

# Słowo wstępne

---

Szanowni Państwo,

Oddajemy w Państwa ręce kolejne wydanie „W gabinecie lekarza specjalisty” poświęcone onkologii. Tym razem poruszamy problemy związane ze stosowaniem terapii ukierunkowanych molekularnie u chorych na niedrobnokomórkowego raka płuca (NDRP). To wydanie jest w pewnym stopniu kontynuacją publikacji, która ukazała się w 2019 roku pod redakcją prof. Dariusza M. Kowalskiego. W tamtym zeszycie zostały omówione inhibitory osi EGFR (ang. *epidermal growth factor receptor*) w leczeniu niedrobnokomórkowego raka płuca. Tym razem opisujemy pozostałe terapie ukierunkowane na inne niż EGFR cele molekularne, w tym przede wszystkim na nieprawidłowe białka szlaków sygnałowych komórek nowotworowych: ALK (ang. *anaplastic lymphoma kinase*), ROS1, NTRK (ang. *neurotrophic receptor tyrosine kinase*) i BRAF. Przedstawiamy także metodologię badań molekularnych stosowanych w celu wykrycia nieprawidłowości w genach *ALK*, *ROS1*, *NTRK*, *BRAF* i innych oraz molekularne przyczyny oporności na terapie ukierunkowane molekularnie. Jak wynika z tego krótkiego opisu, dołożyliśmy wszelkich starań, aby to wydanie „W gabinecie lekarza specjalisty” mogło zainteresować jak najszersze grono specjalistów. Choć jest ono dedykowane przede wszystkim onkologom klinicznym, to poruszamy w nim szereg tematów, które mogą zainteresować także genetyków, patomorfologów i pulmonologów.

„W gabinecie lekarza specjalisty” jest wydawnictwem adresowanym do konkretnych lekarzy, którzy mają bardzo szeroką i ugruntowaną wiedzę w swojej dziedzinie. Omówienie problemów dotyczących skuteczności i bezpieczeństwa stosowania inhibitorów ALK i ROS1 wydaje się mieć największą wartość praktyczną dla Czytelników, gdyż terapie te są zarejestrowane i dostępne w Polsce. Specjalistów biorących do ręki to wydanie „W gabinecie lekarza specjalisty” mogą zdziwić rozdziały o terapiach w Polsce nierefundowanych oraz o trudno dostępnych, kosztownych i skomplikowanych metodach diagnostycznych, takich jak sekwencjonowanie nowej generacji (ang. *next generation sequencing* – NGS). Wydaje się, że te informacje nie mają większej wartości praktycznej. W mojej opinii

nie jest to jednak prawda. Po pierwsze niektóre z omówionych terapii są zarejestrowane w krajach Unii Europejskiej, ale nie zostały refundowane w Polsce (np. inhibitory BRAF, MEK i NTRK). W przypadku wykrycia takich nieprawidłowości genetycznych polscy chorzy na NDRP mogą liczyć na dostęp do tych nowoczesnych metod leczenia dzięki programom ratunkowego dostępu do technologii medycznych (RDTL). Po drugie większość dobrych ośrodków onkologicznych i pulmonologicznych prowadzi badania kliniczne z nowymi cząsteczkami (np. inhibitory KRAS, NTRK, MET i inne). Udział w takich badaniach daje predysponowanym genetycznie chorym na NDRP szansę na długotrwałą remisję. Po trzecie technologia NGS wcale nie jest tak niedostępna, jak mogłoby się wydawać. Kilka polskich laboratoriów zaczyna już rutynowo wykonywać badania NGS u wybranych chorych, co umożliwia równoczesne wykrycie u nich różnych nieprawidłowości genetycznych w komórkach nowotworowych i kwalifikację do terapii w ramach programów lekowych, RDTL lub badań klinicznych. Wielu polskich chorych decyduje się na komercyjne wykonanie badania NGS, najczęściej w zagranicznych laboratoriach genetycznych. Polscy specjaliści onkologii, pulmonologii czy genetyki klinicznej stają przed problemem interpretacji wyników NGS i konsultacji chorych pod kątem dostępności terapii w Polsce, ale także w krajach sąsiednich.

To krótkie wprowadzenie uzmysławia, jak ważny i interdyscyplinarny jest problem onkologicznych terapii ukierunkowanych molekularnie, opisanych w tym wydaniu „W gabinecie lekarza specjalisty”. Mam nadzieję, że Czytelnicy znajdą dla siebie, wśród tej różnorodności artykułów, informacje przydatne w rutynowej praktyce lekarskiej. Miłej lektury.

