Установяване на EGFR мутационен статус от бронхоалвеоларен лаваж при пациенти с първичен белодробен аденокарцином

Д-р Н. Янев, д-р Д. Вълев, проф. Д. Костадинов
Катедра по Белодробни Болести при МФ на МУ София,
Бронхологично Отделение при МБАЛББ „Света София“ ЕАД

AstraZeneca

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ MEDICAL UNIVERSITY SOFIA СОФИЯ

Въведение в проблема

- В последните години се наблюдава революция в геномното профилиране и молекулярно типизиране на белодробния карцином

- Пълно геномно профилиране се препоръчва за преценка на оптимална персонализирана терапия

AstraZeneca

Рецепторът на епидермалния растежен фактор (EGFR)

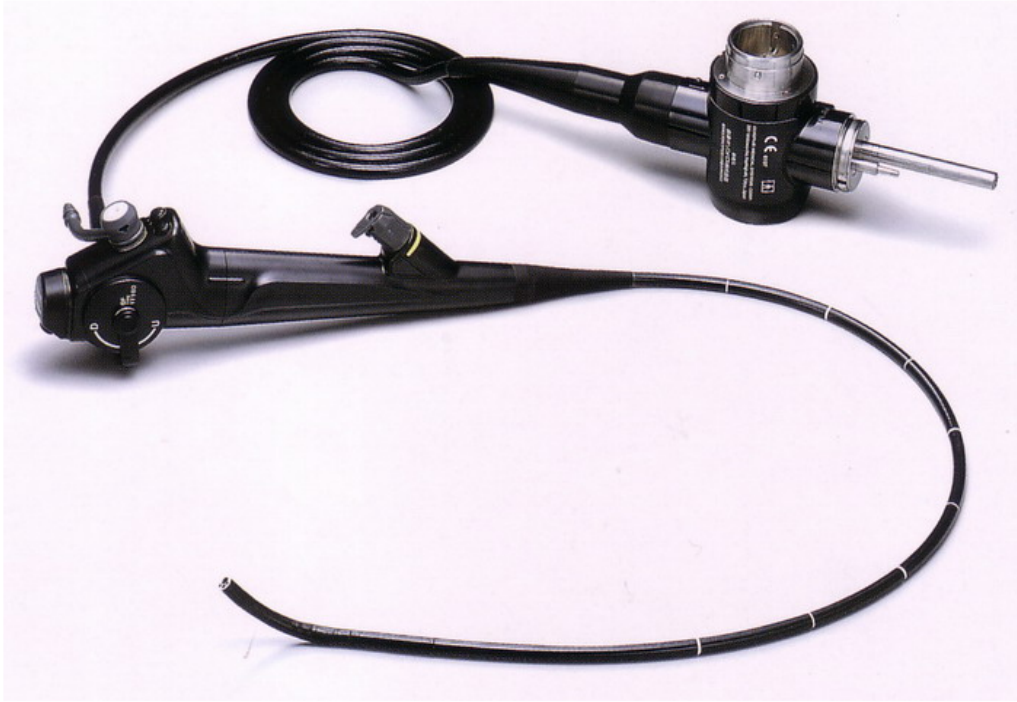
- Рецепторът на епидермалния растежен фактор (EGFR) е ключов онкоген за провеждане на таргетна терапия наред с други - ALK, BRAF, MET и ROS
- Лечение с първа и втора генерация EGFR тирозин-киназни инхибитори като gefitinib, erlotinib и afatinib се пропръчва при пациенти с чувствителни мутации (Exon 19 Deletions, L858R) в киназния домейн на гена на EGFR (1)
- Лечението значително повишава средната преживяемост без прогресия и подобрява процента на отговор при пациенти с NSCLC, чиито тумори имат ключови генетични изменения или „онкогенни драйвери“

Novello S, Barlesi F, Califano R, et al. Metastatic non- small-cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines or diagnosis, treatment and follow-up. Ann Oncol 2016;27:v1-v27.

Златен стандарт

- Златен стандарт за определяне на EGFR мутационния статус са хистологични материали, взети чрез бронхоскопски метод (трансброхиална биопсия, щипкова биопсия и др.) или оперативен материал

- Малките биопсии и цитологични материали са единствен материал при повече от 80% от пациентите с недребноклетъчен карцином[6]



