

POLISH JOURNAL OF PATHOLOGY

Official Journal of the Polish Society of Pathologists
and International Academy of Pathology, Polish Division

Zasady oceny ekspresji białka PD-L1
w kwalifikacji do leczenia chorych
z rakiem okolicy głowy i szyi,
przetyku, niedrobnokomórkowym rakiem płuca
i w trójjemnym raku piersi

DOI: [HTTPS://DOI.ORG/10.5114/PJP.2024.135914](https://doi.org/10.5114/pjp.2024.135914)

Termedia Wydawnictwo Medyczne
TERMEDIA Publishing House

POLISH JOURNAL OF PATHOLOGY

Official Journal of the Polish Society of Pathologists
and International Academy of Pathology, Polish Division

www.pjp.termedia.pl

Editor-in-Chief

Janusz Ryś

Editorial Office

Mirostaw Śnietura (Chief)
Aleksandra Ambicka
Magdalena Białas
Jacek Czopek
Wojciech Dąbroś
Grzegorz Dyduch
Jerzy Hankus
Agnieszka Harazin-Lechowska
Marcin Przewoźnik
Piotr Sadowski
Joanna Szpor
Maria Vogelgesang
Joanna Wysocka

Section editors

Joanna Czuwara
Grzegorz Dworacki
Barbara Górnicka
Wiestawa Grajkowska
Mirostawa W. Jones
Renata Langfort
Łukasz Liszka
Józef Kobos
Artur Kowalik
Andrzej Marszałek
Monika Prochorec-Sobieszek
Janusz Ryś
Mirostaw Śnietura
Małgorzata Wągorowska-Danilewicz
Paweł Właszczuk
Zdzisław Woźniak

Contact

Mirostaw Śnietura MD, PhD
Wybrzeże Armii Krajowej 15
44-102 Gliwice
E-mail: miroslaw.snietura@io.gliwice.pl

International Editorial Board

Dariusz Adamek (Poland)
Jan Baak (Norway)
Krzysztof Bardadin (Poland)
Wojciech Biernat (Poland)
Maria Chosia (Poland)
Lech Chyczewski (Poland)
Gabor Cserni (Hungary)
Bogdan Czerniak (USA)
Joanna Czuwara (Poland)
Marian Danilewicz (Poland)
Maria Dębiec-Rychter (Belgium)
Wenancjusz Domagała (Poland)
Henryk A. Domanski (Sweden)
Krystyna Gałazka (Poland)
Wojciech Gorczyca (USA)
Barbara Górnicka (Poland)
Wiestawa Grajkowska (Poland)
Mariola Iliszko (Poland)
Ewa Iżycka-Świeszewska (Poland)
Michał Jeleń (Poland)
Artur Kowalik (Poland)
Teresa Klepacka (Poland)
Jerzy Klijanienko (France)
Jan Kłos (Norway)
Józef Kobos (Poland)
Radzistaw Kordek (Poland)
Artur Kowalik (Kielce)
Andrzej Kram (Poland)
Maciej Krzakowski (Poland)
Andrzej Kulig (Poland)
Jolanta Kupryjańczyk (Poland)
Dariusz Lange (Poland)
Renata Langfort (Poland)
Jerzy Lasota (USA)
Paweł Piotr Liberski (Poland)
Jan Lubiński (Poland)
Józef Malysz (USA)
Jadwiga Małydk (Poland)
Przemysław Majewski (Poland)
Andrzej Marszałek (Poland)
Anna M. Moran (USA)
Yashuhiro Nakamura (Japan)
Anna Nasierowska-Guttmejer (Poland)
Krzysztof Okoń (Poland)
Włodzimierz Olszewski (Poland)
Anna Pituch-Noworolska (Poland)
Monika Prochorec-Sobieszek (Poland)
Maciej Pronicki (Poland)
Konrad Ptaszyński (Poland)
Zbigniew Rudzki (UK)
Janusz Ryś (Poland)
Andrzej T. Slominski (USA)
Jerzy Stanek (USA)
Simona Stolnicu (Romania)
Józef Szarek (Poland)
Justyna Szumiło (Poland)
Janusz Szymaś (Poland)
Dina Tiniakos (Greece, UK)
Elżbieta Urasińska (Poland)
Małgorzata Wągorowska-Danilewicz (Poland)
Artur Zembowicz (USA)
Bogna Ziarkiewicz-Wróblewska (Poland)

Honorary Committee

Wiestawa Biczyskowska
Jan Bręborowicz
Andrzej Kulig
Janusz Limon
Renata Krystyna Maryniak
Janina Orłowska
Bolesław Papla
Marian Sulik
Lech Zimnoch
Jan Żeromski

TERMEDIA Publishing House
ul. Kleeberga 2, 61-615 Poznań, Poland
Phone/fax +48 61 822 77 81
E-mail: termedia@termedia.pl
<http://www.termedia.pl>

Distribution Subscription Department
Ewa Winkowska
Phone: +48 61 656 22 00

President of the Management Board
of the Termedia Publishing House
Janusz Michalak

Production Editor
Marzena Demska
E-mail: m.demska@termedia.pl

The advertisers shall be liable for the contents of advertisements placed in Polish Journal of Pathology.
Advertisements of prescription drugs are intended only for physicians licensed to prescribe them.

Spis treści

Zasady oceny ekspresji białka PD-L1 w kwalifikacji do leczenia chorych z rakiem okolicy głowy i szyi, przełyku, niedrobnokomórkowym rakiem płuca i w trójjemnym raku piersi	
Zastosowanie i ocena ekspresji białka PD-L1 w kwalifikacji do leczenia inhibitorami punktów kontroli immunologicznej w nowotworach płuca i klatki piersiowej, piersi, przełyku oraz regionu głowy i szyi Katarzyna Stencel, Renata Langfort	1
Ocena ekspresji białka PD-L1 w kwalifikacji do leczenia chorych z niedrobnokomórkowym rakiem płuca Renata Langfort, Małgorzata Szolkowska	8
Zasady oceny ekspresji PD-L1 w raku trójjemnym piersi Jędrzej Borowczak, Łukasz Szyłberg	13
Rak płaskonabłonkowy przełyku – ocena ekspresji białka PD-L1 Małgorzata Lenarcik, Andrzej Mróz	17
Rekomendacje wykonania i oceny PD-L1 w rakach płaskonabłonkowych głowy i szyi Ewa Chmielik, Monika Durzyńska	22

ZASTOSOWANIE I OCENA EKSPRESJI BIAŁKA PD-L1 W KWALIFIKACJI DO LECZENIA INHIBITORAMI PUNKTÓW KONTROLI IMMUNOLOGICZNEJ W NOWOTWORACH PŁUCA I KLATKI PIERSIOWEJ, PIERSI, PRZEŁYKU ORAZ REGIONU GŁOWY I SZYI

KATARZYNA STENCEL¹, RENATA LANGFORT²

¹Oddział Onkologii Klinicznej z Pododdziałem Diennej Chemioterapii, Wielkopolskie Centrum Pulmonologii i Torakochirurgii im. Eugenii i Janusza Zeylandów w Poznaniu

²Zakład Patomorfologii, Instytut Gruźlicy i Chorób Płuc, Warszawa

Wstęp

W nowotworach płuca i klatki piersiowej, nowotworach piersi, przełyku oraz nowotworach regionu głowy i szyi stosuje się obecnie kilka leków immunokompetentnych (tabela 1).

Podstawową rolę w utrzymaniu równowagi pomiędzy aktywnością a wyhamowaniem funkcji układu immunologicznego odgrywają cząsteczki immunologicznych punktów kontroli, które znajdują się na powierzchni komórek układu immunologicznego. Najważniejsze immunologiczne punkty kontrolne to CTLA-4 (*cytotoxic T cell antigen-4*), który znajduje się na powierzchni limfocytów T regulatorowych, PD-1 (*programmed death receptor-1*), obecny na limfocytach T, oraz PD-L1 (*programmed death ligand-1*), znajdujący się na komórkach infiltrujących tkankę nowotworową, komórkach odpowiedzi nieswoistej oraz na większości komórek organizmu. Ekspresję PD-L1 wykazują także komórki nowotworowe. Pobudzenie immunologicznych punktów kontrolnych skutkuje wygaszeniem aktywności układu immunologicznego, anergią limfocytów i ucieczką nowotworu spod kontroli układu immunologicznego.

Zastosowanie przeciwciał przeciwko ligandowi lub receptorowi programowanej śmierci komórki prowadzi do aktywacji układu immunologicznego [1].

W kwalifikacji do leczenia lekami blokującymi punkty kontroli immunologicznej są aktualnie wykorzystywane predykcyjne testy immunohistochemiczne oceniające ekspresję białka PD-L1 w materiale utrwalonym w formalinie i zatopionym w bloczkach parafinowych. Do badań używa się różnych klonów przeciwciał oraz różnych platform diagnostycznych.

W zależności od lokalizacji narządowej nowotworu ocenie podlega ekspresja występująca w komponentie nabłonkowym (komórkach raka) lub w komponentie nabłonkowym i zapalnym towarzyszącym naciekowi nowotworowemu [2–5]. Ekspresję białka PD-L1 określa się w skali stopnia wybarwienia komórek nowotworowych (*Tumor Proportion Score – TPS*), w której ocenia się odsetek zachowanych komórek raka, bądź w skali obejmującej łączny wynik wartości pozytywne (*Combined Positive Score – CPS*), w której uwzględnia się ekspresję białka PD-L1 zarówno w komórkach nowotworowych, jak i zapalnych (limfocytach, makrofagach) odniesioną do całkowitej liczby zachowanych komórek raka i pomnożoną przez 100 [4, 5].

Za pozytywną reakcję uznaje się liniową, całkowitą lub częściową, reakcję błonową na komórkach raka, niezależnie od intensywności, oraz reakcję błonową i/lub cytoplazmatyczną, niezależnie od stopnia nasilenia, w komórkach zapalnych znajdujących się w na-

Tabela 1. Dostępne przeciwciała monoklonalne stosowane w leczeniu nowotworów płuca i klatki piersiowej, nowotworów piersi, przełyku oraz nowotworów regionu głowy i szyi

PRZECIWCIAŁA ANTY-PD-1	PRZECIWCIAŁA ANTY-PD-L1	PRZECIWCIAŁA ANTY-CTLA4
niwolumab	atezolizumab	ipilimumab
pembrolizumab	durwalumab	
cemiplimab		

anti-PD-1 – anti-programme death receptor-1, anti-PD-L1 – anti-programme death-ligand-1, anti-CTLA-4 – anti-cytotoxic T cell antigen

Tabela 2. Zasady zabezpieczenia materiału do oceny ekspresji białka PD-L1 (wg [9])

CZAS ZIMNEGO NIEDOKRWIENIA (COLD ISCHEMIA TIME)	Utrwalenie materiału w ciągu 30 minut od pobrania, najkorzystniej natychmiast po pobraniu (zwłaszcza materiał oligobiopsyjny, cytobloczki)
UTRWALACZ	10% roztwór buforowanej formaliny o obojętnym pH 7,2–7,4
CZAS UTRWALANIA	> 6 do 48 godzin – mały materiał, oligobiopsja, cytobloczek > 6 do 72 godz. – duży materiał (materiał powinien być dostarczony do Zakładu Patomorfologii przed upływem maksymalnego czasu utrwalania)
TEMPERATURA PARAFINY STOSOWANEJ DO ZATAPIANIA WYCINKÓW	60°C
GRUBOŚĆ SKRAWKÓW PARAFINOWYCH	3–5 µm umieszczone na szkiełkach adhezyjnych
PRZECHOWYWANIE BLOCzków PARAFINOWYCH	W temperaturze 14–25°C przy wilgotności powietrza na poziomie od 30 do 60% RH, przy dobowym wahanii ±5% RH [10]
PRZECHOWYWANIE SKROJONYCH I NIEZABARWIONYCH PREPARATÓW MIKROSKOPOWYCH	Do 6 miesięcy w temperaturze 2–8°C (najkorzystniej) lub w 25°C, do 4 miesięcy skrawki z regionu głowy i szyi [7]

cieku nowotworowym i bezpośrednio przylegających do nowotworu [3, 6–8].

Wiarygodność predykcyjnego testu immunohistochemicznego zależy od przestrzegania zasad utrwalania, w tym ilości i jakości utrwalcza, czasu utrwalania, odpowiedniego zabezpieczenia i transportu materiału, temperatury parafiny, jak również od warunków przechowywania bloczków parafinowych i stosowania się do zaleceń producenta testu [4, 5, 7–9] (tabela 2).

Testy najlepiej jest wykonywać na skrawkach o grubości 4–5 µm, bezpośrednio skrojonych z bloczka parafinowego. Materiał wcześniej skrojony i umieszczony na adhezyjnych szkiełkach podstawowych powinien być przechowywany bez dostępu do światła, w temperaturze 2–8°C, nie dłużej niż 6 miesięcy. Dłuższy czas przechowywania może negatywnie wpływać na wyniki zachodzącej reakcji [7–9].

Ocenę ekspresji białka PD-L1 należy wykonywać z kontrolą pozytywną i negatywną, co pozwala na zweryfikowanie jakości i wiarygodności badania.

Niezbędna jest umiejętność oceny testów przez patomorfologa, znajomość reakcji, które są uznane za pozytywne, oraz reakcji nieprawidłowych, a także reakcji, które mogą pojawiać się w innych elementach komórkowych czy strukturalnych materiału [3, 5, 6, 9].

Nowotwory płuca i klatki piersiowej

Immunoterapia (przeciwciała przeciwko immunologicznym punktom kontrolnym) jest powszechnie wykorzystywana u chorych na nowotwory płuca oraz klatki piersiowej i znajduje zastosowanie zarówno w przypadku raka niedrobnokomórkowego płuca, jak i raka drobnokomórkowego czy międzybłoniaka opłucnej (tabela 3).

Nowotwory regionu głowy i szyi

W nowotworach regionu głowy i szyi stosuje się obecnie dwa leki immunokompetentne.

Skuteczność i bezpieczeństwo pembrolizumabu w leczeniu pierwszej linii przerzutowego lub nawrotowego raka płaskonabłonkowego jamy ustnej, gardła i krtani potwierdzono w ramach badania klinicznego 3 fazy KEYNOTE-048. Zastosowanie pembrolizumabu wiązało się z poprawą w zakresie czasu przeżycia całkowitego wobec standardowego schematu leczenia, czyli cetuksimabu w skojarzeniu z chemioterapią według schematu platyna/5-FU. Poprawa ta była istotna statystycznie i klinicznie zarówno przy zastosowaniu pembrolizumabu w monoterapii u chorych z CPS ≥ 1% (HR = 0,78, 95% CI: 0,64–0,96, $p = 0,0171$), jak i przy zastosowaniu pembrolizumabu w skojarzeniu z chemioterapią opartą na pochodnej platyny i 5-FU w całej grupie chorych niezależnie od ekspresji PD-L1 (HR = 0,77, 95% CI: 0,63–0,93, $p = 0,0067$). W Polsce w ramach programu lekowego pembrolizumab stosuje się w monoterapii u chorych z ekspresją PD-L1 (CPS ≥ 1%) w przypadku wolnego przebiegu choroby i braku istotnych objawów klinicznych z niej wynikających, a pembrolizumab w skojarzeniu z chemioterapią u chorych z CPS ≥ 1% w przypadku dynamicznej progresji choroby i nasilonych objawów klinicznych z nią związanych [25].

