



Зачем нужно определение *NTRK*?

- Нейротрофные тропомиозин-рецепторы тирозин-киназы (*NTRK*) – это семейство из трех прото-онкогенов, *NTRK1*, *NTRK2* и *NTRK3*, которое кодирует соответственно 3 белка: *TrkA*, *TrkB* и *TrkC*.
- В норме эти белки вовлечены в различные биологические процессы, в том числе дифференцировку клеток и приспособляемость к изменению физиологических условий вокруг клетки.
- В различных опухолях в онкогенный процесс вовлекаются различные домены *NTRK* [1].
- Учитывая потенциальную онкогенную активность, перестройки *NTRK* стали очередной терапевтической мишенью для таргетной терапии [2].

1. Hechtman J.F., Benayed R., Hyman D.M., Dilon A., et al. Pan-Trk Immunohistochemistry Is an Efficient and Reliable Screen for the Detection of *NTRK* Fusions. *Am J Surg Pathol*. 2017;41(11):1547-1551.

2. Amatu A., Sartore-Bianchi A. and Siena S. *NTRK* gene fusions as novel targets of cancer therapy across multiple tumour types. *ESMO Open*. 2016;1(2):e000023.

Зачем нужно определение *NTRK*?

- Согласно данным С. Rolfo, при наблюдении пациентов с местно-распространенными и метастатическими опухолями с транслокацией *NTRK*, применение энтректиниба (ингибитора TrkA/B/C и ROS1) способно обеспечить частоту объективного ответа 63,5% (n=74, медиана наблюдения 14,2 месяца).
- При этом медиана времени без прогрессирования заболевания составила 11,2 месяца (95% ДИ 8,0–15,7).

Rolfo C., Braud F., Doebele R., Drilon A., et al. Efficacy and safety of entrectinib in patients (pts) with NTRK -fusion positive (NTRK -fp) solid tumors: An updated integrated analysis. Journal of Clinical Oncology. 2020;38:3605-3605.

Где встречается?

- Перестройки *NTRK* чаще всего встречаются в редких опухолях, таких как секреторная карцинома молочной железы, аналог секреторной карциномы слюнной железы (MASC), врожденная инфантильная фибросаркома и врожденная мезобластная нефрома, а также в некоторых других опухолях детского возраста [1].
- В ряде исследований показано, что частота встречаемости реаранжировки гена *NTRK* в солидных опухолях невысока и составляет в карциномах молочной железы от 0,18% [2].
- Но в некоторых редких опухолях, например, в секреторной карциноме слюнной железы или в воспалительной миофибробластической опухоли, может встречаться достаточно часто.
- **Это показывает важную роль патолога в выборе пациентов для выявления генетических перестроек в гене *NTRK* на основе морфологического исследования.**

1. Drilon A., Laetsch T.W., Kummar S., DuBois S.G., et al. Efficacy of Larotrectinib in TRK Fusion-Positive Cancers in Adults and Children. N Engl J Med. 2018;378(8):731-739.
2. Okamura R., Boichard A., Kato S., Sicklick J.K., et al. Analysis of NTRK Alterations in Pan-Cancer Adult and Pediatric Malignancies: Implications for NTRK-Targeted Therapeutics. JCO Precis Oncol. 2018;2018.

Слияния гена NTRK выявлены в некоторых солидных и гематологических ЗНО

Gene fusion	Cancer	Frequency ^a		Detection method(s) ^b
NTRK1	Spitzoid neoplasms	23/140	16.4%	Targeted NGS (FMI), FISH, IHC
	Papillary thyroid cancer	28/228	12.3%	PCR
	Intrahepatic cholangiocarcinoma	1/28	3.6%	Targeted NGS (FMI)
	Lung adenocarcinoma	3/91	3.3%	Targeted NGS (FMI), FISH
	Glioblastoma	2/185 4/162 1/157	1.1% 2.5%	NGS NGS/PCR
	Colorectal cancer	3 reports 1/66	1.5%	cDNA library, FISH, PCR, ICH
	Sarcoma ^c	1/103	1%	RNA-Seq
NTRK2	Astrocytoma	3/96	3.1%	NGS
	Brain lower grade glioma ^c	2/461	0.4%	RNA-Seq
	Lung adenocarcinoma ^c	1/513	0.2%	RNA-Seq
	Head and neck squamous cell carcinoma ^c	1/411	0.2%	RNA-Seq