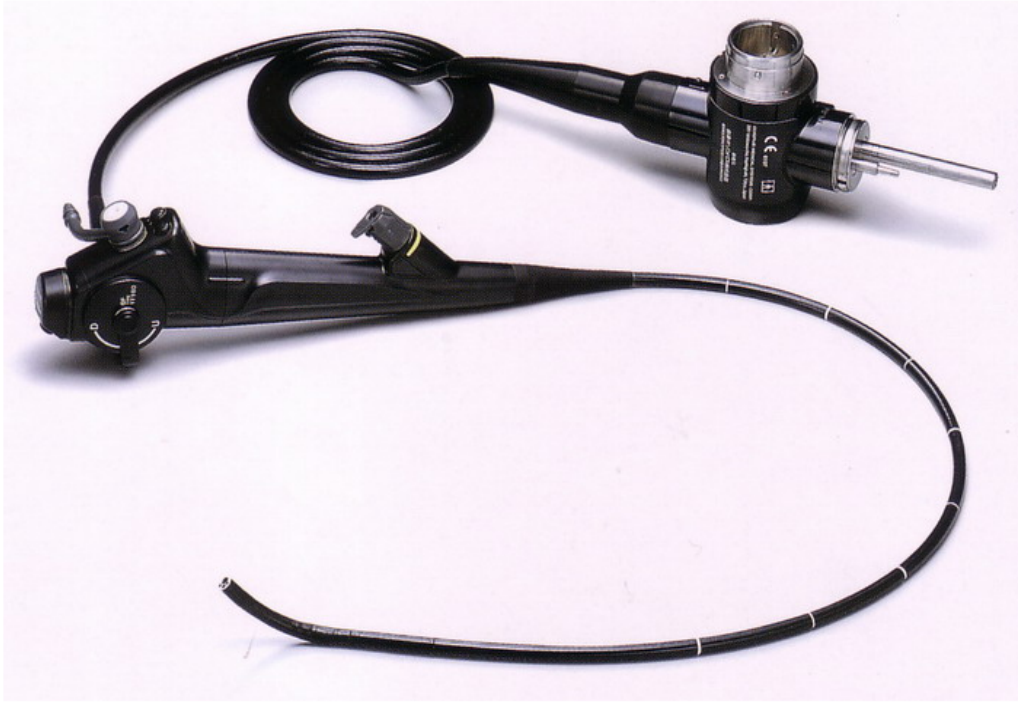
Lindeman NI, Cagle PT, Beasley MB, Chitale DA, Dacic S, Giaccone G, Jenkins RB, Kwiatkowski DJ, Saldivar JS, Squire J, et al: Molecular testing guideline for selection of lung cancer patients for EGFR and ALK tyrosine kinase inhibitors guide- line from the College of American Pathologists, International Association for the Study of Lung Cancer, and Association for Molecular Pathology. J Mol Diagn 15: 415-453, 2013.
Bubendorf L, Lantuejoul S, de Langen AJ, et al. Nonsmall cell lung carcinoma: diagnostic difficulties in small biopsies and cytological specimens: Number 2 in the Series "Pathology for the clinician" Edited by Peter Dorfmüller and Alberto Cavazza. Eur Respir Rev 2017;26.

Бронхоскопски биопсии

Риск – от проведени 75 000 фибробронхоскопии с локална анестезия:

- усложнения 0.08%: 5% (пневмоторакс, хипоксемия, хеморагия)
- Смъртност: 0.01% - 0.5%

В някои случаи е предизвикателство да бъде взета достатъчно туморна тъкан за морфологична и молекулярна верификация



Bubendorf L, Lantuejoul S, de Langen AJ, et al. Nonsmall cell lung carcinoma: diagnostic difficulties in small biopsies and cytological specimens: Number 2 in the Series "Pathology for the clinician" Edited by Peter Dorfmüller and Alberto Cavazza. Eur Respir Rev 2017;26.

Бронхоскопски биопсии

Диагностичен успех в зависимост от “видимостта” на тумора

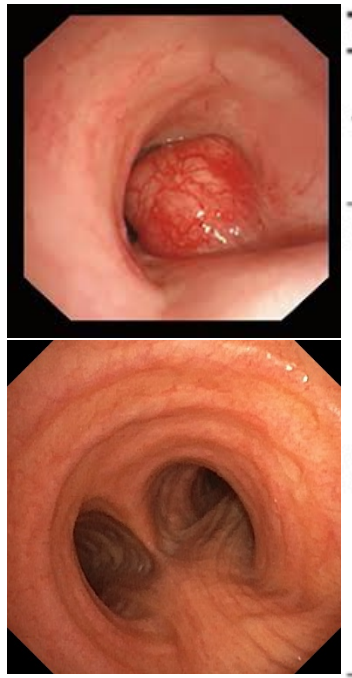


Table III. Diagnostic yield of different bronchoscopic sampling techniques.

Technique	No. of patients (%)		
	Application No. (%)	Diagnostic yield No. (%)	Only technique with a diagnostic result No. (%)
Bronchoscopically-visible tumours (n = 340)			
Bronchial washing	254 (74.7)	72 (28.3)	21 (8.3)
Endobronchial biopsy	325 (95.6)	252 (77.5)	143 (44.0)
Bronchial brushing	67 (19.7)	36 (53.7)	6 (9.0)
Bronchoscopically non-visible tumours (n = 163)			
Bronchoalveolar lavage	155 (95.1)	55 (35.5)	38 (24.5)
Brushing	70 (42.9)	16 (22.9)	9 (12.9)
Transbronchial biopsy	54 (33.1)	17 (31.5)	7 (13.0)

Liam C K, Pang Y K, Poosparajah S, Singapore Med J 2007; 48 (7) : 625

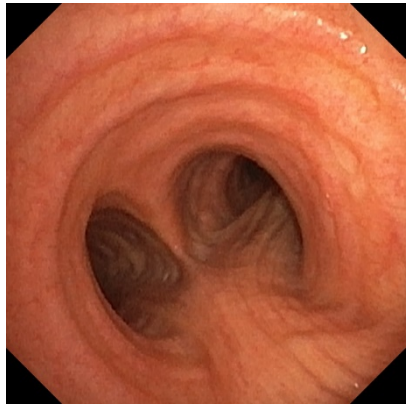


Table IIIa. Bronchoscopic procedures and yields in patients with bronchoscopically-visible tumours.

Procedure(s) performed / Procedure(s) and yield	EBB only	BW only	BB only	EBB and BW	EBB and BB	BW and BB	EBB, BW and BB
EBB positive	62			71	1		9
EBB negative	11			–	–		4
BW positive		2	–	17		–	2
BW negative		6	–	–		–	4
BB positive					–	1	5
BB negative					–	–	–
EBB and BW positive				80			–
EBB and BW negative				23			–
EBB and BB positive					12		–
EBB and BB negative					–		–
BW and BB positive						4	–
BW and BB negative						2	–
EBB, BW and BB positive							17
EBB, BW and BB negative							7
Total	73	8	–	191	13	7	48

EBB: endobronchial biopsy; BW: bronchial washing; BB: bronchial brushing.
The figures represent the numbers of patients in whom the procedure(s) was/were performed which yielded positive or negative results.

