

prof. dr hab. n. med. Paweł Krawczyk

Daj sobie szansę!
Nie bój się diagnostyki
molekularnej!



Szczecin 2021

Diagnostyka czynników molekularnych

**w kwalifikacji do leczenia
chorych na miejscowo zaawansowaną
i zaawansowaną postać
niedrobnokomórkowego raka płuca**



Wprowadzenie	4
Pobieranie materiału i badanie patomorfologiczne	5
Badania genetyczne w kwalifikacji do terapii ukierunkowanych molekularnie u polskich chorych na NDRP w stadium IIIB lub IV	8
Badanie ekspresji PD-L1 u chorych na zaawansowanego NDRP w kwalifikacji do immunoterapii	14
Sekwencjonowanie nowej generacji w diagnostyce czynników kwalifikujących do terapii spersonalizowanych u chorych na NDRP	16
Zasady funkcjonowania laboratoriów genetycznych oraz rozliczania badań genetycznych	19
Piśmiennictwo	22

Wprowadzenie

Objawy ze strony układu oddechowego takie jak narastające kaszel, duszność, ból w klatce piersiowej, a także inne symptomy jak np. chudnięcie zwłaszcza u osób palących w wieku po 60 roku życia zawsze powinny nasunąć podejrzenie raka płuca. U takich chorych wymagana jest diagnostyka obrazowa prowadzona za pomocą prześwietlenia klatki piersiowej, a w przypadku utrzymujących się objawów, za pomocą tomografii komputerowej. Tomografia komputerowa klatki piersiowej jest najlepszym badaniem, które może zostać zastosowane w celu wykrycia zmian nowotworowych w płucach. W badaniu tym poszukujemy guza i powiększonych węzłów chłonnych śródpiersia oraz innych nieprawidłowości (np. płynu w ja-

mie opłucnej), mogących sugerować podejrzenie raka płuca. Wykrycie tych zmian nie jest równoznaczne z postawieniem rozpoznania choroby. Powiększone węzły chłonne stwierdza się np. w sarko-

idozie, a niektóre guzki w płucach mogą mieć charakter łagodny. Ponadto w płucach mogą lokalizować się przerzuty nowotworów z innych narządów. Ostateczne rozpoznanie raka płuca jest możliwe tylko w badaniu patomorfologicznym materiału pobranego ze zmian podejrzanych o nowotwór.



prof. dr hab. n. med. **Paweł Krawczyk**

prof. dr hab. n. med.

Paweł Krawczyk

Katedra i Klinika Pneumonologii,
Onkologii i Alergologii Uniwersytetu
Medycznego w Lublinie



Pobieranie materiału i badanie patomorfologiczne

Na podstawie wyniku tomografii komputerowej (lokalizacja zmian) należy zaplanować sposób pobierania materiału do badań patomorfologicznych. W niniejszym opracowaniu zostaną opisane procedury diagnostyczne u chorych na miejscowo zaawansowanego (duży guz z zajęciem licznych grup węzłów chłonnych, stopień IIIB) lub zaawansowanego (choroba nowotworowa z przerzutami odległymi i/lub płynem w jamie opłucnej albo osierdziu, stopień IV) raka płuca. U takich chorych, u których nie jest możliwy radykalny zabieg operacyjny, podstawową metodą pobierania materiału do badań jest bronchoskopia. W chwili obecnej standardem jest stosowanie bronchoskopii z opcją USG wewnątrz-

skrzelowego (ang. *Endobronchial Ultrasound* – EBUS), które umożliwia uwidocznienie zmian (guz, powiększone węzły chłonne) znajdujących się za ścianą oskrzela. Dzięki zobrazowaniu tych zmian można precyzyjnie przeprowadzić ich biopsję za pomocą cienkiej lub grubej igły (ang. *Transbronchial Needle Aspiration* – TBNA). Najczęściej wykonuje się cienkoigłową biopsję aspiracyjną (niskie ciśnienie wytwarzane strzykawką aspiruje komórki do wnętrza igły). Podczas bronchoskopii można także wykonać kriobiopsje (nieliczne pracownie bronchoskopowe wyposażone są w taką aparaturę) oraz pobrać bronchoaspirat lub zmienioną śluzówkę oskrzela za pomocą specjalnych szczypczyków lub szczoteczek.

Do innych metod pobierania materiału u chorych z podejrzeniem miejscowo zaawansowanego lub zaawansowanego raka płuca należy endoskopia przełyku z biopsją cienkoigłową przez jego ścianę (ang. *Endobronchial Ultrasound – Fine Needle Aspiration – EUS-FNA*), biopsja cienkoigłowa przez ścianę klatki piersiowej lub dostępnych powiększonych węzłów chłonnych (np. szyjnych, nadobojczykowych) lub pobranie płynu z jamy opłucnej. Należy pamiętać, że u chorych z podejrzeniem tego typu nowotworu zawsze konieczne jest postawienie ostatecznego rozpoznania, od którego zależy sposób prowadzenia dalszej diagnostyki oraz planowanie metod leczenia. Dlatego też, jeśli z uwagi na lokalizację zmian nie udało się pobrać wiarygodnego materiału do badań (brak komórek nowotworowych w badaniu patomorfologicznym) lub zmiany były poza zasięgiem omówionych metod, trzeba rozważyć możliwość zastosowania procedur chirurgicznych. Do tych metod należy torakoskopia (najczęściej mało inwazyjna opcja

z zastosowaniem wzierników wyposażonych w kamery wideo) lub mediastinoskopia (pobranie węzłów chłonnych śródpiersia) [1].

Uzyskany materiał utrzuwa się niezwłocznie najczęściej w 10% roztworze formaliny. Utrwalanie nie może trwać ani zbyt krótko (mniej niż 6 godzin), ani zbyt długo (powyżej 48 godzin). Niewłaściwe utrwalanie prowadzi do zniszczenia komórek i zawartych w nich kwasów nukleinowych, co może uniemożliwić przeprowadzenie wiarygodnych badań patomorfologicznych i genetycznych. Niestety w Polsce nadal bardzo często procedury utrwalania materiału są prowadzone niewłaściwie. W zakładzie patomorfologii materiał obrabiany jest w specjalnym procesorze tkankowym, a następnie jest zatapiany w parafinie (powstaje tzw. bloczek parafinowy). Tak utrwalony i zarchiwizowany materiał może być przechowywany przez wiele lat. Z bloczka parafinowego przygotowuje się preparaty mikroskopowe, w których wykonywane są odpowiednie barwienia. Obecność i lokalizację oraz rodzaj komórek nowotwo-

