

Stanovení optimálního vyšetřovacího algoritmu pro efektivní vyhledávání nemalobuněčných karcinomů plic s přestavbou genu *ALK*

– zavedení metodiky a praktické zkušenosti z rutinního vyšetřování

Tomáš Rozkoš¹, Aleš Ryška¹, Markéta Nová¹, Helena Hornychová¹,
Lukáš Krbal¹, Radoslav Matěj^{2,3}, Jan Laco¹

¹Fingerlandův ústav patologie, Univerzita Karlova, Lékařská fakulta v Hradci Králové a Fakultní nemocnice Hradec Králové

²Oddělení patologie a molekulární medicíny; Centrum pro výzkum, diagnostiku a léčbu neurodegenerativních onemocnění a Národní referenční laboratoř TSE-CJN, Thomayerova nemocnice, Praha

³Ústav patologie, Univerzita Karlova, 1. lékařská fakulta a Všeobecná fakultní nemocnice, Praha

SOUHRN

Cílem retrospektivní části studie bylo a) nalezení optimálního klonu imunohistochemické (IHC) protilátky proti ALK proteinu, který bude mít dostatečnou senzitivitu a specifitu, aby jej bylo možné použít jako screeningové metody při výběru případů nemalobuněčného karcinomu plic (NSCLC) pro následné testování přestavby genu *ALK* metodou fluorescenční in situ hybridizace (FISH) a b) zjištění diagnostické výtěžnosti „malých“ biopsií, tj. endobronchiálních, transbronchiálních a transtorakálních biopsií a cytobloků pro vyšetření přestavby genu *ALK*. Takto zjištěná optimální IHC metodika detekce exprese ALK proteinu (klon D5F3, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) byla následně ověřena v prospektivním rutinním vyšetřování pacientů s NSCLC. ALK status byl korelován s morfoloogickým vzhledem tumorů a s vybranými klinickými údaji.

V retrospektivní části studie bylo metodami IHC a FISH vyšetřeno 170 případů EGFR-nemutovaných NSCLC. V prospektivní části studie bylo IHC vyšetřeno 557 případů a FISH 76 případů NSCLC. Celkem bylo v retrospektivním souboru nalezeno 8/154 (5,2 %) případů s přestavbou genu *ALK*, při prospektivním vyšetřování pak 24/557 (4,3 %). Senzitivita a specifita zvolené IHC screeningové metody byly v retrospektivní části 100 % a 99 %, v prospektivní části pak 100 % a 80 %. Diagnostická výtěžnost „malých“ biopsií se v retrospektivní části pohybovala v závislosti na zvolené IHC variantě v rozmezí 74 – 80 %, v prospektivní části činila 88 %. U žádného prospektivně vyšetřovaného případu s pozitivní přestavbou genu *ALK* nebyla detekována mutace *EGFR*. Vysoká diagnostická výtěžnost vypovídá o možnosti testování ALK stavu i u „malých“ biopsií. Prevalence 5,2 % v retrospektivní části (*EGFR* nemutovaných případů) a 4,3 % v prospektivní části (bez znalosti *EGFR* mutace), morfoloogický vzhled tumorů (solidní a acinární typ, mucinózní či alespoň parciální hlenotvorba (extra- a/nebo intracelulární)), stejně tak jako i nižší průměrný věk a zastoupení pohlaví u pacientů s ALK pozitivními nádory v našem prospektivním souboru (57,5 let vs. 65,2 let, 8 mužů a 16 žen vs. 336 mužů a 197 žen) jsou v souladu s celosvětovými údaji.

Klíčová slova: nemalobuněčný karcinom plic – NSCLC – ALK – imunohistochemie – FISH

Identification of an optimal algorithm for effective diagnostics of non-small cell lung cancer with *ALK* gene rearrangement – implementation of the method and practical experiences with routine diagnostics

SUMMARY

The aim of the retrospective part of the study was a) to select an optimal clone of immunohistochemical (IHC) antibody against the ALK protein with specificity and sensitivity high enough to use this antibody as a screening method for selecting non-small cell lung cancer (NSCLC) cases for fluorescence in situ hybridization (FISH) testing of *ALK* gene rearrangement and b) to determine the diagnostic yield of “small” biopsies i.e. endobronchial, transbronchial and transthoracic biopsies and cytoblocks for *ALK* gene rearrangement testing. The best IHC method of ALK protein detection (clone D5F3, dilution 1:100, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) was then verified in prospective routine testing of patients with NSCLC. ALK status was correlated with tumor morphology and clinical data.

In the retrospective part of the study, 170 EGFR-nonmutated cases of NSCLC were IHC and FISH tested. In the prospective part, 557 cases of NSCLC were tested by IHC and 76 by FISH. There were 8/154 (5.2%) cases with *ALK* gene rearrangement detected in the retrospective part and 24/557(4.3 %) in the prospective part. Sensitivity and specificity of the best IHC method were 100 % and 99 % in the retrospective part and 100 % and 80 % in the prospective part. The diagnostic yield of “small” biopsies was between 74 – 80 % retrospectively, depending on IHC variant, and 88 % prospectively. No case with *ALK* gene rearrangement detected prospectively had *EGFR* mutation. A high diagnostic yield confirms that ALK status testing can be used in this type of specimen. A prevalence of 5.2 % in the retrospective part (*EGFR*-nonmutated cases) and 4.3 % in the prospective part (without known *EGFR* mutation status), tumor morphology (solid and acinar type, mucinous type or at least partial mucin production (extra- and/or intracellular) as well as lower average age and male/female ratio of patients with ALK positive tumors in the prospective part (57.5 y vs. 65.2 y, 8 men and 16 women vs. 336 men and 197 women) are consistent with global data.

Keywords: Non-small cell lung cancer – NSCLC – ALK – Immunohistochemistry – FISH

Cesk Patol 2017; 53(2): 89–96

Adenokarcinom je nejčastějším typem nemalobuněčného karcinomu plic (non-small cell lung cancer (NSCLC)) a představuje více než 40 % všech primárních plicních zhoubných nádorů (1). Stávající znalosti této poměrně heterogenní nádorové jednotky jsou však relativně omezené. V současné době stále platí morfoloická klasifikace plicního adenokarcinomu, která rozlišuje následující podtypy tohoto tumoru: lepidický, acinární, papilární, mikropapilární, solidní a následující varianty adenokarcinomu plic: invazivní mucinózní (včetně smíšeného invazivního mucinózního a nemucinózního), koloidní, fetální a enterický (1). Neméně důležitá je však také molekulární klasifikace založená na typu alterace různých onkogenů, které se uplatňují v karcinogenezi (1-7). Tento „molekulární“ přístup je zcela zásadní zejména pro volbu optimální systémové terapie (1,7,8).

