STANDARDY DIAGNOSTYKI GENETYCZNEJ PTGC

ZMIANY SOMATYCZNE W NOWOTWORACH LITYCH DZIECI I DOROSŁYCH



Praca zbiorowa pod redakcją
dr. hab. n. med. Artura Kowalika, prof. UJK

WYDANIE I • 2024

STANDARDY DIAGNOSTYKI GENETYCZNEJ PTGC

ZMIANY SOMATYCZNE W NOWOTWORACH LITYCH DZIECI I DOROSŁYCH

Praca zbiorowa pod redakcją
dr. hab. n. med. Artura Kowalika, prof. UJK

Wydanie I

Wydrukowano ze środków:

AstraZeneca

Wsparcia finansowego udzielili:

INFARMA
Związek Pracodawców Innowacyjnych Firm Farmaceutycznych

Związek Pracodawców Innowacyjnych Firm Farmaceutycznych INFARMA

Roche

STANDARDY DIAGNOSTYKI GENETYCZNEJ PTGC

Polskie Towarzystwo Genetyki Człowieka

ZMIANY SOMATYCZNE W NOWOTWORACH LITYCH DZIECI I DOROSŁYCH

Praca zbiorowa pod redakcją
dr. hab. n. med. Artura Kowalika, prof. UJK

Wydanie I

Standardy wydane pod patronatem:

Polskie Towarzystwo Onkologii Klinicznej

Tytuł książki:
Standardy diagnostyki genetycznej PTGC
Zmiany somatyczne w nowotworach litych dzieci i dorosłych

Projekt typograficzny, łamanie i przygotowanie do druku:
Magdalena Sobczyńska

Korekta:
Grażyna Nawrocka

Wydanie I

Gdynia 2024
Wydawnictwo Echokompendium
81–589 Gdynia, ul. Anyżowa 66

www.echokompendium.pl
e-mail: biuro@echokompendium.pl

ISBN 978-83-938465-6-6

ZESPÓŁ REDAKCYJNY . . . 7
1. WYKAZ SKRÓTÓW . . . 9
2. REGULACJE PRAWNE . . . 11
2.1. Zasady organizacji laboratorium . . . 11
2.2. Kompetencje personelu . . . 12
2.3. Warunki lokalowe i środowiskowe . . . 15
2.4. Wyposażenie laboratorium i odczynniki . . . 16
2.5. Zakres i metody wykonywanych badań . . . 17
2.6. Zarządzanie informacjami w laboratorium . . . 19
2.7. Zewnątrzlaboratoryjna kontrola jakości (EMQN/QCMD i inne) . . . 20
2.8. Ocena i audyty . . . 21
3. FUNKCJONOWANIE MEDYCZNEGO LABORATORIUM DIAGNOSTYCZNEGO . . . 23
3.1. Zlecanie badań molekularnych . . . 23
3.2. Procesy przedanalityczne . . . 23
3.3. Wykonywanie badań, procesy badawcze . . . 30
3.4. Sprawozdawanie i wydawanie wyników badań . . . 33
3.5. Procesy poanalityczne . . . 36
4. DIAGNOSTYKA GENETYCZNA NOWOTWORÓW LITYCH W PRAKTYCE . . . 37
4.1. Rak jelita grubego . . . 37
4.2. Czerniak . . . 43
4.3. Rak jajnika . . . 47
4.4. Rak endometrium . . . 51
4.5. Rak płuca . . . 56
4.6. Nowotwory wieku dziecięcego . . . 64
4.7. Nowotwory mózgu u dorosłych – glejaki . . . 83
4.8. Rak tarczycy . . . 88
4.9. Rak gruczołu krokowego . . . 91
4.10. Rak trzustki . . . 93
4.11. Nowotwór podścieliskowy przewodu pokarmowego (GIST) . . . 94
4.12. Mięsaki . . . 98
4.13. Rak piersi . . . 103
4.14. Rak żołądka . . . 105
4.15. Fuzje NTRK jako przykład markerów niezależnych od tkanki pochodzenia nowotworu . . . 107
5. BIBLIOGRAFIA . . . 109

ZESPÓŁ REDAKCYJNY

Redaktorzy

dr hab. n. med. Artur Kowalik, prof. UJK
Zakład Diagnostyki Molekularnej, Świętokrzyskie Centrum Onkologii w Kielcach
Zakład Biologii Medycznej, Instytut Biologii, Uniwersytet Jana Kochanowskiego w Kielcach

prof. dr hab. n. med. i n. o zdr. Marzena Anna Lewandowska, MBA
Zakład Genetyki i Onkologii Molekularnej, Innowacyjne Forum Medyczne Centrum Onkologii im. prof. Franciszka Łukaszczyka
Katedra Chirurgii Klatki Piersiowej i Nowotworów, Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Collegium Medicum w Bydgoszczy

dr hab. n. med. Izabela Łaczmańska
Zakład Diagnostyki Molekularnej Nowotworów, Dolnośląskie Centrum Onkologii, Pulmonologii i Hematologii we Wrocławiu
Katedra i Zakład Genetyki, Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu

dr hab. n. med. Małgorzata Oczko-Wojciechowska, MBA
Zakład Genetyki Klinicznej i Molekularnej Narodowego Instytutu Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie – Państwowego Instytutu Badawczego, Oddział w Gliwicach

dr hab. n. med. Joanna Trubicka, prof. IPCZD
Zakład Patologii/Pracownia Onkopatologii i Biostruktury Medycznej, Instytut „Pomnik-Centrum Zdrowia Dziecka" w Warszawie

dr n. med. Andrzej Tysarowski
Zakład Diagnostyki Genetycznej i Molekularnej Nowotworów Narodowego Instytutu Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie, Państwowy Instytut Badawczy w Warszawie

dr n. med. Piotr Wójcik
Diagnostyka Oncogene sp. z. o.o. w Krakowie

Redaktorzy pomocniczy

dr n. med. Małgorzata Chłopek
Zakład Diagnostyki Molekularnej, Świętokrzyskie Centrum Onkologii w Kielcach
Laboratory of Pathology, National Cancer Institute, Bethesda, MD, USA

dr n. med. Kinga Hińcza-Nowak
Zakład Diagnostyki Molekularnej, Świętokrzyskie Centrum Onkologii w Kielcach
Klinika Endokrynologii, Świętokrzyskie Centrum Onkologii w Kielcach

dr n. med. Dagmara Michałowska
Zakład Diagnostyki Molekularnej Nowotworów, Dolnośląskie Centrum Onkologii, Pulmonologii i Hematologii

dr n. med. Katarzyna Seliga
Zakład Diagnostyki Genetycznej i Molekularnej Nowotworów, Narodowy Instytut Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie, Państwowy Instytut Badawczy w Warszawie

dr n. med. Joanna Wojtysiak
Zakład Genetyki i Onkologii Molekularnej, Innowacyjne Forum Medyczne Centrum Onkologii im. prof. Franciszka Łukaszczyka w Bydgoszczy

dr n. med. Małgorzata Zając
Diagnostyka Oncogene sp. z. o.o. w Krakowie

Na etapie konsultacji społecznych uwagi do tekstu zgłosili:

- ***prof. dr hab. n. med. Wiesława Grajkowska***, konsultant krajowy w dziedzinie neuropatologii.
- ***prof. dr hab. n. med. Kamila Wojas-Krawczyk***, Katedra i Klinika Pneumonologii, Onkologii i Alergologii, Uniwersytet Medyczny w Lublinie.
- Zakład Patologii Nowotworów, Pracownia Patologii Molekularnej Narodowego Instytutu Onkologii – Państwowego Instytutu Badawczego, Oddział w Gliwicach.
- Zakład Diagnostyki Genetycznej, WWCOiT w Łodzi.
- ***mgr Kamila Kornath***, AstraZeneca.
- ***mgr Marta Wasilewicz***, Roche.
- ***dr Jarosław Samborski***, Amgen Biotechnologia.

Na etapie konsultacji społecznych uwagi do tekstu rozdziału 4.6 *Nowotwory lite wieku dziecięcego* zgłosili (Polskie Towarzystwo Onkologii i Hematologii Dziecięcej):

- ***prof. dr hab. n. med. Walentyna Balwiesz***, Klinika Onkologii i Hematologii Dziecięcej Instytutu Pediatrii, Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum; Klinika Onkologii i Hematologii Dziecięcej Instytutu Pediatrii, Uniwersytecki Szpital Dziecięcy w Krakowie.
- ***prof. dr hab. n. med. Bożenna Dembowska-Bagińska***, Klinika Onkologii, Instytut „Pomnik-Centrum Zdrowia Dziecka" w Warszawie.
- ***prof. dr hab. n. med. Wiesława Grajkowska***, Zakład Patologii, Pracownia Onkopatologii i Biostruktury Medycznej, Instytut „Pomnik-Centrum Zdrowia Dziecka" w Warszawie.
- ***dr hab. n. med. Monika Lejman, prof. UM***, Samodzielna Pracownia Diagnostyki Genetycznej II Katedry Pediatrii Uniwersytetu Medycznego w Lublinie; Dział Diagnostyki Genetycznej Uniwersyteckiego Szpitala Dziecięcego w Lublinie.
- ***dr n. med. Jadwiga Małdyk***, Katedra i Zakład Patomorfologii, Warszawski Uniwersytet Medyczny w Warszawie.
- ***dr n. med. Agata Pastorczak***, Klinika Pediatrii, Onkologii i Hematologii; Uniwersytet Medyczny w Lodzi.
- ***prof. dr hab. n. med. Jan Styczyński***, Katedra Pediatrii, Hematologii i Onkologii; Klinika Pediatrii, Hematologii i Onkologii. Szpital Uniwersytecki nr 1 im. A. Jurasza; Collegium Medicum, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Bydgoszczy.
- ***dr n. med. Katarzyna Szewczyk***, Zakład Genetyki Medycznej, Instytut Pediatrii, Wydział Lekarski, Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum w Krakowie; Laboratorium Cytogenetyki i Genetyki Molekularnej, Uniwersytecki Szpital Dziecięcy w Krakowie.

1 WYKAZ SKRÓTÓW

ASCO – ang. American Society of Clinical Genetics – Amerykańskie Towarzystwo Genetyki Klinicznej
BC – ang. *breast cancer* – rak piersi
BMI – ang. *body mass index* – wskaźnik masy ciała
CE-IVD – ang. *conformity declaration for in vitro diagnostics* – wyrób medyczny do diagnostyki *in vitro*
CNV – ang. *copy number variation* – zmienna liczby kopii
ctDNA – ang. *circulating tumour DNA* – wolnokrążący DNA nowotworowy
ddPCR – ang. *digital droplet PCR* – emulsyjny PCR
DRP – rak drobnokomórkowy
EBV – ang. *Epstein-Barr virus* – wirus Epsteina-Barra
EQA – ang. *external quality assessment* – zewnątrzlaboratoryjna kontrola jakości
ER – ang. *estrogen receptor* – receptor estrogenowy
FDA – ang. Food and Drug Administration – Agencja Żywności i Leków
FFPE – ang. *formalin-fixed paraffin embedded* – (materiał) utrwalony w formalinie i zatopiony w parafinie
FISH – ang. *fluorescence in situ hybridization* – fluorescencyjna hybrydyzacja in situ
GC – ang. *gastric cancer* – rak żołądka
GIST – ang. *gastrointestinal stromal tumor* – nowotwór podścieliskowy przewodu pokarmowego
H&E (HE) – ang. *hematoxylin and eosin* – barwienie hematoksyliną i eozyną
HBOC – ang. *hereditary breast and ovarian cancer* – dziedziczna predyspozycja do raka piersi i jajnika
HER2 – ang. *human epidermal growth factor receptor 2* – receptor ludzkiego naskórkowego czynnika wzrostu
HRD – ang. *homologous recombination deficiency* – niedobór naprawy rekombinacji homologicznej
IASLC – ang. International Association for the Study of Lung Cancer
IHC – ang. *immunohistochemistry* – badanie immunohistochemiczne
KIDL – Krajowa Izba Diagnostów Laboratoryjnych
KRDL – Krajowa Rada Diagnostów Laboratoryjnych
LDT – ang. *laboratory developed test* – test wytworzony w laboratorium
LGM – laboratoryjna genetyka medyczna
MGM – medyczna genetyka molekularna
MLD – medyczne laboratorium diagnostyczne
MLPA – ang. *multiplex ligation-dependent probe amplification* – multipleksowa amplifikacja sond zależna od ligacji
MMRd – ang. *mismatch repair deficiency* – deficyt naprawy źle sparowanych zasad
MSI – ang. *microsatellite instability* – niestabilność mikrosatelitarna
MSI-H – ang. *MSI-high* – wysoka niestabilność mikrosatelitarna
MSP – ang. *methylation-specific PCR* – metylospecyficzna PCR
MSS – ang. *microsatellite stable* – stabilność mikrosatelitarna

NCCN – ang. National Comprehensive Cancer Network
NGS – ang. *next generation sequencing* – sekwencjonowanie następnej generacji
NSCLC – ang. *non-small cel lung cancer, NDRP* – rak niedrobnokomórkowy (płuca)
PARPi – ang. *Poly (ADP-ribose) polymerase inhibitors* – inhibitory PARP
PCA – Polskie Centrum Akredytacji
PCR – ang. *polymerase chain reaction* – reakcja łańcuchowa polimerazy
POLE EDM – ang. *DNA polymerase epsilon (POLE) exonuclease domain* – domena egzonukleazowa POLE
PR – ang. *progesterone receptor* – receptor progesteronowy
QCMD – ang. *quality control for molecular diagnostics* – zewnątrzlaboratoryjna kontrola jakości w zakresie biologii molekularnej
qPCR – ang. *quantitative PCR, Real Time PCR* – ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy
RJG – rak jelita grubego
RT-PCR – ang. *reverse transcription PCR* – reakcja łańcuchowa polimerazy z odwrotną transkrypcją
RUO – ang. r*esearch use only* – (testy) tylko do użytku do badań naukowych
SNaPshot – ang. *single nucleotide polymorphisms (SNPs) typing method, minisequencing* – minisekwencjonowanie
SNV – ang. *single nucleotide variant* – wariant pojedynczego nukleotydu
TKI – ang. *tyrosine kinase inhibitors* – inhibitory kinaz tyrozynowych
WHO – ang. World Health Organization – Światowa Organizacja Zdrowia

REGULACJE PRAWNE

2

2.1. Zasady organizacji laboratorium

Działalność MLD w Polsce regulują następujące dokumenty:

- **Ustawa z dnia 15 września 2022 r. o medycynie laboratoryjnej** (Dz.U. 2022 poz. 2280)
- **Ustawa z dnia 15 kwietnia 2011 r. o działalności leczniczej** (Dz.U. 2011 Nr 112, poz. 654)
- **Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 3 marca 2004 r.** w sprawie wymagań, jakim powinno odpowiadać medyczne laboratorium diagnostyczne (Dz.U. 2004 Nr 43, poz. 408 z późn. zm.) – w trakcie aktualizacji, obecnie po konsultacjach społecznych
- **Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 23 marca 2006 r.** w sprawie standardów jakości dla medycznych laboratoriów diagnostycznych i mikrobiologicznych (Dz.U. 2006 Nr 61, poz. 435) ze zmianami (Dz.U. 2019 poz. 2065), (Dz.U. 2020 poz. 2042) – w trakcie aktualizacji, obecnie po konsultacjach społecznych
- **Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 26 marca 2019 r.** w sprawie szczegółowych wymagań, jakim powinny odpowiadać pomieszczenia i urządzenia podmiotu wykonującego działalność leczniczą (Dz.U. 2019 poz. 595)
- **Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 6 kwietnia 2020 r.** w sprawie rodzajów, zakresu i wzorów dokumentacji medycznej oraz sposobu jej przetwarzania (Dz.U. 2020 poz. 666) wraz z późniejszymi zmianami
- **Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 18 grudnia 2017 r.** w sprawie standardów organizacyjnych opieki zdrowotnej w dziedzinie patomorfologii (Dz.U. 2017 poz. 2435)
- **Ustawa z dnia 7 kwietnia 2022 r. o wyrobach medycznych** (Dz.U. 2022 poz. 974)
- **Ustawa z dnia 10 maja 2018 r. o ochronie danych osobowych** (Dz.U. 2018 poz. 1000)
- **Norma PN-EN ISO 15189:2023-02** Laboratoria medyczne. Wymagania dotyczące jakości i kompetencji

Oraz wytyczne:

- Raquel V. Viana and Carole L. Wallis (2011). **Good Clinical Laboratory Practice (GCLP) for Molecular Based Tests Used in Diagnostic Laboratories**, Wide Spectra of Quality Control, Dr. Isin Akyar (Ed.), ISBN: 978-953- 307-683-6, InTech, Available from: http://www.intechopen.com/books/wide-spectra-of-quality-control/goodclinical-laboratory-practice-gclp-for-molecular-based-tests-used-in-diagnostic-laboratories
- Pieńkowska-Grela B. i in. **Wytyczne dla laboratoriów genetyki nowotworów litych**. Rekomendacje. Biuletyn Polskiego Towarzystwa Onkologicznego NOWOTWORY 2016, tom 1, nr 2, 184–189

Każde MLD w Polsce jest zobligowane do dokonania wpisu do ewidencji prowadzonej przez KRDL – Lista Medycznych Laboratoriów Diagnostycznych; https://kidl.org.pl/laboratory/map

Zgodnie z art. 106 ust. 1 pkt 1) ustawy o działalności leczniczej z dnia 15 kwietnia 2011 r. organem prowadzącym rejestr podmiotów wykonujących działalność leczniczą jest wojewoda. MLD jest zobligowane do uzyskania wpisu do rejestru podmiotów wykonujących działalność leczniczą prowadzonego przez wojewodę.

2.2. Kompetencje personelu

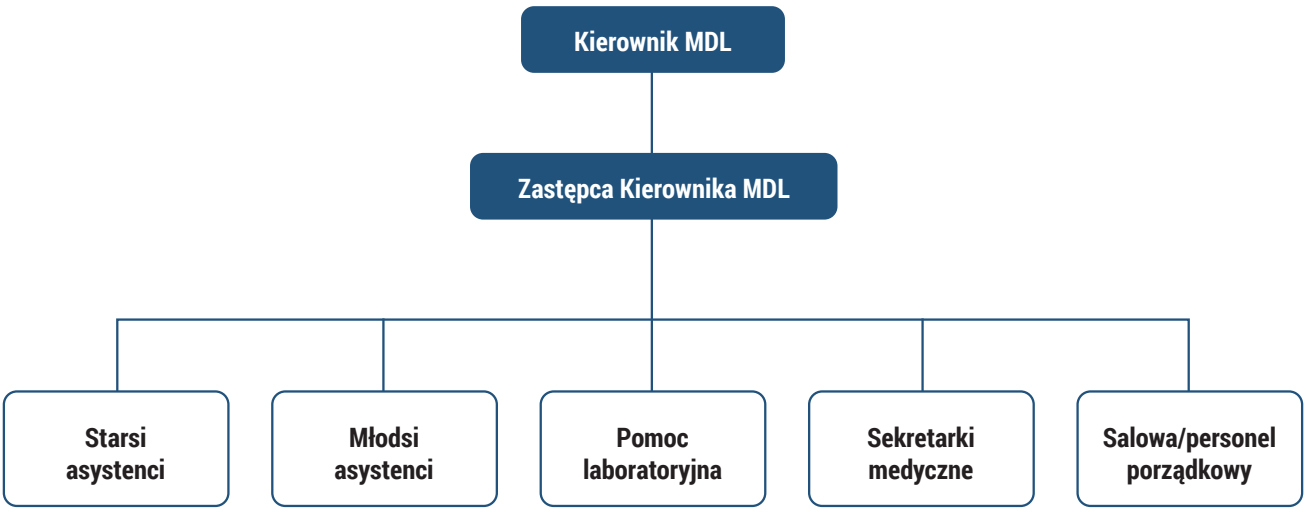
Odpowiednio wykształcony i wysoko wykwalifikowany personel jest jednym z najistotniejszych składowych Dobrej Praktyki Laboratoryjnej (Good Laboratory Practice – GLP). Laboratorium powinno zatrudniać odpowiednią liczbę personelu zależnie od zakresu i liczby wykonywanych badań – w tym odpowiednią liczbę diagnostów laboratoryjnych i specjalistów laboratoryjnej genetyki medycznej. Obecnie nie istnieją wytyczne określające minimalne wymagania co do liczby ww. personelu, z wyjątkiem przepisów dotyczących kierownika MLD z ustawy o medycynie laboratoryjnej z dnia 15 września 2022 r.

Personel MLD powinien uczestniczyć w szkoleniach zgodnie z Rozporządzeniem Ministra Zdrowia z dnia 7 grudnia 2023 r. w sprawie ustawicznego rozwoju zawodowego diagnosty laboratoryjnego (Dz.U. 2023 poz. 2684) oraz Rozporządzeniem Ministra Zdrowia z dnia 20 marca 2023 r. w sprawie ustawicznego rozwoju zawodowego osób uprawnionych do wykonywania czynności medycyny laboratoryjnej w laboratorium (Dz.U. 2023 poz. 675). Szkolenia zewnętrzne oraz wewnętrzne powinny obejmować zarówno zagadnienia dotyczące bieżących doniesień naukowych, technik laboratoryjnych, standardów i wytycznych dla MLD, jak i wiadomości z zakresu zarządzania jakością, walidacji metod, niepewności pomiarów itp. Personel powinien również co roku czynnie uczestniczyć w zewnętrznych programach kontroli jakości oraz wewnątrzlaboratoryjnej kontroli jakości planowanej przez Kierownictwo MLD.

Laboratorium powinno posiadać procedurę wprowadzania i szkolenia nowo zatrudnionych pracowników. Upoważnienia do poszczególnych czynności w MLD powinny być nadawane pracownikowi stopniowo, w odniesieniu do jego umiejętności, stażu pracy w MLD, odbywanych szkoleń wewnętrznych oraz oceny pracy w obecności innego pracownika MLD – opiekuna. Sprawdzenie kompetencji nowo zatrudnionego personelu oraz pozytywna ocena jego pracy (np. ocena wyników uzyskanych dla próbek kontrolnych) przez Kierownictwo MLD jest warunkiem koniecznym nadania upoważnień.

Personel MLD stanowią: kierownik laboratorium (i zastępca kierownika), diagności laboratoryjni (stanowisko: młodszy/starszy asystent), pomoc laboratoryjna/technicy laboratoryjni (biolodzy, biotechnolodzy), sekretarka medyczna, salowa/personel sprzątający.

Ryc. 2.1. Personel MLD – przykładowy schemat organizacyjny



Tab. 2.1. Przykładowe wymagane kompetencje dla personelu MLD zależnie od stanowiska
(* zaznaczono wymagania dodatkowe)

Kompetencje	Kierownik	Zastępca kierownika	Młodszy/starszy asystent	Pomoc laboratoryjna	Sekretarka medyczna	Salowa/personel sprzątający
Wykształcenie	Wyższe medyczne, specjalizacja z Laboratoryjnej Genetyki Medycznej (LGM); doktorat z zakresu biologii molekularnej*.	Wyższe medyczne, doktorat z zakresu biologii molekularnej lub specjalizacja z LGM*.	Wyższe medyczne, magister analityki medycznej lub magister n. biol. oraz studia podyplomowe z analityki medycznej lub #.	Wyższe przyrodnicze, licencjat, inżynier.	Średnie	Podstawowe
PWZDL	**Tak**	**Tak**	**Tak**	Nie dotyczy	Nie dotyczy	Nie dotyczy
Staż pracy	**Min. 5 lat w laboratorium o podobnym profilu, preferowane wcześniejsze doświadczenie na stanowisku kierowniczym*.**	Min. 3 lata w laboratorium o podobnym profilu.	Min. 1 rok w laboratorium* lub praca magisterska z zakresu biologii molekularnej*.	Nie jest wymagany.	Min. pół roku w jednostce medycznej.	Nie dotyczy
Szkolenia	Udokumentowane szkolenia zewnętrzne i wewnętrzne w każdym roku pracy z zakresu działalności laboratorium.	Udokumentowane szkolenia zewnętrzne i wewnętrzne w każdym roku pracy z zakresu działalności laboratorium.	Udokumentowane szkolenia zewnętrzne i wewnętrzne w każdym roku pracy z zakresu działalności laboratorium.	Szkolenia wewnętrzne po zatrudnieniu.	Szkolenia wewnętrzne po zatrudnieniu.	Szkolenia szpitalne wewnętrzne.
Umiejętności	Znajomość technik biologii molekularnej, znajomość baz danych. Umiejętność zarządzania zespołem.	Znajomość technik biologii molekularnej, znajomość baz danych. Umiejętność zarządzania zespołem.	Znajomość technik biologii molekularnej, znajomość baz danych.	Znajomość technik laboratoryjnych.	Znajomość programów do obsługi danych i dokumentacji.	Znajomość zasad sanitarnych.
Upoważnienia	Wykonywanie badań. Przegląd wyników. Autoryzacja wyników. Wybór i wprowadzanie nowych metod. Walidacja i weryfikacja metod. Wykonywanie i autoryzacja badań oraz badań biegłości EQA/QCMD. Wybór i sprawdzanie odczynników. Wybór, obsługa i sprawdzanie sprzętu.	Wykonywanie badań. Przegląd wyników. Autoryzacja wyników (jeśli posiada specjalizację LGM). Wprowadzanie nowych metod. Walidacja i weryfikacja metod. Wykonywanie i autoryzacja badań oraz badań biegłości EQA/QCMD (jw.). Wybór i sprawdzanie odczynników. Obsługa i sprawdzanie sprzętu.	Wykonywanie badań. Udział w walidacji i weryfikacji metod. Wykonywanie badań oraz badań biegłości EQA/QCMD. Sprawdzanie odczynników. Obsługa i sprawdzanie sprzętu.	Wykonywanie czynności diagnostyki laboratoryjnej pod nadzorem diagnosty laboratoryjnego.	Obsługa sekretariatu, przyjmowanie zleceń, wydawanie sprawozdań z badań na oddziały, do poradni, obsługa archiwum.	Zapewnienie czystości w laboratorium, zapewnienie odpowiedniej utylizacji odpadów medycznych i innych.

W Ustawie o medycynie laboratoryjnej w rozdz. 2 art. 5 zapisano m.in., że osobą uprawnioną do wykonywania czynności medycyny laboratoryjnej w laboratorium jest również osoba, która (…) ukończyła jednolite studia magisterskie lub studia pierwszego i drugiego stopnia w zakresie: a) biologii, biologii medycznej, mikrobiologii lub mikrobiologii medycznej i uzyskała tytuł zawodowy magistra lub b) biotechnologii lub biotechnologii medycznej i uzyskała tytuł zawodowy magistra lub magistra inżyniera (…). Osoba (…) wykonuje czynności medycyny laboratoryjnej samodzielnie po uzyskaniu tytułu specjalisty w dziedzinie (…) medycznej genetyki molekularnej na podstawie Ustawy z dnia 24 lutego 2017 r. o uzyskiwaniu tytułu specjalisty w dziedzinach mających zastosowanie w ochronie zdrowia (Dz.U. z 2021 r. poz. 1297), w zakresie uzyskanej specjalizacji.

Dla medycznej genetyki molekularnej w 2023 r. opublikowano program specjalizacji, w którym szczególny nacisk położono na wysokoprzepustowe techniki analizy genomu – NGS i aCGH. Kolejnym krokiem będzie powołanie ośrodków kształcenia w ww. zakresie. Specjaliści uprawnieni do wykonywania czynności diagnostyki laboratoryjnej w zakresie biologii molekularnej będą również uprawnieni do autoryzacji wyników badań w tym zakresie. Specjalizacja ma trwać cztery lata.