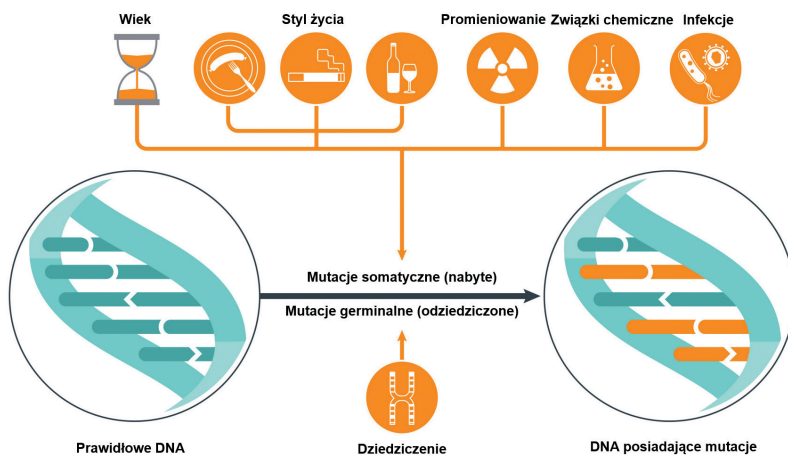




rowych potwierdza barwienie hematoksyliną i eozyną. Na tej podstawie można już zazwyczaj rozpoznać raka niedrobnokomórkowego (NDRP) lub drobnokomórkowego. Badanie to jest jednak zazwyczaj niewystarczające do rozpoznania typu NDRP. Dlatego konieczne jest wykonanie badań immunohistochemicznych (IHC), które wykrywają na powierzchni komórek odpowiednie białka. Podstawowe znaczenie ma tutaj barwienie na obecność białka TTF1 (ang. *Thyroid Transcription Factor 1*) charakterystycznego dla komórek raka gruczołowego oraz na obecność białka p40 lub p63, występujących na komórkach raka płaskonabłonkowego. Dodatni odczyn IHC na obecność jednego z tych markerów umożliwia patomorfologowi postawienie rozpoznania NDRP o immunofenotypie raka gruczołowego lub płaskonabłonkowego. Brak tych markerów sugeruje inny typ NDRP lub przerzutowy charakter zmian (wtedy należy wykonać dodatkowe odczyty IHC, np. na obecność

markera CK20, charakterystycznego dla komórek nowotworów przewodu pokarmowego). Po wykluczeniu przerzutowego charakteru zmian i w przypadku ujemnych odczynów IHC patomorfolog może postawić rozpoznanie NDRP o nieustalonym typie (ang. *Not-Otherwise Specified – NOS*). W małym materiale biopsyjnym nie jest możliwe rozpoznanie raka wielkokomórkowego (ten typ nowotworu może być rozpoznany tylko w dużych materiałach pobranych przez chirurga) [1].

Na podstawie uzyskanego rozpoznania oraz informacji (skierowania) od lekarza onkologa czy pulmonologa diagnozującego i planującego leczenie chorego, patomorfolog musi dodatkowo ocenić zawartość i lokalizację komórek nowotworowych oraz przekazać materiał do dalszych badań czynników kwalifikujących do spersonalizowanych terapii. Od momentu pobrania materiału do jego przekazania nie powinno upłynąć więcej czasu niż 2 tygodnie (10 dni roboczych).



Badania genetyczne w kwalifikacji do terapii ukierunkowanych molekularnie u polskich chorych na NDRP w stadium IIIB lub IV

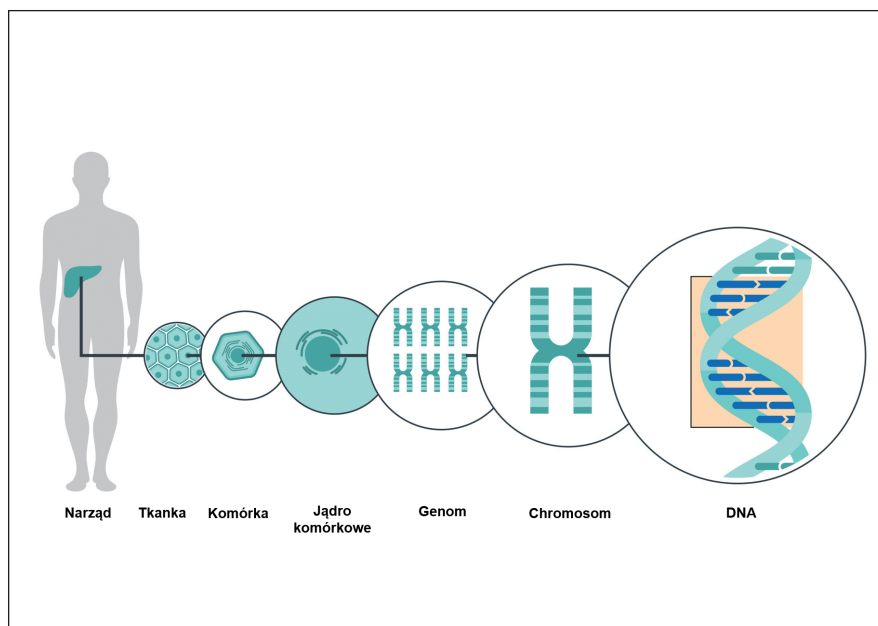
Rodzaj badań genetycznych determinowany jest w Polsce dostępem do refundowanych terapii ukierunkowanych molekularnie, co określa program lekowy B.6. Do badań genetycznych rutynowo wykonywanych u polskich chorych na NDRP o typie innym niż płaskonabłonkowy (najczęściej gruczolowy, ale także NDRP typu NOS) należy ocena mutacji w genie *EGFR* (ang. *Epidermal Growth Factor Receptor*) oraz rearanżacji w genach *ALK* (ang. *Anaplastic Lymphoma Kinase* – *ALK*) i *ROS1*. Częstość występowania tych nieprawidłowości genetycznych w naszej populacji chorych wynosi odpowiednio: 10%, 4,5% oraz 1,5%. Niemal nigdy nie współwystępują one u jednego chorego. Ich wykrycie umożliwia kwalifi-

kację chorych do leczenia inhibitorami kinaz tyrozynowych (IKT) *EGFR*, *ALK* lub *ROS1*. Leki te mają formę doustnych tabletek, a ich zastosowanie powoduje długotrwałe cofanie się zmian nowotworowych (remisję) u 70-80% chorych (dla porównania remisja występuje u 40% chorych otrzymujących chemioterapię i jest zazwyczaj krótkotrwała). Omawiane mutacje i rearanżacje występują tylko w komórkach nowotworowych i nie można ich wykryć w komórkach prawidłowych, w tym w komórkach rozrodczych. Dlatego omawiana grupa zaburzeń molekularnych (tzw. somatycznych) nie jest dziedziczna i nie warunkuje wrodzonej predyspozycji do niedrobnokomórkowego raka płuca [2, 3].

