

Molekulární testování karcinomu endometria – analýza prvních zkušeností z klinické praxe

Molecular testing of endometrial carcinoma in real-world clinical practice

Bednaříková M.^{1,2}, Hausnerová J.³, Minář L.², Taslerová R.³, Vinklerová P.², Ehrlichová L.¹, Trizuljak J.^{1,4}, Blaháková I.⁴, Princ D.⁵, Matulová K.³, Ovesná P.⁶, Slabý O.^{3,4,7}, Weinberger V.²

¹ Interní hematologická a onkologická klinika LF MU a FN Brno

² Gynekologická a porodnická klinika LF MU a FN Brno

³ Ústav patologie, LF MU a FN Brno

⁴ CEITEC – Středoevropský technologický institut, MU Brno

⁵ Masarykův onkologický ústav, Brno

⁶ Institut biostatistiky a analýz, MU Brno

⁷ Ústav biologie, MU Brno

Souhrn

Východiska: Molekulární klasifikace přináší zásadní změny do diagnosticko-léčebného algoritmu u pacientek s karcinomem endometria (endometrial cancer – EC). Cílem sdělení je analýza prvních zkušeností se zavedením molekulárního testování do reálné klinické praxe. **Materiál a metody:** Od května 2021 je ve FN Brno u všech pacientek s nově diagnostikovaným EC v rámci standardního histopatologického vyšetření stanovován také imunohistochemický status proteinů p53 a mismatch repair (MMR). U tumorů nesplňujících klinická kritéria pro nízké riziko a vždy při průkazu deficiencie MMR nebo mutace p53 je prováděno také molekulárně genetické testování genu *POLE*. U každé pacientky je vyhodnoceno riziko recidivy podle nejnovějších guidelines z roku 2020 a na jeho základě doporučen další postup. Všem pacientkám s MMR-deficientními tumory a/nebo pozitivní rodinnou anamnézou je doporučena také genetická konzultace. **Výsledky:** Do analýzy bylo od května 2021 do května 2022 zařazeno celkem 85 pacientek s mediánem věku 66 let. MMR-deficientní tumory mělo 22 pacientek (26 %) a p53-mutované tumory 8 pacientek (9 %). U žádné ze 40 pacientek v nízkém riziku s provedenou analýzou mutačního stavu genu *POLE* nebyl prokázán ultramutovaný typ tumoru. Celkem 46 (51 %) pacientek mělo v době diagnózy nízké riziko, 2 pacientky (2 %) střední, 14 pacientek (16 %) vyšší střední a 20 pacientek (24 %) vysoké riziko recidivy. Celkem 6 pacientek (7 %) bylo diagnostikováno s pokročilým nebo metastatickým onemocněním. Medián doby od operace po projednání na multidisciplinární komisi byl 21 dní (8–36). Celkem 76 pacientek (90 %) absolvovalo léčbu v plném rozsahu v souladu s rizikem recidivy. Z 18 pacientek s dostupnými výsledky genetického vyšetření byla u 4 (22 %) prokázána hereditární forma onemocnění. **Závěr:** Racionálně indikované molekulární testování kombinující imunohistochemické analýzy proteinů MMR i p53 u všech pacientek s EC a sekvenční analýzu genu *POLE* u pacientek v nízkém riziku recidivy je v běžné praxi proveditelné a neprodlužuje dobu nutnou pro rozhodnutí o adjuvantní léčbě.

Klíčová slova

karcinom endometria – molekulární testování – p53 – mismatch repair systém – POLE

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.

The authors declare that they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE recommendation for biomedical papers.



MUDr. Markéta Bednaříková
Interní hematologická
a onkologická klinika
LF MU a FN Brno
Jihlavská 20
625 00 Brno
e-mail:
bednarikova.marketa@fnbrno.cz

Obdrženo/Submitted: 29. 1. 2023

Přijato/Accepted: 7. 2. 2023

doi: 10.48095/ccko2023215

Summary

Background: Molecular classification has brought significant changes in the management of endometrial cancer (EC). In this article, we aim to analyze our first experience with an implementation of molecular testing into daily clinical practice. **Materials and methods:** In all newly diagnosed EC, the status of mismatch repair (MMR) and *p53* proteins has been evaluated immunohistochemically as a part of the routine histopathological examination since May 2021. In tumors that do not meet clinical criteria for a low risk and those with *MMR* deficiency or *p53* mutation, the molecular genetic testing of the *POLE* gene is performed as well. Recommendations for adjuvant treatment or follow-up are subsequently made based on the risk of recurrence. Genetic counselling is proposed to all patients with *MMR*-deficient tumors or family history of cancer. **Results:** A total of 85 patients with newly diagnosed EC between May 2021 and May 2022 were enrolled in the analysis. The median age was 66 years. The results of molecular testing were as follows: 22 (26%) *MMR*-deficient, 8 (9%) *p53*-mutated and none *POLE*-ultramutated of those 40 tumors with performed *POLE* sequencing. A total of 46 (51%) patient had a low risk, 2 (2%) intermediate, 14 (16%) high-intermediate and 20 (24%) patients had a high risk of recurrence. Advanced or metastatic diseases were diagnosed in 6 (7%) patients. The median time between surgery and multidisciplinary tumor board decision was 21 days (8–36). A total of 76 (90%) patients underwent the whole treatment plan according to the recurrence risk. At the time of analysis, the results of genetic testing were available in 18 patients and revealed 4 (22%) carriers of a pathogenic variant in any of the genes associated with Lynch syndrome. **Conclusion:** Molecular testing combining immunohistochemical analyses of *MMR* and *p53* proteins in all newly diagnosed EC patients with sequencing analysis of *POLE* in those with non-low-risk disease is feasible and does not prolong the time needed for treatment decision.

