *MYC* eltéréssel vagy a nélkül), ST2 (JAK2/STAT3, NF-κB), A53 (TP53 inaktiváció). A kapott klasszifikációs rendszer hátránya, hogy csak az összes vizsgált eset 47%-át (első tanulmány), illetve 57%-át tudták csak besorolni a fenti kategóriákba.[31,33]

A DLBCL-ben is kimutathatók random módon megjelenő és a determinisztikus szelekció hatására fennmaradó genetikai aberrációk, amik a progressziót vezérlik (driver mutációk).

Chapuy és munkatársai fagyaszott anyagokon felül FFPE-s mintákat is feldolgoztak. A DLBCL-ek teljes exom szekvenálásával (WES) közel 100 potenciális tumorgenezis driver gént („candidate cancer gene" – CCG) azonosítottak, köztük már korábban is mutációs driver-ként ismert géneket, mint a tumorszuppresszor *TP53*-at; a kromatin módosító *KMT2D*, *CREBBP* és *EP300*-at; BCR, TLR és NF-κB szignálútvonalak elemeit, mint *CD79B*, *MYD88*, *CARD11* és *TNFAIP3*; RAS útvonal elemeket, mint *KRAS* és *BRAF*; a NOTCH2 és NOTCH szignál módosító *SPEN*-t; és immunmodulációs útvonal komponenseket, mint *B2M*, *CD58*, *CD70* és *CIITA-t*. Emellett a DLBCL patogenezisében eddig le nem írt CCG-ket is azonosítottak: BCR, TLR és NF-κB szignálútvonal-szabályozó géneket, hiszton géneket, *IL6*, *CCL4* és a PD1 ligand CD274-et. A fehérjék 3D-s térszerkezetét is figyelembe vevő halmozott mutációk elemzésével (Clustering of Mutations in Protein Structures – CLUMPS) további CCG-k feltárására került sor. A módszer rálátást nyújtott egyes mutációk valószínűsíthető funkciójára is.[35] A kromoszómaátrendeződések és a szomatikus kópiaszám eltérések (SCNA) vizsgálata az esetek 64%-ában tárt fel legalább egy strukturális kromoszómaaberrációt, többnyire géneket erős regulátor elemek mellé helyező transzlokációkat, ahol az *IGH*, *BCL2*, *BCL6* és *MYC* gének voltak a leggyakrabban átrendeződött gének.[32] A visszatérő SCNA-k vizsgálata a WES adatok elemzésén keresztül történt, aminek során 18 kromoszómakar-szintű és 18 fokális génamplifikációt; illetve 2 kromoszómakar-szintű és 32 fokális deléciót fedtek fel, 5% és 32% közötti előfordulási gyakorisággal. Az így meghatározott driver mutációk prognosztikai jelentőségének vizsgálata progressziómentes túlélést (PFS) és teljes túlélést (OS) tekintve rituximabbal kiegészített szisztémás kemoterápiában részesülő betegcsoportban azt mutatta, hogy az 1q42.12 deléció, *MYC* SV-k és 18q21.33/BCL2, 13q31.3/miR-17-92, és 18p amplifikációk egymástól függetlenül a rosszabb PFS prediktorai, és a *MYC* SV-k, 13q31.3 amplifikáció és 1q41.12 deléció megrövidült teljes túléléssel (OS) társultak önállóan és az IPI-vel együtt vizsgálva is. Az egyes DLBCL mintákon észlelt genetikai driverek száma medián 17-nek bizonyult, az együtt előforduló driverek nemnegatív mátrix faktorizációval.[36] történő elemzésével 5 meghatározott genetikai mintázattal rendelkező tumorcsoportot határoztak meg, az úgynevezett C1-C5 klasztereket és a C0 klasztert, utóbbi csoportot a jellegzetes genetikai eltérés hiánya vagy alacsony száma jellemezte.

Lacy és munkatársai a fenti tanulmányoknál nagyobb esetszámmal (n = 928) dolgozva 293 génes panelt használtak a vizsgálatukhoz, de az elemzés nem tartalmazott SV-ra, SCNA-re utaló információkat. A halmozottan előforduló genetikai eltérések alapján öt különböző csoportot azonosítottak: MYD88, BCL2, TET2/SGK1, SOCS1/SGK1, és NOTCH2.[34]

Az MCD csoportban, amely a C5[32] és MYD88[34] csoportokhoz igazodik, és a sejteredetet tekintve az ABC spektrumba tartozik, halmozottan találhatók meg a *MYD88* gén ($MYD88^{L265P}$) és a CD79B gén mutációi, amelyek végső soron az NF-κB jelátviteli út aktivációjához vezetnek. Egy újabb klinikai tanulmány alapján ugyan a *MYD88* mutánst hordozó esetek nem reagáltak jól a BTK-gátlásra, de a *MYD88* és *CD79A*/B mutációk együttes előfordulása esetén kivételesen jó terápiás válasz érhető el ibrutinibbel.[23] A csoportra jellemzőek a 18q kromoszómaaberrációk is (többlet/amplifikáció), ahol a 18q21 szubkromoszómális régióban több driver-gén, így a *BCL2*, *NFATC1* és a *MALT1* is megtalálható. Ennek gyakori következménye a BCL2 fokozott expressziója, ami rosszabb prognózissal jár. Ebben a régióban található a *TCF4* gén is, aminek az eltérései a *MYC* gén enhancer szakaszának szabályozásán keresztül fokozott MYC expresszióhoz vezet.[37] Az MCD csoportba halmozottan fordulnak elő még a *PRDM1* (*BLIMP1*) és *SPIB* gének elváltozásai is. A *SPIB* egy olyan transzkripciós faktort kódol, ami az IRF4-gyel együtt ABC-fenotípust határoz meg és a plazmasejt irá-

CHAPUY ET AL.	WRIGHT ET AL.		LACY ET AL.	GÉNEXPRESSZIÓS PROFIL	MUTÁCIÓS PROFIL	PROGNÓZIS	POTENCIÁLIS CÉLPONT
C1	BN2		NOTCH2	COO független (ABC>GCB)	BCL6 SV; NOTCH2 jelátvitel komponensei; *BCL10, TNFAIP3, SPEN, FAS, CD70* mutációk	jó/rossz	BTK, PI3K, BCL2
C2	A53		–	COO független	*TP53* inaktiváció; CNA-k (*CDKN2A,RB1); NFKBIZ, CNPY3, BCL2* amplifikációk	közepes (kontextus-függő)	BTK
C3	EZB	MYC+	BCL2	GCB (+DHTsig, +MYC eltérés)	*BCL2, EZH2, TNFRSF14, CREBBP, EP300, KMT2D, STAT6, MTOR, GNA13, PTEN, MYC*	rossz	EZH2, BCL2, PI3K
		MYC-		GCB		jó	EZH2, BCL2, PI3K
C4	ST2		TET2/SGK1	GCB	*SGK1, TET2, P2RY8*, hiszton gének	nagyon jó	PI3K, JAK
			SOCS1/SGK1		SGK1, SOCS1, hiszton gének		
C5	MCD		MYD88	ABC	MYD88, CD79B, PIM1, SPIB, CDKN2A	rossz	BTK, PI3K, BCL2, JAK, IRF4
–	N1		NOTCH2?	ABC	NOTCH1, IRF2BP2, BCOR, IKBKB	nagyon rossz	ICI NOTCH1

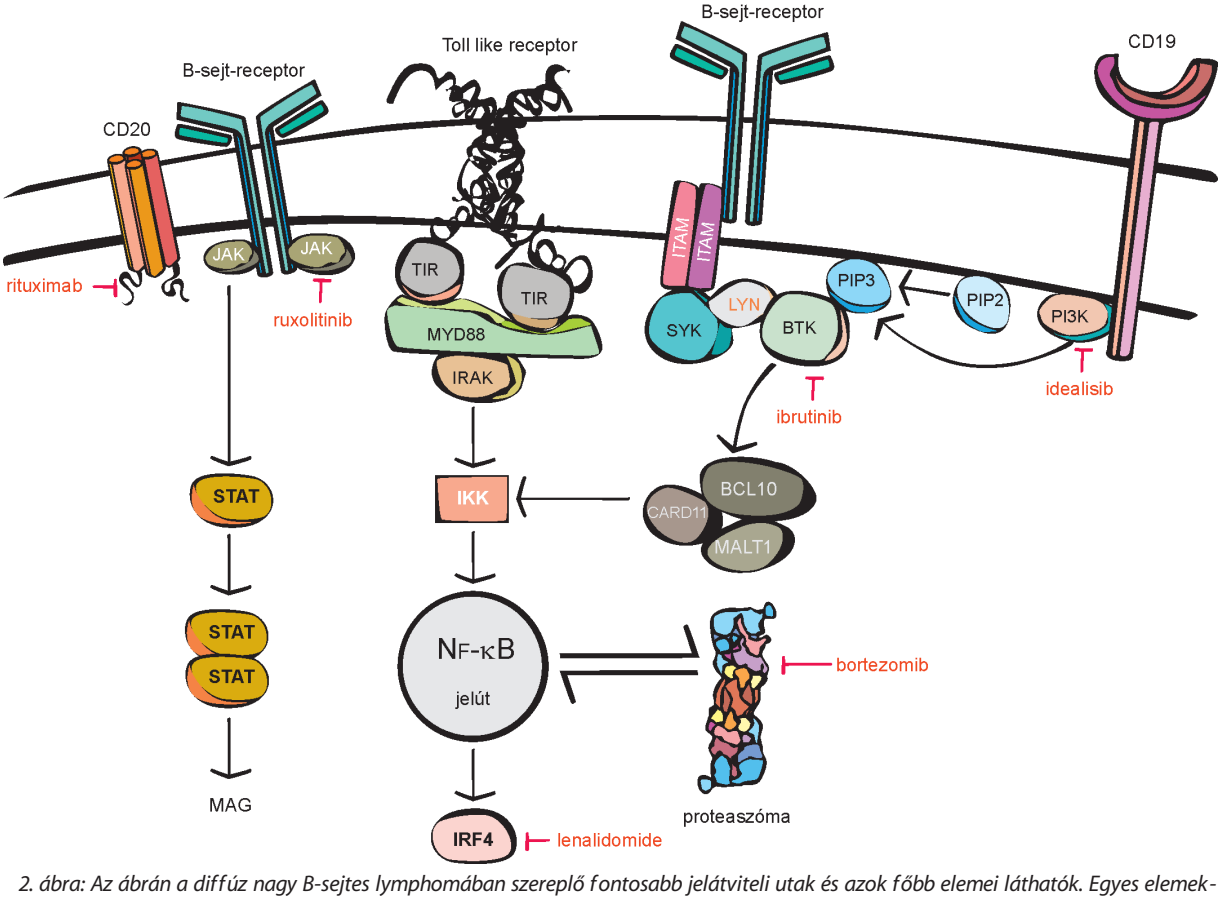
1. ábra: A három nagy molekuláris klasszifikációt javasló tanulmány összehasonlítása.
COO: „cell of origin", sejteredet alapú osztályozás, ABC: aktivált B-sejtes génexpressziós mintázat, GCB: centrum germinatívum B-sejtes génexpressziós mintázat, OS: teljes túlélés, SV: strukturális variáns, DHITsig: double hit lymphomára jellemző génexpressziós mintázat[31-34]

nyú differenciációt segíti elő. A teljes differenciációt a PRDM1-et inaktiváló mutációk akadályozzák meg.[38] A *TP53* tumorszuppresszor gén mutációi ebben a csoportban fordulnak elő a legalacsonyabb arányban.[31]

A BN2 csoport, ami a C1 és NOTCH2 csoportokkal mutat átfedést, sejteredet alapján elsősorban az ABC-DLBCL és az „unclassified" DLBCL eseteket foglalja magában. Az ide tartozó esetek az előző csoporthoz képest kedvezőbb klinikai kimenetelt mutatnak. Jellemzőek a BCL6 transzlokációk, a *NOTCH2* aktiváló mutációi és az esetek egy részében az NF-κB aktivációja is, amit leggyakrabban a *TNFAIP3* deléciója és *BCL10* gén amplifikációja okoz. A gyakoribb *TMEM30A* mutáció a fokozott phagocyta aktivitáson és a kemoterápiás szerek akkumulációján keresztül vezet kedvezőbb prognózishoz.[39]

Az EZB csoportba tartozó legtöbb eset az előzőekkel ellentétben inkább a GCB-DLBCL-ek közé tartozik és fő jellemzőjük az *EZH2* mutációk és a *BCL2* transzlokációk jelenléte. Ezeken túl a kromatin-módosító gének inaktiváló mutációi *(CREBBP, EP300, KMT2D)*, a *REL* amplifikációi, a *TNFRSF14* funkcióvesztő mutációi és a PTEN inaktivációja is halmozottan fordulnak elő. Az EZH2 gén funkciónyerő mutációi a centrum germinativum eredetű lymphomák kialakulásának egyik leggyakoribb driver-e azáltal, hogy a proliferáció ellenőrzőpontok (pl. *CDKN1A*) és a B-sejt-fejlődés terminális differenciációért felelős célgénjeit *(IRF4, PRDM1)* szabályozza. Az EZB csoportot a már korábban említett „DHITsig" génepxressziós tulajdonságok alapján is további két alcsoportra lehet bontani (EZB MYC+ és EZB MYC-).

A C4 klaszterbe *(Chapuy és munkatársai)* tartozó esetek, amik szintén tartalmaznak GCB-DLBCL-eket, sokkal jobb klinikai prognózist mutatnak, mint az EZB csoportba tartozó esetek. A C4 klaszterre jellemzőek a H1 hiszton gének és további core hiszton gének eltérései, de gyakrabban fordul elő számos ismert driver-gén, így a *CD58*, *CARD11*, *KLHL6* módosulása is. Lacy és munkatársai ezt a csoportot két további alcsoportra bontják aszerint, hogy az esetek az *SGK1* és *TET2* gének mutációit (TET2/SGK1 csoport) hordozzák vagy az *SGK1* gén mellett a *SOCS1* gén mutációi mutathatók ki (SOCS1/SGK1 csoport) és amely csoportok az ST2 csoporttal is jelentős átfedést mutatnak.[33,34]



2. ábra: Az ábrán a diffúz nagy B-sejtes lymphomában szereplő fontosabb jelátviteli utak és azok főbb elemei láthatók. Egyes elemekre, mint terápiás célpontokra ható szerek nevei is fel vannak tüntetve.

Az A53 csoportra, amely a C2 klaszterrel mutat nagyfokú egyezést, a *TP53* gén mutációi, kópiaszám variációi és ploiditás-eltérések (fokozott ploiditás) jellemzők.

A *Schmitz és munkatársai* által leírt N1 csoportra a NOTCH1 gén mutációja jellemző, de a többi csoporthoz képest ez egy ritka változatnak bizonyult, a többi tanulmány nem is definiálta önálló entitásként *(1. ábra)*. Az egyes alcsoportokban halmozottan előforduló genetikai eltérések a későbbiekben terápiás célpontként, a célzott terápia megvalósulásában is szerepet játszhatnak *(2. ábra)*.

Összefoglalás

A diffúz nagy B-sejtes lymphomák diagnosztikája már a modern, azóta már a negyedik frissített kiadást is megért WHO klasszifikációk kezdete óta is jelentős változáson esett át. Számos specifikusabb forma vált le róla, kapott önálló nevet és ezáltal tűnhetett úgy, hogy a korábban csak diagnosztikai gyűjtőkosárnak is hívott betegségcsoport egyre pontosabban definiálhatóvá válik.[1] Ezzel ellentétben a kezelésekre adott különböző válaszok és a betegek túlélésében észlelt jelentős különbségek, valamint az utóbbi két évtizedben a molekuláris biológiában elért jelentős előrelépések odáig vezettek, hogy a ma ismert DLBCL a korábbiaknál is heterogénebb betegségnek tekinthető, számos, különböző módszerrel (citogenetika, FISH, molekuláris genetika, immunhisztokémia stb.) meghatározható szubtípussal. A legújabb kutatások alapján feltárt eredmények rámutattak, hogy a szubtípusok meghatározása alapvető fontosságú lehet a diagnosztika, a prognosztika és az alkalmazott terápia szempontjából is. Ezen eredmények tükrében és azáltal, hogy egyes genetikai eltéréseket kimutató módszerek a rutin diagnosztikába is bekerülnek, egyre inkább elérhetővé válik az a cél, hogy a betegek sokkal pontosabb, személyre szabott terápiában részesüljenek, ami végső soron a gyógyulásukhoz vezet.

Irodalom

1. Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, Harris NL, Stein H, Siebert R, et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. Blood 2016; 127:2375-90.
2. Scott DW, King RL, Staiger AM, Ben-Neriah S, Jiang A, Horn H, et al. High-grade B-cell lymphoma with MYC and BCL2 and/or BCL6 rearrangements with diffuse large B-cell lymphoma morphology. Blood 2018; 131:2060-4.
3. Johnson NA, Savage KJ, Ludkovski O, Ben-Neriah S, Woods R, Steidl C, et al. Lymphomas with concurrent BCL2 and MYC translocations: the critical factors associated with survival. Blood 2009; 114:2273-9.
4. Sarkozy C, Traverse-Glehen A and Coiffier B. Double-hit and double-protein-expression lymphomas: aggressive and refractory lymphomas. Lancet Oncol 2015; 16:e555-e567.
5. Copie-Bergman C, Cuilliere-Dartigues P, Baia M, Briere J, Delarue R, Canioni D, et al. MYC-IG rearrangements are negative predictors of survival in DLBCL patients treated with immunochemotherapy: a GELA/LYSA study. Blood 2015; 126:2466-74.
6. Ennishi D, Mottok A, Ben-Neriah S, Shulha HP, Farinha P, Chan FC, et al. Genetic profiling of MYC and BCL2 in diffuse large B-cell lymphoma determines cell-of-origin-specific clinical impact. Blood 2017; 129:2760-70.
7. Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, Ma C, Lossos IS, Rosenwald A, et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. Nature 2000; 403:503-511
8. Rosenwald A, Wright G, Chan WC, Connors JM, Campo E, Fisher RI, et al. The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma. N Engl J Med 2002; 346:1937-47.
9. Gutierrez-Garcia G, Cardesa-Salzmann T, Climent F, Gonzalez-Barca E, Mercadal S, Mate JL, et al. Gene-expression profiling and not immunophenotypic algorithms predicts prognosis in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with immunochemotherapy. Blood 2011; 117:4836-43.
10. Hans CP, Weisenburger DD, Greiner TC, Gascoyne RD, Delabie J, Ott G, et al. Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. Blood 2004; 103:275-82.
11. Coutinho R, Clear AJ, Owen A, Wilson A, Matthews J, Lee A, et al. Poor concordance among nine immunohistochemistry classifiers of cell-of-origin for diffuse large B-cell lymphoma: implications for therapeutic strategies. Clin Cancer Res 2013; 19:6686-95.
12. Staiger AM, Ziepert M, Horn H, Scott DW, Barth TFE, Bernd HW, et al. Clinical Impact of the Cell-of-Origin Classification and the MYC/ BCL2 Dual Expresser Status in Diffuse Large B-Cell Lymphoma Treated Within Prospective Clinical Trials of the German High-Grade Non-Hodgkin's Lymphoma Study Group. J Clin Oncol 2017; 35:2515-26.
13. Scott DW, Wright GW, Williams PM, Lih CJ, Walsh W, Jaffe ES, et al. Determining cell-of-origin subtypes of diffuse large B-cell lymphoma using gene expression in formalin-fixed paraffin-embedded tissue. Blood 2014; 123:1214-7.
14. Nowakowski GS, Feldman T, Rimsza LM, Westin JR, Witzig TE and Zinzani PL. Integrating precision medicine through evaluation of cell of origin in treatment planning for diffuse large B-cell lymphoma. Blood Cancer J 2019; 9:48.
15. Ruan J, Martin P, Furman RR, Lee SM, Cheung K, Vose JM, et al. Bortezomib plus CHOP-rituximab for previously untreated diffuse large B-cell lymphoma and mantle cell lymphoma. J Clin Oncol 2011; 29:690-7.
16. Davies A, Cummin TE, Barrans S, Maishman T, Mamot C, Novak U, et al. Gene-expression profiling of bortezomib added to standard chemoimmunotherapy for diffuse large

B-cell lymphoma (REMoDL-B): an open-label, randomised, phase 3 trial. Lancet Oncol 2019; 20:649-62.