Do leczenia drugiej linii u chorych na płaskonabłonkowego raka jamy ustnej, gardła lub krtani, u których do progresji doszło w trakcie lub do 6 miesięcy po zastosowaniu chemioterapii (w tym chemioterapii w skojarzeniu z cetuksimabem), stosuje się monoterapię niwolumabem. Rejestrację oparto na wynikach badania CheckMate-141, w którym wykazano wydłużenie mediany czasu przeżycia całkowitego z redukcją ryzyka

Tabela 3. Dostępne schematy leczenia z użyciem immunoterapii stosowane w nowotworach płuca i klatki piersiowej

LEK	PD-L1	BADANIE KLINICZNE	KORZYŚĆ
LECZENIE UZUPEŁNIAJĄCE PO RADYKALNYM ZABIEGU CHIRURGICZNYM I CHEMIOTERAPII II–III A			
atezolizumab	≥ 50%	IMpower-010	OS HR 0,42 <i>vs</i> BSC <i>p</i> = 0,005 DFS HR 0,43 [11]
IMMUNOTERAPIA KONSOLIDUJĄCA DURWALUMABEM PO RADYKALNEJ JEDNOCZESNEJ CHEMIORADIOTERAPII			
durwalumab	niezależnie od ekspresji PD-L1/oznaczenie niewymagane	PACIFIC	mOS 47,5 <i>vs</i> 29,1 miesiąca <i>vs</i> BSC OS HR 0,68 <i>p</i> = 0,00251 [12]
MONOTERAPIA W PIERWSZEJ LINII LECZENIA ZAAWANSOWANEGO/PRZERZUTOWEGO NIEDROBNOKOMÓRKOWEGO RAKA PŁUCA			
pembrolizumab	≥ 50%	KEYNOTE-042	mOS 30 <i>vs</i> 14,2 miesiąca <i>vs</i> CHT OS HR 0,63 [13]
atezolizumab	≥ 50%	IMpower110	mOS 20,2 <i>vs</i> 13,1 miesiąca <i>vs</i> CHT OS HR 0,59 <i>p</i> = 0,001 [14]
cemiplimab	≥ 50%	EMPOWER-Lung 1	mOS 26,1 <i>vs</i> 13,3 miesiąca <i>vs</i> CHT OS HR 0,57 <i>p</i> < 0,0001 [15]
CHEMIOIMMUNOTERAPIA W PIERWSZEJ LINII LECZENIA ZAAWANSOWANEGO/PRZERZUTOWEGO NIEDROBNOKOMÓRKOWEGO RAKA PŁUCA			
RAK PŁASKONABŁONKOWY			
pembrolizumab + karboplatyna/paklitaksel	< 50%	KEYNOTE-407	mOS 17,2 <i>vs</i> 11,6 miesiąca <i>vs</i> CHT OS HR 0,71 [16]
RAK NIEPŁASKONABŁONKOWY			
pembrolizumab + karboplatyna lub cisplatyna/pemetreksed	< 50%	KEYNOTE-189	mOS 22 <i>vs</i> 10,6 miesiąca <i>vs</i> CHT OS HR 0,60 [17]
RAK PŁASKONABŁONKOWY I NIEPŁASKONABŁONKOWY			
niwolumab + ipilimumab + chemioterapia	< 50%	CheckMate-9LA	mOS 15,8 <i>vs</i> 11 miesięcy <i>vs</i> CHT OS HR 0,76 [18]
DRUGA I KOLEJNE LINIE LECZENIA NIEDROBNOKOMÓRKOWEGO RAKA PŁUCA			
RAK PŁASKONABŁONKOWY			
niwolumab	niezależnie od ekspresji PD-L1/oznaczenie niewymagane	CheckMate-017	mOS 9,2 <i>vs</i> 6 miesiąca <i>vs</i> CHT OS HR 0,59 <i>p</i> < 0,001 [19]

Tabela 3. Cd.

LEK	PD-L1	BADANIE KLINICZNE	KORZYŚĆ
RAK NIEPŁASKONABLONKOWY			
niwolumab	niezależnie od ekspresji PD-L1/ oznaczenie niewymagane	CheckMate-057	mOS 12,2 vs 9,4 miesiąca vs CHT OS HR 0,73 $p = 0,002$ [20]
RAK PŁASKONABLONKOWY I NIEPŁASKONABLONKOWY			
atezolizumab	niezależnie od ekspresji PD-L1/ oznaczenie niewymagane	OAK	mOS 13,8 vs 9,6 miesiąca vs CHT OS HR 0,73 $p = 0,0003$ [21]
PIERWSZA LINIA LECZENIA DROBNOKOMÓRKOWEGO RAKA PŁUCA			
atezolizumab + chemioterapia	niezależnie od ekspresji PD-L1/ oznaczenie niewymagane	IMpower-133	mOS 12,3 vs 10,3 miesiąca vs CHT OS HR 0,70 $p = 0,007$ [22]
durwalumab + chemioterapia	niezależnie od ekspresji PD-L1/ oznaczenie niewymagane	CASPIAN	mOS 13 vs 10,3 miesiąca vs CHT OS HR 0,73 $p = 0,0047$ [23]
MIĘDZYBŁONIAK OPŁUCNEJ			
niwolumab + ipilimumab	niezależnie od ekspresji PD-L1/ oznaczenie niewymagane	CheckMate-743	mOS 18,1 vs 14,1 miesiąca vs CHT OS HR 0,74 $p = 0,0020$ [24]

OS (overall survival) – czas przeżycia całkowitego, mOS (median overall survival) – mediana czasu przeżycia całkowitego, HR (hazard ratio) – współczynnik hazardu

zgonu o 30% ($p = 0,01$) w porównaniu ze standardową chemioterapią zgodną z wyborem badacza (metotreksat lub docetaksel) [26].

Nowotwory piersi

Immunoterapia w skojarzeniu z chemioterapią jest też obecnie stosowana w leczeniu potrójnie ujemnego raka piersi (*triple negative breast cancer* – TNBC). Skuteczność i bezpieczeństwo pembrolizumabu w leczeniu okołooperacyjnym wczesnego TNBC o dużym ryzyku nawrotu oceniano w badaniu klinicznym 3 fazy KEYNOTE-522 [27]. Leczeniu podlegają chore z rozpoznaniem raka piersi w klinicznym stopniu zaawansowania T1–4 i N1–N2 lub T2–T4 i N0, u których nie stwierdzono ekspresji receptorów estrogenowych ani nadekspresji receptora HER2 lub amplifikacji genu *HER2*. Dodanie immunoterapii do chemioterapii neoadjuwantowej (karboplatyna w skojarzeniu z paklitakselem, a następnie antracyklina w skojarzeniu z cyklofosfamidem) z następczym

zastosowaniem pembrolizumabu po zabiegu chirurgicznym skutkowało istotnym statystycznie i klinicznie wydłużeniem czasu wolnego od zdarzeń (*event free survival* – EFS). Zastosowanie pembrolizumabu przed i po operacji powodowało zmniejszenie ryzyka zdarzenia (nawrotu miejscowego, rozsiewu choroby, zdiagnozowania drugiego pierwotnego nowotworu lub zgonu) o 37% (HR = 0,63, 95% CI: 0,48–0,82). Kwalifikacja do terapii okołooperacyjnej nie wymaga oznaczenia ekspresji PD-L1 [28].

Drugim wskazaniem do zastosowania pembrolizumabu w raku piersi jest stwierdzenie nawrotowego, nieoperacyjnego lub przerzutowego TNBC z ekspresją PD-L1, którą stwierdza się na co najmniej 10% komórek nowotworowych i komórek nacieku immunologicznego. Rejestrację oparto na wynikach badania klinicznego 3 fazy KEYNOTE-355, w którym pembrolizumab stosowano w skojarzeniu z chemioterapią (paklitaksel, nab-paklitasel lub karboplatyna z gemcytabiną). Dodanie immunoterapii do chemioterapii skutkowało istotną redukcją ryzyka progresji

choroby lub zgonu o 35% wobec samej chemioterapii (HR = 0,65, 95% CI: 0,49–0,86, $p = 0,0012$) oraz zwiększeniem odsetka obiektywnych odpowiedzi na leczenie (odpowiednio 53% wobec 40%) i wydłużeniem czasu trwania odpowiedzi na leczenie (odpowiednio 19,3 miesiąca wobec 7,3 miesiąca) [28]. Po okresie obserwacji z medianą wynoszącą 44,1 miesiąca stwierdzono także wydłużenie mediany czasu przeżycia całkowitego u chorych na TNBC z CPS $\geq 10\%$, u których zastosowano chemioimmunoterapię (23 miesiące wobec 16,1 miesiąca) [29].

Nowotwory przełyku

Rak przełyku, rak połączenia żołądkowo-przełykowego oraz rak żołądka to kolejna grupa nowotworów, w których powszechnie stosuje się immunoterapię.

Pierwsze wskazanie do immunoterapii w tej grupie chorych obejmuje leczenie uzupełniające niwolumabem chorych na płaskonabłonkowego lub gruczolowego raka przełyku lub połączenia żołądkowo-przełykowego z chorobą resztkową po zastosowanej wcześniej chemioradioterapii neoadjuwantowej i radykalnej resekcji chirurgicznej ($\geq ypT1$ lub $\geq ypN1$, R0). Skuteczność i bezpieczeństwo tej terapii potwierdzono w badaniu klinicznym 3 fazy CheckMate-557, w którym wykazano dwukrotne wydłużenie czasu wolnego od choroby (*disease free survival* – DFS) u chorych otrzymujących niwolumab (mDFS 22,4 miesiąca wobec 11 miesięcy w ramieniu z placebo), z redukcją ryzyka nawrotu choroby lub zgonu o 31% (HR = 0,69, $p = 0,0003$). Leczenie uzupełniające niwolumabem powinno się rozpocząć do 16 tygodni od zabiegu chirurgicznego i jest stosowane przez 12 miesięcy lub do progresji choroby albo wystąpienia nieakceptowalnej toksyczności. Kwalifikacja do leczenia uzupełniającego niwolumabem nie jest uzależniona od ekspresji PD-L1 (nie ma konieczności oznaczania ekspresji PD-L1) [30].

W przypadku zaawansowanego lub przerzutowego raka gruczolowego żołądka, przełyku lub połączenia żołądkowo-przełykowego w leczeniu pierwszej linii możliwe jest zastosowanie niwolumabu w skojarzeniu z chemioterapią opartą na fluoropirymidynie i oksaliplatynie (schemat CAPOX lub FOLFOX) u chorych, u których CPS oceniono na ≥ 5 (refundacja).

Schemat leczenia zarejestrowano na podstawie wyników badania klinicznego CheckMate-649, do którego włączano chorych niezależnie od ekspresji PD-L1. W grupie chorych z CPS ≥ 5 dodanie niwolumabu do chemioterapii zmniejsza ryzyko zgonu o 29% wobec samej chemioterapii (HR = 0,71, 95% CI: 0,61–0,83, $p < 0,0001$) i ryzyko progresji choroby o 32% (HR = 0,68, 95% CI: 0,58–0,79, $p < 0,0001$). Kwalifikacja do immunochemioterapii chorych na raka gruczolowego żołądka lub połączenia żołądkowo-przełykowego wymaga dodatkowo

badania immunohistochemicznego bądź badania fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* oceniających ekspresję HER2 (wymagany brak ekspresji HER2) [31]. Chorzy na zaawansowanego lub przerzutowego raka przełyku lub połączenia żołądkowo-przełykowego niezależnie od podtypu histologicznego (rak gruczolowy i rak płaskonabłonkowy) w przypadku potwierdzenia CPS ≥ 10 mogą być także kwalifikowani do leczenia pembrolizumabem w skojarzeniu z chemioterapią (pochodna platyny z fluoropirymidyną). W badaniu klinicznym z randomizacją 3 fazy KEYNOTE-590 wykazano, że dodanie pembrolizumabu do chemioterapii w tej grupie chorych wiąże się z wydłużeniem czasu przeżycia całkowitego (mOS 13,5 miesiąca wobec 9,4 miesiąca w ramieniu z samą chemioterapią, HR = 0,62) oraz czasu wolnego od progresji choroby (mPFS 7,5 miesiąca wobec 5,5 miesiąca, HR = 0,51) [32]. Chorzy na zaawansowanego raka płaskonabłonkowego przełyku lub połączenia żołądkowo-przełykowego z ekspresją PD-L1 $\geq 1\%$ mają obecnie w ramach programu lekowego jeszcze dwie inne opcje terapeutyczne pierwszej linii: niwolumab w skojarzeniu z chemioterapią (fluoropirymidyna z pochodną platyny) lub niwolumab w skojarzeniu z ipilimumabem. W badaniu klinicznym CheckMate-648 porównywano oba schematy leczenia z samą chemioterapią i w obu przypadkach wykazano wydłużenie czasu przeżycia całkowitego wobec samej chemioterapii. Zastosowanie niwolumabu z chemioterapią wiąże się z redukcją ryzyka zgonu o 46% w porównaniu z samą chemioterapią (mOS 15,4 miesiąca wobec 9,1 miesiąca, HR = 0,54), a zastosowanie niwolumabu z ipilimumabem o 36% (mOS 13,7 miesiąca wobec 9,1 miesiąca, HR = 0,64) [33]. W ramach programu lekowego u chorych na raka płaskonabłonkowego po niepowodzeniu chemioterapii można zastosować niwolumab w monoterapii bez konieczności oznaczania ekspresji PD-L1. Skuteczność i bezpieczeństwo immunoterapii wobec chemioterapii (docetaksel lub paklitaksel) oceniano w ramach badania klinicznego ATTRACTION-3 i wykazano, że zastosowanie niwolumabu związane jest z wydłużeniem czasu przeżycia całkowitego (mOS 10,9 miesiąca wobec 8,4 miesiąca) i redukcją ryzyka zgonu o 23% (HR = 0,77, 95% CI: 0,62–0,96, $p = 0,019$) [34].

Kwalifikacja do leczenia

Jednym z podstawowych kryteriów kwalifikacji chorych do immunoterapii jest zachowany dobry stopień sprawności (0 lub 1 według kryteriów ECOG). Istotne jest także, aby chory nie przyjmował przewlekłe immunosupresyjnej dawki glikokortykosteroidów (≥ 10 mg prednizolonu lub ekwiwalentnej dawki innych glikokortykosteroidów) ani nie był poddany leczeniu immunosupresyjnemu. Do immunoterapii mogą być kwalifikowani tylko chorzy bez

aktywnych, wymagających leczenia chorób autoimmunologicznych, z wyjątkiem cukrzycy, niedoczynności tarczycy, łuszczycy, wyprysku liszaja płaskiego i bielactwa [35].

Działania niepożądane związane z leczeniem lekami immunokompetentnymi

Działania niepożądane immunoterapii mogą wystąpić w trakcie całego okresu leczenia, a także do kilkunastu miesięcy od jego zakończenia i mogą dotyczyć każdego układu i każdego narządu. Najczęstsze działania niepożądane przypominają schorzenia autoimmunologiczne i dotyczą:

- **narządów dokrewnych:** obejmują nadczynność tarczycy przechodzącą stopniowo w niedoczynność tarczycy (najczęstsze powikłanie), niedoczynność przysadki mózgowej, niedoczynność kory nadnerczy, cukrzycę typu 1,
- **skóry:** obejmują świąd skóry, wysypkę grudkową czy grudkowo-krostkową, odbarwienia skóry,
- **płuc:** manifestują się niezakaźnym (immunologicznym) zapaleniem płuc, które może przebiegać bezobjawowo, ale może także wiązać się z wystąpieniem kaszlu, duszności, bólu w klatce piersiowej czy gorączki,
- **jelit:** w postaci immunologicznego zapalenia jelita przebiegającego z biegunką i/lub bólem brzucha,
- **wątroby:** wywołując immunologiczne zapalenie wątroby przebiegające często bezobjawowo, ze zwiększeniem aktywności aminotransferaz.

Jednym z najczęstszych powikłań immunoterapii jest także **zmęczenie**, które może być jednak objawem związanym z niedokrwistością czy niedoczynnością tarczycy bądź kory nadnerczy.

Do rzadkich powikłań immunoterapii należą:

- powikłania neurologiczne, np. polineuropatia, aseptyczne zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych, porażenie nerwu twarzonego, zespół Guillaina-Barrégo, zapalenie mózgu,
- powikłania kardiologiczne, np. zapalenie mięśnia sercowego, zapalenie osierdzia, arytmia,
- powikłania reumatologiczne – bóle oraz zapalenie mięśni i stawów,
- powikłania nefrologiczne – niewydolność nerek, zapalenie nerek,
- powikłania okulistyczne – zapalenie twardówki, zaburzenia dotyczące siatkówki czy błony naczyniowej oka,
- powikłania hematologiczne – są niezwykle rzadkie i mogą obejmować niedokrwistość hemolityczną czy płamicę małopłytkową [36].

Podsumowanie

Wprowadzenie leczenia inhibitorami punktów kontroli immunologicznej w istotny sposób zmieniło

przebieg i rokowanie wielu nowotworów. Stało się szansą na wydłużenie czasu życia chorych. Z pewnością nie jest leczeniem pozbawionym efektów ubocznych, dlatego właściwa kwalifikacja do leczenia ma duże znaczenie, zwłaszcza gdy konieczna jest ocena ekspresji białka PD-L1. Dobór testu, przestrzeganie zasad jego wykonania i właściwa ocena zachodzącej reakcji w preparatach mikroskopowych odgrywają niezwykle ważną rolę w wyborze odpowiedniej grupy chorych i kwalifikacji do terapii.