Key words

endometrial cancer – molecular testing – *p53* – mismatch-repair system – *POLE*

Úvod

Adenokarcinomy endometria (EC) představují výrazně heterogenní skupinu nádorů s často velmi odlišným biologickým chováním (tab. 1). Zásadní léčebnou modalitou je chirurgický výkon mající význam nejen kurativní, ale také stagingový. Zatímco u pacientek s nízkým rizikem recidivy je samotná operace považována za dostačující výkon, u pacientek nesplňujících kritéria pro nízké riziko je následně indikována adjuvantní léčba ať již ve formě radioterapie, chemoterapie, nebo kombinace obou metod, a to v návaznosti na míru

rizika recidivy onemocnění [1]. Mezi základní prognostické parametry definující riziko rekurence patřily až do zavedení nové molekulární klasifikace stadium onemocnění v době diagnózy (tab. 2), histologický typ a přítomnost, nebo absence nádorové lymfangioinvasze (lymphovascular space invasion – LVSI) (tab. 3) [2].

Molekulární klasifikace EC byla navržena v roce 2013 na základě výsledků

komplexních genomických, transkriptomických a proteomických analýz a rozděluje karcinom endometria do čtyř skupin: 1) ultramutované tumory s patogenní variantou genu *POLE*; 2) hypermutované mikrosatelitově instabilní tumory; 3) copy-number high tumory většinou s přítomnou patogenní variantou genu *TP53*; 4) ostatní tumory, tzv. copy-number low. Kromě molekulárně biologických charakteristik se jed-

Tab. 1. Histologické typy adenokarcinomu endometria, zjednodušené dělení podle [15].

Histologický typ	Četnost (%)
Endometroidní adenokarcinom	80
Serózní karcinom	< 10
Clear cell karcinom	< 10
Nediferencovaný/dediferencovaný karcinom	2
Ostatní (vzácné): smíšený karcinom, mezonefrický adenokarcinom, skvamózní karcinom, mucinózní karcinom (intestinální typ), mesonephric-like adenokarcinom, karcinosarkom	

Tab. 2. TNM a FIGO klasifikace karcinomů endometria [16].

TNM	FIGO	Charakteristika
T1	I	nádor omezen na tělo dělohy
T1a	IA	nádor omezen na endometrium nebo postihuje méně než polovinu myometria
T1b	IB	nádor postihuje polovinu či více myometria
T2	II	nádor postihuje cervikální stroma, nešíří se však mimo dělohu
T3a, N1	III	lokální a/nebo regionální šíření specifikované níže:
T3a	IIIA	nádor postihuje serózu těla děložního nebo adnexa
T3b	IIIB	poškození pochvy nebo parametří
N1	IIIC	metastázy do pánevních nebo paraaortálních mizních uzlin
	IIIC1	metastázy do pánevních mizních uzlin
	IIIC2	metastázy do paraaortálních mizních uzlin
T4	IVA	nádor postihuje sliznici močového měchýře / sliznici střeva
M1	IVB	vzdálené metastázy

FIGO – International Federation of Gynecology and Obstetrics, TNM – primární tumor, regionální lymfatické uzliny

Tab. 3. Charakteristiky prognostických skupin pacientek s karcinomem endometria podle doporučení z roku 2016 a 2020 [2,8].

Riziko	DOP_2016	DOP_2020		
		Molekulární klasifikace neznámá	Molekulární klasifikace známá	
nízké	stadium IA endometroidní grade 1–2 LVSI negativní	stadium IA endometroidní low grade LVSI negat./fokálně	stadium I–II POLEmut bez reziduálního onemocnění	
			stadium IA MMRd/NSMP endometroidní low grade LVSI negat./fokálně	
střední	stadium IB endometroidní grade 1–2 LVSI negativní	stadium IB endometroidní low grade LVSI negat./fokálně	stadium IB MMRd/NSMP endometroidní low grade LVSI negat./fokálně	
			stadium IA endometroidní high grade LVSI negat./fokálně	
			stadium IA non-endometroidní bez invaze do myometria	
vyšší střední	stadium IA endometroidní grade 3 LVSI +/-	stadium I endometroidní LVSI-pozitivní	Stadium I MMRd/NSMP endometroidní LVSI pozitivní	
			stadium IB endometroidní grade 1–2 LVSI pozitivní	
	stadium IB endometroidní high grade	stadium IB MMRd/NSMP endometroidní high grade		
vysoké	stadium IA/B endometroidní grade 1–2 LVSI pozitivní	stadium II	stadium II MMRd/NSMP endometroidní	
			stadium III–IVA operace s R0	stadium III–IVA MMRd/NSMP operace s R0
			non-endometroidní	stadium I – IVA p53abn s invazí do myometria operace s R0
			stadium II	stadium I – IVA MMRd/NSMP serózní, nediferencovaný karcinom nebo karcinosarkom s invazí do myometria; operace s R0
pokročilý	stadium III s reziduem	stadium III–IVA reziduální onemocnění	stadium III–IVA reziduální onemocnění jakýkoliv typ	
	stadium IVA			
metastatický	stadium IVB	stadium IVB	stadium IVB jakýkoliv typ	

DOP_2016 – doporučení pro diagnostiku a léčbu karcinomu endometria z roku 2016, DOP_2020 – doporučení pro diagnostiku a léčbu karcinomu endometria z roku 2020, LVSI – nádorová lymfangioinvaze, MMRd – mismatch repair-deficientní, NSMP – nespecifický molekulární profil, POLEmut – ultramutované tumory s mutací genu *POLE*, p53abn – p53-mutovaný, R0 – operace s nulovým reziduem

notlivé skupiny významně odlišují také svou biologickou povahou. Zatímco ultramutované nádory s patogenní variantou genu *POLE* mají vynikající prognózu, nádory patřící do skupiny copy-number high mají naopak prognózu nejhorší a skupiny hypermutovaných mikrosatelitně instabilních i copy-number low tumorů vykazují intermediární prognózu [3]. Vzhledem k finanční nákladnosti komplexního genomového profilování, relativně dlouhé době odezvy a stále ještě limitované dostupnosti v běžné klinické praxi byla následně navržena a na nezávislých souborech pacientek validována alternativní metodika molekulárního testování založená na molekulárně genetické sekvenční analýze genu *POLE* a imunohistochemickém stanovení exprese proteinů MMR (mismatch repair systému, tj. MLH1, MSH2, MSH6 a PMS2) a p53 [4–7].