17. Younes A, Sehn LH, Johnson P, Zinzani PL, Hong X, Zhu J, et al. Randomized Phase III Trial of Ibrutinib and Rituximab Plus Cyclophosphamide, Doxorubicin, Vincristine, and Prednisone in Non-Germinal Center B-Cell Diffuse Large B-Cell Lymphoma. J Clin Oncol 2019; 37:1285-95.
18. King RL, Nowakowski GS, Witzig TE, Scott DW, Little RF, Hong F, et al. Rapid, real time pathology review for ECOG/ACRIN 1412: a novel and successful paradigm for future lymphoma clinical trials in the precision medicine era. Blood Cancer J 2018; 8:27.
19. Nowakowski GS, LaPlant B, Macon WR, Reeder CB, Foran JM, Nelson GD, et al. Lenalidomide combined with R-CHOP overcomes negative prognostic impact of non-germinal center B-cell phenotype in newly diagnosed diffuse large B-Cell lymphoma: a phase II study. J Clin Oncol 2015; 33:251-7.
20. Vitolo U, Chiappella A, Franceschetti S, Carella AM, Baldi I, Inghirami G, et al. Lenalidomide plus R-CHOP21 in elderly patients with untreated diffuse large B-cell lymphoma: results of the REAL07 open-label, multicentre, phase 2 trial. Lancet Oncol 2014; 15:730-7.
21. Nowakowski GS, Chiappella A, Witzig TE, Spina M, Gascoyne RD, Zhang L, et al. ROBUST: Lenalidomide-R-CHOP versus placebo-R-CHOP in previously untreated ABC-type diffuse large B-cell lymphoma. Future Oncol 2016; 12:1553-63.
22. Zelenetz AD, Salles G, Mason KD, Casulo C, Le Gouill S, Sehn LH, et al. Venetoclax plus R- or G-CHOP in non-Hodgkin lymphoma: results from the CAVALLI phase 1b trial. Blood 2019; 133:1964-76.
23. Wilson WH, Young RM, Schmitz R, Yang Y, Pittaluga S, Wright G, et al. Targeting B cell receptor signaling with ibrutinib in diffuse large B cell lymphoma. Nat Med 2015; 21:922-6.
24. Ennishi D, Jiang A, Boyle M, Collinge B, Grande BM, Ben-Neriah S, et al. Double-Hit Gene Expression Signature Defines a Distinct Subgroup of Germinal Center B-Cell-Like Diffuse Large B-Cell Lymphoma. J Clin Oncol 2019; 37:190-201.
25. Hilton LK, Tang J, Ben-Neriah S, Alcaide M, Jiang A, Grande BM, et al. The double-hit signature identifies double-hit diffuse large B-cell lymphoma with genetic events cryptic to FISH. Blood 2019; 134:1528-32.
26. Sha C, Barrans S, Cucco F, Bentley MA, Care MA, Cummin T, et al. Molecular High-Grade B-Cell Lymphoma: Defining a Poor-Risk Group That Requires Different Approaches to Therapy. J Clin Oncol 2019; 37:202-12.
27. Cucco F, Barrans S, Sha C, Clipson A, Crouch S, Dobson R, et al. Distinct genetic changes reveal evolutionary history and heterogeneous molecular grade of DLBCL with MYC/BCL2 double-hit. Leukemia 2020; 34:1329-41.
28. Schmitz R, Young RM, Ceribelli M, Jhavar S, Xiao W, Zhang M, et al. Burkitt lymphoma pathogenesis and therapeutic targets from structural and functional genomics. Nature 2012; 490:116-20.
29. Lenz G, Wright G, Dave SS, Xiao W, Powell J, Zhao H, et al. Stromal gene signatures in large-B-cell lymphomas. N Engl J Med 2008; 359:2313-23.
30. Staiger AM, Altenbuchinger M, Ziepert M, Kohler C, Horn H, Huttner M, et al. A novel lymphoma-associated macrophage interaction signature (LAMIS) provides robust risk prognostication in diffuse large B-cell lymphoma clinical trial cohorts of the DSHNHL. Leukemia 2020; 34:543-52.
31. Schmitz R, Wright GW, Huang DW, Johnson CA, Phelan JD, Wang JQ, et al. Genetics and Pathogenesis of Diffuse Large B-Cell Lymphoma. N Engl J Med 2018; 378: 1396-407.
32. Chapuy B, Stewart C, Dunford AJ, Kim J, Kamburov A, Redd RA, et al. Molecular subtypes of diffuse large B cell lymphoma are associated with distinct pathogenic mechanisms and outcomes. Nat Med 2018; 24:679-90.
33. Wright GW, Huang DW, Phelan JD, Coulibaly ZA, Roulland S, Young RM, et al. A Probabilistic Classification Tool for Genetic Subtypes of Diffuse Large B Cell Lymphoma with Therapeutic Implications. Cancer Cell 2020; 37:551-568 e514.
34. Lacy SE, Barrans SL, Beer PA, Painter D, Smith AG, Roman E, et al. Targeted sequencing in DLBCL, molecular subtypes, and outcomes: a Haematological Malignancy Research Network report. Blood 2020; 135:1759-71.
35. Kamburov A, Lawrence MS, Polak P, Leshchiner I, Lage K, Golub TR, et al. Comprehensive assessment of cancer missense mutation clustering in protein structures. Proc Natl Acad Sci U S A 2015; 112:E5486-95.
36. Brunet JP, Tamayo P, Golub TR and Mesirov JP. Metagenes and molecular pattern discovery using matrix factorization. Proc Natl Acad Sci U S A 2004; 101:4164-9.
37. Jain N, Hartert K, Tadros S, Fiskus W, Havranek O, Ma MCJ, et al. Targetable genetic alterations of TCF4 (E2-2) drive immunoglobulin expression in diffuse large B cell lymphoma. Sci Transl Med 2019; 11: eaav5599
38. Mandelbaum J, Bhagat G, Tang H, Mo T, Brahmachary M, Shen Q, et al. BLIMP1 is a tumor suppressor gene frequently disrupted in activated B cell-like diffuse large B cell lymphoma. Cancer Cell 2010; 18:568-79.
39. Ennishi D, Healy S, Bashashati A, Saberi S, Hother C, Mottok A, et al. TMEM30A loss-of-function mutations drive lymphomagenesis and confer therapeutically exploitable vulnerability in B-cell lymphoma. Nat Med 2020; 26:577-88.

A KEZELÉSI IDŐ 3–5 PERCRE CSÖKKEN[1]

A lassú infúziók ideje lejárt. Itt a DARZALEX® SC ▼

Az új DARZALEX® az intravénás készítménnyel megegyező hatásossággal és hasonló biztonságossággal beadható, ritkább és enyhébb infúzióval összefüggő reakciók mellett, az eddigi kezelési idő töredéke alatt.[1–2]

DARZALEX® 20 mg/ml koncentrátum oldatos infúzióhoz és DARZALEX® 1800 mg oldatos injekció

Bővebb információért olvassa el a gyógyszer Alkalmazási előírását! A hatályos Alkalmazási előírás teljes szövegét megtalálja az Országos Gyógyszerészeti és Élelmezés-egészségügyi Intézet (www.ogyei.gov.hu/gyogyszeradatbazis/) honlapján.

▼ Ez a gyógyszer fokozott felügyelet alatt áll, mely lehetővé teszi az új gyógyszerbiztonsági információk gyors azonosítását. Az egészségügyi szakembereket arra kérjük, hogy jelentsenek bármilyen feltételezett mellékhatást.

A DARZALEX® rendelőintézeti járóbeteg-szakellátást vagy fekvőbeteg-szakellátást nyújtó szolgáltatók által biztosított körülmények között alkalmazható, korlátozott orvosi rendelvényhez kötött gyógyszer (I). A forgalomba hozatali engedély számai: koncentrátum oldatos infúzióhoz: EU/1/16/1101/001-002, oldatos injekció: EU/1/16/1101/004. A forgalomba hozatali engedély jogosultja: Janssen Cilag International NV, Belgium, képviselete: Janssen Cilag Kft., H-Budapest, 1123 Nagyenyed u. 8-14. Tel.: +36 1 884 2858

A DARZALEX® a 9/1993 NM rendelet 1/A mellékletének 7/a. pontja szerint tételes elszámolás alá eső hatóanyagot tartalmazó készítmény. Kiszerelésenként a bruttó fogyasztói ára: DARZALEX® 20 mg/ml koncentrátum oldatos infúzióhoz 1×20 ml injekciós üvegben: 549 763 Ft; 1×5 ml injekciós üvegben: 138 220 Ft; DARZALEX® 1800 mg oldatos injekció: jelenleg közfinanszírozásban nem részesül. Az esetleges árváltozásról kérjük, tájékozódjon a www.neak.gov.hu honlapról!

Hivatkozások:
1. DARZALEX® (daratumumab) Alkalmazási előírás, 2020 Elérhető: www.ema.europa.eu
2. Mateos MV, *et al.* Lancet Haematol. 2020 May;7(5):e370-e380

Lezárás dátuma: 2020.10.07. CP-175749

Janssen-Cilag Kft.
1123 Budapest, Nagyenyed u. 8-14. | Tel.: +36 1 884 2858 | janssenhu@its.jnj.hu
www.janssenmed.hu

DARZALEX® SC ▼
szubkután daratumumab

A mérhető reziduális betegség szerepe az onkohematológiai betegségek diagnosztikájában és kezelésében

The role of measurable residual disease in the diagnostic and treatment of oncohematological diseases

Barna Gábor[1], Erdélyi Dániel[2], Varga Gergely[3], Masszi András[3], Márk Ágnes[1], Szalóki Gábor[1]

[1] I. Sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet, Semmelweis Egyetem, Budapest

[2] II. Sz. Gyermekgyógyászati Klinika, Semmelweis Egyetem, Budapest

[3] Belgyógyászati és Hematológiai Klinika, Semmelweis Egyetem, Budapest

E-levél: barna.gabor@med.semmelweis-univ.hu

ÖSSZEFOGLALÁS A mérhető vagy minimális reziduális betegség (MRD) kimutatása az onkohematológiai betegségek, főként az akut leukaemiák terápiájában kiemelkedően fontos. Az MRD eredmények megmutatják, hogy a betegek hogyan reagáltak a kapott terápiára, alkalmazásukkal különböző prognosztikus csoportok állíthatóak fel és befolyásolhatják a további kezelések mennyiségét és minőségét. Viszont a kis mennyiségű tumorsejt populációk kimutatása gyakran kihívások elé állítja a diagnosztikában dolgozó szakembereket. Milyen technikával, miből és hogyan mutassuk ki az MRD-t? Összefoglaló cikkünk igyekszik bemutatni az MRD kimutatásának diagnosztikai lehetőségeit és a hazai felhasználását a klinikai gyakorlatban.

KULCSSZAVAK mérhető reziduális betegség, akut leukaemia, lymphoma, áramlási citometria, PCR, NGS

SUMMARY The role of measurable or minimal residual disease (MRD) detection is prominently important in oncohematology, principally in the therapy of acute leukemias. MRD results reveal how patients responded to the therapies, different prognostic groups can be created based on them and they can influence the quantity and quality of the subsequent treatments. On the other hand, the detection of small tumor cell populations challenges the specialists working in the diagnostic field: what kind of method and what kind of material should be used to detect MRD? The aim of our review is to introduce methods for MRD detection and their application in the clinical practice in Hungary.

KEY WORDS measurable residual disease, acute leukemia, lymphoma, flow cytometry, PCR, NGS

Mérhető vagy minimális reziduális (MRD) betegségként definiáljuk azt, amikor nagyon kis mennyiségű tumorsejt megmarad a kezelés során vagy utána, miközben a klinikai vagy mikroszkópos vizsgálat komplett remissziót (CR) véleményez és a beteg nem mutatja a betegségnek semmilyen jelét. Mivel az MRD segítségével látható legjobban a kezelés hatékonysága és a betegség relapszusa, ennek detektálása és az eredmények helyes értékelése igen fontos ma és az elkövetkező időkben, legfőképpen a hematológiai betegségek esetében.

Rövidítések

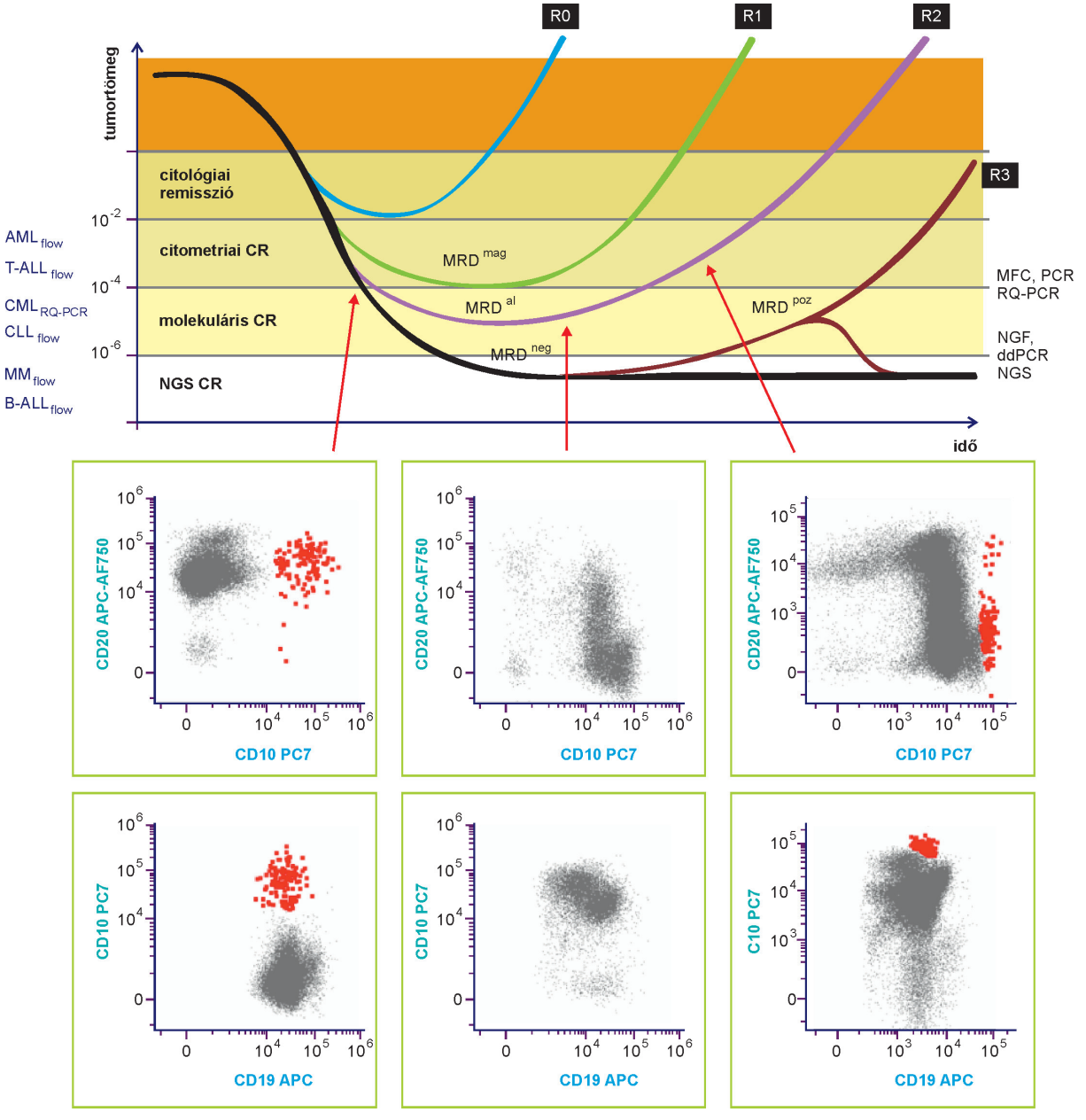
ASO-PCR	*allélspecifikus oligonukleotid PCR*
CR	*komplett remisszió*
ddPCR	*droplet digitális PCR*
DFN	*difference from normal, normáltól eltérő fenotípus*
EFS	*event free survival, eseménymentes túlélés*
ELN	*European Leukemia Network*
LAIP	*leukaemiaasszociált fenotípus*
LOD	*limit of detection, kimutathatóság határa*
LOQ	*limit of quantification, értékelhetőség határa*
MFC	*multiparaméteres áramlási citometria*
MRD	*mérhető vagy minimális reziduális betegség*
NGS	*next generation sequencing, újgenerációs szekvenálás*
NGF	*next generation flow cytometry, újgenerációs áramlási citometria*
RQ-PCR	*real-time kvantitatív PCR*
TCR	*T-sejt-receptor*

MRD történeti áttekintés

A múlt században a kezelőorvosok többnyire a klinikai vizsgálatok, valamint a vér, illetve a csontvelői kenetek mikroszkópos morfológiai vizsgálatával állapították meg a kemoterápiás kezelések hatékonyságát, és sorolták különböző progressziós csoportokba a betegeket a válasz alapján.

Az első MRD vizsgálatokat az 1990-es évek végén végezték több centrumban is. Azt vizsgálták, hogy CR-ben lévő gyerekkori ALL-es betegekben a relapszusok megjelenése és a kezelések után kimutatható reziduális betegség között van-e összefüggés.[1-3] Azt találták, hogy a kezelések során kimutatható reziduális sejtek mennyisége alapján megkülönböztethetünk jó és rossz prognózisú betegeket. 10^{-3}–10^{-2} feletti mennyi-

ségben megjelenő reziduális sejtek jól jelezték előre a későbbi relapszus kialakulását. Míg *Cave H.* és *van Dongen* munkacsoportjai PCR módszer segítségével mutatták ki a reziduális sejteket, addig *Coustan-Smith E.* csoportja multiparaméteres áramlási citometriával (MFC). Ekkor látszott, hogy a technika fejlődésével a kimutatási reakciók érzékenyebbek lettek és a korábbi CR definíciója már nem volt kielégítő. Mára már megkülönböztetünk több CR-t a kimutatási módszerektől függően: klinikai vizsgálat (klinikai CR), mikroszkópos morfológiai vizsgálat (hematológiai CR), kariotipizálás és FISH (citogenetikai CR), RT-PCR vagy PCR (molekuláris CR), áramlási citometria (citometriai CR) vagy újgenerációs szekvenálás (NGS CR). Több tanulmány is kimutatta, hogy myelomás betegeknél egyedül a hematológiai és klinikai CR nem elegendő a pontos rizikó-



1. ábra: MRD meghatározás filozófiája és a kimutatási technikák érzékenysége. A kezelések hatására a tumor sejtek mennyisége csökken. Az MRD mértéke alapján becsülni lehet a recidíva esélyét, és a növekedése beavatkozásra ad lehetőséget a kezelőorvos számára. A jobb oldalon láthatók az alkalmazott technikák érzékenység szerint, bal oldalon a különböző érzékenységű áramlási citometriai metodikák.

csoport meghatározáshoz. Meta-analízisek erős összefüggést mutattak az MRD mértéke és a kezelések sikeressége között.[4,5]

MRD mint prognosztikai faktor

Manapság számos olyan faktor van (diagnózis során megállapított klinikai értékek, különböző biomarkerek), melyek alapján megpróbálják besorolni a betegeket prognosztikai csoportokba, próbálják megjósolni a kezelések hatékonyságát, a betegség lefolyását, kimenetelét. De néha megesik, hogy ezek a faktorok elvesztik a prognosztikus értéküket a különböző kezelések során.[6] Ezzel szemben az MRD kimutatása többnyire független a kezelésektől és állandó segítséget nyújthat a relapszus kialakulásának kimutatásában. Az ismert, hogy minél mélyebb remissziót sikerül elérni egy betegnél, a relapszus annál később következik be és MRD negatív betegeknél akár a terápia elhagyását is jelentheti *(1. ábra)*. Tehát az MRD státusz egy önálló prognosztikai faktorként is használható. Az MRD pozitivitás viszont nem jelenti azt, hogy mindenképpen relapszus következik be. Lehetséges, hogy a maradvány tumorsejtek a kezelések hatására már nem képesek szaporodni vagy az immunrendszer kordában tartja őket.[7] Napjainkban az MRD mérés már a rutin diagnosztika részévé vált, és gyakran ennek a segítségével történik a betegek rizikócsoportokba sorolása. NGS használatával például olyan kérdésekre is választ kaphatunk, hogy mely beteg csoportnál alkalmazható hatásosan allogén transzplantáció a CAR-T sejt terápia után.[8]

MRD kimutatására használható technikák

Az MRD vizsgálata során nagyon kis mennyiségű tumorsejtet kell kimutatni az egészséges sejtek között: legalább 10^{-4}–10^{-6}, azaz 1 tumorsejtet kell megtalálni 10 000 vagy akár 1 000 000 sejt között. Ez pedig nagy érzékenységű technikát igényel. Ma ilyen érzékenységű tesztek a molekuláris módszereken alapuló vizsgálatok (PCR, NGS), valamint az áramlási citometriai mérések. Mindegyik vizsgálatnak van előnye és hátránya, viszont bármilyen technikát is használunk, az MRD kimutatása mindenképpen kihívás. A technikák érzékenységét, előnyeit és hátrányait mutatja be az *1. táblázat*.