Odpowiedzialność kierownika MLD

Odpowiedzialność kierownika obejmuje kwestie zawodowe, naukowe, konsultacyjne, organizacyjne, administracyjne i edukacyjne (co określa ustawa o medycynie laboratoryjnej oraz norma ISO 15189). Kierownik ponosi odpowiedzialność za całość działań i zarządzanie laboratorium, a w szczególności za:

- nadzór nad wykonywanymi czynnościami medycyny laboratoryjnej i skuteczną organizację pracy laboratorium medycznego, w tym uczestnictwo w planowaniu budżetu laboratorium,
- kontakt i współpracę z jednostkami akredytującymi, np. Polskim Centrum Akredytacji, organami nadzoru, właściwymi organami administracyjnymi, zleceniodawcami i dostawcami umów oraz z pacjentami,
- zapewnienie odpowiedniej liczby personelu o odpowiednim wykształceniu i kompetencjach, poprzez bieżącą ocenę sytuacji w laboratorium i zgłaszanie zapotrzebowania na zatrudnienie do dyrekcji i kadr,
- zapewnienie wdrożenia i utrzymania polityki jakości,
- wybór i wdrażanie nowych technik, metod laboratoryjnych i procedur diagnostycznych,
- dbanie o bezpieczeństwo w laboratorium zgodnie z dobrą praktyką laboratoryjną, obowiązującymi ustawami, rozporządzeniami i innymi aktami prawnymi,
- służenie pomocą innemu personelowi medycznemu w jednostce w zakresie swoich kompetencji, m.in. w sprawach doboru badań diagnostycznych i ich interpretacji,
- wybór i monitorowanie dostawców towarów i usług do laboratorium,
- dbanie o zawodowy rozwój pracowników laboratorium (szkolenia),
- monitorowanie czasu wykonywania badań,
- monitorowanie jakości stosowanych odczynników,
- monitorowanie pracy w laboratorium pod kątem jej przydatności w medycynie (skargi i wnioski),
- nadzór nad dokumentacją laboratorium,
- kierowanie badaniami naukowymi i rozwojem laboratorium,
- zaplanowanie i wdrożenie planów awaryjnych w celu zapewnienia usług w sytuacjach krytycznych.

Kierownik może delegować część ww. odpowiedzialności na zastępcę kierownika MLD, a także na wybrany personel, posiadający do tego odpowiednie kompetencje.

Rozdział i przegląd zadań personelu

Oprócz ogólnego zakresu obowiązków i odpowiedzialności określanych przez pracodawcę Kierownictwo MLD ustala na piśmie szczegółowy zakres obowiązków i odpowiedzialności personelu (w tym delegowanie zadań)

oraz zależnie od potrzeb, ale nie rzadziej niż raz w roku, dokonuje przeglądu zadań i sporządza odpowiednie zapisy.

Wskaźniki jakości – personel

Ocena kompetencji personelu (wskaźniki jakości) powinna być dokonywana co najmniej raz w roku na odpowiednim formularzu. Ocenie powinny podlegać m.in.: udział w zewnątrzlaboratoryjnych programach kontroli jakości, liczba procedowanych próbek kontrolnych, liczba szkoleń, liczba niezgodności, liczba opóźnień wyników, liczba skarg i inne.

2.3. Warunki lokalowe i środowiskowe

Pomieszczenia MLD wykonującego diagnostykę metodami biologii molekularnej (BM) obejmują pokoje laboratoryjne, biurowe, socjalne i magazynowe. Podczas planowania pracy w MLD wykonującym badania molekularne należy zwrócić szczególną uwagę na rozdział przestrzenny i czasowy procesów diagnostycznych ze względu na wysokie wymagania co do czystości i ryzyko kontaminacji.

W laboratorium MLD BM należy wyodrębnić przestrzennie co najmniej dwie strefy: PRE-PCR i POST-PCR. Pomiędzy tymi dwoma strefami ruch w MLD powinien być jednokierunkowy od strefy PRE-PCR do POST-PCR (rys. 2.2), a sprzęt, inne wyposażenie (np. statywy) oraz odzież ochronna nie mogą przekraczać strefy, dla której są przeznaczone.

Strefa PRE-PCR, czysta (*clean room*):

- obszar odczynnikowy (*reagent area*) – przygotowywanie i przechowywanie odczynników.

Niezbędne wyposażenie: m.in. lodówka, zamrażarka -20, miniwirówka, pipety, wortex, komora PCR z UV, miejsce na odzież ochronną.

- obszar próbki (*sample area*) – przyjmowanie, przechowywanie materiału, izolacja kwasów nukleinowych, synteza cDNA.

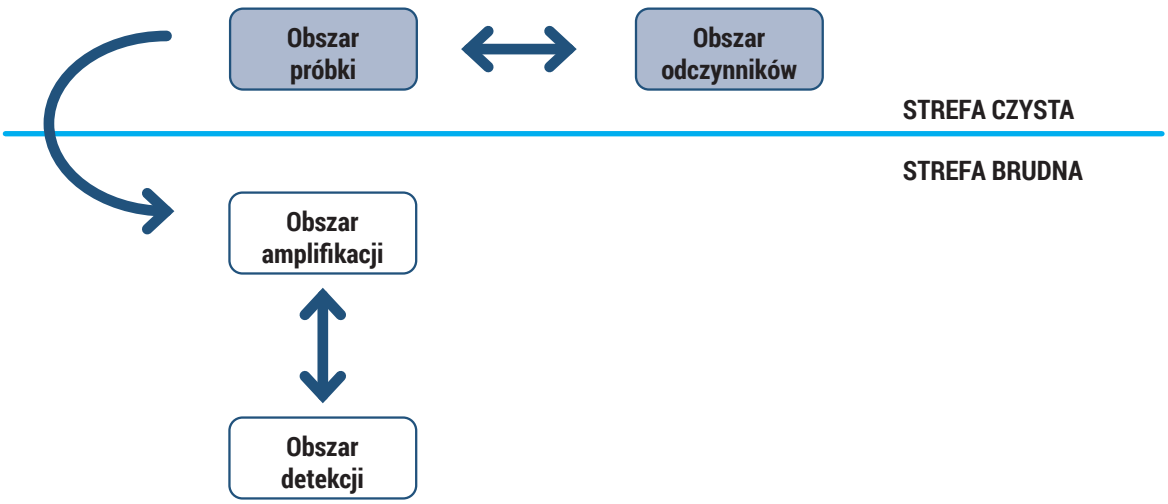
Niezbędne wyposażenie: m.in. lodówka, zamrażarka -20, zamrażarka -80 oraz zalecane jest użytkowanie komory BSL-2 (jeśli materiał jest potencjalnie zakaźny, np. krew, świeże tkanki), wirówka, izolator kwasów nukleinowych, komora PCR z UV i termocykler do cDNA (w tym obszarze nie ma amplifikacji amplikonów), spektrofotometr, pipety, wortex, miejsce na odzież ochronną.

Strefa POST-PCR, „brudna" (*dirty room*):

- obszar amplifikacji (*amplification room*),
- obszar detekcji (*detection room*).

Niezbędne wyposażenie: m.in. lodówka, zamrażarka -20, wirówka, komora PCR z UV, pipety, wortex, konieczny sprzęt (termocykler, real-time PCR, zestaw do elektroforezy żelowej, transiluminator, sekwenator, sekwenator NGS, bioanalyzer, ddPCR i inne), miejsce na odzież ochronną.

Ryc. 2.2. Rozdział pracy w LDM BM, zaznaczono kierunek przemieszczania się próbki



Personel laboratorium szczególnie dba o odpowiednią dekontaminację stanowisk pracy, rozdział przestrzenny i/lub czasowy dla poszczególnych czynności o wysokim prawdopodobieństwie kontaminacji (np. dodawanie kontroli dodatnich).

Powierzchnia i rozkład pomieszczeń laboratorium powinny być adekwatne do wykonywanych czynności. Pomieszczenia wyposażone są w zasilanie elektryczne, oświetlenie, sieć komputerową, klimatyzację, wentylację i instalację wodno-kanalizacyjną. Dostęp do pomieszczeń MLD powinien być ograniczony i monitorowany (wykaz osób upoważnionych do odbioru kluczy i przebywania na terenie MLD).

Warunki środowiskowe (temperatura, wilgotność i oświetlenie) są ustalone w każdym MLD MB według wymagań BHP dla posiadanego sprzętu oraz stosowanych metod diagnostycznych, a temperatura i wilgotność są stale monitorowane za pomocą odpowiednich czujników (np. elektronicznego systemu do monitorowania temperatury i wilgotności).

2.4. Wyposażenie laboratorium i odczynniki

Wyposażenie laboratorium obejmuje:

- urządzenia wykorzystywane w procesach badawczych (urządzenia pomiarowe, urządzenia pomocnicze, urządzenia grzewcze i chłodnicze, sprzęt drobny).

  Jeśli to możliwe, sprzęt powinien posiadać certyfikat CE IVD.

Oprócz wymaganych przeglądów technicznych zapewniających bezpieczeństwo użytkowania urządzenia pomiarowe wymagają regularnych (zwykle corocznych) przeglądów w autoryzowanym serwisie. Wybrane typy urządzeń: np. termometry, wagi, pipety, termocyklery, jeśli mają kluczowe znaczenie dla procesu diagnostycznego, wymagają wzorcowań w odpowiednim zakresie w laboratorium posiadającym akredytację laboratorium wzorcującego w odniesieniu do PN-EN ISO/IEC 17025:2018-02 w danym zakresie.

- komputery i oprogramowanie przyrządów,
- kompletne systemy pomiarowe (np. systemy do monitorowania warunków środowiskowych)

W odniesieniu do odczynników wyposażenie obejmuje:

- materiały odniesienia i wzorce (np. markery mas, wzorce wagi),

- materiały do kontroli jakości (np. próbki uzyskane z EQA/QCMD, wcześniej zbadane próbki uzyskane od pacjentów (jeśli pacjent podpisał zgodę na anonimowe użycie materiału).

Laboratorium powinno posiadać wykaz stosowanych materiałów odniesienia.

Laboratorium powinno określić kryteria wyboru dostawców sprzętu i odczynników.

Laboratorium powinno posiadać procedurę zarządzania sprzętem, prowadzić ewidencję posiadanego sprzętu oraz określić, jak często (raz w roku/raz w miesiącu/przed każdym użyciem itp.) i jakiemu typowi kontroli (sprawdzanie/kalibracja/wzorcowanie) podlega dany sprzęt, a także prowadzić odpowiednie zapisy w tym zakresie. Laboratorium powinno posiadać kluczowe urządzenia pomiarowe w dwóch egzemplarzach lub mieć podpisane umowy na podwykonawstwo, zapewniające ciągłość badań w sytuacjach przedłużających się awarii.

Laboratorium powinno posiadać procedurę dekontaminacji powierzchni i sprzętu.

Odczynniki:

Laboratorium stosuje metody diagnostyczne zgodne z Rozporządzeniem Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) 2017/746 z dnia 5 kwietnia 2017 r. w sprawie wyrobów medycznych do diagnostyki in vitro, które umożliwiają uzyskanie wiarygodnego wyniku diagnostycznego i są:

1. certyfikowane CE-IVD zgodnie z Rozporządzeniem IVDR i używane zgodnie z wytycznymi producenta wyrobu, lub
2. w przypadku braku metody certyfikowanej CE-IVD spełniającej wymagania laboratorium dopuszczone jest zastosowanie:
   a. zestawów certyfikowanych CE-IVD używanych poza wskazaniami lub modyfikowanych we własnym zakresie, pod warunkiem i spełnienia kryteriów, o których mowa w rozdz. II, art. 5, p. 5 Rozporządzenia IVDR,
   b. zestawów do badań naukowych (RUO), pod warunkiem i spełnienia kryteriów, o których mowa w rozdz. II, art. 5, p. 5 Rozporządzenia IVDR,
   c. metod opracowanych przez laboratorium (*laboratory-developed tests*, LDT) wykorzystywanych na skalę nieprzemysłową na potrzeby instytucji zdrowia publicznego pod warunkiem i spełnienia kryteriów, o których mowa w rozdz. II, art. 5, p. 5 Rozporządzenia IVDR.

- Laboratorium powinno posiadać procedurę walidacji metod. Obowiązek walidacji metody diagnostycznej spoczywa na producencie testów komercyjnych z certyfikatem CE-IVD, jeśli stosowane są ściśle według procedury producenta, a w każdym innym przypadku na laboratorium.

2.5. Zakres i metody wykonywanych badań

Próbki pierwotne w MLD wykonującym badania molekularne w nowotworach litych:

- skrawki tkanek utrwalone w formalinie, zatopione w parafinie (ang. *formalin-fixed paraffin-embedded*, FFPE) – materiał histologiczny uzyskiwany w trakcie biopsji (biopsja gruboigłowa, mammotomiczna, bronchofiberoskopia, biopsja chirurgiczna) lub w trakcie zabiegu operacyjnego. Materiał powinien być utrwalony w 10% zbuforowanej formalinie (4% roztwór wodny aldehydu mrówkowego) o pH 7,2–7,4. W przypadku małego materiału biopsyjnego czas utrwalania powinien wynosić 6–48 godzin, natomiast w przypadku dużego materiału pooperacyjnego 12–48 godzin. Przed przystąpieniem do badania wymagana jest ocena materiału nowotworowego przez lekarza patomorfologa. Badania molekularne wykonywane są z użyciem niebarwionych skrawków parafinowych o grubości 4–6 µm.

- cytoblok – materiał cytologiczny utrwalony podobnie jak materiał tkankowy bezpośrednio po zaaspirowaniu,
- materiał zabezpieczony bezpośrednio po pobraniu, bez wstępnego utrwalania w formalinie (tzw. materiał świeży) metodą „snap freezing",
- krew obwodowa pobrana na EDTA,
- płynna biopsja – wolnokrążące DNA nowotworowe (ang. cfDNA – *cell free DNA*, inna nazwa: ctDNA – *circulating tumour DNA*) – krew obwodowa (osocze) pobrana do probówek z EDTA lub do specjalnych probówek ze stabilizatorem ccfDNA (*circulating cfDNA*).

Próbki wtórne (uzyskiwane z próbek pierwotnych i archiwizowane w MLD):

- DNA,
- RNA (cDNA).

Laboratorium powinno posiadać procedurę przechowywania, archiwizacji i utylizacji próbek pierwotnych (krew, tkanka, bloczki FFPE i inne) i wtórnych (izolaty DNA/RNA, cDNA), w której opisuje warunki i czas przechowywania oraz sposób utylizacji.

Bloczki FFPE przechowywane są 20 lat według Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 18 grudnia 2017 r. w sprawie standardów organizacyjnych opieki zdrowotnej w dziedzinie patomorfologii (Dz.U. 2017 poz. 2435).

Na przechowywanie materiału po wykonaniu badania i wydaniu sprawozdania powinna być udzielona pisemna zgoda pacjenta (np. na formularzu świadomej zgody na badanie genetyczne) – w przeciwnym wypadku materiał powinien być utylizowany po wykonaniu badania i wydaniu sprawozdania.

Przykładowe czasy przechowywania: bloczki FFPE – 20 lat, DNA – 10 lat, krew – 2 lata.

Techniki używane w diagnostyce genetycznej guzów litych:

Techniki cytogenetyki klasycznej i molekularnej:

- cytogenetyka klasyczna – analiza prążkowa chromosomów (*G-banding using tripsin and Giemsa*, GTG),
- FISH – fluorescencyjna hybrydyzacja in situ (*fluorescent in situ hybridization*), metoda oparta na hybrydyzacji specyficznych, fluorescencyjnych sond do określonych regionów genomu,
- aCGH – porównawcza hybrydyzacja genomowa do mikromacierzy (*array comparative genomic hybridization*).

Techniki biologii molekularnej:

- PCR (i jej odmiany: PCR-RFLP, ASA-PCR, ddPCR – cyfrowy PCR (*digital droplet PCR*)) – reakcja łańcuchowa polimerazy (*polymerase chain reaction*),
- qPCR – ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy w oparciu o sondy fluorescencyjne (*quantitative PCR, real time PCR*),
- RT-PCR – reakcja łańcuchowa polimerazy z odwrotną transkrypcją (*reverse transcription PCR*),
- MLPA – multipleksowa amplifikacja sond zależna od ligacji (*multiplex ligation-dependent probe amplification*) – umożliwia wykrycie zmienionej liczby kopii badanego genu/eksonu/regionu,
- sekwencjonowanie metodą Sangera,
- sekwencjonowanie następnej generacji (*next generation sequencing,* NGS).

Wybrane bazy danych i inne strony:

- https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi – BLAST
- http://varnomen.hgvs.org/ – zasady zapisu zmian w genach/białkach itp.
- https://tark.ensembl.org/web/mane_project/ – obowiązujące sekwencje referencyjne
- https://www.ensembl.org/index.html – baza informacji dotyczących genomów

- https://www.genenames.org/ – obowiązujące nazwy genów
- https://varsome.com/– baza wariantów
- https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/ – baza wariantów
- https://franklin.genoox.com/clinical-db/home – baza wariantów
- https://varseak.bio/ – baza wariantów, przewidywanie miejsc splicingu
- http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr – PCR in silico
- https://arup.utah.edu/database/BRCA/ – baza wariantów BRCA1, BRCA2, MlH1, MSH2, MSH6
- https://tp53.isb-cgc.org/ – baza wariantów genu TP53
- http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php – The Human Gene Mutation Database
- https://mutalyzer.nl/ – m.in. nazewnictwo, przewidywanie wpływu wariantu na białko
- https://gnomad.broadinstitute.org/ – częstości wariantów
- https://www.cancergenomeinterpreter.org/home – interpretacja wykrytych wariantów
- https://www.cbioportal.org/ – interpretacja wykrytych wariantów
- https://www.clinicaltrials.gov/ – baza badań klinicznych

2.6. Zarządzanie informacjami w laboratorium

Laboratorium powinno mieć dostęp do danych i informacji potrzebnych do realizacji swojej działalności oraz udokumentowaną procedurę zapewniającą poufność informacji dotyczących pacjenta. Systemy laboratorium stosowane do gromadzenia, przetwarzania, zapisywania, raportowania, przechowywania i odzyskiwania danych powinny być sprawdzone pod względem funkcjonalności przed ich wdrożeniem. Laboratorium powinno określić uprawnienia i odpowiedzialność personelu mającego dostęp do danych i informacji o pacjentach, wprowadzającego i edytującego dane i wyniki badań pacjentów, autoryzującego sprawozdania z badań.

Zarządzanie informacjami w laboratorium powinno opierać się na zastosowaniu Systemu Zarządzania Informacją Laboratoryjną LIMS (ang. Laboratory Information Management System).

Systemy zarządzania informacją powinny:

- być zwalidowane przez dostawcę i zweryfikowane przez laboratorium pod względem funkcjonalności przed uruchomieniem i wdrożeniem do rutynowej pracy,
- być chronione przed nieupoważnionym dostępem,
- być zabezpieczone przed naruszeniem lub utratą,
- zapewniać integralność danych i informacji,
- uwzględniać awarie systemu rejestracji i wprowadzone korekcje,
- być zgodne z krajowymi lub międzynarodowymi wymaganiami dotyczącymi ochrony danych.

Funkcjonalności systemu zarządzania informacjami w laboratorium powinny obejmować:

- zarządzanie próbkami: przyjęcie i zarejestrowanie próbek wraz z danymi pacjenta,
- zarządzanie badaniami: przypisanie, zaplanowanie i śledzenie prac analitycznych związanych z próbkami,
- zarządzanie obiegiem dokumentów: zapewnienie poprawnego formatu i treści oraz dostęp do dokumentów.

Do systemu LIMS można włączyć różne typy rejestrów, takie jak rejestr pacjentów, rejestr odczynników i materiałów jednorazowego użytku, rejestr badań i rejestr wyposażenia.

Laboratorium powinno weryfikować, czy wyniki badań i informacje z nimi związane są kompatybilne w wersjach elektronicznych i papierowych. W przypadku wdrażania nowych badań laboratorium powinno weryfikować, czy zmiany zostały zaimplementowane prawidłowo.

Laboratorium powinno mieć udokumentowaną procedurę działania w przypadku awarii lub przerw w funkcjonowaniu systemu informatycznego.

Laboratorium prowadzi statystyki materiału niediagnostycznego oraz powodów jego odrzucenia.

2.7. Zewnątrzlaboratoryjna kontrola jakości (EMQN/QCMD i inne)

Laboratorium powinno uczestniczyć w zewnątrzlaboratoryjnych programach kontroli jakości (EQA – *external quality assessment*) w zakresie wykonywania badań i laboratoryjnej interpretacji ich wyników. Programy kontroli jakości powinny być prowadzone przez odpowiednie instytucje, np. EMQN (European Molecular Genetics Quality Network), GenQA (Genomix Quality Assessment), Quality Control for Molecular Diagnostics (QCMD) lub inne posiadające akredytację wg normy ISO 17043. W przypadku braku badania biegłości dla danej metody laboratorium powinno uczestniczyć w porównaniach międzylaboratoryjnych.

Laboratorium powinno ustanowić udokumentowaną procedurę uczestnictwa w badaniach biegłości określającą odpowiedzialność i zawierającą opis uczestnictwa oraz kryteria wyboru organizatorów kontroli jakości.

Ponadto MLD stosuje się do zaleceń pokontrolnych, organizuje spotkania informacyjne z pracownikami MLD w celu szczegółowego omówienia wyników uczestnictwa w międzynarodowej kontroli jakości oraz podejmuje działania korygujące w przypadku uzyskania niesatysfakcjonującego rezultatu.

MLD uczestniczy w kontroli jakości w celu sprawdzenia swojej całej procedury badawczej, począwszy od otrzymania materiału, oceny komórkowości (jeżeli dotyczy), izolacji DNA/RNA, przeprowadzenia badania (wykonania oznaczeń) oraz przygotowania raportu (sprawozdania z badania) dla lekarza klinicysty. Udział w programie ma pokazać ewentualne braki, które trzeba poprawić, nie należy zatem przykładać „niestandardowego wysiłku" do uczestnictwa w kontroli.

Certyfikat EQA powinien zawierać informację o pozytywnej ocenie z kontroli lub taka informacja powinna być dostępna na stronie internetowej organizatora.

Kryteria wyboru organizacji prowadzących programy zewnątrzlaboratoryjnych kontroli jakości:

Wymagane

- Kompetencje organizatora są potwierdzone certyfikatem akredytacji na zgodność z normą PN-EN ISO/IEC 17043.
- Zakres programu badań biegłości i obiekty badań biegłości odpowiadają obiektom w laboratorium (badane markery i materiał).
- Program ma charakter cykliczny.
- Dostępny jest opis programu zawierający zakres programu, źródło i metodę pozyskania obiektu badań biegłości i sposób jego przygotowania.
- Zapewniony jest prawidłowy przebieg programu badania biegłości (instrukcje dla uczestników, odpowiednia identyfikacja i oznakowanie próbek do badań oraz ich pakowanie, dystrybucja i przechowywanie, klarownie określone kryteria raportowania i sporządzania sprawozdania z badań, możliwość odwołania się od wyniku).
- Wyniki programu (genotypy i interpretacja) są publikowane i jawne, ale indywidualne wyniki są poufne.
- Uczestnik otrzymuje indywidualny raport z oceną i wyszczególnionymi ewentualnymi błędami oraz certyfikat.

Pożądane

- Program jest ogólnoeuropejski/ogólnoświatowy, liczba uczestników przekracza 50 ośrodków.
- Dostępne są zasady i warunki płatności za udział, koszt udziału w badaniach i koszt opłat członkowskich jest konkurencyjny w stosunku do innych programów.

- Istnieje udokumentowany harmonogram badań i oceny.
- Renoma rynkowa organizatora jest wysoka.

Laboratorium powinno posiadać coroczny harmonogram zewnątrzlaboratoryjnej kontroli jakości, gromadzić certyfikaty z kontroli oraz prowadzić zapisy z poszczególnych kontroli. Uczestnictwo w poszczególnych programach powinno być planowane tak, żeby zapewnić wymaganą (np. roczną) ważność certyfikatu.

Próbki dostarczane przez organizatora testu lub próbki z porównań międzylaboratoryjnych powinny być traktowane jak próbki od pacjentów i badane ściśle według sprawdzanej procedury pozwalającej na kontrolowanie pełnego procesu wykonywania badań, łącznie z procedurami przedanalitycznymi i poanalitycznymi. W przypadku uczestnictwa w programach międzynarodowych sprawozdania z badań są sporządzane zgodnie z wymogami organizatora.

Laboratorium powinno uczestniczyć w kontrolach co najmniej raz w roku, a jeśli to niemożliwe – co najmniej na dwa lata dla danego zakresu badań.

W przypadku niemożności uczestnictwa w kontrolach zewnątrzlaboratoryjnych laboratorium sprawdza metodę poprzez stosowanie próbek zdiagnozowanych wcześniej w ośrodkach rekomendowanych przez towarzystwa naukowe w Polsce i za granicą, stosowanie „próbek o znanym statusie" (własnych, wcześniej zbadanych próbek) oraz stosowanie materiałów odniesienia dostarczonych przez producentów metod.

Laboratorium powinno analizować wyniki uzyskanych kontroli, a w przypadku wyników negatywnych wprowadzić działania naprawcze, takie jak: sprawdzenie poprawności procedur, szkolenia personelu, dostosowanie metod badawczych do obowiązujących standardów.

2.8. Ocena i audyty

Laboratorium powinno zaplanować i wdrożyć procesy oceny i audytów wewnętrznych (według normy PN-EN ISO 15189:2023-02) w celu:

- sprawdzenia, czy wszystkie procesy są realizowane w sposób spełniający wymagania i potrzeby użytkowników,
- zapewnienia zgodności z systemem zarządzania jakością,
- ciągłego doskonalenia systemu zarządzania jakością.

Ocena działalności laboratorium powinna obejmować:

1. okresowe przeglądy zleceń oraz przydatności procedur i wymagań dotyczących próbek,
2. ocenę informacji zwrotnych od użytkowników/zleceniodawców,
3. propozycje i uwagi personelu,
4. audyt wewnętrzny,
5. zarządzanie ryzykiem,
6. wskaźniki jakości,
7. kontrole przeprowadzane przez organizacje zewnętrzne.

Jednostki zewnętrzne uprawnione do kontroli MLD:

- Kierownictwo jednostki nadrzędnej (szpitala, poradni, sieci laboratoriów) – w pełnym zakresie,
- Krajowa Izba Diagnostów Laboratoryjnych (KIDL), zespół wizytatorów Krajowej Rady Diagnostów Laboratoryjnych (KRDL) – w zakresie prowadzenia działalności diagnostycznej na podstawie Uchwały Nr 146/IV/2018 Krajowej Rady Diagnostów Laboratoryjnych z dnia 26 października 2018 roku w sprawie

uchwalenia Regulaminu zakresu i zasad działania wizytatorów Krajowej Rady Diagnostów Laboratoryjnych. Przeprowadzenie postępowania kontrolnego ma na celu ocenę wykonywania czynności diagnostyki laboratoryjnej przez diagnostę laboratoryjnego dokonaną na podstawie ustalonego stanu faktycznego przy zastosowaniu przyjętych kryteriów kontroli. W przypadku stwierdzenia nieprawidłowości celem postępowania kontrolnego jest również ustalenie ich zakresu, przyczyn i skutków, a także sformułowanie zaleceń zmierzających do usunięcia nieprawidłowości.

- Stacja Sanitarno-Epidemiologiczna (SANEPID) – w zakresie spełniania warunków sanitarno-epidemiologicznych,
- Państwowa Inspekcja Pracy (PIP) – w zakresie bezpieczeństwa i higieny pracy oraz legalności zatrudnienia,
- Narodowy Fundusz Zdrowia (NFZ) – w zakresie prowadzenia działalności diagnostycznej, jeżeli MLD lub jego jednostka nadrzędna posiada kontrakt w NFZ,
- Konsultant wojewódzki ds. laboratoryjnej genetyki medycznej lub diagnostyki laboratoryjnej z ramienia wojewody – w zakresie prowadzenia działalności diagnostycznej,
- Zleceniodawcy – w zakresie prowadzenia działalności diagnostycznej, którą podzlecają w MLD,
- Polskie Centrum Akredytacji (PCA) – w zakresie akredytowanych procedur, na żądanie MLD.

FUNKCJONOWANIE MEDYCZNEGO LABORATORIUM DIAGNOSTYCZNEGO

3

3.1. Zlecanie badań molekularnych

Zgodnie z Rozporządzeniem Ministra Zdrowia w sprawie jakości dla medycznych laboratoriów diagnostycznych i mikrobiologicznych z dnia 23 marca 2006 roku z późn. zmianami – obecnie w nowelizacji

Skierowanie na badanie molekularne powinno zawierać:

- datę zlecenia;
- datę pobrania materiału od pacjenta;
- nazwę i dane kontaktowe jednostki kierującej,
- imię i nazwisko pacjenta;
- płeć pacjenta;
- datę urodzenia pacjenta;
- PESEL (w przypadku noworodka nr PESEL matki, a w razie braku nr. PESEL – rodzaj i numer dokumentu potwierdzającego tożsamość);
- sposób kontaktu z pacjentem i lekarzem zlecającym badanie;
- Wskazanie do badania (rozpoznanie kliniczne, istotne informacje (np. o transfuzjach, stosowanym leczeniu)
- cel badania/zlecone badania;
- rodzaj materiału do wykonania badania molekularnego;
- podpis i pieczęć lekarza kierującego;
- w przypadku badania z krwi podpis i pieczęć pielęgniarki pobierającej materiał;
- dołączony formularz zgody na badania genetyczne.