Na základě robustních dat dokladujících prognostický význam molekulární klasifikace bylo v roce 2020 její stanovení inkorporováno do aktualizace evropských doporučení pro management pacientek s EC (DOP_2020). Tato doporučení definují kritéria pro zařazení pacientek do jednotlivých skupin podle míry rizika recidivy onemocnění jak v situaci, kdy molekulární klasifikace známa není, tak v situaci, kdy jsou výsledky molekulárního testování k dispozici (tab. 3) [8]. Oproti předchozím doporučením z roku 2016 (DOP_2016) přinesla DOP_2020 některé zásadní změny. Vedle modifikace klinických prognostických parametrů (např. přesunutí stadia II z vysokého do vyššího středního rizika) je to především fakt, že průkaz patogenní sekvenční varianty v genu *POLE* svědčící pro ultramutovaný typ tumoru nebo mutovaný stav genu *TP53* zásadním způsobem ovlivňují terapeutický přístup u pacientek s nově diagnostikovaným EC. Nejenom pacientky v klinickém stadiu IA, ale i pacientky ve stadiu IB a II s *POLE*-ultramutovanými tumory jsou bez ohledu na další parametry zařazeny do skupiny s nízkým rizikem bez nutnosti adjuvantní terapie. Naopak tumory s aberantní expresí p53 (resp. mutací *TP53*) a prokázanou invazí do myometria jsou i při diagnóze ve stadiu IA bez ohledu na histologický typ zařazeny do

skupiny s vysokým rizikem, kdy je standardně doporučena adjuvantní léčba (tab. 3) [8]. V roce 2021 bylo publikováno také společné národní doporučení čtyř odborných společností České lékařské společnosti J. E. Purkyně (ČLS JEP) detailně popisující metodiku molekulárního testování EC v podmínkách ČR [9].

Cílem předkládané práce je analýza prvních zkušeností s prospektivním stanovováním molekulárního testování u pacientek s nově diagnostikovaným EC a vyhodnocení přínosu zavedení molekulární klasifikace do reálné klinické praxe.

Material a metody

Od jara roku 2021 je molekulární testování EC ve FN Brno prováděno prospektivně v rámci standardního histopatologického vyšetření vždy, pokud je k dispozici dostatečně reprezentativní vzorek tumoru pro imunohistochemické a molekulárně genetické analýzy. Vyšetření jsou prováděna na vzorcích tumoru odebraných při operaci, fixovaných formaldehydem a zalitých v parafínu (formalin-fixed paraffin-embedded – FFPE). Pokud nebyl operační výkon proveden, jsou vyšetření v indikovaných případech doplněna ze vzorků získaných při diagnostickém výkonu.

Proteiny p53 a MMR jsou stanovovány imunohistochemicky (IHC) u všech pacientek s nově diagnostikovaným EC.

Metodika IHC analýzy p53

K imunohistochemické analýze byla použita komerčně dostupná protilátka p53 (klon D0-7, 1 : 200; Agilent, USA) a automatický systém Ventana BenchMark Ultra. Dle míry exprese proteinu je nález hodnocen jako wild type (fokálně slabá disperzní jaderná pozitivita) či mutovaný typ exprese (silná jaderná exprese ve více než 80 % nádorových buněk, nulová jaderná exprese či cytoplazmatická exprese).

Metodika IHC analýzy MMR

K imunohistochemické analýze byly použity komerčně dostupné protilátky MSH2 (klon BSB-147, 1 : 50; BioSB, USA), MLH1 (klon ES05, RTU; Agilent, USA), PMS2 (klon EP51, RTU; Agilent, USA), MSH6 (klon PU29, 1 : 70; Novocastra,

Leica Biosystems Newcastle Ltd, Anglie) a automatický systém Ventana BenchMark Ultra. Hodnocení a interpretace výsledků se řídí dle doporučení College of American Pathologists.

Metodika analýzy mutačního stavu genu *POLE*

Mutační stav genu *POLE* je vyšetřován u všech tumorů s výjimkou těch, které splňují kritéria pro zařazení do skupiny s nízkým rizikem recidivy, tj. low-grade endometroidní karcinomy s hloubkou invaze do méně než poloviny šířky myometria, bez podstatné LVSI (tab. 3). V případě průkazu MMRd a/nebo p53MUT je mutační stav genu *POLE* došetřen bez ohledu na klinické parametry, a to pro dořešení případných double či multiple classifiers.

Po identifikaci vhodného FFPE bloku k analýze a zhodnocení procentuálního zastoupení nádorových buněk erudovaným patologem je izolována genomová DNA s podílem nádorové DNA ≥ 50 %. Amplifikace a sekvenční analýza exonů 9–14 genu *POLE* (dle referenční sekvence NM_006231.4) se řídí aktuálními standardy vydávanými Společností českých patologů ČLS JEP a aktuální verzí National Comprehensive Cancer Network (NCCN) guidelines. Jednotlivé sekvence použitých primerů (Generi Biotech, Česká republika) jsou uvedeny v tab. 4. Nález je hodnocen jako negativní v případě, že nebyla detekována žádná z dosud popsaných patogenních sekvenčních variant genu *POLE* v exonech 9–14, nebo jako pozitivní v případě, že byla detekována některá z dosud popsaných patogenních sekvenčních variant genu *POLE* v exonech 9–14.