Piśmiennictwo

1. Wojas-Krawczyk K. Immunoterapia raka płuca. Podstawy immunoonkologii. PZWL, Warszawa 2021.
2. Khunger M, Hernandez AV, Pasupuleti V i wsp. Programmed cell death 1 (PD-1) ligand (PD-L1) expression in solid tumors as a predictive biomarker of benefit from PD-1/PD-L1 axis inhibitors: a systematic review and meta-analysis. *JCO Precis Oncol* 2017; 1: 1-15.
3. Marletta S, Fusco N, Munari E i wsp. Atlas of PD-L1 for pathologists: indications, scores, diagnostic platforms and reporting system. *J Pers Med* 2022; 12: 1073. DOI: <https://doi.org/10.3390/jpm12071073>.
4. Walk EE, Yohe SL, Beckman A i wsp. The cancer immunotherapy biomarker testing landscape. *Arch Pathol Lab Med* 2020; 144: 706-724.
5. Willis JE, Eyerer F, Walk EE i wsp. Companion Diagnostics. Lessons Learned and the Path Forward from the Programmed Death Ligand-1 Rollout. *Arch Pathol Lab Med* 2023; 147: 62-70.
6. Meng X, Huang Z, Teng F i wsp. Predictive biomarkers in PD-1/PD-L1 checkpoint blockade immunotherapy. *Cancer Treat Rev* 2015; 41: 868-876.
7. PD-L1 IHC 22C3 pharmDX. Interpretation Manual – Wersja 2019.11.
8. Ventana PD-L1 (SP263) Assay Interpretation for Non-Small Cell Lung Carcinoma [Wtyczne immunohistochemicznej oceny ekspresji PD-L1 z zastosowaniem testu VENTANA PD-L1 (SP-263) Assay w niedrobnokomórkowym raku płuca]. 2017.
9. Tsao MS, Kerr KM, Dacic S i wsp. (red.). IASLC Atlas of PD-L1 Immunohistochemistry Testing in Lung Cancer. North Fort Myers, FL, 2017.
10. Podręcznik wdrożeniowy Jednostki Diagnostyki Patomorfologicznej. Wskazówki i zalecenia. CMJ, Kraków 2022.
11. Felip E, Altorki N, Zhou C i wsp. Adjuvant atezolizumab after adjuvant chemotherapy in resected stage IB-III non-small-cell lung cancer (IMpower010): a randomised, multicentre, open-label, phase 3 trial. *Lancet* 2021; 398: 1344-1357.
12. Spigel D, Faivre-Finn C, Gray J i wsp. Five-year survival outcomes from the PACIFIC trial: durvalumab after chemoradiotherapy in stage III non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2022; 40: 1301-1311.
13. Reck M, Rodriguez-Abreu D, Robinson A i wsp. Updated analysis of KEYNOTE-024: pembrolizumab versus Platinum-based chemotherapy for advanced non-small-cell lung cancer with PD-L1 tumor proportion score of 50% or greater. *J Clin Oncol* 2019; 37: 537-546.
14. Herbst R, Giaccone G, Marinis F i wsp. Atezolizumab for first-line treatment of PD-L1-selected patients with NSCLC. *N Engl J Med* 2020; 383: 1328-1339.
15. Ozguroglu M, Kilickap S, Sezer A i wsp. First-line cemiplimab monotherapy and continued cemiplimab beyond progression plus chemotherapy for advanced non-small-cell lung cancer with PD-L1 50% or more (EMPOWER-Lung 1): 35-month follow-up from a multicentre, open label, randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2023; 24: 989-1001.

16. Novello S, Kowalski DM, Luft A i wsp. Pembrolizumab plus chemotherapy in squamous non-small-cell lung cancer: 5-year update of the phase III KEYNOTE-407 study. *J Clin Oncol* 2023; 41: 1999-2006.
17. Garassino M, Gadgeel S, Speranza G i wsp. Pembrolizumab plus pemetrexed and Platinum in nonsquamous non-small-cell lung cancer: 5-year outcomes from the phase 3 KEYNOTE-189 study. *J Clin Oncol* 2023, 41: 1992-1998.
18. Paz-Ares L, Ciuleanu T, Cobo M i wsp. First line nivolumab plus ipilimumab with chemotherapy versus chemotherapy alone for metastatic NSCLC in CheckMate 9LA: 3-year clinical update and outcomes in patients with brain metastases or select somatic mutations. *J Thorac Oncol* 2022; 17: 289-308.
19. Brahmer J, Reckamp K, Baas P i wsp. Nivolumab versus docetaxel in advanced squamous-cell non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2015; 373: 123-135.
20. Borghaei H, Paz-Ares L, Horn L i wsp. Nivolumab versus docetaxel in advanced nonsquamous-cell non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2015; 373: 1627-1639.
21. Rittmeyer A, Barlesi F, Waterkamp D i wsp. Atezolizumab versus docetaxel in patients with previously treated non-small-cell lung cancer (OAK): a phase 3, open-label, multicentre, randomised, controlled trial. *Lancet* 2017; 398: 255-265.
22. Horn L, Mansfield A, Szczesna A i wsp. First line atezolizumab plus chemotherapy in extensive-stage small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2018; 379: 2220-2229.
23. Paz-Ares L, Dvorkin M, Chen Y i wsp. Durvalumab plus planinum-etoposide in first line treatment of extensive-stage small-cell lung cancer (CASPIAN): a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial. *Lancet* 2019; 394: 1929-1939.
24. Baas P, Scherpereel A, Nowak A i wsp. First-line nivolumab plus ipilimumab in unresectable malignant pleural mesothelioma (CheckMate 743): a multicentre, randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet* 2021; 397: 375-386.
25. Burtness B, Harrington H, Greil L i wsp. Pembrolizumab alone or with chemotherapy versus cetuximab with chemotherapy for recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck (KEYNOTE-048): a randomised, open-label, phase 3 study. *Lancet* 2019; 394: 1915-1928.
26. Ferris R, Blumenschein G, Fayette J i wsp. Nivolumab for recurrent squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* 2016; 375: 1856-1867.
27. Schmid P, Cortes J, Dent R i wsp. Event-free survival with pembrolizumab in early triple-negative breast cancer. *N Engl J Med* 2022; 386: 556-567.
28. Cortes J, Cescon D, Rugo H i wsp. Pembrolizumab plus chemotherapy versus placebo plus chemotherapy for previously untreated locally recurrent inoperable or metastatic triple-negative breast cancer (KEYNOTE-355): a randomized, placebo controlled, double-blind, phase 3 clinical trial. *Lancet* 2020; 396: 1817-1828.
29. Cortes J, Rugo H, Cescon D i wsp. Pembrolizumab plus chemotherapy in advanced triple-negative breast cancer. *N Engl J Med* 2022; 387: 217-226.
30. Kelly R, Ajani J, Kuzdzal J i wsp. Adjuvant Nivolumab in resected esophageal or gastroesophageal junction cancer. *N Engl J Med* 2021; 384: 1191-1203.
31. Janjigian Y, Shitara K, Moehler M i wsp. First-line nivolumab plus chemotherapy versus chemotherapy alone for advanced gastric, gastro-oesophageal junction, and oesophageal adenocarcinoma (CheckMate 649): a randomized, open label, phase 3 trial. *Lancet* 2021; 398: 27-40.
32. Sun J, Shen L, Shah M i wsp. Pembrolizumab plus chemotherapy versus chemotherapy alone for first-line treatment of advanced oesophageal cancer (KEYNOTE-590): a randomized, placebo-controlled, phase 3 study. *Lancet* 2021; 398: 759-771.
33. Doki Y, Ajani J, Kato K i wsp. Nivolumab combination therapy in advanced esophageal squamous-cell carcinoma. *N Engl J Med* 2022; 386: 449-462.
34. Kato K, Cho B, Takahashi M i wsp. Nivolumab versus chemotherapy in patients with advanced oesophageal squamous cell carcinoma refractory or intolerant to previous chemotherapy (ATTRACTION-3): a multicentre, randomized, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2019; 20: 1506-1517.
35. Program Lekowy B6. Dostępne na: www.gov.pl (dostęp z dnia: 15 października 2023).
36. Haanen J, Obeid M, Spain L i wsp. Management of toxicities from immunotherapy: ESMO clinical practice guideline for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2022; 33: 1217-1238.

OCENA EKSPRESJI BIAŁKA PD-L1 W KWALIFIKACJI DO LECZENIA CHORYCH Z NIEDROBNOKOMÓRKOWYM RAKIEM PŁUCA

RENATA LANGFORT, MAŁGORZATA SZOŁKOWSKA

Zakład Patomorfologii, Instytut Gruźlicy i Chorób Płuc, Warszawa

Algorytm diagnostyki patomorfologicznej w pierwotnym raku płuca

W ciągu ostatnich lat diagnostyczny algorytm postępowania w grupie chorych z rakiem płuca zmienił się w istotny sposób. Kluczowymi kryteriami nadal pozostają określenie typu morfologicznego raka (rak drobnokomórkowy *vs* niedrobnokomórkowy) i stopień zaawansowania choroby.

Rak drobnokomórkowy (*small cell lung carcinoma* – SCLC), będący nowotworem o agresywnym przebiegu i złym rokowaniu, w momencie rozpoznania jest zwykle uogólnionym procesem, który wymaga leczenia systemowego [1–3]. Postępowanie w rakach niedrobnokomórkowych (*non-small cell lung carcinoma* – NSCLC) zależy przede wszystkim od stopnia zaawansowania choroby, ale uwzględnia również podtyp histologiczny [3–5].

Rak niedrobnokomórkowy płuca – postać operacyjna

Najskuteczniejszą metodą leczenia NSCLC nadal pozostaje zabieg chirurgiczny, jednak możliwość ta dotyczy małej grupy chorych, tj. ok. 15–20% [3–5]. W przypadkach, w których rozległość procesu nowotworowego wskazuje na możliwość leczenia chirurgicznego (stopień zaawansowania I, II, IIIA wg 8. edycji TNM zaaprobowanej przez UICC/AJCC), przed operacją zwykle wystarczające jest rozpoznanie „raka niedrobnokomórkowy”, a postać morfologiczną NSCLC określa się na podstawie materiału operacyjnego guza na podstawie kryteriów określonych w aktualnej 5. edycji klasyfikacji WHO guzów klatki piersiowej (2021) [6–8].

Zgodnie z obecnie obowiązującym programem leczenia NSCLC i międzybłoniaka opłucnej (B.6) u pacjentów w stopniu zaawansowania choroby IB–III, po radykalnym zabiegu chirurgicznym (R0) i limfadenektomii obejmującej trzy stacje węzłów chłonnych

z pozycji N1 (wewnątrzplucne i okolice wnęki) oraz trzy stacje węzłów śródpiersia z pozycji N2 z uwzględnieniem grupy 7, z pierwotnym gruczolakorakiem płuca lub NSCLC z przewagą utkania raka gruczołowego (> 50%) należy wykonać badania molekularne w kierunku oznaczenia występowania mutacji aktywującej w genie *EGFR* z delecją w eksonie 19 lub substytucją w eksonie 21 [9].

Z kolei w grupie radykalnie zoperowanych pacjentów w stopniu zaawansowania II–IIIA i IIIB (pT3N2) z NSCLC wskazane jest wykonanie predykcyjnego testu immunohistochemicznego oceniającego ekspresję białka PD-L1 w komórkach raka. Dodatkowo u pacjentów z rakiem innym niż płaskonabłonkowy konieczne jest wykonanie badań molekularnych w kierunku mutacji aktywującej w genie *EGFR*, rearanżacji w genach *ALK* i *ROS1* [9].

Najprawdopodobniej w niedługim czasie algorytm ten ulegnie modyfikacji w związku z planowanym wprowadzeniem leczenia przedoperacyjnego inhibitorami punktów kontroli immunologicznej. Terapia neoadjuwantowa będzie wiązała się z koniecznością określenia podtypu morfologicznego NSCLC i prawdopodobnie również ekspresji białka PD-L1 w grupie chorych w stadium operacyjnym choroby.

Rak niedrobnokomórkowy płuca – postać zaawansowana

Algorytm postępowania w grupie chorych z NSCLC w stadium uniemożliwiającym przeprowadzenie zabiegu chirurgicznego (zwykle IIIB, IV), w dobrym stanie klinicznym wymaga ustalenia podtypu NSCLC, tj. określenia, czy rak wykazuje różnicowanie gruczołowe czy płaskonabłonkowe.

Raki niedrobnokomórkowe, w których nie można sprecyzować podtypu ani na podstawie kryteriów morfologicznych widocznych w badaniu mikroskopowym, ani za pomocą badań dodatkowych, histo-

chemicznych na obecność śluzu śródcytoplazmatycznego i immunohistochemicznych wykorzystujących dwa najbardziej swoiste i czułe markery: TTF-1 i p40, których ekspresja wskazuje odpowiednio na różnicowanie gruczolowe i płaskonabłonkowe raka, są nazywane rakami niedrobnokomórkowymi bliżej nieokreślonymi – BNO (*not otherwise specified* – NOS) [8, 10–12]. Odsetek rozpoznań „raka niedrobnokomórkowego – NOS” powinien mieścić się w granicach 5–10% [4, 5, 13] wszystkich rozpoznań NDRP.

Określenie postaci morfologicznej NSCLC wynika z konieczności wykonania badań predykcyjnych, których wyniki pozwolą na dobór najbardziej skutecznej terapii dla odpowiedniej grupy chorych.

Rekomendowane obecnie w polskim programie lekowym B.6 (*Leczenie chorych na raka płuca oraz międzybłoniaka płucnej*) minimum testów molekularnych, które powinny być wykonywane u wszystkich chorych z zaawansowanym rakiem niepłaskonabłonkowym płuca, obejmuje ocenę mutacji w genie *EGFR*, rearanżacji w genach *ALK* i *ROS1* oraz dodatkowo w raku gruczolowym – mutacji G12C w genie *KRAS* [9].

W związku z pojawiającą się coraz większą liczbą wykrywanych nieprawidłowości molekularnych występujących w NSCLC i możliwością ich leczenia coraz powszechniej wykorzystywana jest metoda sekwencjonowania następnej generacji (*next generation sequencing* – NGS).

Dodatkowo u wszystkich chorych z rozpoznaniem zaawansowanym NSCLC wskazane jest wykonanie predykcyjnego testu immunohistochemicznego w kierunku ekspresji białka PD-L1. Ocena ekspresji białka PD-L1 wynika z możliwości leczenia chorych z NSCLC lekami blokującymi punkty kontroli immunologicznej.

Ocena immunohistochemiczna (IHC) ekspresji białka PD-L1

Najlepiej zbadaną metodą oceny czynnika predykcyjnego kwalifikującego do leczenia inhibitorami punktów kontroli immunologicznej (IPKI) jest ocena immunohistochemiczna ekspresji białka PD-L1 na komórkach raka.

Wysokość ekspresji białka PD-L1 pomaga jedynie przewidzieć prawdopodobieństwo odpowiedzi na leczenie IPKI. Korzyść z leczenia odnoszą najczęściej chorzy z wysoką ekspresją PD-L1 ($\geq 50\%$), ale również może dotyczyć pacjentów bez potwierdzonej ekspresji PD-L1. Z kolei wysoka ekspresja PD-L1 nie gwarantuje dobrej odpowiedzi na terapię IPKI we wszystkich przypadkach [13, 15–17]. Wytlumaczeniem tego zjawiska jest przede wszystkim heterogenność nowotworu oraz wielkość i liczba wycinków pobieranych w celu ustalenia rozpoznania mikroskopowego [15, 17–19].

Ponad 70% chorych z rakiem płuca w momencie rozpoczęcia diagnostyki znajduje się w zaawansowanym stadium choroby. U tych chorych materiałem dostępnym do testu anty-PD-L1 jest najczęściej materiał oligobiopsyjny zawierający niewielkie fragmenty tkankowe pobrane w trakcie bronchofiberoskopii lub biopsji transtorakalnej, a w ok. 30–40% przypadków jest to materiał cytologiczny (cytobloczki) uzyskany w czasie nakłucia przez ścianę oskrzela (*endobronchial ultrasonography-transbronchial needle aspiration* – EBUS-TBNA), przelyku (*endoscopic ultrasonography-fine needle aspiration* – EUS-FNA) albo przez ścianę klatki piersiowej (*transthoracic needle aspiration* – TTNA) [20, 21].

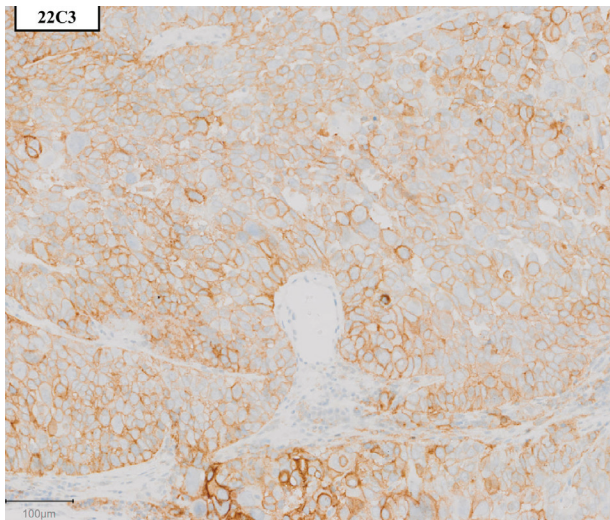
Mały wycinek pobrany do badania mikroskopowego stanowi ok. 0,001% objętości guza o średnicy 5 cm, w związku z tym stwierdzana w nim ekspresja PD-L1 nie zawsze jest reprezentatywna dla całej zmiany nowotworowej [22].