Prof. dr hab. n. med. Paweł Krawczyk

# Sekwencjonowania nowej generacji (NGS) w kwalifikacji do terapii ukierunkowanych molekularnie i immunoterapii u chorych na nowotwory

Dr n. med. Anna Grenda

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

## WPROWADZENIE

Sekwencjonowanie nowej generacji (ang. *next generation sequencing* – NGS) jest zaawansowaną techniką badawczo-diagnostyczną. Jej rozwój przyczynił się do sytuacji klinicznej, w której możemy uzyskać bardzo dużą ilość informacji na temat zmian genetycznych w komórkach nowotworowych, których obecność może umożliwić zastosowanie terapii spersonalizowanych u chorych onkologicznych. Sekwencjonowanie Sangera (inaczej sekwencjonowanie bezpośrednie), nazywane obecnie sekwencjonowaniem pierwszej generacji, umożliwia odczyt sekwencji nukleotydowej pojedynczego fragmentu genu, co przed erą NGS było zaawansowaną techniką o dość dużej rozdzielczości. Jednak do przeprowadzenia wiarygodnego badania sekwencjonowania bezpośredniego wymagany jest wysoki odsetek komórek nowotworowych ( $\geq 50\%$ ), aby wykrytą zmianę genetyczną można było zakwalifikować jako prawdziwie pozytywną. Ponadto analiza w sekwencjonowaniu metodą Sangera ogranicza się do wybranych odcinków genów, co może być niewystarczające w diagnostyce chorób nowotworowych z udowodnionym występowaniem wielu różnych zmian genetycznych w różnych odcinkach całego genomu. Między innymi z tego względu opracowywano technologię umożliwiającą jednoczesowe (w jednym badaniu, „w jednej próbówce”) poszukiwanie wszystkich zmian genetycznych w szerokich obszarach genomu, których obecność uprawnia do wdrożenia nowoczesnych terapii personalizowanych u chorych onkologicznych.

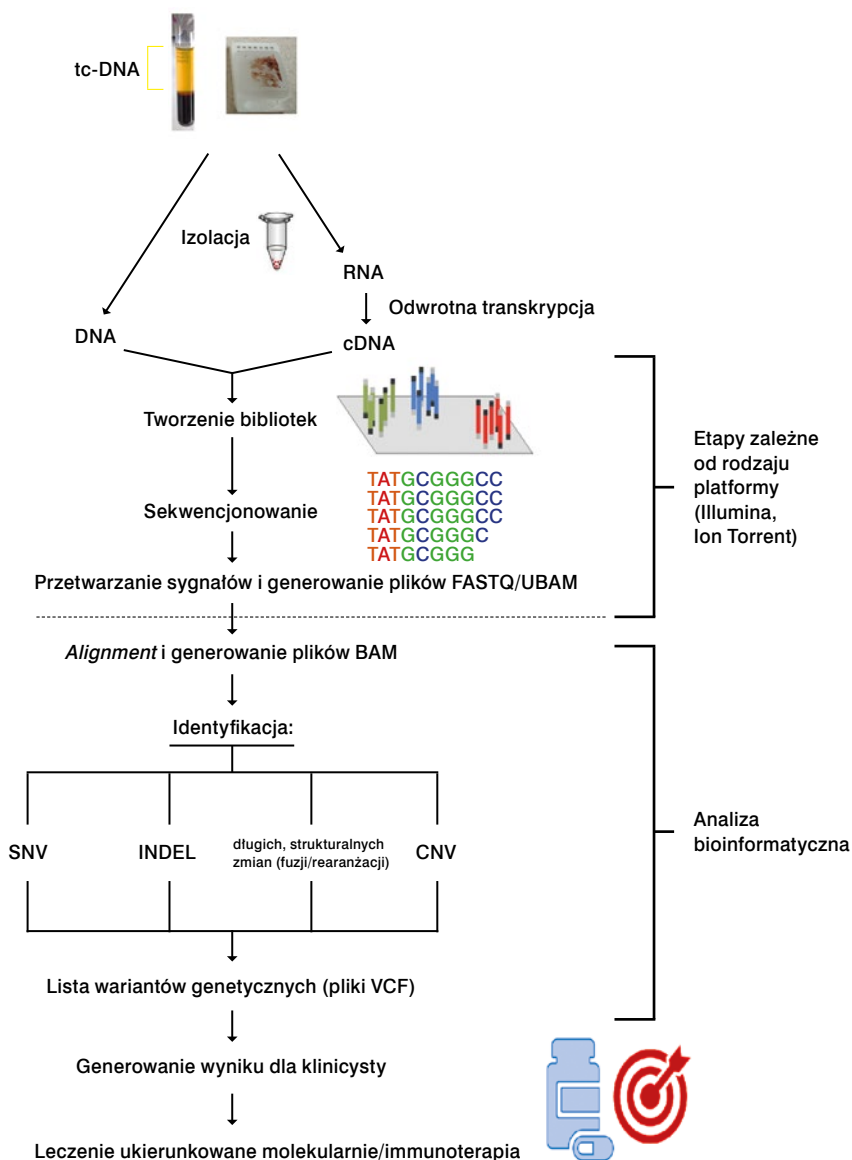
Terapie ukierunkowane molekularnie (ang. *molecularly targeted therapies*) mają udowodnioną skuteczność w przedłużaniu życia chorych na nowotwory, poprawy jego jakości, przy jednoczesnym minimalizowaniu dra-