85% 25% 79% 71% 68%

Table IIIb. Bronchoscopic procedures and yields in patients with bronchoscopically non-visible tumours.

Procedure(s) performed / Procedure(s) and yield	BAL only	BB only	TBB only	BAL and B	BAL and TBB	B and TBB	BAL, B and TBB
BAL positive	21			4	10		3
BAL negative	39			–	–		1
B positive		2		3		–	4
B negative		1		–		–	3
TBB positive			2		2	–	3
TBB negative			2		–	–	3
BAL and B positive				7			–
BAL and B negative				32			–
BAL and TBB positive					10		–
BAL and TBB negative					7		–
B and TBB positive						–	–
B and TBB negative						1	–
BAL, B and TBB positive							–
BAL, B and TBB negative							3
Total	60	3	4	46	29	1	20

BAL: bronchoalveolar lavage; B: brushing; TBB: transbronchial biopsy
The figures represent the numbers of patients in whom the procedure(s) was/were performed which yielded positive or negative results.

35% 30% 75% 50%

Liam C K, Pang Y K, Poosparajah S, Singapore Med J 2007; 48 (7) : 625

Бронхоскопски биопсии

- Диагностичен успех в зависимост от разположението на тумора в бронхиалното дърво
- В зависимост от размера на биопсията - криобиопсия

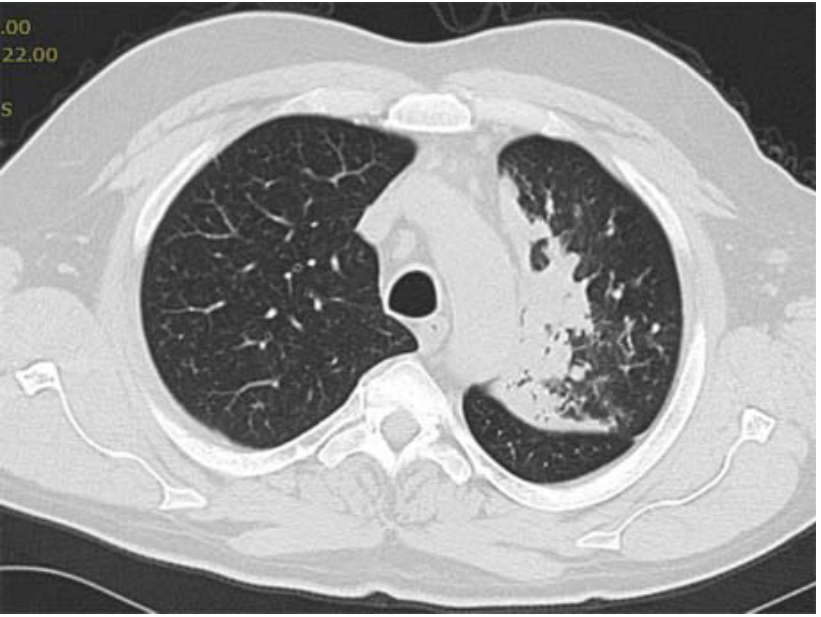
Table VI. Effect of location of tumour on diagnostic yield of bronchoscopic sampling procedures.

Tumour location	No. of cases with diagnostic specimens/total no. of cases (%)					
	Bronchial washing	Endobronchial biopsy	Bronchial brushing in patients with BVT	Broncho-alveolar lavage	Bronchial brushing in patients with no BVT	Transbronchial biopsy
Main bronchus	10/40 (25.0)	52/59 (88.1)	7/9 (77.8)	–	–	–
Upper lobe	29/116 (25.0)	114/151 (75.5)	17/34 (50.0)	19/78 (24.4)	7/37 (18.9)	7/26 (26.9)
Intermediate bronchus	11/28 (39.3)	26/30 (86.7)	4/5 (80)	–	–	–
Middle/ lingular lobe	3/16 (18.8)	12/21 (57.1)	1/2 (50.0)	2/13 (15.4)	3/8 (37.5)	0/4 (0)
Lower lobe	20/59 (33.9)	53/70 (75.7)	8/18 (44.4)	12/65 (18.5)	10/25 (40.0)	10/24 (41.7)
Total	73/259* (28.2)	257/331*** (77.6)	37/68** (54.4)	33/156** (21.2)	20/70 (28.6)	17/54 (31.5)

BVT: bronchoscopically-visible tumour

* Five patients had tumours in two different lobes; ** One patient had tumours in two different lobes; *** Six patients had tumour in two different lobes.

Liam C K, Pang Y K, Poosparajah S, Singapore Med J 2007; 48 (7) : 625



Използвани бронхоскопски биопсични техники:

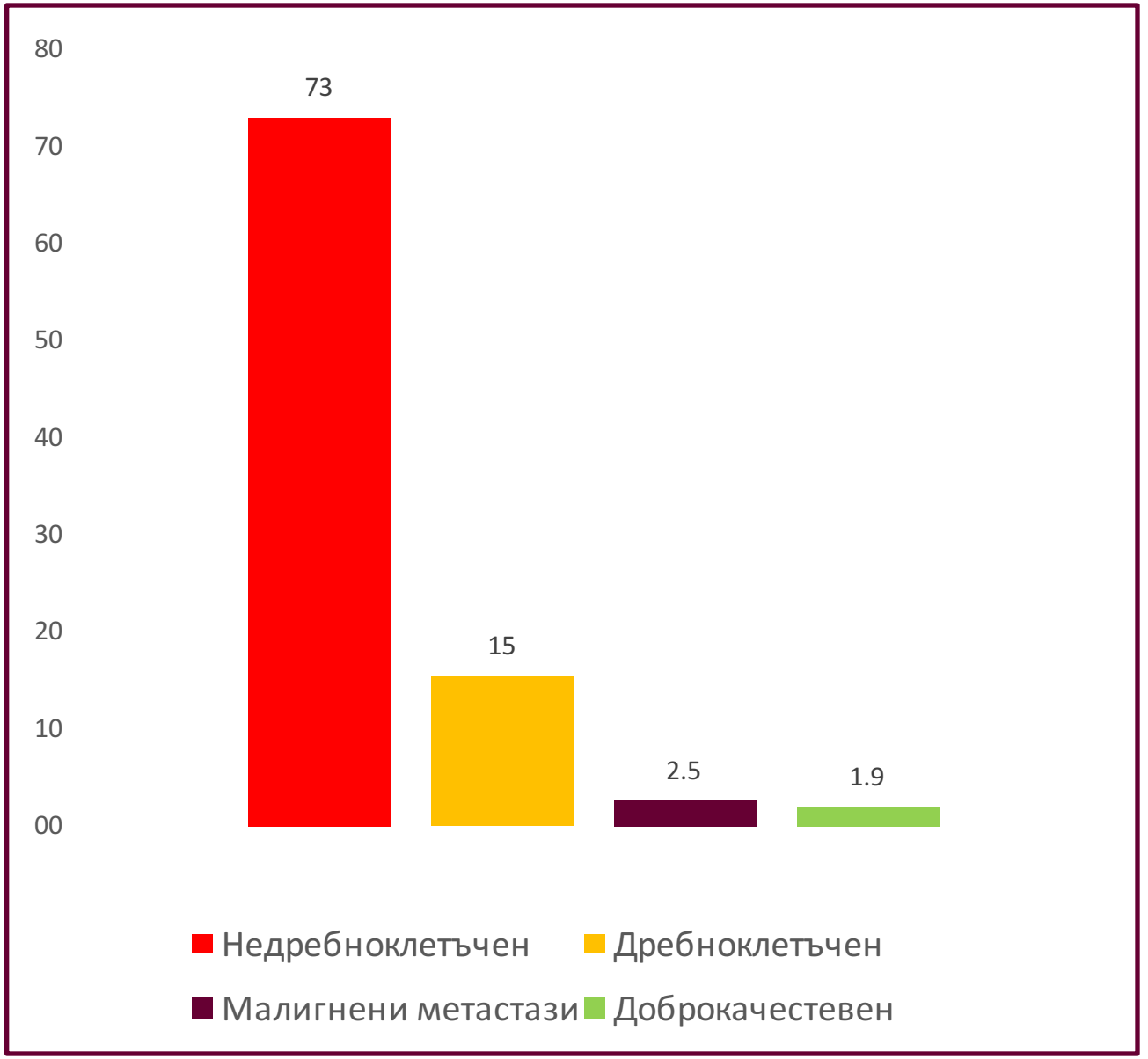
1. ТБТАБ
2. ФЩБ
3. БАЛ

Използвани бронхоскопски биопсични техники:

1. КБ
2. БАЛ

Диагноза

- За периода 2016-2018 са проведени 3216 бронхоскопии
- От тях при 1391 (51%) със съмнение за неоплазия
- Хистологична доказана при 1087 **(78.1%)**
- Възраст 63.1 ± 9,8; Мъже 76,3%



Недребноклетъчен Рак на Белия Дроб (НДРБД)

- Установен аденокарцином при 264 пациенти
- Честотата на аденокарцином е по-висока при жени (39,1% vs 19.7%; p<0.05)
- Честотата на плоскоклетъчен карцином е по-висока при мъже (39,7% vs 16,7%; p<0.05)

Честота

Мултицентрово проучване, проведено в България при 1427 пациента с недребноклетъчен белодробен карцином, установява по-висока честота на EGFR положителен мутационен статус при пациенти със следните характеристики:

- аденокарцином (12.5%)
- жени (19.4%)
- непушачи (22.9%)
- напреднала възраст

Тези резултати са съпоставими с получените сред изследвани пациенти в Северна Америка и Западна Европа[2*]

Bichev, S.N., Marinova, D.M., Slavova, Y.G. et al. Cell Oncol. (2015) 38: 145. https://doi.org/10.1007/s13402-014-0211-7