Czynniki wpływające na jakość oceny ekspresji białka PD-L1

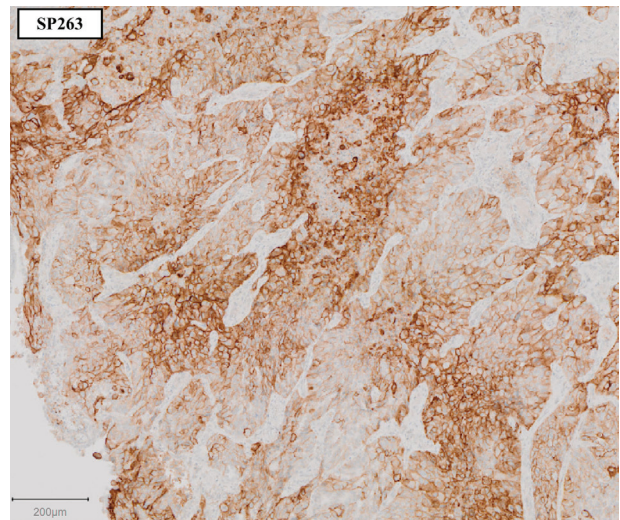
Zwalidowanym materiałem odpowiednim do oceny ekspresji białka PD-L1 w raku płuca jest materiał tkankowy lub materiał cytologiczny zabezpieczony w postaci cytobloczków.

Jakość i czułość badania oraz wiarygodność predykcyjnego testu immunohistochemicznego w dużym stopniu zależą od odpowiedniego przygotowania i przeprowadzenia materiału. Przede wszystkim istotne jest odpowiednie zabezpieczenie materiału przez klinicystę pobierającego materiał, przestrzeganie warunków transportu, temperatury i czasu utrwalania. Czas utrwalania nie powinien być krótszy niż 6 godzin i dłuższy niż 48 godzin dla małych wycinków oraz 72 godziny dla większego materiału [16, 23–25]. Duży materiał pooperacyjny wymaga wstępnego opracowania zgodnie z zaleceniami Polskiego Towarzystwa Patologów [26]. Materiał powinien trafić do jednostki diagnostyki patomorfologicznej przed upływem maksymalnego czasu utrwalania, najlepiej w ciągu 24 godzin.

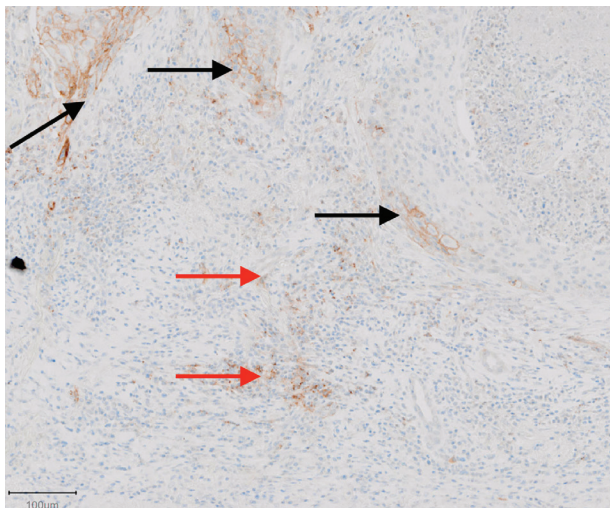
Znaczenie ma także czas upływający od pobrania materiału do jego utrwalenia (tzw. *cold ischemia*), który powinien być jak najkrótszy (najkorzystniej poniżej 30 minut, nie dłuższy niż 60 minut), oraz rodzaj i objętość utrwalacza. Zwalidowanym i powszechnie stosowanym utrwalaczem wykorzystywanym w diagnostyce patomorfologicznej do oceny czynników predykcyjnych jest 10% roztwór zbuforowanej formaliny o obojętnym pH (7,2–7,4). Przyjętą zasadą jest 10-krotnie większa objętość środka utrwalającego w stosunku do utrwalanego materiału. Ekspresję białka PD-L1 każdorazowo należy wykonywać



Rycina 1. Ocena ekspresji białka PD-L1, klon 22C3. Materiał operacyjny. Rak niedrobnokomórkowy (gruczołowy, lity) płuca z widoczną reakcją błonową w komórkach raka (TPS = 100%)



Rycina 2. Ocena ekspresji białka PD-L1, klon SP263. Materiał operacyjny. Rak niedrobnokomórkowy (gruczołowy, lity) z widoczną reakcją błonową, ogniskowo z podbarwieniem cytoplazmy w 100% komórek raka (TS = 100%)



Rycina 3. Widoczna reakcja błonowa w komórkach raka niedrobnokomórkowego (klon SP263) – czarne strzałki, oraz w komponentach zapalnych – czerwone strzałki

z kontrolą dodatnią i ujemną, co pozwala na ocenę wiarygodności zachodzącej reakcji [16, 23–25].

Istotne jest także przestrzeżenie warunków przechowywania bloczków parafinowych, które są określone w programie akredytacji jednostek diagnostyki patomorfologicznej [27].

Wykonanie predykcyjnego testu IHC jest możliwe na skrawkach uzyskanych z archiwalnego materiału z bloczków parafinowych. Znaczenie dla jakości i wiarygodności testu ma jednak czas ich przechowywania. Przyjmuje się, że optymalny jest materiał nie starszy niż 3-letni, chociaż akceptowalne są również starsze bloczki parafinowe, jednak maksymalnie do 5 lat [16, 24].

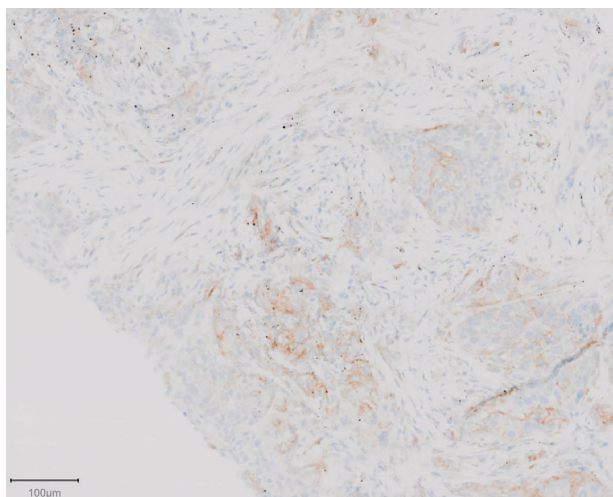
Nieprzestrzeżenie zasad utrwalania i przeprowadzania materiału przeznaczonego do oceny ekspresji

białka PD-L1 powoduje zmiany w budowie antygeny, co w konsekwencji uniemożliwia jego rozpoznanie przez swoiste przeciwciało, negatywnie wpływa na wynik badania immunohistochemicznego i może być przyczyną wyników fałszywie dodatnich lub ujemnych.

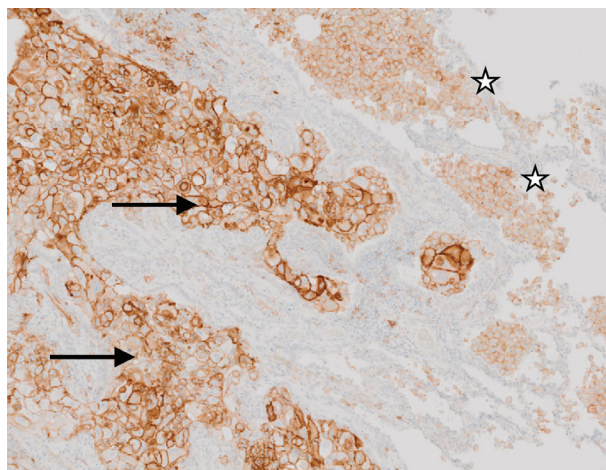
Ocena mikroskopowa ekspresji białka PD-L1

Do oceny immunohistochemicznej ekspresji białka PD-L1 są wykorzystywane głównie klony przeciwciał 22C3 (Agilent Technologies/Dako), SP263 (Ventana) oraz 28-8 (Agilent Technologies/Dako). W teście ocenia się odsetek komórek nowotworowych wykazujących dodatnią reakcję w odniesieniu do całkowitej liczby komórek raka w materiale (*tumor proportion score* – TPS, *tumor score* – TS). Dodatnią reakcją jest reakcja błonowa (w przypadku klonów 22C3, 28-8) (rycina 1) lub błonowa z możliwością podbarwienia cytoplazmy (klon SP263) (rycina 2), o każdej intensywności, ciągła lub nieciągła. Reakcja wyłącznie cytoplazmatyczna nie jest uznawana za pozytywną. Minimalna liczba komórek nowotworowych w materiale zakwalifikowanym do testu powinna wynosić ≥ 100 [16, 17, 20, 24, 25].

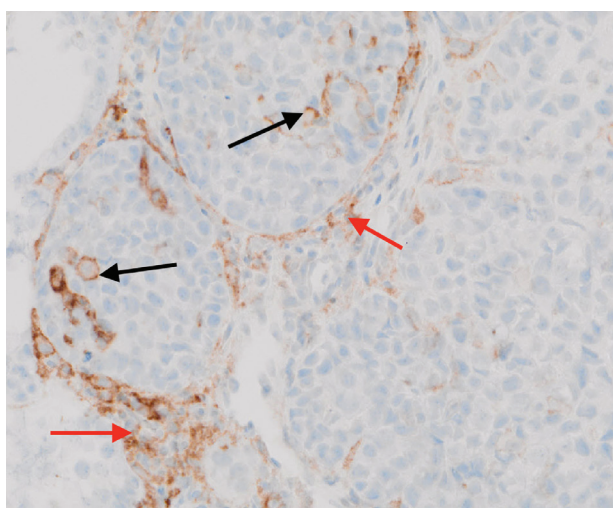
Ocena reakcji IHC w preparatach mikroskopowych może stwarzać trudności, które często wynikają z wielkości i jakości materiału, morfologii zmian, jak również doświadczenia patomorfologa. Odróżnienie prawdziwie dodatniej reakcji IHC od fałszywej bywa trudne, zwłaszcza w wycinkach zawierających artefakty związane m.in. z pobraniem materiału (mechaniczne zgniecenie nacieku nowotworowego), obecnością rozległej martwicy i nacieków zapalnych (rycina 3). Jest również trudniejsze w preparatach, które zawierają niewielki odsetek diagnostycznych komórek



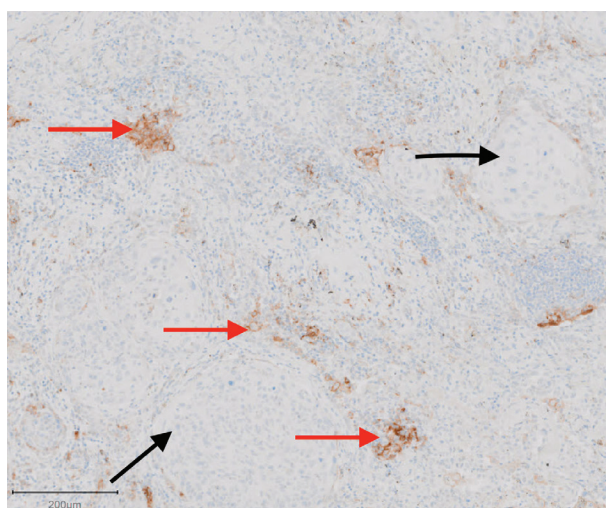
Rycina 4. Biopsja gruboigłowa przez ścianę klatki piersiowej. Widoczna słaba, błonowa ekspresja białka PD-L1 (klon SP263) w komórkach raka



Rycina 5. Widoczna silna ekspresja błonowa w komórkach raka (klon 22C3) – czarne strzałki, oraz reakcja błonowa w błonie komórkowej makrofagów wypełniających otaczające pęcherzyki płucne – białe gwiazdki



Rycina 6. Widoczna ekspresja białka PD-L1 w komórkach zapalnych otaczających naciek raka (klon 22C3) – czerwone strzałki, oraz reakcja błonowa w nielicznych komórkach raka – czarne strzałki



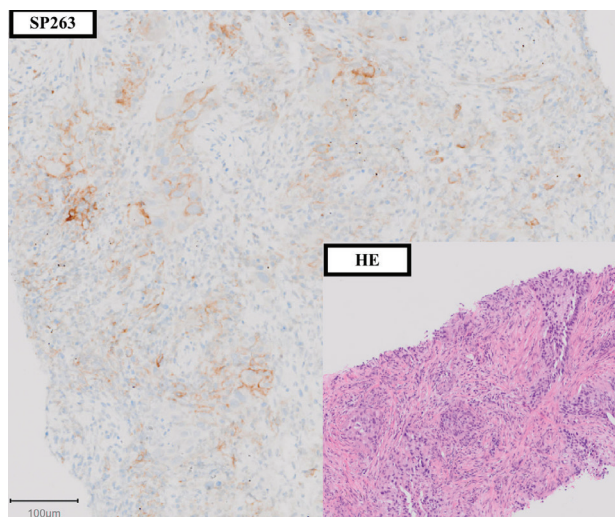
Rycina 7. Widoczna ekspresja białka PD-L1 w komórkach zapalnych towarzyszących naciekowi nowotworowemu – czerwone strzałki, brak ekspresji w komórkach raka – czarne strzałki

nowotworowych oraz gdy reakcja nie jest bardzo intensywna (rycina 4) [16, 17, 24, 25].

Dodatnią reakcję błonową wykazują też makrofagi płucne i komórki zapalne, co może być przyczyną błędnych rozpoznań (ryciny 5–7). Obecność reakcji fałszywie dodatniej stwierdza się również w obszarach martwicy i gromadzenia się śluzu, a także w obumarłych komórkach nowotworowych (zwykle tylko w postaci zabarwienia cytoplazmy). W związku z tym ocena ekspresji białka PD-L1 powinna odbywać się w porównaniu z odpowiednim preparatem barwionym hematoksylina-eozyną (HE) (rycina 8) [16, 24].

W rozpoznaniu patomorfologicznym wskazane jest umieszczenie numeru wybranego bloczka parafinowego, z którego został wykonany test, podanie nazwy wykorzystanego klonu przeciwciała, zastosowanych

kryteriów oceny (ze względu na odmienne punkty odjęcia w kwalifikacji do leczenia różnymi preparatami), najlepiej z podaniem procentu komórek nowotworowych wykazujących ekspresję białka PD-L1 (TPS, TS), oraz informacji, czy test był testem laboratoryjnym, opracowanym i zwalidowanym wyłącznie w pracowni, w której był wykonywany (*laboratory developed test* – LDT), czy też był testem towarzyszącym (*companion diagnostic test* – CDx) bądź uzupełniającym (*complementary diagnostic test*) [17, 20, 24, 25]. Zastąpienie testu towarzyszącego czy uzupełniającego, na podstawie którego pacjenci są kwalifikowani do leczenia IPKI, testem laboratoryjnym wymaga przeprowadzenia wewnętrznej standaryzacji i walidacji metody. Zgodnie z zapisem umieszczonym w programie leczenia raka płuca i międzybłoniaka opłucnej



Rycina 8. Biopsja gruboigłowa raka płuca z widoczną słabą ekspresją białka PD-L1 (klon SP263), z wycinkiem barwionym HE

wymagany jest systematyczny udział jednostek przeprowadzających predykcyjne testy immunohistochemiczne oceniające ekspresję białka PD-L1 w programach kontroli jakości w celu uzyskania certyfikatu dla testu wykorzystywanego w pracowni [9].

Podsumowanie

Diagnostyka raka płuca odbywa się zwykle na podstawie unikatowego materiału oligobiopsyjnego lub cytologicznego, co wymaga niezwykle racjonalnego sposobu postępowania, zmierzającego nie tylko do ustalenia rozpoznania, lecz także wykonania badań predykcyjnych. Ze względu na unikatowość materiału i zwiększającą się liczbę wymaganych do oceny biomarkerów najkorzystniej jest wykonać ocenę immunohistochemiczną ekspresji białka PD-L1 w momencie ustalania rozpoznania patomorfologicznego.