stycznych efektów ubocznych, jakie są związane ze stosowaniem chemioterapii. Terapie ukierunkowane molekularnie są skuteczne tylko u chorych, u których w komórkach nowotworowych doszło do istotnych zaburzeń genetycznych, najczęściej mutacji (ang. *driver mutations*) lub rearanżacji genowych. Te nieprawidłowości powodują powstanie nadmiernie aktywnych receptorów komórek nowotworowych lub wewnątrzkomórkowych białek sygnałowych. Najczęściej dochodzi do spontanicznej nadaktywności enzymu kinazy tyrozynowej w wewnątrzkomórkowej części receptorów powierzchniowych. Zastosowanie inhibitorów kinaz tyrozynowych (IKT) u chorych z mutacjami lub rearanżacjami w genach kodujących receptory powierzchniowe (domenę kinazy tyrozynowej) zrewolucjonizowało możliwości terapeutyczne u chorych na nowotwory, zwłaszcza u chorych na niedrobnokomórkowego raka płuca (NDRP).

Na bazie pojęcia „targeted treatment” pojawił się termin „targeted sequencing”, określający badanie zmian genetycznych techniką NGS, ukierunkowane na wybrane geny czy ich fragmenty, których sekwencję można odczytać jednocześnie z dużą czułością i specyficznością przy minimalnej ilości dostępnego materiału do badania. Przy zastosowaniu techniki NGS możemy sekwencjonować cały genom (ang. *whole genome sequencing* – WGS), tylko sekwencje kodujące, czyli eksom (ang. *whole exome sequencing* – WES) lub, jak już wspomniano wcześniej, tylko wybrane geny lub ich fragmenty (NGS typu Hot Spot, *targeted sequencing*) (tab. 1). Niemniej jednak przeprowadzenie tego badania oparte jest na pewnych, niezmiennych etapach (ryc. 1). Ważne jest też, jaką technologią sekwencjonowania dysponuje laboratorium. Obecnie dwie najważniejsze platformy mają zastosowanie w onkologii klinicznej: Illumina oraz Ion Torrent. Systemy Illumina są oparte na fluorescencyjnym systemie detekcji pojedynczych nukleotydów, natomiast technologia Ion Torrent – na pomiarze pH, które zmienia się przy włączaniu kolejnych nukleotydów do nici DNA podczas sekwencjonowania.

## MATERIAŁ DO BADANIA NGS

Podstawowym materiałem do badania w technice NGS są tkanki nowotworowe lub komórki zatopione i utrwalone w parafinie (ang. *formalin-fixed, paraffin-embedded* – FFPE). Wykorzystanie materiałów FFPE niesie ze sobą pewne wyzwania dotyczące jakości wyizolowanych kwasów nukleinowych (DNA i RNA). Od ich jakości uzależnione jest pomyślne sekwencjonowanie i uzyskanie wiarygodnych wyników. Pobrany materiał z guza nowotworowego w rutynowej praktyce patomorfologicznej jest prawie zawsze utrwalany w formalinie w celu wykonania barwienia H & E