Molekuláris technikák

A molekuláris technikák legtöbbje PCR-reakción alapul. Legtöbbször olyan DNS- vagy RNS-szakaszokat vizsgálnak, amelyek vagy a leukaemiagenezisben játszanak szerepet, vagy a leukaemiás sejtekre specifikusan jellemző mutációkat hordozhatnak. A DNS-alapú meghatározásokban leggyakrabban kromoszóma aberrációkat pl. transzlokációkat, mint a t(8;21), vagy immunglobulin és T-sejt-receptor- (TCR) átrendeződést vizsgálják. Utóbbi esetekben a V(D)J régió génátrendeződését vizsgálják, mivel a B- vagy T-sejtes leukaemia kialakulása során egy egyedi immunglobulin vagy TCR génátrendeződés jellemző a teljes leukaemiás sejtpopulációra. A magas érzékenység eléréséhez egyénre szabott allél-specifikus oligonukleotid PCR (ASO-PCR) reakciókat végeznek, melyek specifikusak bizonyos

1. táblázat: Az MRD kimutatási módszereinek tulajdonságai

ÉRZÉKENYSÉG	TECHNIKA TÍPUSA	ELŐNYÖK	HÁTRÁNYOK
10^{-2}–10^{-3}	PCR (IgH, TCR primer mix)	standardizált	limitált érzékenység
	MFC (gyenge LAIP, AML)	gyors, relatív olcsó	limitált érzékenység, szakember igényes
10^{-3}–10^{-4}	MFC (ALL)	gyors, relatív olcsó	szakember igényes
10^{-4}–10^{-5}	ASO-PCR (IgH, TCR)	személyre szabott	laboratórium igényes
	RQ-PCR (DNS, RNS alapú)	nagy érzékenység, standardizált	laboratórium igényes, relatív kvantifikáció, RNS instabilitás,
10^{-5}–10^{-6}	NGF (B-ALL, MM, CLL)	relatív gyors, olcsó	eszköz, idő-, szakemberigényes
	ddPCR	kvantitív	részben standarizált, laboratórium igényes
	NGS	széles spektrumú és egyedi klónokat is kimutat	drága, részben standarizált

leukaemiás klónokra. Emiatt ezek a reakciók laboratórium-, idő- és pénzigényesek. Az ASO-PCR reakciók nagy érzékenységűek (10^{-5}–10^{-6}), viszont mivel személyre szabottak, ezért egy bizonyos próba csak egyazon személyen alkalmazható és új klón kimutatására nem alkalmas. Viszont mivel a VDJ régió rekombinációja folyamatos a terápiák során, ezért új és új klónok jelenhetnek meg, amit már a kezdeti primerek nem tudnak kimutatni.

Az RNS-alapú meghatározások fúziós fehérjék mRNS-ének mennyiségét mutatják ki. Ezeket a teszteket, akkor használják, amikor a DNS-alapú tesztek nem praktikusak. Ilyen teszt például a krónikus myeloid leukaemiában megjelenő BCR-ABL1 fúziós fehérje mRNS-ének kimutatása. A t(9;22) transzlokáció esetén túl hosszú lenne a 9-es és 22-es kromoszóma DNS-szakaszának vizsgálata, ezért az mRNS vizsgálata sokkal praktikusabb. Reverz transzkripciót követően real-time kvantitatív-PCR (RQ-PCR) vizsgálattal 10^{-4}–10^{-6} érzékenységgel mutathatók ki a keresett szakaszok. Hasonló módszerrel vizsgálják a t(15;17) PML-RARA és a t(12;21) ETV6-RUNX1 fúziós fehérjék mRNS-ét is. Ezek ma már rutinszerűen, standardizáltan működő vizsgálatok és nem egyénre specifikusak, mivel ezek a fúziós fehérjék egyéntől függetlenül jellemzőek ezekre a leukaemiás sejtekre. Az RNS-alapú teszteknek viszont a hátránya, hogy az RNS kevésbé stabil, mint a DNS, a különböző terápiás szerek tovább növelhetik az instabilitását és ezért a DNS-nél óvatosabb kezelést, előkészítést igényel. Az RNS-alapú módszerek pontatlanságát növeli a sejtek változó mRNS expressziója is, szemben az állandó DNS-mennyiséggel, DNS-allélszámmal.

Újabb módszerként az elmúlt évtizedben megjelent a droplet digitális PCR (ddPCR). Ez ugyan már 2011-től elérhető volt kereskedelmi forgalomban, az MRD mérésére csak jóval később használták. *Coccaro és mtsai* Philadelphia pozitív ALL-es eseteket vizsgáltak ddPCR és RQ-PCR segítségével. A ddPCR érzékenyebbnek bizonyult sok esetben.[9] Ebben a technikában a PCR reakciók nem egy relatív nagyobb, 20 µl térfogatú elegyben zajlanak, hanem kis cseppekben elkülönülten, ahol 1 vagy néhány DNS-molekula található. Így valódi kvantitatív mérésre ad lehetőséget belső kontroll gén jelenléte nélkül, nagy érzékenységgel (10^{-6}) a RQ-PCR-rel szemben, ahol relatív kvantifikáció történik.[10] Viszont mivel itt is egyénre szabott próbák vannak, ezért az ASO-PCR-hez hasonlóan idő-, eszköz- és költségigényesebb, mint a RQ-PCR.

A molekuláris módszerek közül pedig a legújabban használt technika az újgenerációs szekvenálás (next generation sequencing, NGS). Ez szekvenálási technikák gyűjtőneve, melyek a hagyományos Sanger-szekvenálásnál gyorsabb és olcsóbb szekvenálást tesznek lehetővé: kis génszakaszok szekvenálása után áll össze a teljes DNS szakasz.[11] A legelterjedtebb eljárás az onkohematológiában a célzott, ún. génpanelek vizsgálata. Itt a betegségre jellemző gének mutációinak vizsgálata zajlik. Az NGS fejlődésével lehetőség nyílik nemcsak a különböző ismert mutációk és transzlokációk keresésére, hanem akár az összes klonális mutáció vagy génátrendeződés vizsgálatára. *Pulsipher és mtsai* transzplantált ALL-es betegek relapszus rizikóját vizsgálták NGS-sel és MFC-vel. NGS segítségével sikerült a betegeket alacsony és magas rizikójú csoportokba sorolni, míg ezek a betegek MFC-vel egységesen MRD negatívak voltak.[12] AML-ben szintén jól használható a módszer a gének epigenetikus változásainak kimutatására.[13] Az NGS érzékenysége nagy előny az MRD vizsgálatoknál, viszont hátránya, hogy nagy bioinformatikai analízis igénye van és még nem eléggé standardizáltak az eljárások.

Áramlási citometria

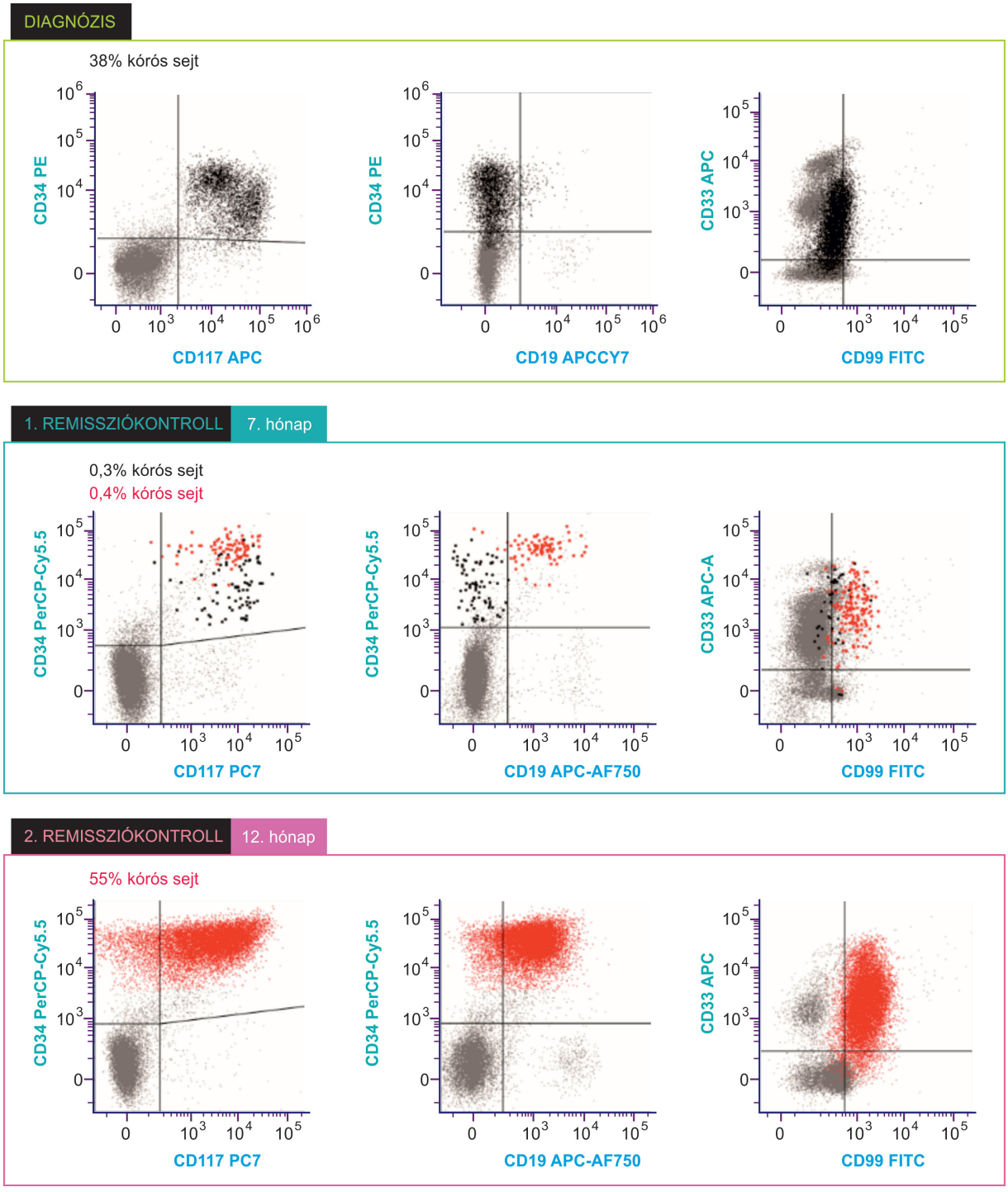
A multiparaméteres áramlási citometriai (multiparameter flow cytometry, MFC) vizsgálatok során specifikus antitest panelek segítségével határozzák meg a leukaemiás sejtek fenotípusát és mennyiségét. A leukaemiás sejtek általában speciális fenotípussal rendelkeznek: részben hasonlítanak a normál myeloid vagy lymphoid sejtekre, de bizonyos markerekben eltérnek tőlük. Ezt nevezik a normáltól eltérő fenotípusnak (difference from normal, DFN). A leukaemiás sejtek legtöbbször egyénre jellemző DFN-t mutatnak a diagnózis során. Ezt nevezik leukaemia asszociált fenotípusnak (LAIP). A DFN/LAIP-ba számos aberráns fenotípus tartozhat, ami MFC-vel kimutatható: a) aberráns, más sejtvonalba tartozó antigének expressziója (pl. CD7-expresszió myeloid sejteken), b) normál antigének megváltozott expressziója, c) normál antigének aszinkron kifejeződése. Az MFC MRD vizsgálatok pontossága növelhető, ha a LAIP-ot és DFN-t is figyelembe vesszük a vizsgálatok során.[14]

Az MFC MRD vizsgálatok érzékenysége a rutin diagnosztikában általában 10^{-3}–10^{-5} között változik. Az MFC mérések érzékenységét befolyásolja az alkalmazott panel specificitása, a LAIP eltérése a normál fenotípustól és a lemért események száma.

A nemzetközi irodalomban egyre több ajánlás jelenik meg, hogy egyes megbetegedésekhez milyen paneleket és markereket érdemes használni és azokat mi-

lyen fluoreszcens csatornában érdemes detektálni. Az AIEOP-BFM-ALL 2000 és BIOMED-1-ben *Dworzak és mtsai* olyan paneleket dolgoztak ki, melyekkel hatékonyan meghatározhatók a reziduális sejtek B-sejtes akut leukaemiában.[15] A Euroflow Konzorcium nagy erőfeszítéseket tett, nemcsak a panelek standardizálása terén, hanem a citométerek beállítása terén is, hogy a mérések megbízhatóak és pontosak legyenek.[16, 17]

A diagnóziskor a LAIP meghatározásra kerül, viszont a kezelések során ez változhat *(2. ábra)*. Ezért fontos, hogy panelek és ezáltal a LAIP is minél több markert tartalmazzanak és segítségükkel könnyebben



2. ábra: Fenotípusváltozás (LAIP változás) kimutatása áramlási citometriával AML-ben. Egy AML-es beteg mintáit láthatjuk a diagnóziskor, valamint 7 és 12 hónappal a diagnózist követően. A 7. hónapban megjelent egy új fenotípusú (CD19+) populáció. A 12. hónapban már csak a CD19+ populáció mutatható ki.

elkülöníthetők legyenek a tumoros sejtek a normálisan fejlődő sejtektől. Így egy tapasztalt elemző nagyon kis mennyiségű MRD populációt is megtalálhat. Általában 10–50 esemény az alsó detektálási határa ezeknek a vizsgálatoknak (limit of detection, LOD). Ennyi a legkevesebb esemény, amit ki kell mutatni, hogy megbízhatóan valós populációról beszélhessünk. Viszont ennél valamivel nagyobb az az eseményszám, aminek már a mennyiségét értékelni lehet. Ez az értékelhetősége a mérésnek (limit of quantification LOQ). A mérések során ezekből az értékekből ki lehet számolni, hogy mennyi esemény lemérése szükséges a megfelelő érzékenység eléréséhez.[18] *Rawston és mtsai* krónikus lymphocytás leukaemia (CLL) MRD vizsgálata során összeállítottak egy panelt, mely esetén 20 sejtben határozták meg a vizsgálat alsó detektálási határát és 50 sejtben az értékelhetőségét.[19] Ennek a panelnek a segítségével 2 millió esemény lemérése esetén érhető el a 10^{-5}-es detektálási határ: LOD=20/2 000 000×100%.

Abban az esetben, amikor MRD kimutatható, de az értékelhetőség határa alatt van (<LOQ), akkor a leletben fel kell tüntetni, hogy az MRD mennyisége pontosan nem határozható meg. Abban az esetben, ahol tumoros sejtek azonosíthatók, de a kimutathatósági határ alatt jelennek meg (<LOD), ekkor a leletben jelezni kell, hogy megjelentek, de a jelentőségük kérdéses és klinikai követés ajánlott.[14]

Vannak már tanulmányok, ahol B-sejtes ALL-ben és myelomában is sikerült 10^{-6}-os, PCR-hez hasonló érzékenységet elérni.[20,21] Ezt nevezik új generációs áramlási citometriának (next generation flow cytometry, NGF). Itt 3–10 millió eseményt mértek le 1 vagy 2 csőben összesen. Viszont ennyi sejt előkészítése, mérése és kiértékelése problémákba ütközhet a rutin diagnosztikai laboratóriumokban. Ennyi sejt előkészítéséhez ún. bulk lízis szükséges, amely során több ml csontvelő aspirátum feldolgozása történik meg több centrifugálási és lizálási lépésen keresztül. Ez minta- és időigényes eljárás és jelenleg nehezen illeszthető be a rutin diagnosztikai laboratóriumok munkamenetébe.

Milyen minta szükséges az MRD vizsgálatokhoz?

Az MRD vizsgálatok során nemcsak a használt technika kiválasztása, hanem a minta minősége is nagyon fontos. A legtöbb esetben: AML, B-sejtes ALL és myeloma esetén az MRD kimutatására csontvelői mintát ajánlatos használni, mivel ezeknél a betegségeknél nagy eltérések lehetnek a csontvelő és a vér tumorsejttartalma között.[22] *Cousten-Smith E. és mtsai* összehasonlító vizsgálatokat végeztek lymphoid leukaemiák esetén és azt találták, hogy ahol B-sejtes leukaemiás betegeknél az MRD kimutatható volt a vérből, ott a relapszusnak nagy volt a valószínűsége. T-sejtes leukaemiáknál viszont mind a vér, mind a csontvelői minta hasonló eredményt adott.[23,24] CLL esetében a nemzetközi ajánlások szerint az MRD-vizsgálatokat vérből kell végezni és ha az eredmény negatív, akkor a csontvelői minta csak megerősítésre szolgál.[25] AML-ben is vizsgálták, hogy vénás vért is lehetne használni MRD-meghatározás céljából. Egy tanulmányban mind az indukció, mind a konszolidáció után a blasztok aránya a csontvelőben és a perifériás vérben szignifikáns konkordanciát mutatott (indukció: r=0,86, konszolidáció r=0,82, mindkét esetben p<0,001).[26] Azonban a csontvelőhöz képest a vér legalább egy nagyságrenddel kevesebb reziduális sejtet tartalmazott, így a küszöbértékek máshova teendők. A 2018-as ELN guideline nem javasolja önmagában a perifériás vér vizsgálatán alapuló MRD-meghatározást.[27] A csontvelői MRD-mérés prognosztikai/ prediktív értékét nagyban meghatározza a minta minősége is. Myeloma esetén kimutatták, hogy a csontvelői minta vérrel való hígulása jelentősen csökkenti a detektálható myelomasejtek mennyiségét, ezért fontos, hogy a csontvelő megfelelő minőségű legyen.[28] Az NGF használatánál 2–4 ml mintavételből származó, EDTA-val kezelt, vérrel nem keveredett csontvelői minta szükséges, hogy megfelelő eredményt kapjunk. A myeloma MRD kimutatására szolgáló panel tartalmaz olyan markereket, melyek segítenek megállapítani, hogy mennyire hígult vérrel a minta. A következő sejt populációk arányát határozzák meg: magvas vörösvértestek, mastocyták, fejlődő B-sejtek, valamint korai myeloid és erythroid alakok.[29] A csontvelői mintavétel technikai nehézségeihez az is hozzáadódik, hogy a reziduális betegség eloszlása inhomogén a szervezetben.[30] Éppen ezért merült fel a PET/CT használata a remisszió kontroll céljából.[31]

Az MRD jelentősége akut leukaemiákban és lymphomákban

MRD ALL-ben

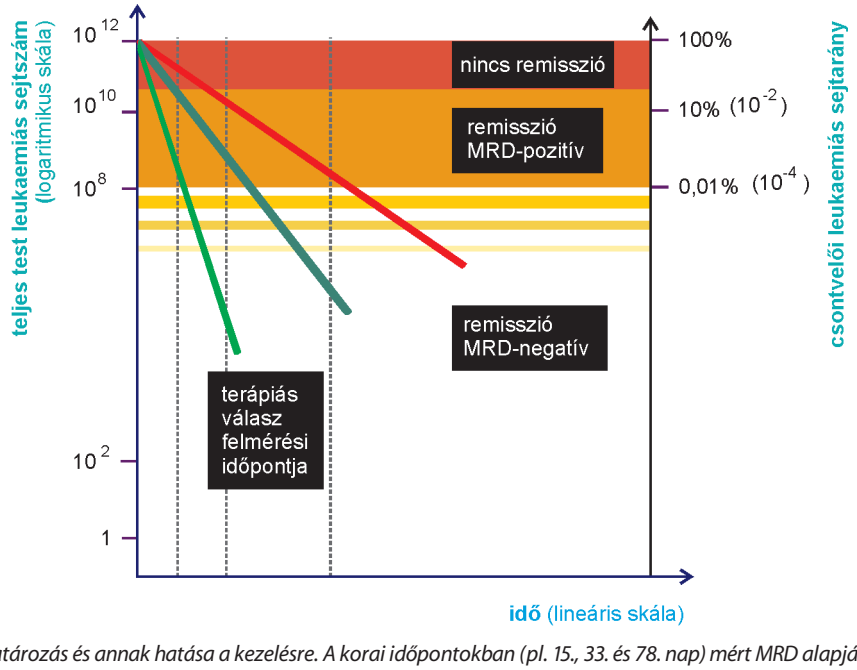
Mivel ALL-ben a morfológiai vizsgálatokkal nem lehet különbséget tenni a fejlődő lymphoid alakok (hematogónok) és a lymphoid blastok között, ezért az MRD vizsgálatoknak döntő jelentőségük van. Ez különösen fontos a kemoterápia vagy transzplantáció után regenerálódó csontvelő esetén, ahol a hematogónok akár 10%-nál is magasabb arányban lehetnek jelen. Az MRD vizsgálatokat többnyire MFC-vel és RQ-PCR-rel

végzik. Mindkét technika megbízható és a Euroflow Konzorcium által kidolgozott NGF B-ALL panel használatával az esetek 98%-ában az RQ-PCR-rel egyező eredményeket kaptak.[20] Ehhez viszont az kellett, hogy a csontvelői mintákból is legalább 4 millió eseményt mérjenek le. Így az RQ-PCR-hez hasonló 10^{-5} érzékenységgel lehetett meghatározni a tumorsejt populáció méretét.[32] Az MRD meghatározása viszont mindkét technika segítségével nehézségekbe ütközhet: változhat a klónok génátrendeződése (Ig/TCR), amelyek a RQ-PCR vizsgálatok célpontjai, de a kezelések során változik a leukaemiás sejtek fenotípusa is, ami az MFC eredmények kiértékelésekor okozhat nehézséget. Az NGS segíthet a különböző Ig/TCR klónok azonosításában, de ma még ez a technika nem eléggé standardizált és széleskörben elterjedt ahhoz, hogy a rutin diagnosztika részévé váljon.