Piśmiennictwo

- Nicholson AG, Chansky K, Crowley J i wsp. The International Association for the Study of Lung Cancer staging project: proposals for the revision of the clinical and pathologic staging of small cell lung cancer in the forthcoming eight edition of the TNM Classification for Lung Cancer. *J Thorac Oncol* 2016; 11: 300-311.
- Dingemans AMC, Früh M, Ardizzoni A i wsp. Small-cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2021; 32: 839-853.
- Krzakowski M, Jassem J, Antczak A i wsp. Nowotwory klatki piersiowej. Wytyczne postępowania diagnostyczno-terapeutycznego. *Onkol w Praktyce Klin* 2022; 18. DOI: 10.5603/OCP.2021.0022.
- Planchard D, Popat S, Kerr K i wsp. Metastatic non-small cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guideline for diagnosis, treatment and follow-up. Updated version published 15 September 2020 by the ESMO Guidelines Committee. *Ann Oncol* 2021; 29 (Suppl 4): iv192-iv237.
- Hendriks LE, Kerr KM, Menis J i wsp. Oncogene-addicted metastatic non-small-cell Practice Guideline for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2023; 339-358.

- Goldstraw P, Chansky K, Crowley J i wsp. The IASLC Lung Cancer Staging Project: Proposals for Revision of the TNM Stage Groupings in the Forthcoming (Eight) Edition of the TNM Classification for Lung Cancer. *J Thorac Oncol* 2016; 11: 39-51.
- Rami-Porta R: Staging Manual in Thoracic Oncology. 2nd ed. IASLC, North Fort Myers, FL 2016.
- WHO Classification of Tumours Editorial Board. Thoracic tumours. W: WHO classification of tumours series. Wyd. 5. Vol. 5. International Agency for Research on Cancer, Lyon 2021.
- Program Lekowy B6. Dostępne na: www.gov.pl (dostęp: 15 października 2023).
- Travis WD, Brambilla E, Noguchi M i wsp. Diagnosis of lung cancer in small biopsies and cytology: implications of the 2011 International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society classification. *Arch Pathol Lab Med* 2013; 137: 668-684.
- Dietel M, Bubendorf L, Dingemans AM i wsp. Diagnostic procedures for non-small-cell lung cancer (NSCLC): recommendations of the European Expert Group. *Thorax* 2016; 71: 177-184.
- Yatabe Y, Dacic S, Borczuk A i wsp. Best practices recommendations for diagnostic immunohistochemistry in lung cancer. *J Thorac Oncol* 2018; 14: 377-407.
- Loo PS, Thomas SC, Nicolson MC i wsp. Subtyping of undifferentiated non-small cell carcinoma in bronchial biopsy specimens. *J Thorac Oncol* 2010; 5: 442-447.
- Peters S, Kerr K, Stahel R. PD-1 blockade in advanced NSCLC: a focus on pembrolizumab. *Cancer Treat Rev* 2018; 6: 39-49.
- Thunnissen E, de Langen AJ, Smit EF. PD-L1 IHC in NSCLC with a global and methodological perspective. *Lung Cancer* 2017; 113: 102-105.
- Lantuejoul S, Tsao MS, Cooper WA i wsp. PD-L1 Testing for lung cancer in 2019: perspective from the IASLC Pathology Committee. *J Thorac Oncol* 2019; 15: 499-519.
- Hendry S, Byrne DJ, Wright GN i wsp. Comparison of four PD-L1 immunohistochemical assays in lung cancer. *J Thorac Oncol* 2018; 13: 367-376.
- Ilie M, Hofman P. Reproducibility of PD-L1 assessment in non-small cell lung cancer – know your limits but never stop trying to exceed them. *Clin Cancer Res* 2017; 23: 4569-4577.
- Hwang DM, Alqaer T, Santiago RC i wsp. Prevalence and heterogeneity of PD-L1 expression by 22C3 assay in routine population-based and reflexive clinical testing in lung cancer. *J Thorac Oncol* 2021; 16: 1490-1500.
- Bubendorf L. Can we use cytology specimens? *J Thorac Oncol* 2018; 13 (Suppl): S1-S149.
- Li B, Zhao V. Prof. Lukas Bubendorf: the pros and cons of using cytology specimens in molecular testing. *Transl Lung Cancer Res* 2018; 7 (Suppl 1): S62-S63. DOI: 10.21037/tlcr.2017.12.03.
- Ilie M, Hofman V, Dietel M i wsp. Assessment of the PD-L1 status by immunohistochemistry: challenges and perspectives for therapeutic strategies in lung cancer patients. *Virchows Arch* 2016; 468: 511-525.
- Gagné A, Wang E, Bastien N i wsp. Impact of specimen characteristics on PD-L1 testing in non-small cell lung cancer: validation of the IASLC PD-L1 testing recommendations. *J Thorac Oncol* 2019; 14: 2062-2070.
- Tsao MS, Kerr KM, Dacic S i wsp. IASLC Atlas of PD-L1 Immunohistochemistry Testing in Lung Cancer. IASLC, Editorial Rx Press, North Fort Myers, FL 2017.
- Beasley MB, Bubendorf L, Jain D. Specimen Acquisition and Pre-Analytical Considerations. W: Sholl LM, Cooper WA, Kerr KM i wsp. (red.). IASLC Atlas of Molecular Testing for Targeted Therapy in Lung Cancer. IASLC, Denver, Colorado 80202, USA 2023, 29-36.
- Patomorfologia: standardy I przykłady dobrej praktyki oraz elementy diagnostyki różnicowej. Standardy organizacyjne oraz standardy postępowania w patomorfologii. Wytyczne dla zakładów/pracowni patomorfologii. 2020.
- Podręcznik wdrożeniowy Jednostki Diagnostyki Patomorfologicznej. Wskazówki i zalecenia. CMJ, Kraków 2022.

ZASADY OCENY EKSPRESJI PD-L1 W RAKU TRÓJUEMNYM PIERSI

JĘDRZEJ BOROWCZAK, ŁUKASZ SZYLBERG

Zakład Patologii Nowotworów i Patomorfologii, Centrum Onkologii im. prof. Franciszka Łukaszczyka w Bydgoszczy

Krajobraz po IMpassion 131

W ostatnich latach doszło do znaczących zmian w leczeniu systemowym raka piersi, których podstawę stanowiły wyniki badań IMpassion 131 i KEYNOTE-355. Badanie IMpassion 131 nie potwierdziło, by połączenie atezolizumabu z nab-paklitakselem wydłużało czas wolny od progresji u pacjentów z nieresekcyjnym, miejscowo zaawansowanym lub przerzutowym, potrójnie ujemnym rakiem piersi (*triple-negative breast cancer* – TNBC) w porównaniu z monoterapią paklitakselem. Efektem wyników badań było wycofanie zastosowania atezolizumabu w tym wskazaniu oraz cofnięcie rekomendacji amerykańskiego Urzędu ds. Żywności i Leków (*Food and Drug Administration* – FDA) [1–3]. *European Society of Medical Oncology* i *National Comprehensive Cancer Network* nadal zalecają zastosowanie atezolizumabu w celu leczenia pacjentów z nieoperacyjnym, miejscowo zaawansowanym lub przerzutowym TNBC z ekspresją PD-L1 na komórkach zapalnych naciekających guz, którzy nie otrzymywali wcześniej chemioterapii [4–6]. W Polsce wyniki badania IMpassion 131 zostały uwzględnione przez Agencję Oceny Technologii Medycznych i Taryfikacji, która uznała objęcie atezolizumabu refundacją za nieuzasadnione [7]. Z tego powodu preferowanym schematem lekowym przewidzianym dla pacjentów z przerzutowym lub miejscowo zaawansowanym TNBC pozostaje pembrolizumab w połączeniu z chemioterapią [8].

Powyższe doniesienia zostały ujęte w programie lekowym B.9.FM, uwzględnionym na liście refundacyjnej opublikowanej przez Ministerstwo Zdrowia 30 sierpnia 2023 roku [9].

Pembrolizumab może zostać zastosowany w pierwszej linii leczenia przerzutowego TNBC z ekspresją PD-L1 w skojarzeniu z paklitakselem albo z gemcytabiną i karboplatyną. Ponadto program lekowy obejmuje także przedoperacyjne podanie pembrolizumabu w skojarzeniu z chemioterapią oraz kontynuację leczenia pembrolizumabem po resekcji miejscowo zaawan-

sowanego lub wczesnego TNBC z dużym ryzykiem nawrotu. Biorąc pod uwagę możliwość jednokrotnego zastosowania pembrolizumabu w programie lekowym oraz ryzyko potencjalnie ciężkich skutków ubocznych terapii, kwalifikacja pacjentów musi być poprzedzona dokładną oceną ekspresji PD-L1.

Zasady oceny ekspresji PD-L1 w TNBC

Dobór testu

Na rynku dostępne są cztery zatwierdzone przez FDA protokoły służące do oceny ekspresji PD-L1 oraz liczne testy immunohistochemiczne różniące się powinowactwem przeciwciał do materiału nowotworowego. Klon PD-L1 22C3 oparty na mysich przeciwciałach monoklonalnych anty-PD-L1 jest jedynym testem zatwierdzonym przez FDA do oceny ekspresji PD-L1 w TNBC przed rozpoczęciem terapii pembrolizumabem [10]. Niemniej jednak literatura bogata jest w doniesienia dotyczące zgodności pomiędzy poszczególnymi testami. Badania sugerują, że klon SP142 wykrywa mniej guzów PD-L1-pozytywnych niż pozostałe klony i jego zastosowanie może być przyczyną wystąpienia wyników fałszywie ujemnych. Przeciwnie, zastosowanie klonu SP263 może prowadzić do uzyskania wyższego odsetka guzów PD-L1-pozytywnych niż przy użyciu innych testów. Obecny stan wiedzy nie pozwala jednoznacznie stwierdzić, czy wynika to z wyższej czułości klonu SP263 oraz czy zwiększona rozpoznawalność guzów wykazujących ekspresję PD-L1 koreluje z odpowiedzią kliniczną na leczenie [11–13].

Aktualny program lekowy B.9.FM umożliwia zastosowanie pembrolizumabu w leczeniu pacjentów z TNBC po wykazaniu ekspresji PD-L1 CPS ≥ 10 za pomocą zvalidowanego testu. Zważywszy, że PD-L1 IHC 22C3 jest jedynym testem rekomendowanym przez FDA do oceny ekspresji PD-L1 w TNBC, w dalszej części artykułu uwzględniono jedynie wskazówki praktyczne dotyczące prawidłowej oceny PD-L1 z użyciem tego klonu.

Obliczanie CPS

Ekspresja PD-L1 w TNBC oceniana jest za pomocą systemu *Combined Positive Score* (CPS), definiowanego jako iloraz liczby komórek wykazujących ekspresję PD-L1 (komórki raka inwazyjnego, limfocyty i makrofagi) przez wszystkie żywe komórki raka inwazyjnego oraz całość pomnożona przez 100 (rycina 1). Według ustalonych rekomendacji, TNBC jest PD-L1-ujemny, gdy CPS wynosi < 10 ($CPS < 10$), natomiast gdy $CPS \geq 10$, to TNBC jest PD-L1-dodatni ($CPS \geq 10$). Maksymalny możliwy do uzyskania CPS wynosi 100. W przypadku przekroczenia tej wartości w wyniku obliczeń, wynik zaokrąglamy do 100. Wynik CPS jest zawsze liczbą całkowitą, dlatego w zapisie unikamy wartości procentowych oraz ułamków.

Ocena PD-L1 i kalkulacja CPS powinna zostać przeprowadzona pod 20-krotnym powiększeniem obiektu. Jeżeli komórki nowotworowe mają ok. 20 μm średnicy, to pod 20-krotnym powiększeniem będziemy widzieli w całym polu widzenia ok. 2500 komórek nowotworowych. Dokładne ustalenie wartości CPS wymaga oceny całego preparatu, ponieważ rozkład ekspresji w obrębie guza jest często niejednorodny. W celu obliczenia CPS w pierwszej kolejności należy określić całkowitą liczbę komórek raka inwazyjnego (mianownik CPS), a następnie liczbę komórek raka inwazyjnego, limfocytów i makrofagów, które wyka-

zują ekspresję PD-L1 (licznik CPS). Do oceny CPS można wykorzystać następujące metody:

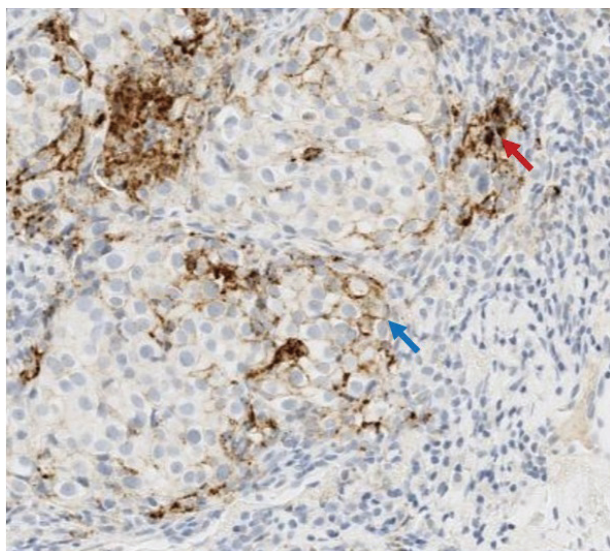
- jeżeli guz cechuje się nierównomierną ekspresją PD-L1, to cały jego obszar należy podzielić na segmenty o identycznej liczbie komórek nowotworowych – CPS dla każdego segmentu obliczany jest oddzielnie, a ekspresja w obrębie całego guza jest sumą CPS wszystkich segmentów podzieloną przez ich liczbę,
- jeżeli jedynie niewielki obszar guza wykazuje ekspresję PD-L1, należy w pierwszej kolejności ocenić, jaki procent całego guza stanowi obszar z ekspresją PD-L1, a następnie należy obliczyć CPS tylko dla tego obszaru, natomiast otrzymany wynik pomnożyć przez wcześniej wyliczony procent powierzchni guza.

Kryteria włączenia i wyłączenia komórek do oceny CPS w TNBC

Aby preparat nadawał się do oceny, musi zawierać przynajmniej 100 żywych komórek raka inwazyjnego. W przeciwnym wypadku należy spróbować powtórzyć ocenę po głębszym skrojeniu materiału lub wybrać inny bloczek parafinowy, jeżeli jest dostępny. Ekspresja PD-L1 w zależności od komórki może być widoczna w formie reakcji błonowej lub cytoplazmatycznej (rycina 2).

$$CPS = \frac{\text{Liczba komórek raka inwazyjnego, limfocytów i makrofagów z ekspresją PD-L1}}{\text{Całkowita liczba żywych komórek raka inwazyjnego}} \times 100$$

Rycina 1. Wzór CPS do oceny PD-L1 w raku trójjemnym piersi



Rycina 2. Ekspresja PD-L1 w TNBC. Strzałką czerwoną zaznaczono ziarnistą, cytoplazmatyczną ekspresję w komórkach zapalnych. Strzałką niebieską zaznaczono błonową ekspresję w komórkach raka inwazyjnego

W przypadku komórek raka inwazyjnego będzie widoczna głównie ekspresja błonowa. Część komórek raka może wykazywać reakcję cytoplazmatyczną, ale do obliczeń CPS włączamy tylko komórki z ekspresją błonową lub błonową i cytoplazmatyczną. Komórki nowotworowe wykazujące wyłącznie zabarwienie cytoplazmy nie są wliczane do kalkulacji CPS. Należy zwrócić uwagę, że reakcja błonowa może być przerywana oraz o dowolnej intensywności.

W przypadku komórek zapalnych wymaganych w liczniku CPS uwzględniamy tylko liczbę limfocytów i makrofagów z obecnością ekspresji PD-L1. Ponadto w obliczeniach uwzględniamy tylko komórki zapalne, które są w obrębie raka lub w jego bezpośrednim sąsiedztwie. Należy uwzględnić jedynie jednojądrzaste komórki zapalne widoczne w tym samym polu widzenia co guz pod 20-krotnym powiększeniem (zazwyczaj do 0,5 mm od komórek nowotworowych). Limfocyty będą wykazywały zwykle ekspresję cytoplazmatyczną, ziarnistą, o różnej intensywności. Z kolei makrofagi będą charakteryzowały się ekspresją

blonową. Na potrzeby kalkulacji CPS makrofagi i histocyty uznawane są za te same komórki, a każda wielojądrzasta komórka zapalna – za pojedynczą komórkę i jest także uwzględniana w liczniku CPS.