Malou podskupinu adenokarcinomů plic představují tumory, jejichž karcinogeneze je navozena fúzí genu *ALK* s některým z dalších partnerů (nejčastěji *EML4*, méně často *KIF5B*, *LKC1*, *TFG*, *DCTN1*, *SQSTM1*, *TPR*, *HIP1*) (9-14). Tato genová přestavba byla poprvé popsána v roce 2007 (9) a již za pouhé 3 roky byla zveřejněna první studie popisující úspěšnou léčbu těchto nádorů crizotinibem, což je inhibitor *ALK*, *c-MET* a *ROS1* (15-18). Tento výsledek byl následně potvrzen několika dalšími rozsáhlými studiemi, které prokázaly, že pacienti s přestavbou genu *ALK*, kteří jsou léčeni crizotinibem, mají výrazně delší dobu přežití (19-24). Vzhledem k tomu, že přestavba genu *ALK* je popisována dle současně platné WHO klasifikace u 4 – 5 % NSCLC (1), je nezbytně nutné najít optimální způsob identifikace pacientů vhodných pro tuto cílenou léčbu v rutinní diagnostické praxi.

Ještě do nedávna byla léčba crizotinibem indikována pouze u NSCLC s přestavbou genu *ALK* potvrzenou fluorescenční in situ hybridizací (FISH) (25). Výtečnost tohoto vyšetření však velmi komplikuje skutečnost, že většina nádorů je diagnostikována v pozdním stádiu, kdy chirurgická léčba již není indikována, a tak jedinou tkání, která je použitelná k testování, jsou malé vzorky, často s limitním množstvím nádorové tkáně (endobronchiální, transbronchiální a transtorakální biopsie a cytobloky). Tato tkáň se navíc nepoužívá pouze pro mikroskopickou diagnostiku (založenou na rutinním barvení hematoxylinem-eozinem a na imunohistochemickém vyšetření exprese markerů dlaždicobuněčné či žlázové diferenciaci), ale také na další molekulární testování prediktivních markerů, zejména na detekci mutací genu kódujícího receptor epidermálního růstového faktoru (*EGFR*) (5,6).

Nejzásadnějšími problémy v prospektivním testování přestavby genu *ALK* metodou FISH jsou: 1) dostupnost adekvátního množství nádorové tkáně (v případě „malých biopsií“), 2) přístrojová a personální testovací kapacita laboratoře a 3) cena testování.

Výše zmíněné skutečnosti mohou potenciálně vést k omezení široké dostupnosti testování a následně k omezení léčby *ALK*-inhibitorem. K odstranění těchto problémů vede alternativní dvoustupňové testování se screeningovým vyhledáváním potenciálně pozitivních nádorů pomocí imunohistochemie (IHC) následované potvrzením pozitivních případů metodou FISH. Tento přístup se již s úspěchem využívá v rutinní diagnostice přestavby genu *ALK* (26-28), stejně jako při vyšetřování jiných

prognostických a prediktivních genetických změn, např. amplifikace genu *HER2* u karcinomu prsu a žaludku (29,30). Dvoustupňový způsob detekce vede ke zvýšení dostupnosti testování, jelikož IHC je standardně prováděna ve většině laboratoří patologie. Daný postup navíc výrazně snižuje náklady na testování, protože metodou FISH jsou ověřovány pouze případy „vytipované“ pomocí IHC. V únoru 2016 došlo k úpravě doporučených postupů Společnosti českých patologů ČLS JEP pro testování *ALK* pozitivitu pro indikaci léčby crizotinibem a stačí potvrzení *ALK* pozitivitu pouze jednou z metod, tj. FISH nebo validovanou IHC (31).

Klíčovým aspektem celého diagnostického algoritmu nicméně zůstává dostatečně vysoká senzitivita a specifita IHC detekce *ALK* proteinu, což je nutné individuálně nastavit na každém pracovišti v závislosti na lokálních podmínkách, které jsou pravidelně ověřovány účastí v systému kontroly kvality. Cílem práce bylo:

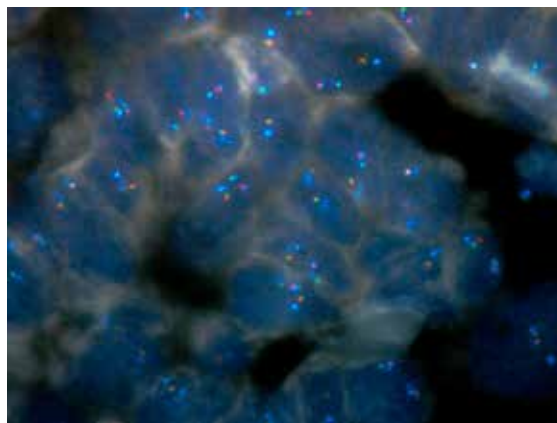
- 1) v retrospektivní studii archivních případů adenokarcinomu plic nalézt a) alespoň jeden klon protilátky, který bude mít dostatečnou senzitivitu a specifitu, aby jej bylo možné použít jako screeningové metody při vyhledávání NSCLC pro následné testování *ALK* metodou FISH a b) analýza diagnostické výtečnosti nádorové tkáně pro vyšetření přestavby genu *ALK* metodou FISH u „malých“ biopsií,
- 2) v provedené prospektivní studii bylo prováděno IHC testování *ALK* pomocí metodiky vybrané na základě retrospektivní studie v rámci rutinní diagnostiky pacientů s NSCLC. Výsledky byly korelovány s morfoloickým vzhledem tumorů a vybranými klinickými údaji.

MATERIÁL A METODY

Retrospektivní část studie

V retrospektivní části byla sestavena kohorta 170 případů částečně selektovaných primárních adenokarcinomů plic (diagnóza potvrzena pozitivním imunohistochemickým průkazem TTF-1) konsekutivně diagnostikovaných v období 1. 1. 2009 - 31. 12. 2012 na Fingerlandově ústavu patologie (FÚP), Fakultní nemocnici Hradec Králové (119 případů) a na Oddělení patologie a molekulární medicíny Thomayerovy nemocnice v Praze (51 případů).

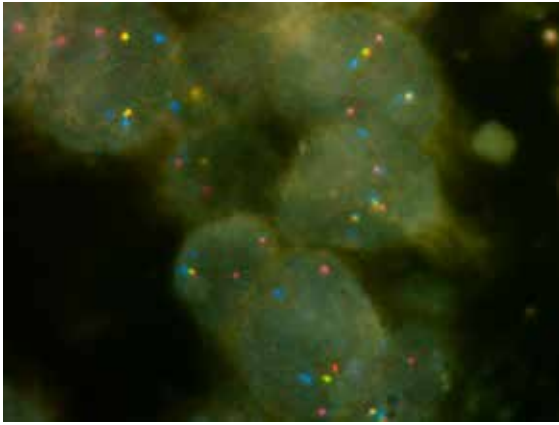
Ze souboru byly vyřazeny případy, u kterých byla prokázána mutace genu *EGFR*, protože dle současných znalostí je přítomnost mutace *EGFR* a zároveň přestavba genu *ALK* u adenokarcinomu plic extrémně vzácná (32) a prakticky se vzájemně vylučují (tzv. exkluzivní mutace) (33). U každého případu byly zaznamenány pohlaví a věk pacienta a podtyp karcinomu, případně



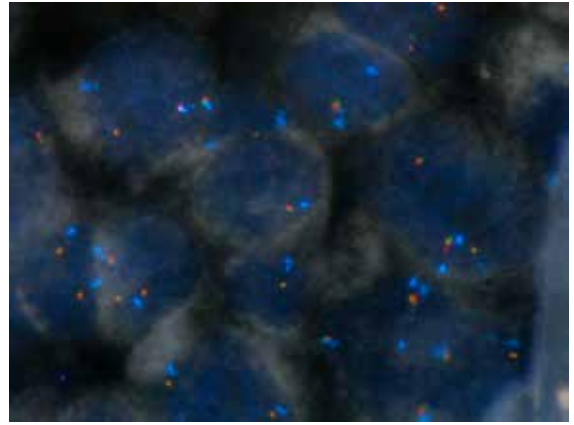
Obr. 1. Inverze genu *ALK* (oddělené červené a zelené signály) s *EML4* jako fúzním partnerem (modré signály), zvětšení 1000x.