EGFR мутационен статус

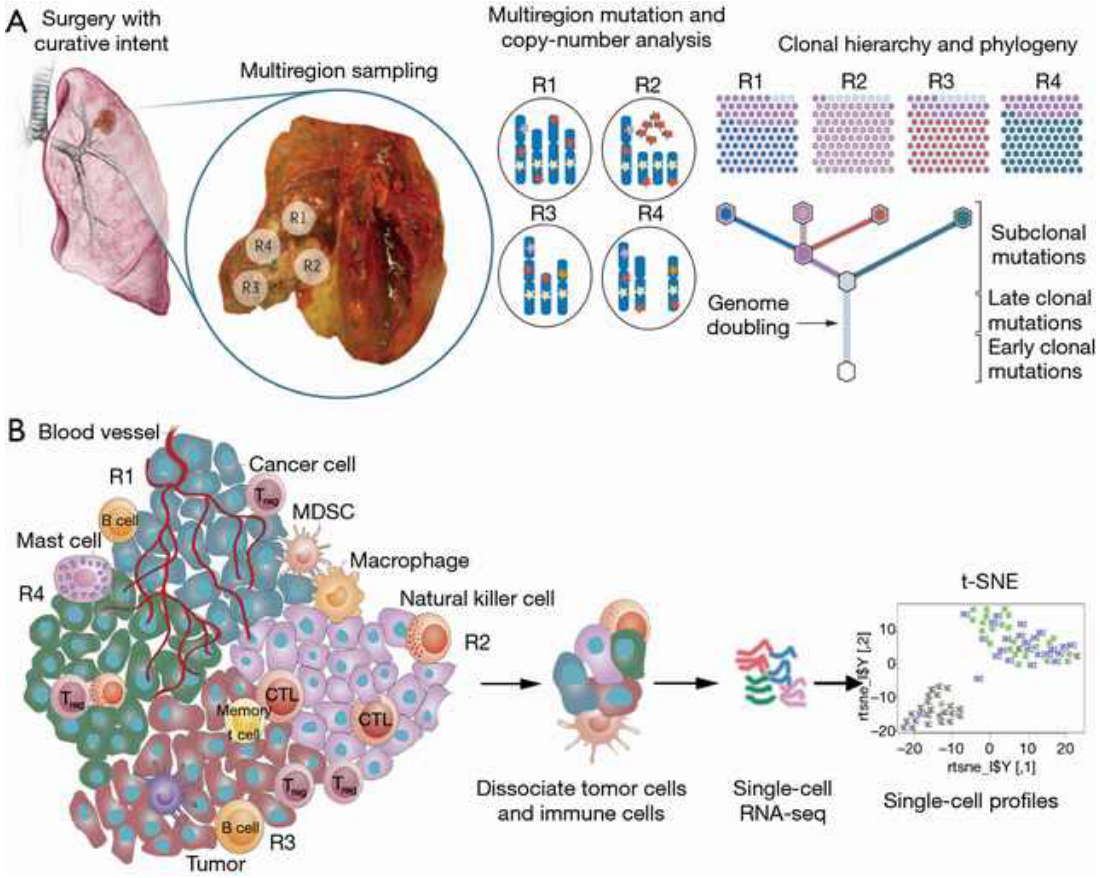
- От обобщаващи данни на Spicer и сътрудници, EGFR мутационен статус не е изследван при 19% от пациентите с недребноклетъчен белодробен карцином[4]

- Като основни причини се явяват:
  - недостатъчно тъканен матераил
  - тежко общо състояние на пациента
  - удължаване на времето за поставяне на диагнозата[5]

Spicer J, Tischer B, Peters M. EGFR mutation testing and oncologist treatment choice in advanced NSCLC: global trends and differences. Ann Oncol 2015;26:i57-i61.
Reck M, Hagiwara K, Han B et al. ctDNA determination of EGFR mutation status in European and Japanese patients with advanced NSCLC: The ASSESS study. J Thorac Oncol 2016;11:1682-9.

- Резултатите от генетичните изследвания от биопсия на един участък от тумора не са отражение на туморната хетерогенност и не позволяват проследяване на молекулярната резистентост в процеса на лечение[8]

- Съществуват няколко субклона в отделен тумор на белия дроб, всеки от които е представен от различен подтип рак на белия дроб. Някои подтипове рак на белия дроб са по-чувствителни към терапия



Spicer J, Tischer B, Peters M. EGFR mutation testing and oncologist treatment choice in advanced NSCLC: global trends and differences. Ann Oncol 2015;26:i57-i61.
Reck M, Hagiwara K, Han B et al. ctDNA determination of EGFR mutation status in European and Japanese patients with advanced NSCLC: The ASSESS study. J Thorac Oncol 2016;11:1682-9.

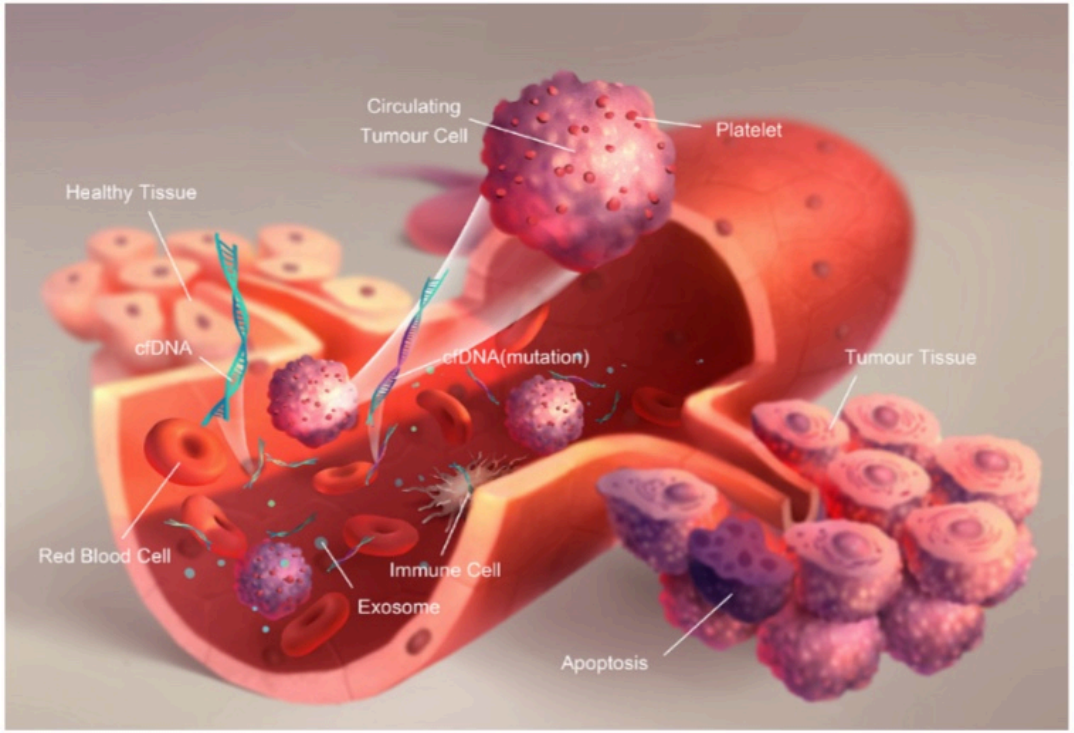
Течна биопсия

Изолирането на циркулираща туморна ДНК (ctDNA) от периферна кръв, известна като „течна биопсия“, е неинвазивен метод, алтернатива на тъканната биопсия за провеждане на молекулярен скрининг при пациенти, подходящи за таргетна терапия. Чувствителността и специфичността на метода варира в зависимост от платформата на изследване и качеството на изследвания материал[9]