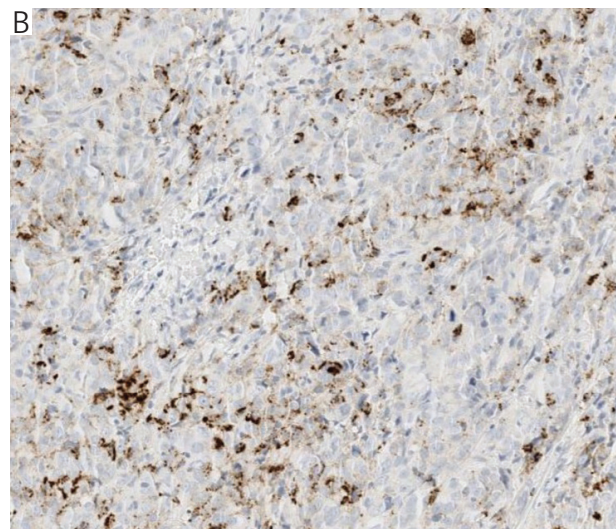
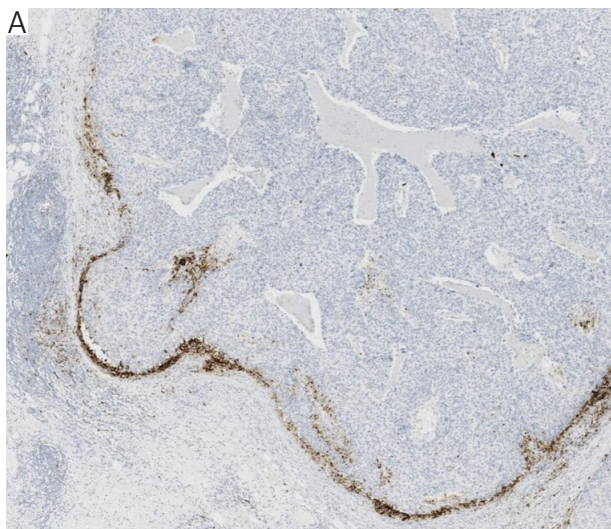
Należy podkreślić, że w liczniku i mianowniku CPS nie uwzględnia się komórek raka przewodowego i zrazikowego *in situ* (DCIS oraz LCIS). Ponadto, łagodne komórki nabłonkowe, neutrofile, eozynofile i komórki

plazmatyczne również nie są uwzględniane przy ocenie CPS. Wszystkie kryteria włączenia i wyłączenia w celu obliczenia CPS zestawiono w tabeli 1.

Jak już wcześniej wspomniano, duża heterogenność TNBC sprawia, że w obrębie guza mogą występować obszary o różnej ekspresji i wzorach rozkładu PD-L1 [14]. Ekspresja PD-L1 w guzie może być równomiernie rozłożona (ekspresja „rozproszona”) lub występować jedy-

Tabela 1. Kryteria włączenia i wyłączenia do oceny CPS

KOMÓRKI UWZGLĘDNIANE W MIANOWNIKU CPS	KOMÓRKI WYKLUCZONE W MIANOWNIKU CPS
wszystkie żywe komórki raka inwazyjnego	martwica
	komórki raka przewodowego i zrazikowego <i>in situ</i> (DCIS i LCIS)
	wszystkie komórki zapalne
	łagodne komórki nabłonkowe
	komórki zrębu, w tym fibroblasty
KOMÓRKI UWZGLĘDNIANE W LICZNIKU CPS	KOMÓRKI WYKLUCZONE W LICZNIKU CPS
wszystkie żywe komórki raka inwazyjnego wykazujące częściowe lub całkowite, linijne zabarwienie błony komórkowej o dowolnej intensywności	wszystkie komórki raka inwazyjnego oraz zapalne bez widocznej ekspresji
<u>jednojądrzaste komórki zapalne (limfocyty i makrofagi)</u> w obrębie raka lub w jego bezpośrednim sąsiedztwie wykazujące zabarwienie błony komórkowej lub cytoplazmy o dowolnej intensywności	komórki raka inwazyjnego wykazujące wyłącznie wybarwienie cytoplazmatyczne
	komórki raka przewodowego i zrazikowego <i>in situ</i> (DCIS i LCIS)
	komórki zapalne związane z rakiem przewodowym lub zrazikowym <i>in situ</i>
	komórki zapalne związane ze zmianami niezłośliwymi
	komórki zapalne niezwiązane bezpośrednio z rakiem
	neutrofile, eozynofile i komórki plazmatyczne
	łagodne komórki nabłonkowe
	komórki zrębu, w tym fibroblasty
	martwica



Rycina 3. Na mikrofotografii A widoczna „ogniskowa” ekspresja PD-L1 w TNBC. Na mikrofotografii B widoczna „rozproszona” ekspresja PD-L1 w TNBC

nie w jego części (ekspresja „zagregowana” lub „ogniskowa”) (rycina 3). Z tego powodu istnieje ryzyko, że ocena materiału tkankowego pobranego drogą biopsji gruboigłowej w przypadku guzów wykazujących ogniskową ekspresję PD-L1 będzie fałszywie ujemna. Statystycznie ok. 50% TNBC powinno wykazywać ekspresję PD-L1 [15, 16].

Piśmiennictwo

- Schmid P, Adams S, Rugo HS i wsp. Atezolizumab and nab-paclitaxel in advanced triple-negative breast cancer. *N Engl J Med* 2018; 379: 2108-2121.
- Miles D, Gligorov J, André F i wsp. Primary results from IMpassion131, a double-blind, placebo-controlled, randomised phase III trial of first-line paclitaxel with or without atezolizumab for unresectable locally advanced/metastatic triple-negative breast cancer. *Ann Oncol* 2021; 32: 994-1004.
- Rosa K. Roche withdraws atezolizumab PD-L1-positive metastatic TNBC indication in the United States; 2021. Dostępne na: <https://www.onclive.com/view/roche-withdraws-atezolizumab-pd-l1-positive-metastatic-tnbc-indication-in-the-united-states> (dostęp: 15 października 2023).
- Gradishar WJ, Moran MS, Abraham J i wsp. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines®) Breast Cancer; 2023. Dostępne na: https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/breast.pdf.
- ESMO. Triple-negative breast cancer; 2023. Dostępne na: <https://www.esmo.org/living-guidelines/esmo-metastatic-breast-cancer-living-guideline/triple-negative-breast-cancer/article/pd-l1-positive-mtnbc> (dostęp: 15 października 2023).
- Tecentriq, INN-atezolizumab; Charakterystyka Produktu Leczniczego; 2017. Dostępne na: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/tecentriq-epar-product-information_pl.pdf (dostęp: 15 października 2023).
- Stelmach M. AOTMiT uznaje za niezasadne objęcie refundacją atezolizumabu w leczeniu raka piersi. *Termedia*; kwiecień 2022. Dostępne na: <https://www.termedia.pl/onkologia/AOTMiT-uznaje-za-niezasadne-objecie-refundacja-atezolizumabu-w-leczeniu-raka-piersi,46522.html> (dostęp: 15 października 2023).
- Cortes J, Cescon DW, Rugo HS i wsp. Pembrolizumab plus chemotherapy versus placebo plus chemotherapy for previously untreated locally recurrent inoperable or metastatic triple-negative breast cancer (KEYNOTE-355): a randomised, placebo-controlled, double-blind, phase 3 clinical trial. *Lancet* 2020; 396: 1817-1828.
- Obwieszczenie Ministra Zdrowia z dnia 30 sierpnia 2023 r. w sprawie wykazu refundowanych leków, środków spożywczych specjalnego przeznaczenia żywieniowego oraz wyrobów medycznych na 1 września 2023 r. – Ministerstwo Zdrowia. Dostępne na: <https://www.gov.pl/web/zdrowie/obwieszczenie-ministra-zdrowia-z-dnia-30-sierpnia-2023-r-w-sprawie-wykazu-refundowanych-lekow-srodkow-spozywczych-specjalnego-przeznaczenia-zywnieniowego-oraz-wyrobow-medycznych-na-1-wrzesnia-2023-r> (dostęp: 15 października 2023).
- Center for Devices, Radiological Health. List of Cleared or Approved Companion Diagnostic Devices (In Vitro and Imaging Tools). W: U.S. Food and Drug Administration. FDA; 2023. Dostępne na: <https://www.fda.gov/medical-devices/in-vitro-diagnostics/list-cleared-or-approved-companion-diagnostic-devices-in-vitro-and-imaging-tools> (dostęp: 15 października 2023).
- Rugo HS, Loi S, Adams S i wsp. PD-L1 immunohistochemistry assay comparison in atezolizumab plus nab-paclitaxel-treated advanced triple-negative breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2021; 113: 1733-1743.
- Schmidt G, Guhl MM, Solomayer EF i wsp. Immunohistochemical assessment of PD-L1 expression using three different monoclonal antibodies in triple negative breast cancer patients. *Arch Gynecol Obstet* 2022; 306: 1689-1695.
- Vlajnic T, Baur F, Soysal SD i wsp. PD-L1 Expression in triple-negative breast cancer-a comparative study of 3 different antibodies. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2022; 30: 726-730.
- Kahn AM, Golestani R, Harigopal M i wsp. Intratumor spatial heterogeneity in programmed death-ligand 1 (PD-L1) protein expression in early-stage breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2023; 201: 289-298.
- Choi H, Ahn SG, Bae SJ i wsp. Comparison of programmed cell death ligand 1 status between core needle biopsy and surgical specimens of triple-negative breast cancer. *Yonsei Med J* 2023; 64: 518-525.
- Ben Dori S, Aizic A, Zubkov A i wsp. The risk of PD-L1 expression misclassification in triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2022; 194: 297-305.

RAK PŁASKONABŁONKOWY PRZELYKU – OCENA EKSPRESJI BIAŁKA PD-L1

MAŁGORZATA LENARCIK¹, ANDRZEJ MRÓZ²

¹Zakład Patologii Nowotworów, Narodowy Instytut Onkologii – Państwowy Instytut Badawczy; Katedra i Klinika Gastroenterologii, Hepatologii i Onkologii Klinicznej, CMKP, Warszawa

²Zakład Patologii Nowotworów, Narodowy Instytut Onkologii – Państwowy Instytut Badawczy; Zakład Patomorfologii, CMKP, Warszawa

Rak przełyku stanowi istotny problem kliniczny w skali globalnej i odpowiada za ponad pół miliona zgonów rocznie. Znakomita większość przypadków to wariant płaskonabłonkowy (ok. 85%) raka przełyku, ze znacznym zróżnicowaniem geograficznym częstości występowania. Rak płaskonabłonkowy przełyku wykrywany jest zazwyczaj w zaawansowanym stadium choroby i w przypadkach nieoperacyjnych leczony jest chemioterapią. Wyniki ostatnich badań CheckMate 648 i KEYNOTE-590 wykazały, że dodanie do klasycznej chemioterapii przeciwciał monoklonalnych przeciwko receptorom PD-L1 lub zastosowanie kombinacji leczenia immunologicznego skutkowało istotnym wydłużeniem czasu przeżycia pacjentów (*overall survival* – OS) bez względu na status ekspresji PD-L1 i przeżycia wolnego od choroby (*diseasefree survival* – DFS) u chorych z ekspresją PD-L1 wynoszącą TC \geq 1% i CPS \geq 10. Według danych światowych odsetek takiej ekspresji występuje w ok. 50% raków płaskonabłonkowych przełyku, co nakłada na patomorfologów obowiązek przeprowadzenia oceny predykcyjnej w materiale tkankowym. Poniżej przedstawiono algorytm oceny ekspresji PD-L1 w raku płaskonabłonkowym przełyku.

Klony 22C3, SP142 oraz 28-8 są przeznaczone do jakościowego wykrywania białka ligandu 1 programowanej śmierci (*programmed death ligand-1* – PD-L1). Według zaleceń amerykańskiego Urzędu ds. Żywności i Leków (*Food and Drug Administration* – FDA) do oceny ekspresji PD-L1 w raku płaskonabłonkowym przełyku rekomendowany jest klon 22C3. Wykorzystuje się materiał utrwalony w 10% zbuforowanej formalinie i zatopiony w parafinie. Zasady wykonania badań immunohistochemicznych zawarte są w części ogólnej niniejszego opracowania.

Zasady oceny ekspresji PD-L1 w raku płaskonabłonkowym przełyku:

- 1) ocena adekwatności materiału tkankowego,
- 2) ocena kontroli barwienia,

3) ocena ekspresji PD-L1,

4) oznaczenia CPS i/lub TPS/TC (%) – zasady formułowania raportu.

Ad 1. Do oceny kwalifikujemy materiał pochodzący z komponentu inwazyjnego zaawansowanego raka płaskonabłonkowego zawierający co najmniej 100 dobrze zachowanych komórek nowotworowych. Materiał może pochodzić z biopsji endoskopowej lub zabiegu chirurgicznego zmiany pierwotnej bądź przerzutu nowotworowego.

Ad 2. Test z użyciem przeciwciała anty PD-L1 wymaga przeprowadzenia kontroli jakości. Wyróżniamy dwa typy tego testu:

- kontrola pozytywna – linie komórkowe dostarczone przez producenta, o umiarkowanej ekspresji białka PD-L1 i niewykazujące ekspresji białka PD-L1,
- kontrola negatywna (NCR) – próbka tkanki pacjenta utrwalona i zatopiona w parafinie + zbuforowane mysie przeciwciała monoklonalne IgG.

Rutynowo stosuje się NCR, które musi spełnić kryteria akceptowalności.

Kryteria akceptowalne – kontrola jakości

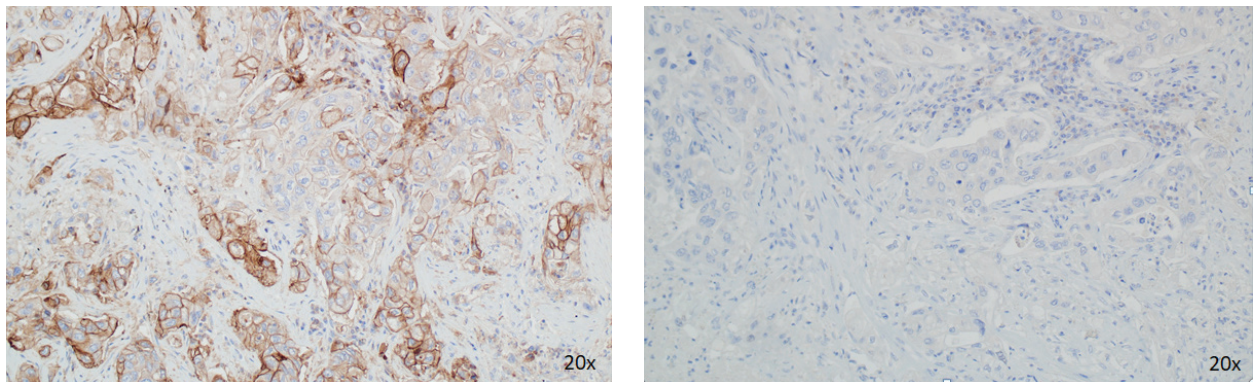
Pozytywna

- PDL-1 [+] ekspresja błonowa
70% komórek ---- 22c3
80% komórek ---- 28.8
- Intensywność barwienia \geq [1+]

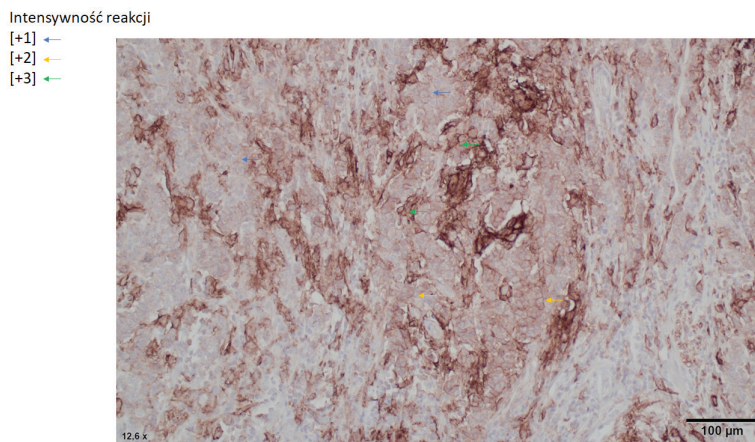
Negatywna [NCR]

- Brak p/ciała
- Brak reakcji błonowej
- Intensywność barwienia < [1+]
- Dopuszczalny odczyn cytoplazmatyczny o intensywności \leq [1+]

Ad 3. Pozytywna ekspresja PD-L1 to odczyn błonowy o każdej intensywności wybarwienia, częściowy lub ciągły, w testowanych komórkach raka oraz odczyn błonowo-cytoplazmatyczny w limfocytach i makrofagach znajdujących się w bezpośrednim sąsiedztwie lub obrębie guza. Do pozytywnych wyników reakcji PD-L1 nie zaliczamy ekspresji w martwicy,



Rycina 1. Pozytywna i negatywna (NCR) kontrola jakości barwienia PD-L1



Rycina 2. Intensywność reakcji: [+1], [+2] i [+3]

zagnieceniami tkankowych, w tym na brzegu wycinka, w nieinwazyjnym komponente nowotworu.