Gene fusion	Cancer	Frequency ^a		Detection method(s) ^b
NTRK3	MASC	15/15	100%	FISH
	Congenital fibrosarcomas	10/11 5/5	91% 100%	PCR PCR and FISH
	Secretory breast carcinoma	12/13	92%	FISH, PCR
	Congenital mesoblastic nephroma	5/6	83%	PCR and FISH
	Papillary thyroid cancer	9/62 ^d 7/243 ^e	14.5% 2.9%	RNA-Seq
	Thyroid carcinoma ^c	7/498	1.5%	RNA-Seq
	Ph-like acute lymphoblastic leukemia	1/154	0.7%	NGS
	Colon adenocarcinoma ^c	2/286	0.7%	RNA-Seq
	Skin cutaneous melanoma ^c	1/374	0.3%	RNA-Seq
	Head and neck squamous cell carcinoma ^c	1/411	0.2%	RNA-Seq
NTRK1/2/3	Acute myeloid leukemia	2 case reports	n.a	PCR, FISH
	Paediatric gliomas	8/112	(7.1%)	NGS

^aOnly positive studies are listed, and thus the actual prevalence may be lower than reported; ^bDetection method used in each study; ^cThe Cancer Genome Atlas; ^dPost-Chernobyl; ^eSporadic. cDNA: complementary deoxyribonucleic acid; FISH: fluorescence in situ hybridisation; FMI: Foundation Medicine Incorporated; IHC: immunohistochemistry; MASC: mammary analogue secretory carcinoma; NGS: next-generation sequencing; NTRK: neurotrophic tropomyosin receptor kinase; PCR: polymerase chain reaction; RNA: ribonucleic acid; Seq: sequencing. Vaishnavi A. et al. (2015) Cancer Discov 5:25-34.

Диагностика транслокаций NTRK

- Определение транслокаций NTRK не включено в клинические рекомендации в РФ*
- Скрининг NTRK не выполняется в рутинных клинических условиях
- Различные методы определения транслокаций NTRK в опубликованных исследованиях затрудняют определение их частоты

*определение транслокаций NTRK включено в рекомендации NCCN для немелкоклеточного рака легкого, колоректального рака, меланомы, MASC, опухолей из невыявленного первичного очага

Преаналитическая фаза и рекомендации по стандартизации

Параметр	Рекомендации
Тип образца	Парафиновые блоки Цитологические образцы не подходят для ИГХ и FISH Тип образца должен быть отмечен (например, операционный материал, биопсия, цитология)
Минимальный объем образца	Количество клеток: FISH: >100 оцениваемых ядер клеток ИГХ: около 2000 клеток NGS: >30%
Сбор и хранение образца	Фиксация в 10% нейтральном забуференном формалине и заливка парафином, как рекомендовано Фиксатор должен быть отмечен Образец должен храниться как блок, а не в виде отдельных срезов Если подготовлены срезы, дата должна быть отмечена

Modified from Eberhard DA, et al. J Clin Oncol 2008;26:983–94

Иммуногистохимия

- Различные антитела способны выявить экспрессию TRK в тканях
- Существуют антитела способные изолированно выявить экспрессию TRKA, TRKB или TRKC, а также антитела ко всем трем белкам (pan-TRK)
- Наиболее часто используемый и хорошо изученный клон - EPR 17341 (Abcam and Roche/Ventana), который связывается с С-концом белков TRKA, TRKB и TRKC, как следствие подходит для выявления любых онкогенных результатов слияния NTRK
- Ткань коры головного мозга или мозжечка может быть использована в качестве внешнего контроля, периферические нервы (при наличии в строме) – внутреннего контроля, а нормальные ткани (кровеносные сосуды, кожа, воспалительные клетки) – как негативный внутренний контроль

Webinar "Exchange NTRK experience" Prof. Dr. David Creytens, MD, PhD Pathologist, Head of Clinic Professor of Pathology Soft Tissue and Bone Pathology, Pediatric oncopathology, Head&Neck Pathology, Dermatopathology Ghent University Hospital, Ghent University

Иммуногистохимия

- Позитивным считается окрашивание хотя бы 1% опухолевых клеток*
- Интенсивность и локализация окрашивания (цитоплазматическое, мембранное, перинуклеарное, ядерное) могут варьировать
- Локализацию экспрессии TRK в клетке, отличную от нативной мембранной, обеспечивает партнер слияния, поэтому есть корреляция между локализацией окрашивания и вариантом партнера**
- Исследования показали, что чувствительность иммуногистохимического метода к выявлению слияний *NTRK3* ниже чем для *NTRK1* и *NTRK2* (79% против 96% и 100% соответственно)*/**