Sacher AG, Komatsubara KM, Oxnard GR. Application of Plasma Genotyping Technologies in Non-Small Cell Lung Cancer: A Practical Review. J Thorac Oncol 2017;12:1344-56.

Течна биопсия

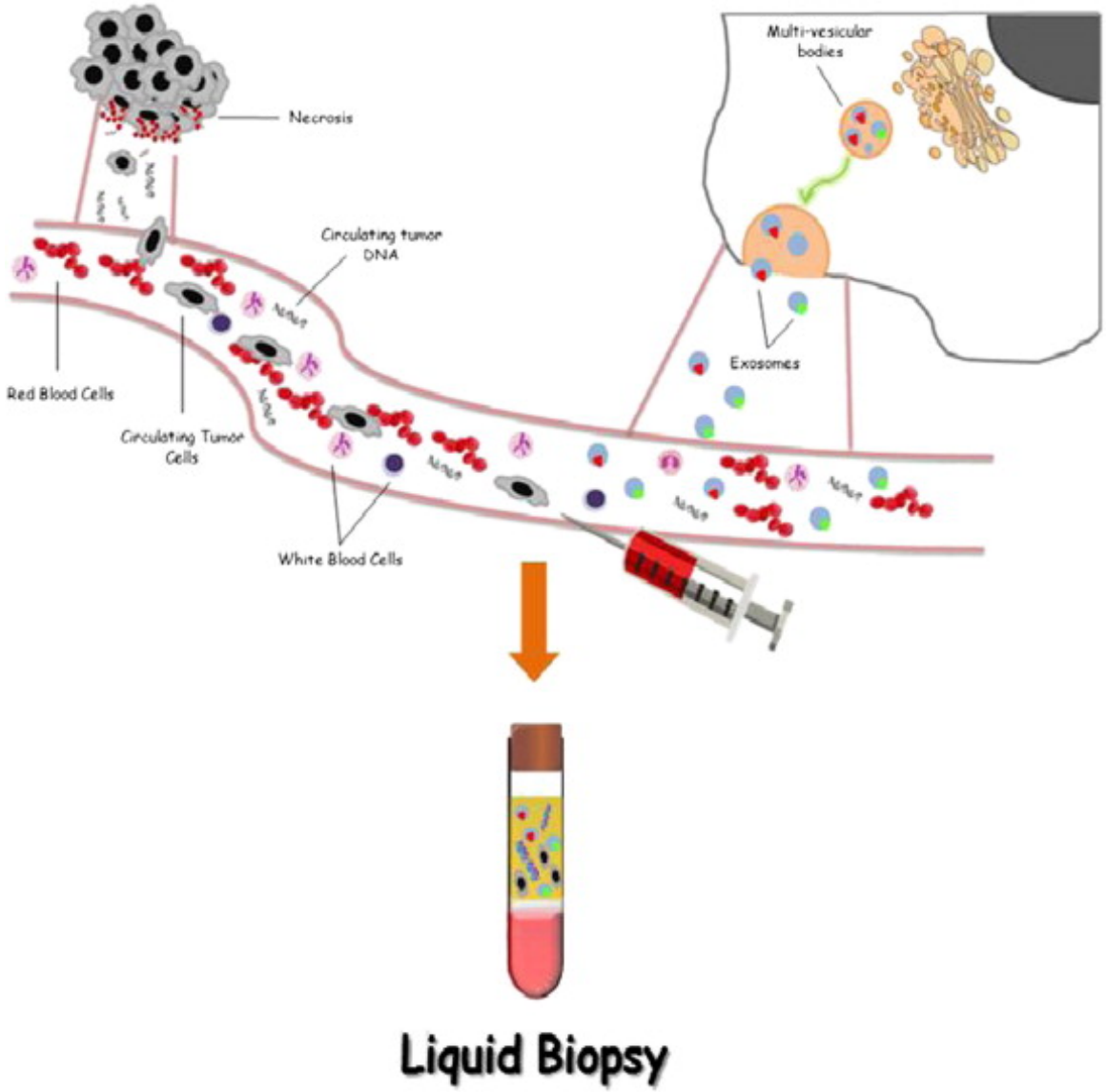
Бързият растеж на туморната формация води до апоптоза и некроза. В някои случаи, количеството на пост-апоптичните остатъци и фрагменти надвишава фагоцитния клирънс и те попадат в системното кръвообръщение, откъдето се изолират[13]



Diehl F, Schmidt K, Choti MA, Romans K, Goodman S, Li M, et al. Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. Nat Med 2008;14:985–90

Течна биопсия

Използването на плазма за провеждане на течна биопсия има известни ограничения, поради изключително малкото количество ctDNA , което налага използването на по-чувствителни диагностични методи, свързани с по-високи разходи[10, 11]



Zachariah RR, Schmid S, Buerki N, Radpour R, Holzgreve W, Zhong X. Levels of circulating cell-free nuclear and mitochon- drial DNA in benign and malignant ovarian tumors. Obstet Gynecol 2008;112:843–50.
Zanetti-Dallenbach RA, Schmid S, Wight E, Holzgreve W, Ladewing A, Hahn S, et al. Levels of circulating cell-free serum DNA in benign and malignant breast lesions. Int J Biol Markers 2007;22:95–9.