Ad 4. W zależności od potrzeb programu lekowego w ocenie ekspresji PD-L1 w raku płaskonabłon-

kowym przełyku stosujemy indeksy CPS (*combined positive score*) lub – rzadziej – TPS/TC% (*positive tumor cell expression*) z zastosowaniem punktów odcięcia odpowiednio 10 i 1%.

$$\begin{aligned} \text{CPS} &= \frac{\text{PDL-1 stainings cells [tumor cells and immune cells: lymphocytes, macrophages]}}{\text{Total number viable tumor cells}} \times 100 \\ (\text{combined positive score}) & \\ \text{TPS/TC (\%)} &= \frac{\text{PDL-1 positive tumor cells}}{\text{Total number tumor cells}} \times 100 \\ [\% \text{PDL-1 positive tumor cells expression}] & \end{aligned}$$

Zgodnie z obowiązującymi obecnie w Polsce wytycznymi dotyczącymi immunoterapii raka płaskonabłonkowego przełyku, pacjentów kwalifikuje się na podstawie wartości bezwzględnej CPS ≥ 10 . W liczniku proponowanego równania CPS bierzemy pod uwagę pozytywną ekspresję PD-L1 w komórkach raka i w towarzyszących komórkach zapalnych, w mianowniku zaś liczbę całkowitą komórek raka ocenianych w tym samym polu. W teorii więc wskaźnik CPS może przekroczyć 100, jednak wartość tę przyjmujemy jako maksymalną dla wyniku. Zaleca się użycie powiększenia $\times 20$ w celu wiarygodnej oceny słabej ekspresji (+1) błonowej w komórkach. Ekspresja PD-L1 w raku płaskonabłonkowym przełyku jest często niejednorodna i nierównomiernie dystrybuowana. Należy

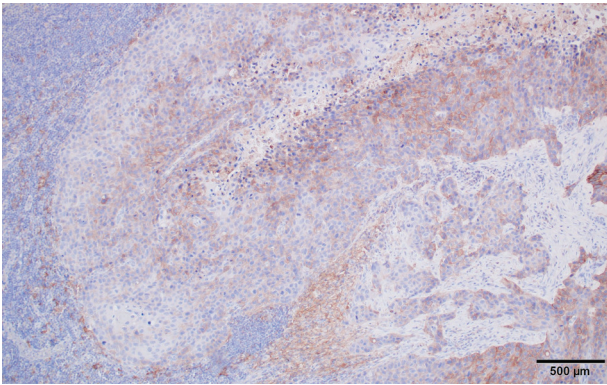
zatem ocenić liczne pola i za wartość ostateczną CPS/TC przyjąć wyliczoną średnią – przykłady poniżej.

$$\text{CPS} = \frac{\text{Dodatknie komórki nowotworowe, limfocyty i makrofagi}}{\text{Wszystkie żywe komórki nowotworowe}} \times 100$$

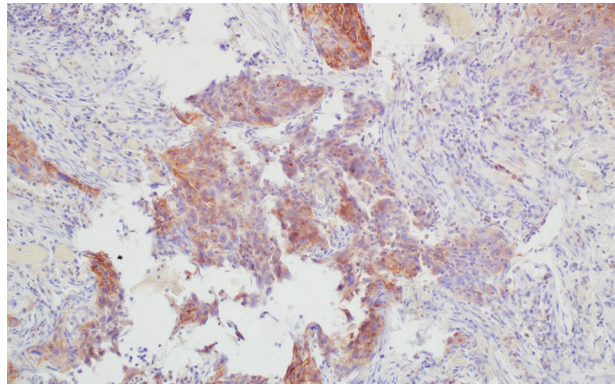
Kryteria włączenia (licznik) Kryteria włączenia (mianownik)

- PDL-1 [+] komórki w inwazyjnym komponente raka ESCC
- Jednojądrowe komórki zapalne, limfocyty, makrofagi
- BPDL-1 [+] oraz PDL-1 [-] komórki w inwazyjnym komponente raka ESCC

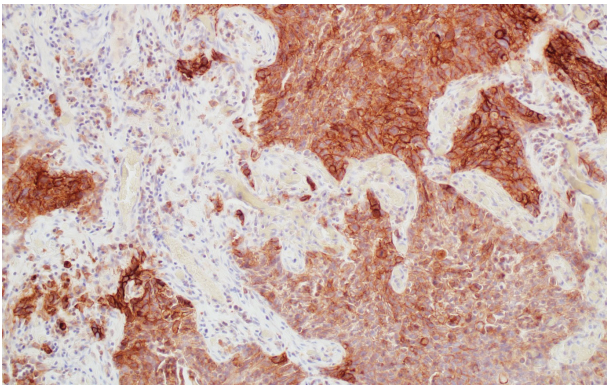
Poniżej zaprezentowano przykłady oceny ekspresji PD-L1 w raku płaskonabłonkowym przelyku (CPS i TPS/TC).



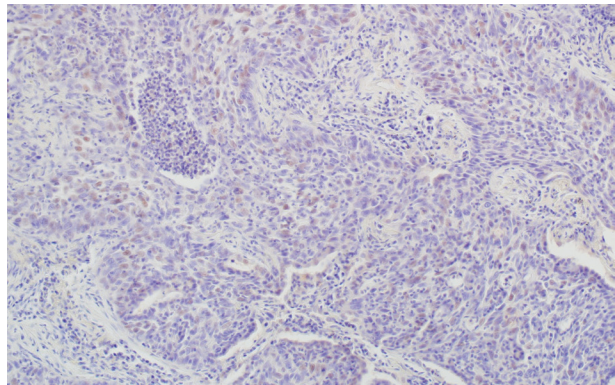
Rycina 3. Przypadek 1. Rak płaskonabłonkowy przelyku, 427 komórek PD-L1(+), 1050 żywych komórek raka, CPS 40, CPS \geq 10



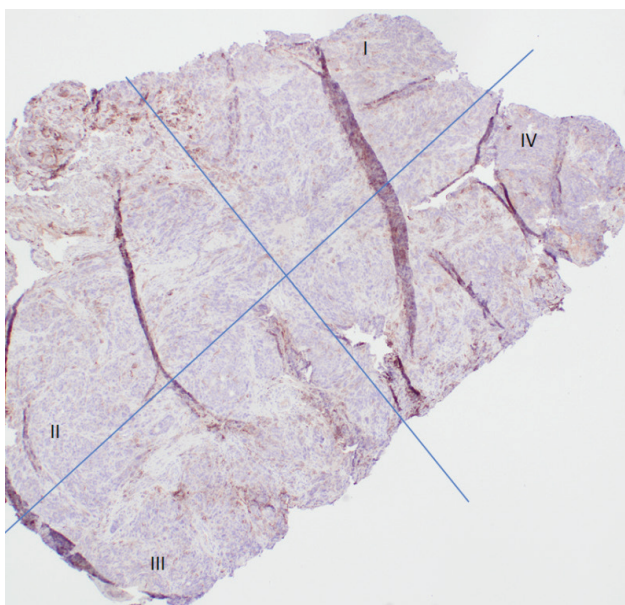
Rycina 5. Przypadek 3. Rak płaskonabłonkowy przelyku, 43 komórek PD-L1, 409 żywych komórek raka, CPS 11, CPS \geq 10



Rycina 4. Przypadek 2. Rak płaskonabłonkowy przelyku, 1243 komórki PD-L1(+), 1300 żywych komórek raka, CPS 95, CPS \geq 10



Rycina 6. Przypadek 4. Rak płaskonabłonkowy przelyku, 0 komórek PD-L1 (+), 1400 żywych komórek raka, CPS 0, CPS \leq 10



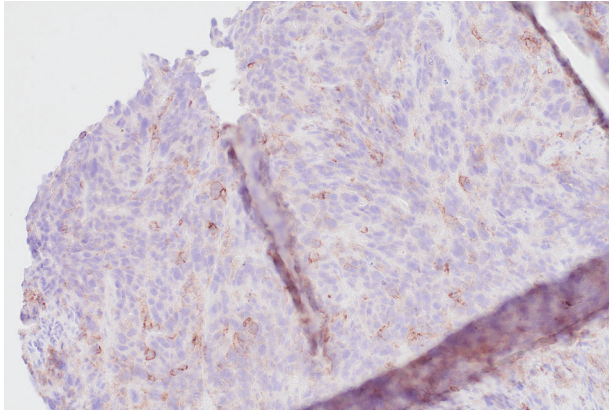
Heterogenność odczynu

Martwica
Neutrofile
Ropnie
Komórki podścieliska

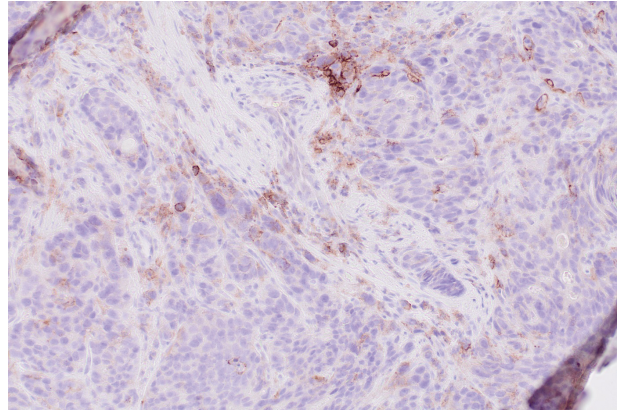
$$TC [\%] = \frac{I+II+III+IV}{4} = [\%]PDL-1[\text{positive}] \text{ tumor cells}$$

cut off: PDL-1 expression \geq 1%
PDL-1 expression $<$ 1%

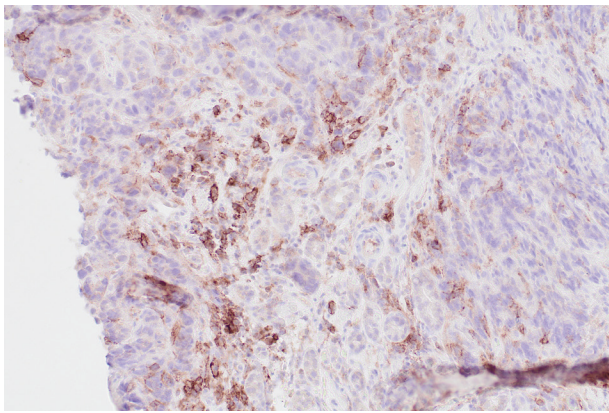
Rycina 7. Przypadek 5. Rak płaskonabłonkowy przelyku, heterogenność odczynu



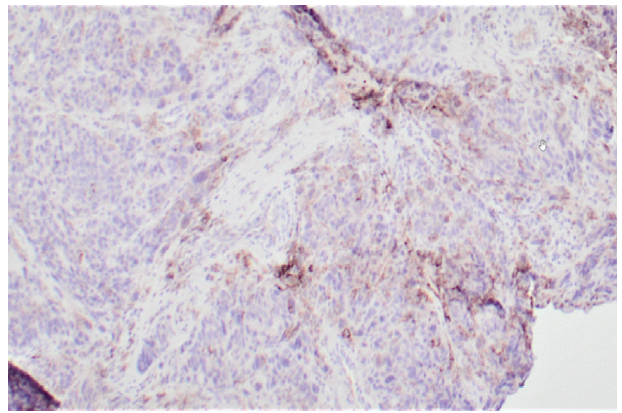
Rycina 8. I: 79 PD-L1(+), 1000 żywych komórek raka, TPS/TC% = 7,9%



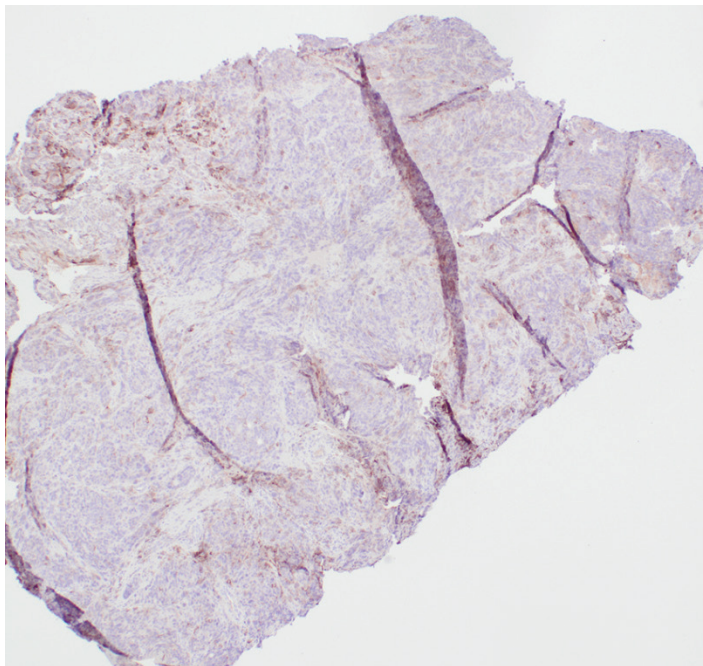
Rycina 10. III: 167 PD-L1(+), 1200 żywych komórek raka, TPS/TC% = 13,9%



Rycina 9. II: 150 PD-L1(+), 300 żywych komórek raka, TPS/TC% = 50%



Rycina 11. IV: 25 PD-L1(+), 1100 żywych komórek raka, TPS/TC% = 2,2%



Rycina 12. Przypadek 5. Podsumowanie

Heterogenność odczynu

Komponent inwazyjny
≥100 komórek nowotworowych
Kontrola jakości

$$TC [\%] = \frac{8\% + 50\% + 14\% + 2\%}{4} = 18,5\% \text{ PDL-1} [+]$$

Wynik: PDL-1 expression ≥ 1%

Raport końcowy oceny ekspresji PD-L1 w raku przelyku:

- 1) typ materiału – biopsja *vs* materiał operacyjny; zmiana pierwotna *vs* przerzut, materiał histologiczny *vs* cytoblock,
- 2) barwienie PD-L1 – klon (22C3, 28-8),
- 3) kwalifikacja – materiał wystarczający (≥ 100 komórek raka) *vs* niewystarczający,
- 4) kontrola negatywna (NCR) – akceptowalna *vs* nieakceptowalna,
- 5) wynik liczbowy: CPS ($< / \geq 10$) lub TPS/TC ($< / \geq 1\%$).

Piśmiennictwo

1. Herbst RS, Soria JC, Kowanetz M i wsp. Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients. *Nature* 2014; 515: 563-567.
2. Kato K, Sun J, Shah MA i wsp. LBA8_PR – Pembrolizumab plus chemotherapy versus chemotherapy as first-line therapy in patients with advanced esophageal cancer: the phase 3 KEYNOTE-590 study. *Ann Oncol* 2020; 31 (Suppl 4): S1142-S1215. DOI: 10.1016/annonc/annonc325.
3. Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR i wsp. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med* 2012; 366: 2443-2454.
4. Doki Y, Ajani JA, Kato K i wsp.; CheckMate 648 Trial Investigators. Nivolumab combination therapy in advanced esophageal squamous-cell carcinoma. *N Engl J Med* 2022; 386: 449-462.
5. Kojima T, Shah MA, Muro K i wsp.; KEYNOTE-181 Investigators. Randomized phase III KEYNOTE-181 study of pembrolizumab versus chemotherapy in advanced esophageal cancer. *J Clin Oncol* 2020; 38: 4138-4148.
6. Yap DWT, Leone AG, Wong NZH i wsp. Effectiveness of immune checkpoint inhibitors in patients with advanced esophageal squamous cell carcinoma: a meta-analysis including low PD-L1 subgroups. *JAMA Oncol* 2023; 9: 215-224.
7. Kalpakoff M, Hund S, Musser J i wsp. Inpatient tumor heterogeneity in IHC interpretation using PD-L1 IHC 22C3 pharmDx. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2021; 29: 667-673.
8. Matsubara Y, Toriyama K, Kadowaki S i wsp. The impact of combined PD-L1 positive score on clinical response to nivolumab in patients with advanced esophageal squamous cell carcinoma. *Esophagus* 2023; 20: 524-532.
9. Keytruda (summary of product characteristics). European Medicine Agency; 2021.