▪ Webinar "Exchange NTRK experience" Prof. Dr. David Creyten, MD, PhD Pathologist, Head of Clinic Professor of Pathology Soft Tissue and Bone Pathology, Pediatric oncopathology, Head&Neck Pathology, Dermatopathology Ghent University Hospital, Ghent University

▪ *Gatalica Z, Ziu J, Swensen J, et al. Mod Pathol 2019;32:147-153; **Hechtman JF, Benayed R, Hyman DM, et al. Am J Surg Pathol 2017;41:1547-1551; ***Solomon JP, Linkov I, Rosado A, et al. Mod Pathol 2020;33:38-46

Иммуногистохимия

- Есть основания полагать, что специфичность метода зависит от типа опухоли
- При появлении антитела в практике отмечалась 100% специфичность в карциномах толстой кишки, легкого, щитовидной железы, поджелудочной железы и биллиарного тракта, а в опухолях молочной и слюнной желез время от времени появляется спонтанное цитоплазматическое окрашивание, как следствие - специфичность снижается
- Также специфичность снижается в опухолях мягких тканей и костей, особенно с нейрогенной дифференцировкой, так как в них физиологично может экспрессироваться TRK дикого типа

▪ Webinar "Exchange NTRK experience" Prof. Dr. David Creyten, MD, PhD Pathologist, Head of Clinic Professor of Pathology Soft Tissue and Bone Pathology, Pediatric oncopathology, Head&Neck Pathology, Dermatopathology Ghent University Hospital, Ghent University

Секреторная карцинома молочной железы





Гистологические варианты опухолей молочной железы

- **Редкие варианты и слюноподобные опухоли**
 - 8550/3 Ацинарноклеточная карцинома
 - 8200/3 Аденокистозная карцинома
 - **8502/3 Секреторная карцинома**
 - 8430/3 Мукоэпидермоидная карцинома
 - 8525/3 Полиморфная аденокарцинома
 - 8509/3 Столбчато-клеточная карцинома с обратной полярностью
- **Нейроэндокринные образования молочной железы**
 - 8240/3 Нейроэндокринная опухоль NOS
 - 8240/3 Нейроэндокринная опухоль , grade 1
 - 8249/3 Нейроэндокринная опухоль , grade 2
 - 8249/3 Нейроэндокринная опухоль , grade 3
 - 8246/3 Нейроэндокринный рак NOS
 - 8041/3 Мелкоклеточный нейроэндокринный рак
 - 8013/3 Крупноклеточный нейроэндокринный рак

CA: WHO IARC, WHO Classification of Tumours - Breast tumours (5th ed, Volume 2), 2019