3.2. Procesy przedanalityczne

3.2.1. Materiał biologiczny, który podlega ocenie patomorfologicznej do badań genetycznych:

a. wycinek tkankowy, zatopiony w bloku parafinowym lub preparat histologiczny barwiony lub niebarwiony H&E (*hematoxylin and eosin*);

Blok parafinowy – utrwalony wycinek tkankowy zatopiony w parafinie.

Preparat histologiczny – skrawek tkankowy z bloku parafinowego, umieszczony na szkiełku podstawowym.

Skrawek tkankowy – fragment tkanki o grubości 3–6 µm, skrojony z bloku parafinowego przy pomocy mikrotomu (urządzenia do precyzyjnego skrawania materiału tkankowego).

Makrodysekcja – wydzielenie fragmentu wycinka tkankowego z bloku parafinowego. Fragment podlegający makrodysekcji patomorfolog zaznacza pisakiem na ocenianym preparacie histologicznym barwionym HE.

b. preparat cytologiczny barwiony lub niebarwiony H&E;
   Preparat cytologiczny – utrwalony rozmaz komórkowy na szkiełku podstawowym.
   Cytoblok – zawiesina komórkowa utrwalana podobnie jak materiał tkankowy.
c. materiał mrożony i przechowywany w dedykowanych kasetkach w temperaturze -70°C.

3.2.2.1. Standardy utrwalania materiału biologicznego w formalinie do badań molekularnych

Tkankowy

Utrwalanie materiału tkankowego ma przede wszystkim na celu zachowanie architektury tkanki oraz morfologii komórek do badań histopatologicznych, a także zabezpieczenie materiału biologicznego w sposób, który umożliwi skuteczną i wiarygodną ocenę molekularną. Najczęściej stosowanym utrwalaczem, który odpowiednio zabezpiecza właściwości histologiczne tkanki, jest formalina. Tak utrwalony materiał jest obecnie rutynowo wykorzystywany również do diagnostyki molekularnej. Uzyskanie materiału diagnostycznego o odpowiedniej jakości do badań molekularnych wymaga przestrzegania standardów utrwalania.

Utrwalanie w formalinie

Utrwalanie w formalinie polega na chemicznym zatrzymaniu procesów biologicznych w tkance oraz zatrzymaniu kolonizacji przez mikroorganizmy. Istotą tej reakcji jest tworzenie przez formaldehyd mostków metylenowych, które sieciują i inaktywują białka w utrwalanym materiale.

Utrwalanie nie pozostaje bez wpływu na kwasy nukleinowe. Zbyt późne rozpoczęcie utrwalania lub niedostateczne utrwalenie materiału spowoduje degradację biologiczną pod wpływem nukleaz. Zbyt długi kontakt z formaldehydem przyczyni się natomiast do szeregu trwałych chemicznych zmian w DNA i RNA.

Głównym problemem jest zależna od formaldehydu fragmentacja kwasów nukleinowych, która przy dużym nasileniu ogranicza lub uniemożliwia uzyskanie wyniku z utrwalonego materiału. W trakcie utrwalania mostki metylenowe powstają również w obrębie kwasów nukleinowych oraz między kwasami nukleinowymi a sąsiadującymi białkami, tworząc tzw. wiązania krzyżowe. Ich nagromadzenie ogranicza możliwości izolacji DNA/RNA z utrwalonego materiału oraz upośledza przebieg reakcji PCR na kolejnych etapach procesu diagnostycznego. Utrwalanie w formalinie powoduje losowe zmiany chemiczne nukleotydów mogące być przyczyną wyników fałszywie pozytywnych. Modyfikowane chemicznie zasady azotowe są błędnie parowane przez polimerazę DNA w reakcjach PCR i przy zastosowaniu czułych metod mogą być identyfikowane jako mutacja. Najczęstszą z takich modyfikacji jest deaminacja cytozyny, której produktem jest uracyl. Enzym rozpoznaje tę zasadę jako tyminę i w trakcie syntezy komplementarnej nici zamiast guaniny pojawia się adenina. Artefakt może być powielony w kolejnych cyklach PCR i uwidoczniony jako tranzycja C>T lub G>A. Produktem deaminacji adeniny jest hipoksantyna, która może być przyczyną fałszywej substytucji A>G i T>C.

Najważniejsze zmiany chemiczne w DNA/RNA pod wpływem formaldehydu:

- fragmentacja związana ze zrywaniem wiązań fosfodiestrowych,
- tworzenie wiązań krzyżowych poprzez mostki metylenowe w obrębie kwasu nukleinowego i z sąsiadującymi białkami,
- deaminacja cytozyny prowadząca do artefaktów w sekwencji C>T, G>A,
- deaminacja adeniny prowadząca do artefaktów w sekwencji A>G, T>C.

Zmiany w kwasach nukleinowych mają charakter nieodwracalny i powodują trwałe obniżenie jakości materiału diagnostycznego lub jego całkowite zniszczenie. **Zachowanie kluczowych parametrów utrwalania materiału pozwala na powstanie tych zmian na akceptowalnym poziomie i uzyskiwanie diagnostycznych wyników w badaniach molekularnych.**

Najważniejsze parametry utrwalania w formalinie:

Stężenie: 4% formaldehyd

W formalinie stosowanej do utrwalania optymalne stężenie formaldehydu wynosi 4%. Stosowanie odczynnika o wyższym stężeniu prowadzi do nasilonej degradacji DNA/RNA.

10% formalina to zwyczajowa nazwa 4% wodnego roztworu formaldehydu.
Maksymalne stężenie formaldehydu w roztworze wodnym nie przekracza 40%.
Historycznie utrwalacz uzyskiwano przez 10-krotne rozcieńczenie takiego roztworu.

Neutralne pH, optymalnie 7,2–7,4

Formalina do utrwalania powinna posiadać neutralne pH (optymalnie w zakresie 7,2–7,4, w tym celu stosuje się odpowiedni układ buforujący). Zapewnia to odpowiednie środowisko reakcji utrwalania formaldehydem. Niebuforowany roztwór formaldehydu ma charakter kwaśny, a takie środowisko spowalnia reakcję utrwalania oraz zwiększa stopień degradacji DNA/RNA.

Czas utrwalania 6–48 godzin

Do badań molekularnych zalecany czas wynosi minimum 6 i nie przekracza 48 godzin. Tempo penetracji formaliny wynosi w temperaturze pokojowej ok. 1 mm/h. Spenetrowanie tkanki przez formalinę nie jest równoznaczne z utrwalaniem materiału. Od momentu wniknięcia formaldehydu w głąb tkanki potrzebne jest kilka godzin na przebieg reakcji utrwalania. Odpowiedni stopień usieciowania białek dla najdrobniejszych bioptatów osiąga się dopiero po 6 godzinach. Minimalna granica utrwalania powinna być dostosowana do wielkości utrwalanego materiału. Zbyt krótki czas utrwalania spowoduje biologiczną degradację DNA/RNA. Utrwalanie dłuższe niż 48 godzin zwiększa stopień fragmentacji i modyfikacji chemicznej kwasów nukleinowych zależnej od formaldehydu. Obecnie, przy rutynowym zastosowaniu RNA do analizy genów fuzyjnych, górna granica czasu utrwalania nie może przekraczać 48 godzin. Badania nad wpływem utrwalania w formalinie na jakość RNA wskazują na górną granicę czasu utrwalania wynoszącą 48 godzin, powyżej której obserwuje się wzmożoną fragmentację oraz obniżoną wydajność amplifikacji w reakcjach qPCR (*real-time PCR*) czy całkowity brak amplifikacji (silna degradacja RNA) w reakcjach RT-PCR (*reverse transcription PCR*) i qPCR.

Grubość utrwalanego materiału nie większa niż 10 mm

Materiał operacyjny powinien zostać przekrojony lub ponacinany na fragmenty o grubości 0,5–1 cm. Między przekroje można umieścić paski bibuły lub gazę w celu zapewnienia równomiernej penetracji formaliny. Utrwalanie grubszych fragmentów tkankowych nie zapewnia wystarczająco szybkiej penetracji formaliny w głębi tkanki i skutkuje degradacją materiału biologicznego.

Objętość utrwalacza co najmniej 10-krotnie większa od utrwalanego materiału

Materiał tkankowy powinien być zanurzony w minimum 10-krotnej objętości utrwalacza. Zaleca się jednak stosowanie większej objętości formaliny w stosunku do tkanki (15:1–20:1). Nadmiar utrwalacza (przewaga substratu) ma zapewnić odpowiednią stałą kinetykę reakcji utrwalania. Zastosowanie zbyt małej objętości skutkuje spowolnieniem penetracji formaliny i niedostatecznym utrwaleniem wewnątrz materiału.

Temperatura utrwalania nieprzekraczająca temperatury pokojowej (20–25°C)

Nie zaleca się podgrzewania formaliny, jeżeli tkanka ma być wykorzystana do badań molekularnych. W trakcie utrwalania nie powinno się przekraczać temperatury otoczenia. Wyższa temperatura przyspiesza degradację DNA/RNA zależną od formaldehydu.

Tab. 3.1. Najczęściej popełniane błędy utrwalania w formalinie

Nieprawidłowe warunki utrwalania	Skutek
Przekroczony czas utrwalania >48 h	Nasilona fragmentacja DNA/RNA oraz liczne artefakty w sekwencji C>T, G>A
10% formaldehyd	Nasilona fragmentacja DNA/RNA oraz liczne artefakty w sekwencji C>T, G>A
Utrwalanie zbyt dużych materiałów operacyjnych ze słabą penetracją formaliny	Degradacja biologiczna DNA/RNA
Zbyt wysoka temperatura utrwalania w sezonie letnim	Nasilona fragmentacja DNA/RNA oraz liczne artefakty w sekwencji C>T, G>A

Odwapnianie

Przed przeprowadzeniem do bloczka parafinowego bioptaty kostne poddaje się dodatkowo odwapnieniu w celu zmiękczenia i umożliwienia wykonania preparatów histologicznych. Odwapnianie przeprowadzane jest w kwaśnym środowisku, co dodatkowo może zwiększać stopień degradacji kwasów nukleinowych.

Zmiany chemiczne w DNA/RNA pod wpływem kwaśnego środowiska w trakcie odwapniania:

- fragmentacja związana ze zrywaniem wiązań fosfodiestrowych;
- powstawanie miejsc apurynowych związane ze zrywaniem wiązań glikozydowych.

Najmniejszy stopień degradacji DNA zaobserwowano w przypadku roztworu EDTA. Taki materiał cechuje najlepsza wydajność izolacji, integralność DNA oraz amplifikacja w PCR w porównaniu z innymi środkami odwapniającymi. Nie zaleca się stosowania roztworów HCl lub kwasu mrówkowego, jeśli materiał ma być wykorzystany do diagnostyki molekularnej.

Zalecany odczynnik do odwapniania:

- roztwór EDTA.

Procesor tkankowy

Materiał przed zatopieniem w parafinie powinien zostać całkowicie odwodniony w szeregu alkoholi. Przeprowadzenie do bloczka parafinowego tkanki zawierającej śladowe ilości wody spowoduje stopniową degradację materiału.

Zalecana jest systematyczna wymiana alkoholi w procesorze tkankowym zgodnie z wymogami producenta w celu zapewnienia optymalnego odwodnienia utrwalonego materiału.

Cytologiczny

- **rozmaz** – do jego utrwalenia wykorzystuje się alkohol etylowy (95–96%). Utrwalanie powinno się rozpocząć natychmiast (1–2 s) po zakończeniu biopsji. W związku z powyższym jakość DNA oraz RNA jest bardzo dobra. Mankamentem jest nie zawsze wystarczająca ilość komórek nowotworowych oraz jego wykorzystanie wiąże się ze zniszczeniem rozmazu;

- **cytoblok** – materiał bezpośrednio ze strzykawki wpuszcza się do utrwalacza z wykorzystaniem 10% zbuforowanej formaliny (4% roztwór formaldehydu) o pH 7,2–7,4. Czas utrwalania materiału cytologicznego powinien wynosić 6–24 godziny (maksymalnie 48 godzin) bezpośrednio po zaaspirowaniu.

3.2.2.2. Zabezpieczenie tzw. świeżej tkanki

Pobrany do badań genetycznych materiał tkankowy może zostać zabezpieczony bezpośrednio po pobraniu (bez wstępnego utrwalania w formalinie, tzw. materiał świeży) poprzez zamrożenie techniką „snap freezing" (np. w ciekłym azocie lub na suchym lodzie), a następnie przechowywany w temperaturze -70°C przez czas nieograniczony. Do przechowywania tkanek w takich warunkach stosuje się probówki z odpowiednich tworzyw sztucznych (odpornych na działanie niskich temperatur). Należy unikać kilkukrotnego zamrażania i rozmrażania materiału. Wykonywanie badań na tak zabezpieczonym materiale pozwala uniknąć występowania artefaktów utrwalania, które mogą utrudnić analizę uzyskanych danych genetycznych.

3.2.3. Ocena przydatności materiału do badania molekularnego:

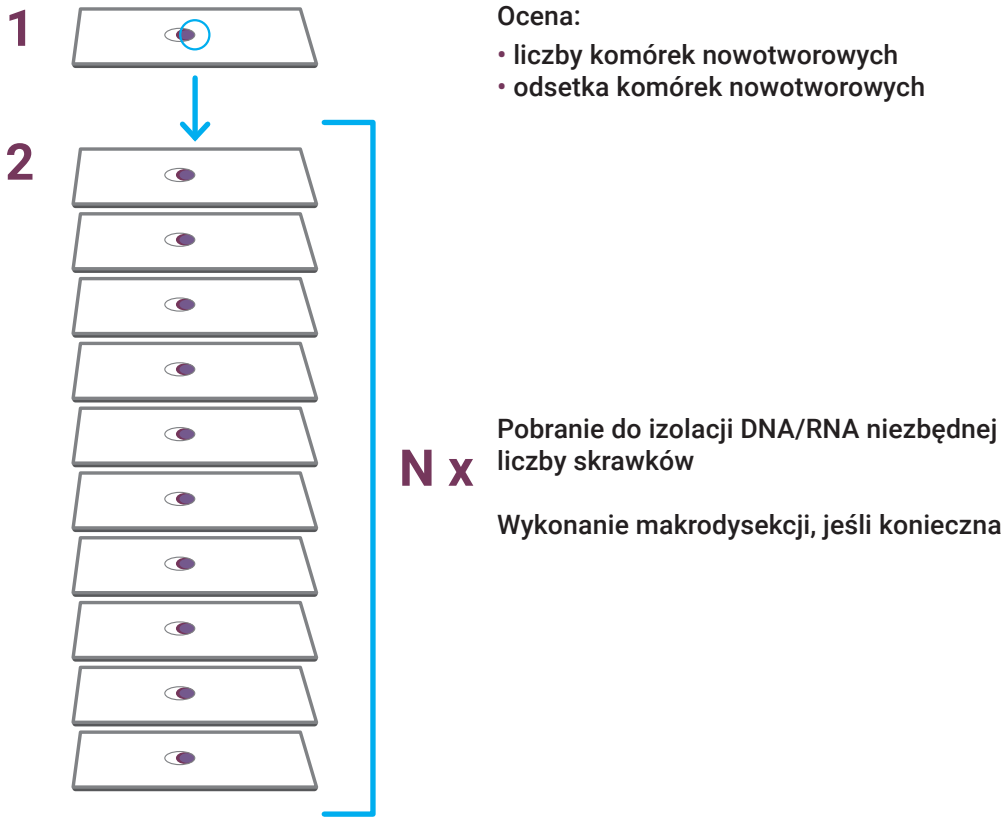
1. Typowanie reprezentatywnego materiału biologicznego przez lekarza patomorfologa:
   a. lekarz patomorfolog wybiera reprezentatywny materiał biologicznie (FFPE, cytoblok, preparat cytologiczny, preparat H&E), na podstawie którego dokonuje oceny jego przydatności do badania genetycznego:
      - liczba komórek nowotworowych,
      - odsetek komórek nowotworowych.
2. Przygotowanie próbek przez Zakład Patomorfologii:
   a. Przygotowywanie materiału biologicznego z bloków parafinowych:
      - preparaty niebarwione przeznaczone na badanie molekularne lub FISH. Dodatkowo, do tak przygotowanych preparatów dołącza się kolejny preparat histologiczny barwiony metodą HE (lub zdjęcie) z zaznaczonym przez lekarza patomorfologa obszarem utkania nowotworowego.
   b. Przygotowywanie materiału biologicznego z cytobloków:
      - preparaty niebarwione przeznaczone na badanie molekularne lub FISH. Dodatkowo, do tak przygotowanych preparatów dołącza się kolejny preparat barwiony metodą HE (lub zdjęcie) z zaznaczonym przez lekarza patomorfologa obszarem, w którym znajdują się komórki nowotworowe.
   c. Przygotowanie materiału biologicznego cytologicznego:
      - preparat cytologiczny/rozmaz po ocenie patomorfologicznej przekazywany jest w całości do badań genetycznych. Na preparacie cytologicznym przeznaczonym do badania FISH lekarz patomorfolog zaznacza markerem obszar, w którym znajdują się komórki nowotworowe.
   d. Przygotowanie materiału biologicznego zabezpieczonego poprzez mrożenie:
      - z zabezpieczonego materiału przygotowuje się preparat histologiczny barwiony metodą HE, który podlega ocenie lekarza patomorfologa pod kątem wskazania obszaru, w którym znajdują się komórki nowotworowe, oraz oceny odsetka utkania nowotworowego. Następnie wyselekcjonowany obszar materiału biologicznego jest krojony do probówek typu eppendorf i poddawany kolejnym etapom badań molekularnych.
3. Laboratorium na podstawie informacji od patomorfologa podejmuje decyzję o liczbie skrawków przeznaczonych do izolacji kwasów nukleinowych do planowanego badania.

W zależności od testu konieczne będzie uzyskanie od kilku do ponad 100 ng DNA/RNA na badanie. Dla wiarygodności wyniku istotne są:

- odsetek komórek nowotworowych powyżej progu detekcji stosowanej metody (testu),
- wydajność izolacji DNA/RNA pozwalająca na uzyskanie przynajmniej niezbędnej minimalnej ilości kwasu nukleinowego do wykonania badania.

Jeśli zachodzi konieczność dokonania makrodysekcji, to wykonuje się ją z serii preparatów, a nie bloczka parafinowego. Należy obchodzić się z materiałem pacjenta oszczędnie, ponieważ może zachodzić konieczność wykorzystania go również w przyszłości.

Ryc. 3.1. Schemat kwalifikacji materiału z bloczka parafinowego do diagnostyki molekularnej



3.2.4. Informacje o wytypowanym przez lekarza patomorfologa materiale do badań molekularnych:

1. W przypadku materiału biologicznego tkankowego (FFPE, preparat cytologiczny, cytoblok, materiał mrożony i inne):
   a. numer bloczka/preparatu,
   b. liczba komórek nowotworowych obecnych w preparacie barwionym metodą HE i odsetek komórek nowotworowych (na tle wszystkich komórek jądrzastych) obecnych w preparacie dla materiału drobinowego bądź biopsyjnego.

3.2.5. Ekstrakcja kwasów nukleinowych, ocena ilościowa i jakościowa

1. Proces ekstrakcji kwasów nukleinowych z tkanki zatopionej w parafinie powinien być wydajny i umożliwiać oczyszczanie z inhibitorów reakcji enzymatycznych. Ocenę statusu genów wykonuje się na poziomie DNA i/lub RNA.

2. Przed wykonaniem analizy genetycznej należy ocenić ilość i jakość wyizolowanego materiału genetycznego. Ocenę wykonuje się metodą spektrofotometryczną lub bardziej precyzyjną fluorymetryczną.

3.2.6. Kryteria odrzucenia próbki MLD:

- brak utkania nowotworowego;
- zbyt mała ilość materiału do izolacji DNA/RNA;
- słaba jakość/ilość wyizolowanego DNA/RNA;
- zdegradowany DNA/RNA;
- niezgodność opisu materiału do badań genetycznych z danymi pacjenta;
- niezgodność otrzymanego materiału z opisem kwalifikacji patomorfologicznej do badań genetycznych;
- brak wyniku patomorfologicznego i (konsultacji) kwalifikacji materiału do badania;
- brak informacji o odsetku komórek nowotworowych lub/i liczbie w preparacie cytologicznym;
- nieprawidłowo pobrany/zabezpieczony materiał (krew pobrana na nieprawidłowy antykoagulant, wymaz pobrany na niewłaściwe medium);
- nieprawidłowe przechowywanie materiału (degradacja DNA, RNA);
- brak zgody pacjenta na wykonanie badania.

Wartości alarmowe:

- bardzo mała (<9 mm2, 3x3 mm) powierzchnia materiału do izolacji DNA/RNA;
- wartości alarmowe poniżej 5% komórek nowotworowych lub poniżej 300 komórek nowotworowych **(ze wszystkich skrawków skrojonych do wykonania badania patrz 3.2.3c)** dla metod qPCR, FISH oraz wartości alarmowe poniżej 20% komórek nowotworowych lub poniżej 1000 komórek dla NGS;
- wartości alarmowe w molekularnych badaniach cytogenetycznych poniżej 50 komórek nowotworowych w nowotworach niehematologicznych;
- brak zastosowania makrodysekcji dla materiału z odsetkiem komórek nowotworowych ≤20%;
- brak wydruku z zaznaczonym polem preparatu z komórkami nowotworowymi do badania FISH;
- skrawki parafinowe o nieznanej grubości [µm];
- źle utrwalony cytoblok w utrwalaczu innym niż na bazie alkoholu;
- przekroczenie dopuszczalnego czasu/terminu przekazania próbek do badań (CTC, badania RNA);
- niekompletnie wypełnione skierowanie, brak zgody pacjenta na wykonanie badania;
- niekompletnie wypełniony patomorfologiczny wynik kwalifikacji materiału do badania.

3.3. Wykonywanie badań, procesy badawcze

Dnia 26 maja 2022 r. weszło w życie nowe rozporządzenie dotyczące wyrobów medycznych do diagnostyki in vitro [2017/746/UE] [IVDR], które bardzo precyzyjnie reguluje wszelkie aspekty związane z wykorzystaniem odczynników, zestawów i materiałów kontrolnych przewidzianych do stosowania w diagnostyce. Laboratorium stosuje metody diagnostyczne zgodne z Rozporządzeniem Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) 2017/746 z dnia 5 kwietnia 2017 r. w sprawie wyrobów medycznych do diagnostyki in vitro, które umożliwiają uzyskanie wiarygodnego wyniku diagnostycznego i są:

1. certyfikowane CE-IVD zgodnie z Rozporządzeniem IVDR i używane zgodnie z wytycznymi producenta wyrobu, lub
2. w przypadku braku metody certyfikowanej CE-IVD spełniającej wymagania laboratorium dopuszczone jest zastosowanie:
   a. zestawów certyfikowanych CE-IVD używanych poza wskazaniami lub modyfikowanych we własnym zakresie, pod warunkiem i spełnienia kryteriów, o których mowa w rozdz. II, art. 5, p. 5 Rozporządzenia IVDR,
   b. zestawów do badań naukowych (RUO), pod warunkiem i spełnienia kryteriów, o których mowa w rozdz. II, art. 5, p. 5 Rozporządzenia IVDR,
   c. metod opracowanych przez laboratorium (*laboratory-developed tests*, LDT) wykorzystywanych na skalę nieprzemysłową na potrzeby instytucji zdrowia publicznego pod warunkiem i spełnienia kryteriów, o których mowa w rozdz. II, art. 5, p. 5 Rozporządzenia IVDR.

Walidacja lub weryfikacja metody w laboratorium jest udokumentowana.

W przypadku testu komercyjnego, opracowanego i zwalidowanego przez producenta, ocenie podlega jego precyzja i poprawność. W odniesieniu do testów komercyjnych, modyfikowanych w laboratorium, oceniana jest również powtarzalność, odtwarzalność i poprawność. Dokonuje się także porównania wiarygodności wyników badań uzyskiwanych przy użyciu procedury zalecanej przez producenta oraz procedury zmodyfikowanej przez laboratorium. Metody opracowane w laboratorium podlegają procesowi pełnej walidacji.

Ponadto laboratorium ma obowiązek opracowania i wdrożenia procedur stosowanych metod badawczych, które zawierają:

- cel i sposób wykonywania badania;
- wykaz wyrobów medycznych do diagnostyki in vitro, w tym odczynników i materiałów kontrolnych wraz z warunkami ich przechowywania, oraz sprzętu laboratoryjnego i aparatury pomiarowo-badawczej;
- ostrzeżenia i środki ostrożności dotyczące użytkowania odczynników;
- instrukcje przygotowania materiału do badań;
- opis postępowania analitycznego;
- opis charakterystyki parametrów analitycznych metody zwalidowanej przez laboratorium;
- sposób formułowania wyników i przygotowania sprawozdania z badania.

Stosowane w laboratorium metody badań i procedury diagnostyczne odpowiadają powszechnie przyjętym międzynarodowym standardom analizy cytogenetycznej i molekularnej.

Standardy badań molekularnych uwzględniają:

1. zasady izolacji i oczyszczania kwasów nukleinowych (DNA i RNA);
2. zasady rutynowych metod analizy kwasów nukleinowych (DNA i RNA) oraz technik identyfikacji wariantów molekularnych (markerów genomowych).

Zapewnienie odpowiedniego standardu badań diagnostycznych, a w szczególności odpowiedniego poziomu kompetencji zespołu diagnostów, wymaga, aby w laboratorium wykonywanych było nie mniej niż 100 badań rocznie wykonywanych daną metodą (badania cytogenetyczne, np. cytogenetyka klasyczna lub molekularne, np. metoda *real-time PCR*, NGS i inne); w przypadku, gdy wykonano mniej niż 100 badań danego rodzaju, konieczna jest ocena zewnętrzna.

Dla efektywnego funkcjonowania laboratorium medycznego bardzo istotne jest stałe aktualizowanie przez personel medyczny wiedzy oraz zdolności manualnych. Personel medyczny laboratorium powinien regularnie uczestniczyć w szkoleniach wewnętrznych i zewnętrznych podnoszących jego kwalifikacje i kompetencje zarówno w kwestiach praktycznych (technicznych), jak i teoretycznych.

Niezwykle istotnym elementem, warunkującym zgodność z prawem wykonywania badań przez laboratoria diagnostyczne, są wymogi dotyczące pomieszczeń, w których znajduje się laboratorium oraz wymogi odnośnie do wyposażenia w aparaturę pomiarowo-badawczą.

Kwestie dotyczące wyposażenia laboratorium w aparaturę medyczną reguluje Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 21 marca 2006 roku (Dz.U. 2006, nr 59, poz. 422 z późn. zm.) w sprawie wymagań, jakim powinno odpowiadać medyczne laboratorium diagnostyczne.

Laboratorium wyposaża się w aparaturę pomiarowo-badawczą dostosowaną do rodzaju wykonywanych badań, umożliwiającą stosowanie metod badawczych zgodnych z aktualnym stanem wiedzy.

Laboratorium prowadzi dokumentację dotyczącą aparatury pomiarowo-badawczej oraz sprzętu stanowiących wyposażenie laboratorium, zawierającą:

1. karty gwarancyjne;
2. specyfikacje techniczne;
3. datę rozpoczęcia eksploatacji;
4. wykaz pracowników przeszkolonych i upoważnionych do obsługi oraz bezpośrednio odpowiedzialnych za daną aparaturę lub sprzęt;
5. instrukcje użytkowania;
6. zapisy kalibracji;
7. instrukcje postępowania przy działaniach naprawczych i korygujących;
8. oświadczenie o dopuszczeniu do użytkowania po usunięciu awarii;
9. dane o bieżącej obsłudze i kontroli;
10. dane o konserwacji bieżącej i okresowej prowadzonej zgodnie ze wskazaniami wytwórców przez użytkowników lub podmioty autoryzowane przez dystrybutorów albo wytwórców.