REKOMENDACJE WYKONANIA I OCENY PD-L1 W RAKACH PŁASKONABLONKOWYCH GŁOWY I SZYI

EWA CHMIELIK¹, MONIKA DURZYŃSKA²

¹Zakład Patologii Nowotworów, Narodowy Instytut Onkologii – Państwowy Instytut Badawczy, Oddział w Gliwicach

²Zakład Patomorfologii Nowotworów, Narodowy Instytut Onkologii – Państwowy Instytut Badawczy, Warszawa

Wstęp

W raku płaskonabłonkowym rejonu głowy i szyi wskazaniem do oceny ekspresji PD-L1 jest kwalifikacja do leczenia pembrolizumabem w monoterapii lub w skojarzeniu z chemioterapią opartą na pochodnych platyny i 5-fluorouracylu (5-FU) u chorych dorosłych z pierwszorazowym nawrotem raka z przerzutami lub z rakiem nieoperacyjnym [1].

Rejestrację produktu leczniczego oparto na wynikach wielośrodowego, trójramiennego, otwartego badania klinicznego z randomizacją KEYNOTE-048. Do badania włączono 882 chorych z rakiem płaskonabłonkowym głowy i szyi. W badaniu wykazano statystycznie istotne wydłużenie czasu przeżycia całkowitego (*overall survival* – OS) u chorych w ramieniu z pembrolizumabem i chemioterapią w porównaniu z chorymi w ramieniu z cetuksymabem i chemioterapią. Mediana OS wyniosła odpowiednio 13 miesięcy oraz 10,7 miesiąca (HR = 0,77; 95% CI: 0,63–0,93; $p = 0,0067$). Uwzględniając poziom ekspresji PD-L1 w podgrupie chorych z CPS ≥ 1 , mediana OS wyniosła 12,3 miesiąca w ramieniu z pembrolizumabem oraz 10,3 miesiąca w ramieniu z cetuksymabem i chemioterapią (HR = 0,78; 95% CI: 0,64–0,96; $p = 0,0171$), natomiast u chorych z CPS ≥ 20 mediana OS wyniosła 14,9 miesiąca dla pembrolizumabu i 10,7 miesiąca dla cetuksymabu z chemioterapią (HR = 0,61; 95% CI: 0,45–0,83; $p = 0,0015$). W badanej grupie dodatni wynik CPS ≥ 1 stwierdzono u 85% chorych [2].

Wybór materiału i badania kontrolne

Histopatologicznym kryterium włączenia do badania jest potwierdzony rak płaskonabłonkowy jamy ustnej, ustnej albo krtaniowej części gardła lub krtani (ICD-10 C01, C02, C03, C04, C05, C06, C09, C10, C12, C13, C14, C32). Materiał do badania może po-

chodzić z ogniska pierwotnego, wznowy, przerzutu odległego lub przerzutu do węzłów chłonnych [3]. Immunohistochemiczną ocenę ekspresji PD-L1 wykonuje się na skrawkach skrojonych z bloczków parafinowych. W celu zapewnienia odpowiedniej jakości materiału wycinki powinny być utrwalone w 10% zbuforowanej formalinie, natomiast czas utrwalania powinien wynosić między 6 godzin a 72 godziny w zależności od wielkości materiału. Z bloczka parafinowego należy skroić trzy preparaty niebarwione o grubości 4–5 μm , które następnie służą do wykonania barwienia hematoksyliną-eozyną (H&E) (ryciny 1A i 1C) (w celu potwierdzenia adekwatności materiału), wykonania negatywnej kontroli oraz badania immunohistochemicznego z PD-L1. Ocena adekwatności materiału polega na potwierdzeniu w preparacie co najmniej 100 zachowanych komórek raka płaskonabłonkowego inwazyjnego. Przeciętnie, pod powiększeniem 20 \times widocznych jest 2500 komórek raka płaskonabłonkowego, jednak liczba ta może być różna w zależności od podtypu raka i jego morfologii. Istotne jest odróżnienie obszaru nowotworu z rakiem nieinwazyjnym (w którym nie dokonuje się oceny PD-L1) od raka naciekającego. Należy unikać wyboru materiału, w którym wstępuje martwica [4].

Przed wdrożeniem oceny PD-L1 wskazane jest przeprowadzenie walidacji przeciwciała w Zakładzie Patomorfologii. W tym celu można wykorzystać preparaty kontrolne od producenta zawierające linie komórkowe dodatnie i ujemne w badaniu PD-L1, wewnątrzlaboratoryjną dodatnią i ujemną kontrolę tkankową oraz dodatnią kontrolę w migdałku podniebiennym (rycina 1D). Skrawki kontrolne z migdałka lub innych tkanek powinny być stosowane każdorazowo w wykonywanym procesie barwienia. W migdałku w prawidłowo wykonanym badaniu występuje intensywne zabarwienie błonowe

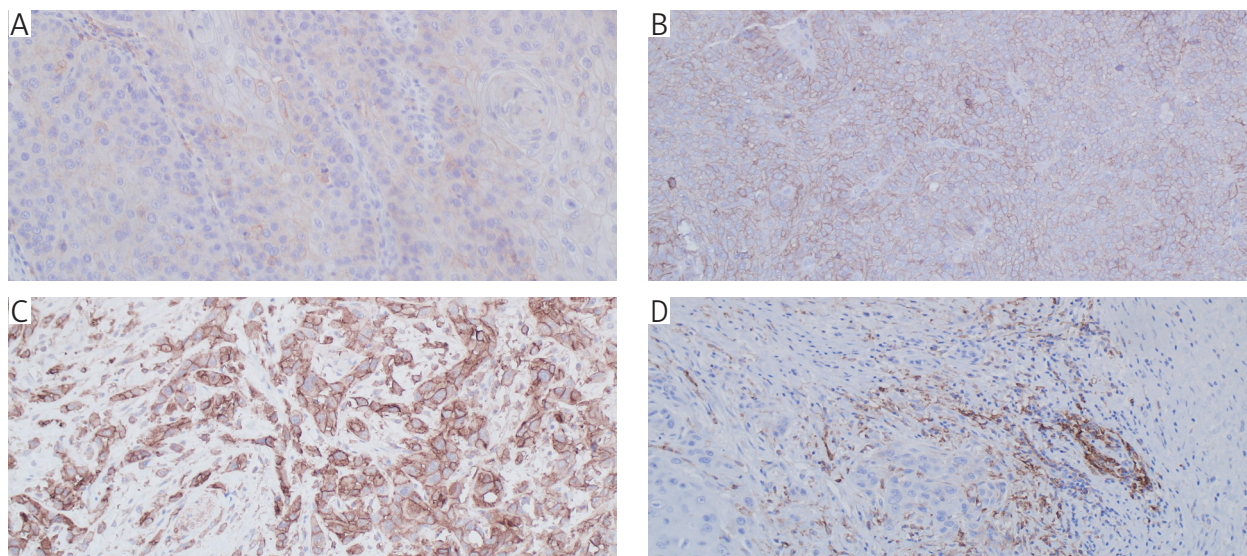
w komórkach nabłonka krypt oraz słabe lub średnie błonowe zabarwienie makrofagów centrów rozmnażania [4].

Obecnie do oceny ekspresji PD-L1 w raku płaskonabłonkowym głowy i szyi rekomendowane są dwa typy przeciwciał, tj. klon 22C3 pharmDx (Dako) (rycyna 1) oraz klon SP263 (Ventana) (ryciny 2B, D, E) [5].

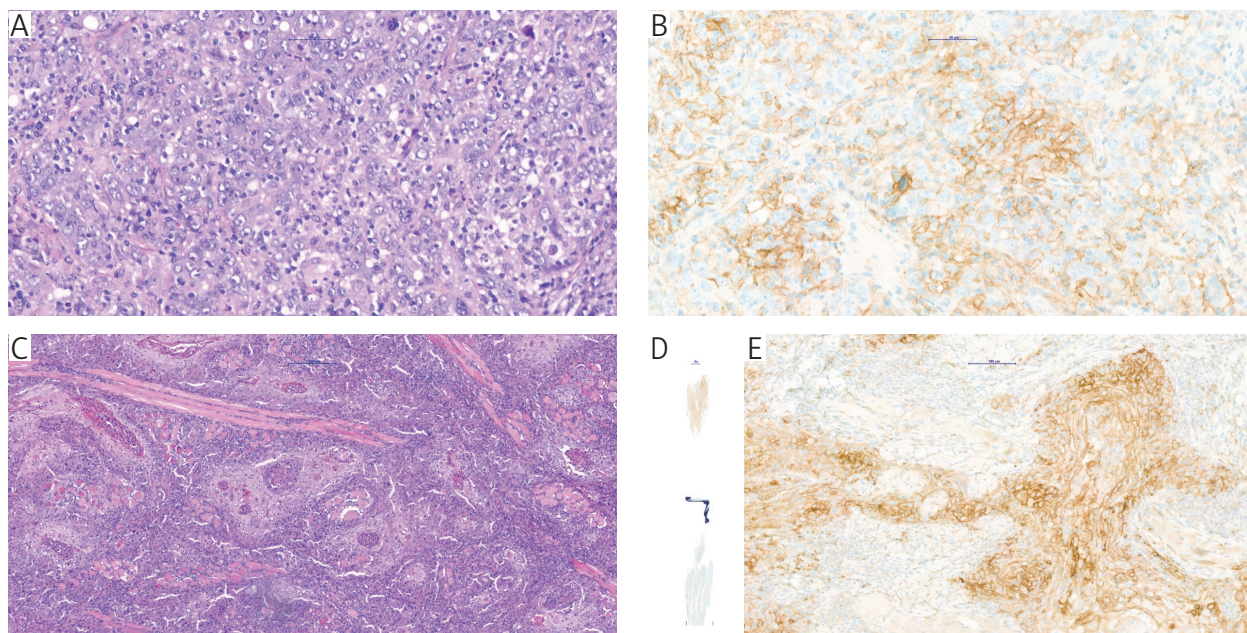
Ocena ekspresji PD-L1

Interpretacja barwienia immunohistochemicznego PD-L1 powinna być wykonana przez doświadczonego patologa.

Ekspresja jest określana przy użyciu łącznego wyniku dodatniego (CPS).



Rycina 1. Ocena ekspresji PD-L1, klon 22C3. A) CPS = 22, słabo intensywny odczyn błonowy w komórkach raka, 20 \times . B) CPS = 90, słabo i średnio intensywny odczyn błonowy w komórkach raka, 20 \times . C) CPS = 100, silnie intensywny odczyn błonowy w komórkach raka, 20 \times . D) CPS = 50, odczyn dodatni w komórkach zapalnych (MICs), brak reakcji w komórkach raka, 20 \times



Rycina 2. Przykłady ekspresji PD-L1, klon SP263 w raku krtani (A, B) i raku języka (C–E). A) Rak płaskonabłonkowy krtani, H&E, 40 \times . B) Ekspresja PD-L1 w raku krtani, klon SP263, CPS = 70, 40 \times . C) Rak płaskonabłonkowy języka, H&E, 10 \times . D) Ekspresja PD-L1 w raku języka, klon SP263, kontrola pozytywna w utkaniu migdałka, 0,26 \times . E) Ekspresja PD-L1 w raku języka, klon SP263, CPS = 90, 20 \times

Łączny wynik dodatni (CPS) jest obliczany na podstawie liczby komórek PD-L1 dodatnich, czyli komórek nowotworowych raka płaskonabłonkowego naciekającego i komórek jednojądrzastych, bezpośrednio związanych z odpowiedzią na nowotwór limfocytów i makrofagów, w obrębie gniazd nowotworowych i przylegającego podścieliska w tym samym polu widzenia $20\times$ co guz, podzielonej przez całkowitą liczbę żywych komórek nowotworowych, a następnie pomnożoną przez 100. Należy podkreślić, że komórki zapalne zlokalizowane w pewnej odległości od komórek nowotworowych nie są brane pod uwagę. Inne typy komórek (np. plazmocyty, granulocyty kwasochłonne, komórki wielojądrzaste) nie są uwzględniane. Natomiast wielojądrziste komórki raka, które wykazują błonowe zabarwienie, są uwzględniane w liczniku. Ekspresja PD-L1 w obszarach raka płaskonabłonkowego przedinwazyjnego (*in situ*), obszarach martwiczych lub komórkach mezenchymalnych podścieliska nie powinna być oceniana [4].

W ocenie ekspresji komórek raka bierze się pod uwagę odczyn błonowy o każdej intensywności (1+, 2+, 3+), który może być kompletny lub częściowy, linearny lub ziarnisty. Jeżeli z odczynem błonowym współlistnieje odczyn cytoplazmatyczny, to powinien być intensywniejszy. Komórki raka wykazujące wyłącznie odczyn cytoplazmatyczny powinny być wyłączone z liczenia [4].

Ocena ekspresji limfocytów i makrofagów uwzględnia zarówno odczyn cytoplazmatyczny, jak i błonowy o każdej intensywności. Dodatkowo jednojądrzaste komórki zapalne, które towarzyszą rakowi *in situ* lub dysplazji nabłonka czy zmianom łagodnym, należy wykluczyć z sumowania.

$$\text{CPS} = \frac{\text{Dodatnie komórki nowotworowe, limfocyty i makrofagi}}{\text{Wszystkie żywe komórki nowotworowe}} \times 100$$

Wynik powyższego równania jest dokładną wartością liczbową, przy czym maksymalna wartość to CPS = 100.

Ekspresja PDL1 (CPS \geq 1) jest wykorzystywana do kwalifikacji pacjenta do leczenia pierwszego rzutu pembrolizumabem w nawrotowym i przerzutowym raku płaskonabłonkowym regionu głowy i szyi.

Łączny wynik dodatni jest raportowany według trzech możliwych kategorii:

- CPS < 1: brak ekspresji PDL1 (ujemny),
- CPS \geq 1: ekspresja PDL1 (dodatni),
- CPS \geq 20: ekspresja PDL1 (dodatni).

Poziom ekspresji PDL1 CPS \geq 20 może być interesujący dla lekarzy prowadzących leczenie.

Oprócz kategorii w rozpoznaniu patologicznym należy podać dokładną wartość liczbową, ponieważ kategorie i wskazania mogą ulec zmianie w przyszłości [6].

Raport patologiczny oceny PD-L1 w raku płaskonabłonkowym regionu głowy i szyi powinien zawierać dane kliniczne pacjenta, potwierdzenie obecności 100 komórek raka w badanym materiale, rodzaj klonu użytego przeciwciała, rodzaje zastosowanych kontroli, typ oceny z klinicznym punktem odcięcia i wartość absolutną CPS [7].

Podsumowanie

1. W obrębie regionu głowy i szyi ocenę PD-L1 wykonuje się w raku płaskonabłonkowym jamy ustnej, ustnej i krtaniowej części gardła oraz krtani na zlecenie klinicysty (dotychczas nie ma wytycznych, żeby oceniać PD-L1 w każdym nowo rozpoznanym raku płaskonabłonkowym).
2. Patolog potwierdza rozpoznanie i obecność w preparacie minimum 100 komórek raka płaskonabłonkowego inwazyjnego.
3. Do oceny ekspresji PD-L1 można użyć klonu 22C3 pharmDx (Dako) lub SP263 (Ventana).
4. Błonowa ekspresja PD-L1 komórek raka oraz błonowa i/lub cytoplazmatyczna ekspresja komórek immunologicznych są oceniane jako dodatnie.
5. Wynik oceny podawany jest w CPS.
6. Wynik dodatni to CPS \geq 1.

Piśmiennictwo

1. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/keytruda-epar-product-information_pl.pdf
2. Seiwert TY, Burtneß B, Mehra R i wsp. Safety and clinical activity of pembrolizumab for treatment of recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck (KEYNOTE-012): an open-label, multicentre, phase 1b trial. *Lancet Oncol* 2016; 17: 956-965.
3. Kalpakoff M, Hund S, Musser J i wsp. Inpatient tumor heterogeneity in IHC interpretation using PD-L1 IHC 22C3 pharmDx. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2021; 29: 667-673.
4. https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/29314_22c3_pharmDx_hnscc_interpretation_manual_us.pdf
5. Cerbelli B, Girolami I, Eccher A i wsp. Evaluating programmed death-ligand 1 (PD-L1) in head and neck squamous cell carcinoma: concordance between the 22C3 PharmDx assay and the SP263 assay on whole sections from a multicentre study. *Histopathology* 2022; 80: 397-406.
6. Trigo J, García-Cosío M, García-Castaño A i wsp. Recommendations for the use of biomarkers for head and neck cancer, including salivary gland tumours: a consensus of the Spanish Society of Medical Oncology and the Spanish Society of Pathology. *Clin Transl Oncol* 2022; 24: 1890-1902.
7. Marletta S, Fusco N, Munari E i wsp. Atlas of PD-L1 for pathologists: indications, scores, diagnostic platforms and reporting systems. *J Pers Med* 2022; 12: 1073.