✉ Adresa pro korespondenci:

MUDr. Tomáš Rozkoš
Fingerlandův ústav patologie
Fakultní nemocnice Hradec Králové
Sokolská 581, 50005 Hradec Králové
tel.: 495 833 129
e-mail: tomas.rozkos@fnhk.cz



Obr. 2. Inverze genu *ALK* se ztrátou intersticiální DNA (samo-
statné červené signály, zelené signály chybí) s účastí *EML4* jako
fúzním partnerem (modré signály), zvětšení 1000x.



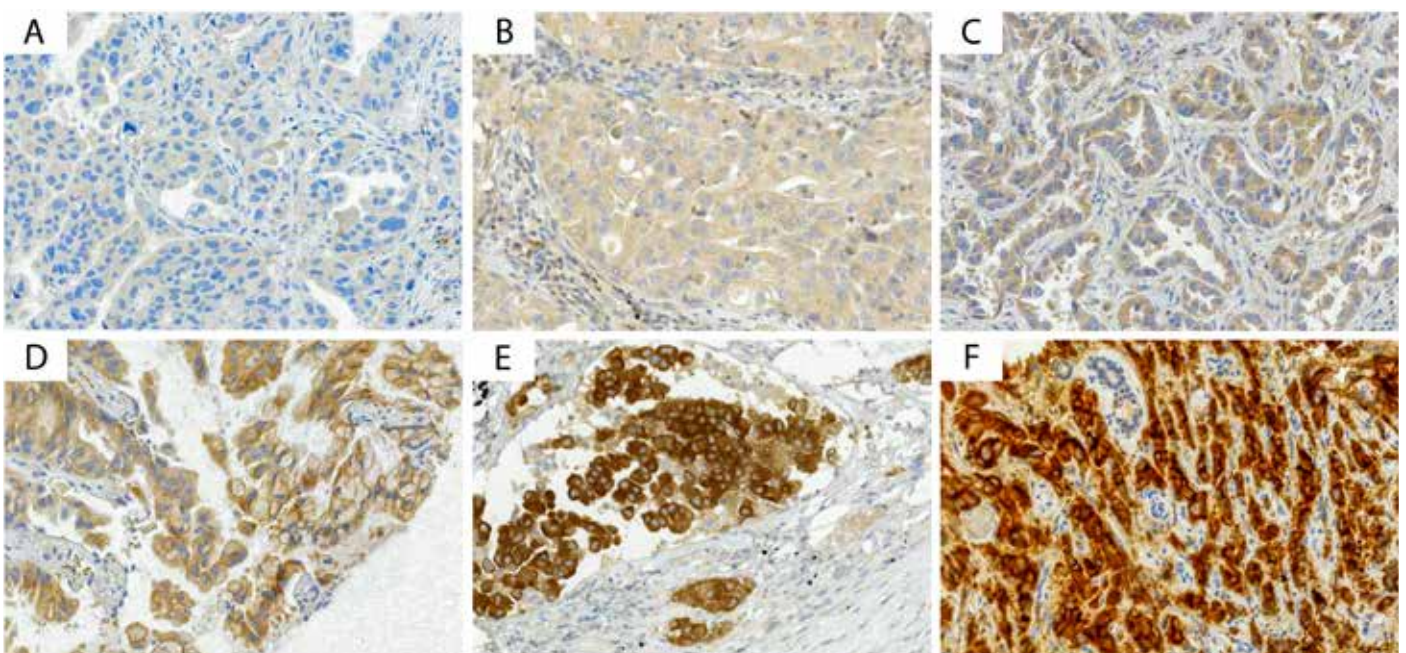
Obr. 3. Nádorové buňky bez přestavby genu *ALK* (červený a ze-
lený signál v těsné blízkosti, absence nadpočetného modrého
signálu), zvětšení 1000x.

nápadná hlenotvorba patrná již v základním HE barvení v > 10 % nádoru. Takto selektovaný soubor nádorů byl zpracován metodu tissue microarray (TMA).

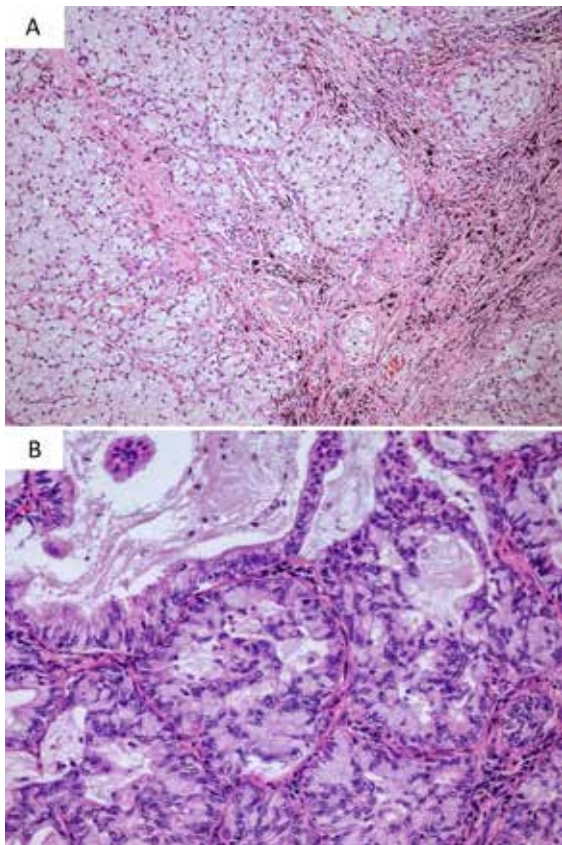
K detekci přestavby genu *ALK* byla využita metoda FISH s použitím sondy ZytoLight SPEC *ALK/EML4* TriCheck Probe (Zytovision, Bremerhaven, Germany) a detekčního systému ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit (Zytovision) s doporučeným standardním postupem dle výrobce. Každý vzorek byl hodnocen na fluorescenčním mikroskopu Nikon Eclipse 80i s použitím 100x objektivu a směsného a samostatných filtrů (ZyBlue/ZyGreen/ZyOrange; ZyBlue; ZyGreen; ZyOrange). Pozitivně byly hodnoceny buňky s přestavbou genu *ALK* (nejčastěji inverze na 2. chromozómu s genem *EML4*, méně často translokace genu *ALK* s jiným fúzním partnerem z jiného chromozómu) (obr. 1) a/ nebo s delecí 3' konce genu *ALK* (obr. 2), ostatní varianty byly hodnoceny jako negativní (obr. 3). U každého případu bylo zhodnoceno minimálně 50 nádorových buněk. Případ byl považován za *ALK* FISH-pozitivní, pokud bylo $\geq 15\%$ nádorových buněk hodnoceno jako pozitivní.