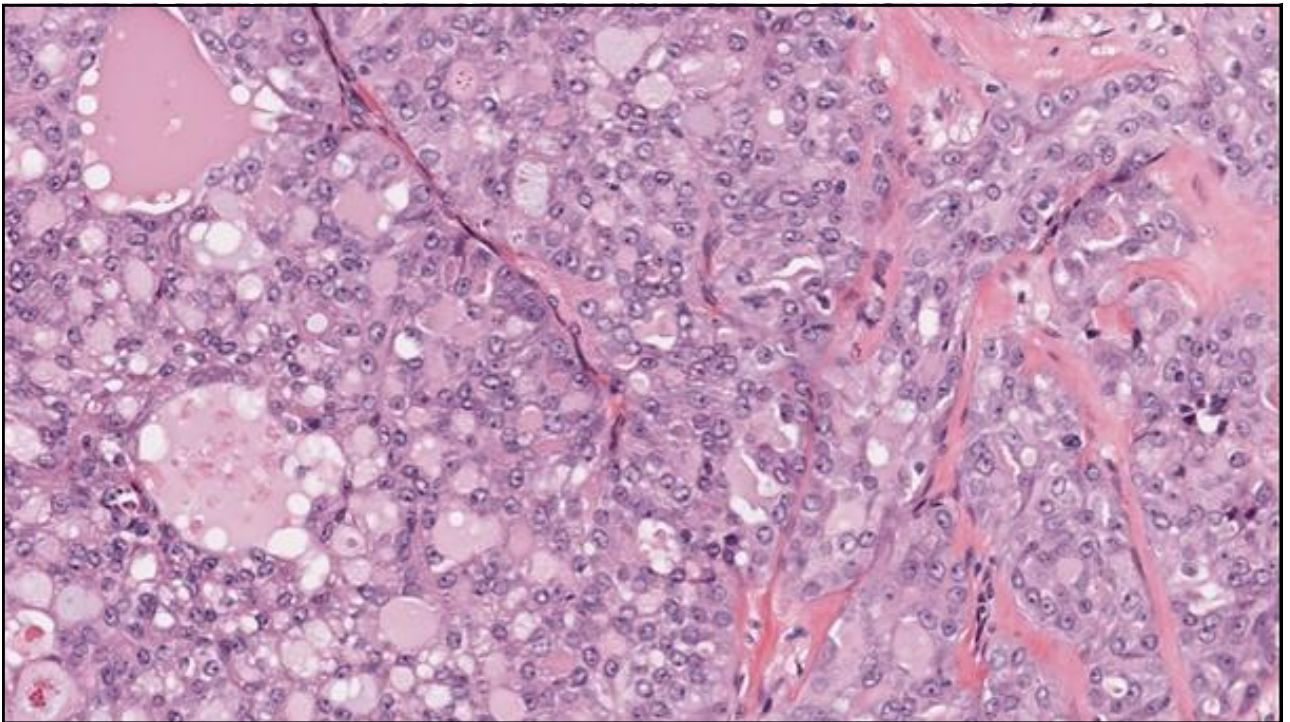
Секреторная карцинома молочной железы

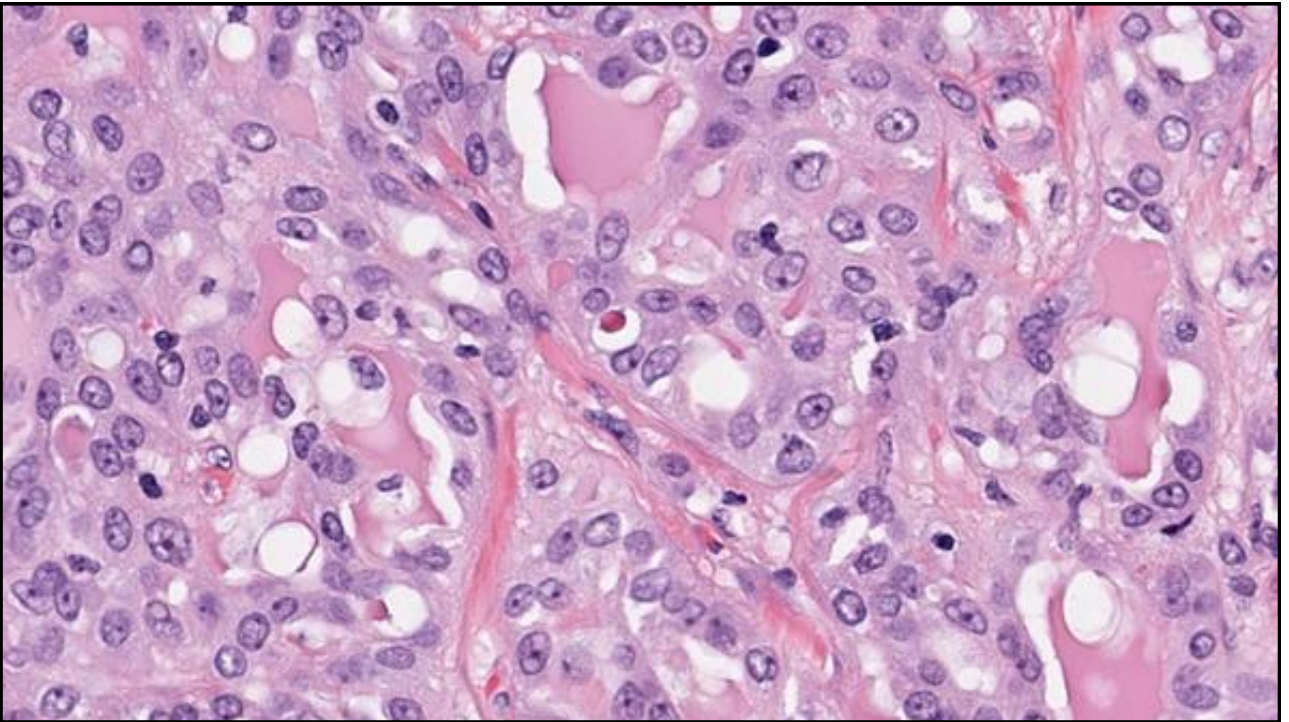
- Очень редкий вид опухоли и встречается менее чем в 0,05% всех инвазивных карцином молочной железы, чаще выявляется у женщин, но может быть у мужчин и подростков.
- Возраст больных может быть от 3 до 87 лет, средний возраст пациентов 53 года
- Обычно благоприятный прогноз, несмотря на поражение л/узлов в трети случаев
- Опухоль с четкой, ровной границей, обычно расположена в субареолярной зоне.
- Характерно слияние генов ETV6-NTRK3