Stanovení molekulárního subtypu EC

Specifikace molekulárního subtypu EC je reportována u tumorů, které mají stanoveny všechny potřebné parametry, tj. status MMR, p53 a mutační stav genu *POLE*. V souladu s národním doporučením je používána terminologie [9]:

- 1) *POLE*-ultramutovaný typ tumoru – průkaz známých patogenních variant v exonu 9–14 genu *POLE*
- 2) MMR-deficientní typ – průkaz deficiencie MMR a současně *POLE*wt při jakémkoli statusu p53

3) p53-mutovaný typ – p53-aberantní fenotyp a současně MMR proficiencie i *POLE*wt

4) s nespécifickým molekulárním profilem

Stratifikace pacientek podle míry rizika recidivy

Na základě stagingu, histologického typu, gradingu, stanovení LVSI a výsledků molekulárního testování je pacientka v rámci projednání dalšího postupu na Indikační onkogynekologické komisi (IOGK) zařazena do příslušné rizikové skupiny podle DOP_2020 (tab. 3) [8]. Pokud bylo provedeno kompletní molekulární testování včetně analýzy genu *POLE*, je definitivní riziko stanoveno na základě DOP_2020 – Molekulární klasifikace známa. V situacích, kdy by případný průkaz patogenní varianty genu *POLE* neměnil léčebný postup, jako jsou tumory splňující kritéria pro nízké riziko, nebo naopak diseminované tumory v době diagnózy, je riziko stanoveno na základě klinických parametrů (tab. 3).

Kritéria pro indikaci genetické konzultace

Všem pacientkám s MMR-deficientními tumory a/nebo s pozitivní rodinnou anamnézou je v rámci projednání na IOGK doporučena také genetická konzultace k vyloučení hereditární formy onemocnění.

Soubor pacientek

Do analýzy byly zařazeny všechny pacientky Onkogynekologického centra FN Brno s nově diagnostikovaným EC v období květen 2021 – květen 2022. Pro posouzení významu začlenění molekulárního testování do klinické praxe byly pacientky retrospektivně zařazeny do některé z prognostických skupin také podle předchozích doporučení DOP_2016 (tab. 3) a výsledky stratifikací podle jednotlivých doporučení byly porovnány [2].

Statistická analýza

K popisu charakteristik pacientek a tumorů byly použity absolutní a relativní četnost pro kategoriální proměnné a pro spojité medián a mezikvartilové rozpětí. Vzhledem k tomu, že se jednalo

Tab. 4. Sekvence použitých primerů.

PRIMER	Sekvence
POLE-9F	GAGCTTGGCTTTATGCTTATTTTG
POLE-9R	GGCAGATGCTGCTGTAGTATG
POLE-10F	TCTCTAGGCAGAGTGTGTGG
POLE-10R	ACATGTCCGTTCTTCCCAC
POLE-11F	CTTTGGGAGAGGAATTTGGAATAG
POLE-11R	CAGGAGCCACCTCCTAAGTC
POLE-12F	GGGCATTAGAGCCTGACC
POLE-12R	GTGACAGCACAGTCTGCAAG
POLE-13F1	TGCCTGTTAGGAACCTGCATC
POLE-13R1	ATGTCCTCCGGGTCTAGC
POLE-13F2	ACAGTTACCTTCTGTGGGC
POLE-13R2	TGTCCCGGAGACACAGC
POLE-14F	GTGCTTCACTTGTACCCTG
POLE-14R	TGCCGACAGGACAGATAATG

o deskriptivní studii, nebylo provedeno žádné statistické testování.

Výsledky

Do analýzy bylo zařazeno celkem 85 pacientek s mediánem věku 66 let, z toho 58 (68 %) v klinickém stadiu I, 7 (8 %) ve stadiu II, 16 (19 %) ve stadiu III a 4 (5 %) ve stadiu IV. Celkem 67 (79 %) pacientek mělo low-grade endometroidní karcinom, 13 (15 %) high-grade endometroidní karcinomy (tab. 5). I přes implementaci molekulárního testování byl medián doby od operace po projednání na IOGK 21 dní (8–36).

Výsledky molekulárního testování byly následující: celkem 22 pacientek (26 %) mělo MMR-deficientní tumory a 8 pacientek (9 %) p53-mutované tumory. U žádné ze 40 pacientek v nenízkém riziku s provedenou analýzou mutačního stavu genu *POLE* nebyl prokázán ultramutovaný typ tumoru. U jedné pacientky nebyl vyšetřen status p53 a u dvou pacientek v nenízkém riziku nebyla provedena analýza genu *POLE* (tab. 6). V obou případech se jednalo o tumory diagnostikované v klinickém stadiu IVB, kdy doplnění molekulárních analýz by nevedlo ke změně terapeutického postupu. Z pohledu zařazení pa-

cientek do skupin dle míry rizika recidivy podle DOP_2020 bylo 46 pacientek (51 %) v nízkém riziku, 2 pacientky (2 %) ve středním, 14 pacientek (16 %) ve vyšším středním a 20 pacientek (24 %) ve vysokém riziku. Celkem 6 pacientek (7 %) bylo diagnostikováno s pokročilým nebo metastatickým onemocněním.

U 76 pacientek (90 %) byl léčebný postup stanoven i dokončen plně v souladu s DOP_2020 podle míry rizika recidivy onemocnění [8]. U jedné pacientky (1 %) musela být doporučena adjuvantní léčba ukončena předčasně z důvodu nepřiměřené toxicity chemoterapie. Pouze u 8 pacientek (9 %) byla výsledná léčebná doporučení modifikována z důvodu celkového stavu nebo vůle pacientky, kdy navzdory riziku recidivy nebyla doporučena adjuvantní chemoterapie nebo radioterapie aplikována.