Течна биопсия vs ТЪКАННА

- Резултати от метаанализ на проучвания с 1590 пациенти за чувствителността на метода “течна биопсия” от кръвна плазма спрямо тъканна биопсия за детерминиране на мутационния статус, показват съпоставимост на двата метода между 65-70% и висока специфичност 88.5%.

- Като заключение авторите не препоръчват метода, поради по-ниска чувствителност, сравнено с хистологичен препарат[12]

Li Z, Zhang Y, Bao W, Jiang C. Insufficiency of peripheral blood as a substitute tissue for detecting EGFR mutations in lung cancer: a meta-analysis. Target Oncol. 2014;9:381–388

Течна биопсия - БАЛ

- Ограничен брой проучвания са насочени към изследване на EGFR мутационен статус от брохоалвеоларен лаваж

- Бронхоалвеоларният лаваж има редица предимства – инвазивен метод, свързан с по-малък риск за пациента, дори и в по-напредналите стадии на заболяването. От друга страна въз основа на факта, че повече клетъчни остатъци, резултат на туморната апоптоза и некроза, се натрупват в локализирана зона в белите дробове, преди да навлязат в съдовата система, то концентрацията на ctDNA би била по-висока в бронхоалвеоларен лаваж (BAL) отколкото в плазма[14, 15]

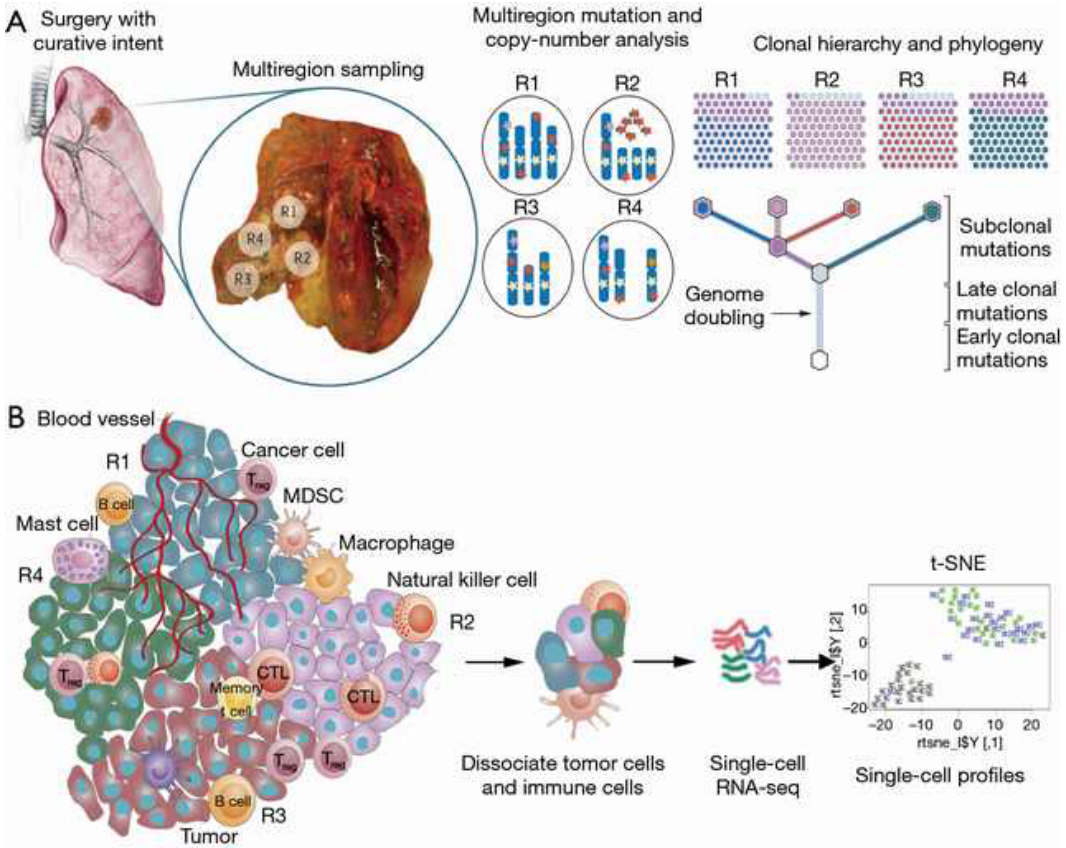
- Това по-високо ниво на ctDNA би било по-подходящо за идентифициране на EGFR мутационния статус

Jahr S, Hentze H, Englisch S, Hardt D, Fackelmayer FO, Hesch RD, et al. DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. Cancer Res 2001;61:1659–65.
Stroun M, Lyautey J, Lederrey C, Olson-Sand A, Anker P. About the possible origin and mechanism of circulating DNA apoptosis and active DNA release. Clin Chim Acta 2001;313:139–42.

Течна биопсия - БАЛ

- Също така в бронхоалвеоларния лаваж, теоретично е възможно да има фрагменти ctDNA от различни участъци на туморната повърхност (туморна хетерогенност), което увеличава шанса за идентифициране на мутация от местоположение, от което не може да бъде взет материал с друг метод

- Проучване на *Schmidt u съмр.* доказва възможността за изолиране на свободна туморна ДНК от лаваж[16]



Schmidt B, Carstensen T, Engel E, Jandrig B, Witt C, Fleis- chhacker M. Detection of cell-free nucleic acids in bronchial lavage fluid supernatants from patients with lung cancer. Eur J Cancer 2004;40:452–60.