Horowitz D.P., Sharma C.S., Connolly E., Gidea-Addeo D., et al. Secretory carcinoma of the breast: results from the survival, epidemiology and end results database. Breast. 2012;21(3):350-3.

Микроскопическое строение

- содержит полигональные клетки с эозинофильной гранулированной или вакуолизированной цитоплазмой, круглыми и овальными ядрами.
- может формировать микрокистозные, ячеистые, солидные, тубулярные и папиллярные структуры.
- микрокистозные участки могут симулировать тиреоидные фолликулы.
- большинство секреторных карцином имеют смешанное строение.
- ядерный полиморфизм, как правило, слабый или умеренный, митотическая активность низкая
- опухоль обычно имеет 1 или 2 градацию по Ноттингемской системе, high-grade карциномы встречаются исключительно редко.





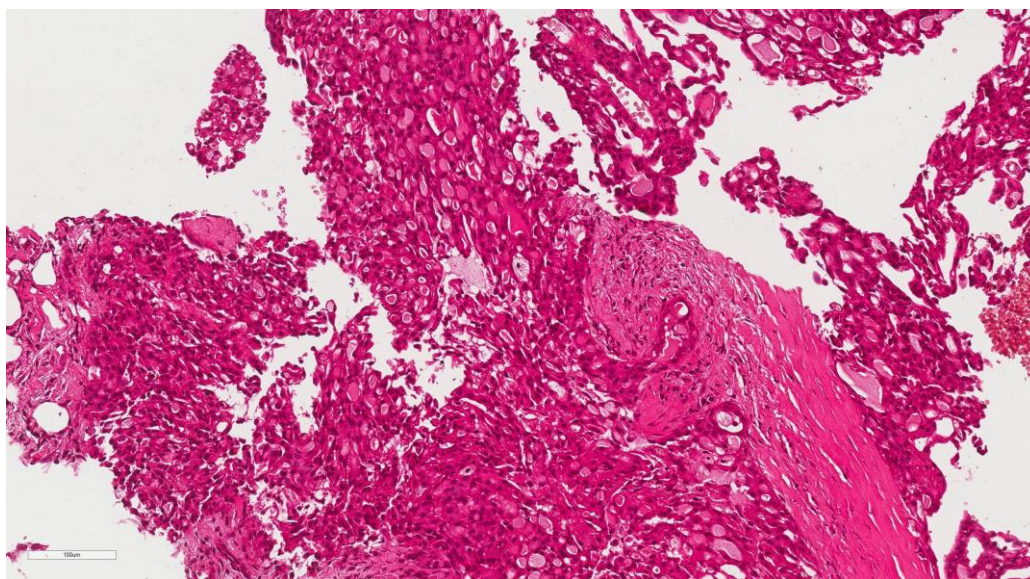
Иммуногистохимический профиль

- Клетки секреторной карциномы обычно диффузно экспрессируют CEA, S100, маммаглобин, SOX10, MUC4.
- В большинстве из них выявляются базальные маркеры (CK5/6, EGFR), хотя и фокально.
- GATA3, CK8/18, CD117 и виментин также могут быть позитивными.
- Хотя подавляющая часть этих карцином имеет тройной негативный фенотип ER (-), PR (-), HER2 (-), однако уровень экспрессии Ki-67 часто ниже 20%.