Následně byl každý případ vyšetřen imunohistochemicky třemi různými klony protilátek proti proteinu ALK. Varianta 1: klon D5F3, ředění 1:100, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA; varianta 2: „kombinovaná“ protilátka vzniklá spojením klonu D5F3, ředění 1:100, Cell Signaling Technology a polyklonální protilátky ZAL4, ředění 1:750, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA; varianta 3: klon 5A4, ředění 1:20, Novocastra, Newcastle, UK. Detekce všech tří protilátek byla provedena v přístroji VENTANA BenchMark ULTRA (Ventana Medical Systems, Tuscon, AZ, USA) s použitím detekčního kitu OptiView DAB IHC Detection Kit (Ventana Medical Systems).

Výsledek imunohistochemické exprese proteinu ALK byl nezávisle a bez znalosti výsledku FISH vyšetření přestavby genu *ALK* posuzován nezávisle dvěma hodnotiteli (TR, AR) semikvantitativní metodou následovně: 0 – negativní, 1 – slabá pozitivita patrná pouze při velkém zvětšení 400x, 1-2 – slabá pozitivita patrná při středním zvětšení 100x, 2 – slabá pozitivita patrná již při malém zvětšení 40x, 2-3 – středně silná pozitivita, 3 – silná pozitivita (obr. 4A-F). Výsledky IHC vyšetření pak byly porovná-



Obr. 4. Rozdílná intenzita exprese ALK proteinu v nádorových buňkách (A intenzita 0+, B intenzita 1+, C intenzita 1-2+, D intenzita 2+, E intenzita 2-3+, F intenzita 3+, klon D5F3, ředění 1:100, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA, zvětšení 400x).



Obr. 5. Morfologické varianty s častějším výskytem přestavby genu *ALK*; solidní tumor s morfologií buněk tvaru pečetního prstene (A, zvětšení 100x), acinárně rostoucí adenokarcinom s intra- i extracelulární hlenotvorbou (B, zvětšení 200x).

ny s výsledky FISH vyšetření a statisticky analyzovány. Optimální IHC varianta pak byla aplikována v rutinním prospektivním vyšetřování pacientů s NSCLC od 1. 1. 2014.

Prospektivní část studie

V prospektivní části byly primární plicní karcinomy konsekutivně diagnostikovány v resekátech i „malých“ biopsiích v období 1. 1. 2014 – 31. 5. 2016 na FÚP jako adenokarcinom, NSCLC - spíše adenokarcinom a NSCLC- blíže nespecifikovaný, nejprve testovány IHC variantou 3 (klon 5A4) do 27. 11. 2015, kdy došlo ze strany výrobce k ukončení dodávek protilátky. Po

tomto datu pokračovalo testování IHC variantou 1 (klon D5F3), která měla v retrospektivní části srovnatelné výsledky. K dalšímu vyšetřování metodou FISH (sonda ZytoLight SPEC *ALK*/EML4 TriCheck Probe) pak byly vybrány případy, u kterých byla zjištěna jakákoliv intenzita exprese *ALK* při IHC vyšetření (1+ a více) a také IHC negativní případy (0+), které dle epidemiologických a morfologických charakteristik statisticky signifikantně častěji vykazují *ALK* přestavbu, tj. acinární a invazivní mucinózní typy a adenokarcinomy s prokázanou hlenotvorbou, nádory u „mladších“ pacientů (do 50 let) a zároveň nekuřáků (obr. 5A, B) (1). U každého případu byly zaznamenány pohlaví a věk pacienta a podtyp karcinomu, případně nápadná hlenotvorba patrná již v základním HE barvení v > 10 % nádoru. Následně byla opět stanovena senzitivita a specifita IHC vyšetření v porovnání s výsledkem FISH. Paralelně s vyšetřením stavu *ALK* byly prospektivně případy testovány na mutaci genu *EGFR* (včetně vyšetření cytologických případů, u kterých se testování *ALK* neprovádělo).

Ke statistickému zhodnocení byl použit program NCSS 8 (NCSS, Keyville, Utah, USA). Pro základní statistický popis souboru byla použita deskriptivní statistika. K analýze distribuce dat byl použit omnibus test normality. Pro porovnání jednotlivých skupin byl použit Fischerův přesný test, nepárový dvouvýběrový T-test a chí-kvadrát test. Za statisticky významnou byla považována hladina významnosti $p < 0,05$.

VÝSLEDKY

Retrospektivní část studie

V retrospektivní části studie bylo celkem vyšetřeno 170 případů. V souboru bylo 123 resekátů a 47 „malých“ biopsií. FISH vyšetření bylo hodnotitelné u 116/123 (94,3 %) resekátů (příčiny nehodnotitelnosti: 6x absence signálů, 1x absence (vykrojení) nádorové tkáně) a u 38/47 (80,9 %) malých biopsií (příčiny nehodnotitelnosti: 1x absence signálů, 8x absence (vykrojení) nádorové tkáně).

IHC detekce variantou 1 nebyla provedena u souboru malých biopsií pro umenšení tkáně předchozími vyšetřeními. IHC vyšetření variantou 1 bylo hodnotitelné u 97,6 % (120/123) resekátů (3x absence nádorové tkáně), variantou 2 bylo hodnotitelné u 98,4 % (121/123) resekátů (2x absence nádorové tkáně) a u 78,7 % (37/47) malých biopsií (10x absence nádorové tkáně). Varianta 3 byla hodnotitelná u 98,4 % (121/123) resekátů (2x absence nádorové tkáně) a u 74,5 % (35/47) malých biopsií (12x absence nádorové tkáně).

Tabulka č. 1. Senzitivita a specifita jednotlivých variant IHC detekce exprese proteinu *ALK* dle hodnotitelů a dvou rozdílných prahů pozitivity.

	hodnotitel 1					
	varianta 1 SN	varianta 1 SP	varianta 2 SN	varianta 2 SP	varianta 3 SN	varianta 3 SP
1 +	100 % (8/8)	94,7 % (107/113)	100 % (10/10)	86,0 % (148/172)	100 % (10/10)	92,4 % (146/158)
1-2 +	100 % (8/8)	99,1 % (107/108)	90,0 % (9/10)	96,7 % (148/153)	100 % (10/10)	98,7 % (146/148)
	hodnotitel 2					
	varianta 1 SN	varianta 1 SP	varianta 2 SN	varianta 2 SP	varianta 3 SN	varianta 3 SP
1 +	100 % (8/8)	95,5 % (107/112)	100 % (10/10)	86,0 % (148/172)	100 % (10/10)	95,4 % (146/153)
1-2 +	100 % (8/8)	99,1 % (107/108)	90,0 % (9/10)	99,3 % (148/149)	100 % (10/10)	99,3 % (146/147)
SN = senzitivita, SP = specifita						
IHC = imunohistochemie, FISH = fluorescenční in situ hybridizace						
1 + = případy IHC hodnoceny jako 1+ a více by byly ověřeny FISH						
1-2 + = případy IHC hodnoceny jako 1-2+ a více by byly ověřeny FISH						