U chorych na płaskonabłonkowego raka płuca badań genetycznych nie wykonuje się rutynowo z uwagi na rzadkie występowania tych nieprawidłowości genetycznych w tym typie nowotworu oraz brak możliwości leczenia terapiami ukierunkowanymi molekularnie u chorych na raka płaskonabłonkowego w ramach programu lekowego B.6. Zalecenie ESMO (ang. *European Society on Medical Oncology*) rekomendują jednak wykonanie badań molekularnych u niepalących chorych na raka płaskonabłonkowego (omawiane zaburzenia genetyczne występują częściej u kobiet i u osób niepalących) [4].

Materiałem do badań genetycznych są zazwyczaj komórki lub tkanki nowotworowe przechowywane w bloczku parafinowym. Jest to ten materiał, z którego postawiono rozpoznanie choroby nowotworowej. Z tych materiałów przygotowuje się preparaty mikroskopowe, w których najpierw ocenia się lokalizację komórek nowotworowych w barwieniu hematoksy-

liną i eozyną. Jeden z tych preparatów zostaje przeznaczony do izolacji DNA w celu badania mutacji w genie *EGFR*. Obowiązuje zasada badania wszystkich mutacji w genie *EGFR* w eksonach 18-21, które występują z częstością >1% wśród wszystkich znanych mutacji *EGFR* (najczęstsze są delecje w eksonie 19 i substytucja L858R). Ekson jest fragmentem DNA danego genu, który koduje białko (w odróżnieniu od intronu, który ma inne funkcje), natomiast delecja oznacza ubytek nukleotydów w łańcuchu DNA, a substytucja zastąpienie jednego nukleotydu innym. Najszybszą i najłatwiejszą techniką badania mutacji w genie *EGFR* jest real-time PCR (ang. *Polymerase Chain Reaction*). Badanie PCR polega na amplifikacji (powieleniu) fragmentu genu, który zawiera mutację i jest prowadzone w czasie rzeczywistym (ang. *real-time*). Narastanie liczby produktów PCR obserwowane jest na bieżąco za pomocą specjalnego oprogramowania. Amplifikacja genu prowadzona jest w odpowiedniej temperatu-

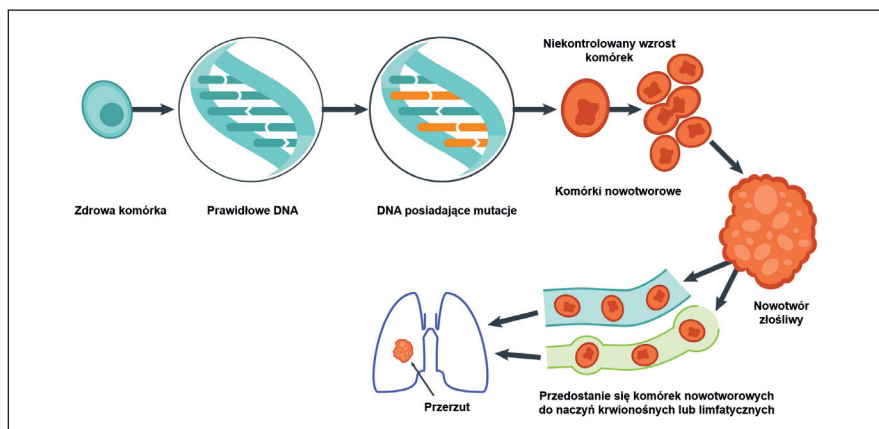


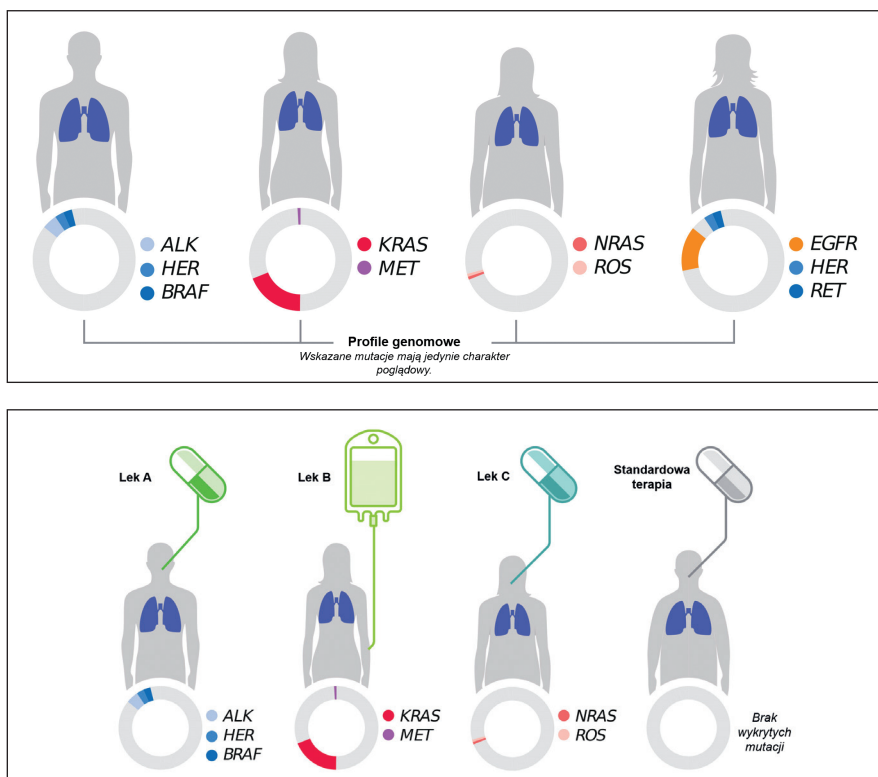
rze za pomocą enzymu polimerazy DNA, a powielany fragment genu jest oznaczony specjalnymi starterami reakcji połączone z barwnikami fluorescencyjnymi. Narastanie fluorescencji oznacza zwiększanie ilości produktu PCR w czasie kolejnych cykli amplifikacji. Czas wykonania badania to 2 dni robocze, chociaż izolację DNA i real-time PCR można przeprowadzić nawet w ciągu 8 godzin pracy [3, 4].