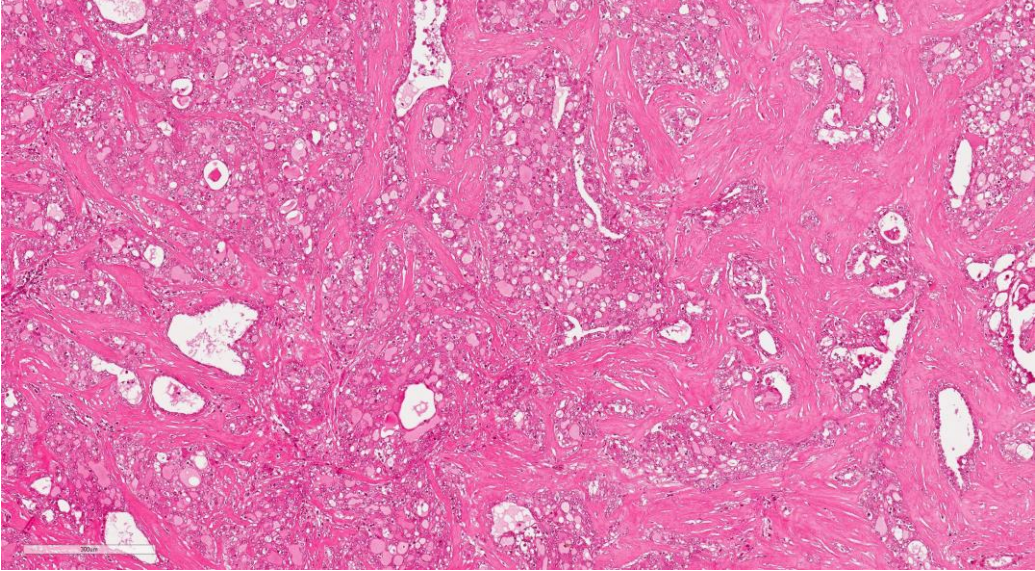
Клинический случай

- Пациентка К. поступила в региональную клинику с жалобами на образование в молочной железе. Гистологическое заключение по биопсийному материалу – С50.4, аденокистозный рак молочной железы. ИГХ: РЭ 0б., РП 0б., HER2 0, Ki67 - 7%.
- С клиническим диагнозом «С50.4 Злокачественное новообразование верхне--наружного квадранта молочной железы, рак правой молочной железы T2N0M0. Стадия IIA.» пациентке была выполнена радикальная резекция правой молочной железы со срочным гистологическим исследованием краев резекции и миопластикой.
- Гистологическое заключение по операционному материалу – Инфильтративная протоковая карцинома молочной железы, G2, pT2N0, ICD-O code 8500/3.
- Для проведения химиотерапевтического лечения пациентка поступила в клинику ФГБУ ДПО РМАНПО МЗ РФ, где был проведен пересмотр препаратов и по формальным морфологическим признакам заподозрена секреторная карцинома и проведено иммуногистохимическое исследование с антителами Ventana pan-TRK.
- Более того, при проведении иммуногистохимического исследования на операционном материале были получены следующие результаты: ER – 2%, 4 балла, PgR – 2%, 5 баллов, Ki-67 – 9%, HER2 – 0.

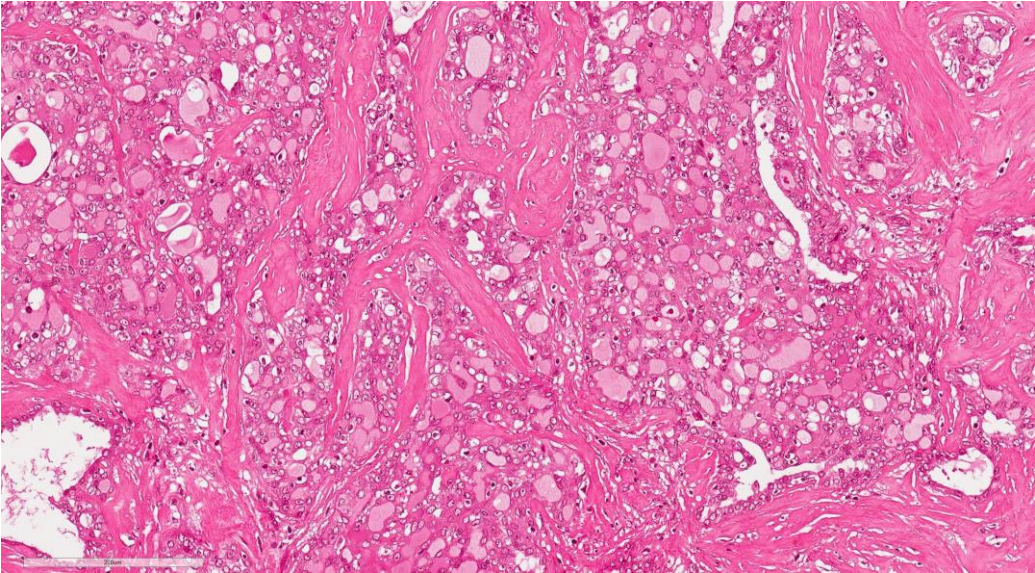
Биопсийный материал (увеличение 20x)