Az akut leukaemiák végleges gyógyulása csak a leukaemia utolsó sejtig való elpusztításával valósul meg. Az akut leukaemiás gyermekek szinte mindegyikét MRD-negatívvá lehet tenni 1–2 hónap kezeléssel, de nemcsak a klasszikus értelemben vett remisszió, hanem még az MRD-negativitás határa is messze van a gyógyulástól. A kezelés elején mérjük az MRD-t - a későbbi időpontokban ugyanis a betegek nagyon nagy többségénél már méréshatár alatt lenne az MRD. Gyermekkori ALL-ben egy-egy konkrét időpontban mért MRD erősebb prognosztikus faktornak bizonyult, mint bármilyen más, korábban ismert faktor. Jelentős javuláshoz vezetett a túlélésben a kezelés intenzitásának stratifikálása a betegek korai terápiás válasza alapján *(3. ábra)*. Ez a filozófia a fejlett világban minden kezelési protokoll részévé vált a 2000-es évektől. Ma Európa nyugati felén jellemzően IgH/TCR RQ-PCR-n, Európa keleti felén és Észak-Amerikában döntően áramlási citometrián alapulnak a kezelési protokollok.

A Magyar Gyermekhematológiai Munkacsoport először az ALL-IC BFM 2009 nemzetközi klinikai tanulmány keretében alkalmazta ezt a kezelési stratifikációs elvet. Az indukció 15. napján 10% feletti MFC-vel meghatározott csontvelői MRD-vel rendelkezőket egy lényegesen intenzívebb kemoterápiás ágra sorolják, míg 0,1% alatti MRD esetén deintenzifikálják a kezelést a protokoll fő törzsét alkotó ághoz képest. A későbbi időpontokban mért MRD értékelése kevésbé kőbe vésett. Az általános gyakorlat szerint a 33. napon 1% feletti, illetve a 78. napon 0,1%-ot elérő MRD allogén csontvelő-transzplantációt indikál az első komplett remisszióban.

Hasonlóan nagy az MRD-monitorozás jelentősége a gyermekkori ALL recidívák esetében. Az ALL-REZ BFM P95/96 tanulmányban az intermedier rizikócsoportba tartozó ALL recidívás betegeknél megfigyelték az indukciós blokk végi csontvelő MRD érték és a túlélés közti erős összefüggést: MRD<10^{-4} esetén a 10 éves eseménymentes túlélés (EFS) 80% ± 7% standard



3. ábra: MRD meghatározás és annak hatása a kezelésre. A korai időpontokban (pl. 15., 33. és 78. nap) mért MRD alapján logikus és praktikus a kezelést stratifikálni. A jó prognózisú betegek (zöld) viszonylag kevés kemoterápiával is meggyógyulnak. A rosszul reagáló betegeknek (vörös) ugyanaz a kemoterápia nem pusztítaná el az összes leukaemiás sejtjét, ezért ilyenkor hosszabb, intenzívebb kezelésre van szükség a gyógyuláshoz. Anélkül recidíválni fognak, az MRD negativitás ellenére.

hiba (SE) volt, 10^{-4}≤MRD<10^{-3} esetén 64% ± 15%, 10^{-3}≤MRD<10^{-2} esetén 36% ± 14%, 10^{-2}≤MRD esetén 4,8% ± 4,6%.[32] A munkacsoport ezen eredmények után az indukció végén ≥10^{-3} csontvelői MRD-vel rendelkező betegek allogén őssejt transzplantációja mellett döntött az ALL-REZ BFM 02 tanulmány keretében. Az indukció végi MRD≥10^{-3} rosszul reagáló csoportban transzplantációval 64% ± 5% 5 éves EFS-t értek el, míg a donorral nem rendelkező hasonló betegeknél transzplantáció nélkül kemoterápiával 24% ± 10%-ot, ugyanakkor az MRD<10^{-3} csoportban nem transzplantáltak, csak kemoterápiával 70% ± 5% EFS-t értek el.[33]

MRD AML-ben

Az MRD meghatározása AML-ben nagyobb kihívás, mint ALL-ben, mivel egyrészt AML-en belül több sejtvonalról beszélünk, másrészt PCR technikákkal csak az AML-ek kb. 50%-a követhető, mivel ezekben találunk megfelelő molekuláris célpontot. RQ-PCR módszerrel az NPM1 mutáció, a RUNX1-RUNXT1 (t(8,21)), a CBFB-MYH11 (inv(16)) és a PML-RARA (t(15,17)) kimutatása használható a relapszus prognosztikai markereként. Ezeknek a vizsgálatoknak az érzékenysége 10^{-4}–10^{-5}. *NPM1* mutációt hordozó AML-ben két ciklus után a betegek 15%-ában maradt kimutatható a mutáció. A pozitivitás szoros összefüggést mutatott a relapszussal a 3 éves követési időszak alatt (82% vö. 30%, p<0.001).[34] Ez klinikailag azt jelenti, hogy a diagnosztikai fázisban jó prognózisú csoportba sorolt és primeren transzplantáció nélküli konszolidációra szánt betegek közül kiszűrhetők azok, akik szorosabb követésre szorulnak. A European Leukemia Net (ELN) guideline az ilyen esetekben perifériás vérből és csontvelőből is javasolja az MRD mérését: amennyiben a kezelés végén a vérből nem mutatható ki a mutáció, de a csontvelőben igen, abban az esetben havonta javasolt az ismétlés és az MRD mennyiség növekedése esetén a beteg kezelése szükséges.[27]

A preleukaemia alapító klónokra jellemző mutációk, mint a *DNMT3A*, az *ASXL1* vagy a *TET2* mutáció nem használhatóak követésre, mivel ezek egészséges emberekben is előfordulnak az életkor növekedésével egyre nagyobb frekvenciával. Az *FLT3* kináz mutációja AML-ben prognosztikai marker a relapszus és a teljes túlélés tekintetében.[35] MRD követésére azonban szintén nem javasolt, mert az *FLT3* mutációt hordozó betegekben a relapszus egy része nem hordozza már a mutációt vagy más mutáció mutatható ki, illetve az *FLT3* negatív betegségek is relabálhatnak *FLT3* mutációval.[35]

Ahol nincs molekuláris célpont, azokban az esetekben FCM segítségével lehet meghatározni az MRD-t. AML-ben a kezelések során a lymphoid leukaemiáknál gyakrabban változhat a leukaemiás sejtek fenotípusa. A követések során nemcsak a leukaemia asszociált fenotípust (LAIP) érdemes vizsgálni, ami a diagnózis alkalmával felállítható, hanem egyéb normáltól eltérő fenotípust (DFN) is. Így azokban az esetekben, amikor nincs molekuláris követési lehetőség, a DFN/LAIP-ok szintje, a háttérben lévő normál fejlődő progenitor sejtek mennyisége, valamint az alkalmazott antitest panel is megszabja a vizsgálatok érzékenységét. Ezért a lehető legtöbb marker vizsgálata javasolt, hogy az aberráns expressziók és más eltérések azonosíthatók legyenek. Ma rutinban leggyakrabban AML-ben a 0,1%-os érzékenységet tekintik megfelelőnek és a European Leukemia Network (ELN) is ezt ajánlja, még akkor is, ha alacsonyabb értékek is detektálhatók.[14,27] Az egyes vizsgálatokban a 0,1%-os határérték alatt kimutatott LAIP sejteknek szintén volt prognosztikai értéke. Ezeket az ELN ajánlás, mint ismeretlen jelentőségű reziduális leukaemiás sejt javasolja megjeleníteni. Jelentőségük további kutatásokat igényel.

A terápiás eredmények a felnőttkori leukaemiában távol állnak az ideálistól: az indukciós kezeléssel az esetek nagy részében elérhető a komplett remisszió (nem idős AML-es betegek 60–80%-ában), de a későbbiek során ez nehezen tartható meg. A remisszióba jutó betegek nagy része relabál, és a túlélési mutatók rosszak.[36] MRD kontroll többször ajánlott a kezelés során: az NCCN Guideline legalább az indukciós kezelés után és az allogén csontvelő-transzplantáció előtt javasolja, illetve az alkalmazott kezelési regimennek megfelelően. A mintavétel ideje a kezelés 21–28. napja között javasolt. A gyakorlatban ez minden kezelési ciklus után a rekonstitúció alatti napokban történik.[37] Gyermekkori AML-ben, ha a második kemoterápiás blokk után vett csontvelőben még kimutatható bármennyi maradék leukaemia, akkor allogén csontvelő-transzplantáció javasolt.

Ma már elképzelhetetlen az akut leukaemiák allogén őssejt transzplantáció körüli ellátása MRD monitorozás nélkül. ALL-ben erősebb, AML-ben valamivel gyengébb a transzplantáció előtti két hétben mért MRD és a transzplantáció utáni recidíva közötti összefüggés. Rezisztens leukaemia esetén emiatt cél a minél alacsonyabb MRD elérése, illetve a transzplantációs kondicionálás, a graft összetételének és a GVHD-profilaxis/GVL hatásnak MRD-től függő megválasztása. A transzplantáció után mért MRD is igen erős prog-

nosztikus marker a további recidíva tekintetében. A leukaemiás klón rendszeres, érzékeny monitorozásával, ún. molekuláris relapszus észlelése esetén az immunszuppresszió csökkentésével vagy donor lymphocyta infúziókkal, esetleg leukaemia elleni kemo-, biológiai- vagy immunterápiával jelentősen növelni lehet a tartós gyógyulás esélyét. Viszont kb. 10^{-3} feletti blaszt arány, vagy akár a mikroszkóposan is észlelhető relapszus esetén ezen kezelések már elégtelenek.[38]

MRD plazmasejtes myelomában

Az MRD kimutatása myelomában az elmúlt évtizedben kapott nagyobb jelentőséget, mivel a kezelés hatékonysága sokat fejlődött. Számos új kezelés (pl. proteaszómagátlók, immunmoduláns szerek, célzott antitestterápiák) jelent meg, így már a myeloma diagnosztikájában sem elegendő a morfológiai és klinikai CR.[39] De míg a gyerekkori B-sejtes ALL esetén a 10^{-4}-es érzékenységi szint általában megfelelő az MRD vizsgálatok esetén, addig több vizsgálatból is kiderült, hogy myelomában ennél nagyobb érzékenység szükséges. *Rawston mtsai* kimutatták, hogy az MRD érzékenységi szintjének 10-szeres növelése kb. +1 év progressziómentes túléléssel társul.[40] *Paiva és mtsai* NGF segítségével értek el 2×10^{-6}-os érzékenységi szintet, míg *Perrot és mtsai* NGS-sel vizsgálták az immunglobulin génátrendeződést 10^{-6}-os érzékenységgel.[21,41] Ez utóbbi vizsgálatban kimutatták, hogy azoknak a betegeknek, akik MRD negatívak voltak 10^{-6}-os érzékenységi szintnél, jóval hosszabb volt a progressziómentes túlélésük, mint a többi betegnek, rendelkezzenek akár 10^{-5} mennyiségű MRD populációval. Viszont ezek a technikák (NGS, NGF) jelenleg még a rutin diagnosztikában nem elérhetőek.

Az NGF esetén az előkészítési nehézségek mellett szükség van nagy teljesítményű számítógépekre, amelyek képesek több millió esemény kiértékelésére, valamint speciális kiértékelő szoftverre (pl. Infinicyt 2.0 (Cytognos, Spain)) is, amely automata analízisre képes. Ezek az eszközök viszont a legtöbb laboratóriumból hiányoznak. NGS esetén pedig a standardizáció, valamint a megfelelő infrastruktúra megléte szükséges a diagnosztikus központokban.

Az új monoklonális antitest (anti-CD38) terápiák során az MRD kimutatása újabb nehézségekbe ütközik, mivel az egyik fő plazmasejt marker, a CD38 válik kimutathatatlanná a terápiás antitest miatt. A CD138 gyakran nem elegendő a plazmasejtek kimutatására, mivel a sejtek öregedésével a CD138 eltűnik a sejtek felszínéről. Emellett *Krejcik és mtsai* kimutatták, hogy a daratumumab kezelés hatással van nemcsak a CD38 expressziójára, kimutathatóságára, hanem más myeloma markerek, mint a CD138, CD56, CD49d expressziójára is.[42] Bár megjelentek olyan áramlási citometriás multiepitop anti-CD38 antitestek, melyek alkalmasak a CD38 kimutatására a monoklonális terápiás antitest kapcsolódása után is, de ezek sem tudják kivédeni a CD38 szint csökkenésének a hatását, melyet ezek a szerek idéznek elő.[43] Olyan kísérletek is zajlanak, amelyek célja olyan új markerek azonosítása, melyek helyettesíthetik a CD38-at a plazmasejtek azonosításában (pl. CD229, CD54), de még nincs elég adat a megfelelő ajánlás kialakításához.[44] A CD229 erős expressziót mutatott mind kóros, mind normál plazmasejteken, ami nemcsak a plazmasejtek azonosításában, hanem új monoklonális terápiában is ígéretes eredménynek látszik.[45]

Mindazonáltal az MRD egyelőre csak klinikai vizsgálatokban, kísérletes jelleggel szabja meg, hogy milyen kezelést kapjon a beteg (intenzifikálás, fenntartó kezelés felfüggesztése MRD eredményektől függően). Viszont a gyakorlatban mindig kialakulnak olyan helyzetek, amikor az MRD eredmény befolyással lehet a döntésre, például ha valaki nehezen tolerál egy terápiát, akkor nyugodtabb szívvel csökkentjük a dózist, ha már sikerült MRD negativitást elérni.

Érdekes megfigyelés viszont, hogy a legújabb CAR-T sejtes terápiák rapidan képesek MRD negativitást elérni, viszont ennek ellenére gyakoriak a korai relapszusok, mutatva, hogy myelomában még az MRD negatív betegek is képesek reprodukálni a betegséget.[46]

MRD CLL-ben

CLL esetén szintén az utóbbi években jelent meg számos célzott terápia, amelynek segítségével a tumorsejtek aránya minimálisra csökkenthető és az MRD mérése jelentőséget nyert. Ilyen terápiák voltak először a kemo- és immunterápiák, ahol monoklonális ellenanyagot használtak (rituximab, alemtuzumab) a ciklofoszfamid és fludarabin mellett.[47,48] A kemo- és immunterápia, valamint a BTK inhibitor ibrutinib után pedig a BCL2-gátló venetoclax jelent meg, amely nagyon hatékonyan képes csökkenteni a CLL sejtek arányát.[49] Az MRD méréseket megfelelő érzékenységgel NGS és MFC segítségével lehet elvégezni, de ezek a vizsgálatok jelenleg még nem képezik a rutin diagnosztika részét. Mivel NGS kevés helyen áll rendelkezésre, ezért a hazai laboratóriumok legtöbbje MFC-vel végzi

ezeket a méréseket. A klinikai szerepe még kérdéses: nincsenek egyértelmű nemzetközi ajánlások azzal kapcsolatban, hogy mikor vegyék figyelembe az MRD eredményeket. Jelenleg zajlanak olyan klinikai vizsgálatok, amelyek eredménye döntő lesz ilyen tekintetben. Lehetséges, hogy ezek alapján az MRD vizsgálata majd a rutin diagnosztika részét fogja képezni.[50]

Összefoglalás

Mind a kezelőszerek, mind a kimutatási technikák fejlődésével az MRD meghatározása egyre fontosabbá vált. Láthatjuk, hogy semelyik módszer sem mindenható és gyakran érdemes párhuzamosan több technikát használni.

A mai klinikai gyakorlatban az MRD kimutatásának főképp az akut leukaemiák esetében van jelentősége, terápiás következménye. Az MRD egyre érzékenyebb kimutatásával új lehetőségek nyíltak a betegek csoportosítására, rizikó csoportok kialakítására és új kezelések bevezetésére. Ez nagyban javítja a kezelések hatékonyságát, de sok feladat még megoldásra vár:

- az új modern módszerekhez szükséges eszközpark biztosítása a rutin laboratóriumok számára,
- az eddig még nem eléggé standardizált módszerek standardizálása és beállítása a rutin diagnosztikába (NGS, ddPCR, NGF),
- a metodikák fejlesztése a terápiákkal párhuzamosan (pl. plazmasejtek kimutatása anti-CD38 terápia után, új molekuláris markerek keresése),
- a perifériás vérminták használata AML MRD meghatározásra,
- a relabáló/refrakter AML-es esetekben hogyan értékelhetőek a különböző MRD mérések,
- az MRD figyelembevétele nemcsak az akut leukaemiák, hanem a lymphomák klinikai protokolljának kialakítása során is.

Ezek lehetnek a következő évek feladatai mind a kutatók, mind a klinikusok, mind a gyógyszerfejlesztő cégek számára. Az, hogy ez sikeres legyen, további szoros együttműködés és egymás munkájának támogatása szükséges.