Dotychczas nie było wskazań do badania mutacji w genie *EGFR* u chorych we wczesnych stadiach NDRP operowanych z powodu tej choroby. Podnoszona jest jednak kwestia wykonania tego badania niejako „na zapas” z powodu często występującej wznowy choroby u osób operowanych. Wznowa taka występuje nawet u ponad 50% chorych w stadium IIIA (duży guz i zajęte regionalne węzły chłonne). Biorąc pod uwagę problemy prowadzenia diagnostyki molekularnej w naszym kraju i długi czas oczekiwania na wynik (zostało to opisane w ostatnim rozdziale tego opracowania), u niektórych chorych może istnieć wskazanie do przeprowadzenia badań molekularnych zaraz po zabiegu operacyjnym. Ponadto ostatnio doszło do rejestracji w Unii Europejskiej ozymertynibu – inhibitora *EGFR* 3. generacji do pooperacyjnego leczenia uzupełniającego (adjuwantowego)

u chorych z najczęstszymi mutacjami w genie *EGFR*. Niestety ta opcja terapeutyczna, pomimo jej wybitnej skuteczności w porównaniu do chemioterapii pooperacyjnej, nie jest w Polsce refundowana.

Kolejne z przygotowanych preparatów z materiału przekazanego przez zakład patomorfologii przeznacza się do badania rearanżacji genu *ALK*. W normalnych komórkach brak jest ekspresji *ALK* z uwagi na wyciszenie genu kodującego to białko, co ma miejsce w okresie płodowy. W przypadku rearanżacji genu *ALK*, dochodzi do jego połączenia z innym genem, który jest aktywny transkrypcyjnie (najczęściej jest nim gen *EML-4*). Dochodzi do przepisania (transkrypcji) sekwencji DNA połączonych genów *ALK* i *EML-4* na mRNA a następnie na białko. Fuzyjne białko pojawia się na komórkach nowotworowych. Najszybszą i najłatwiejszą metodą wykorzystywaną w celu wyrycia rearanżacji jest badanie obecności białka *ALK* na powierzchni komórek nowotworowych techniką IHC. W metodzie IHC wykorzystuje się przeciwciała monoklonalne rozpoznające białko *ALK* na powierzchni komórek oraz przeciwciała drugorzędowe rozpoznające przeciwciała połączone z *ALK*. Polimer takich przeciwciał wyznakowany jest enzymem – peroksydazą chrzanową, która zamienia bezbarwny substrat w ko-





lorowy produkt. Reakcję barwną obserwuje się w mikroskopie świetlnym, a samego barwienia dokonuje się w barwiarkach automatycznych. Czas wykonania badania to przeciętnie 3 dni robocze, podczas których wykonuje się barwienie, a następnie patomorfolog ocenia jego efekt

W niektórych przypadkach wynik badania IHC może być niediagnostyczny i wymaga potwierdzenia techniką fluorescencyjnej hybrydyzacji in situ (ang. *Fluorescence in situ Hybridisation* – FISH). Niektóre ośrodki rezygnują w ogóle z badania IHC i oceniają rearanżację genu *ALK* tylko metodą FISH. Badanie FISH jest zdecydowanie bardziej skomplikowane, długotrwałe i kosztowne od badania IHC. Częściej także można się spodziewać wyników niediagnostycznych. Badanie FISH polega na hybrydyza-

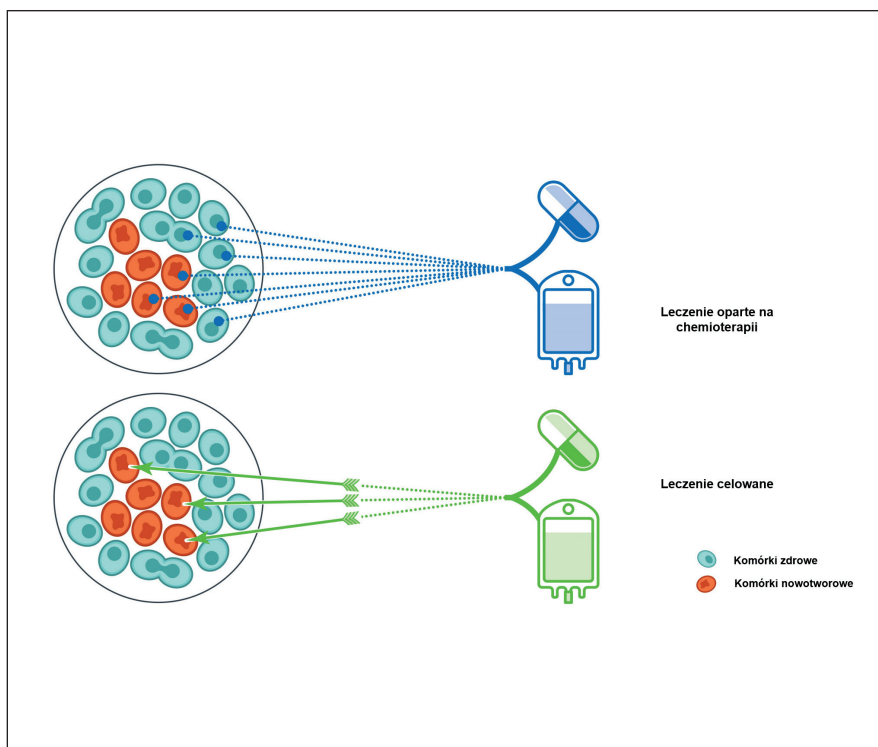
cji (przyłączeniu) sond molekularnych znakowanych fluorochromami do fragmentów DNA zawierających badany gen. Sondy (podobnie jak startery PCR) przyłączają się na zasadzie komplementarności, czyli zgodności kolejności nukleotydów w sondzie i w badanym fragmencie DNA. W przypadku rearanżacji genu *ALK*, dochodzi do przemieszczenia jego fragmentu, a co za tym idzie rozdzielenia sond, które w prawidłowych komórkach łączą się do blisko siebie zlokalizowanych fragmentów genu. Obserwujemy rozdzielone świecenie fluorochromów w mikroskopie fluorescencyjnym. Za dodatni wynik badania FISH przyjmuje się taki, w którym opisano 15% jąder komórkowych z rearanżacją genu *ALK*, przy czym wynikiem wiarygodnym jest taki, w którym przeanalizowano co najmniej 50 jąder ko-