Tabulka č. 2. ALK-pozitivní případy - retrospektivní část.

pohlaví	věk	typ nádoru	hlenotvorba	intenzita IHC	typ přestavby genu ALK	% pozitivních buněk	EML4
M	80	AC - solidní	-	2-3	I	43	+
Ž	51	AC - acinární	+	2-3	D	26	-
M	78	AC - papilární	+	2	I	62	+
Ž	71	AC - papilární	+	3	D	50	-
Ž	59	AC - acinární	-	2	I	47	+
M	49	AC - acinární	-	1-2	I	36	+
M	56	AC - solidní	+	3	I	68	+
M	67	AC - solidní	+	2	I	46	+

M = muž, Ž = žena, AC = adenokarcinom, IHC = imunohistochemie
I = inverze, D = delece 3' konce genu ALK

hlenotvorba = hlenotvorba patrná již v základním HE barvení v > 10% nádoru

Tabulka č. 3. ALK-pozitivní případy - prospektivní část.

pohlaví	věk	typ nádoru	hlenotvorba	intenzita IHC	typ přestavby genu ALK	% pozitivních buněk	EML4
M	67	AC - mucinózní	+	3	D	77	-
Ž	53	AC - mikropapilární	+	3	I	50	+
Ž	53	AC - mikropapilární	+	3	I	46	+
Ž	53	AC - solidní	-	3	D	56	+
M	42	spíše AC - solidní	-	3	T	60	-
Ž	64	NSCLC se sarkomatoidními a AC rysy	-	3	D	60	N
Ž	54	AC - mikropapilární	+	3	I	46	+
M	59	AC - acinární	-	3	I	61	+
M	37	spíše AC - solidní	-	2	I	78	+
Ž	33	AC - acinární	+	3	D	96	+
M	36	AC - solidní	+	2-3	D	56	-
M	68	AC - acinární	-	3	I	53	+
Ž	71	AC - mikropapilární	-	2	I	70	+
M	53	AC - solidní	-	3	T	44	-
Ž	44	AC - solidní	-	3	D	32	-
Ž	73	AC - acinární	-	2-3	T	38	-
Ž	80	spíše AC - solidní	-	2	I	30	+
Ž	38	AC - solidní	+	2	T	26	-
Ž	73	AC - solidní	-	2	I	64	+
Ž	58	spíše AC - solidní	-	1-2	D	50	N
Ž	64	spíše AC - solidní	-	2-3	T	80	-
M	66	AC - acinární	+	3	I	90	+
Ž	67	AC - mucinózní	+	2	I	60	+
Ž	73	AC - mucinózní	+	3	I	48	+

M = muž, Ž = žena, AC = adenokarcinom, NSCLC = nemalobuněčný karcinom plic
IHC = imunohistochemie
I = inverze, D = delece 3' konce genu ALK, T = translokace, N = nehodnotitelné

hlenotvorba = hlenotvorba patrná již v základním HE barvení v > 10% nádoru

Celkově bylo v souboru nalezeno 5,2 % (8/154) případů s přestavbou genu ALK. Senzitivity a specifity jednotlivých IHC variant jsou uvedeny v tabulce (tab. 1) zvláště pro každého hodnotitele, vždy ve dvou možnostech podle nastavení prahu citlivosti IHC detekce.

Relativní počet pozitivních buněk u ALK FISH-pozitivních případů byl v průměru $47,3 \pm 13,4$ % (medián 46,5 %, rozmezí 26,0 – 68,0 %), zatímco u negativních případů byl $3,3 \pm 2,7$ % (medián 3 %, rozmezí 0 – 11,0 %) ($p < 0,00001$). Celkem byla nalezena 6x (75%) inverze genů ALK/EML4 a 2x delece 3' konce genu ALK.

Gen *EML4* byl fúzním partnerem v 6/8 (75 %) případů. Podrobnější klinicko-patologické údaje k pozitivním případům jsou uvedeny v tabulce (tab. 2).

Soubor pacientů s ALK-pozitivním nádorem sestával z 5 mužů a 3 žen, soubor pacientů s ALK-negativním nádorem sestával ze 101 mužů a 61 žen. V zastoupení pohlaví nebyl zjištěn mezi těmito skupinami statisticky významný rozdíl (poměr muži/ženy 1,7 vs. 1,7) ($p = 0,99$).

Průměrný věk pacientů s ALK pozitivním nádorem byl 63,9 ± 11,9 let (medián 63,0 let; rozmezí 49,0 – 80,0 let) v porovnání s 65,5 ± 7,3 lety (medián 65,0 let; rozmezí 40,0 – 81,0 let) u pacientů s ALK negativním nádorem. Průměrný věk obou skupin se statisticky významně nelišil ($p = 0,54$).

S ohledem na histologický typ ALK-pozitivního nádoru se v souboru vyskytly tyto varianty: solidní 3x, acinární 3x a papilární 2x. Nápadná hlenotvorba (extra- či intracelulární) patrná již v základním HE barvení v > 10% nádoru byla pozorována u 5 případů.

Prospektivní část studie

V prospektivní části studie bylo vyšetřeno IHC celkem 557 případů. K testování metodou FISH bylo vybráno 76 případů. ALK pozitivních případů bylo 24 což je 4,3 %. Podrobnější klinicko-patologické údaje k pozitivním případům jsou uvedeny v tabulce (tab. 3). Relativní počet pozitivních buněk u ALK FISH-pozitivních případů byl v průměru 57,1 ± 18,1 % (medián 56,0 %, rozmezí 26 – 96,0 %), zatímco u negativních případů byl 3,0 ± 2,5 % (medián 2,0 %, rozmezí 0 – 10,0 %) ($p < 0,00001$). Celkem byla nalezena 12x inverze genů *ALK/EML4*, 7x delece 3' konce genu *ALK* a 5x translokace genu *ALK*. Gen *EML4* byl fúzním partnerem v 14/24 (58 %) případů. Senzitivita IHC vyšetření byla 100 %, specificita vzhledem k rozšíření testování nad rámec indikace stanovené v retrospektivní části, s cílem maximálně omezit možnost falešné negativy (tj. navíc byly testovány i případy IHC negativní (0+), které dle epidemiologických a morfologických charakteristik častěji vykazují *ALK* přestavbu – acinární a invazivní mucinózní typy a adenokarcinomy s prokázanou hlenotvorbou, nádory u „mladších“ pacientů (do 50 let) a zároveň nekuřáků), byla 31,6 %. Při aplikaci původních kritérií z retrospektivní části studie by senzitivita zůstala 100 % a specificita se zvýšila na 80 %. Celkem bylo FISH vyšetřeno 43 malých vzorků (41 jehlových biopsií a 2 cytobloky) s diagnostickou výtěžností 88,4 % (u 5 případů nebylo možné stanovit ALK status v důsledku chybění nádorové tkáně umenšením vzorků předchozími vyšetřeními) a 33 resekátů s diagnostickou výtěžností 100 %.