Při porovnání rozdílů ve stratifikaci pacientek podle míry rizika recidivy na základě DOP_2020 a předchozích DOP_2016 jsou patrné rozdíly v počtech zařazených pacientek prakticky ve všech rizikových skupinách s výjimkou pacientek diagnostikovaných s pokročilým nebo metastatickým onemocněním, kde se kritéria pro zařazení v mezidobí nijak nezměnila (graf 1) [2,8]. K modifi-

Tab. 5. Klinické charakteristiky souboru.

Klinické charakteristiky	n = 85
věk, medián (IQR)	66 (58–72)
BMI, medián (IQR)	33 (29 – 35)
menopauzální stav, n (%)	
pre/perimenopauza	14 (16 %)
postmenopauza	71 (84 %)
parita, medián (IQR)	2,00 (1,00–2,00)
Klinické stadium, n (%)	
I	
IA	51 (60 %)
IB	7 (8,2 %)
II	7 (8,2 %)
III	
IIIA	4 (4,7 %)
IIIB	1 (1,2 %)
IIIC	11 (13 %)
IV	
IVA	0
IVB	4 (4,7 %)
Histologie, n (%)	
endometroidní LG	67 (79 %)
endometroidní HG	13 (15 %)
non-endometroidní	
serózní	2 (2,4 %)
clear-cell	1 (1,2 %)
karcinosarkom	2 (2,4 %)
Doba do IOGK, medián (IQR), dny	21,0 (19,0–23,2)

BMI – body mass index, HG – high-grade, IOGK – indikační onkogynekologická komise, IQR – mezikvartilové rozpětí, LG – low-grade, n – počet případů

kaci rizika oproti dříve užívanému doporučení došlo v našem pilotním souboru celkem u 11 (13 %) pacientek, z toho u 4 (36 %) na základě molekulárních charakteristik (konkrétně průkaz p53-mutovaného tumoru při absenci průkazu MMRd a nemutovaném stavu genu *POLE*) a u 7 (64 %) pacientek na základě změny v posuzování významnosti některého z klinických parametrů (tab. 7).

Genetická konzultace byla nabídnuta celkem 24 pacientkám z celého souboru – 22 pacientkám na základě průkazu MMR-deficientního tumoru a 2 pa-

cientkám s MMR-proficientními tumory pro rodinnou zátěž. V době analýzy byly známy výsledky genetického vyšetření u 18 pacientek, z nichž u 4 (22 %) bylo prokázáno nosičství patogenní varianty v některém z genů asociovaných s Lynchovým syndromem, u 8 (45 %) byl výsledek negativní a u 6 (33 %) pacientek byla detekována varianta nejasného klinického významu.

Diskuze

Aktualizace DOP_2020 obsahující implementaci molekulární klasifikace při-

Tab. 6. Výsledky molekulárního testování.

Výsledky testování	n = 85
POLE, n (%)	
MUT	0
WT	40 (100 %)
% nádorové tkáně, medián (IQR)	80 (50–90)
neprovedeno	45
MMR, n (%)	
MMRd	22 (26 %)
MMRp	63 (74 %)
p53, n (%)	
MUT	8 (9 %)
WT	76 (90 %)
neprovedeno	1

náš zásadní změny do managementu pacientek s nově diagnostikovaným karcinomem endometria [8]. Předkládaná analýza shrnuje pilotní zkušenosti s aplikací těchto doporučení do běžné klinické praxe ve FN Brno. V návaznosti na publikovaná národní doporučení pro molekulární testování u karcinomu endometria jsme se v rámci Mezioborové pracovní skupiny pro onkogynekologii dohodli na algoritmu vyšetření a v průběhu jara 2021 bylo zahájeno molekulární testování jako nedílná součást rutinního histopatologického vyšetření. Námí zvolená metodika molekulárního testování reflektuje klinickou potřebu a vychází z úvahy, že vyšetření mutačního stavu genu *POLE* není nutné provádět paušálně, protože u pacientek s EC splňujících klinická kritéria pro nízké riziko recidivy nemění případná znalost o ultramutovaném typu tumoru klinický postup, kterým je doporučení dispenzarizace po operačním výkonu bez nutnosti adjuvantní léčby. Vyšetření stavu p53 a MMR indikujeme u všech pacientek s nově diagnostikovaným EC. Průkaz p53-mutovaného typu tumoru totiž automaticky zařazuje pacientku do skupiny s vysokým rizikem, kdy je standardně doporučována adjuvantní léčba ve snaze o redukci rizika recidivy onemocnění. Průkaz MMR-deficientního tu-

Tab. 7. Molekulární klasifikace karcinomu endometria – přehled publikovaných studií.