3.3.1. Wykonanie diagnostycznego badania genetycznego

1. Materiał do diagnostycznych badań genetycznych stanowi:
   a. krew obwodowa pobrana na EDTA;
   b. krew obwodowa do analiz ctDNA pobrana do właściwych probówek ze stabilizatorem;
   c. preparaty cytologiczne: utrwalone rozmazy z biopsji;
   d. wymazy lub inny materiał biologiczny naniesiony jako rozmaz na szkiełku podstawowym;
   e. materiały cytologiczne: utrwalone rozmazy z biopsji, wymazy lub inny materiał biologiczny przeniesione do probówek typu eppendorf zawierających odpowiedni bufor;
   f. materiał tkankowy zatopiony w bloczku parafinowym;
   g. materiał z bloczka parafinowego w postaci skrawków parafinowych;

h. materiał tkankowy świeży, mrożony;
i. wyizolowany kwas nukleinowy DNA/RNA.

2. Próbki materiału biologicznego opracowywane są przez przeszkolony i wykwalifikowany personel medyczny laboratorium zgodnie ze sposobami postępowania opisanymi w wewnętrznych procedurach laboratoryjnych.
3. Wszystkie czynności dotyczące przygotowania aparatów do pracy oraz wykonania badania przeprowadzane są zgodnie z instrukcjami producenta i/lub procedurami badawczymi laboratorium przez przeszkolonych pracowników.
4. Do każdego diagnostycznego badania genetycznego pracownik wykonuje wewnątrzlaboratoryjną kontrolę jakości w oparciu o próby kontrolne pozytywne i negatywne oraz próby zerowe (bez matrycy, ang. *non-template controls*).
5. Personel medyczny MLD szczegółowo analizuje wyniki oznaczeń zgodnie ze sposobami postępowania opisanymi w wewnętrznych procedurach laboratoryjnych. Poprawność uzyskanych wyników ocenia się poprzez dokładną analizę oznaczeń zgodnie ze szczegółowymi zaleceniami producenta testu wykorzystywanego do diagnostyki, a także zastosowaniem aktualnych baz danych, wytycznych i literatury.

Badanie przeprowadzane jest przez wykwalifikowany personel, z użyciem odpowiedniego wyposażenia, podlegającego okresowym kontrolom i (jeśli tego wymaga) wzorcowaniu i odpowiedniej jakości odczynników. Analiza uzyskanych danych dokonywana jest przy pomocy dedykowanego oprogramowania.

Mimo iż oferta różnorodnych wyrobów medycznych do diagnostyki in vitro dynamicznie się poszerza, nadal często zdarza się sytuacja, w której na rynku brakuje gotowej certyfikowanej metody służącej do identyfikacji zmian genetycznych, które mogą być przyczyną różnych chorób lub stanowią istotny czynnik ryzyka rozwoju chorób nowotworowych. W takiej sytuacji laboratorium ma możliwość opracowania własnego testu lub metody diagnostycznej i ma prawo ich wykorzystywania w procesie diagnostycznym wtedy, gdy posiada akredytację na zgodność z normą ISO 15189:2012. W efekcie zgodnie z rozporządzeniem IVDR do świadczenia pełnego zakresu dotychczasowych usług laboratorium będzie wymagało nadzoru ze strony jednostki akredytującej.

Wybór metody diagnostycznej uzależniony jest od preferencji laboratorium. Warunkuje go doświadczenie personelu oraz dostępność sprzętu diagnostycznego (tab. 3.2.).

Tab. 3.2. Wybrane techniki biologii molekularnej wykorzystywane w diagnostyce molekularnej nowotworów

Technika	Granica wykrywalności lub minimalny odsetek komórek z wariantem*	Czas analizy	Uwagi
Sekwencjonowanie metodą Sangera	20%	Poniżej 10 dni roboczych dla zmian diagnozowanych rutynowo w laboratorium.	Dosyć mała czułość, wynik wymaga interpretacji przez doświadczonego diagnostę, relatywnie niski koszt, możliwość detekcji nowych wariantów molekularnych, nie posiada CE IVD.
Metody oparte o PCR allelospecyficzny (ASA-PCR) – zestawy komercyjne	1–5%	Poniżej 10 dni roboczych.	Wiarygodne i powtarzalne techniki oparte o PCR, posiadają wysoką czułość i wysoką specyficzność, możliwość wykrycia konkretnych wariantów molekularnych, mogą posiadać CE IVD.
Sekwencjonowanie następnej generacji (NGS) – zestawy komercyjne	0,1–10%	Poniżej 20 dni roboczych Preferowany czas – nie powinien przekraczać 10 dni roboczych po wejściu materiału do laboratorium.	Kosztowne, czas zwykle jest wydłużony ze względu na kumulowanie prób do oznaczenia, wymagają wykonania i interpretacji przez doświadczonego diagnostę, mogą posiadać CE IVD.
dPCR (cyfrowy PCR)	0, 1–0,01%	Poniżej 10 dni roboczych.	Wiarygodne i powtarzalne techniki oparte o dPCR, posiadają wysoką czułość i wysoką specyficzność, możliwość wykrycia konkretnych mutacji, wymagają zastosowania wielu sond molekularnych, mogą posiadać CE IVD.
FISH	Zwykle 3–15%. Zależnie od badanego markera i ustalonego punktu odcięcia sondy konieczne 100 komórek w preparacie	Poniżej 10 dni roboczych.	Do zalet metody należy zaliczyć dokładną i prostą detekcję oraz stosunkowo wysoką czułość i specyficzność. Natomiast kluczowe wady to: ograniczona liczba rearanżacji ocenianych w jednym badaniu, możliwość uzyskania wyników fałszywie dodatnich z powodu identyfikowania zmian niefunkcjonalnych (fuzje poza ramką odczytu), brak możliwości zidentyfikowania różnych partnerów fuzyjnych w jednym badaniu, a także brak możliwości wykrywania fuzji antysensowanych (niekanonicznych).

* Minimalna zawartość komórek z wariantem w stosunku do komórek prawidłowych.

3.4. Sprawozdawanie i wydawanie wyników badań

- Celem sprawozdania z badania molekularnego jest przekazanie wyników badań w formacie, który jest jasny i zrozumiały dla lekarzy podejmujących decyzje kliniczne. Ten aspekt jest regulowany przez **Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 23 marca 2006 r.** w sprawie standardów jakości dla medycznych laboratoriów diagnostycznych i mikrobiologicznych (Dz.U. 2006 nr 61 poz. 435) ze zmianami (Dz.U. 2019 poz. 2065), (Dz.U. 2020 poz. 2042).

Pierwsza strona sprawozdania

Na pierwszej stronie sprawozdania powinny znajdować się następujące informacje:

1. dane laboratorium wykonującego badanie;
2. nr badania nadany przez laboratorium;
3. dane jednostki oraz lekarza (telefon i adres e-mail kontaktowy) kierującego na badanie;
4. data zlecenia badania;
5. data i godzina pobrania materiału;
6. data i godzina otrzymania materiału do badania;

7. identyfikatory pacjenta (imię i nazwisko, PESEL, data urodzenia, adres zamieszkania, sposób komunikacji z pacjentem);
8. płeć pacjenta;
9. identyfikatory próbki (np. numer bloczka parafinowego lub krwi obwodowej, numer izolacji kwasu nukleinowego);
10. stan próbki;
11. data wykonania badania (lub zakres dat);
12. wskazanie do wykonania badania;
13. krótki opis metodyczny (rodzaj badania i zastosowana metoda) uwzględniający ograniczenia metody;
14. wynik – informacja o wykrytych wariantach patogennych i prawdopodobnie patogennych;
15. laboratoryjna interpretacja uzyskanego wyniku (np. opisanie działania mutacji na kodowane białko, a w przypadku czynników predykcyjnych dla terapii ukierunkowanych molekularnie potencjalny wpływ obecnej mutacji na odpowiedź na dany lek);
16. ewentualne zalecenia dotyczące poradnictwa genetycznego lub inne (np. konieczność dodatkowych badań);
17. dane osoby wykonującej i autoryzującej badanie – imię i nazwisko, tytuł zawodowy, uzyskane specjalizacje, nr wykonywania zawodu i podpis;
18. data wydania wyniku.

Na pierwszej stronie w sposób czytelny powinna zostać przedstawiona informacja dotycząca zidentyfikowanych wariantów patogennych i/lub prawdopodobnie patogennych lub ich braku w badanej próbce. Ponadto, na pierwszej stronie należy przedstawić najważniejsze informacje dotyczące stosowanej metodyki oraz jej potencjalnych ograniczeń. Dodatkowe informacje o wskaźnikach jakościowych powinny być przedstawione na kolejnych stronach sprawozdania z badania diagnostycznego. Dotyczy to również innych informacji technicznych, które nie są istotne dla lekarza kierującego, które jednak należy umieścić w sprawozdaniu. Dokument powinien być czytelny i mieć zwartą formę, zaleca się, by starać się go ograniczyć do jednej kartki (dwóch stron).

Opis wariantów genetycznych i ich klasyfikacja

1. W raporcie należy używać oficjalnych nazw genów zatwierdzonych przez HUGO Gene Nomenclature Committee (https://www.genenames.org/). Należy podać oznaczenie sekwencji referencyjnej preferowane LRG lub wg NCBI czy ENSEMBL lub ostatnio preferowanej MANE (https://tark.ensembl.org/web/mane_project/). Wskazane jest umieszczenie dodatkowo nazwy zwyczajowej genów/wariantów, jeżeli może ona pomóc w interpretacji wyników przez lekarza kierującego.
2. Na sprawozdaniach powinny być raportowane warianty patogenne oraz prawdopodobnie patogenne. Decyzja o raportowaniu wariantów o nieznanym znaczeniu klinicznym (VUS) należy do kierownika laboratorium. W wyjątkowych przypadkach VUS może być raportowany na prośbę genetyka klinicznego. Informacja ta powinna być zamieszczona na wyniku.
3. Zidentyfikowane warianty należy zapisywać zgodnie z wytycznymi Human Genome Variation Society (http://varnomen.hgvs.org/). Informacja potwierdzająca ten fakt powinna znaleźć się na wyniku. Dla badań cytogenetycznych należy stosować się do reguł aktualnego wydania ISCN (obecnie ISCN 2020).
4. Tzw. Incidental findings – przypadkowo wykryte warianty, niewiązane ze wskazaniem do badania, należy raportować zgodnie z wytycznymi (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/docs/acmg/).
5. Warianty należy klasyfikować zgodnie z wytycznymi ACMG, odpowiednio dla wariantów germinalnych (PMID: 25741868) i somatycznych (PMID: 27993330). Informacja potwierdzająca ten fakt powinna znaleźć się na wyniku:

a. zawarte w raporcie dowody potwierdzające klasyfikację powinny być przedstawione w jasny i zrozumiały sposób;
b. należy zacytować publikacje zawierające istotne informacje mające wpływ na klasyfikację wariantu;
c. należy stosować pełne nazwy poszczególnych klas, np. takie jak „prawdopodobnie patogenne", a nie numer kategorii (np. „klasa 4");
d. w przypadku niektórych grup pacjentów lub genów istnieją międzynarodowe konsorcja eksperckie, które klasyfikują poszczególne warianty. Laboratorium powinno rozważyć, czy stosuje klasyfikację wariantu zaproponowaną przez konsorcja, czy też klasyfikuje warianty samodzielnie. Informacja ta powinna być dostępna dla lekarzy;
e. w przypadku metody NGS wynik powinien zawierać informację, jaki odsetek badanej sekwencji miał wymaganą głębokość sekwencjonowania, zwłaszcza dla wyników, gdzie nie wykryto wariantów patogennych czy prawdopodobnie patogennych.

Metodyka

Opis metodyczny powinien zawierać informacje na temat:

1. Metody wykorzystanej do izolacji kwasów nukleinowych
2. Odczynników i technologii wykorzystywanej do przeprowadzenia analizy
3. W przypadku badań z wykorzystaniem techniki NGS konieczne jest przedstawienie informacji dotyczących:
   a. odczynników stosowanych do przygotowania bibliotek;
   b. rodzaju badania (hot-spot NGS, panel genowy, WES, WGS);
   c. listy analizowanych genów;
   d. rodzaju sekwenatora;
   e. analizy danych (wersja genomu referencyjnego, wersja używanego oprogramowania),
   f. ograniczenia metody:
      - czułości i specyficzności testu;
      - informacji o regionach, które nie zostały objęte analizą;
      - ograniczeń dotyczących możliwości identyfikacji określonych wariantów genetycznych (np. CNV);
      - ograniczeń narzuconych przez strukturę genomu lub metodę sekwencjonowania (np. brak możliwości wykrycia SNP w regionach bogatych w GC);
      - potencjalnych ograniczeń wynikających ze stosowania analizy bioinformatycznej;
      - ewentualnych możliwości uzyskania wyników fałszywie negatywnych.

Ponadto, laboratorium powinno mieć opracowaną strategię dotyczącą:

1. Przekazania wyników badań pacjentom/zlecającemu.

Format wyniku

- Strony wyniku powinny być numerowane nr 1/2 2/2 itd. Każda strona w nagłówku lub stopce powinna zawierać minimum danych identyfikacyjnych pacjenta (imię, nazwisko, data urodzenia). Koniec sprawozdania powinien być jasno oznaczony.
- Wynik autoryzuje specjalista laboratoryjnej genetyki medycznej.

3.5. Procesy poanalityczne

1. W przypadku gdy materiał biologiczny (krew, FFPE, materiał tkankowy świeży/mrożony lub izolaty DNA/RNA) zostaną wykorzystane w całości, należy to odnotować w dokumentacji związanej z wykonywanym badaniem molekularnym.
2. Po uzyskaniu świadomej zgody od pacjenta na przechowywanie materiału biologicznego na potrzeby ewentualnego powtarzania badania lub rozszerzenia badania lub na potrzeby badań naukowych materiał biologiczny (krew, FFPE lub izolaty DNA/RNA) po zakończeniu badania można przechowywać w terminie określonym przez dane laboratorium:
    - Krew pełną przechowywać w temperaturze -20°C/-80°C, w przypadku konieczności powtórzenia badania lub zlecenia dodatkowych badań.
    - DNA izolowane z materiału tkankowego (blok parafinowy) przechowywać w temperaturze -20°C/-80°C po zakończeniu diagnostyki molekularnej.
    - RNA izolowane z materiału tkankowego (blok parafinowy), świeżego, krwi pełnej przechowywać w temperaturze -80°C po zakończeniu diagnostyki molekularnej.

DIAGNOSTYKA GENETYCZNA NOWOTWORÓW LITYCH W PRAKTYCE

4

4.1. Rak jelita grubego

4.1.2. Rak jelita grubego – epidemiologia, terapia anty-EGFR, MSI

- Rak jelita grubego (RJG) (ang. *colorectal cancer* – CRC) należy do najczęściej występujących nowotworów złośliwych na świecie.
- Metody leczenia uzależnione od takich czynników jak stopień zaawansowania oraz lokalizacja.
- Nowoczesne terapie celowane wymagające molekularnej diagnostyki czynników predykcyjnych ukierunkowane są przede wszystkim na receptor EGF (EGFR).
- Terapia anty-EGFR z wykorzystaniem przeciwciał monoklonalnych ukierunkowanych na receptor naskórkowego czynnika wzrostu stosowana jest obecnie w Polsce jako leczenie pierwszego rzutu u chorych na zaawansowanego raka jelita grubego.
- Przeciwciała monoklonalne anty-EGFR, takie jak cetuksymab i panitumumab, mogą być stosowane w monoterapii lub w leczeniu skojarzonym z chemioterapią u pacjentów bez patogennych wariantów w genach *KRAS*, *NRAS* oraz *BRAF* p.Val600Glu (p.V600E).
- W przypadku obecności wariantu *BRAF* p.Val600Glu w przerzutowym raku jelita grubego istnieje możliwość zastosowania przeciwciała monoklonalnego anty-EGFR w skojarzeniu z inhibitorem kinazy BRAF.
- Dostępne dane wskazują, że chorzy na MMRd/MSI CRC w II stopniu zaawansowania mają doskonałe rokowanie i nie odnoszą korzyści z chemioterapii adjuwantowej opartej na 5-FU.
- Obecność deficytu naprawy źle sparowanych zasad/niestabilności mikrosatelitarnej (MMRd/MSI) jest czynnikiem predykcyjnym odpowiedzi na immunoterapię.

4.1.3. Materiał do badań molekularnych

- W przerzutowym raku jelita grubego (IV stopień zaawansowania klinicznego) w pierwszej kolejności należy rozważyć badanie ogniska wtórnego nowotworu. Jeżeli guz przerzutowy nie jest dostępny, należy oceniać tkankę pochodzącą z guza pierwotnego.
- W badaniu mutacji preferowany jest w pierwszej kolejności materiał operacyjny z guzem pierwotnym lub wtórnym niż drobny materiał z kolonoskopii zawierający znacznie mniej tkanki.
- Jeśli zastosowano przedoperacyjną radio/chemioterapię i wynik badania histopatologicznego zawiera informację o widocznej odpowiedzi na leczenie, w pierwszej kolejności należy rozważyć badanie ogniska wtórnego (np. przerzut do wątroby) lub materiału z kolonoskopii. Guz pierwotny z materiału operacyjnego w takim przypadku może zawierać niewystarczającą ilość utkania nowotworu.
- Jeżeli u pacjenta występowały co najmniej dwa ogniska pierwotne w jelicie grubym (synchroniczne lub metachroniczne), należy w pierwszej kolejności przeznaczyć do badania ognisko wtórne w celu ustalenia statusu mutacji w klonie odpowiedzialnym za rozsiew choroby.

- Badanie MSI może być wykonane na świeżej, zamrożonej lub zatopionej w parafinie tkance nowotworowej przy użyciu testu opartego na PCR do wykrywania niestabilności.
- Wybrany preparat do diagnostyki zmian genetycznych w genach *KRAS/NRAS/BRAF* i MSI powinien zawierać odpowiedni odsetek komórek nowotworowych w ilości nie mniejszej niż 20% dla mutacji i 30% dla MSI.
- W przypadkach, kiedy w preparatach obserwuje się znaczne ilości tkanki prawidłowej, należy wykonać makro- lub mikrodysekcję w celu wyodrębnienia utkania nowotworowego. Dopuszcza się stosowanie preparatów zawierających mniejsze utkanie nowotworowe niż 20%, jednak w takich przypadkach zastosowana metoda analityczna powinna cechować się wysoką czułością, może to być np. ilościowa reakcja łańcuchowej polimerazy (qPCR) lub PCR emulsyjny (ddPCR) lub NGS. W takim przypadku nie zaleca się stosowania metody sekwencjonowania Sangera, której czułość jest na poziomie ok. 20%.
- Liczba skrawków powinna być uzależniona od wielkości fragmentu tkanki nowotworowej. W przypadku dużych fragmentów (o średnicy wycinka ok. 1 cm) wystarczające są 2–3 skrawki (o grubości nieprzekraczającej 4–5 μm), natomiast w przypadku niewielkich wycinków (o średnicy 2–3 mm) wymagana jest analiza co najmniej 10 skrawków. Liczba skrawków powinna zostać ustalona w wewnętrznych procedurach walidacyjnych dla metody diagnostycznej.
- Konieczny podkreślenia jest fakt, iż preparat wybarwiony HE do oceny zawartości procentowej nowotworu musi być wykonany bezpośrednio przed preparatem do analizy molekularnej. W przeciwnym razie zawartość komórek guza w preparacie wybarwionym HE i w preparatach przygotowanych do badania molekularnego może się znacząco różnić, a to z kolei może negatywnie wpływać na wynik badania molekularnego.

4.1.4. Czynniki predykcyjne warunkujące odpowiedź na terapie celowane w przerzutującym raku jelita grubego

Białka RAS

- Związanie liganda przez receptor EGFR powoduje aktywację białka z rodziny RAS polegającą na związaniu przez nie GTP. Spośród nich znaczenie rokownicze w kontekście terapii RJG mają mutacje w genach *NRAS* i *KRAS*.
- Większość aktywujących mutacji w genach *NRAS* i *KRAS* dotyczy kodonów 12 i 13. Stanowią one odpowiednio 70% i 20% wszystkich mutacji wykrywanych w raku jelita grubego. Znacznie rzadziej obserwuje się mutacje w kodonach 59, 61, 117, 146 i innych (tab. 4.1.).

Tab. 4.1. Mutacje występujące w genach *KRAS*/*NRAS*

Gen	Ekson	Kodon	Nazwa mutacji na poziomie białkowym	Nazwa mutacji na poziomie nukleotydowym
KRAS	2	12	p.Gly12Asp	c.35G>A
			p.Gly12Val	c.35G>T
			p.Gly12Cys	c.34G>T
			p.Gly12Arg	c.34G>C
			p.Gly12Ser	c.34G>A
			p.Gly12Ala	c.35G>C
		13	p.Gly13Asp	c.38G>A
			p.Gly13Cys	c.37G>T
			p.Gly13Arg	c.37G>C
			p.Gly13Ser	c.37G>A
			p.Gly13Ala	c.38G>C
			p.Gly13Val	c.38G>T
	3	59	p.Ala59Thr	c.175G>A
			p.Ala59Glu	c.176C>A
			p.Ala59Gly	c.176C>G
			p.Gln61Lys	c.180_181delinsAA
			p.Gln61Leu	c.182A>T
			p.Gln61Arg	c.182A>G
			p.Gln61His	c.183A>C
			p.Gln61His	c.183A>T
	4	117	p.Lys117Asn	c.351A>C
			p.Lys117Asn	c.351A>T
		146	p.Ala146Thr	c.436G>A
			p.Ala146Pro	c.436G>C
			p.Ala146Val	c.437C>T
NRAS	2	12	p.Gly12Cys	c.34G>T
			p.Gly12Ser	c.34G>A
			p.Gly12Ala	c.35G>C
			p.Gly12Asp	c.35G>A
			p.Gly12Val	c.35G>T
		13	p.Gly13Arg	c.37G>C
			p.Gly13Val	c.38G>T
			p.Gly13Asp	c.38G>A
	3	59	p.Ala59Thr	c.175G>A
		61	p.Gln61Lys	c.181C>A
			p.Gln61Leu	c.182A>T
			p.Gln61Arg	c.182A>G
			p.Gln61His	c.183A>T
			p.Gln61His	c.183A>C
	4	117	p.Lys117Asn	c.351G>C
			p.Lys117Asn	c.351G>T
		146	p.Ala146Thr	c.436G>A
			p.Ala146Val	c.437C>T

UWAGA! Stosując sekwencjonowanie, różnorodność wariantów jest znacznie większa, przykłady spoza tabeli:

KRAS c.34_35delinsCT; *p.Gly12Leu*
KRAS c.34_35delinsTA; *p.Gly12Tyr*
KRAS c.34_35delinsTT; *p.Gly12Phe*
KRAS c.34_35delinsTT; *p.Gly12Leu*
KRAS c.35_36delinsAA; *p.Gly12Glu*
KRAS c.38_39delinsAA; *p.Gly13Glu*
KRAS c.38_39delinsAT; *p.Gly13Asp*
KRAS c.38_39delinsTT; *p.Gly13Val*
KRAS c.175G>T; *p.Ala59Ser*
KRAS c.180_181delinsCA; *p.Gln61Lys*
KRAS c.181_183_delinsTAC; *p.Gln61Tyr*
KRAS c.182A>C; *p.Gln61Pro*
KRAS c.350A>G; *p.Lys117Arg*
NRAS c.436G>T; *p.Ala146Ser*
KRAS c.27_29dup; *p.Gly10dup*
KRAS c.29_31dup; *p.Gly10dup*
KRAS c.30_35dup; *p.Ala11_Gly12dup*
KRAS c.36_38dup; *p.Gly13dup*
KRAS c.38_40dup; *p.Gly13dup*

Białko BRAF

- Poza białkami RAS bardzo istotną rolę warunkującą skuteczność odpowiedzi na terapię celowaną w RJG odgrywa białko BRAF.
- Mutacje w *BRAF* występują w 5–22% raków jelita grubego. Zidentyfikowano dotąd ponad 40 rodzajów mutacji *BRAF* występujących w 24 różnych kodonach.
- Najczęściej (90% przypadków) identyfikowaną mutacją w RJG jest zlokalizowana w domenie kinazowej substytucja waliny w pozycji 600 glutaminianem (c.1799T>A; p.Val600Glu; nazwa zwyczajowa V600E).
- Mutacja *BRAF* p.V600E jest obecnie czynnikiem predykcyjnym dla leczenia skojarzonego inhibitor anty-BRAF i przeciwciało monoklonalne anty-EGFR.

MSI

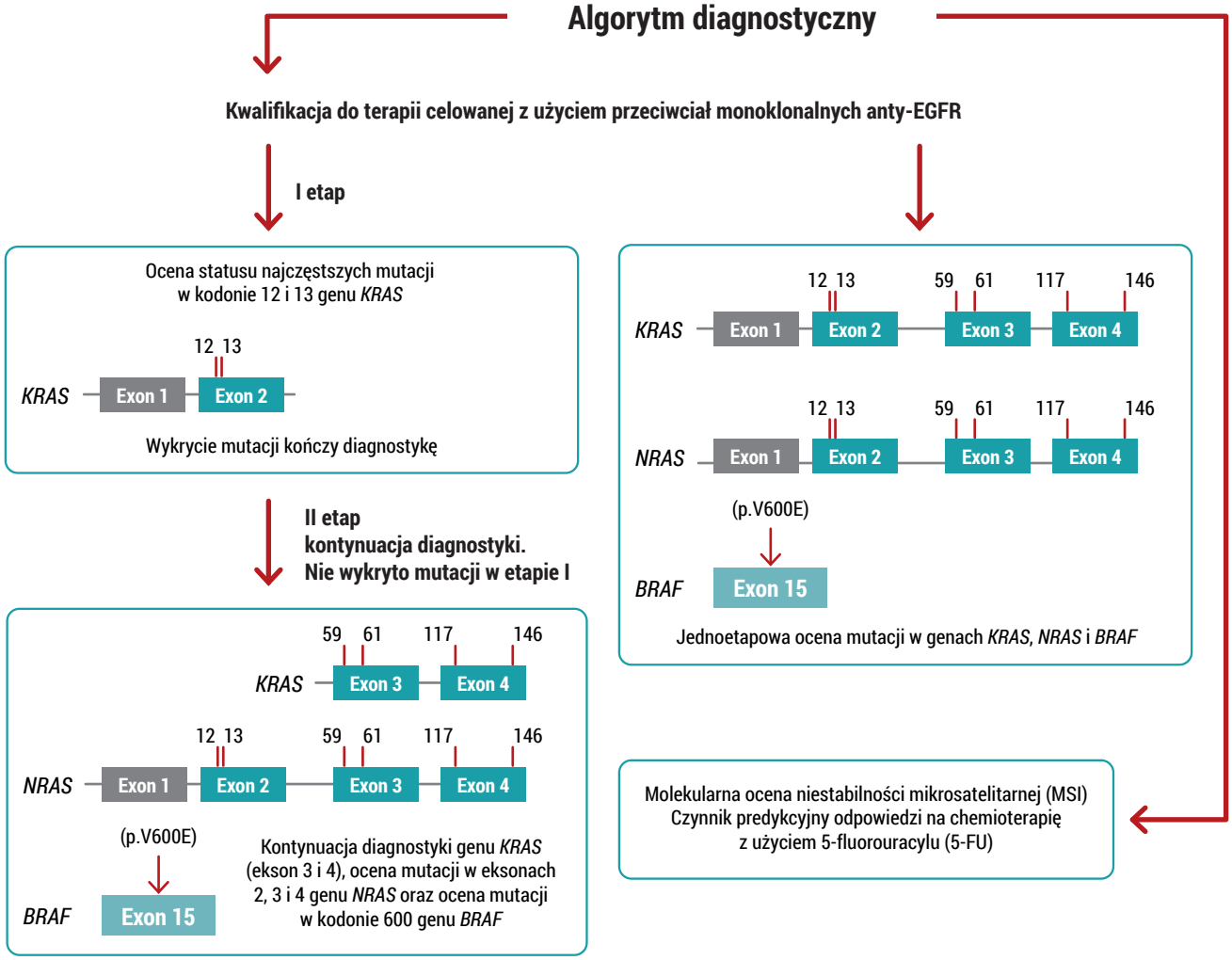
- Około 12–15% raków jelita grubego ma upośledzoną naprawę niedopasowania DNA (MMRd), która w guzie charakteryzuje się niestabilnością mikrosatelitarną (MSI).
- Guzy z MMRd/MSI rozwijają się w wyniku germinalnej mutacji w genie MMR (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2*), czyli związane są z zespołem Lyncha (3–5% CRC), lub częściej w związku z epigenetyczną inaktywacją genu *MLH1*.
- CRC ze statusem MMRd/MSI mają odrębny fenotyp, który obejmuje predylekcję do proksymalnej części okrężnicy, słabe zróżnicowanie i obfity naciek limfocytarny guza.
- Guzy te mają lepsze przeżycie skorygowane o stopień zaawansowania w porównaniu z guzami o statusie funkcjonalnym MMR lub stabilnymi mikrosatelitarnie (MSS) i mogą inaczej odpowiadać na chemioterapię adjuwantową opartą na 5-fluorouracylu.