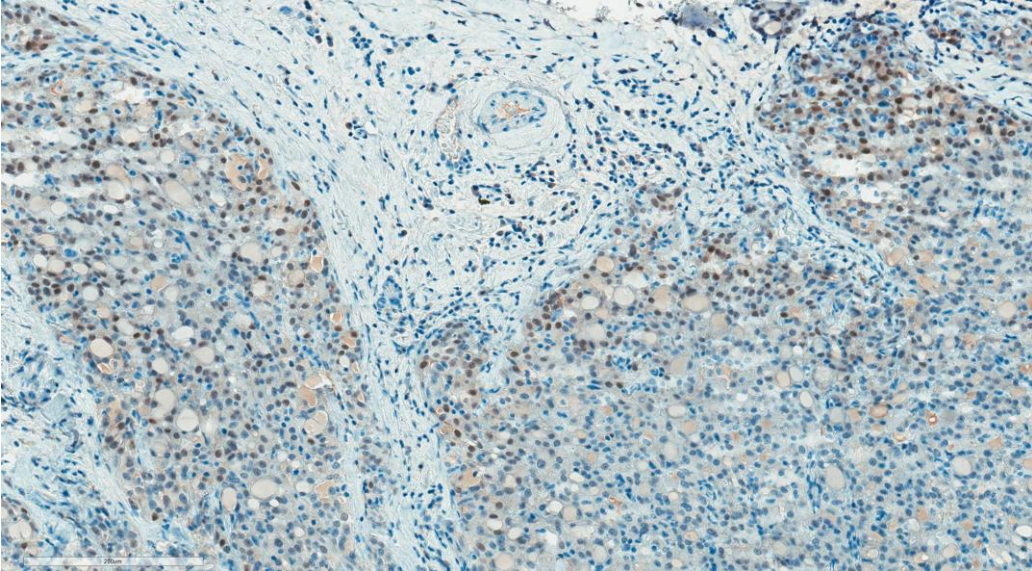
Операционный материал (увеличение 10х)



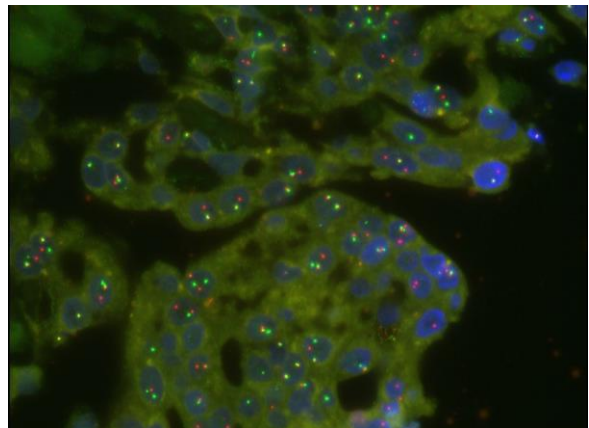
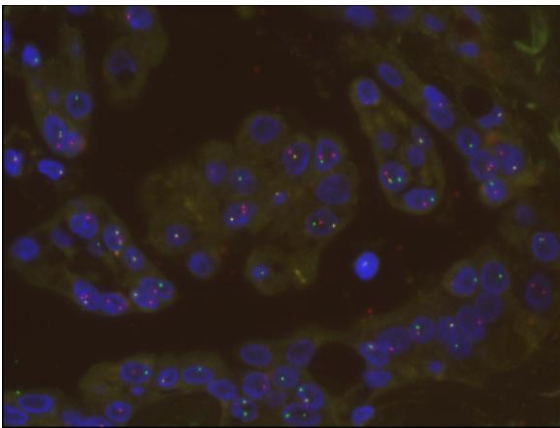
Операционный материал (увеличение 20х)