Течна биопсия - БАЛ

В проучване на Park, мутационният статус е установен при 91,7% от БАЛ, като за целта е ползван високочувствителен метод[17]

No.	Tissue biopsy	Bronchoalveolar lavage			
		PNA PCR	PANAMutyper®	Site	DNA concentrations, ng/μL
1	p.E746_A750del	WT	WT	Rt. upper lobe	15.08
2	p.E746_A750del	E19del	–	Lt. upper lobe	10.64
3	p.E746_A750del	E19del	–	Lt. upper lobe	10.77
4	E19del	E19del	–	Lt. upper lobe	11.11
5	E19del	E19del	–	Rt. upper lobe	10.03
6	p.L858R	p.L858R	–	Rt. lower lobe	11.57
7	p.L858R	p.L858R	–	Rt. upper lobe	13.01
8	p.L858R	p.L858R	–	Rt. upper lobe	5.49
9	p.L858R	WT	p.L858R	Lt. lower lobe	9.43
10	p.L858R	p.L858R	–	Lt. lower lobe	8.53
11	p.L858R and p.T790M	p.L858R and p.T790M	–	Lt. lower lobe	11.98
12	E19del	WT	E19del	Rt. upper lobe	13.35
13	WT	WT	–	Lt. lower lobe	14.92
14	WT	WT	–	Lingular division	13.60
15	WT	WT	–	Rt. lower lobe	12.32
16	WT	WT	–	Rt. upper lobe	9.67
17	WT	WT	–	Lt. lower lobe	11.56
18	WT	WT	–	Rt. upper lobe	11.11
19	WT	WT	–	Rt. lower lobe	11.66
20	WT	WT	–	Rt. upper lobe	10.79

Park, S., Hur, J., Lee, K., et al. (2017). Assessment of EGFR mutation status using cell-free DNA from bronchoalveolar lavage fluid. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM), 55(10), pp. 1489-1495. Retrieved 13 Nov. 2018, from doi:10.1515/cclm-2016-0302

Течна биопсия - БАЛ

- Проучване *на Buttitta* и сътрудници доказва EGFR мутационен статус в БАЛ чрез метода next- generation sequencing (NGS), като диагностичната чувствителност достига до 78.8%[18]

- В контраст, проучване на Kim и сътрудници, търсещи EGFR мутации в плазма, установената чувствителност чрез PCR метода е 16.1% [19]

Table 3. *EGFR* mutation analysis on BAL and pleura fluids (Series B) by Sanger sequencing and NGS

			***EGFR* mutational analysis**		
			Cytology		**Surgical sample**
ID	**Sample type**	**Tumor cells (%)**	**Sanger sequencing**	**NGS**	**Sanger sequencing**
1n	BAL	n.a.	Wild-type	Wild-type	2235_2249del 15bp
2n	BAL	n.a.	Wild-type	2235_2249del 15b	2235_2249del 15bp
3n	BAL	n.a.	Wild-type	2240_2257del 18b	2240_2257del 18bp
4n	PF	n.a.	Wild-type	Wild-type	T 2573G
5n	BAL	n.a.	Wild-type	T 2573G	T 2573G
6n	PF	n.a.	Wild-type	Wild-type	2236_2250del 15bp
7n	PF	n.a.	Wild-type	Wild-type	2235_2249del 15bp
8n	BAL	n.a.	Wild-type	T 2573G	T 2573G
9n	PF	n.a.	Wild-type	2236_2250del 15b	2236_2250del 15bp
10n	PF	n.a.	Wild-type	Wild-type	2235_2249del 15bp
11n	BAL	n.a.	Wild-type	Wild-type	T 2573G
12n	BAL	n.a.	Wild-type	Wild-type	T 2573G

NOTE: Comparison with *EGFR* mutations by Sanger sequencing on matched surgical samples.
Abbreviations: ID, identification number; n.a., not assessable; PF, pleural fluids.

Buttitta F, Felicioni L, Del Grammastro M, Filice G, Di Lorito A, Malatesta S, et al. Effective assessment of egfr mutation status in bronchoalveolar lavage and pleural fluids by next-generation sequencing. Clin Cancer Res 2013;19:691–8. Kim HR, Lee SY, Hyun DS, Lee MK, Choi CM, Yang SH, et al. Detection of EGFR mutations in circulating free DNA by PNA- mediated PCR clamping. J Exp Clin Cancer Res 2013;32:50.

В България

- PCR методът за установяване на мутационен статус е най-широко използваният в България. Проучването на Бичев и сътрудници[2] е проведено на система Cobas, която е икономически по-изгодна за провеждане на рутинни ежедневни изследвания. За нея е натрупана значителна база данни за периода от 2015 насам при пациенти с аденокарцином

- По данни от същия автор, чувствителността на метода за установяване на мутационен статус при изследване от серум е 7%

РАЗРАБОТЕН И В МОМЕНТА СЕ ПРОВЕЖДА ПРОЕКТ ЗА ИЗСЛЕДВАНЕ НА ЧУВСТВИТЕЛНОСТТА НА ТЕЧНА БИОПСИЯ ОТ БАЛ СПРЯМО СЕРУМ. НАЧАЛНИТЕ РЕЗУЛТАТИ СА ОБНАДЕЖДАВАЩИ

Заключение

Установяването на EGFR мутационен статус от БАЛ ще доведе до следните ползи:

1) инвазивен метод с по-нисък риск за пациента
2) възможност за поставяне на диагноза при пациенти, неподходящи за друга инвазивна методика
3) или с недостатъчен тъканен материал
4) и начално, преди започване на таргетното лечение, установяване на мутационния статус
5) както и проследяване с оглед установяване на терапевтична резистентност В ХОДА НА ЛЕЧЕНИЕТО