Soubor pacientů s ALK-pozitivním nádorem se sestával z 8 mužů a 16 žen, soubor pacientů s ALK-negativním nádorem sestával z 336 mužů a 197 žen. V zastoupení pohlaví byl zjištěn mezi těmito skupinami statisticky významný rozdíl (poměr muži/ženy 0,5 vs. 1,7) ($p = 0,0034$).

Průměrný věk pacientů s ALK pozitivním nádorem byl 57,5 ± 13,6 let (medián 58,5 let; rozmezí 33 – 80 let) v porovnání s 65,2 ± 8,9 lety (medián 65 let; rozmezí 36 – 88 let) u pacientů s ALK negativním nádorem. Průměrný věk pacientů v těchto dvou skupinách se statisticky významně lišil ($p = 0,0052$).

S ohledem na histologický subtyp ALK-pozitivního nádoru se v souboru vyskytly tyto varianty s převažujícím typem růstu: solidním 11x, acinární 5x, mikropapilární 4x, mucinózní 3x a 1x NSCLC se sarkomatoidními a AC rysy. Nápadná hlenotvorba (extra- či intracelulární) patrná již v základním HE barvení v > 10% nádoru byla pozorována u 10 případů.

Mutace genu *EGFR* byla vyšetřena u 636 případů (557 resekátů a „malých“ biopsií a 79 cytologických případů, u kterých se testování ALK neprovádělo), z toho bylo 63 (9,9 %) pozitivních, přičemž u žádného případu s pozitivní přestavbou genu *ALK* nebyla detekována mutace *EGFR*.

DISKUZE

Pro správné IHC hodnocení exprese ALK je klíčová volba metody detekce proteinu, tedy klonu primární protilátky a detekčního systému. V retrospektivní části naší studie jsme proto testovali nejčastěji užívané komerčně dostupné klony primární protilátky použité v předchozích studiích (34). Z výsledků uvedených v tabulce 1 vyplývá, že testované varianty se od sebe mírně liší svojí senzitivitou i specificitou. Při nastavení prahu citlivosti IHC detekce na hodnotu 1+ je senzitivita všech tří variant u obou hodnotitelů 100 %, a to při nejnižší specificitě 86,0 % (varianta 2 (D5F3, Cell Signaling + ZAL4, Invitrogen) u obou hodnotitelů). Při nastavení prahu citlivosti IHC detekce na hodnotu 1-2+ zůstává senzitivita 100 % u variant 1 (D5F3, Cell Signaling) a 3 (5A4, Novocastra), a to při zvýšení specificity minimálně na hodnotu 98,7 % (varianta 3 (5A4, Novocastra) u hodnotitele 1). Jako nejlepší screeningová metoda se tedy jeví IHC detekce variantou 1 (D5F3, Cell Signaling) při nastavení prahu citlivosti 1-2+, kde senzitivita je 100 % a specificita je 99,1 %. Varianta 3 (5A4, Novocastra) s prahem citlivosti 1-2+ však vykazuje velmi podobné, dostačující výsledky s hodnotami senzitivity 100 % a specificity 98,7 %. Tyto závěry jsou v souladu s dalšími studii zabývajícími se IHC detekcí exprese ALK u NSCLC, které potvrzují vhodnost obou námi vybraných klonů protilátek (34). Celkově bylo zjištěno 5,2 % (8/154) případů s přestavbou genu *ALK*, což se blíží k horní hranici podílu ALK-pozitivních případů uváděných v jiných studiích (34). Toto může být způsobeno vyřazením případů s mutací *EGFR* z testování.

Diagnostická výtěžnost vyšetření stavu ALK se liší u resekátů a malých biopsií. U resekátů je diagnostická výtěžnost velmi dobrá – 94,3 % při vyšetření FISH a minimálně 97,5 % při IHC vyšetření, zatímco u malých biopsií je nižší – 80,9 % u vyšetření FISH a minimálně 74,5 % u IHC vyšetření. Příčinou nevyšetřitelnosti u všech malých biopsií byla absence nádorové tkáně v důsledku umenšení vzorku předchozími vyšetřeními.

Intenzita IHC barvení byla téměř vždy homogenní v celé nádorové populaci, a to jak v resekátech, tak i v malých biopsiích, což umožňuje spolehlivou diagnostiku exprese ALK i z malých biopsií bez rizika falešné negativy v důsledku heterogenity nádorové populace. Tento závěr podporují i naše dva pozitivní případy zjištěné v resekátu a zároveň v malé biopsii od téhož pacienta, kde IHC detekce obou vzorků byla shodně pozitivní. Dále se v souboru vyskytl jeden případ, který byl FISH pozitivní, avšak IHC detekce byla ve všech třech variantách negativní. Následným podrobným zkoumáním daného případu bylo zjištěno, že vyšetřovaná tkáň byla nejprve zpracována v rámci peroperační biopsie zmrazovací technikou a až dodatečně zpracována klasickou technikou se zalitím do parafinu. Proto byl vyšetřen jiný vzorek nádoru od téhož pacienta, který nebyl zmrazen, a v tomto případě již byla IHC detekce ve všech variantách pozitivní. Byť se jedná pouze o jediný případ, lze z něj vyvodit „opatrný“ závěr, že tkáň zpracovaná zmrazovací technikou nemusí být vhodná pro IHC detekci, avšak pro vyšetření FISH je dostačující.

Ve většině případů (kromě jednoho s IHC pozitivitou 1-2+) nádory s přestavbou genu *ALK* vykazovaly silnější IHC pozitivitu (2+ a více), zatímco FISH negativní případy byly buď IHC negativní (0+), nebo byla pozorována pozitivita na spodní hranici prahu citlivosti (1 + a 1-2 +). Výjimkou byl jeden FISH negativní případ, který vykazoval ve všech třech IHC variantách silnou pozitivitu (3 +). Při FISH vyšetření byla však v nádoru jako vedlejší náleze detekována vysoká amplifikace genu *EML4*, jejíž význam je nespecifický a není jasné, zda by tento náleze mohl být příčinou falešné positivity IHC hodnocení.

Průměrný procentuální počet pozitivních buněk se u ALK FISH-pozitivních a FISH-negativních případů statisticky signifikantně lišil, a to jak v retrospektivní části (3 % (0 – 11 %) u negativ-

ních případů oproti 47 % (26 – 68 %) u pozitivních případů; $p < 0,00001$), tak v prospektivní části studie (3 % (0 – 10 %) u negativních případů oproti 57 % (26 – 96 %) u pozitivních případů; $p < 0,00001$). Tento náleží svědčí o jednoznačné interpretovatelnosti výsledků FISH vyšetření při použití prahu 15 % pozitivních buněk pro definici ALK pozitivního případu, který je v současné době aplikována u většiny sond (34). Nejčastějším typem pozitivní přestavby genu *ALK* byla inverze s účastí fúzního partnera *EML4*, což je v souladu s dosavadními poznatky (1).