Irodalom

1. Cave H, van der Werff ten Bosch J, Suciu S, Guidal C, Waterkeyn C, Otten J, et al. Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. European Organization for Research and Treatment of Cancer—Childhood Leukemia Cooperative Group. The New England journal of medicine 1998; 339:591-8.
2. van Dongen JJ, Seriu T, Panzer-Grumayer ER, Biondi A, Pongers-Willemse MJ, Corral L, et al. Prognostic value of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukaemia in childhood. Lancet 1998; 352:1731-8.
3. Coustan-Smith E, Behm FG, Sanchez J, Boyett JM, Hancock ML, Raimondi SC, et al. Immunological detection of minimal residual disease in children with acute lymphoblastic leukaemia. Lancet 1998; 351:550-4.
4. Landgren O and Rajkumar SV. New Developments in Diagnosis, Prognosis, and Assessment of Response in Multiple Myeloma. Clin Cancer Res 2016; 22:5428-33.
5. Munshi NC, Avet-Loiseau H, Rawstron AC, Owen RG, Child JA, Thakurta A, et al. Association of Minimal Residual Disease With Superior Survival Outcomes in Patients With Multiple Myeloma: A Meta-analysis. JAMA Oncol 2017; 3:28-35.
6. Sehn LH. Optimal use of prognostic factors in non-Hodgkin lymphoma. Hematology Am Soc Hematol Educ Program 2006; 295-302.
7. Campana D. Should minimal residual disease monitoring in acute lymphoblastic leukemia be standard of care? Curr Hematol Malig Rep 2012; 7:170-7.
8. Kansagra AJ, Frey NV, Bar M, Laetsch TW, Carpenter PA, Savani BN, et al. Clinical utilization of Chimeric Antigen Receptor T-cells (CAR-T) in B-cell acute lymphoblastic leukemia (ALL)-an expert opinion from the European Society for Blood and Marrow Transplantation (EBMT) and the American Society for Blood and Marrow Transplantation (ASBMT). Bone Marrow Transplant 2019; 54:1868-80.
9. Coccaro N, Anelli L, Zagaria A, Casieri P, Tota G, Orsini P, et al. Droplet Digital PCR Is a Robust Tool for Monitoring Minimal Residual Disease in Adult Philadelphia-Positive Acute Lymphoblastic Leukemia. J Mol Diagn 2018; 20:474-82.
10. Hindson CM, Chevillet JR, Briggs HA, Gallichotte EN, Ruf IK, Hindson BJ, et al. Absolute quantification by droplet digital PCR versus analog real-time PCR. Nat Methods 2013; 10:1003-5.
11. Behjati S and Tarpey PS. What is next generation sequencing? Arch Dis Child Educ Pract Ed 2013; 98:236-8.
12. Pulsipher MA, Carlson C, Langholz B, Wall DA, Schultz KR, Bunin N, et al. IgH-V(D)J NGS-MRD measurement pre- and early post-allotransplant defines very low- and very high-risk ALL patients. Blood 2015; 125:3501-08.
13. Bibault JE, Figeac M, Helevaut N, Rodriguez C, Quief S, Sebda S, et al. Next-generation sequencing of FLT3 internal tandem duplications for minimal residual disease monitoring in acute myeloid leukemia. Oncotarget 2015; 6:22812-21.
14. Fuda F and Chen W. Minimal/Measurable Residual Disease Detection in Acute Leukemias by Multiparameter Flow Cytometry. Curr Hematol Malig Rep 2018; 13:455-66.
15. Dworzak MN, Buldini B, Gaipa G, Ratei R, Hrusak O, Luria D, et al. AIEOP-BFM consensus guidelines 2016 for flow cytometric immunophenotyping of Pediatric acute lymphoblastic leukemia. Cytometry B Clin Cytom 2018; 94:82-93.

16. van Dongen JJ, Lhermitte L, Bottcher S, Almeida J, van der Velden VH, Flores-Montero J, et al. EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. Leukemia 2012; 26:1908-75.
17. Kalina T, Flores-Montero J, van der Velden VH, Martin-Ayuso M, Bottcher S, Ritgen M, et al. EuroFlow standardization of flow cytometer instrument settings and immunophenotyping protocols. Leukemia 2012; 26:1986-2010.
18. Arroz M, Came N, Lin P, Chen W, Yuan C, Lagoo A, et al. Consensus guidelines on plasma cell myeloma minimal residual disease analysis and reporting. Cytometry B Clin Cytom 2016; 90:31-9.
19. Rawstron AC, Fazi C, Agathangelidis A, Villamor N, Letestu R, Nomdedeu J, et al. A complementary role of multiparameter flow cytometry and high-throughput sequencing for minimal residual disease detection in chronic lymphocytic leukemia: an European Research Initiative on CLL study. Leukemia 2016; 30:929-36.
20. Theunissen P, Mejstrikova E, Sedek L, van der Sluijs-Gelling AJ, Gaipa G, Bartels M, et al. Standardized flow cytometry for highly sensitive MRD measurements in B-cell acute lymphoblastic leukemia. Blood 2017; 129:347-57.
21. Paiva B, Puig N, Cedena MT, Rosinol L, Cordon L, Vidriales MB, et al. Measurable Residual Disease by Next-Generation Flow Cytometry in Multiple Myeloma. J Clin Oncol 2020; 38:784-92.
22. Chen X and Wood BL. Monitoring minimal residual disease in acute leukemia: Technical challenges and interpretive complexities. Blood Rev 2017; 31:63-75.
23. Coustan-Smith E, Sancho J, Hancock ML, Razzouk BI, Ribeiro RC, Rivera GK, et al. Use of peripheral blood instead of bone marrow to monitor residual disease in children with acute lymphoblastic leukemia. Blood 2002; 100:2399-402.
24. van der Velden VH, Jacobs DC, Wijkhuijs AJ, Comans-Bitter WM, Willemse MJ, Hahlen K, et al. Minimal residual disease levels in bone marrow and peripheral blood are comparable in children with T cell acute lymphoblastic leukemia (ALL), but not in precursor-B-ALL. Leukemia 2002; 16:1432-6.
25. Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, Caligaris-Cappio F, Dighiero G, Dohner H, et al. iwCLL guidelines for diagnosis, indications for treatment, response assessment, and supportive management of CLL. Blood 2018; 131:2745-60.
26. Maurillo L, Buccisano F, Spagnoli A, Del Poeta G, Panetta P, Neri B, et al. Monitoring of minimal residual disease in adult acute myeloid leukemia using peripheral blood as an alternative source to bone marrow. Haematologica 2007; 92:605-11.
27. Schuurhuis GJ, Heuser M, Freeman S, Bene MC, Buccisano F, Cloos J, et al. Minimal/measurable residual disease in AML: a consensus document from the European LeukemiaNet MRD Working Party. Blood 2018; 131:1275-91.
28. Manasanch EE, Salem DA, Yuan CM, Tageja N, Bhutani M, Kwok M, et al. Flow cytometric sensitivity and characteristics of plasma cells in patients with multiple myeloma or its precursor disease: influence of biopsy site and anticoagulation method. Leukemia & lymphoma 2015; 56:1416-24.
29. Flores-Montero J, Sanoja-Flores L, Paiva B, Puig N, Garcia-Sanchez O, Bottcher S, et al. Next Generation Flow for highly sensitive and standardized detection of minimal residual disease in multiple myeloma. Leukemia 2017; 31:2094-103.
30. Vanderhoek M, Juckett MB, Perlman SB, Nickles RJ and Jeraj R. Early assessment of treatment response in patients with AML using [(18)F]FLT PET imaging. Leuk Res 2011; 35:310-6.
31. Han EJ, Lee BH, Kim JA, Park YH and Choi WH. Early assessment of response to induction therapy in acute myeloid leukemia using (18)F-FLT PET/CT. EJNMMI Res 2017; 7:75
32. Eckert C, von Stackelberg A, Seeger K, Groeneveld TW, Peters C, Klingebiel T, et al. Minimal residual disease after induction is the strongest predictor of prognosis in intermediate risk relapsed acute lymphoblastic leukaemia - long-term results of trial ALL-REZ BFM P95/96. Eur J Cancer 2013; 49:1346-55.
33. Eckert C, Henze G, Seeger K, Hagedorn N, Mann G, Panzer-Grumayer R, et al. Use of allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation based on minimal residual disease response improves outcomes for children with relapsed acute lymphoblastic leukemia in the intermediate-risk group. J Clin Oncol 2013; 31:2736-42.
34. Ivey A, Hills RK, Simpson MA, Jovanovic JV, Gilkes A, Grech A, et al. Assessment of Minimal Residual Disease in Standard-Risk AML. The New England journal of medicine 2016; 374:422-33.
35. Kottaridis PD, Gale RE, Langabeer SE, Frew ME, Bowen DT and Linch DC. Studies of FLT3 mutations in paired presentation and relapse samples from patients with acute myeloid leukemia: implications for the role of FLT3 mutations in leukemogenesis, minimal residual disease detection, and possible therapy with FLT3 inhibitors. Blood 2002; 100:2393-8.
36. Grimwade D, Walker H, Oliver F, Wheatley K, Harrison C, Harrison G, et al. The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML 10 trial. The Medical Research Council Adult and Children's Leukaemia Working Parties. Blood 1998; 92:2322-33.
37. Tallman MS, Wang ES, Altman JK, Appelbaum FR, Bhatt VR, Bixby D, et al. Acute Myeloid Leukemia, Version 3.2019, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. J Natl Compr Canc Netw 2019; 17:721-49.
38. Lamble A, Phelan R and Burke M. When Less Is Good, Is None Better? The Prognostic and Therapeutic Significance of Peri-Transplant Minimal Residual Disease Assessment in Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia. J Clin Med 2017; 6:66.
39. Chim CS, Kumar SK, Orlowski RZ, Cook G, Richardson PG, Gertz MA, et al. Management of relapsed and refractory multiple myeloma: novel agents, antibodies, immunotherapies and beyond. Leukemia 2018; 32:252-62.
40. Rawstron AC, Gregory WM, de Tute RM, Davies FE, Bell SE, Drayson MT, et al. Minimal residual disease in myeloma by flow cytometry: independent prediction of survival benefit per log reduction. Blood 2015; 125:1932-5.

41. Perrot A, Lauwers-Cances V, Corre J, Robillard N, Hulin C, Chretien ML, et al. Minimal residual disease negativity using deep sequencing is a major prognostic factor in multiple myeloma. Blood 2018; 132:2456-64.
42. Krejcik J, Frerichs KA, Nijhof IS, van Kessel B, van Velzen JF, Bloem AC, et al. Monocytes and Granulocytes Reduce CD38 Expression Levels on Myeloma Cells in Patients Treated with Daratumumab. Clin Cancer Res 2017; 23:7498-511.
43. Takamatsu H, Yoroidaka T, Fujisawa M, Kobori K, Hanawa M, Yamashita T, et al. Comparison of minimal residual disease detection in multiple myeloma by SRL 8-color single-tube and EuroFlow 8-color 2-tube multiparameter flow cytometry. Int J Hematol 2019; 109:377-81.
44. Pojero F, Flores-Montero J, Sanoja L, Perez JJ, Puig N, Paiva B, et al. Utility of CD54, CD229, and CD319 for the identification of plasma cells in patients with clonal plasma cell diseases. Cytometry B Clin Cytom 2016; 90:91-100.
45. Olson M, Radhakrishnan SV, Luetkens T and Atanackovic D. The role of surface molecule CD229 in Multiple Myeloma. Clin Immunol 2019; 204:69-73.
46. Sidana S and Shah N. CAR T-cell therapy: is it prime time in myeloma? Blood Adv 2019; 3:3473-80.
47. Eichhorst B, Fink AM, Bahlo J, Busch R, Kovacs G, Maurer C, et al. First-line chemoimmunotherapy with bendamustine and rituximab versus fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab in patients with advanced chronic lymphocytic leukaemia (CLL10): an international, open-label, randomised, phase 3, non-inferiority trial. The Lancet. Oncology 2016; 17:928-42.
48. Geisler CH, van T' Veer MB, Jurlander J, Walewski J, Tjonnfjord G, Itala Remes M, et al. Frontline low-dose alemtuzumab with fludarabine and cyclophosphamide prolongs progression-free survival in high-risk CLL. Blood 2014; 123:3255-62.
49. Roberts AW, Davids MS, Pagel JM, Kahl BS, Puvvada SD, Gerecitano JF, et al. Targeting BCL2 with Venetoclax in Relapsed Chronic Lymphocytic Leukemia. The New England journal of medicine 2016; 374:311-22.
50. Takács F, Kardos I, Czeti Á, Aczél D, Illés S, Balogh A, et al. A minimális reziduális betegség vizsgálata krónikus lymphoid leukaemiában. 2020; 53:17.

Molekuláris genetikai módszerek az örökletes rákszindrómák klinikai diagnosztikájában

Molecular genetic methods in clinical diagnosis of hereditary cancer syndromes

Patócs Attila[1,2,3]
[1] Örökletes Daganatok Kutatócsoport, Budapest
[2] Molekuláris Genetikai Osztály, Országos Onkológiai Intézet, Budapest
[3] Laboratóriumi Medicina Intézet, Semmelweis Egyetem, Budapest
E-levél: patocs.attila@med.semmelweis-univ.hu

ÖSSZEFOGLALÁS Az örökletes rákszindrómák ritka klinikai kórképek, de a gyakori megjelenésű szolid tumorok (pl. emlőrák, vastagbélrák) között is mintegy 5–10%-ban jelen lehetnek. A molekuláris genetikai diagnosztikai munkát rendkívüli mértékben átalakította az új generációs szekvenálási technológiai térhódítása. Az új technológia elsősorban a molekuláris patológiai diagnosztikát forradalmasította. Ennek oka, hogy az onkológiai kezelések indikációhoz egyre több molekuláris genetikai marker azonosítása szükséges. Az alkalmazott technológiák lehetőséget adnak több tucat, vagy akár több száz gén vagy variáns egyidejű vizsgálatára, ami az eddig ritkán azonosított szindrómás esetek felismert számának növeléséhez is vezethet. A daganatszövetekben azonosított genetikai eltérések, amelyek örökletes rákszindrómákkal társulnak, szükségessé teszi ezeknek a betegeknek a klinikai genetikai konzultációját. Klinikai oldalról minden olyan látszólag sporadikus daganat esetében, ahol az örökletesség esélye nagyobb mint 10%, indokolt molekuláris genetikai vizsgálat végzése. A komplex fenotípussal rendelkező betegek molekuláris genetikai kivizsgálása során a kivizsgálás során a szekvenciális megközelítést alkalmazzuk. A rákszindrómáért felelős gén célzott molekuláris genetikai vizsgálatára kerül sor első megközelítésben, majd, amennyiben egyéb patogenetikai ok is feltételezhető, kerül sor a célzott génpanel alkalmazására. Természetesen az új generációs szekvenálási módszertan itt is bevezetésre került. Ugyanakkor az örökletesség vizsgálata során a molekuláris vizsgáló módszer analitikai teljesítőképessége mellett egyéb jogi és etikai megfontolásokat is figyelembe kell venni.

KULCSSZAVAK örökletes rákszindróma, genetikai tanácsadás, molekuláris genetikai vizsgálat, új generációs szekvenálás

SUMMARY Hereditary cancer syndromes are rare entities, but they can be found among prevalently occurring solid tumours (ie. breast and colon). The technical developments due to Next generation sequencing (NGS) lead to revolution and spead-up of molecular genetic diagnostics. This new methodology revolutionized the diagnostic workflow of molecular pathology. In these cases, many novel targeted therapeutics need the identification of genetic markers. Using next generation sequencing technologies from couple toward hundreds of genes and variants can be assessed parallel, resulting in identification of cases harboring hereditary mutations. In addition, somatic mutations of cancer susceptibility genes indicate the genetic counselling of these patients. In cancer cases where the chance for detection of mutation is >10%, genetic testing is recommended. In molecular genetic testing of genes responsible for a hereditary cancer syndrome, the sequential approach is recommended. In the first line analysis the evaluation of a single gene should be performed, then if other genes are involved, small gene panel testing is recommended. NGS-based techniques can be also used in these cases. Besides the analytical performance of the molecular genetic testing, other ethical and legal aspects should be taken into consideration.

KEY WORDS hereditary cancer syndromes, genetic counseling, molecular genetic testing, next generation sequencing

A molekuláris genetikai módszerek rohamos fejlődése és terjedése a klinikai genetikai diagnosztika átalakulásához vezet. Korábban a genetikai vizsgálatok során a monogénes kórképek esetében általában egy gén vagy a leggyakoribb mutációk vizsgálatát végezték el polimeráz láncreakciót (PCR) követő bidirekcionális Sanger-szekvenálással. Azonban már korábban is ismert volt, hogy akár az örökletes daganatok esetében is, számos szolid tumor kialakulásának hátterében nemcsak egy, hanem több gén károsodása is felmerül. Olyan szolid tumorok esetében is, mint pl. az emlő vagy vastagbélrák hátterében is több, általában 5–8, különböző gén patogenetikai szerepét igazolták már eddig is, így a diagnosztikus értékű genetikai vizsgálatok,

Rövidítések

ACMG	*The American College of Medical Genetics and Genomics*
FFPE	*formalinnal fixált és parafinba ágyazott szövetminta*
FIHPT	*familiáris izolált hyperparathyreosis*
FHH	*familiáris hypercalcaemiás hypocalciuria*
GATK	*Genome Analyser Tool Kit*
LRG	*Locus reference genomic*
MEN1	*mulitplex endokrin neoplasia 1-es*
NGS	*újgenerációs szekvenálási technikák (next-generation sequencing, NGS)*
PCR	*polimeráz láncreakció*
VUS	*variant with unknown significance*

ezeknek a géneknek a vizsgálatát is magába kell, hogy foglalja.[1] A hagyományos módszerekkel ezek a vizsgálatok hatalmas költséget jelentenek és a mintavételtől az eredmény kiadásáig eltelt idő nagyon gyakran a több hónapot is meghaladhatja. A diagnosztikai munka felgyorsítását tette lehetővé a molekuláris genetikai vizsgálatokat forradalmasító új generációs szekvenálási módszerek elterjedése, amelyek alkalmazására az örökletes daganatszindrómák klinikai genetikai vizsgálatában is alkalmaznak.

Módszertani alapok

Az újgenerációs szekvenálási technikák (next-generation sequencing, NGS) alkalmazásával egy időben több tíz, száz vagy akár a teljes genom vizsgálatára van lehetőség. A betegségspecifikus molekuláris diagnosztikai tevékenység során általában a vizsgált gének száma nem haladja meg az ötvenet, de pl. komplex onkológiai szomatikus mutáció profilozás során több száz gént (nagy panel) vizsgálnak egyidejűleg. Az alkalmazott technológiától függően kisebb génpanelek során több tíz vagy száz minta egyidejű mérése is kivitelezhető. A költséghatékonyságot és a diagnosztikai tevékenységet jól jellemző ún. lelet-átfordulási időt (TAT – turn around time) is szem előtt tartva minden laboratóriumnak mérlegelnie kell az alkalmazott módszer és a vizsgálati igényt, és ezek alapján kialakítania saját munkafolyamatát.

Az NGS munkafolyamat első lépése a *mintaelőkészítés* és *könyvtárkészítés*. Örökletes szindrómák során csírasejtes DNS-t használnak, amit leggyakrabban perifériás vérmintákból, esetleg szájnyálkahártya epitél sejtekből vonnak ki. Ezekben az esetekben, szemben a formalinnal fixált és parafinba ágyazott (FFPE) szövetmintákkal, a DNS jó minőségű és elegendő mennyiségű a vizsgálatok kivitelezéséhez. Az FFPE mintákból kinyert DNS lehet töredezett, de szemben a Sanger-szekvenálással az NGS könyvtárkészítésre ezek a minták is alkalmasak, mivel a könyvtárkészítés során a DNS porlasztása történik annak érdekében, hogy a platform-függő adapter szekvenciák bekötése (ligálása) megtörténjen. Az adapter-szekvenciákkal kiegészített DNS molekulák felsokszorozása a következő lépés, amit vagy PCR-rel vagy hibridizációval végeznek.[1-6] A könyvtár mérete a vizsgált gének méretétől és számától függ. A szekvenálási eredményt befolyásolja az ún. lefedettség („read" által lefedett szekvencia). Ez az a paraméter, ami azt mutatja meg, hogy az adott nukleotid pozíciót hányszor szekvenáltuk meg. Az örökletes rákszindrómák vizsgálata során a minimálisan 20 read (allélonként 10–10) az a mennyiség, amit elfogadhatunk. Több ajánlás a minimum 100-as lefedettséget javasolja. Molekuláris patológiai vizsgálatok esetében a tumor heterogenitást is figyelembe véve kisebb lefedettségű eredmények is elfogadhatók. A lefedettség mértéke a géneket érintő kópiaszámváltozások igazolásában lehet kritikus. Számos gén esetében a mutációk mellett a gének nagyobb szakaszait (teljes exonok, vagy teljes gének) érintő deléció (hemizigóciája) is lehet patogén. Leggyakrabban a von Hippel–Lindau-szindrómáért felelős *VHL* gén, de a MEN1 szindrómát okozó menin, valamint a *TP53*, *SDHB*, *PTEN*, de a *BRCA1*, *BRCA2* és a Lynch-szindrómát eredményező gének eseteiben is 5–20%-ban találhatunk ilyen eltéréseket, amelyek kimutatásában az NGS mellett egyéb metodikák: valós idejű kvantitatív PCR vagy multiplex ligációs próba amplifikáció (MLPA) is alkalmazásra kerülnek.