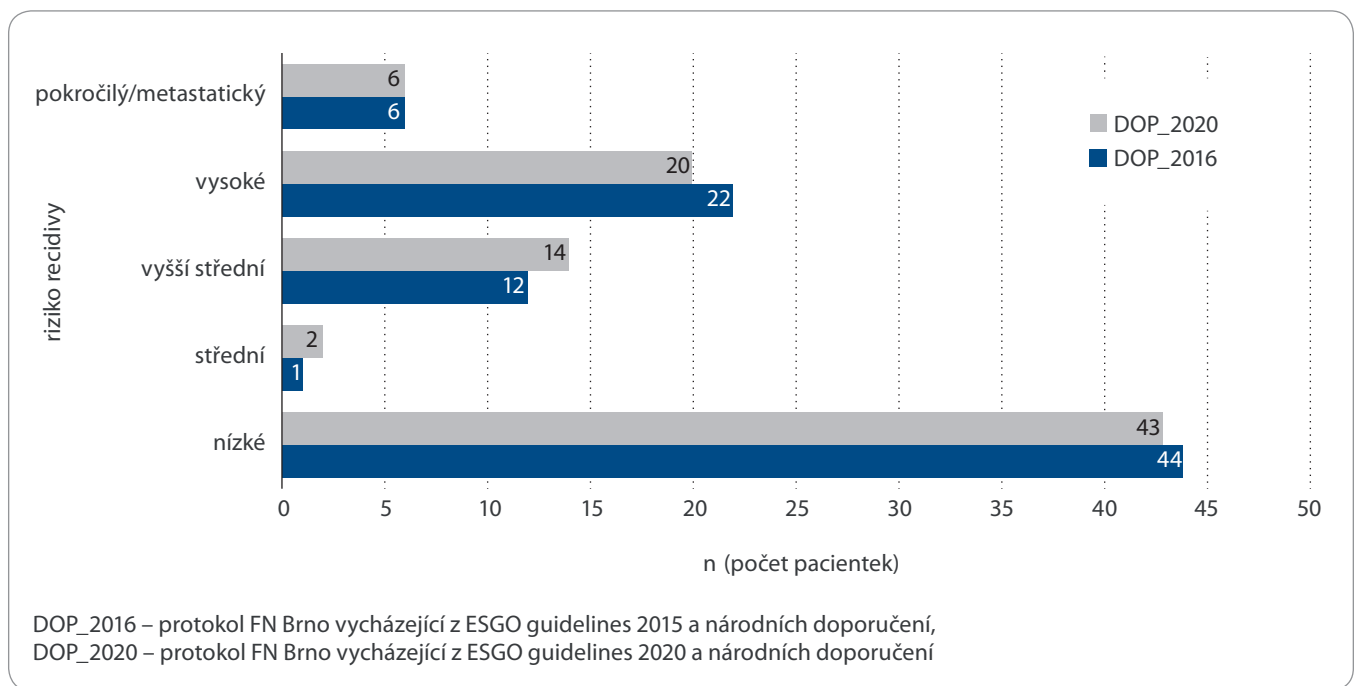
Charakteristiky	TCGA 2013 [3] n = 232	Talhok 2015 [4] n = 143	Stelloo 2016 [6] n = 834	Talhok 2017 [10] n = 319	Bosse 2018 [11] n = 376	Kommos 2018 [7] n = 452	Devereaux 2022 [12] n = 310
typ studie	retrospektivní	retrospektivní	retrospektivní	retrospektivní	retrospektivní	retrospektivní	prospektivní
věk, medián	NA	63	68	67	66	65	64
stadium, n (%)							
I	254 (68 %)	102 (71 %)	834 (100 %)	221 (70 %)	291 (77 %)	365 (81 %)	177 (57 %)
II–IV	116 (32 %)	41 (29 %)		94 (30 %)	85 (23 %)	57 (19 %)	102 (33 %)
NA	3			4			31 (10 %)
histologie, n (%)							
EEC	304 (82 %)	119 (83 %)	834 (100 %)	215 (67 %)	376 (100 %)	320 (71 %)	220 (71 %)
non-EEC	66 (18 %)	25 (17 %)		104 (33 %)		132 (29 %)	90 (39 %)
grade, n (%)							
LG	193 (52 %)	90 (63 %)	724 (87 %)	123 (39 %)		357 (79 %)	185 (60 %)
HG	111 (30 %)	53 (37 %)	110 (13 %)	196 (61 %)	376 (100 %)	95 (21 %)	32 (10 %)
NA	66 (18 %)						93 (30 %)
POLE, n (%)							
MUT	17 (7 %)	12 (8 %)	49 (6 %)	30 (9 %)	49 (13 %)	42 (9 %)	15 (5 %)
WT	215 (93 %)	131 (92 %)	785 (94 %)	289 (91 %)	327 (87 %)	410 (91 %)	295 (95 %)
metodika	NGS	NGS/Sanger	Sanger	NGS/Sanger	NGS/Sanger	NGS/Sanger	SNaPshot
MMR, n (%)							
MMRd	65 (28 %)	41 (29 %)	219 (26 %)	64 (20 %)	138 (36 %)	127 (28 %)	59 (25 %)
MMRp	167 (72 %)	102 (71 %)	615 (74 %)	255 (80 %)	238 (64 %)	325 (72 %)	251 (75 %)
metodika	NGS/MSI	IHC	MSI	IHC	IHC	IHC	IHC
p53							
P53MUT	60 (26 %)	25 (18 %)	74 (9 %)	86 (27 %)	79 (21 %)	55 (12 %)	81 (26 %)
P53WT	172 (74 %)	118 (82 %)	760 (91 %)	233 (73 %)	297 (79 %)	397 (88 %)	229 (73 %)
metodika	NGS	IHC	IHC	IHC	IHC	IHC	IHC
NSMP/P53WT	90 (39 %)	63 (44 %)	492 (59 %)	139 (44 %)	228 (50 %)	228 (50 %)	135 (44 %)

EEC – endometroidní karcinom, HG – high-grade, IHC – imunohistochemie, LG – low-grade, MMR – mismatch-repair system, MMRd – MMR-deficientní, MSI – mikrosatelitní instabilita, MUT – mutovaný, n – počet, NA – nestanoveno, NGS – sekvenování nové generace, non-EEC – non-endometroidní karcinom, NSMP – s nespecifickým molekulárním profilem, Sanger – analýza metodou Sangerova sekvenování, SNaPshot – single nucleotide polymorphism analyses, WT – wild type

moru sice podle aktuálních doporučení neovlivňuje zařazení pacientky do některé z rizikových skupin, ale umožňuje identifikaci pacientek, u nichž je indikováno další došetření k vyloučení hereditární formy onemocnění. Při zohlednění počtu nových pacientek v našem centru a potřebě rychlého zavedení molekulárního testování jsme se dohodli, že v úvodní fázi budeme status p53 a MMR stanovovat v souladu s národním do-

poručením imunohistochemicky a mutační stav genu *POLE* metodou Sangerova sekvenování. Sekvenování nové generace využíváme v současnosti u pacientek s EC při vyčerpaných možnostech standardní systémové léčby podávané s paliativním záměrem, a to v rámci pátrání po eventuální targetovatelné lézi v situacích, kdy je pacientka stále kandidátkou aktivního terapeutického přístupu.