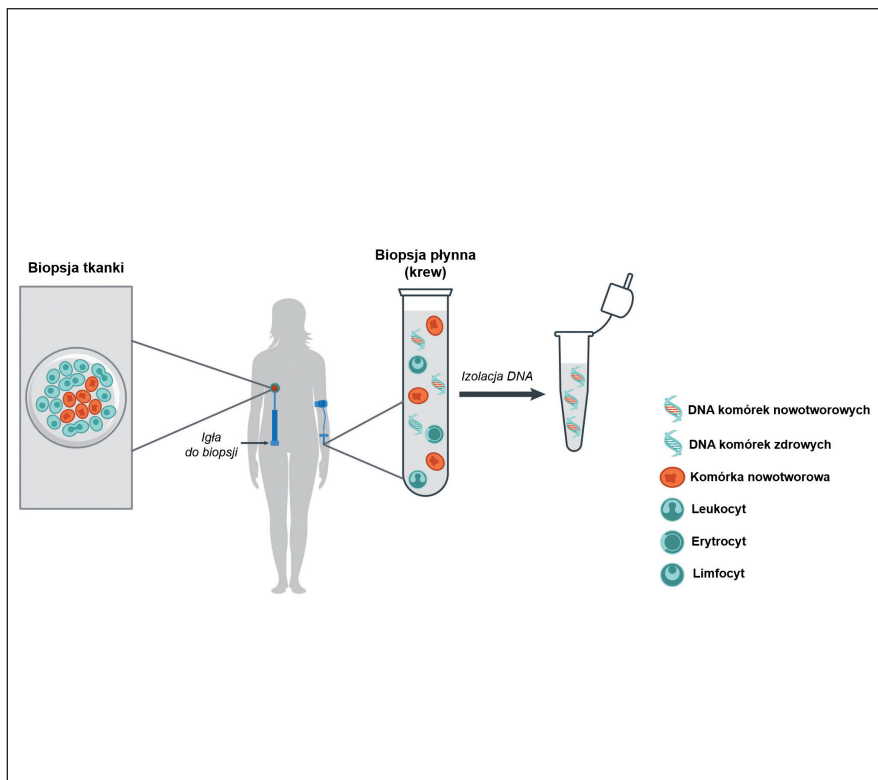
mórek nowotworowych. Czas wykonania badania FISH to 3 dni robocze [3, 4].

Badanie rearanżacji genu *ROS1* przeprowadza się techniką FISH i jest analogicznie wykonywane jak badanie rearanżacji genu *ALK*. W chwili obecnej brak jest zaleceń, które umożliwiłyby badanie obecności rearanżacji tego genu za pomocą techniki IHC [3, 4].

Z uwagi na konieczność przeprowadzenia szybkiej diagnostyki molekularnej, badania genów *EGFR*, *ALK* i *ROS1* oraz ekspresji PD-L1 (opisane w odrębny rozdziale) wykonuje się jednocześnie w kolejnych przygotowanych preparatach mikroskopowych. Komplet wyników ośrodek zlecający badanie powinien otrzymać w czasie nie dłuższym niż 2 tygodnie, ale możliwe jest wykonanie wszystkich badań w ciągu 5 dni roboczych.

Wszystkie trzy geny oraz wiele innych można zbadać jednocześnie techniką sekwencjonowania nowej generacji (ang. *Next Generation Sequencing* – NGS). Metoda ta jest dopuszczona do wykorzystania w programie lekowym B.6 i została opisana w odrębny rozdziale. Technika NGS oraz real-time PCR (ale nie IHC i FISH) mogą również służyć do badań genetycznych płynnej biopsji (krew obwodowa lub płyny z jam ciała). Czułość tych technik wykorzystana do badania płynnej biopsji może nie być jednak wystarczająca do wykrycia nieprawidłowości genetycznych. Należy także pamiętać, że w rutynowej diagnostyce u wcześniej nie leczonych chorych na zaawansowanego NDRP w kwalifikacji do leczenia 1. linii bada się także ekspresję PD-L1 na komórkach nowotworowych techniką IHC. Badanie to nie może być wykonane w płynnej

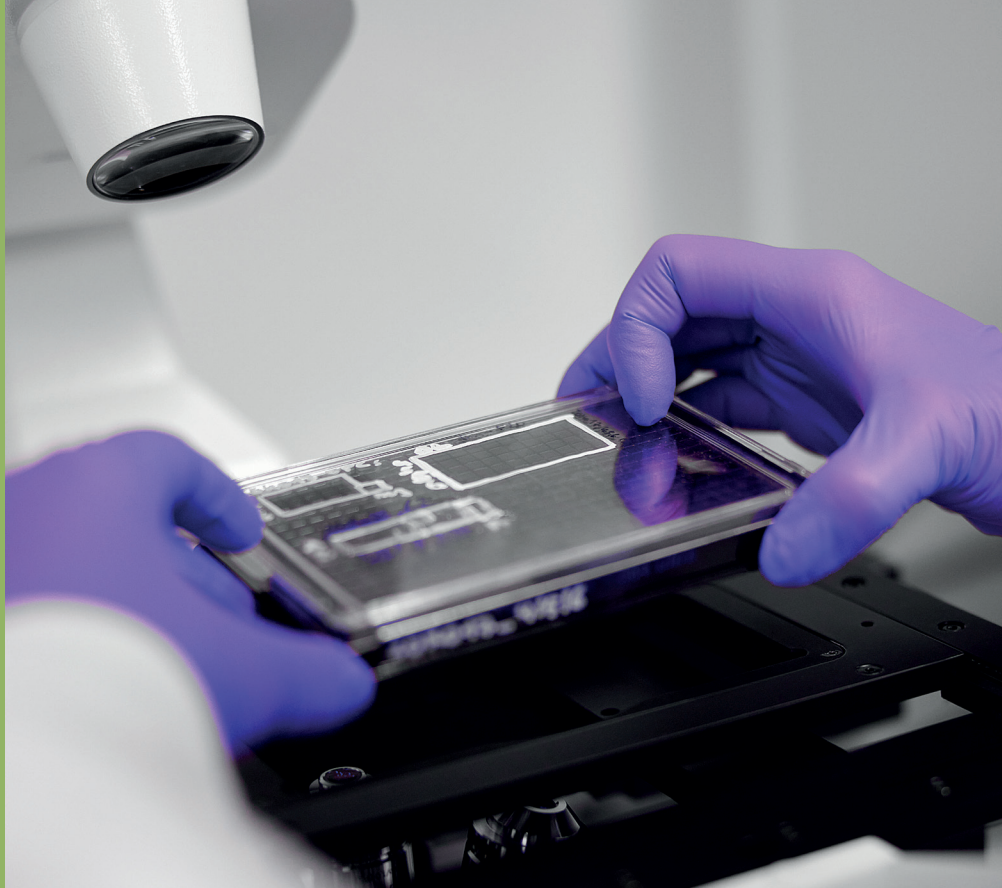




biopsji. Dlatego wykorzystanie tego materiału w rutynowej diagnostyce w kwalifikacji wcześniej nie leczonych chorych do leczenia systemowego 1. linii budzi duże kontrowersje. W związku z tym u takich chorych należy zawsze dążyć do uzyskania wiarygodnego materiału pobranego z guza, przerzutów do węzłów chłonnych lub przerzutów odległych, który jest przekazywany do diagnostyki molekularnej [2, 3, 4].