Az NGS adatok feldolgozása, interpretálása, tárolása és újraértékelése, bioinformatikai elemzések

A szekvenálási adatok elsődleges értékelése az adott platformot gyártó által rendelkezésre bocsátott specifikus programcsomaggal történik. A feldolgozás során több jól elkülönült lépést különböztetünk meg: 1. a szekvenálási adatok minőségének elemzése, 2. az adapter szekvenciák levágása, 3. a célgénekre specifikus szekvenálási adatok illesztése a referencia adatbázisokhoz, majd a 4. a különbözőséget mutató pozíciók további elemzése (interpretáció). Az 1-3. lépés során bioinformatikában jártas szakemberekre és nagy számítási kapacitással rendelkező számítógépekre van szükség. Az illesztését követően minden egyes bázishoz megkapjuk a lefedettséget. A korábban részletezett minimális lefedettség mellett csírasejtes DNS esetében fontos paraméter a heterozigóta mutációk/variánsok beazonosítása, amihez szükséges, az, hogy a két allél közötti read megoszlás az ideális 50%-tól csak minimálisan térjen el.[6,7]

Az első két lépés analízisében a szekvenáló módszer és annak gyártói ajánlásait kell követni. Az adapter szekvenciák minden esetben gyártó specifikusak, így ezek levágása (trimmelése) során ezek ismerete nélkülözhetetlen. A minőségi elemzés során több paramétert javasolt ellenőrizni. Fontos meghatározni az összlefedettség minőségi mutatóit, de minden egyes pozíció minőségi mutatóinak ismerete is elengedhetetlen az értékeléshez. Génpanelek esetén ritkábban, de exom vagy teljes genom esetében gyakran előfordul, hogy a

lefedettség nem homogén a teljes szekvenálási területen, egyes területek egyeltalán, vagy rossz minőségben reprezentáltak. Általánosságban a különböző könyvtárkészítő protokollok a 96–98%-os lefedettséget garantálják. A nem kellő minőségben lefedett régiókat egyedileg, hagyományos Sanger-szekvenálással szükséges vizsgálni.

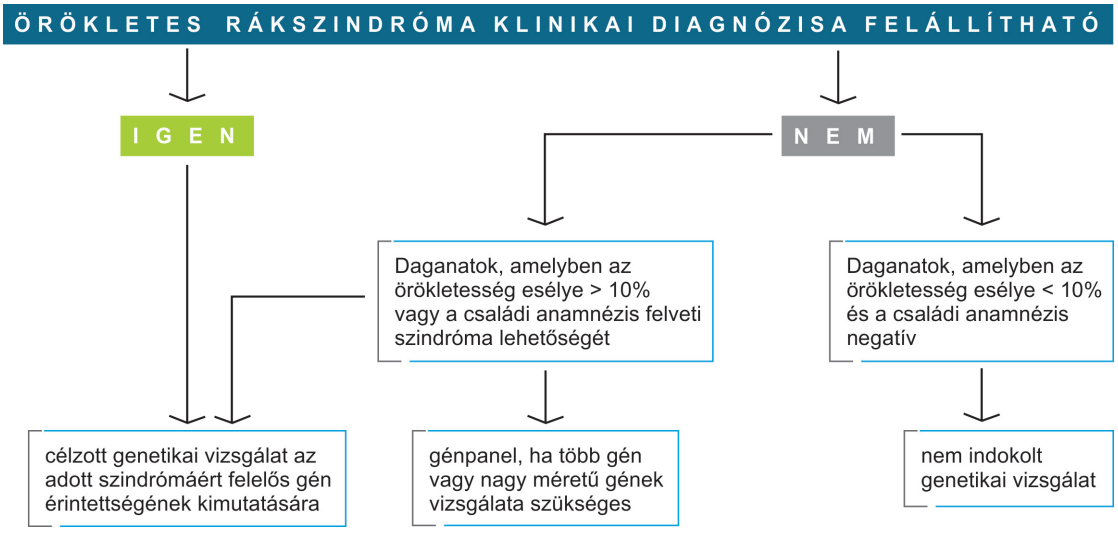
A referenciagenomra történő illesztése szintén bioinformatikai feladat. Célzott szekvenálás során a referenciagenomból a célgének koordinátáit veszik alapul (transzkript specifikus koordinátak szükségesek), míg exom vagy teljes genom szekvenáláskor a teljes genomra történik az illesztés. Számos kihívással kell szembesülni, mert a különböző adatbázisokban egy adott génnek számos transzkriptje szerepel, és a legtöbb illesztő algoritmus mindegyikre megcsinálja az illesztést. Így előfordultat, hogy olyan transzkriptre is keletkezik hívás (call), ami egy splice variánst jelent és csak bizonyos szövetekben expresszálódik. Csírasejtes vizsgálatkor célszerű elkészíteni a kötelezően riportálandó gének egyedi adatbázisát, amihez javasolt az LRG (Locus reference genomic) azonosítókat alkalmazni. Ez az az adatbázis, ami kifejezetten a klinikai genetikai munkára lett létrehozva, megbízható, pontos kromoszóma lokalizációkat tartalmaz és rendszeresen manuális ellenőrzésen esik át. A többi (NCBI, ENSEMBL stb.) adatbázisok esetében a különböző verziók közötti különbségek miatt ugyanannak a variánsnak az eltérő nomenklatúrája és eltérő beazonosítása fordulhat elő. Saját tapasztalataink alapján exom szekvenálás során akár 10–15%-os eltérés is előfordulhat csak az adatbázisok verziószám közötti különbségek miatt.

Az illesztés után következik a beazonosított variánsok klinikai értelmezése (interpretációja). Ennek során elemzésre kerül minden olyan eltérés, aminek potenciális szerepe lehet a betegség kialakulásában. Számos integrált algoritmus pl. a Genome Analyser Tool Kit (GATK)-val biztosítja komprehenzív módon több adatbázisból származó információk kigyűjtését. A klinikai interpretációban elengedhetetlen ismerni az allél megoszlási adatokat (patogén eltérések általában ritkák, extrém ritkák), és amennyiben nem szerepel az adott eltérés a betegség-specifikus adatbázisokban (pl. HGMD, Human Gene Mutation Database: https://go.qiagen.com/HGMD, dbSNP, ClinVar, Exom Variant Server stb.) az interpretációban segíthetnek az *in silico* funkcióelemzések is. Ezek a nukleotid eltérést transzformálják fehérje szintre és a keletkezett mutáns fehérje szerkezeti változásai alapján prediktálják a kóros funkciókat. A leggyakrabban használt algoritmusok a SIFT (Sorting intolerant from tolerant – https://sift.bii.a-star.edu.sg/) és a Polyphen (Polymorphism phenotyping – http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/index.shtml) algoritmusok. Ebben a folyamatban kerül sor a beazonosított variánsok osztályozására is. Az ACMG (The American College of Medical Genetics and Genomics) javaslat alapján jelenleg az összes variánst öt kategóriába soroljuk. Az 5-ös, 4-es és 3-as csoportba sorolt eltérések (Pathogenic, likely pathogenic és VUS – variant with unknown significance) feltüntetése a Molekuláris genetikai leleten elengedhetetlen. Az 1-es és 2-es (benign és likely benign) csoportba sorolt eltérések klinikailag inszignifikáns eltéréseket jelentenek.[8] Fontos azonban kiemelni, hogy a szinonim variánsok közül, azok, amelyek közel találhatók az exon-intron határhoz szükséges külön is elemezni, a rejtett splice hatás miatt. Saját tapasztalat alapján számos *BRCA1*/2 génvariáns esetén a szinonim variáns splice hatásúnak bizonyult így a jóindulatú csoportból a patogén csoportba került átsorolásra.

A szekvenálási adatok feldolgozása és interpretálása során egy adatbázis (variant calling file -vcf) keletkezik, ami tartalmazza az összes variánsra vonatkozóan elérhető összes adatot (lefedettség, allélmegoszlás, gyakoriság, patogenitás). Ahhoz, hogy ebből az adatbázisból a klinikum számára is hasznosítható lelet keletkezzen, szükséges a klinikai genetikusok bevonása.

A klinikai genetikusok szerepe a teljes molekuláris genetikai diagnosztikai munka során nélkülözhetetlen. A legutóbbi Klinikai Genetikai Szakmai Kollégium ajánlása tartalmazza az onkogenetikára vonatkozó hazai irányelveket is.[9] Ennek értelmében a vizsgálat előtti és utáni tájékoztatások során ugyanazokat a szempontok kell érvényesíteni, mint az egyéb örökletes betegség esetén. Fontos azonban felhívni a figyelmet a rákos betegség kialakulási kockázatának az ismertetésére. A rákrizikó emelkedéssel járó variánsok közlése során a tanácskérő és családtagjai számára tájékoztatást kell adni az elérhető betegségmegelőzési és kezelési lehetőségekről, egyidejűleg hangsúlyozni kell a már azonosított betegségkockázat növelő környezeti faktorok szerepét is, a vizsgálat eredménye hatással lehet egy esetleg egyéb szervrendszert érintő daganatok kialakulásának kockázatára, és a rendszeres klinikai nyomonkövetésre.[9]

A gyakoribb örökletes rákszindrómák esetén követendő molekuláris genetikai diagnosztikai eljárásokat foglalja össze az *1. ábra*.



1. ábra. Sematikus ábra az örökletesség vizsgálatára onkológiai esetekben

Új generációs szekvenálással vizsgált daganatok

Örökletes emlő és petefészekrák molekuláris genetikai vizsgálata

A nők második leggyakoribb daganata, amely minden harmadik rákhoz köthető halálozásért felelős. Az összes emlőrák genetikai determináltsága kb. 5–8%, de bizonyos szűkebb populációkban 20% is lehet. Ilyen hatalmas szám mellett a hazai incidencia és az ismertetett genetikai prevalencia alapján évente mintegy 600–800 új esetet kellene beazonosítanunk. Ettől a hazai adatok elmaradnak, évente kb. 3–400 eset felismerése valósul meg. A genetikai vizsgálatok indikációs kritériumait több szakmai szervezet is frissítette, több különbség van ezek között, de a legfontosabb indikációs kritériumok azonosak. Így, az 50 éves életkor előtt megjelenő emlőrák, a „tripla-negatív" (ösztrogén-, progeszteron-receptor és HER2/neu-negatív) szövettan, a ≥2 primer emlődaganat ugyanabban a betegben, a ≥3 emlő-, petefészek, hasnyálmirigy- és/vagy agresszív prosztatadaganat közeli rokonokban, beleértve a probandot és az emlőrákot is magába foglaló rákszindrómák klinikai diagnózisa esetén javasolt a vizsgálat.[10] Petefészekrák és férfiakban kialakuló emlődaganat minden esetben a genetikai vizsgálat indikációját jelenti.[10,11]

Az emlő- és petefészekrák esetén a *BRCA1*/*BRCA2* gének vizsgálata az elsődlegesen javasolt genetikai vizsgálat (a kis genomi eltérések vizsgálata mellett a nagy deléciók vizsgálata is javasolt). A gének viszonylag nagy mérete és a vizsgálatokra váró betegek száma az NGS alapú módszerek használatát indokolja. Fontos megjegyezni, hogy a klinikai genetikai diagnosztikai munkában az ún. minősített (IVD-CE, in vitro fiagnosztikában használható) reagenskészlet és bioinformatikai algoritmusok használata szükséges.

Amennyiben örökletes rákszindróma részeként kerül felismerésre emlő- vagy petefészekrák az adott szindrómáért felelős gén egyedi vizsgálata javasolt. Itt hagyományos vizsgáló módszerek: Sanger-szekvenálás, multiplex ligációs próba amplifikációval kópiaszám meghatározás is szükséges *(1. táblázat)*. A leggyakoribb szindrómák, amelyekben emlőrák is előfordul, a Li-Fraumeni-szindróma (kötőszövetes tumor, osteosarcoma, agytumor, melldaganat, adrenocorticalis tumor, laeukaemia, bronchoalveoláris tumor, vastagbélrák), a Peutz-Jeghers szindróma, a Cowden-kór és a *CDH1* mutációkhoz társuló (lobuláris emlőcarcinoma és diffúz gyomortumor) kórkép *(1. táblázat)*.

Amennyiben a *BRCA1*/2 gének vizsgálata negatív eredménnyel zárult, de családi anamnézis alapján az örökletesség esélye magas javasolt egyéb gének vizsgálata is. Itt fontos kiemelni, hogy elsősorban azoknak a géneknek a vizsgálata indokolt, ami szükséges klinikai döntéshez (célzott diagnosztikai és/vagy terápiás beavatkozásokat: terápia vagy műtéti). Ezek a gének a *BRCA1, BRCA2, TP53, PTEN, CDH1* és *PALB2*.[11-14] A vizsgálatok és az adatok bővülésével a *BRCA1*/2 negatív esetek további 2-8%-ában igazolható patogén eltérés.[13,14] A nagy génpaneles esetleg teljes exom vagy genom vizsgálatok során azonban ki kell emelni, hogy a kereskedelmi forgalomban elérhető, fizetős szolgáltatásként megrendelt genetikai vizsgálatok közel fele fals-pozitív vagy fals-negatív eredményt mutatott, ami a betegellátást veszélyezteti.[14]

1. táblázat: Tumortípusok, amelyek örökletesség esélye nagyobb, mint 10% és örökletes rákszindrómák a vizsgálandó gének és a javasolt molekuláris genetikai módszer

TUMOR	VIZSGÁLNI JAVASOLT GÉNEK	JAVASOLT VIZSGÁLATI MÓDSZER
Emlőrák, petefészekrák	Klinikai döntéssel bíró gének (1-es és 2-es csoport) vizsgálata feltétlenül indokolt. Negatív eredmény esetén a 3-as csoport génjeinek vizsgálata javasolt.	
	1. *BRCA1, BRCA2*	Célzott génpanel és MLPA (validálás Sanger-szekvenálással)
	2. *TP53, PTEN, CDH1, STK11*	Célzott, egyedi génvizsgálata vagy génpanel és MLPA (validálás Sanger-szekvenálással)
	3. *ATM, CHEK2, PALB2, BARD1, BRIP1, MRE11A, NBN, RAD50, RAD51C, RAD51D, XRCC2, ABRAXAS*	Nagy génpaneles, onkopanelek vagy exom szekvenálás és kópiaszám meghatározás. Validálás Sanger-szekvenálással és MLPA
Vastagbélrák	Mikroszatellita instabil daganatok (elsőként javasolt vizsgálat a daganatszövet immunhisztokémiai vizsgálata) esetében javasolt gének: mismatch repair hiányért felelős fehérjék, *MLH1, MSH2, MSH6, PMS2, EPCAM*	A kiesett fehérjét kódoló gén vizsgálata egyedi Sanger-szekvenálással, célzott génpanel vagy nagy génpanellel (validálás Sanger-szekvenálással) és MLPA
Phaeochromocytómák és paraganganglliómák	*RET, VHL, NF1, SDHA, SDHB, SDHC, SDHD, SDHAF2, MAX, FH, KIF1B, MDH2, GOT2, TMEM127, MAX*	Célzott génpanel, esetleg exom szekvenálás (validálás Sanger-szekvenálással) és MLPA. Korlátozott lehetőség esetén a *RET* és *SDHB* gének elsődleges vizsgálata indokolt.
Multiplex endokrin neoplasia 1-es típus	*MENIN*	célzott vizsgálat (Sanger-szekvenálás) és MLPA
Multiplex endokrin neoplasia 2-es típus és sporadikus medullaris pajzsmirigyrák	*RET*	célzott vizsgálat (Sanger-szekvenálás)
von Hippel–Lindau-szindróma	*VHL*	célzott vizsgálat (Sanger szekvenálás) és MLPA
Familiaris hypophysis adenoma	*AIP*	célzott vizsgálat (Sanger-szekvenálás) és MLPA
Neurofibromatosis 1-es típus	*NF1*	célzott vizsgálat (Sanger-szekvenálás), célzott génpanel és MLPA
Li Fraumeni-szindróma	*TP53*	célzott vizsgálat (Sanger-szekvenálás) és MLPA
Cowden/BRR szindróma	*PTEN*	célzott vizsgálat (Sanger-szekvenálás) és MLPA
Peutz–Jeghers-szindróma	*STK11 (LKB)*	célzott vizsgálat (Sanger-szekvenálás) és MLPA
Carney-komplex	*PRKAR1A*	célzott vizsgálat (Sanger-szekvenálás) és MLPA
Tuberosus sclerosis	*TSC1, TSC2*	célzott vizsgálat (Sanger-szekvenálás), célzott génpanel és MLPA
Örökletes melanoma	*CDK2A, CDK4*	célzott vizsgálat (Sanger-szekvenálás), célzott génpanel és MLPA

BRR szindróma: Bannayan–Riley–Ruvalcaba szindróma; *LKB1*/*STK11:* szerin, treonin-kináz 11-et kódoló gén; *PTPN11:* 11-es nem receptor típusú fehérje tirozin-foszfatázt kódoló gén; *MLPA:* mulitplex ligációs próba amplifikáció, *PRKAR1A:* cAMP-függő fehérje kináz 1 α-alegységét szabályozó gén; *NF1:* neurofibromatosis 1-es típusáért felelős gén; *SDH:* szukcinát dehidrogenáz alegységeit kódoló gének; *TP53:* p53 tumorszuppresszor gén; *TSC1, TSC2:* hamartint és tuberint kódoló gének; *VHL:* von Hippel-Lindau betegség

A colorectalis daganatok molekuláris genetikai vizsgálata

Colorectalis daganatok kb. 5–10% vezethető vissza örökletes genetikai hibára. Erre utalhat a daganatok kialakulása 50 évnél fiatalabb betegekben, ≥50 év és elsőfokú rokon colorectális vagy endometriális daganat igazolása, synchronous vagy metachronous colorectális vagy endometriális daganatok ugyanabban az egyénben, colorectális tumor mismatch repair-deficienciával, valamint a colorectális tumor és **Lynch-szindrómára** utaló daganatok megléte. A ritka, örökletes rákszindrómák közül a Cowden-kór, Li-Fraumeni szindróma (részletesebb leírásukat az *1. táblázat* tartalmazza) valamint a polipózissal járó tumorszindrómákra utaló fenotípus jegyek is a molekuláris genetikai vizsgálatok indikációit jelentik.

Ezekben az esetekben az elsődlegesen javasolt vizsgálat a Lynch-szindrómáért (OMIM120435) felelős genetikai eltérések kimutatása. Minden új colorectalis daganat esetén javasolt a mismatch repair hiányért felelős fehérjék *(MLH1/MSH2/MSH6/PMS2)* vizsgálata immunhisztokémiai módszerrel és a mikroszatellita instabilitás vizsgálata a daganatszövetben.[15] Minden *MLH1*-hiányt mutató daganat esetében javasolt a BRAF genetikai vizsgálata és az *MLH1* gén promoterének hipermetilációs vizsgálata. Az összes olyan esetben, ahol nem igazolódik *BRAF* mutáció vagy hipermetiláció, indokolt a Lynch szindrómáért felelős gének *(MLH1, MSH2, MSH6, PMS2* és *EPCAM)* közül annak a vizsgálata, amelynek kiesése az immunhisztokémiai vizsgálat alapján valószínűsíthető. Találati gyakoriság alapján az *MSH2* 60%, *MLH1* 30%, *MSH6* 7–10%, és elvétve a *PMS2* és *EPCAM* gén mutációk igazolhatók.

A vizsgálat módszertanában mind a hagyományos Sanger szekvenálás, mind pedig a kereskedelmi forgalomban is elérhető ún. vastagbélrák génpanelek, illetve a molekuláris patológián alkalmazott különböző méretű (kis és nagy) génpanelek is alkalmazhatóak.

Phaeochromocytoma, paraganglioma

Az örökletes rákszindrómák közül több az endokrin szöveteket érinti. A szindrómák megjelenése heterogén, klinikai felismerésük nehéz a változó penetrancia miatt is. Genetikai háttér alapján a mellékvesevelőből kiinduló **phaeochromoctoma** az egyik legösszetettebb genetikai hátterű daganat (jelenleg mintegy 16 gén patogenetikai szerepe igazolódott). A klinikai gyakorlat számára legfontosabb kizárni a multiplex endokrin neoplázia 2-es típusát (MEN2), valamint a szukcinát-dehidrogenáz-B alegységét kódoló *SDHB* gén érintettségét. Ezek mellett a többi lehetséges gén egyidejű vizsgálata javasolt. Ez alapján célzott génpanel alkalmazása tudja a legjobban kielégíteni a klinikai igényeket és költséghatékonyan biztosítani a molekuláris genetikai eredményt.[16,17]

A Pheo/PGL NGS alapú molekuláris genetikai diagnosztikájában mind a génpanel, mind pedig exom szekvenálás használható.[19,20] Laboratóriumunkban egy 18 gén vizsgálatára alkalmas panelt fejlesztettünk, ami a többi örökletes endokrin szindróma (pl. MEN1) vizsgálatát is lehetővé teszi. Figyelembe véve ezeknek a ritka kórképeknek az incidenciáját, így a havi egyszeri mérés rentábilisan biztosítja a klinikai igényeknek megfelelő leletátfordulási időt. Természetesen a klinikai alkalmazhatóság előtt a teljes munkafolyamat validálása szükséges. A szekvenálási lépések és a bioinformatikai elemzések standardizálása mellett a klinikai validálás elvégzése is javasolt.[21,22] Amennyiben a jellegzetes fenotípus egyértelműen csak az egyik szindrómára utal, úgy annak célzott vizsgálata javasolt.