V prospektivní části studie bylo diagnostikováno 24/557 (4,3 %) případů s pozitivní přestavbou genu *ALK*, což je v souladu s dosud publikovanými výsledky, které se pohybují u rozsáhlejších studií v rozmezí 3 – 6 % (34). Nižší podíl ALK-pozitivních případů v porovnání s retrospektivní částí studie pak potvrzuje vliv částečné selekce souboru s vyřazením *EGFR* mutovaných případů v retrospektivní části. V žádném ze 46 případů, které byly testovány FISH i přesto, že nespĺňovaly IHC kritéria (pozitivita IHC 1+, IHC negativní případy 0+) nebo které dle epidemiologických a morfoloických charakteristik statisticky častěji vykazují *ALK* přestavbu, nebyla nalezena přestavba genu *ALK*, což svědčí pro dostatečnou senzitivitu zvolené metody IHC detekce. Diagnostická výtěžnost malých biopsií 88,4 % (u 5 případů nebylo možné stanovit ALK status v důsledku chybění nádorové tkáně umenšením vzorků předchozími vyšetřeními) je vysoká a potvrzuje závěry retrospektivní části o možnosti testování ALK statusu i u „malých“ biopsií. U žádného případu s pozitivní přestavbou genu *ALK* nebyla detekována mutace *EGFR*, což je v souladu s dosud známými závěry (33).

I v tomto souboru nádory s přestavbou genu *ALK* vykazovaly silnější IHC pozitivitu (2+ a více), kromě jednoho s IHC pozitivitou 1-2 +, zatímco FISH negativní případy byly buď IHC negativní (0 +), nebo byla pozorována pozitivita na spodní hranici prahu citlivosti (1 + a 1-2 +). V pěti případech pak byla hodnocena exprese proteinu ALK 2+ a následně FISH vyšetření bylo negativní, bez vedlejších nálezů (např. amplifikace apod.). Tento jev je v literatuře vysvětlován komplexní přestavbou genu *ALK*, která není detekovatelná metodou FISH (ale lze ji odhalit např. metodou sekvenování nové generace či RNA in situ hybridizací) a také nízkou frekvencí přestavby genu *ALK* v nádorových buňkách s následným přenosem fúzního proteinu intercelulární komunikací i do buněk bez přestavby genu *ALK* (35,36).

V zastoupení pohlaví nebyl v retrospektivní části studie nalezen statisticky významný rozdíl mezi sledovanými skupinami (poměr muži/ženy 1,7 vs. 1,7; $p = 0,99$), což může být důsledkem malého počtu pozitivních případů (8 případů). V prospektivní části studie byl nalezen statisticky významný rozdíl v zastoupení pohlaví (poměr muži/ženy 0,5 vs. 1,4; $p = 0,048$); ALK pozitivní tumor se vyskytl 2x častěji u žen (16 případů) než u mužů (8 případů), což je v souladu se současnými poznatky (1,34).

Průměrný věk pacientů s ALK pozitivním nádorem (58 let) a ALK negativním nádorem (64 let) se statisticky významně lišil pouze v prospektivní části studie ($p = 0,014$). Absence rozdílu

v retrospektivní části studie (64 let u ALK-pozitivních nádorů oproti 66 letům u ALK-negativních nádorů; $p = 0,54$) lze opět přisoudit malému počtu pozitivních případů. Alespoň z nálezů v prospektivní části lze tedy konstatovat, že se ALK pozitivní nádory vyskytují v průměru u mladších pacientů, nicméně vzhledem k velmi širokému věkovému spektru a věkovému překryvu obou skupin pacientů v našem souboru nelze údaj o věku využít v selekci jednotlivých pacientů vhodných pro testování přestavby genu *ALK*. Oba tyto závěry potvrzuje i řada předchozích studií (1).

S ohledem na histologický typ ALK-pozitivního nádoru se v celém našem souboru nejčastěji vyskytovaly nádory s převládajícím solidním typem růstu (14x), následované nádory s acinárním typem růstu (8x). Mucinózní typ nebo částečná hlenotvorba (extra- a/nebo intracelulární) byla pozorována u 15 případů. Z uvedených nálezů vyplývá relativně úzký vztah ALK pozitivních nádorů k převážně solidnímu či acinárnímu typu růstu a k hlenotvorbě (mucinózní typ růstu či nápadná hlenotvorba patrná již v základním HE barvení v > 10% nádoru), který je v souladu s dosavadními poznatky (1,37). Avšak vzhledem k tomu, že tyto nádory mohou vykazovat téměř jakoukoliv morfoloii, nelze s ohledem na jejich nízkou prevalenci použít morfoloická kritéria pro selekci jednotlivých případů vhodných pro testování přestavby genu *ALK* v důsledku rizika výrazného snížení senzitivity vyšetření. Navíc u některých vzorků, např. cytobloků nebo endobiopsií nelze v některých případech morfoloický typ nádoru určit vůbec nebo může být v odebrané tkáni zastížen pouze minoritní růstový vzorec.

Závěrem je možné konstatovat, že byla nalezena screenigová IHC metoda vhodná pro detekci exprese ALK proteinu u NSCLC, která byla ověřena i v rutinním testování a následně zavedena do běžné diagnostické praxe. Testování ALK statusu je možné provádět i na „malých“ biopsiích tj. endobronchiálních, transbronchiálních a transtorakálních biopsií a cytoblocích s dostatečnou diagnostickou výtěžností. Dále lze také upozornit na možnost falešné negativity IHC detekce ALK proteinu u tkáni, které byly nejprve zpracovány zmrazovací technikou.

PODĚKOVÁNÍ

Podpořeno programem PRVOUK P37/11 a P27/LF1/1, OPBK CZ.2.16/3.1.00/24509, projektem BBMRI_CZ LM2015089 a SVV 260181 a SVV 260289. Retrospektivní část studie byla částečně finančně podpořena edukačním grantem firmy Pfizer.

Autoři děkují za pomoc při statistickém zpracování MUDr. Igoru Sirákoví, Ph.D., z Kliniky onkologie a radioterapie Fakultní nemocnice Hradec Králové.

PROHLÁŠENÍ

Autor práce prohlašuje, že v souvislosti s tématem, vznikem a publikací tohoto článku není ve střetu zájmů a vznik ani publikace článku nebyly podpořeny žádnou farmaceutickou firmou. Toto prohlášení se týká i všech spoluautorů.