- W celu zwiększenia identyfikacji pacjentów z dMMR/MSI w praktyce klinicznej, która obejmuje osoby z zespołem Lyncha, zaleca się, aby wszystkie resekcjonowane CRC były analizowane pod kątem statusu MMR/MSI. Należy mieć na uwadze niższą czułość testu MMR (IHC) w wykrywaniu zespołu Lyncha. Około 3–10% guzów w zespole Lyncha posiada mutację, która nie powoduje zauważalnej utraty antygenu w teście immunohistochemicznym.
- Na podstawie statusu MSI, CRC można podzielić na dwie grupy: MSI-H (o wysokiej niestabilności „–high"), jeśli dwa lub więcej z pięciu markerów mikrosatelitarnych wykazuje niestabilność, oraz stabilne mikrosatelitarnie (ang. *microsatellite stable* (MSS)), jeśli jeden lub żaden z markerów nie wykazuje niestabilności.

4.1.5. Algorytm diagnostyczny genów *RAS*, *BRAF* i *MSI*

- Diagnostykę molekularną genów z rodziny *RAS* i *BRAF* wykonuje się jednoczasowo lub w ramach odrębnych, prowadzonych kolejno analiz: *KRAS*, *NRAS* i *BRAF*, w zależności od wskaźnika wykrywania mutacji. Jeżeli u danego pacjenta wykryto mutację w *KRAS*, nie przeprowadza się już analizy innych genów, ponieważ możliwość wdrożenia terapii anty-EGFR u tego pacjenta została już wykluczona (ryc. 4.1.).

Ryc. 4.1. Diagnostyczne badania genetyczne wykonywane w przerzutującym raku jelita grubego. Badania wykonywane na materiale pobranym w trakcie hospitalizacji lub materiale archiwalnym w przypadku konieczności podjęcia zmiany decyzji terapeutycznej. Ocena nabytych zmian somatycznych.



4.1.6. Metody stosowane do oceny statusu genów KRAS/NRAS/BRAF i MSI

- Sekwencjonowanie metodą Sangera jest powszechnie uznawane za „złoty standard" w wykrywaniu mutacji DNA. Metodę można stosować do oznaczania wszystkich mutacji w badanych genach (tj. *KRAS*, *NRAS* i *BRAF*). Zaletą tej metody jest możliwość wykrywania wszystkich możliwych wariantów, w tym rzadszych, których nie obejmują testy przesiewowe w obrębie analizowanego obszaru DNA z wyjątkiem dużych delecji obejmujących cały ekson. Metoda wymaga stosunkowo dużego odsetka komórek nowotworowych (nie mniej niż 20%) w analizowanych preparatach.
- Metoda qPCR jest najpowszechniej stosowaną techniką do badania statusu genów *KRAS/NRAS/BRAF*. Metoda pozwala na jednoczasową, bardzo czułą i szybką identyfikację zmian w badanych genach. Zestawy qPCR umożliwiają identyfikację najczęściej występujących mutacji w genach: *KRAS* (w kodonach 12, 13, 59, 61, 117 i 146), *NRAS* (w kodonach 12, 13, 61, 117 i 146) oraz w kodonie 600 genu *BRAF*. Testy qPCR o wysokiej czułości są wyjątkowo przydatne, gdy dysponujemy preparatem o bardzo niskim odsetku komórek nowotworowych, a nie ma możliwości przeprowadzenia makrodysekcji preparatu. Czułość metody powinna mieścić się w przedziale ok. 1–5%. Pod względem specyficzności powinno być wykrytych co najmniej siedem typowych zmian w kodonach 12 i 13, warianty w kodonach 59, 61, 117 i 146 *KRAS* i *NRAS* oraz wariant p.Val600Glu występujące w genie *BRAF*. Wadą testów w oparciu o qPCR jest brak możliwości wykrywania rzadziej występujących mutacji, np. *KRAS* p.Gly13Cys (G13C).
- W przypadku techniki NGS i sekwencjonowania metodą Sangera nazwa mutacji jest przypisywana i weryfikowana przez diagnostę laboratoryjnego. Z tego względu, aby uniknąć błędnej interpretacji, niezwykle istotne jest korzystanie z odpowiedniej sekwencji referencyjnej (np. MANE https://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/MANE/ i https://www.ensembl.org/info/genome/genebuild/mane.html) i przestrzeganie obowiązujących zasad nazewnictwa mutacji określonych przez HGVS (https://varnomen.hgvs.org/).
- System analizy MSI zawiera fluorescencyjnie znakowane startery do jednoczesnej amplifikacji pięciu markerów powtórzeń mononukleotydowych (*BAT-25*, *BAT-26*, *NR-21*, *NR-24* i *MONO-27*). Analizę wykonuje się z wykorzystaniem PCR i elektroforezy kapilarnej. Próbki, w których:
  a. żaden lub jeden z pięciu markerów mikrosatelitarnych jest zmieniony, są klasyfikowane jako MSS (stabilne),
  b. >=40% markerów mikrosatelitarnych jest zmienionych (2–5 zmienionych markerów) są klasyfikowane jako MSI-H (MSI-high, wysoka niestabilność mikrosatelitarna).
- Interpretacja profili wymaga porównania z prawidłowym DNA od każdego pacjenta.
- Drugą opcją oceny MSI jest wykorzystanie systemu zamkniętego z wykorzystaniem markerów *ACVR2A*, *BTBD7*, *DIDO1*, *MRE11*, *RYR3, SEC31A*, *SULF2*. Pozwala on na określenie statusu niestabilności jako MSI-H (*microsatellite instability–high*) lub MSS (*microsatellite stable*). Test jest pozytywny, jeśli ≥2/7 markerów jest pozytywne. Jest to optymalne rozwiązanie dla badania pojedynczych próbek, ponieważ system zawiera kontrole wewnętrzne.

NGS

- Wielkoskalowe techniki badawcze, takie jak sekwencjonowanie następnej generacji (NGS), również mogą być wykorzystywane do diagnostyki genetycznej w analizie kwalifikacyjnej do terapii celowanej. Aktualnie dla terapii anty-EGFR w RJG wymagana jest ocena molekularna tylko trzech markerów molekularnych (*KRAS*, *NRAS* i *BRAF*), co można ocenić już przy zastosowaniu małych paneli NGS. Natomiast kompleksowe profilowanie molekularne NGS umożliwia również ocenę MSI oraz umożliwia zbadanie fuzji genowych, istotnych przy kwalifikacji do terapii tkankowo agnostycznych takich jak zastosowanie inhibitorów TRK, związanych z występowaniem rearanżacji genów NTRK1/2/3.

4.1.7. Alternatywne metody analizy *KRAS/NRAS/BRAF*

Płynna biopsja

- Nową i wartościową metodą diagnostyczną w RJG jest analiza krążącego DNA nowotworu (ctDNA). Metoda ta polega na analizie mutacji w DNA uwalnianym przez komórki nowotworowe do krwiobiegu.
- W przypadkach, w których niemożliwe jest uzyskanie wycinka nowotworu lub materiał jest niediagnostyczny, analiza ctDNA pozostaje jedyną opcją.
- Wykrywanie mutacji można przeprowadzić za pomocą testów qPCR lub ddPCR lub NGS o wysokiej czułości dedykowanych do analizy ctDNA. Jednocześnie do pobierania krwi można stosować wyłącznie przeznaczone do tego celu probówki. Zawierają one stabilizatory zapobiegające lizie jądrzastych komórek krwi i uwalnianiu ich DNA genomowego. Choć frakcja ctDNA jest ogólnie uznawana za wartościowy materiał diagnostyczny, ponieważ odzwierciedla heterogenność całego nowotworu (a nie tylko jego fragmentu, jak w przypadku analizy standardowych wycinków guzów), analiza ctDNA nie jest zalecana, gdy dostępny jest materiał tkankowy, z powodu wysokiego ryzyka uzyskania wyniku fałszywie ujemnego.

4.1.8. Czas wykonania badania molekularnego

- Wynik powinien być uzyskany w jak najkrótszym możliwym czasie, który nie powinien przekraczać po otrzymaniu materiału:
  - 10 dni roboczych dla metody qPCR oraz sekwencjonowania Sangera,
  - 20 dni roboczych dla metody NGS. Preferowany czas nie powinien przekraczać 10 dni roboczych po wejściu materiału do laboratorium.

4.2. Czerniak

4.2.1. Epidemiologia, podział

- Czerniak (ang. *melanoma*) stanowi ok. 2% wszystkich zachorowań na nowotwory w Polsce. Rocznie na świecie odnotowuje się ok. 150 000 nowych przypadków zachorowań na ten nowotwór.
- Czerniak należy do nowotworów skóry, charakteryzuje się złym rokowaniem i często daje przerzuty. Wywodzi się z komórek melanocytarnych. Najczęściej mamy do czynienia z czerniakiem skóry, ale nowotwór ten może się również lokalizować w błonach śluzowych, gałce ocznej lub w innych mniej typowych obszarach.
- Dotychczasowe klasyfikacje podtypów czerniaka uwzględniały m.in. takie cechy jak charakter wzrostu, typu komórki i lokalizacja, natomiast z genetycznego punktu widzenia najistotniejsza jest najnowsza klasyfikacja histologiczna Światowej Organizacji Zdrowia WHO (WHO classification of Skin Tumours 4th Edition 2018). Czerniaki zostały tu podzielone na te związane etiologicznie z ekspozycją na słońce oraz te niezależne od ekspozycji, natomiast uwarunkowane profilem genetycznym, lokalizacją anatomiczną i epidemiologią.
- Podtypy czerniaków powiązane są ze specyficznymi zmianami genetycznymi. Ocena statusów wybranych genów umożliwia właściwe różnicowanie nowotworu. W czerniakach skóry występują zmiany w genach *BRAF*, *CDKN2A*, *NRAS*, *KIT*. Procentowy rozkład mutacji w genach rutynowo oznaczanych na potrzeby diagnostyki molekularnej wynosi dla czerniaków skóry nienarażonych na długotrwałe działanie słońca: *BRAF* – 50%, *NRAS* – 20%, a dla czerniaków skóry narażonych na długotrwałe działanie słońca: *BRAF* – 10%, *NRAS* – 10%, a *KIT* – 2%.

- W przypadku czerniaków błon śluzowych zmiany dotyczą genów *SF3B1* – 22%, *KIT* – 20%, *NRAS* – 15% i *BRAF* – 5%.
- Czerniaki akralne charakteryzują się zmianami w genach *NF1*, *KIT* – 15%, *NRAS* – 15% i *BRAF* – 15%.
- Czerniaki wywodzące się ze znamienia błękitnego oraz narządu wzroku posiadają mutacje w genach *GNAQ* – 50%, *GNA11* – 32%, zmiany *BRAF* w tym podtypie czerniaka występują poniżej 1%.
- Diagnostyka mutacji występujących w promotorze genu *TERT* i genu *HRAS* wykorzystywana jest w celu właściwej klasyfikacji zmian melanocytowych typu spitzoidnego ze szczególnym uwzględnieniem różnicowania z czerniakiem W przypadku nowotworów typu spitzoidnego należy rozważyć poszukiwanie fuzji genowych z udziałem genów *NTRK1* lub *NTRK3*.

4.2.2. Badane markery

- Najwyższy odsetek wariantów patogennych występuje w czerniakach w genie *BRAF* (27–70%). Zidentyfikowano ponad 40 rodzajów wariantów typu zmiany sensu występujących w 24 różnych kodonach. Większość z nich jest wyjątkowo rzadka (0,1–2%).
- Najczęściej występującą mutacją jest substytucja reszty waliny na resztę glutaminianu w kodonie 600 (p.Val600Glu). Ten rodzaj mutacji dominuje w czerniaku i stanowi ok. 90%. W wyniku tej mutacji białko ulega aktywacji, co powoduje aktywację ścieżki RAS/MAPK. W efekcie, jak wykazano w badaniach aktywności kinazy BRAF in vitro, białko z wariantem p.Val600Glu jest ponad 500 razy bardziej aktywne od postaci prawidłowej.

Tab. 4.2. Występowanie poszczególnych wariantów mutacji *BRAF* w czerniaku

Mutacja	Odsetek poszczególnych wariantów w kodonie 600 genu *BRAF*
p.Val600Glu	90%
p.Val600Lys	5%
p.Val600Asp	1–5%
p.Val600Glu (E2)	1–5%
p.Val600Met	<1%
p.Val600Arg	<1%

- Warianty patogenne genu *BRAF* występują na wczesnych etapach transformacji nowotworowej i same w sobie nie są zdolne do inicjacji procesu nowotworowego.

4.2.3. Materiał

- Podstawowym materiałem do badań genetycznych w czerniaku jest bloczek parafinowy. Po kwalifikacji materiału przez patomorfologa laboratorium na bazie preparatu HE wyodrębnia z preparatu komórki nowotworowe, stosując proces mikro- lub makrodysekcji. W przypadku dużych fragmentów wystarczą z reguły 2–3 skrawki, a w przypadku małych wycinków (o średnicy 2–3 mm) minimum 10.
- Wart podkreślenia jest również fakt, iż preparat wybarwiony HE do oceny zawartości procentowej nowotworu musi być wykonany bezpośrednio przed preparatem do analizy molekularnej.

- Przyjmuje się, że do uzyskania wiarygodnego wyniku analizowany preparat powinien zawierać nie mniej niż 20% utkania nowotworowego. W wyjątkowych przypadkach dopuszcza się stosowanie preparatów zawierających mniejsze utkanie nowotworowe, jednak w takich sytuacjach niezbędne jest użycie metody analitycznej o podwyższonej czułości opartej o technologię qPCR, ddPCR lub NGS.
- Wybierając metodę, należy zwrócić uwagę na następujące parametry: dostępność technologii oraz wymaganego do niej sprzętu, czułość i specyficzność metody, czas niezbędny na przeprowadzenie kompletnej analizy, zakres otrzymywanych wyników.

4.2.4. Metody

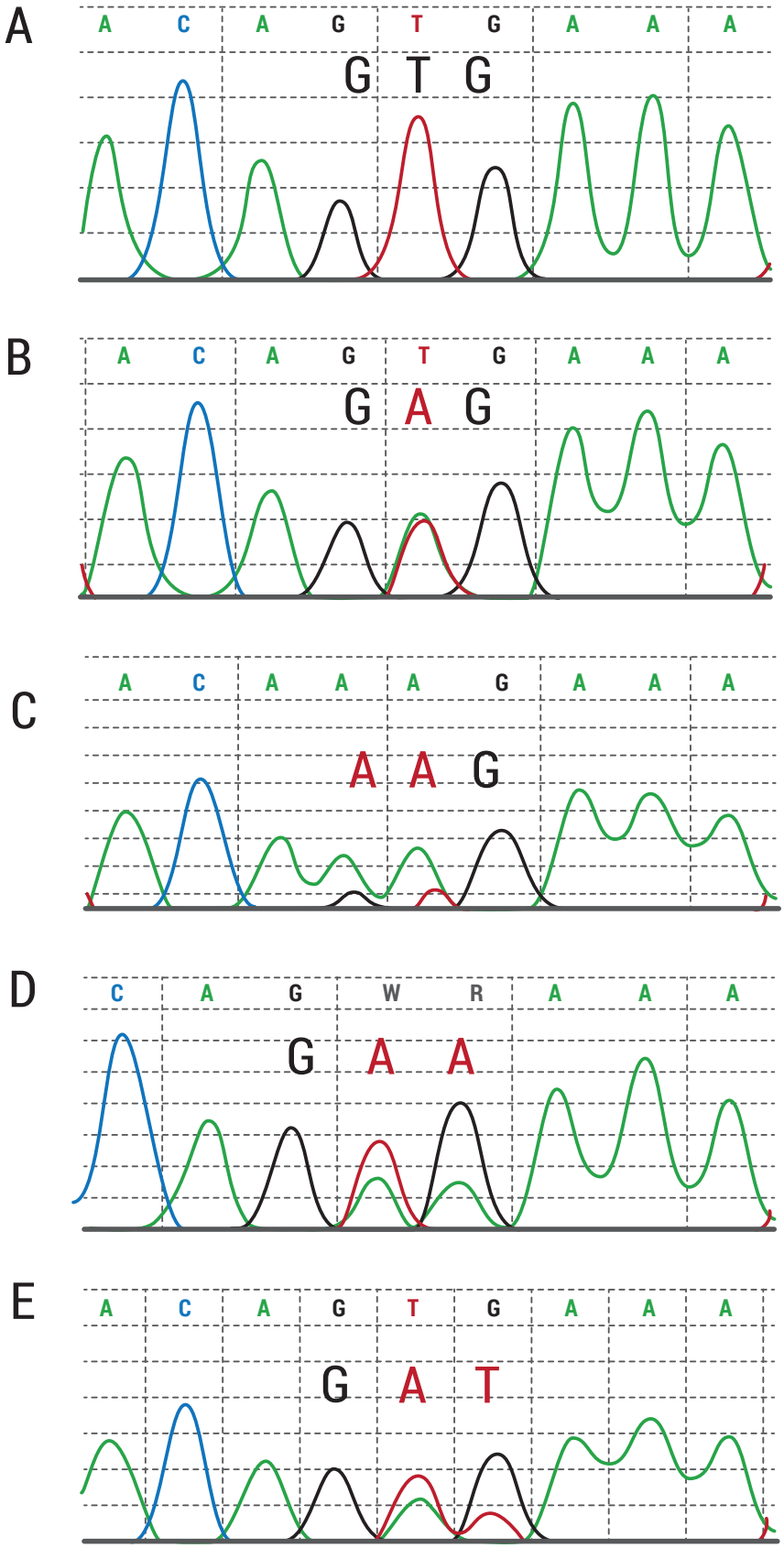
- Sekwencjonowanie bezpośrednie metodą Sangera.
- Metoda ta umożliwia identyfikację wszystkich wariantów występujących w genie *BRAF* (NM_004333.6) w eksonie 15 (regiony kodonu 600) (ryc. 4.2.) oraz w eksonie 11 (regiony kodonu 466), a także rozróżnia wszystkie warianty mutacji w samym kodonie 600, m.in. warianty: p.(Val600Glu), c. 1799T>A (nazwa zwyczajowa V600E); wariant p.(Val600Glu), c.1799_1800delinsAA (V600E2); wariant p.(Val600Lys), c.1798_1799delinsAA, (V600K); wariant p.(Val600Asp), c.1799_1800delinsAC, (V600D); wariant p.(Val600Asp), c.1799_1800delinsAT, (V600D2); p.(Val600Gly), c.1799T>G, (V600G); p.Val600Arg, c.1798_1799delinsAG, (V600R); p.Val600Met, c.1798G>A, (V600M). Ma to szczególne znaczenie, biorąc pod uwagę to, że poszczególne warianty przekładają się na różną aktywność kinazową białka BRAF. Obecnie toczące się badania kliniczne wymagają podania dokładnej nazwy zidentyfikowanej u danego pacjenta substytucji p.Val600, a w przyszłości będzie to konieczne w kwalifikacji pacjentów do leczenia z wykorzystaniem konkretnego leku.
- Z tego też względu sekwencjonowanie Sangera stosuje się często również jako analizę weryfikacyjną po wykryciu wariantu przy użyciu testu opartego na qPCR. Testy qPCR przeważnie nie rozróżniają zidentyfikowanych wariantów, tj. umożliwiają stwierdzenie, że jest obecna mutacja w danym kodonie, ale pozwalają na stwierdzenie, jaki dokładnie nukleotyd, a w konsekwencji aminokwas, został wprowadzony. Testy qPCR są dedykowane do identyfikacji tylko wybranych wariantów, np. V600. Dlatego w przypadku wykorzystania testu qPCR i niewykryciu mutacji *BRAF* zaleca się wykonanie sekwencjonowania w celu weryfikacji wyniku, szczególnie w sytuacji, kiedy obraz kliniczny przemawia za obecnością mutacji *BRAF*.

Metody oparte o technikę qPCR

- Ocena statusu genu *BRAF* metodą qPCR odbywa się za pomocą zestawów komercyjnych, które zwykle wykrywają obecność wariantu w kodonie 600, ale nie różnicują, jaki to wariant.

Zastosowanie ctDNA jako alternatywnej metody analizy genu *BRAF*

- W przypadku biopsji tkanek tylko część potencjalnie złośliwego guza jest pobierana do celów diagnostycznych i charakterystyki molekularnej. Obserwowany profil mutacji będzie w konsekwencji odzwierciedlać tylko ograniczony fragment dostarczony w zebranym materiale. Natomiast profilowanie genetyczne z wykorzystaniem ctDNA może odzwierciedlać całkowity profil mutacji całej masy guza, w tym nowych subklonów odpowiedzialnych za przerzuty. Stąd też w płynnej biopsji możliwe jest wykrycie mutacji, która nie jest obecna w pierwotnej biopsji tkanki.
- Analiza ctDNA wykonywana jest z wykorzystaniem wysokoczułych testów opartych na qPCR lub PCR emulsyjnym (ang. *droplet digital PCR*, ddPCR) i sekwencjonowania następnej generacji (NGS). W przypadku wykonywania oznaczeń na ctDNA zastosowany test musi mieć walidację na ten rodzaj materiału i charakteryzować się czułością poniżej 1%. Sekwencjonowanie bezpośrednie metodą Sangera nie znajduje tu



Ryc. 4.2. Fluorogramy uzyskane w reakcji sekwencjonowania bezpośredniego metodą Sangera przedstawiające warianty mutacji w kodonie 600 genu *BRAF*. A – postać prawidłowa kodonu 600 (GTG); B – wariant p.(Val600Glu), c. 1799T>A, (GAG); C – wariant p.(Val600Lys), c.1798_1799delinsAA, (AAG); D – wariant p.(Val600Glu), c.1799_1800delinsAA, (GAA); E – wariant p.(Val600Asp), c. c.1799_1800delinsAT, (GAT).

zastosowania ze względu na zbyt niski stopień czułości (ok. 20%), chociaż w niektórych przypadkach również ta technika umożliwia identyfikację mutacji z płynnej biopsji.

NGS

- Obecnie w czerniaku wymagana jest ocena markerów molekularnych *BRAF*, *NRAS* i *KIT,* dlatego NGS nie jest pierwszą metodą z wyboru. Niemniej jednak posiada on wysoką czułość i możliwość oznaczania jednocześnie wielu wariantów w różnych genach, dzięki temu NGS jest bardzo dobrym narzędziem do analizy preparatów z tkanek i ctDNA. NGS z zastosowaniem RNA umożliwia również identyfikację fuzji genowych, które stają się obecnie nowymi celami terapeutycznymi mogącymi mieć istotne znaczenie kliniczne w czerniaku (np. fuzje genowe *BRAF*, *ALK*, *ROS1*, *NTRK1/2/3*).

4.2.5. Czas wykonania badania

- Wynik powinien być uzyskany w jak najkrótszym możliwym czasie, który nie powinien przekraczać po otrzymaniu materiału:
  - 10 dni roboczych dla metody qPCR oraz sekwencjonowania Sangera,
  - 20 dni roboczych dla metody NGS.

4.3. Rak jajnika

4.3.1. Epidemiologia, etiologia

- W 2019 r. wśród najczęściej rejestrowanych nowotworów u kobiet rak jajnika (ang. *ovarian cancer*) znajdował się na 5. miejscu (4,3%) oraz 4. miejscu wśród odsetka zgonów z powodu chorób nowotworowych (6,0%).
- W Polsce w 2019 r. zdiagnozowano 3710 przypadków zachorowania na raka jajnika, a odnotowano 2777 zgonów.
- Szczyt zachorowań przypada w okresie pomenopauzalnym (między 60. a 69. rokiem życia).
- 5-letnie przeżycie waha się między 30 a 50%. W ok. 70% tych nowotworów choroba wykrywana jest w zaawansowanym stadium.

4.3.2. Predyspozycje dziedziczne

- Około 10–18% wszystkich nowotworów jajnika ma podłoże genetyczne związane z obecnością wariantów patogennych w genach *BRCA1* i *BRCA2*.
- Inną genetyczną przyczyną raka jajnika są warianty w genach MMR (ang. *miss match-repair*, MMR). Za wystąpienie zespołu Lyncha, w którego spektrum jest rak jajnika, odpowiadają dziedziczne warianty w następujących genach: *MSH2*, *MSH6*, *MLH1*, *PMS2*.
- W rozpoznaniu zespołu Lyncha obserwuje się częstość występowania raka jajnika wahającą się od 0,9 do 2,7%. W ciągu życia największe ryzyko wystąpienia raka jajnika dotyczy nosicielek patogennych wariantów *MSH2* (ok. 10%) w porównaniu z ~3-krotnie niższym ryzykiem u nosicielek wariantów *MLH1* (3,4%).
- Obserwuje się również niewielką różnicę w średnim wieku zachorowania pomiędzy nosicielkami wariantów genu *MSH2* (45 lat; zakres 37–58 lat) a nosicielkami wariantów genu *MLH1* (51 lat; zakres 35–75 lat). Nosicielki wariantów w genie *MSH6* charakteryzuje znacznie młodszy wiek zachorowania.

- W zespole Lyncha obserwuje się zwykle inne raki jajnika aniżeli surowicze.
- Każda pacjentka z rozpoznanym rakiem jajnika powinna uzyskać poradę genetyczną.

4.3.4 Podtypy raka jajnika

- Zgodnie z nową klasyfikacją (wg WHO 2020) na podstawie badań histopatologicznych, immunoprofilu i analizy molekularnej wyróżnia się co najmniej pięć głównych typów raka jajnika: rak surowiczy wysokiego stopnia – niskozróżnicowany (HGSC, 70%), rak endometrioidalny (EC, 10%), rak jasnokomórkowy (CCC, 6–10%), rak surowiczy niskiego stopnia – wysokozróżnicowany (LGSC, 5%) oraz rak śluzowy (MC, 3%).
- Ostatnie postępy w charakterystyce molekularnej guzów, skorelowane z wynikami badań histoklinicznych i molekularnych raków jajnika, ujawniły, że nabłonkowy rak jajnika można podzielić na dwie odrębne grupy określane jako raki typu I i typu II.
- Typ I – stanowi 25% raków jajnika. Typ ten stanowią LGSOC, raki endometrioidalne, raki śluzowe i raki jasnokomórkowe, wywodzące się z nabłonka jajnika. Raki jajnika typu I wykazują obecność mutacji *BRAF* i *KRAS* w ok. 65% przypadków. Obecne są także mutacje innych genów (*HER2*, *PIK3CA*, *PTEN*). Raki jajnika typu I charakteryzują się dobrym rokowaniem i wolnym wzrostem, a 5-letnie przeżycie wynosi ok. 55%.
- Typ II – stanowi 75% raków jajnika. Zaliczamy tutaj *HGSOC*, raka niezróżnicowanego i mięsakoraka. Wywodzą się najprawdopodobniej z dystalnego lub strzępkowego odcinka jajowodu. Charakteryzują się mutacjami w genach *TP53* (ok. 90%) i *BRCA1/2*. Raki typu II są zwykle wykrywane w zaawansowanym stadium choroby, często już z obecnością przerzutów, a 5-letnie przeżycie nie przekracza 30%.
- W raku surowiczym wyróżnia się dwa podtypy: wysokozróżnicowany (*low-grade serous ovarian carcinoma* – LGSOC) i niskozróżnicowany (*high-grade serous ovarian carcinoma* – HGSOC).