Célzott génvizsgálattal vizsgált rákszindrómák

A leggyakrabban felismert és vizsgált tumorszindrómák a Mulitplex Endokrin Neoplasia 1-es (MEN1) és 2-es típusa (MEN2), a von Hippel-Lindau szindróma, Neurofibromatosis 1-es típusa, Cowden kór, Carney komplex. Közös jellemzőjük az autoszomális domináns öröklődésmenet, ami azt jelenti, hogy az utódoknak 50 % az esélye, hogy a betegséget okozó eltérést öröklöjék.[17]

Mulitplex endokrin neoplasia 1-es (MEN1) típusában mellékpajzsmirigy adenoma vagy hyperplasia, hasnyálmirigy neuroendokrin daganat és hypophysis daganat társulása figyelhető meg. Hátterében a MEN1 tumorszuppresszor gén örökletes mutációi álnak. A betegségokozó mutációk lehetnek pontmutációk, de deléciók és inszerciók is azonosításra kerültek, amelyek a gén teljes szakaszán előfordulhatnak. A mellékpajzsmirigy adenóma, ha fiatal életkorban jelentkezik, utalhat egyéb örökletes szindrómára is (pl. MEN2 szindróma, a familiáris hypercalcaemiás hypocalciuria – FHH, familiáris izolált hyperparathyreosis – FIHPT vagy mellékpajzsmirigy adenoma-állkapocs tumorszindróma). A genetikai vizsgálatoknak így ki kellene terjednie azokra a génekre is, amelyek a fent említett szindrómákat (*RET* a MEN2-t, *CaSR* az FHH-t és FIHP-t és a *HPRT2* a mellékpajzsmirigy adenoma-állkapocs tumorszindrómát) okozzák.[24]

Mulitplex endokrin neoplasia 2-es (MEN2) típusában medulláris pajzsmirigyrák, phaeochromocytoma és a már említett hyperparathyreosis figyelhető meg. A klinikai megjelenés alapján több klinikai altípus ismert, amelyek közül kiemelendő a rendkívül súlyos lefolyást mutató MEN2B szindróma, amelyben a fent ismertetett tumorokhoz jellegzetes külső jelek (marfanoid alkat, ajak- száj- és szemhéj nyálkahártyán kialakuló neuromák) társulnak. A betegségért a *RET* protoonkogén aktiváló mutációi a felelősek. Ebben a kórképben a *RET* protoonkogén mutációk igazolásának nemcsak a diagnózis felállításában, hanem a betegség prognózisának a megítélésében is óriási szerepe van. Szoros genotípus-fenotípus összefüggések ismertek, amelyek alapján a mutációt hordozókban preventív pajzsmirigy-eltávolítás indokolt. Ennek időpontját dönti el a mutáció típusa. A látszólag sporadikus medullaris pajzsmirigyrákos esetekben is kimutatták, hogy a *RET* mutációk 1–7%-ban jelen lehetnek.[24]

A gén-specifikus molekuláris genetikai vizsgálatok mellett foglalt állást az Amerikai Endokrin Társaság, ami fenotípus-orientált algoritmust dolgozott ki a klinikai genetikai vizsgálatok végzésére.[25]

A tumorszuppresszor génekhez társuló daganatok esetén a molekuláris genetikai vizsgálatok során nem elegendő csak a DNS szekvenálás, mivel a patogén mutációk, géntől függően, az esetek 5–25%-ban ún, hemizigóta eltérések. Ezek igazolására MLPA és qRT-PCR alapú metodikákat alkalmazunk. A módszer elengedhetetlen a *VHL, TP53, SDHx, BRCA1/2, MEN1, NF1, PRKAR1A, PTEN,* Lynch-szindróma génjeinek vizsgálata során is *(1. táblázat).*

Etikai kérdések

Az örökletesség, a rákrizikó alapját jelentő genetikai vizsgálatok indikálása, végzése és az eredmények kiadása csak a megfelelő szakemberek együttes munkájával biztosítható. A hatályos jogszabályok alapján minden beteget a vizsgálat előtt tájékoztatni kell a vizsgálatról, a várható eredményről és azt, hogy ez miként érinti a beteget és a családját (részletezve a Klinikai Genetikai tagozat szakmai irányelvében). A tesztelés előtti konzultáción a beteg írásos beleegyező nyilatkozatban nyilatkozik a vizsgálatban történő részvételről. A tájékoztatás során ki kell térni arra is, hogy az NGS alapú módszerekkel született adatok a későbbiekben is felhasználásra kerülhetnek. Előfordulhat, hogy az adott betegségre jellemző genetikai eltérés később válik ismertté, így a molekuláris genetikai diagnosztikát végző laboratóriumoknak fel kell készülniük, hogy retrospektíven is szükségessé válhat az adatok újra elemzése.

A vizsgálatot követő poszt-tanácsadáson kerül sor az eredmények megbeszélése. Itt a legfontosabb kérdések a rákrizikó ismertetése, a családtagok preszimptomatikus tesztelésének szükségessége és a beteget érintő diagnosztikai és terápiás lehetőségek ismertetése. Onkológiai esetek során elengedhetetlen a multidiszciplináris orvosi team bevonása (onkoteamek). VUS esetében új vizsgálatok pl. RNS alapú funkcionális vizsgálatok esetleg a daganatszövetek analízisének szükségessége is felmerül. Ezek segíthetnek az adott nem klasszifikált variáns patogenitásának megítélésében.

Összefoglalás

Az NGS alapú vizsgáló módszerek elterjedtek a napi klinikai diagnosztikában. Az örökletes daganatos kórképek során is alkalmazásra kerültek, de a legtöbb kórkép, amelynek megléte a klinikai megjelenés alapján igazolt, továbbra is a hagyományos molekuláris biológiai módszerek használata javasolt. A módszerek kapacitása és áruk kedvező, ami számos egészségügyi szolgáltatót csábít a kereskedelmi forgalomban elérhető reagensek, technológiai háttér beszerzésére. Ugyanakkor, a klinikai genetikai diagnosztikában csak olyan eljárások fogathatók el, amelyeknek a minden lépése validált, minőségbiztosított, teljesítőképessége ismert. A genetikai vizsgálatok végzése etikai és jogi szempontból is szigorúan szabályozott. Az orvos-szakmai társaságok szakmai ajánlásai iránymutatók, óvatosságra intenek és javasolják a nagyon szoros együttműködést az onkológiai betegellátásban dolgozó szakmák képviselői között.

Irodalom

1. Butz H, Patócs A. Brief Summary of the Most Important Molecular Genetic Methods (PCR, qPCR, Microarray, Next-Generation Sequencing, etc.). Exp Suppl 2019; 111: 33-52.
2. Buermans HPT, den Dunnen JT: Next generation sequencing technology: Advances and application Biochimica et Biophysica Acta 2014; 1932-41.
3. Rothberg JM, Hinz W, Rearick TM, et al: An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. Nature 2011; 475: 348-52.
4. Bentley DR, Balasubramanian S, Swerdlow et al.. Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. Nature 2008; 456:53-9.
5. Merriman B, Rothberg JM: Progress in ion torrent semiconductor chip based sequencing, Electrophoresis 2012; 33:3397-417.

6. Choi M, Scholl UI, Ji W, et al. Genetic diagnosis by whole exome capture and massively parallel DNA sequencing. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009; 106:19096-10.
7. van El CG, Cornel MC, Borry P, et al. ESHG Public and Professional Policy Committee. Whole-genome sequencing in health care: recommendations of the European Society of Human Genetics. Eur J Hum Genet. 2013; 21:580-4.
8. Richards S, Aziz N, Bale S, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. Genet Med. 2015; 17:405-24.
9. 2020. EüK. 20. szám EMMI szakmai irányelv 2
10. Telli ML, Gradishar WJ, Ward JH. NCCN Guidelines Updates: Breast Cancer. J Natl Compr Canc Netw. 2019; 17:552-5.
11. Singer CF, Balmaña J, Bürki N, et al. Genetic counselling and testing of susceptibility genes for therapeutic decision-making in breast cancer-an European consensus statement and expert recommendations. Eur J Cancer. 2019; 106:54-60.
12. S Bonache et al. J Cancer Res Clin Oncol 144 (12), 2495-2513. Multigene Panel Testing Beyond BRCA1/2 in Breast/Ovarian Cancer Spanish Families and Clinical Actionability of Findings. J Cancer Res Clin Oncol 2018; 144: 2495-2513.
13. A.C. Antoniou, S. Casadei, T. Heikkinen, D. Barrowdale, K. Pylkas, J. Roberts, et al. Breast-cancer risk in families with mutations in PALB2 N Engl J Med, 2014; 371:497-506.
14. Tandy-Connor S, Guiltinan J, Krempely K, LaDuca H, Reineke P, Gutierrez S, et al. False-positive results released by direct-to-consumer genetic tests highlight the importance of clinical confirmation testing for appropriate patient care. Genet Med. 2018; 20: 1515-1521.
15. Gulland A: All patients with colorectal cancer should be tested for genetic condition, NICE advises BMJ 2017; 356:j998.
16. Sarkadi B, Grolmusz VK, Butz H, et al. Molekuláris genetikai vizsgálatok az örökletes endokrinológiai tumor szindrómák klinikai diagnosztikájában [Evolution of molecular genetic methods in the clinical diagnosis of hereditary endocrine tumour syndromes]. Orv Hetil. 2018;159:285-92.
17. Sarkadi B, Patócs A. Hereditary Diseases Predisposing to Pheochromocytoma (VHL, NF-1, Paraganglioma Syndromes, and Novel Genes). Exp Suppl. 2019; 111:129-47.
18. https://www.agilent.com/cs/library/datasheets/public/Performance%20characteristics%20BRCA%20MASTR%20Plus%20Dx%205991-8423ENN.pdf
19. Rattenberry E, Vialard L, Yeung A, et al. A comprehensive next generation sequencing-based genetic testing strategy to improve diagnosis of inherited pheochromocytoma and paraganglioma. J Clin Endocrinol Metab. 2013; 98:E1248-56.
20. Welander J, Andreasson A, Juhlin CC, et al. Rare germline mutations identified by targeted next-generation sequencing of susceptibility genes in pheochromocytoma and paraganglioma. J Clin Endocrinol Metab 2014; 99:E1352-60.
21. Vrijenhoek T, Kraaijeveld K, Elferink M, et al. Next-generation sequencing-based genome diagnostics across clinical genetics centers: implementation choices and their effects European Journal of Human Genetics 2015; 23:1142-50.
22. Gergics P, Toke J, Szilagyi A, et al. Methods for the analysis of large gene deletions and their application in some hereditary diseases. [A nagy géndeletiók kimutatásának módszerei és alkalmazásuk egyes örökletes betegségekben.] Orv Hetil. 2009; 150: 2258-64.
23. https://www.mrcholland.com/product/P002/491
24. Patócs A. Multiplex endokrin neoplasiák és egyéb örökletes endokrin tumor szindrómák pp. 447-464. In: Leövey A, Nagy VE, Paragh G; Rácz K (szerk.) Az endokrin és anyagcsere-betegségek gyakorlati kézikönyve Budapest, Medicina Könyvkiadó 2011; 703.
25. Lenders JW, Duh QY, Eisenhofer G, et al. Pheochromocytoma and paraganglioma: an Endocrine Society clinical practice guideline. J Clin Endocrinol Metab 2014; 99:1915-42.

Mi a szerepe a genetikai tanácsadásnak onkológiai betegségek esetén?

What is the role of genetic counselling in case of an oncological disorder?

Zeke Helga[1]*, Fekete Bálint András[1,2,3]*, Molnár Mária Judit[1]
* megosztott első szerzők
[1] Genomikai Medicina és Ritka Betegségek Intézete, Semmelweis Egyetem, Budapest
[2] Czeizel Intézet, Budapest
[3] New Era Genetics, Budapest
E-levél: drfekete@genetikus.com

ÖSSZEFOGLALÁS A genetikai tanácsadás egy olyan kommunikációs folyamat, mely során a klinikai genetikus tájékoztatást ad a genetikai vizsgálatok előnyeiről és kockázatairól, feltárja a lehetséges következményeket, illetve segít a genetikai betegség megértésében. A genetikai tanácsadás onkológiai indikációkban különösen fontos, mivel az onkológiai betegségek 5–10%-a örökletes, a megelőzésnek általában vannak lehetőségei, ugyanakkor az ilyen betegségek diagnózisa nagy pszichés terhet ró a genetikai vizsgálatot kérőre, illetve családjukra. A szóban forgó betegségek ismeretén túl a genetikai tanácsadás és genetikai tesztelés folyamatának megértéséhez fontos tisztában lennünk a genetikai tesztek típusaival, lehetséges eredményével is. A klinikai genetikus szerepének megértése végső soron segíti az örökletes onkológiai betegségek által érintett betegek diagnózisát és managementjét, ezáltal csökkenti a mortalitást és morbiditást.

KULCSSZAVAK genetika, onkológia, genetikai tanácsadás, tumorszindrómák, onkogenetika

SUMMARY Genetic counselling is a communication process during which the clinical geneticist advises the patient about the advantages and risks of genetic tests, possible outcomes and helps the understanding of the genetic disease. Genetic counselling in oncology is especially important since 5-10% of oncological disorders are hereditary, prevention is usually a possibility, while on the other hand the diagnosis of such disorders is a big psychological burden for the patient and for their family. It's important to know these disorders and the process of genetic counselling and testing but it's also crucial to be familiar with the available genetic test types and their possible outcomes. Understanding the role of the clinical geneticist helps the diagnosis and management of hereditary oncological disorders, thus reduces mortality and morbidity.

KEY WORDS genetics, oncology, genetic counselling, tumor syndromes, oncogenetics

A 2008. évi XXI. törvény a humángenetikai adatok védelméről, a humángenetikai vizsgálatok és kutatások, valamint a biobankok működésének szabályairól megfogalmazza a genetikai tanácsadás definícióját. Eszerint elsősorban olyan kommunikációs folyamat, amely során erre jogosult személy tájékoztatást ad a klinikai genetikai vizsgálatok előnyeiről vagy kockázatairól, feltárja a humángenetikai vizsgálatok eredményeinek lehetséges következményeit, és segíti a betegség természetének megértését. A jogszabály alapján jogosult személy klinikai genetikus lehet, aki ismeri a genetikai vizsgálatok különböző aspektusai mellett a különböző etikai, pszichés konfliktusokat, amelyekkel a vizsgálatra jelentkező személynek a jogszabályban is előírt megfelelő preteszt és poszteszt (genetikai teszt előtti és utáni) tanácsadás hiányában magának kell megküzdenie.[1] Bár ezen jogszabályok 2008 óta visszavonásig hatályosak, mégis előfordul, hogy nem a jogszabályban előírtak szerint járnak el a különböző szakterületek képviselői. Cikkünk a genetikai tanácsadás fontosságára kívánja irányítani a figyelmet.

A Humán Genom Projektnek (HGP) és a molekuláris genetikai technikai fejlődésnek köszönhetően az 1990-es évek óta az onkológiai betegségek természetéről is egyre többet tudunk. A molekuláris genetikai mechanizmusok megismerése a kezelések vonatkozásá-

Rövidítések

ACMG	*American College of Medical Genetics and Genomics*
CML	*krónikus myeloid leukaemia*
HGP	*Humán Genom Projekt*
LFS	*Li Fraumeni-szindróma*
LOH	*loss of heterozigosity*
OMIM	*Online Mendelian Inheritance in Man*
PGD	*preimplantációs genetikai diagnosztika*
VHL	*Hippel Lindau-betegség*

ban is előrelépést jelentettek, ezáltal az onkológia vált a személyre szabott medicina elsődleges szakterületévé. A daganatok többsége a testi sejtekben az élet során szerzetten alakul ki, de régóta ismeretes, hogy 5–10%-ban öröklődő tumor szindrómák következtében jön létre. Ilyen esetben az onkogén mutáció már a csírasejtek szintjén jelen van, legtipikusabb esetben heterozigóta formában, és az élet során különböző aktiváló mechanizmusok váltják ki a második allél károsodását, azaz a heterozigótaság úgymond „elveszik" (loss of heterozigosity).[2] Elsősorban ezekben az esetekben javasolt klinikai genetikus közreműködése és genetikai tanácsadás.

A herediter rákszindróma előfordulására hívhatja fel a családon belül a szokatlanul korai manifesztáció, a családban halmozottan fordulnak elő ugyan olyan típusú, vagy egymáshoz kapcsolódó daganatok (pl. emlő- és petefészekrák, bél- és endometriumrák), páros szerv esetén kétoldali tumor, több primer tumor jelenléte egyszerre, esetleg jellegzetes fenotípusos jegyek előfordulása, pl. melanosis Peutz–Jeghers-szindrómában.[2]

Az ACMG (American College of Medical Genetics and Genomics) 2015-ben ajánlást fogalmazott meg az örökletes rákszindrómák kivizsgálása és menedzsmentje tekintetében.[2] Az itt leírtak alapján az onkogenetikai tanácsadást végző klinikai genetikus feladata a családi anamnézis felvétele, a genetikai vizsgálat megszervezése, a differenciáldiagnosztikai szempontból kulcsfontosságú egyéb megbetegedések, szindrómák elkülönítése. Emellett a megfelelő managementre is ki kell térnie a tanácsadásnak, az utánkövetés és prevenciós ajánlások, illetve minden fokozott rizikónak kitett/érintett családtag genetikai tanácsadása, tesztelése mellett.[3] Bár minden genetikai vizsgálatot pre- és poszteszt tanácsadásnak kellene megelőznie, talán a herediter rákszindrómák esetében a legtényszerűbb ezek haszna. Amennyiben szakképzett klinikai genetikushoz irányítjuk a beteget, akkor a megfelelő genetikai teszt fog kiválasztásra kerülni. Ne felejtsük el, hogy a családot érintő pszichoszociális tehertétellel is a genetikus van tisztában, illetve a rossz hír közléséhez megfelelő kommunikációs stratégia birtokában is ő van. A legfontosabb herediter rákszindrómákat (az áttekinthetőség végett a teljesség igénye nélkül) összefoglaló táblázatot az ACMG ajánlás alapján készítettük *(1. táblázat)*.