LITERATURA

1. Travis WD, Brambilla E, Burke AP, Marx A, Nicholson AG. WHO Classification of Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart. Lyon: IARC Press; 2015: 26-43.
2. Pao W, Girard N. New driver mutations in non-small-cell lung cancer. *Lancet Oncol* 2011; 12(2): 175-180.
3. Takeuchi K, Soda M, Togashi Y, et al. RET, ROS1 and ALK fusions in lung cancer. *Nat med* 2013; 18(3): 378-381.
4. Pan Y, Zhang Y, Li Y, et al. ALK, ROS1 and RET fusions in 1139 lung adenocarcinomas: a comprehensive study of common and fusion pattern-specific clinicopathologic, histologic and cytologic features. *Lung Cancer* 2014; 84(2): 121-126.
5. Collisson EA, Campbell JD, Brooks AN, et al. Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma. *Nature* 2014; 511(7511): 543-550.
6. Chatziandreu I, Tsioli P, Sakellariou S, et al. Comprehensive Molecular Analysis of NSCLC; Clinicopathological Associations. *PLoS One* 2015; 10(7): e0133859.
7. Ramalingam SS, Owonikoko TK, Khuri FR. Lung cancer: New biological insights and recent therapeutic advances. *CA Cancer J Clin* 2011; 61(2): 91-112.
8. Dietel M, Jöhrens K, Laffert MV, et al. A 2015 update on predictive molecular pathology

- and its role in targeted cancer therapy: a review focussing on clinical relevance. *Cancer Gene Ther* 2015; 22(9): 417-430.
9. **Soda M, Choi YL, Enomoto M.** Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature* 2007; 448(7153): 561-566.
 10. **Iyevleva AG, Raskin GA, Tiurin VI.** Novel ALK fusion partners in lung cancer. *Cancer Lett* 2015; 362(1): 116-121.
 11. **Lira ME, Kim TM, Huang D, et al.** Multiplexed Gene Expression and Fusion Transcript Analysis to Detect ALK Fusions in Lung Cancer. *J Mol Diagn* 2013; 15(1): 51-61.
 12. **Choi YL, Lira ME, Hong M, et al.** A novel fusion of TPR and ALK in lung adenocarcinoma. *J Thorac Oncol* 2014; 9(4): 563-566.
 13. **Hong M, Kim RN, Song JY, et al.** HIP1-ALK, a novel fusion protein identified in lung adenocarcinoma. *J Thorac Oncol* 2014; 9(3): 419-422.
 14. **Wong DW, Leung EL, Wong SK, et al.** A novel KIF5B-ALK variant in nonsmall cell lung cancer. *Cancer* 2011; 117(12): 2709-2718.
 15. **Kwak EL, Bang YJ, Camidge DR.** Anaplastic lymphoma kinase inhibition in non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2010; 363(18): 1693-1703.
 16. **Mazières J, Zalcman G, Crinò L, et al.** Crizotinib therapy for advanced lung adenocarcinoma and a ROS1 rearrangement: results from the EUROS1 cohort. *J Clin Oncol* 2015; 33(9): 992-999.
 17. **Shaw AT, Ou SH, Bang YJ, et al.** Crizotinib in ROS1-rearranged non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2014; 371(21): 1963-1971.
 18. **Toyokawa G, Seto T.** Anaplastic lymphoma kinase rearrangement in lung cancer: its biological and clinical significance. *Respir Investig* 2014; 52(6): 330-338.
 19. **Bang YJ.** Treatment of ALK-positive non-small cell lung cancer. *Arch Pathol Lab Med* 2012; 136(10): 1201-1204.
 20. **Camidge DR, Bang YJ, Kwak EL.** Activity and safety of crizotinib in patients with ALK-positive non-small-cell lung cancer: updated results from a phase 1 study. *Lancet Oncol* 2012; 13(10): 1011-1019.
 21. **Shaw AT, Yeap BY, Solomon BJ.** Effect of crizotinib on overall survival in patients with advanced non-small-cell lung cancer harbouring ALK gene rearrangement: a retrospective analysis. *Lancet Oncol* 2011; 12(11): 1004-1012.
 22. **Shaw AT, Kim DW, Nakagawa K.** Crizotinib versus chemotherapy in advanced ALK-positive lung cancer. *N Engl J Med* 2013; 368(25): 2385-2394.
 23. **Solomon BJ, Cappuzzo F, Felip E, et al.** Intracranial Efficacy of Crizotinib Versus Chemotherapy in Patients With Advanced ALK-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer: Results From PROFILE 1014. *J Clin Oncol* 2016; 34(24): 2858-2865.
 24. **Kolek V, Skříčková J, Pešek M, et al.** České zkušenosti s léčbou crizotinibem v kontextu mezinárodních studií a další perspektivy léčby ALK pozitivních nemalobuněčných karcinomů plic. *Lung Cancer News* 2015; 4-8.
 25. **Dundr P, Hornychová H, Matěj R, Ryška A, Staněk L, Tichý T.** Doporučený postup pro histologické vyšetření karcinomu plic. Společnost českých patologů ČLS JEP, 2013.
 26. **McLeer-Florin A, Moro-Sibilot D, Melis A, et al.** Dual IHC and FISH testing for ALK gene rearrangement in lung adenocarcinomas in a routine practice: a French study. *J Thorac Oncol* 2012; 7(2): 348-354.
 27. **Sholl LM, Weremowicz S, Gray SW, et al.** Combined use of ALK immunohistochemistry and FISH for optimal detection of ALK-rearranged lung adenocarcinomas. *J Thorac Oncol* 2013; 8(3): 322-328.
 28. **Ali G, Proietti A, Pelliccioni S, et al.** ALK rearrangement in a large series of consecutive non-small cell lung cancers: comparison between a new immunohistochemical approach and fluorescence in situ hybridization for the screening of patients eligible for crizotinib treatment. *Arch Pathol Lab Med* 2014; 138(11): 1449-1458.
 29. **Ryška A, Nenutil R.** Doporučený postup pro zpracování a vyšetření bioptických vzorků prsu. Společnost českých patologů ČSL JEP, 2013.
 30. **Rüschoff J, Dietel M, Baretton G, et al.** HER2 diagnostics in gastric cancer-guideline validation and development of standardized immunohistochemical testing. *Virchows Arch* 2010; 457(3): 299-307.
 31. **Ryška A, Matěj R.** Doporučený postup SČP ČLS JEP pro vyšetření NSCLC – aktualizace algoritmu testování ALK – únor 2016.
 32. **Lee T, Lee B, Choi YL, Han J, Ahn MJ, Um SW.** Non-small cell lung cancer with concomitant EGFR, KRAS, and ALK mutation: clinicopathologic features of 12 cases. *J Pathol Transl Med* 2016; 50(3): 197-203.
 33. **Gainor JF, Varghese AM, Ou SH, et al.** ALK rearrangements are mutually exclusive with mutations in EGFR or KRAS: an analysis of 1,683 patients with non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2013; 19(15): 4273-4281.
 34. **Tsao MS, Hirsch FR, Yatabe Y.** IASLC Atlas of ALK Testing in Lung Cancer. Aurora: IASLC Press; 2013.
 35. **Ma D, Wang Z, Yang L, et al.** Responses to crizotinib in patients with ALK-positive lung adenocarcinoma who tested immunohistochemistry (IHC)-positive and fluorescence in situ hybridization (FISH)-negative. *Oncotarget* 2016; 7(39): 64410-64420.
 36. **Klammer H, Mladenov E, Li F, Iliakis G.** Bystander effects as manifestation of intercellular communication of DNA damage and of the cellular oxidative status. *Cancer Lett* 2015; 356: 58-71.
 37. **Cruz-Rico G, Avilés-Salas A, Segura-González M, et al.** Diagnosis of EML4-ALK translocation with FISH, immunohistochemistry, and real-time polymerase chain reaction in patients with non-small cell lung cancer. *Am J Clin Oncol*. In press 2017.