Tab. 4.3. Molekularna i histokliniczna klasyfikacja raków jajnika

	Rak surowiczy wysokiego stopnia – niskozróżnicowany	Rak surowiczy niskiego stopnia – wysokozróżnicowany	Rak endometrioidalny	Rak jasnokomórkowy	Rak śluzowy
Częstość występowania (%)	70%	<5%	10%	6–10%	3–4%
Pochodzenie	Jajowód	Endosalpingioza/ Jajowód	Endometrioza	Endometrioza	Potworniak/Nieznane
Zmiana prekursorowa	Śródnabłonkowy rak surowiczy (STIC – *serous tubal intraepithelial carcinoma*)	surowiczy guz o granicznej złośliwości (*serous borderline tumor*)	Atypowa endometrioza, endometrioidny guz o granicznej złośliwości (*atypical endometriosis; endometrioid borderline tumor*)	Atypowa endometrioza, jasnokomórkowy guz o granicznej złośliwości (*atypical endometriosis; clear cell borderline tumor*)	Śluzowy guz o granicznej złośliwości (*mucinous borderline tumor*)
Zespół dziedzicznej predyspozycji do nowotworu	Dziedziczna oredyspozycja do raka piersi i jajnika, powodowana przez warianty patogenne genów *BRCA1/2* (HBOC)	–	Zespół Lyncha	Zespół Lyncha	–

	Rak surowiczy wysokiego stopnia – niskozróżnico-wany	Rak surowiczy niskiego stopnia – wysokozróżnico-wany	Rak endometrioidalny	Rak jasnokomórkowy	Rak śluzowy
Czynniki molekularne (mutacje)	*TP53* *BRCA1/2* HRD Aberracje chromosomowe	*KRAS* *NRAS* *BRAF* *HER2*	*CTNNB1* *PIK3CA* *PTEN* *KRAS* *ARID1A* *MSI* *POLE* *TP53*	*ARID1A* *PIK3CA* *PTEN* *MSI*	*CDKN2A* utrata liczby kopii *KRAS* *HER2* amplifikacja *TP53*

4.3.5. Badane markery

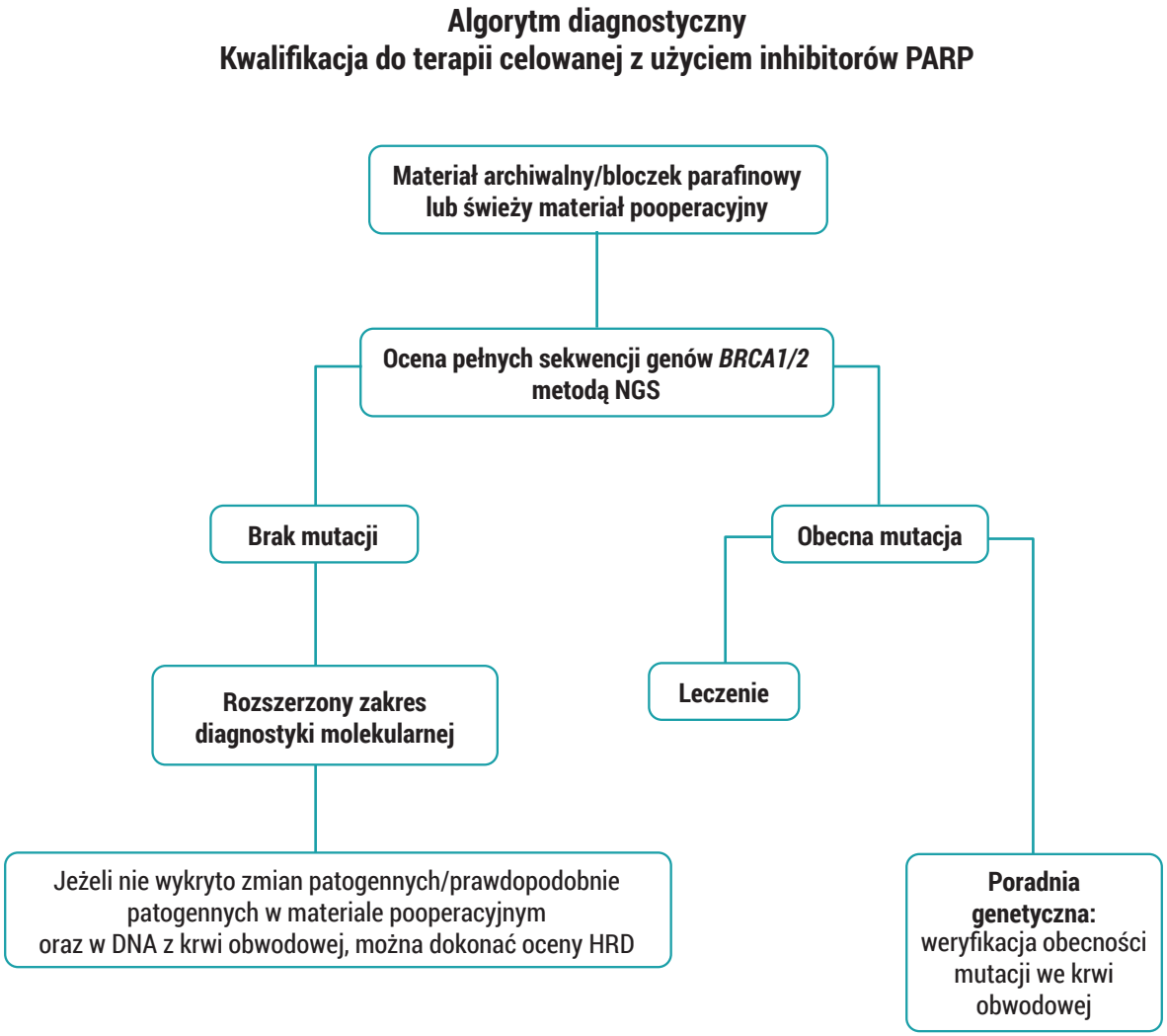
- Badanie statusu genów *BRCA1/2*, które należy ocenić pod kątem zmian somatycznych i germinalnych.
- U pacjentek, u których nie zostaną wykryte warianty w genach *BRCA1/2*, należy ocenić inne markery predykcyjne, takie jak status rekombinacji homologicznej (HRD), jeśli wcześniejsze testy nie obejmowały tych markerów.

4.3.6. Algorytm diagnostyczny

- Badania molekularne wykonywane w oparciu o materiał pooperacyjny powinny obejmować identyfikację zmian molekularnych, które mają wpływ na zastosowaną terapię. Zwykle dotyczy to kwalifikacji pacjentki do terapii celowanej z wykorzystaniem inhibitora PARP (PARPi).
- PARPi jest stosowany w przypadku identyfikacji wariantów genetycznych kwalifikowanych jako patogenne lub prawdopodobnie patogenne w genach *BRCA1*/*BRCA2* oraz zaburzeń homologicznej rekombinacji (ang. *homologus recombination deficiency*, HRD).
- W tym celu konieczne jest odpowiednie zabezpieczenie materiału pooperacyjnego pochodzącego z tkanki nowotworowej. W tego rodzaju materiale identyfikuje się zarówno zmiany germinalne, jak i somatyczne.
- Identyfikacja wariantu patogennego lub prawdopodobnie patogennego w tkance guza wymaga skierowania pacjentki do poradni genetycznej w celu zlecenia badania genetycznego oceniającego genezę zmiany (germinalna/somatyczna). W tym celu konieczne jest pobranie krwi obwodowej oraz izolacja DNA z leukocytów. Jeżeli zmiana patogenna lub prawdopodobnie patogenna zostanie potwierdzona w DNA z krwi obwodowej, pacjentka wraz z rodziną (krewni 1°) powinna zostać objęta opieką genetyka klinicznego.
- Również w przypadku uzyskania wyniku niediagnostycznego z materiału tkankowego lub jego braku pacjentka powinna zostać skierowana do poradni genetycznej w celu zlecenia badania genetycznego z krwi obwodowej. Na ryc. 4.3. przedstawiono schemat postępowania diagnostycznego w zakresie badań genetycznych w raku jajnika.

4.3.7. Materiał

- Do wykonania badania molekularnego wykorzystuje się krew obwodową (NGS BRCA) lub materiał pooperacyjny (NGS BRCA i HRD) w formie skrojonych i niebarwionych skrawków parafinowych (FFPE). Może to być zarówno materiał świeży, jak i archiwalny. Wyboru najbardziej reprezentatywnego fragmentu do badania molekularnego dokonuje lekarz patomorfolog. Liczba skrawków powinna zostać ustalona w wewnętrznych procedurach walidacyjnych dla metody diagnostycznej. W skrawkach odsetek komórek nowotworowych powinien wynosić przynajmniej 20% (NGS BRCA) i 30% (HRD).



Ryc. 4.3. Algorytm diagnostyki molekularnej raka jajnika.

4.3.8. Czas wykonania badania

- Wynik powinien być uzyskany w jak najkrótszym możliwym czasie, który nie powinien przekraczać po otrzymaniu materiału:
  - 20 dni roboczych dla metody NGS.

4.4. Rak endometrium

4.4.1. Epidemiologia, etiologia

- Z powodu raka endometrium (ang. *endometrial cancer*) w Polsce w 2018 r. zdiagnozowano 6059 przypadków oraz odnotowano 1781 zgonów.
- Szczyt zachorowań przypada w okresie okołomenopauzalnym (między 55. a 64. rokiem życia).
- 5-letnie względne przeżycie wynosi 76% dla europejskich kobiet (EUROCARE-5, 2015 r.), wahając się od 72,9% w Europie Wschodniej do 83,2% w Europie Północnej.
- Oprócz czynników środowiskowych, jak czynniki reprodukcyjne i nadwaga, predyspozycje genetyczne są coraz częściej uznawane za główny czynnik ryzyka zachorowania na raka endometrium.

4.4.2. Predyspozycje dziedziczne do raka endometrium

- Rak endometrium jest genetycznie heterogenny i należy do zespołów predyspozycji z wysokim lub średnim ryzykiem zachorowania w ciągu całego życia.
- W zespole Lyncha obok raka jelita grubego najwyższe ryzyko rozwoju w ciągu życia ma rak endometrium (27–71%). Na podłożu zespołu Lyncha rozwija się 2–3% raków endometrium.
- Za wystąpienie zespołu Lyncha odpowiadają patogenne warianty dziedziczne w następujących genach: *MSH2*, *MLH1*, *PMS2*, *MSH6*, których produkty białkowe uczestniczą w naprawie niesparowanych zasad w DNA (ang. *missmatch repair*, MMR). Najczęściej występują w genach *MSH2* i *MLH1*.
- W rezultacie upośledzenia naprawy niesparowanych zasad w DNA (ang. *mismatch repair deficiency*, MMRd) rozwijają się nowotwory z niestabilnością mikrosatelitarną (ang. *microsatellite instability*, MSI), która charakteryzuje się rozległymi insercjami i delecjami w regionach kodujących, co prowadzi do mutacji typu przesunięcia ramki odczytu (ang. *frameshift*). W następstwie jest produkowana duża liczba zmutowanych białek, neoantygenów, co zwiększa odpowiedź na immunoterapię (anty-PD1/PDL1).
- Czynnikiem komplikującym sytuację jest fakt, że 15–20% sporadycznych raków endometrium wykazuje w badaniu immunohistochemicznym (IHC) brak ekspresji białka MLH1 oraz wysoki poziom niestabilności mikrosatelitarnej (ang. *MSI-high*, MSI-H) spowodowany metylacją promotora i wyciszeniem ekspresji *MLH1*.
- Dodatkowymi genami kandydatami związanymi ze zwiększonym ryzykiem rozwoju raka endometrium są geny *POLD1* i *POLE* przypisywane do zespołu przypominającego zespół Lyncha.
- Mutacje w genach *BRCA1/2* wiążą się ze zwiększonym ryzykiem rozwoju surowiczego typu raka endometrium.

4.4.3. Typy histologiczne

- Rak trzonu rozwija się w tkance wyścielającej jamę macicy (endometrium). Wyróżniamy następujące najczęstsze podtypy histologiczne:
  a. 80–90% – rak endometrioidalny,
  b. 5–10% – rak surowiczy,
  c. 1–2% – rak jasnokomórkowy,
  d. 1–2% – gruczolakorak mieszanokomórkowy,
  e. 1% – mięsakorak.

- MMRd jest powszechny w endometrioidalnych nowotworach endometrium, natomiast niedobór naprawy rekombinacji homologicznej (ang. *homologous recombination deficiency*, HRD) został opisany w przypadku guzów nieendometrioidalnych.

4.4.4. Podtypy molekularne raka endometrium

- Prowadzone bardzo intensywnie badania z wykorzystaniem technologii sekwencjonowania następnej generacji (NGS) doprowadziły do wyróżnienia kilku podtypów molekularnych raka endometrium.

Tab. 4.4. Molekularne podtypy raka endometrium

Podtyp (Synonimy)	POLE – zmutowany (POLE EDM)	MMRd (MSI)	p53 WT, MSS, CNlow (NSMP)	p53 nieprawidłowe (abn) (CNhigh)
Częstość mutacji na 1 milion pz	>100	100-10	<10	<10
Somatyczne zmiany liczby kopii	Bardzo niskie	Niskie	Niskie	Wysokie
Najczęściej występujące mutacje	*POLE* (100%) *DMD* (100%) *CSMD1* (100%) *FAT4* (100%) *PTEN* (94%)	*PTEN* (88%) *PIK3CA* (54%) *PIK3R1* (42%) *RPL22* (37%) *ARID1A* (37%)	*PTEN* (77%) *PIK3CA* (53%) *CTNNB1* (52%) *ARID1A* (42%) *PIK3R1* (33%)	*TP53* (92%) *PIK3CA* (47%) *FBXW7* (22%) *PPP2R1A* (22%) *PTEN* (10%)
Odsetek	5%	25%	45%	25%
Wiek	~ 50–60	~ 60	~60	~70
BMI	Niskie	Wysokie	Wysokie	Niskie
Prognoza	Wczesny etap i doskonała	Pośrednia (zespół Lyncha)	Pośrednia	Wysoki stopień zaawansowania i zła
Możliwe implikacje dotyczące leczenia	Hamowanie immunologicznych punktów kontrolnych	Inhibicja immunologicznego punktu kontrolnego. Skierowanie do programu leczenia nowotworów dziedzicznych w przypadku podejrzenia zespołu Lyncha	Leczenie hormonalne. Można rozważyć postępowanie oszczędzające płodność. Podtyp ten wydaje się mieć podobną patogenezę jak nowotwory jelita grubego i odbytnicy	Możliwa rola dla inhibitorów HER2 i PARP. Podgrupa ta ma te same cechy co rak piersi typu basal-like i rak surowiczy jajnika

CNlow – podtyp o niskiej liczbie kopii, NSMP – niespecyficzny profil molekularny.

- 3–5% raków endometrium wykazuje dowolną kombinację markerów należących do poprzednich kategorii. POLEmut-p53abn, MMRd-p53abn lub POLEmut-MMRd-p53abn. Mutacje TP53 w ultra- lub hipermutowanych guzach nie są związane z gorszym rokowaniem obserwowanym w rakach endometrium z mutacjami tylko TP53 i dlatego są uważane za mutacje pasażerskie. Innymi słowy, przebieg choroby w guzach z mutacjami POLEmut i p53abn lub MMRd i p53abn jest taki jak w przypadku raka endometrium odpowiednio z POLEmut lub MMRd. Istniała doskonała zgodność między ekspresją białka p53 oznaczoną metodą IHC a statusem mutacji TP53, jeśli wyłączono raki endometrium MMRd i POLEmut z analizy (95% zgodności). **Dlatego też mutacja TP53 jest tylko markerem CN-high po wykluczeniu podtypów POLEmut i MMRd.**
- Mutacje patogenne występujące w podtypie POLE EDM są tylko zlokalizowane w domenie egzonukleazy (eksony 9–14).

Tab. 4.5. Patogenne mutacje w genie POLE

Lp.	Mutacja w białku	Mutacja w genie (cDNA)
1.	p.Pro286Arg, P286R	c.857C>G
2.	p.Val411Leu, V411L	c.1231G>T/C
3.	p.Ser297Phe, S297F	c.890C>T
4.	p.Ser459Phe, S459F	c.1376C>T
5.	p.Ala456Pro, A456P	c.1366G>C
6.	p.Phe367Ser, F367S	c.1100T>C
7.	p.Leu424Ile, L424I	c.1270C>A
8.	p.Met295Arg, M295R	c.884T>G
9.	p.Pro436Arg, P436R	c.1307C>G
10.	p.Met444Lys, M444K	c.1331T>A
11.	p.Asp368Tyr, D368Y	c.1102G>T

- Charakterystyczny profil mutacji (ultrazmutowany fenotyp) dla guzów z mutacją w domenie egzonukleazy POLE (**POLE EDM**) wykazywały również guzy, które tych mutacji nie posiadały. Natomiast niektóre z tych guzów miały mutacje w POLD1 (p.Asp316Gly (D316G), p.Ser478Asn (S478N) i p.Leu606Met (L606M) zaklasyfikowane jako prawdopodobnie patogenne i jedną patogenną p.Arg705Trp (R705W).

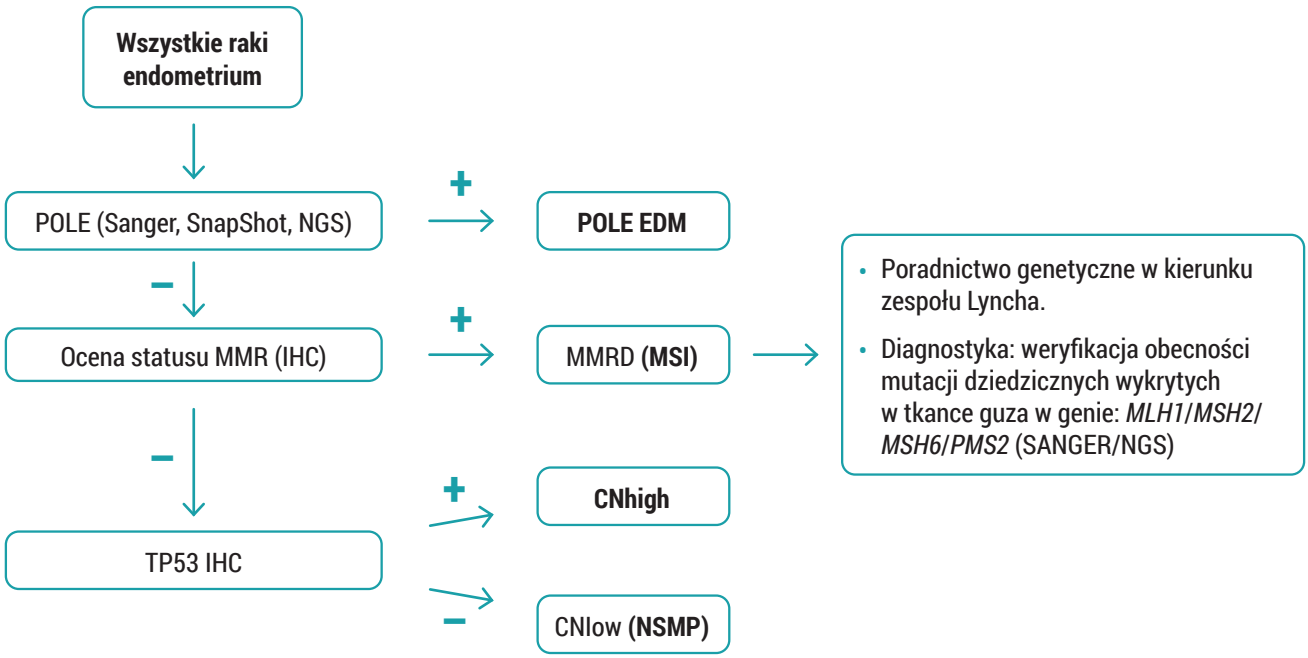
4.4.5. Badane markery

- Algorytmy diagnostyczne klasyfikacji molekularnej raka endometrium
- Do wprowadzenia klasyfikacji molekularnej dla rutynowej diagnostyki raka endometrium potrzeba było oceny prostych biomarkerów odzwierciedlających podtypy molekularne.
- Analiza występowania mutacji w części genu *POLE* kodującego domenę egzonukleazy oraz ocena IHC obecności MMRd (ocena ekspresji czterech białek: MLH1, MSH2, MSH6, PMS2) lub ocena molekularna MSI i ekspresji TP53 (tab. 4.5.) jest określana jako minimalny pakiet diagnostyczny (PROMISE).
- ESMO zaleca badanie IHC jako skuteczny pośredni test na obecność MMRd. IHC jest również przydatna w identyfikacji genu, który powinien być badany pod kątem wariantów patogennych w przypadku dziedzicznej predyspozycji do nowotworów. Słabą stroną techniki IHC są wyniki fałszywie pozytywne związane z niejednorodnym utrwaleniem materiału. Należy mieć na uwadze niższą czułość testu MMR (IHC) w wykrywaniu zespołu Lyncha. Około 3–10% guzów w zespole Lyncha posiada mutację, która nie powoduje zauważalnej utraty antygenu w teście immunohistochemicznym.
- W przypadku niejednoznacznych wyników ekspresji metodą IHC koniecznie należy wykonać analizę MSI z wykorzystaniem testu molekularnego. Zgodność pomiędzy wynikiem badania genetycznego i immunohistochemicznego sięga według niektórych autorów 98%.
- Istnieją również doniesienia, że zgodność w ocenie pomiędzy metodami MSI a IHC jest na tyle niska, że zaleca się stosowanie obu metodologii dla optymalnej stratyfikacji pacjentów.
- Badanie molekularne sekwencji mikrosatelitarnych jest badaniem do wykrywania MSI jako bezpośredniego dowodu na obecność MMRd w danym nowotworze (złoty standard).
- Drugą opcją oceny MSI jest wykorzystanie systemu zamkniętego z zastosowaniem markerów *ACVR2A*, *BTBD7*, *DIDO1*, *MRE11*, *RYR3*, *SEC31A*, *SULF2*. Pozwala on na określenie statusu niestabilności jako

MSI-H (*microsatellite instability-high*) lub MSS (*microsatellite stable*). Test jest pozytywny, jeśli ≥2/7 markerów jest pozytywne. Jest to optymalne rozwiązanie dla badania pojedynczych próbek, ponieważ system zawiera kontrole wewnętrzne.

- Najbardziej kompleksową metodą oceny MSI jest NGS. Jego główną zaletą jest możliwość sprzężenia analizy MSI z określeniem obciążenia mutacyjnego guza (ang. *tumor mutation burden*, TMB). Obecnie wadą tej metody jest konieczność zastosowania dużych paneli (500 genów), co jest związane z dużym kosztem badania oraz jest czasochłonne.

Ryc. 4.4. Minimalny algorytm diagnostyki raka endometrium

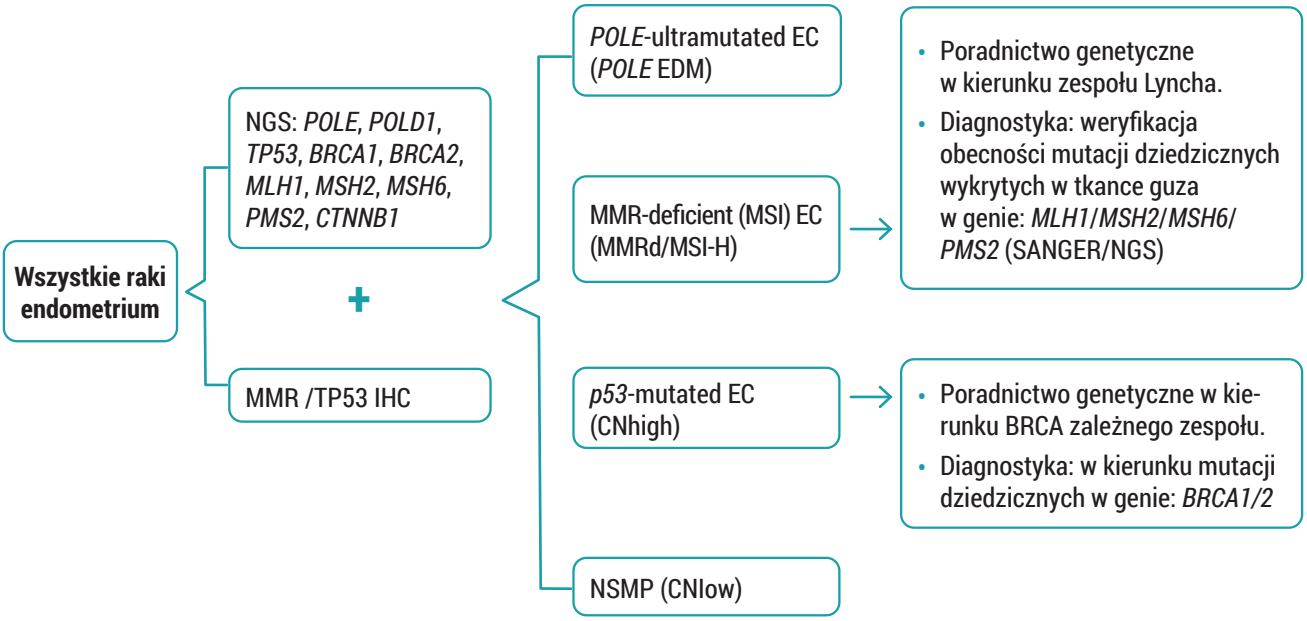


- Ocenę występowania mutacji w *POLE* w domenie egzonukleazy można wykonywać metodą sekwencjonowania Sangera, SnapShot lub NGS.
- Analiza mutacji w *POLE* z wykorzystaniem metody Sangera oraz SnapShot w przypadku materiału o zawartości komórek nowotworowych poniżej 20% i uzyskania wyniku *„brak mutacji”* powinna być opatrzona komentarzem o możliwości uzyskania wyniku fałszywie negatywnego i zalecenia powtórzenia wykonania badania z wykorzystaniem czulszej metody w postaci NGS. Wynik badania autoryzuje specjalista laboratoryjnej genetyki medycznej.
- Ocenę IHC ekspresji białek MMR (MLH1, MSH2, MSH6, PMS2) oraz TP53 wykonuje patomorfolog.
- Wadą zastosowania tego algorytmu jest duża liczba pacjentów z podejrzeniem zespołu Lyncha (MMRd) na poziomie ok. 25%, którzy wymagają weryfikacji w późniejszych etapach leczenia pacjenta, zwłaszcza że występowanie zespołu Lyncha w rakach endometrium jest na poziomie 2–3%.

Kompleksowy algorytm diagnostyki raka endometrium

- Kompleksowym algorytmem jest wykonywanie równolegle oceny IHC ekspresji białek TP53 i MMRd (MLH1, MSH2, MSH6, PMS2) oraz sekwencjonowania panelowego metodą NGS (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, PMS2, *TP53*, *POLE*, *POLD1*, *BRCA1*, *BRCA2*, *CTNNB1* (ekson 3)).

Ryc. 4.5. Kompleksowy algorytm diagnostyki raka endometrium



- W przypadku algorytmu kompleksowego równolegle przeprowadza się badanie NGS (wykonuje diagnosta laboratoryjny) oraz ocenę IHC MMR/TP53 (wykonuje lekarz patomorfolog).
- Zastosowanie tego algorytmu pozwala zaklasyfikować pacjentkę do typu molekularnego oraz umożliwia wytypowanie pacjentek do dalszej diagnostyki w kierunku dziedzicznych predyspozycji do nowotworów jak zespół Lyncha oraz zespoły związane z mutacjami w genach *BRCA1/2*.

4.4.6. Materiał

- Do wykonania badania molekularnego wykorzystuje się materiał pooperacyjny w formie skrojonych i niebarwionych skrawków parafinowych. W skrawkach odsetek komórek raka endometrium wynosi przynajmniej 20%.

4.4.7. Metody

- Do oceny POLE EDM stosuje się sekwencjonowanie, SnapShot, qPCR, NGS.
- Dla oceny niestabilności mikrosatelitarnej (MSI) stosuje się PCR z elektroforezą kapilarną lub *real-time* PCR. Można również zastosować sekwencjonowanie NGS.
- W przypadku panelu genów stosuje się sekwencjonowanie NGS.