A XXI/2008. számú *„A humángenetikai adatok védelméről, a humángenetikai vizsgálatok és kutatások, valamint a biobankok működésének szabályairól"* c. törvény alapján az Egészségügyi Minisztérium 2010-ben szakmai protokollt jelentetett meg a családon belüli betegséghalmozódásról (a familiáris megbetegedések genetikai hátterének felderítésére).[1]

1. táblázat: A legfontosabb herediter tumorszindrómák összefoglalása[3]

HEREDITER RÁKSZINDRÓMA	ÖRÖKLÉSMENET	ÉRINTETT GÉN	JELLEMZŐK/MIKOR REFERÁLJUK?
Carney-komplex (OMIM 160980)	AD	*PRKAR1A*	Lentiginosis, szív, bőr, emlő myxomák, endokrin tumorok (ezek közül a primer pigmentált nodularis adrenocorticalis tumorok előfordulása már elégséges a referáláshoz. A diagnosztika kritériumrendszer, McCune–Albright-szindróma elkülönítésében segít *Stratakis és társai* közleménye[10]
Cowden-szindróma (OMIM 158350)	AD	*PTEN*	Kulcstünete a macrocephalia, az arcon trichilemmomák, egyéb bőrtünetek. Korai emlőrák, follicularis thyreoid carcinoma, vesesejtes, endometrium-, colorectalis carcinoma, melanoma társulhat. A diagnosztikus kritériumrendszert *Tan és társai* foglalták össze[11]
Familiaris adenomatosus polyposis-szindróma (OMIM 175100)	AD	*APC*	Klinikai diagnózis: >100 polyp a colonban, de már 10 feletti adenomatosus colon polyp mellett referálni szükséges; fokozott duodenum, pancreas- és pajzsmirigyrák kockázattal kell számolni[12]
Familiáris emlő- és petefészekrák (OMIM 604370, 612555)	AD	*BRCA1, BRCA2*	Korai előfordulású emlő és petefészekrákra hajlamosít, férfiaknál is okozhat emlő- vagy prostatarákot. Pancreasrák, melanoma társulása gyakori. Ashkenazi zsidóknál prevalenciája magasabb, fiatal életkorban előforduló emlőrák, 60 évesnél fiatalabb korban előforduló tripla negatív emlőrák is genetikai tanácsadásra irányítandó
Familiáris melanoma (OMIM 155600)	AD	*CDKN2A/ ARF CDK4*	Típusosan >50 festékes naevus, pozitív családi anamnézis esetén vagy több. mint 3 melanoma szimultán előfordulása esetén referálandó[13]

HEREDITER RÁKSZINDRÓMA	ÖRÖKLÉSMENET	ÉRINTETT GÉN	JELLEMZŐK/MIKOR REFERÁLJUK?
Li–Fraumeni-szindróma (OMIM 151623)	AD	*TP53*	Emlő-, agy-, adrenocortex-carcinoma, leukaemia, lágyszövet-sarcoma, osteosarcoma, bronchoalveolaris rák, colorectalis carcinoma tartoznak az LFS spektrumba, és gyakran már 50 éves kor előtt megjelennek. A *TP53* mutáció valószínűsége nő, ha már 30 éves kor előtt jelentkezik az első tumor. Az alábbi 2020-as guideline rendkívül részletes ajánlásokat fogalmaz meg a genetikai tesztelés, preszimptomás szűrés, surveillance tekintetében[14]
Lynch-szindróma (OMIM 120435, 120436)	AD	*MLH1, MSH2*	Urothelialis carcinoma, glioblastoma, lágyszöveti sarcomák, colorectalis carcinoma, pancreasrák. A legfrissebb guideline 2020-ban jelent meg[15]
Gorlin–Goltz-szindróma (OMIM 109400)	AD	*PTCH1, PTCH2, SUFU*	Jellegzetes fenotípussal, legtöbbször szembetűnő arcdysmorphiával járó basal sejtes neavusok előfordulása. A macrocephalia és a skeletalis eltérések együttes jelenléte könnyen felismerhetővé teszik a kórképet. A diagnózis kimondásához két major és egy minor, vagy egy major és három minor kritériumnak kell teljesülnie[16]
Multiplex endokrin neoplasia I (OMIM 131100)	AD	*MEN1*	Két vagy több különböző MEN1-asszociált tumor társulása esetén (mellékvese-, mellékpajzsmirigy-, agyalapi mirigy, hasnyámirigy-, thymustumor vagy bronchialis carcinoid tumor) referálandó. Gastrinoma önmagában is elegendő kritérium, vagy több különböző pancreas neuroendokrin tumor előfordulása ugyanannál a személynél[17]
Multiplex endokrin neoplázia II. (OMIM 171400, 155240, 162300)	AD	*RET*	Medullaris pajzsmirigyrák, phaeochromocytoma, mellékpajzsmirigy-carcinoma társulása[18]
Neurofibromatosis I. (OMIM 162200)	AD	*NF1*	Cafe-au-lait foltok, Lisch-nodulusoik, hónalji szeplők, fibromatosus tumorok jellemzik elsősorban, „perifériás neurofibromatosis”
Neurofibromatosis II. (OMIM 101000)	AD	*NF2*	Bilaterális acusticus neurinoma, meningeomák, scwannomák jellemzik elsősorban, „centrális neurofibromatosis”
Retinoblastoma (OMIM 180200)	AD	*RB1*	5 éves kor alatt előforduló retinatumor, legalább 40%-ban öröklött, pozitív családi anamnézis, bilateralis tumorok a legfőbb hajlamosító tényezők.
Peutz–Jeghers-szindróma (OMIM 175200)	AD	STK11	Mucocutan hyperpigmentatio szájban, ajkakon, orron, szemen, genitaliákon, ujjakon, gastrointestinalis traktus hamartomatosus polypusai mellett, illetve a colorectalis carcinoma, pancreasrák és gyomorcarcinoma előfordulási valószínűsége magasabb[19]
Sclerosis tuberosa (OMIM 191100)	AD	TSC1, TSC2	Agy-, vese-, szív-, bőr- és idegrendszeri tumorok előfordulása jellemző. Legalább két minor vagy major kritérium előfordulása esetén referálandó[20]
Von Hippel–Lindau-szindróma (OMIM 193300)	AD	VHL	Világos sejtes veserákhoz haemangioblastoma, phaeochromocytoma is társulhat

A genetikai törvény alapján a genetikai tanácsadó orvos diagnosztikai, preszimptómás, prediktív, farmakogenomikai és carrier tesztelés, prenatalis és preimplantációs genetikai vizsgálatokat rendelhet el.[4]

Diagnosztikai tesztelés egy adott betegségben érintett személy célzott genetikai vizsgálatát jelenti, de az eredménytől függően a vizsgálat a későbbiekben kiterjedhet a családtagokra is, az öröklésmenet függvényében.[3] Amint azt az *1. táblázatban* is láthatjuk, számos onkogenetikai betegség esetében van létjogosultsága a célzott genetikai tesztelésnek. Sajnos ott még nem tartunk, hogy minden esetben maga a célszemély profitáljon a tesztelésből, de a családtagok vizsgálatának haszna prevenciós célzattal nem megkérdőjelezhető, mint ahogy ezek pszichoszociális hatása sem. Ismét hangsúlyozzuk, hogy a rossz hír közlésében, a megküzdési stratégiákra, további életvezetésre történő javaslattételben egy szakképzett klinikai genetikus nyújthat megfelelő segítséget, a pre- és poszteszt tanácsadás vonatkozásában. Genetikai mintavételt csak az érintett írásbeli beleegyezését követően lehet végezni, 18 éven aluliak esetében a szülők hozzájárulása szükséges a vizsgálat-

hoz.[1] Itt jegyeznénk meg azt is, hogy 18 éven aluliak genetikai vizsgálatát nemzetközi gyakorlatban is csak tünetek megjelenése vagy várható megjelenése esetén ajánlják.

Preszimptómás tesztelés nagy kockázatnak kitett egyenesági családtag genetikai tesztelését jelenti, még a tünetek megjelenése előtt, mely tünetek megjelenése pozitív esetben várható. A prediktív genetikai tesztelés egy egészséges személy fokozott rizikóját vizsgálja és némileg hasonló a preszimptomás genetikai teszthez.[3] Ebben az esetben a vizsgált betegség jövőbeni kialakulását tekintve több a bizonytalanság, nem kell feltétlenül a talált betegség manifesztációjára számítani.

Általánosságban herediter rákszindrómák esetén elmondhatjuk, hogy az ideális életkor a tesztelésekre nézve a húszas életévekre tehető. Nagyon fontos hangsúlyozni mind a szülők, mind a gyermekeik felé, hogy valóban nem elhanyagolhatók a prevenciós lehetőségekből és utánkövetésből származó előnyök, de a vizsgálat végzése minden esetben egyéni döntés eredményeként kell megszülessen, és a választási lehetőséget fel kell ajánlani. A vizsgálat eredménye az élet bármilyen területére kihatással lehet, befolyásolhatja a pályaválasztást, a családalapítást, a társadalmi beilleszkedést, erről mind tájékoztatni szükséges az érintetteket.

Egy 152 fiatal felnőttet vizsgáló tanulmányban az átlagéletkor a teszteléskor 20 év körülinek mondható, általánosságban 5 és 30 éves koruk között értesültek a fokozott rizikóról, döntő többségük (111-en közülük) a 18. születésnapja után kapta meg a tájékoztatást, 54-ükkel az édesanya közölte, 19-ükkel az édesapa, 16 esetben a szülők együttesen, és mindösszesen 26-an beszéltek genetikai tanácsadóval/orvossal először (a fennmaradó esetekben távolabbi családtagtól értesültek). A vizsgálatban résztvevők döntő többsége, 105 fő saját maga döntött a genetikai vizsgálat végzéséről, a többiek erős presszióról számoltak be a család részéről. A legjelentősebb aggodalomnak a részt vevő fiatalok részéről a gyermekvállalás kérdése bizonyult, az érintett szülők szinte egyöntetűen a gyermekeik tesztelését támogatták, és jelentős bűntudatról számoltak be (különösen az anyák).[4]

Onkogenetikai vonatkozásban legtöbbet tárgyalt területe a *BRCA1* és *-2* gének által okozott örökletes emlőrák.[5] A korai előfordulású emlőrák hátterében 40–50%-ban mutatható ki a *BRCA1* gén genetikai hibája, míg *BRCA2* génben előforduló hibák további 30–40%-ért felelősek. Abban az esetben, ha egy nő bizonyítottan *BRCA1* mutációt hordoz, 60–85% esélye van arra, hogy az élete során mellrák fog kialakulni nála, *BRCA2* gén esetén is hasonló a várható kockázat. Ilyen esetekben a petefészekrák rizikója is emelkedett, illetve férfiak esetén emelkedett prosztatarák kockázattal és az egyébként alacsony előfordulási gyakoriságú férfi mellrák akár 100-szoros rizikóemelkedésével kell számolnunk. Örökletes emlőrák gyanúját veti fel emlőrák előfordulása több közeli családtagnál, fiatal életkor, emlő és petefészekrák előfordulása a családban, akár külön-külön családtagokban, vagy ugyanazon egyénnél, kétoldali emlőrák, illetve emlőrák előfordulása férfiak esetében.[2]

A *BRCA* gének vizsgálatát követően a prevenció magában foglalhat bizonyos életmódbeli változtatásokat, rizikóra specifikus szűréseket, megelőző műtéti eltávolítást, esetleg gyógyszeres terápiát.[2] Nagy figyelmet kapott Angelina Jolie profilaktikus mastectomiája 2013-ban, pro és kontra is számos kérdés merült fel, pl. a beültetett implantátumok mellett a képalkotó vizsgálatokkal történő szűrés hatékonysága csökkenhet. A preteszt genetikai tanácsadásnak ki kell térnie arra is, hogy sem a pozitív, sem a negatív eredmény nem jelent az emlőrák esetében definitív diagnózist (életmódbeli, környezeti tényezők, akár egy korábbi eltérés átminősítése miatt).

Az American College of Medical Genetics and Genomics 2015-ös frissített guideline-ja[6] alapján a genetikai riportok terminológiájában 5 különböző kategória különíthető el, ezek a *„pathogenic (patogén)”, „likely pathogenic (valószínűleg patogén)”, „uncertain significance (ismeretlen jelentőségű)”, „likely benign (valószínűleg benignus)”* és *„benign (benignus)”* eltérések. Ez különösen nehéz kihívás elé állítják a genetikai tanácsadás során az orvost. Nem mindig könnyű például eldönteni, hogyan interpretáljuk a lehetséges kockázatokat egy megtalált eltérés esetében, illetve például egy olyan egyén tekintetében, aki abban a tudatban jött be a rendelőbe, hogy teljesen egészséges.

Kiemelendő, hogy a manifeszt tumorok genetikáját vizsgáló tesztek a precíziós orvostudomány/személyre szabott medicina fontos részei, annak vizsgálatát takarják, hogy az adott egyén genetikai háttere hogyan befolyásolhatja a gyógyszerre adott reakcióját. Ilyen információk alapján az egyén számára legmegfelelőbb kezelés indikálható, nem véletlen, hogy leginkább az onkológia szakterületen tudják ezen információkat felhasználni és rendkívül dinamikus fejlődésnek lehetünk a szemtanúi. A rákgenom feltérképezésével célzott terápia rendelhető el, és megfelelően megválasztott terápiás célpontok mellett a kemoterápiás szerek akár alacsonyabb dózisban is alkalmazhatók, így kevesebb toxicitással is járhatnak. A CML-re jellemző t(9;22)(q34;q11) reciprok transzlokáció hordozása esetén alkalmazott

tirozinkináz-gátló kezelés volt az első alkalmazása a személyre szabott medicinának az onkológiában.[2] Azonban mivel leggyakrabban sporadikus eltérésekről van szó, legtöbbször a beteg nem találkozik klinikai genetikussal a kivizsgálás során.

Manapság a terápiás célpontként szolgáló genetikai hibák jelentős része ún. „liquid biopszia" végzésével a vérből kimutatható (a tumorszövetből bizonyos mennyiségű DNS a keringésbe kerül).[2] Magyarországon egyelőre egynéhány daganat esetében érhető el az eljárás, de amennyiben széleskörűen hozzáférhetővé válik, mintegy szűrővizsgálatként forradalmasíthatja az onkogenetika szakterületét.

A teljesség kedvéért megemlítendő, hogy a **carrier/hordozósági tesztelést** általában autoszomális recesszív és X-hez kötött betegségek esetében végzünk szülőkben, praenatalisan vagy családtervezés keretében, az egészséges utód biztosítása céljából. A pár által rejtetten hordozott eltérések kiszűrése történik meg. Praenatalis vizsgálat alatt a koraterhességben végzett genetikai vizsgálatot értjük, amennyiben a magzatra nézve fokozott kockázatú genetikai eltérés valószínűsíthető. Preimplantációs genetikai diagnosztika (PGD) során a praeembryo vizsgálata történik a családban ismert genetikai eltérésre nézve, IVF technológiához kapcsoltan.[4] Onkogenetikai vonatkozásban nem jellemző ilyen tesztek végzése.

Tapasztalataink szerint Magyarországon kevés praenatalis vizsgálat történik onkogenetikai indikációval. Olyan kifejezetten súlyos kórképekben megfontolandó a végzése, mint a von Hippel Lindau-betegség (VHL) vagy a Li Fraumeni-szindróma.[7] Az ezen betegségre hordozó személyeknek az életük során igen jelentős rizikóval kell számolniuk és az első megjelenés érintheti a gyermekkort is. A BRCA praenatalis tesztelés is komoly vita tárgyát képezi,[8] itt a legfőbb ellenérv, hogy lehetőség nyílik profilaktikus mastectomia/oophorectomia végzésére. A PGD alkalmazása ilyen indikációban jelenleg is nagy vita tárgyát képezi szakmai körökben, de az érintettek részéről régóta ismeretes ilyen igény megfogalmazódása.[9]

Napjainkra jelentős mértékben megnőtt az igény az onkológiai betegek genetikai vizsgálatára, és a gyakorló klinikusra hárul a teher, hogy eldöntse szükséges-e a tesztelés, illetve mi a megfelelő szűrési stratégia. Az érvényes jogszabály értelmében ezen döntést a klinikai genetikus hozhatja meg, jelen cikkünk a genetikai tanácsadásra irányítás eldöntésében kíván segítséget nyújtani és az multidiszciplináris management szükségességére kívánja irányítani a figyelmet.

Irodalom

1. 2008. évi XXI. törvény a humángenetikai adatok védelméről, a humángenetikai vizsgálatok és kutatások, valamint a biobankok működésének szabályairól. https://net.jogtar.hu/jogszabaly?docid=A0800021.TV&celpara=&searchUrl=/jogszabaly-kereso%3Fevszam%3D%26sorszam%3D%26para%3D%26tipus%3Dnincs%26kif%3D2006/66/EK%250D%250A2008/12/EK%250D%250A2008/103/EK%26searchfor%3Don%26pagenum%3D5
2. Raskó I, Oláh É, Gaál Zs. A karcinogenesis genetikája és Oláh É, Balogh I, Ujfalusi A. Gyakoribb malignus kórképek citogenetikai és molekuláris genetikai jellemzői. 353-431, Oláh É. Klinikai Genetika, Medicina Kiadó, 2015.
3. Hampel H, Bennett RL, Buchanan A, et al. A practice guideline from the American College of Medical Genetics and Genomics and the National Society of Genetic Counselors: referral indications for cancer predisposition assessment. Genet Med 2015; 17:70-87.
4. EüM szakmai protokoll a családon belüli betegséghalmozódásról (a familiáris megbetegedések genetikai hátterének felderítésére). https://old-kollegium.aeek.hu/conf/upload/oldiranyelvek/KLIN-GEN_csaladon%20beluli%20betegseghalmozodasrol_mod1_v0.pdf
5. https://www.nhs.uk/conditions/predictive-genetic-tests-cancer/
6. Richards S, Aziz N, Bale S, et al; ACMG Laboratory Quality Assurance Committee. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. Genet Med. 2015; 17(5):405-24.
7. Avigad, Smadar PhD; Peleg, Dan MD; Barel, Dalit PhD; Benyaminy, Hadar MSc; Ben-Baruch, Noa MD; Taub, Ellen MSc; Shohat, Mordechai MD; Goshen, Yacov MD; Cohen, Ian J MBChB; Yaniv, Isaac MD; Zaizov, Rina MD Prenatal Diagnosis in Li-Fraumeni Syndrome, Journal of Pediatric Hematology/Oncology: September 2004; 26(9):541-5. doi: 10.1097/01.mph.0000139452.45209.ad
8. Lancaster JM, Wiseman RW, Berchuck A. An inevitable dilemma: prenatal testing for mutations in the BRCA1 breast-ovarian cancer susceptibility gene. Obstet Gynecol. 1996 Feb; 87(2):306-9. doi: 10.1016/0029-7844(95)00405-X. PMID: 8559544.
9. Lammens C, Bleiker E, Aaronson N, et al. Attitude towards pre-implantation genetic diagnosis for hereditary cancer. Fam Cancer. 2009; 8(4):457-64. doi:10.1007/s10689-009-9265-5
10. Stratakis CA, Kirschner LS, Carney JA. Clinical and molecular features of the Carney complex: diagnostic criteria and recommendations for patient evaluation. J Clin Endocrinol Metab 2001; 86:4041–6.
11. Tan MH, Mester J, Peterson C, Yang Y, Chen JL, Rybicki LA, Milas K, Pederson H, Remzi B, Orloff MS, Eng C. A clinical scoring system for selection of patients for PTEN mutation testing is proposed on the basis of a prospective study of 3042 probands. Am J Hum Genet. 2011;88:42–56.
12. Provenzale D, Gupta S, Ahnen DJ, Bray T, Cannon JA, Cooper G, David DS, Early DS, Erwin D, Ford JM, Giardiello FM, Grady W, Halverson AL, Hamilton SR, Hampel H, Ismail MK, Klapman JB, Larson DW, Lazenby AJ, Lynch PM, Mayer RJ, Ness RM, Regenbogen SE,

Samadder NJ, Shike M, Steinbach G, Weinberg D, Dwyer M, Darlow S. Genetic/familial high-risk assessment: colorectal version 1.2016, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. J Natl Compr Canc Netw. 2016; 14:1010-30.

13. Debniak T. Familial malignant melanoma - overview. Hered Cancer Clin Pract. 2004; 2(3):123-129. doi:10.1186/1897-4287-2-3-123
14. Frebourg T, Bajalica Lagercrantz S, Oliveira C, et al. Guidelines for the Li–Fraumeni and heritable TP53-related cancer syndromes. Eur J Hum Genet 2020; 28:1379-86. https://doi.org/10.1038/s41431-020-0638-4
15. Monahan KJ, Bradshaw N, Dolwani S Hereditary CRC guidelines eDelphi consensus group, et al Guidelines for the management of hereditary colorectal cancer from the British Society of Gastroenterology (BSG)/Association of Coloproctology of Great Britain and Ireland (ACPGBI)/ United Kingdom Cancer Genetics Group (UKCGG) Gut 2020; 69:411-44.
16. Bree AF, Shah MR; BCNS Colloquium Group. Consensus statement from the first international colloquium on basal cell nevus syndrome (BCNS). Am J Med Genet A. 2011 Sep; 155A(9):2091-7. doi: 10.1002/ajmg.a.34128. Epub 2011 Aug 10. PMID: 21834049.
17. Lassen T, Friis-Hansen L, Rasmussen ÅK, Knigge U, Feldt-Rasmussen U, Primary Hyperparathyroidism in Young People. When Should We Perform Genetic Testing for Multiple Endocrine Neoplasia 1 (MEN-1)? The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2014 Nov; 99(11):3983-7. https://doi.org/10.1210/jc.2013-4491
18. Brandi ML, Gagel RF, Angeli A, et al. CONSENSUS: Guidelines for Diagnosis and Therapy of MEN Type 1 and Type 2, The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2001 Dec; 86(12):5658-71. https://doi.org/10.1210/jcem.86.12.8070
19. Beggs AD, Latchford AR, Vasen HFA, et al Peutz–Jeghers syndrome: a systematic review and recommendations for management Gut 2010; 59:975-86.
20. Roach ES, Gomez MR, Northrup H. Tuberous sclerosis complex consensus conference: revised clinical diagnostic criteria. J Child Neurol 1998; 13:624-8.