Natomiast płynna biopsja jest rutynowo wykorzystywana do diagnostyki mutacji T790M w eksonie 20 genu *EGFR* u chorych progresujących po początkowo skutecznym leczeniu IKT *EGFR* starszej generacji. W przypadku wykrycia tej mutacji (ponad 50% chorych) możliwe jest leczenie 2. linii za pomocą IKT *EGFR* trzeciej generacji – ozymertynibu, który jest refundowa-

ny w Polsce w ramach programu lekowego B.6. U takich chorych z krwi obwodowej izoluje się wolne krążące DNA (ang. *circulating free DNA* – cfDNA). Następnie ocenia się obecność mutacji technikami PCR lub NGS. Niestety ich czułość wynosi tylko od 50% do 90%. Zaletą badania płynnej biopsji jest możliwość jej kilkukrotnego powtórzenia, co wykorzystuje się u chorych z niewykrytą mutacją T790M w obawie przed wynikami fałszywie ujemnymi. Niemniej jednak kilkukrotny negatywny wynik tego badania powinien być potwierdzony w materiale pobranym z guza czy przerzutów odległych lub do węzłów chłonnych za pomocą techniki real-time PCR lub NGS. Z drugiej strony wynik pozytywny badania mutacji T790M uzyskany w płynnej biopsji zawsze kwalifikuje do leczenia [2, 3, 4].



Badanie ekspresji PD-L1 u chorych na zaawansowanego NDRP w kwalifikacji do immunoterapii

Ekspresja PD-L1 (ang. Programmed Death Ligand 1) na komórkach nowotworowych jest obecnie jedynym zaakceptowanym markerem użytecznym w kwalifikowaniu chorych na NDRP w stopniu IV do immunoterapii pembrolizumabem lub chemioimmunoterapii z udziałem pembrolizumabu w ramach programu lekowego B.6.

Chorych na raka płaskonabłonkowego można kwalifikować do tego rodzaju leczenia bez konieczności wykonania dodatkowych badań molekularnych. Natomiast u chorych na NDRP o typie innym niż płaskonabłonkowy należy wykluczyć obecność mutacji w genie *EGFR* oraz rearanżacji genów *ALK* i *ROS1* [3, 4].

Badanie ekspresji PD-L1 na komórkach nowotworowych przeprowadza się w tym samym materiale, w którym patomorfolog rozpoznał chorobę nowotworową i w którym wykonano badania molekularne (kolejnie przygotowane preparaty mikroskopowe). Jedyną techniką zaakceptowaną do badania tego markera jest metoda IHC wykonywana analogicznie jak w przypadku badania białka ALK. Inaczej jednak wygląda interpretacja wyników. Patomorfolog w przypadku oceny ekspresji PD-L1 zobowiązany jest podać odsetek komórek, które posiadają na swojej powierzchni PD-L1 (w przypadku badania ALK wystarczy stwierdzenie, że białko to było obecne na komórkach nowotworowych). Wy-

krycie ekspresji PD-L1 na ponad 50% komórek nowotworowych kwalifikuje chorych na NDRP w IV stopniu zaawansowania do monoterapii pembrolizumabem. U chorych z ekspresją PD-L1 na <50% komórek nowotworowych możliwe jest zastosowanie chemioimmunoterapii. Precyzyjne opisanie odsetka komórek nowotworowych z ekspresją PD-L1 jest istotne z uwagi na fakt pojawiania się innych metod immunoterapii, które mogą być stosowane u chorych z ekspresją PD-L1 na ponad 1% komórek nowotworowych (opcje terapeutyczne na razie nie refundowane w Polsce). Czas wykonania badania ekspresji PD-L1 nie powinien przekraczać 3 dni roboczych.





Sekwencjonowanie nowej generacji w diagnostyce czynników kwalifikujących do terapii spersonalizowanych u chorych na NDRP

NGS jest najnowocześniejszą technologią wykorzystywaną w diagnostyce czynników predykcyjnych (warunkujących skuteczność leczenia) u chorych na nowotwory. Jest też technologią najbardziej skomplikowaną i najdroższą oraz obciążoną dużym odsetkiem wyników niediagnostycznych lub niejednoznacznych. Procedura ta jest kilkudniowa, a laboratoria zwykle zastrzegają sobie prawo do wydawania wyników badania NGS nie wcześniej niż po 3-4 tygodniach od otrzymania materiału. Do jej wykonania i w interpretacji wyników (analiza bioinformatyczna) niezbędne jest olbrzymie doświadczenie. W Polsce jest tylko kilka ośrodków specjalizujących się badaniu NGS u chorych na nowotwory, dlatego dostępność do tego badania nie jest jeszcze powszechna [3]

Masowe równoległe sekwencjonowanie przeprowadza się w DNA

i mRNA wyizolowanym z materiału, w którym przeprowadzono diagnostykę patomorfologiczną lub w cfDNA i cfmRNA z płynnej biopsji. Zaletą NGS jest oszczędność materiału – jednocześnie bada się wiele genów i nie trzeba przygotowywać kolejnych preparatów, co jest szczególnie istotne w przypadku ubogokomórkowych biopsji cienkoigłowych. mRNA musi zostać przepisane na komplementarne DNA w procesie odwrotnej transkrypcji. Wymagana jest najwyższa jakość kwasów nukleinowych, co w polskich warunkach często jest nieosiągalne (fragmentacja DNA, a zwłaszcza mRNA w czasie zbyt długiego lub niewłaściwego utrwalania). Ta sytuacja może powodować, że nawet u 25% chorych diagnozowanych za pomocą NGS i tak konieczne będzie wykorzystanie testów jednogennych (real-time PCR, FISH), co znacząco wydłuży czas oczekiwania na wyniki badań [3].