Jak dokladují naše první zkušenosti, námi zvolená metodika je v praxi proveditelná a nijak neprodlužuje dobu nutnou k projednání dalšího postupu v rámci primární léčby u pacientek s nově diagnostikovaným EC (medián doby od data diagnózy do projednání dalšího postupu s výsledky histologie byl v našem souboru 21 dní (tab. 5). Při hodnocení pilotních výsledků v kontextu s dosud publikovanými daty mů-



Graf 1. Predikce rizika podle DOP_2016 a DOP_2020 [2,8].

žeme konstatovat, že věkové složení naší kohorty (medián věku 66 let) i proporcionální rozložení jednotlivých stadií v době diagnózy (68 % diagnostikováno ve stadiu I a 32 % ve stadiu II–IV) odpovídá klinickým parametrům souborů v dosud publikovaných retrospektivních analýzách [3,4,6,7,10,11] i ve vůbec první práci popisující zkušenosti s prospektivním stanovováním molekulární klasifikace u EC [12] (tab. 5 a 8).

Skutečnost, že v našem souboru nebyla zachycena žádná pacientka s ultramutovaným typem tumoru, může být vysvětlena především relativně malou velikostí naší pilotní kohorty v porovnání s velikostí souborů pacientek v rámci dosud publikovaných studií, obzvláště vezmeme-li do úvahy udávanou frekvenci těchto typů tumorů (5–13 %; tab. 8). Podle dosud publikovaných dat se POLE-ultramutované tumory vyskytují především u pacientek s endometroidními tumory, a to u tumorů s vysokým i nízkým gradem. Např. ve studii Stelloo et al. bylo 49 % pacientek s POLE-ultramutovaným typem tumoru ve skupině s nízkým rizikem recidivy [6]. Je tedy evidentní, že řada pacientek s potenciálně POLE-ultramutovaným tumorem nebyla v našem souboru vůbec testována, neboť znalost výsledku testování

by nezměnila náš klinický postup. Velký důraz je kladen na dostatečné procentuální zastoupení nádorové tkáně ve vzorku vybraném patologem pro účely Sangerova sekvenování, a to vzhledem k možné limitaci této metody v senzitivitě záchytu patogenních variant. Udávaný detekční limit námi užívané metody je 15–20 % mutované alely, tj. nejméně 30–40 % buněk s mutací. Při mediánu 80 % nádorové tkáně ve vzorcích určených k testování *POLE* v naší pilotní kohortě nepředpokládáme významný podíl falešně negativních výsledků (tab. 6). Navíc výsledky studie Temko et al. dokladují, že somatické patogenní varianty exonukleázové domény genu *POLE* vznikají velmi časně v průběhu kancerogeneze a jsou detekovatelné již v prekurzorových lézích. Nepředpokládá se tedy významný podíl falešně negativních výsledků při analýze mutačního stavu *POLE* v důsledku heterogenity tumoru [13].

Relativně nízký podíl pacientek s p53-mutovaným typem tumoru v našem souboru (n = 8, tj. 9 %) je vysvětlitelný zejména nízkým podílem pacientek s non-endometroidními karcinomy, resp. serózními karcinomy (tab. 6). Tato hodnota je v naprosté korelaci s výsledky studie Stelloo et al., ve které byly retrospek-

tivně analyzovány pacientky ze studií PORTEC-1 a PORTEC-2, tj. pouze s endometroidními karcinomy při podílu HG tumorů 13 % (tab. 8).

Podíl pacientek s MMR-deficientními tumory 26 % (tab. 6) je plně v souladu s výsledky dosud publikovaných studií (tab. 8). Vysoký záchyt pacientek s hereditární formou EC při genetickém testování indikovaném na základě průkazů MMR-deficientního tumoru a/nebo rodinné anamnézy (22 %) dokladuje oprávněnost námi zvolených kritérií ke genetické konzultaci i skutečnost, že plošné zavedení testování MMR u všech pacientek s nově diagnostikovaným EC napomáhá identifikovat pacientky s dědičnou dispozicí ke vzniku nádorových onemocnění.

Konkordance mezi skutečně absolvovanou léčbou a léčbou doporučenou v návaznosti na zařazení pacientky do rizikové skupiny podle recentních evropských doporučení s využitím molekulárního testování (89 %) je v našem pilotním souboru vysoká, vyšší než např. v holandské studii posuzující compliance lékařů s aplikací doporučených postupů v běžné klinické praxi [14]. Naše pilotní zkušenosti tak dokladují praktickou realizovatelnost nových doporučení pro management pacientek s EC. Vý-

znamnost změn, které tato nová doporučení přináší, ilustruje porovnání s predikcí rizika recidivy podle předchozího DOP_2016 (graf 1) [2] a také detailní charakteristika parametrů, které byly důvodem pro změnu ve stratifikaci rizika u jednotlivých případů (tab. 7).

Hlavním kladem naší pilotní studie je skutečnost, že se jedná o první práci svého druhu vyhodnocující pragmatickou implementaci molekulárního testování do běžné klinické praxe u pacientek s nově diagnostikovaným karcinomem endometria, kdy jsou stanovovány parametry p53 a MMR u všech pacientek a mutační stav genu *POLE* je vyhodnocován pouze u pacientek s nízkým rizikem recidivy onemocnění. Relativním nedostatkem je velikost souboru podmiňená faktem, že se jedná o pilotní studii vyhodnocující dosavadní zkušenosti před případnou modifikací zavedeného postupu.