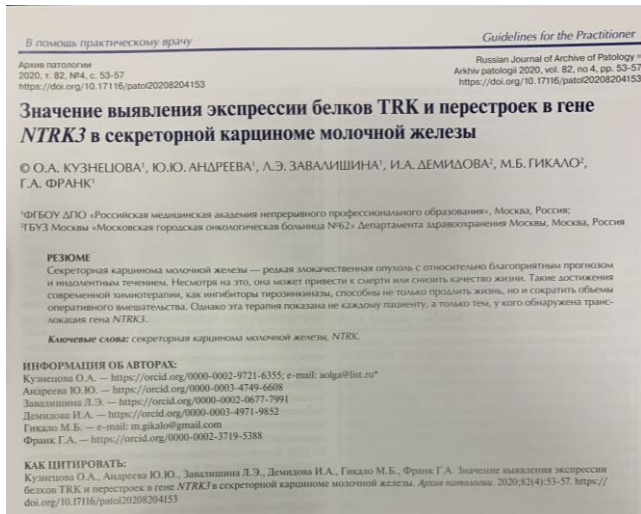
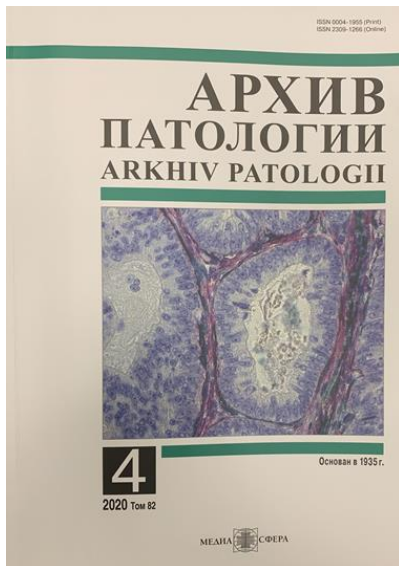


Реакция с антителами к ran-trk

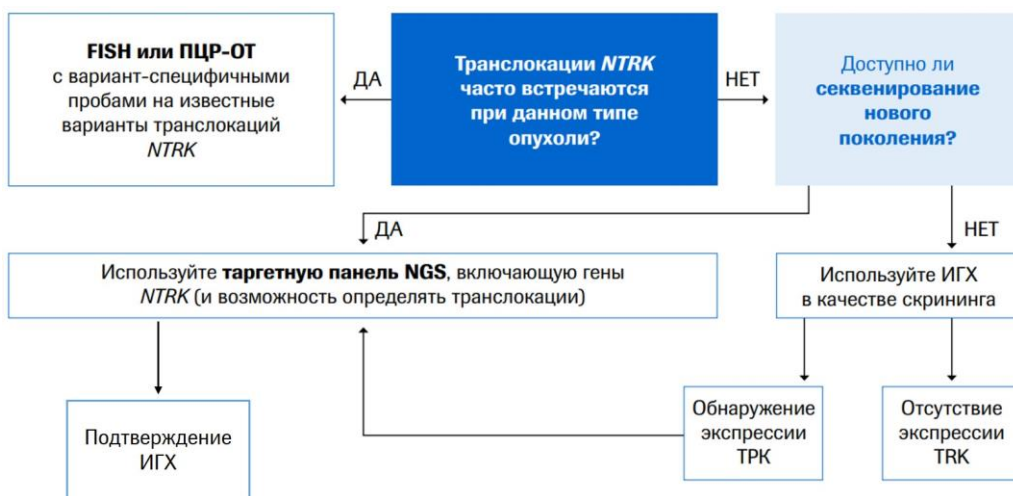


FISH-исследование выявило транслокацию NTRK3





Алгоритм рекомендованный ESMO Translational Research and Precision Medicine Working Group



Marchiò C, Scaltriti M, Ladanyi M, et al. ESMO recommendations on the standard methods to detect NTRK fusions in daily practice and clinical research. *Ann Oncol.* 2019;30(9):1417-1427. doi:10.1093/annonc/mdz204

- Необходимо помнить о редких типах опухолей с частыми транслокациями *NTRK*, т.к. их своевременная диагностика позволит провести таргетную терапию и, зачастую, спасти жизнь
- Антитела к TRK доступны для исследований, и разработка пан-TRK ИГХ тестов продолжается
- ИГХ должен использоваться только в качестве скрининга, с последующим подтверждением NGS [1–3]
- В России есть уникальная возможность направлять опухолевый материал TRK-позитивных случаев для проведения NGS

1. Murphy DA et al. Appl Immunohistochem Mol Morphol 2017;25:513-23; 2. Jang JS et al. J Thorac Oncol 2016;11:1891-900; 3. Gremel G et al. Front Oncol 2013;3:1-12; 4. Shukla N et al. JCO Precis Oncol 2017;1-8; 5. Gounder MM et al. J Clin Oncol 2017;35(suppl):11001-11001; 6. Gagan J, Van Allen EM. Genome Med 2015;7:80



Спасибо!