Uzyskane do badania NGS kwasy nukleinowe są odpowiednio cięte na mniejsze fragmenty i tworzona jest tzw. „biblioteka” genetyczna. Następnie fragmenty te są równolegle sekwencjonowane w sekwenatorze (odczytywana jest kolejność nukleotydów w każdym fragmencie). Skomplikowana analiza bioinformatyczna pozwala na połączenie uzyskanych informacji o kolejności nukleotydów w całość. W praktyce klinicznej najczęściej wykorzystuje się sekwencjonowanie wybranych kilkunastu-kilkudziesięciu genów (tzw. sekwencjonowanie targetowe). Odczytuje się pełną sekwencję genu (regiony promotorowe, introny i eksony), co umożliwia identyfikację znanych (wykrywanych techniką real-time PCR) nieprawidłowości genetycznych, ale też innych rzadszych wariantów. W przypadku rzadkich wariantów pojawia się problem identyfikacji ich znaczenia klinicznego. Nierzadkie takie znaczenie (np. predyspozycja do rozwoju choroby albo do aktywności terapii) nie zostało określone (ang. *Variant of Unknown Significance*

– VUS). W innych przypadkach takie zmiany nie mają żadnego znaczenia klinicznego (np. rzadkie warianty polimorfizmów genetycznych). Bardziej skomplikowaną wersją sekwencjonowania nowej generacji jest profilowanie genomu kilkuset genów (ang. *Comprehensive Genomic Profiling* – CGP). Dzięki tej metodzie uzyskujemy informacje o polimorfizmach, mutacjach i rearanżacjach genetycznych, zaburzeniach liczby kopii genów oraz obciążeniu mutacjami komórek nowotworowych (ang. *Tumor Mutation Burden* – TMB). Są próby stosowania immunoterapii u chorych na NDRP z wysokim TMB. Najbardziej skomplikowane, ale mało przydatne w rutynowej diagnostyce genetycznej jest sekwencjonowanie wszystkich sekwencji kodujących tzw. eksomów (ang. *Whole Exome Sequencing* – WES) oraz sekwencjonowanie całego genomu (ang. *Whole Genome Sequencing* – WGS) [3].

W myśl programu lekowego B.6 sekwencjonowanie nowej generacji może być wykorzystane do badania rearanżacji genów





ALK i *ROS1*. Program lekowy nie precyzuje jaką metodą ma zostać zbadany gen *EGFR*. Określono tylko, że mają to być wiarygodne i zwalidowane metody, do których NGS może należeć pod warunkiem jego prawidłowego wykonania i prawidłowego utrwalenia materiału patomorfologicznego. Należy jednak pamiętać, że metodą NGS można wykryć wiele nieprawidłowości i wariantów genetycznych, w tym takie, które kwalifikują do leczenia zarejestrowanego w Unii Europejskiej lub w USA, a nie refundowanego w Polsce. Do najważniejszych z nich zaliczamy: mutacje w okolicy eksonu 14 genu *MET*, mutacje w kodonie 600 genu *BRAF*, mutacja G12C w genie *KRAS*, rearanżacje genów *NTRK 1-3* oraz rearanżacje genu *RET*. Te nieprawidłowości genetyczne mogą być wykryte nawet u 20% chorych na NDRP. Ponadto w wyniku NGS mogą się pojawić zmiany genetyczne kwalifikujące chorych do udziału w badaniach klinicznych. W pierwszym przypadku istnieją ograniczo-

ne i skomplikowane możliwości uzyskania dostępu do terapii w ramach funduszu medycznego (ratunkowego dostępu do technologii lekowych). Wypisanie odpowiednich wniosków wymaga zaangażowania i kompetencji ze strony lekarza planującego takie leczenie. W drugim przypadku chory musi pozostawać w bardzo dobrym stanie sprawności, umożliwiającym mu podróżowanie po kraju a nawet za granicę w poszukiwaniu odpowiedniego badania klinicznego z eksperymentalnymi lekami. Kolejnym problemem jest możliwość przypadkowego wykrycia w badaniu NGS (w technologii CGP bądź wyższych) mutacji germinalnych (dziedzicznych), warunkujących np. dziedziczną skłonność do chorób nowotworowych. W związku z tym chory powinien podpisać odpowiednią zgodę na badanie, a lekarz (w tym przypadku genetyk kliniczny) powinien brać pod uwagę konieczność prowadzenia opieki także nad członkami rodziny chorego [2, 3, 4].



Zasady funkcjonowania laboratoriów genetycznych oraz rozliczania badań genetycznych

W myśl zapisów Ustawy o diagnostyce laboratoryjnej, Rozporządzeniu Ministra Zdrowia z dnia 19 sierpnia 2015 roku oraz programu lekowego B.6, laboratoria genetyczne muszą być wpisane do rejestru Krajowej Rady Diagnostów Laboratoryjnych. Kierownikiem laboratorium jest specjalista z laboratoryjnej genetyki medycznej. Laboratoria powinny używać metod odpowiednio zwalidowanych, najlepiej z certyfikatem do diagnostyki *in vitro* (ang. *In Vitro Diagnostic* – IVD). Laboratoria diagnostyczne podlegają okresowej kontroli ze strony NFZ i konsultantów wojewódzkich (w praktyce odbywa się to niezmiennie

rzadko). Laboratoria muszą wziąć udział i uzyskać certyfikat pozytywnego ukończenia europejskiego programu zewnątrzlaboratoryjnej kontroli jakości prowadzonych badań. Kontrole jakości polegają na badaniu genetycznym zaślepionych materiałów zawierających komórki lub DNA nowotworowe, które są dostarczane przez organizatorów takich programów. Corocznej kontroli podlega jakość badania każdego genu, który ocenia laboratorium (w praktyce komplet aktualnych certyfikatów posiadają tylko laboratoria świadczące usługi na rzecz co najmniej kilku szpitali w kraju) [2, 5, 6].

W Polsce istnieją dwa modele sposobu prowadzenia kompleksowej diagnostyki czynników predykcyjnych. Duże szpitale kliniczne i centra onkologii posiadają własne zakłady patomorfologii i laboratoria genetyczne. W tym przypadku jednostki te świadczą usługi dla własnych chorych kwalifikowanych do leczenia lub dla nielicznych innych małych szpitali, które podpisały z nimi umowy. Diagnostyka ekspresji PD-L1 i czasami ALK metodą IHC odbywa się wtedy w rodzimym zakładzie patomorfologii, a badania genetyczne, w tym często NGS, w rodzimym laboratorium genetycznym bez konieczności skomplikowanego przesyłania materiału do badań i skierowań. Niestety w Polsce rocznie na raka płuca choruje 22 000 osób, a połowa z nich wymaga diagnostyki czynników predykcyjnych. Pacjenci ci są diagnozowani w mniejszych szpitalach nieposiadających zaplecza w postaci zakładu patomorfologii i laboratorium genetycznego. W celu prowadzenia diagnostyki szpitale takie podpisują umowy z komercyjnymi zakładami patomorfologii i laboratoriami genetycznymi.