tc-DNA (ang. *tumor, circulating DNA*) – wolnokrążące, nowotworowe DNA; cDNA (ang. *complementary DNA*) – DNA przepisane z sekwencji RNA; FASTQ, UBAM, BAM – bioinformatyczny zapis sekwencji nukleotydowej, odczytanej podczas sekwencjonowania; Alignment – bioinformatyczne wyrównywanie sekwencji odczytanych podczas sekwencjonowania; SNV (ang. *single nucleotide variant*) – zmiana pojedynczego nukleotydu; INDEL – zmiany genetyczne typu insercja/delecja; CNV (ang. *copy number variation*) – zmiana liczby kopii genu; VCF (ang. *variant caller file*) – pliki ze zidentyfikowanymi wariantami genetycznymi

RYCINA 1.

NGS – od próbki materiału z guza lub krwi obwodowej do leczenia personalizowanego

(hematoksylina i eozyna) oraz testów immunohistochemicznych. Materiały FFPE nie są zatem wykonywane z ukierunkowaniem na wykorzystanie ich do NGS, czego osoby wykonujące to badanie oraz przeprowadzające

analizę danych uzyskanych z sekwencjonowania muszą być świadome. Tradycyjne utrwalanie tkanek w formalinie indukuje wewnątrz- i międzycząsteczkowe połączenia w kwasach nukleinowych poprzez tworzenie zasad Schiffa oraz poprzez grupy metylowe reagujące z pierwszorzędowymi grupami aminowymi lub tiolowymi [1]. Ten nieco skomplikowany opis chemiczny oznacza, że przez tradycyjne utrwalanie tkanek w formalinie pojawiają się trudności w wydajnej izolacji i skutecznym sekwencjonowaniu ekstrahowanego DNA. Formalina, szczególnie gdy jest kwaśna i niebuforowana, indukuje również fragmentację DNA, co obniża jakość sekwencjonowania. Proces utrwalania w formalinie może prowadzić do chemicznego i mechanicznego uszkodzenia kwasów nukleinowych, co leży u źródła obserwowanych artefaktów w analizowanych sekwencjach. Oznacza to, że w materiałach takich można zaobserwować wzrost liczby substytucji cytozyny na tyminę i guaniny na adeninę (m.in. poprzez deaminację cytozyny do uracylu), które najczęściej obserwowane są przy niskich poziomach częstotliwości alleli < 10% [1]. Utrwalanie w formalinie może być również przyczyną powstawania luk w DNA, czyli miejsc pozabawionych zasad [2]. Kofanova i wsp. wskazują, że faza preanalizacyjna, czyli utrwalanie materiałów tkankowych, jest kluczowa dla otrzymania wiarygodnych wyników sekwencjonowania. Porównali oni metodę utrwalania w formalinie oraz w perfluoropolieteryze (PFPE) i okazało się, że liczba odczytów sekwencji była większa w przypadku utrwalacza PFPE [1].

Na jakość sekwencjonowania oprócz utrwalacza mają wpływ warunki i czas przechowywania oraz metoda ekstrakcji kwasów nukleinowych. Wybór ostatniej z wymienionych jest elementem walidacji laboratoryjnej. Izolacja może być oparta na metodzie kolumnkowej lub metodzie wykorzystującej kulki magnetyczne, jednak niezależnie od jej wyboru, musi ona zapewniać jak największy odzysk kwasów nukleinowych z materiału oraz uniknięcie ich fragmentacji [3].

Materiałem do sekwencjonowania może być również wolnokrążące nowotworowe DNA (ang. *tumor, circulating-DNA* – tc-DNA). Uzyskuje się je metodą płynnej biopsji (ang. *liquid biopsy*) z surowicy lub z osocza krwi obwodowej chorego. Jest go stosunkowo mało w porównaniu do DNA „zdrowego”, jednak metodą NGS możemy wychwycić mutacje nawet w tak ograniczonej ilości materiału, jakim jest tc-DNA. tc-DNA w surowicy lub osoczu jest łatwo dostępne oraz nieprzetworzone chemicznie, tak jak w przypadku materiałów FFPE. Lai i wsp. przeprowadzili ocenę przydatności tc-DNA do badania NGS w celu wykrycia różnych nieprawidłowości genetycznych u chorych na raka płuca [4]. Do badania włączono 101 chorych. Pobrali oni próbki krwi obwodowej i wyizolowali tc-DNA.