Závěr

Pilotní analýza našich zkušeností s implementací molekulárního testování u pacientek s nově diagnostikovaným karcinomem endometria dokladuje, že kombinace imunohistochemických analýz proteinů MMR a p53 u všech pacientek a sekvenční analýzy genu *POLE* u pacientek v nízkém riziku je v běžné klinické praxi proveditelné a neprodlužuje dobu nutnou k rozhodnutí o adjuvantní léčbě. Stanovování nových markerů v rámci molekulárního testování pomáhá identifikovat pacientky se špat-

nou, nebo naopak excelentní prognózou (p53-mutované tumory, resp. ultramutované tumory s patogenní variantou genu *POLE*), a lépe tak cílit doporučení stran případné adjuvantní léčby. Samotný výsledek analýzy proteinů MMR sice doposud neměl vliv na volbu optimální strategie v rámci primární léčby, nicméně její plošné provádění u všech pacientek s nově diagnostikovaným karcinomem endometria napomáhá v širším kontextu identifikovat ty pacientky, které jsou nosičkami dědičné dispozice ke vzniku nádorových onemocnění.

Dedikace

Podpořeno MZČR-RVO (FNBr, 65269705).

Literatura

1. Modrá kniha České onkologické společnosti. [online]. Dostupné z: <https://www.linkos.cz/lekar-a-multidisciplinari-tym/personalizovana-onkologie/modra-kniha-cos/aktualni-vydani-modre-knihy/>.
2. Colombo N, Preti E, Landoni F et al. Endometrial cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2013; 24 (Suppl 6): vi33–vi38. doi: 10.1093/annonc/mdt353.
3. The Cancer Genome Atlas Research Network. Integrated genomic characterization of endometrial carcinoma. *Nature* 2013; 497(7447): 67–73. doi: 10.1038/nature12113.
4. Talhouk A, McConechy MK, Leung S et al. A clinically applicable molecular-based classification for endometrial cancers. *Br J Cancer* 2015; 113(2): 299–310. doi: 10.1038/bjc.2015.190.
5. León-Castillo A, de Boer SM, Powell ME et al. Molecular classification of the PORTEC-3 trial for high-risk endometrial cancer: impact on prognosis and benefit from adjuvant therapy. *J Clin Oncol* 2020; 38(29): 3388–3397. doi: 10.1200/JCO.20.00549.
6. Stelloo E, Nout RA, Osse EM et al. Improved risk assessment by integrating molecular and clinicopathological factors in early-stage endometrial cancer-combined analysis of the PORTEC cohorts. *Clin Cancer Res* 2016; 22(16): 4215–4224. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-15-2878.
7. Kommos S, McConechy MK, Kommos F et al. Final validation of the ProMisE molecular classifier for endometrial carcinoma in a large population-based case series. *Ann Oncol* 2018; 29(5): 1180–1188. doi: 10.1093/annonc/mdy058.
8. Concin N, Matias-Guiu X, Vergote I et al. ESGO/ESTRO/ESP guidelines for the management of patients with endometrial carcinoma. *Int J Gynecol Cancer* 2020; 31(1): 12–39. doi: 10.1136/ijgc-2020-002230.
9. Dunder P, Cibula D, Doležel M et al. Molecular testing in endometrial carcinoma – joint recommendation of Czech Oncological Society, Oncogynecological Section of the Czech Gynecological and Obstetrical Society, Society of Radiation Oncology, Biology and Physics, and the Society of Czech Pathologists. *Ceska Gynekol* 2021; 86(4): 264–272. doi: 10.48095/cccc2021264.
10. Talhouk A, McConechy MK, Leung S et al. Confirmation of ProMisE: a simple, genomics-based clinical classifier for endometrial cancer: molecular classification of EC. *Cancer* 2017; 123(5): 802–813. doi: 10.1002/cncr.30496.
11. Bosse T, Nout RA, McAlpine JN et al. Molecular classification of grade 3 endometrioid endometrial cancers identifies distinct prognostic subgroups. *Am J Surg Pathol* 2018; 42(5): 561–568. doi: 10.1097/PAS.00000000000001020.
12. Devereaux KA, Weiel JJ, Pors J et al. Prospective molecular classification of endometrial carcinomas: institutional implementation, practice, and clinical experience. *Mod Pathol* 2022; 35(5): 688–696. doi: 10.1038/s41379-021-00963-y.
13. Temko D, Van Gool IC, Rayner E et al. Somatic *POLE* exonuclease domain mutations are early events in sporadic endometrial and colorectal carcinogenesis, determining driver mutational landscape, clonal neoantigen burden and immune response. *J Pathol* 2018; 245(3): 283–296. doi: 10.1002/path.5081.
14. Eggink FA, Mom CH, Bolland D et al. Compliance with adjuvant treatment guidelines in endometrial cancer: room for improvement in high risk patients. *Gynecol Oncol* 2017; 146(2): 380–385. doi: 10.1016/j.ygyno.2017.05.025.
15. Kurman RJ, Carcangiu ML, Herrington CS et al. WHO classification of tumours of female reproductive organs. International Agency for Research on Cancer 2014.
16. Brierley J, Gospodarowicz MK, Wittekind C et al. TNM klasifikace zhoubných novotvarů. [online]. Available from: <https://dwn.alza.cz/ebook/nahled/pdf2/EK34089>.
17. Colombo N, Creutzberg C, Amant F et al. ESMO-ESGO-ESTRO consensus conference on endometrial cancer: diagnosis, treatment and follow-up. *Radiother Oncol* 2015; 117(3): 559–581. doi: 10.1016/j.radonc.2015.11.013.