4.4.8. Czas wykonania badania molekularnego

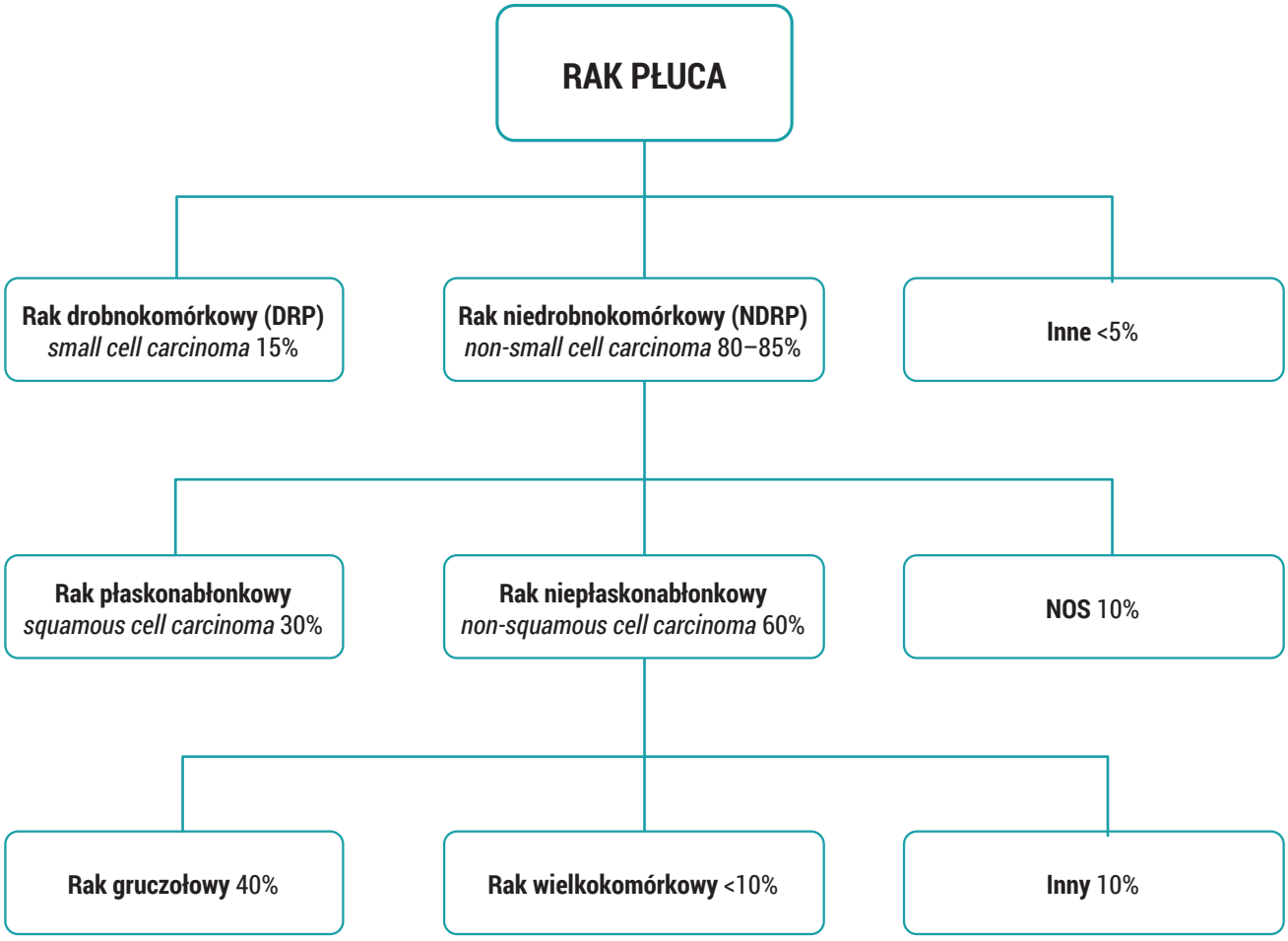
- Wynik powinien być uzyskany w jak najkrótszym możliwym czasie, który nie powinien przekraczać po otrzymaniu materiału:
  - 10 dni roboczych dla metody qPCR, SnapShot oraz elektroforezy kapilarnej,
  - 20 dni roboczych dla metody NGS.

4.5. Rak płuca

4.5.1. Epidemiologia

- W Polsce rak płuca (ang. *lung cancer*) jest obok raka prostaty najczęściej diagnozowanym nowotworem złośliwym (ponad 21 tys. zachorowań rocznie) oraz najczęstszą przyczyną zgonów z powodu nowotworu złośliwego (ponad 23 tys. zgonów rocznie). Nowotwór ten diagnozowany jest najczęściej w stadium zaawansowanym (80%) bez możliwości leczenia radykalnego, a wymagającym leczenia farmakologicznego i jest jednym z najgorzej rokujących nowotworów złośliwych – przeżycie 5-letnie w Polsce wynosi 14,4%.
- Czynnikiem zwiększającym ryzyko wystąpienia raka płuca jest w największym stopniu narażenie na rakotwórcze związki zawarte w dymie tytoniowym. Innymi czynnikami ryzyka są fizyczne i chemiczne czynniki środowiskowe, obciążony chorobami nowotworowymi wywiad rodzinny czy narażenie na azbest.
- Pod względem histologicznym rak płuca dzieli się na dwie podstawowe grupy: raka drobnokomórkowego (DRP) – ok. 15% oraz niedrobnokomórkowego (NDRP) – ok. 80–85%. W grupie raka niedrobnokomórkowego najczęściej występuje rak gruczołowy (40%), płaskonabłonkowy (30%) i wielkokomórkowy (10%) (ryc. 4.6.).

Ryc. 4.6. Podział raka płuca w zależności od typu histologicznego



4.5.2. Biomarkery

Tab. 4.6. Biomarkery predykcyjne w niedrobnokomórkowym raku płuca

Nowotwór	Biomarker	Leki
Niedrobnokomórkowy rak płuca	EGFR	TKI (I, II, III generacja)
	ALK	TKI (I, II, III generacja)
	ROS1	TKI
	BRAF V600	Inhibitor kinazy serynowo-treoninowej BRAF
	MET	TKI
	RET	TKI
	PD-L1	Przeciwciała monoklonalne
	NTRK	TKI
	KRAS p.Gly12Cys (G12C)	Inhibitor GTPazy KRAS
	EGFR insercje w eksonie 20	Przeciwciała monoklonalne
	Negatywny wynik EGFR, ALK	Przeciwciała monoklonalne
	Negatywny wynik EGFR, ALK, ROS1	Przeciwciała monoklonalne

4.5.2.1. *EGFR*

- Receptor naskórkowego czynnika wzrostu (EGFR) jest jednym z białek transbłonowych. Mutacje *EGFR* stwierdza się u ok. 50% pacjentów z NDRP pochodzenia azjatyckiego oraz u ok. 10–14% pacjentów z NDRP w krajach zachodnich.
- Najczęstszymi mutacjami w genie *EGFR* są delecje w eksonie 19 oraz mutacja punktowa p.Leu858Arg w eksonie 21 (odpowiednio ok. 45% i 40% pacjentów). Pozostałe mutacje *EGFR* występują w 10–18%: zwykle są to insercja w eksonie 20 czy mutacje punktowe w eksonie 18.
- Obecność mutacji w genie *EGFR* wskazuje na możliwość uzyskania korzyści z leczenia inhibitorami kinazy tyrozynowej (TKI) EGFR. Ponadto, u ok. 60% chorych w momencie progresji choroby podczas ww. leczenia może pojawić się dodatkowa mutacja punktowa (substytucja c.2369C>T, p.Thr790Met) w genie *EGFR*. Chorzy ci mogą odnieść korzyść kliniczną z leczenia TKI III generacji, który może być zastosowany w momencie stwierdzenia progresji po leczeniu I, II lub III linii z wykorzystaniem inhibitorów kinazy tyrozynowej EGFR I i II generacji.

4.5.2.2. Rearanżacje *ALK*

- Kinaza chłoniaka anaplastycznego – to gen kodujący receptorową kinazę tyrozynową należącą do rodziny receptora insulinowego. Rearanżacje genu *ALK* mogą występować w różnych typach nowotworów i prowadzić do konstytutywnie aktywnej kinazy tyrozynowej o potencjale onkogennym. Najczęstszą rearanżacją jest mała inwersja w krótkim ramieniu chromosomu 2 powodująca fuzję pomiędzy częścią 5′ genu *EML4* a częścią 3′ genu *ALK*. Inne geny, z którymi *ALK* może tworzyć fuzje, to: *KIF5B*, T*FG, KLC1*.
- Liczne badania wykazały wrażliwość komórek nowotworowych z potwierdzonymi rearanżacjami genu *ALK* na działanie inhibitorów kinazy tyrozynowej ALK. Rearanżacje genu ALK występują w 2–7% NDRP. Pacjenci z tymi rearanżacjami są zwykle młodsi, niepalący i mają typ histologiczny gruczolakoraka. Współistnienie rearanżacji genu *ALK* z mutacjami *EGFR* lub *KRAS* jest rzadko wykazywane, co potwierdza, że *ALK* jest odrębnym czynnikiem onkogennym.

4.5.2.3. Rearanżacje *ROS1*

- Protoonkogen 1 ROS (*ROS1*) koduje receptorową kinazę tyrozynową podobną do ALK i innych członków rodziny receptorów insulinowych. Rearanżacje *ROS1* prowadzą do syntezy białek fuzyjnych, w których domena kinazowa ROS1 staje się konstytutywnie aktywna i wzmaga proliferację komórkową. Rearanżacje *ROS1* mogą występować u ok. 1–2% chorych na NDRP.
- Rekomendowanymi opcjami leczenia chorych na zaawansowanego NDRP z rearanżacją genu *ROS1* są inhibitory kinazy tyrozynowej ROS1. TKI ROS1 II i III generacji są skuteczne u pacjentów z rearanżacją w genie *ROS1* i obecnymi przerzutami do ośrodkowego układu nerwowego.

4.5.2.4. Rearanżacje *RET*

- RET jest receptorem kinazy tyrozynowej, który zwiększa proliferację i różnicowanie komórek. Rearanżacje *RET* w NDRP występują między genem *RET* a innymi domenami, zwłaszcza rodziną kinezyn, co prowadzi do nadekspresji białka RET. Rearanżacje *RET* występują u ok. 0,7–2% chorych na NDRP, częściej o typie histologicznym gruczolakoraka, nigdy niepalących i w młodszym wieku.

4.5.2.5. Fuzje genów *NTRK*: *NTRK1*, *NTRK2* i *NTRK3*

- Geny te kodują trzy transbłonowe receptory białkowe: TrkA, TrkB i TrkC należące do rodziny kinaz receptorowych tropomiozyny (TRK). Fuzje genów obejmujące *NTRK1*, *2* i *3* oraz ich geny partnerskie działają jak czynniki onkogenne dla różnych nowotworów, w tym guzów litych.
- Fuzje genów *NTRK* występują u ok. 0,2% pacjentów z NDRP niezależnie od płci, wieku, historii palenia i histologii. Fuzje genów *NTRK* nie współwystępują ze zmianami w *KRAS*, *EGFR*, *ALK* i *ROS1*.
- Badanie rearanżacji *NTRK* można rozważyć u pacjentów, u których nie stwierdzono obecności mutacji czy rearanżacji w głównie ocenianych biomarkerach, takich jak *EGFR*, *ALK* czy *ROS1*.

4.5.2.6. *MET*

- c-Met jest receptorem kinazy tyrozynowej czynnika wzrostu hepatocytów. Znane warianty w genie *MET* mogą obejmować mutacje splicingowe eksonu 14 czy zmienną liczbę kopii genu. Białko receptorowe powstające w wyniku mutacji *MET* ma zwiększoną sygnalizację cMet i potencjał onkogenny.
- Zmiany w genie *MET* obserwuje się u 3–4% chorych na zaawansowanego NDRP, istotnie częściej u chorych w starszym wieku (w przeciwieństwie do rearanżacji *ALK* i *ROS1* diagnozowanych częściej u osób młodszych). Nieprawidłowości w genie *MET* zwykle nie współistnieją z nieprawidłowościami w genach *EGFR*, *ROS1*, *BRAF* i *ALK*.

4.5.2.7. *BRAF*

- Szlak kinaz RAS–RAF–MEK–ERK–MAP pośredniczy w odpowiedzi komórek na sygnały mitogenne. BRAF jest wewnątrzkomórkową kinazą sygnalizacyjną w szlaku kinaz białkowych aktywowanych mitogenami (MAPK).
- Najczęstszą nieprawidłowością genetyczną obserwowaną w genie *BRAF* jest substytucja c.1799T>A skutkująca zamianą aminokwasu waliny w pozycji 600 na kwas glutaminowy (p.Val600Glu). Obserwowane są również inne warianty zmian w kodonie 600 genu *BRAF*, takie jak np. p.Val600Lys, p.Val600Arg, p.Val600Met oraz zmiany w innych kodonach, które występują niezmiernie rzadko.
  Mutacje w genie *BRAF* (zwykle c.1799T>A, p.Val600Glu) występują u 1,5% chorych na raka gruczołowego płuca, zazwyczaj u obecnych lub byłych palaczy.
  U chorych z mutacją p.Val600 skuteczne okazały się inhibitory BRAF i MEK.

Mutacje *BRAF* (zwykle p.Val600Glu (V600E)) występują u 3% pacjentów z gruczolakorakiem płuc, zazwyczaj u obecnych lub byłych palaczy. Częstość występowania mutacji *BRAF* innych niż p.Val600Glu jest wyższa w raku płuca niż w czerniaku.

4.5.2.8. *KRAS*

- Białka RAS należą do rodziny tzw. białek G. W skład podrodziny RAS wchodzą białka HRAS, NRAS, KRASA i KRASB. Onkogen *KRAS* jest zmutowany w ponad 30% nowotworów. Mutacje aktywujące występują głównie w kodonach 12 i 13, rzadziej w kodonach 59, 61, 117 i 146.
- Mutacje w genie *KRAS* to najczęściej substytucje pojedynczych nukleotydów. Zmiany te znoszą wewnętrzną aktywność GTPazową białka RAS, czyniąc je niewrażliwym na oddziaływania białek z rodziny GAPs, co prowadzi do akumulacji zaktywowanej postaci białka w konformacji z GTP i w konsekwencji stałej stymulacji komórki.
- W przypadku niedrobnokomórkowego raka płuca mutacje w genie *KRAS* występują z częstością ok. 30%. Zmiany te spotyka się szczególnie często u osób palących. W genie *KRAS* wariant p.Gly12Cys (nazwa zwyczajowa G12C) jest wykrywany u ok. 18% pacjentów. Wariant ten jest markerem predykcyjnym dla zastosowania inhibitora GTPazy blokującego białko KRAS G12C u pacjentów z NDRP, u których zidentyfikowano ten wariant.

4.5.3. Ścieżki diagnostyczne

- Ze względu na systematycznie wzrastającą liczbę markerów obecnie konieczną do oceny metodą diagnostyki raka płuca z wyboru jest sekwencjonowanie NGS. W przypadku braku dostępu do sekwencjonowania NGS laboratorium prowadzi diagnostykę w oparciu o kombinacje metod qPCR oraz FISH.

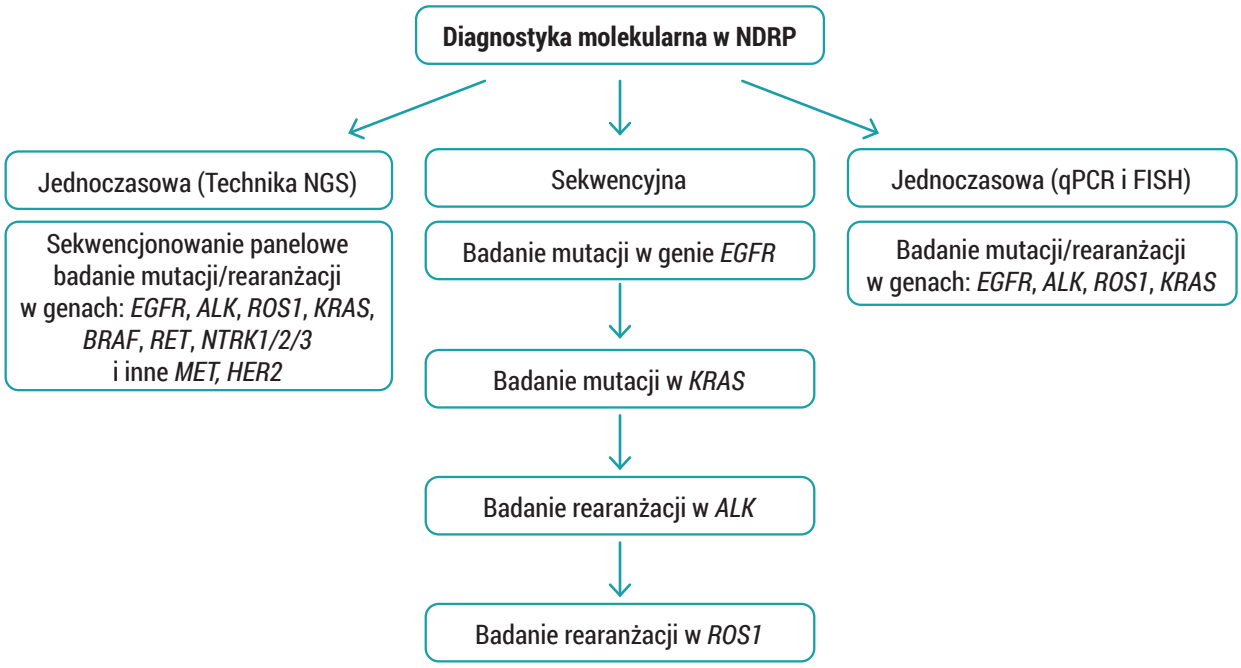
Diagnostyka genetyczna umożliwia 3 ścieżki diagnostyczne (ryc. 4.7.).

a. Sekwencyjna:
   - w pierwszym etapie badane są mutacje w genie *EGFR* – obecność mutacji kończy diagnostykę. W przypadku negatywnego wyniku:
   - ocena mutacji w genie *KRAS* (G12C),
   - przeprowadza się badanie rearanżacji genu *ALK* – obecność mutacji kończy diagnostykę. W przypadku negatywnego wyniku:
   - bada się rearanżację genu *ROS1*,
   - decyzja oceny innych biomarkerów.

b. Jednoczasowa:
   - wszystkie markery predykcyjne badane są w tym samym czasie z wykorzystaniem różnych technik, takich jak: qPCR, FISH – w zależności od materiału, dostępności technologii, aparatury i kompetencji zespołu badawczego. Wadą jest dostępność minimum 50 komórek nowotworowych na badania FISH, trudności przeprowadzenia wszystkich analiz biomarkerów z materiału drobinowego czy cytologicznego. Natomiast zaletą jest możliwość przeprowadzenia badania w trybie CITO w ciągu 2–3 dni od otrzymania materiału biologicznego, niski koszt aparatury i ich eksploatacji, niski koszt odczynników oraz mniejsza pracochłonność,
   - wszystkie markery predykcyjne badane są w tym samym czasie w ramach jednej technologii – NGS. Zaletą jest możliwość jednoczasowego badania z jednej porcji materiału wielu klas mutacji, w tym fuzji genowych (jeśli materiałem do badania jest również RNA). W jednym badaniu oceniane są m.in.

zmiany genetyczne w *EGFR*, *KRAS*, *ALK*, *ROS1* oraz wiele nowych markerów predykcyjnych, takich jak np. *BRAF*, *MET, RET*, *NTRK1/2/3*, *HER2* i inne.

Ryc. 4.7. Molekularne ścieżki diagnostyczne raka płuca



4.5.4. Metody

Sekwencjonowanie następnej generacji (NGS)

- Panele NGS dedykowane do badania raka płuca są ukierunkowane przede wszystkim na ocenę wariantów genetycznych w postaci zmian pojedynczych nukleotydów oraz małych delecji/insercji w takich genach jak *EGFR*, *BRAF, KRAS*, *HER2* oraz fuzji genowych w genach *ALK*, *ROS1*, *NTRK*, *RET* czy różnych wariantów fuzyjnych i splicingowych w genie *MET*. Zmiany oceniane mogą być na poziomie RNA i DNA. Należy podkreślić, że w przypadku identyfikacji fuzji genowych obecnie złotym standardem jest ich identyfikacja metodą NGS na poziomie RNA. Podstawowe zalety przemawiające za identyfikacją fuzji genowych metodą NGS to: wysoka czułość i specyficzność, możliwość identyfikacji wielu fuzji genowych w jednym badaniu, możliwość identyfikacji partnerów fuzyjnych oraz dokładnych miejsc pęknięć u zidentyfikowanych partnerów fuzyjnych, możliwość oceny, czy fuzja zawiera się w ramce odczytu (czy jest wariant patogenny – funkcjonalny, czy niefunkcjonalny bez znaczenia klinicznego).
- Głębokość sekwencjonowania: w przypadku zmian somatycznych badane regiony powinny być odczytane nie mniej niż 250 razy. Rekomendowane jest, aby generowane odczyty były na poziomie 500. Przy takim pokryciu przyjmuje się, że warianty zidentyfikowane na poziomie nie mniejszym niż 5% (VAF = 5%) można uznać za wiarygodne.
- Wyniki badania NGS, w przypadkach kiedy identyfikowany jest rzadki wariant, lub nieraportowany dotąd wariant fuzyjny, powinny być potwierdzone inną metodą. Do potwierdzania takich zmian zwykle stosuje się sekwencjonowanie bezpośrednie metodą Sangera, które może weryfikować warianty na DNA lub złącza fuzyjne na cDNA.

qPCR – ocena statusu genów na poziomie DNA (*EGFR*, *KRAS*, *BRAF*, *HER2*, inne)

- W przypadku genu *EGFR* izolaty DNA analizowane są pod kątem obecności wariantów aktywujących – ocena minimum 29 najczęstszych wariantów w eksonach 18, 19, 20 i 21. Test powinien identyfikować warianty genetyczne w genie *EGFR* występujące z częstością nie mniejszą niż 1% wszystkich mutacji występujących w tym genie. W przypadku genu *BRAF* test powinien identyfikować minimum wariant p.Val600Glu. W przypadku genu *KRAS* identyfikowane powinny być warianty w kodonach 12 i 13, a w szczególności wariant p.Gly12Cys. W przypadku genu *HER2* identyfikowane powinny być insercje w eksonie 20. Rekomendowane jest zastosowanie testów CE-IVD.
- W przypadku zastosowania testów qPCR do identyfikacji fuzji genowych z udziałem takich genów jak *ALK*, *ROS1*, *RET*, *NTRK* analiza musi bazować na ocenie RNA, a test powinien identyfikować typowe złącza fuzyjne dla wymienionych genów.

Fluorescencyjna hybrydyzacja in situ (FISH)

- W przypadku molekularnej analizy cytogenetycznej rearanżacji *ALK* czy *ROS1* przez hybrydyzację fluorescencyjną in situ z użyciem sond dla końców 3′ i 5′ genu – połączone sygnały (zielone i czerwone lub widoczne jako żółte) wskazują na prawidłowy *locus ALK* czy *ROS1*; a rozdzielony czerwony i zielony sygnał wskazuje na rearanżację *ALK* czy *ROS1*. Wynikiem pozytywnym jest również obecność izolowanego sygnału 3′. Obecność rearanżacji można stwierdzić, jeśli obserwuje się pozytywny sygnał fluorescencyjny w >50% z 50 czytelnych komórek nowotworowych lub w przypadkach niejednoznacznych w =>15% ze 100 analizowanych komórek nowotworowych.
- Częściej metody molekularne, jak NGS, wypierają metodę FISH.

4.5.5. Materiał

- **NGS:** Materiał do badania: DNA/RNA izolowane z bloczka parafinowego lub materiału cytologicznego. Badane preparaty powinny zawierać nie mniej niż 20% utkania nowotworowego, aby wynik analizy był wiarygodny. Ilość kwasów nukleinowych niezbędnych do przeprowadzenia analizy NGS w zależności od producenta testu to od ok. 10 ng do 200 ng. Kluczowa jest tu jakość wyizolowanych kwasów nukleinowych. Ocena ilościowa powinna opierać się na pomiarze na fluorymetrze wykorzystującym specyficzne barwniki wiążące się z DNA/RNA. Testy w oparciu o RNA zawierają wewnętrzne kontrole (pomiar ekspresji genów metabolizmu podstawowego). Wyboru najbardziej reprezentatywnego fragmentu do badania dokonuje patomorfolog.
- **qPCR:** Próbkę do badania stanowi wycinek tkankowy w postaci bloczka parafinowego lub materiał cytologiczny pobrany w trakcie zabiegu chirurgicznego z 5% komórek nowotworowych w materiale histologicznym/cytologicznym przeznaczonym do badania genetycznego. W przypadku testu w oparciu o RNA, jeżeli test nie zawiera wewnętrznej kontroli jakości i integralności RNA/cDNA, należy ocenić integralność RNA elektroforetycznie. Wyboru najbardziej reprezentatywnego fragmentu do badania dokonuje patomorfolog.
- **FISH:** Próbkę do badania stanowi utrwalony w formalinie i zatopiony w parafinie materiał tkankowy w postaci bloczka przygotowanego z wycinka pobranego w trakcie zabiegu chirurgicznego. Może to być zarówno materiał świeży, jak i archiwalny. Wyboru najbardziej reprezentatywnego fragmentu do badania FISH dokonuje patomorfolog. Materiał jest skrawany i nakładany na mikroskopowe szkiełko podstawowe. Jego grubość ustalana jest w wewnętrznych procedurach walidacyjnych dla metody FISH. Może ona wynosić 4–6 µm.

4.5.6. Czas wykonania badania molekularnego

- Wynik powinien być uzyskany w jak najkrótszym możliwym czasie, który nie powinien przekraczać od momentu otrzymania materiału:
  - 10 dni roboczych dla metody qPCR oraz sekwencjonowania metodą Sangera,
  - 20 dni roboczych dla metody NGS,
  - 10 dni roboczych dla FISH.

4.5.7. Rak płuca – uzupełnienie diagnostyki genetycznej o badanie ctDNA

Podstawą diagnostyki genetycznej w kwalifikacji do terapii celowanych jest pobranie próbki tkanki guza w postaci biopsji lub materiału pooperacyjnego (bloczek parafinowy), ocenionego pod względem zawartości komórkowej przez patologa, a następnie wykonanie badania genetycznego dla zmian nabytych (somatycznych). Obecnie coraz częściej ocenę biomarkerów molekularnych wspomagającą postawienie odpowiedniej diagnozy lub umożliwiającą kwalifikację do terapii celowanej można wykonać z biopsji płynnej. Biopsja płynna jest minimalnie inwazyjną procedurą, polegającą na pobraniu płynów ustrojowych (krew obwodowa, mocz, płyn z opłucnej, płyn mózgowo-rdzeniowy) pozwalającą na ocenę wolnokrążącego DNA (*cell free DNA*, cfDNA) uwalnianego z komórek podczas ich rozpadu. W przypadku komórek nowotworowych wolnokrążące DNA z biopsji płynnej jest określane jako wolnokrążące nowotworowe (ang. *circulating tumor DNA*, ctDNA). W rozpoznaniu raka płuca zastosowanie znajduje biopsja płynna z krwi obwodowej.

Płynna biopsja ma zastosowanie w badaniach przesiewowych nowotworów, określaniu stopnia zaawansowania nowotworu, charakteryzowaniu heterogeniczności wewnątrznowotworowej, monitorowaniu progresji nowotworu i odpowiedzi na terapię w celu dobrania zindywidualizowanego leczenia. W odniesieniu do raka płuca największe zastosowanie znajduje badanie ctDNA w zaawansowanych stadiach NDRP pozwalające na ocenę wariantów typu SNV genu EGFR i umożliwiające zakwalifikowanie pacjenta do terapii inhibitorami kinazy tyrozynowej EGFR (ang. *tyrosine kinase inhibitors*, TKIs). Szczególnie istotne jest to w przypadku braku materiału pooperacyjnego (bloczka parafinowego) lub niediagnostycznego wyniku z tkanki. Dodatkowo płynna biopsja pozwala na ocenę wariantów genu *EGFR* predysponujących do oporności pojawiającej się w trakcie terapii celowanej molekularnie. Ponadto genotypowanie ctDNA przy użyciu NGS pozwala na kwalifikację pacjenta do badań klinicznych.