W tej sytuacji rozpoczyna się skomplikowany i nieujednolicony proces zlecania badań genetycznych. Najczęściej po uzyskaniu wyniku badania patomorfologicznego lekarz onkolog lub pulmonolog zwraca się z prośbą o wypożyczenie bloczka do zakładu patomorfologii. Po jakimś czasie bloczek trafia na biurko lekarza lub, w bardziej optymistycznym wariacie, do laboratorium genetycznego, jeśli taka metoda przebiegu materiału została wypracowana. Czas potrzebny na dostarczenie bloczka parafinowego do laboratorium genetycznego często przekracza 1 miesiąc. Jeśli zsumujemy czas do uzyskania wyniku badania patomorfologicznego, czas procedur wypożyczenia bloczka oraz czas do uzyskania wyniku badania genetycznego, to często chory diagnozowany jest przez okres 3 miesięcy. W tym miejscu należy przypomnieć, że czas na przeprowadzenie specjalistycznej diagnostyki w ramach Karty Diagnostyki i Leczenia Onkologicznego (DiLO) wynosi 28 dni. Czas ten liczy się od dnia pobrania materiału (np. bronchoskopii) do dnia rozpoczęcia leczenia.





Badania genetyczne w chorobach nowotworowych w kwalifikacji do leczenia są dla polskich chorych refundowane. Sposób refundacji reguluje Zarządzenie Prezesa NFZ nr 118/2021/DSOZ. Przepisy często ulegają zmianom. Obecnie pojedyncze badanie mutacji w genie *EGFR* wycenione jest na 649 zł (badanie proste), badanie FISH rearanżacji genu *ALK* lub *ROS1* – na 1298 zł (badanie złożone) oraz badanie NGS – na 2434 zł (badanie zaawansowane). Szpitale wystawiając rozliczenie kosztów badań genetycznych do NFZ nie mogą sumować tych cen (rozlicza się tylko jedno, najdroższe badanie). Badania immunohistochemiczne nadal nie są refundowane przez NFZ. Wymienione kwoty są niskie, ale wystarczające na pokrycie kosztów badań. Dlatego też

szpitale prowadzące diagnostykę raka płuca powinny zadbać o jej kompleksowość i zapewnić dostęp chorym kwalifikującym się do leczenia do diagnostyki genetycznej. W żadnym przypadku chory nie powinien ponosić kosztów rutynowej diagnostyki czynników predykcyjnych (mutacje w genie *EGFR*, rearanżacje genów *ALK* i *ROS1*, ekspresja PD-L1). Sprawa jest bardziej skomplikowana, jeśli chodzi o diagnostykę prowadzoną metodą NGS. Z uwagi na niewielką dostępność aparatury NGS nie ma w Polsce możliwości wykorzystania tej metody u wszystkich chorych (około 10 000 pacjentów). Istnieją możliwości komercyjnego wykonania badania NGS zagranicą. Koszt takiego badania waha się od 4 500 do 8 500 zł w zależności od liczby badanych genów [7].

Piśmiennictwo

1. Langfort R. Rola badań patomorfologicznych w wyborze metody leczenia raka płuca. Onkologia po Dyplomie. 2016. <https://www.onkologiapodyplomie.pl>
2. Ministerstwo Zdrowia. Programy lekowe. Choroby onkologiczne. <https://www.gov.pl/web/zdrowie/choroby-onkologiczne>
3. Krawczyk P. Amerykańskie zalecenia dotyczące badań genetycznych w kwalifikacji chorych na raka płuca do terapii inhibitorami kinaz tyrozynowych. Onkol Prakt Klin Edu. 2019; 5(3): 197-206.
4. Planchard D, Popat S, Kerr K i wsp. Metastatic non-small cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. <https://www.esmo.org/content/download/347819/6934778/1/ESMO-CPG-mNSCLC-15SEPT2020.pdf>
5. Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 19 sierpnia 2015 r. zmieniające rozporządzenie w sprawie standardów jakości dla medycznych laboratoriów diagnostycznych i mikrobiologicznych. Dz. U. z 2015 r. poz 1372.
6. Ustawa z dnia 27 lipca 2001 roku o diagnostyce laboratoryjnej Dz. U. z 2021 r. poz. 866, 1559.
7. Zarządzenie Prezesa NFZ nr 118/2021/DSOZ <https://www.nfz.gov.pl/zarzadzenia-prezesa/zarzadzenia-prezesa-nfz/zarzadzenie-nr-1182021dsoz,7380.html>





Stowarzyszenie Walki z Rakiem Płuca

Osoby chore na nowotwór płuca otacza swoją opieką Stowarzyszenie Walki z Rakiem Płuca. Stowarzyszenie powstało w 1994 roku w Gdańsku. Jego założycielem jest profesor Jan Skokowski. Szczeciński Oddział Stowarzyszenia powstał w roku 2008 r. z inicjatywy Anny Żyłowskiej –pacjentka od lat zmagająca się z chorobą.

Misją Stowarzyszenia jest przede wszystkim poprawa sytuacji pacjentów chorych na raka płuca. Stowarzyszenie chce zwrócić uwagę społeczeństwa na zagrożenia wpływające na zwiększoną zachorowalność na nowotwór płuca oraz zjednoczyć pacjentów, opiekunów, specjalistów w dziedzinie ochrony zdrowia, polityków i przedstawicieli ochrony zdrowia w walce z tą chorobą.

Udzielamy praktycznego i emocjonalnego wsparcia pacjentom i ich bliskim, promujemy profilaktykę raka płuca i zdrowy tryb życia, prowadzimy akcje edukacyjne, wydajemy broszury dla pacjentów, szerzymy wiedzę na temat nowoczesnych terapii i prowadzimy działania mające na celu poprawienie dostępu do nich.

Zapraszamy chorych, rodziny i osoby wspierające do kontaktu z nami. Zawsze służymy rada i pomocą.

Dane teleadresowe:

Stowarzyszenie Walki z Rakiem Płuca Oddział Szczecin

Al. Jana Pawła II 42 71-415 Szczecin

Tel. 91 813 62 88

www.szczecin.rakpluca.pl, stowarzyszenie@rakpluca.szczecin.pl, poczta@rakpluca.szczecin.pl

nr KRS 0000663608 i nr konta 59 1140 2004 0000 3102 7674 2192

Podziękowania dla:

Profesora Pawła Krawczyka
za tekst, zaangażowanie i pomoc w opracowaniu broszury

Broszura powstała dzięki wsparciu firm:



Roche POLSKA



Opracowanie projektu graficznego
oraz skład komputerowy broszury:



Marcin Sieradzan (Red Griffin)
www.facebook.com/redgriffin001

wydawca:

Stowarzyszenie Walki z Rakiem Płuca Oddział Szczecin



www.rakpluca.szczecin.pl
www.facebook.com, Stowarzyszenie Walki z Rakiem Płuca
70-415 Szczecin, Al. Jana Pawła II 42, tel. 91 813 62 88
nr KRS 0000663608