Zgodnie z aktualnymi zaleceniami NCCN dotyczącymi NSCLC (1) zalecane jest profilowanie molekularne pod kątem zmiany p.Thr790Met (T790M) w genie *EGFR* oraz innych wariantów oporności po zaobserwowaniu progresji choroby u pacjentów z NSCLC, u których wcześniej wykryto somatyczny, aktywujący wariant tego genu i zastosowano terapię inhibitorami kinazy tyrozynowej EGFR. NCCN zaleca zastosowanie TKI III generacji jako kolejną opcję terapeutyczną dla pacjentów z przerzutowym NDRP i wariantem p.Thr790Met po zaobserwowaniu progresji choroby podczas stosowania niektórych TKIs EGFR (I i II generacji).

Według rekomendacji NCCN można wykonać badanie ctDNA uzyskane z biopsji płynnej przy progresji zamiast biopsji tkanki w celu oceny wariantu p.Thr790Met, jeżeli jednak wynik tego badania z osocza jest ujemny, zaleca się biopsję tkanki lub powtórzenie badania z nowego pobrania.

Rekomendacje NCCN nie zalecają badania ctDNA z osocza w celu postawienia diagnozy NDRP, w takich przypadkach zalecane jest wykorzystanie tkanek. NCCN podkreśla również, że standardy i wytyczne dotyczące badania ctDNA osocza pod kątem wariantów/mutacji somatycznych nie zostały opublikowane oraz że dane literaturowe wskazują, że odsetek wyników fałszywie ujemnych wynosi do 30%, a wykrywane warianty nie zawsze są związane z nowotworem (np. identyfikacja wariantu genu *IDH1* w badaniu ctDNA z osocza w raku płuca prawdopodobnie nie jest związana z NDRP i jest bardziej prawdopodobne, że reprezentuje klonalną

hematopoezę o nieokreślonym potencjale). Opisano również rzadkie przypadki wykrycia wariantów genu *KRAS* niezwiązanych z nowotworem, co sugeruje ostrożność w interpretacji tych wyników.

Dlatego też zastosowanie badania krążącego DNA nowotworowego można rozważyć w określonych okolicznościach klinicznych:

1. ze względu na stan pacjenta, który uniemożliwia inwazyjne pobranie próbki tkanki,
2. w przypadku braku wystarczającej ilości tkanki do analizy molekularnej,
3. w przypadku badań klinicznych – badanie ctDNA osocza jest użytecznym, minimalnie inwazyjnym testem, który można wykorzystać do identyfikacji wielu genów, w tym: *ALK*, *BRAF*, *EGFR*, *HER2*, *MET, RET, ROS1* i innych, które nie zostałyby zidentyfikowane u pacjentów z przerzutowym NDRP, a mogą kwalifikować do dalszej terapii, w tym do terapii eksperymentalnych.

Badanie ctDNA powinno być wykonane z wykorzystaniem zwalidowanego testu diagnostycznego. Poniżej podano kluczowe kwestie przedanalityczne związane z badaniem mutacji w ctDNA w NDRP (zmodyfikowane zalecenia według ESMO 2022).

1. Pobranie krwi obwodowej w celu oznaczenia wariantów genowych w ctDNA
   - Maksymalny czas od pobrania krwi powinien wynosić 2 godziny dla probówek z EDTA i 3 dni dla probówek z konserwantem w temperaturze pokojowej.
   - Objętość pobranej krwi powinna wynosić 2 × 10 ml, jednak nie podano znormalizowanej objętości. Zgodnie z literaturą uważa się, że powinna wynosić minimum 10 ml.
   - Osocze powinno być uzyskane z biopsji płynnej w ciągu 2 godzin od pobrania; alternatywnie należy rozważyć użycie stabilizujących probówek zawierających utrwalacze, aby umożliwić przetwarzanie krwi w późniejszym czasie.
2. Przechowywanie osocza do badania ctDNA
   - Uzyskane osocze bezkomórkowe powinno być przechowywane w temperaturze -20°C lub -80°C (w suchym lodzie na czas transportu), przy czym długoterminową stabilność DNA w osoczu wykazano w temperaturze -80°C.
3. Uwagi dotyczące probówek wykorzystywanych do badania oraz przechowywania ctDNA
   - Krew należy pobierać do odpowiednich probówek, aby zapobiec krzepnięciu.
   - Probówki zawierające stabilizator cfDNA zostały zaprojektowane w celu utrzymania jakości małych fragmentów DNA przez wiele dni w temperaturze pokojowej. Producent podaje, że stabilność cfDNA wynosi do 14 dni przy odpowiednim przechowywaniu, co umożliwia wygodną wysyłkę do laboratoriów analitycznych. Doświadczenia użytkowników wskazują jednak, że im krótszy jest czas przechowywania i transportu do laboratorium, tym lepsze uzyskuje się wyniki badania genetycznego. Zaleca się, aby próbkę przechowywać po pobraniu do 5 dni.
   - Wydajność reakcji nie ulega zaburzeniu przy przechowywaniu ctDNA w probówkach zawierających stabilizator do 48 godzin w temperaturze pokojowej (20–24°C).
   - Krew pobrana na antykoagulant (EDTA) wymaga natychmiastowego przetwarzania (oddzielenie osocza od pozostałych elementów krwi).
   - W przypadku analiz genomowych probówki EDTA są odpowiednie do przechowywania próbki z ctDNA, jeśli nie przekroczono maksymalnie 4 godzin w temperaturze pokojowej lub 24 godzin w temperaturze 4°C.
   - W miarę możliwości należy unikać powtarzających się cykli zamrażania i rozmrażania wyizolowanego ctDNA, a już bezwarunkowo nie należy rozmrażać wielokrotnie osocza przed wykonaniem izolacji cfDNA.

4. Izolacja ctDNA
    - W celu uzyskania maksymalnej wydajności zaleca się stosowanie metody dostosowanej do selektywnej ekstrakcji małych fragmentów cfDNA (<166 bp).

4.6. Nowotwory wieku dziecięcego

- W skali kraju każdego roku diagnozowanych jest ok. 1000–1200 dzieci z nowotworami litymi.
- Profil zmian molekularnych występujących w nowotworach wieku dziecięcego w istotny sposób różni się od profilu zmian obserwowanych w nowotworach diagnozowanych u dorosłych. Stąd bezpośrednia ekstrapolacja wiedzy i doświadczenia w zakresie markerów molekularnych opracowanych i stosowanych w onkologii osób dorosłych na grunt onkologii pediatrycznej nie jest możliwa.
- Wiedza na temat specyficznych dla nowotworów wieku dziecięcego zmian genetycznych, obecnych w komórkach nowotworowych (markerów somatycznych), jak i zmian germinalnych, jest użyteczna na wszystkich etapach procesu diagnostyczno-terapeutycznego:

    - znane są już markery genetyczne specyficzne dla poszczególnych typów histologicznych nowotworów, które umożliwiają postawienie właściwego rozpoznania (**grupa markerów diagnostycznych**),
    - identyfikowane są markery molekularne korelujące ze stopniem złośliwości nowotworów, umożliwiające ocenę przebiegu choroby i rokowanie (**grupa markerów prognostycznych**), jak również umożliwiające ocenę skuteczności podejmowanych terapii (**grupa markerów predykcyjnych**),
    - ocenie podlegają również zmiany molekularne identyfikowane w materiale genetycznym pochodzącym z krwi obwodowej pacjentów (zmiany germinalne); umożliwiają one określenie, czy wystąpienie danego nowotworu było wynikiem obecności defektu molekularnego (**grupa markerów predysponujących**),
    - obecnie największe nadzieje pokłada się w **markerach molekularnych** umożliwiających kwalifikację pacjentów **do terapii celowanej**.

4.6.1. Epidemiologia

- Choroby nowotworowe wieku dziecięcego stanowią drugą co do częstości przyczynę zgonów w populacji pediatrycznej. Występują one z częstością 2–5 przypadków na 100 000 dzieci do 15. roku życia. Stanowią 0,8% nowotworów całej populacji. Nowotwory lite stanowią ok. 60% wszystkich nowotworów złośliwych wieku dziecięcego.
- Międzynarodowa klasyfikacja nowotworów dziecięcych (International Classification of Childhood Cancer – ICCC, trzecia edycja ICD-O-3/IARC 2017) wyróżnia szerokie spektrum dziecięcych nowotworów litych:
    - nowotwory ośrodkowego układu nerwowego (OUN), inne nowotwory wewnątrzczaszkowe i wewnątrzrdzeniowe (~20–23%)*,
    - nerwiak zarodkowy (*neuroblastoma*) i inne nowotwory układu współczulnego (8–10%)*,
    - nowotwory nerek, w tym guz Wilmsa (7–8%)*,
    - nowotwory złośliwe kości, w tym kostniakomięsak i mięsak Ewinga (~7%)*,
    - mięsaki tkanek miękkich i inne mięsaki pozakostne (~7%)*,
    - nowotwory z pierwotnych komórek rozrodczych (3–6%),
    - nowotwory wątroby, w tym wątrobiak zarodkowy – hepatoblastoma (0,5–2%),
    - siatkówczak (2,5–3%)*,

  - inne nowotwory złośliwe pochodzenia nabłonkowego i czerniak złośliwy (<1%),
  - inne i nieokreślone nowotwory złośliwe.

  * Wszystkich nowotworów złośliwych wieku rozwojowego.

- Od połowy lat siedemdziesiątych odsetek wyleczeń większości guzów litych wieku dziecięcego wzrósł aż o 50%. Obecnie trwałe wyleczenie uzyskuje się u ponad 80% pacjentów. Niemniej wciąż obserwowana wysoka śmiertelność w grupie dzieci z nowotworami o wysokim stopniu złośliwości wskazuje na pilną potrzebę modyfikacji algorytmów postępowań diagnostyczno-terapeutycznych uwzględniających ocenę markerów genetycznych, umożliwiających m.in. wdrożenie terapii celowanej mogącej przyczynić się do poprawy efektywności leczenia.

4.6.2. Markery genetyczne

4.6.2.1. Nowotwory ośrodkowego układu nerwowego

- Nowotwory ośrodkowego układu nerwowego (OUN) zajmują drugie miejsce po białaczkach pod względem częstości występowania i są najczęstszą przyczyną zgonów z powodu nowotworów u dzieci. W Polsce rocznie rozpoznaje się ok. 220–240 nowych zachorowań. Ponadto pacjenci wyleczeni z nowotworu mózgu mają ciężkie odległe następstwa związane z przebytą chorobą i leczeniem.
- Jest to najlepiej poznana pod względem molekularnym grupa nowotworów litych wieku dziecięcego. To właśnie w przypadku nowotworów mózgu takich jak np. rdzeniak zarodkowy (*medulloblastoma*, MDB) wyniki badań z zakresu transkryptomiki i genomiki po raz pierwszy przyczyniły się do zdefiniowania podgrup molekularnych, których identyfikacja ma konkretne przełożenie na postępowanie kliniczne (np. podgrupa z aktywacją szlaku Wnt (MDB typ molekularny WNT) związana jest z lepszym rokowaniem i redukcją dawki naświetlania, co przyczynia się do zmniejszenia długoterminowych skutków prowadzonej terapii).
- Zasadność stosowania oznaczeń markerów genetycznych w postępowaniu diagnostycznym wykazano już w klasyfikacji nowotworów OUN Światowej Organizacji Zdrowia z 2016 r. (WHO 2016) dotyczącej np. nowotworów ośrodkowego układu nerwowego, a następnie podkreślano ich rolę w wytycznych przygotowywanych przez międzynarodowe konsorcjum cIMPACT-NOW (The Consortium to Inform Molecular and Practical Approaches to CNS Tumor Taxonomy). W najnowszej klasyfikacji WHO 2021 nowotworów OUN markery genetyczne mają fundamentalne znaczenie dla postawienia rozpoznania histopatologicznego.
- Obserwowany jest wzrost liczby leków ukierunkowanych molekularnie. Wybór optymalnej terapii bezwzględnie wymaga oceny obecności bądź braku określonych zmian genetycznych.
- Zestaw markerów genetycznych o istotnym znaczeniu klinicznym dla pediatrycznych nowotworów ośrodkowego układu nerwowego zamieszczono w poniższej tabeli.

Tab. 4.7. Markery molekularne – nowotwory ośrodkowego układu nerwowego wieku rozwojowego

Typ nowotworu		Geny/charakterystycznie zmienione profile molekularne	Marker diagnostyczny	Marker prognostyczny (rokowniczy), predykcyjny, predysponujący
Pediatric-type diffuse low-grade gliomas	***Gliomas, glioneuronal tumors, and neuronal tumors***			
	Diffuse astrocytoma, MYB- or MYBL1-altered	• *MYB* • *MYBL1* • IDH-wildtype (*IDH1*, *IDH2*) • H3-wildtype (*H3-3A*, *HIST1H3B* • *HIST1H3C*)	+	Zmiany z udziałem genów *MYB* i *MYBL1*: korzystny czynnik rokowniczy
	Angiocentric glioma	• *MYB* (najczęściej fuzja *MYB::QKI)*	+	Korzystny czynnik rokowniczy
	Polymorphous low-grade neuroepithelial tumor of the young	• *BRAF* • *FGFR* family	+	Potencjalne cele dla inhibitorów kinaz tyrozynowych (w zależności od wykrytej zmiany)
	Diffuse low-grade glioma, MAPK pathway-altered	• *FGFR1* • *BRAF*	+	Potencjalne cele dla inhibitorów kinaz tyrozynowych (w zależności od wykrytej zmiany)
Pediatric-type diffuse high-grade gliomas				
	Diffuse midline glioma, H3 K27-altered	• *H3-3A, HIST1H3B, HIST1H3C:* p.K28M • *TP53* • *ACVR1* • *PDGFRA* • *EGFR* • *EZHIP*	+	Patogenne warianty w genach kodujących histon H3.3 – niekorzystny czynnik rokowniczy. Potencjalne cele dla terapii celowanej (w zależności od wykrytej zmiany)
	Diffuse hemispheric glioma, H3 G34-mutant	• *H3-3A: p.G35R/V* • *TP53* • *ATRX* • *MGMT*	+	MGMT – korzystny czynnik prognostyczny związany z większą wrażliwością na temozolomid
	Diffuse pediatric-type high-grade glioma, H3-wildtype and IDH-wildtype (podgrupy pedRTK1, pedRTK2, pedMYCN)	• IDH-wildtype (*IDH1*, *IDH2*) • H3-wildtype (*H3-3A*, *HIST1H3B HIST1H3C*) • *PDGFRA* • *MYCN* • *EGFR* • (ocena metylomu)	+	Potencjalne cele dla terapii celowanej (w zależności od wykrytej zmiany)
	Infant-type hemispheric glioma	• *NTRK1/2/3* • *ALK* • *ROS*	+	Potencjalny cel dla inhibitorów kinaz tyrozynowych (w zależności od wykrytej zmiany)
Circumscribed astrocytic gliomas				
	Pilocytic astrocytoma	• *KIAA1549::BRAF* • *BRAF* • *NF1* • fuzje z udziałem genów *NTRK1* i *NTRK2*	+	Potencjalne cele dla inhibitorów kinaz tyrozynowych (w zależności od wykrytej zmiany) KIAA1549::BRAF, *BRAF* – korzystny czynnik prognostyczny
	High-grade astrocytoma with piloid features	• IDH-wildtype (*IDH1*/*IDH2*) • E*GFR amflification widltype* • ścieżka sygnałowa MAPK głównie: BRAF (głównie fuzje) • NF1 • *ATRX* • *CDKN2A/B* • ocena metylomu	+	Potencjalne cele dla inhibitorów kinaz tyrozynowych (w zależności od wykrytej zmiany)

Typ nowotworu		Geny/charakterystycznie zmienione profile molekularne	Marker diagnostyczny	Marker prognostyczny (rokowniczy), predykcyjny, predysponujący
	Pleomorphic xanthoastrocytoma	• *BRAF* • *CDKN2A/B*	+	Potencjalne cele dla inhibitorów kinaz tyrozynowych (w zależności od wykrytej zmiany)
	Subependymal giant cell astrocytoma	• *TSC1* • *TSC2*	+	Potencjalne cele dla inhibitorów szlaku mTOR
	Astroblastoma, MN1-altered	• *MN1* (głównie fuzja z *BEND2*)	+	Korzystny czynnik rokowniczy
Glioneuronal and neuronal tumors				
	Ganglioglioma	ścieżka sygnałowa MAPK: • *BRAF* • *RAS* • *FGFR1/2* • *RAF1* • *NTRK2* • *NF1*	+	Potencjalne cele dla inhibitorów kinaz tyrozynowych (w zależności od wykrytej zmiany)
	Desmoplastic infantile ganglioglioma/ desmoplastic infantile astrocytoma	• ścieżka sygnałowa MAPK: głównie *BRAF*	+	Potencjalne cele dla inhibitorów kinaz tyrozynowych (w zależności od wykrytej zmiany)
	Dysembryoplastic neuroepithelial tumor	• *FGFR1*	+	Potencjalne cele dla inhibitorów receptora kinazy tyrozynowej FGFR1
	Rosette-forming glioneuronal tumor	• *FGFR1* • *PIK3CA* • *NF1*	+	Potencjalne cele terapeutyczne (w zależności od wykrytej zmiany)
	Myxoid glioneuronal tumor	• *PDFGRA*	+	–
	Diffuse leptomeningeal glioneuronal tumor	• ścieżka sygnalna MAPK, głównie fuzja *KIAA1549::BRAF* rearanżacje strukturalne 1p (ocena metylomu)	+	Potencjalne cele dla inhibitorów kinaz tyrozynowych (w zależności od wykrytej zmiany)
	Dysplastic cerebellar gangliocytoma (Lhermitte-Duclos disease)	• *PTEN*	+	–
	Extraventricular neurocytoma	• IDH-wildtype (*IDH1*, *IDH2*) • *FGFR* (*FGFR1::TACC1* fusion)	+	–
	Ependymal tumors			
Supratentorial ependymoma				
	Supratentorial ependymoma, ZFTA fusion-positive	• *ZFTA::RELA*	+	Fuzja z udziałem genu *YAP1* – korzystny czynnik prognostyczny
	Supratentorial ependymoma, YAP1 fusion-positive	• *YAP1::MAMLD1*	+	Fuzja z udziałem genu *ZFTA* – niekorzystny czynnik rokowniczy
Posterior fossa ependymoma				
	Posterior fossa ependymoma, group PFA	• globalna redukcja H3 K27me3 • (ocena metylomu)	+	Niekorzystny czynnik rokowniczy
	Posterior fossa ependymoma, group PFB	• H3 K27me3 • (utrzymanie poziomu metylacji) • (ocena metylomu)	+	Korzystne czynniki rokownicze

Typ nowotworu		Geny/charakterystycznie zmienione profile molekularne	Marker diagnostyczny	Marker prognostyczny (rokowniczy), predykcyjny, predysponujący
Spinal ependymoma				
	Spinal ependymoma, MYCN-amplified	• *NF2* • *MYCN*	+	*MYCN* – niekorzystny czynnik prognostyczny
	Choroid plexus tumors			
	Choroid plexus carcinoma	• *TP53*		Niekorzystny czynnik rokowniczy związany z ograniczeniem wskazań do radioterapii
	Embryonal tumors			
Medulloblastomas, molecularly defined				
	Medulloblastoma, WNT-activated	• *CTNNB1* • *APC*	+	Korzystne czynniki rokownicze
	Medulloblastoma, SHH-activated and TP53-wildtype	• *TP53*-wildtype • *PTCH1* • *SUFU* • *SMO* • *MYCN* • *GLI2* • (ocena metylomu)	+	Potencjalne cele dla inhibitorów szlaku SHH. Niekorzystne czynniki rokownicze (*MYCN*)
	Medulloblastoma, SHH-activated and TP53-mutant	• *TP53* • *PTCH1* • *SUFU* • *SMO* • *MYCN* • *GLI2* • (ocena metylomu)	+	Potencjalne cele dla inhibitorów szlaku SHH. Niekorzystne czynniki rokownicze (*TP53*, *MYCN*)
	Medulloblastoma, non-WNT/non-SHH	• *MYC* • *MYCN* • *PRDM6* • (ocena metylomu)	+	
Other CNS embryonal tumors				
	Atypical teratoid/rhabdoid tumor	• *SMARCB1* • *SMARCA4* • rearanżacje chrom. 22	+	*SMARCB1* – niekorzystny czynnik rokowniczy, *SMARCA4* – standardowy czynnik rokowniczy
	Embryonal tumor with multilayered rosettes	• *C19MC* • *DICER1*	+	–
	CNS neuroblastoma, FOXR2-activated	• *FOXR2*	+	–
	CNS tumor with BCOR internal tandem duplication	• *BCOR*	+	Niekorzystny czynnik rokowniczy
	Pineal tumors			
	Pineoblastoma	• *RB1* • *DICER1*	+	–
	Desmoplastic myxoid tumor of the pineal region, SMARCB1-mutant	• *SMARCB1*	+	–

4.6.2.2. Nerwiak zarodkowy współczulny (*neuroblastoma* – NBL)

- Najczęstszy nowotwór współczulnego układu nerwowego (97%) i najczęstszy nowotwór w okresie niemowlęcym; mediana wieku rozpoznania wynosi 17 miesięcy. Odpowiada za 15% zgonów z powodu choroby nowotworowej u dzieci. W Polsce rocznie rozpoznaje się ok. 70 nowych zachorowań.
- Rozwija się z komórek progenitorowych grzebienia nerwowego, stąd może wystąpić w dowolnym miejscu współczulnego układu nerwowego, w tym w zwojach szyjnych górnych, przykręgosłupowych i trzewnych. Najczęstsze umiejscowienia ogniska pierwotnego to: okolica zaotrzewnowa jamy brzusznej (60–80%), tylne śródpiersie (15%), szyja (2–5%), miednica (2–5%). U ~50% pacjentów NBL rozpoznaje się w 4. stopniu zaawansowania.
- Największe znaczenie prognostyczne w NBL mają wiek dziecka w momencie rozpoznania i stopień zaawansowania choroby; u dzieci poniżej 1. roku życia, nawet w przypadku zaawansowanej choroby, rokowanie jest bardzo dobre, w przeciwieństwie do dzieci starszych, u których mimo intensywnych i złożonych protokołów leczniczych wyniki leczenia są ciągle niezadowalające.
- Przy ustalaniu rokowania, oprócz wymienionych danych klinicznych, uwzględnia się również profil molekularny nowotworu obejmujący ocenę stopnia ploidii komórek nowotworowych, obecność amplifikacji onkogenu MYCN oraz występowanie strukturalnych i liczbowych aberracji chromosomowych.
- Zestaw markerów genetycznych o istotnym znaczeniu klinicznym dla *neuroblastoma* zamieszczono w poniższej tabeli.

Tab. 4.8. Markery genetyczne – *neuroblastoma*

Typ nowotworu	Geny/charakterystycznie zmienione profile molekularne	Metoda	Marker diagnostyczny	Markery prognostyczne (rokownicze), predykcyjne
Neuroblastoma	*MYCN* (amplifikacja)	• I-FISH (ang. *interphase fluorescence in situ hybrydization*) – metoda rekomendowana	–	Niekorzystny czynnik rokowniczy niezależnie od wieku pacjenta. Występowanie amplifikacji genu MYCN związane jest z wielokrotnie wyższym ryzykiem wznowy i zgonu z powodu progresji
	NCA (*numerical chromosomal abnormalities*) – liczbowe aberracje chromosomowe w materiale genetycznym komórek nowotworowych	• mikromacierz całogenomowa • MLPA	–	Diploidia obserwowana w materiale genetycznym tkanki nowotworowej związana jest z niekorzystnym przebiegiem choroby. U niemowląt hiperdiploidia jest korzystnym czynnikiem rokowniczym (związana jest z dobrą odpowiedzią na chemioterapię)
	SCA (*segmental chromosomal aberration*) – strukturalne aberracje chromosomowe – najczęściej obejmujące regiony chromosomowe 1p, 1q, 2p, 3p, 6p, 6q, 4p, 11q i 17q i inne	• mikromacierz całogenomowa • MLPA	–	Najczęściej są obserwowane w zaawansowanych stadiach choroby u starszych dzieci, są to niekorzystne czynniki rokownicze, zwiększające ryzyko nawrotu choroby, niezależnie od tego, której pary chromosomów dotyczą
	ALK – zmiany typu SNP (najczęściej: p.F1174L, p.F1245C, p.R1275Q) – amplifikacje – fuzje	• sekwencjonowanie metodą Sangera • sekwencjonowanie nowej generacji (*Next Generation Sequencing* – NGS) • FISH • RT-PCR	–	Potencjalny cel dla inhibitorów kinazy ALK, niekorzystny czynnik rokowniczy

4.6.2.3. Nowotwory nerek, w tym nerczak płodowy (guz Wilmsa)

- Najczęstszym nowotworem złośliwym nerek wieku dziecięcego jest nerczak płodowy (*nephroblastoma*), stanowiący ponad 90% nowotworów w tej lokalizacji. Jest to drugi co do częstości, po *neuroblastoma,* pozaczaszkowy guz lity u dzieci.
- Do innych, rzadziej występujących nowotworów zaliczane są:
  - mięsak jasnokomórkowy nerki (*clear cell sarcoma of kidney* – CCSK),
  - rak nerki związany z translokacjami MiTF/TFE,
  - złośliwy nowotwór rabdoidny nerki (*malignant rhabdoid tumor of kidney* – MRTK),
  - wrodzona postać nerczaka (*congenital mesoblastic nephroma* – CMN) oraz inne.

Nerczak płodowy

- W Polsce liczba nowych zachorowań na guza Wilmsa wynosi od 45 do 50 rocznie.
- Szacunkowa zapadalność na ten nowotwór to 7/1 000 000 dzieci poniżej 16. roku życia.
- Nerczak płodowy najczęściej diagnozowany jest u dzieci w wieku 1–5 lat. Średni wiek w momencie rozpoznania to 44 miesiące u pacjentów z jednostronną postacią nowotworu i 31 miesięcy u pacjentów z obustronnym guzem. Po 15. roku życia ten typ nowotworu występuje bardzo rzadko.
- Przypadki rodzinne stanowią 1,5%.
- Zmiany molekularne:
  - w ok. jednej trzeciej przypadków guza Wilmsa obserwowane są zmiany w genach *WT1*, *CTNNB1* lub *AMER1* (*WTX*) – w genach supresorowych regulujących wzrost, różnicowanie i proliferacje zarodkowej tkanki nerkotwórczej;
  - kolejną istotną grupą są geny: *DROSHA*, *DGCR8*, *DICER1* i *XPO5*, których białkowe produkty regulują procesowanie miRNA;
  - inną ważną grupą są geny, których ekspresja odgrywa znaczącą rolę na wczesnych etapach rozwoju nerek, takie jak: *SIX1* i *SIX2*, *EP300* (*CREBBP*), *MLLT1*, *BCOR* i *MYCN*;
  - zmiany w genie *TRIM28* związane są z podtypem nabłonkowym guza Wilmsa;
  - w typach anaplastycznych guza Wilmsa obserwuje się występowanie zmian w genie *TP53*;
  - obserwowana utrata heterozygotyczności w obrębie regionów chromosomowych 1p i 16q oraz zwiększenie ilości materiału genetycznego w obrębie chromosomu 1q związane są z niekorzystnym rokowaniem. Ponadto zaobserwowano gorsze rokowanie w przypadku aberracji w regionach chromosomu 11p13 i 11p15.
- Zestaw markerów genetycznych o istotnym znaczeniu klinicznym dla nowotworów nerki wieku rozwojowego zamieszczono w poniższej tabeli.

Tab. 4.9. Markery genetyczne – nowotwory nerki u dzieci

Typ nowotworu	Geny/charakterystycznie zmienione profile molekularne	Metoda	Marker diagnostyczny	Markery prognostyczne (rokownicze), predykcyjne
Guz Wilmsa (nephroblastoma)	• *WT1* (11p13)	• MLPA • sekwencjonowanie metodą Sangera • sekwencjonowanie nowej generacji (*Next Generation Sequencing* • NGS)	+	Brak jednoznacznych danych
	• LOH 1p/16q • *TP53*	• mikromacierz całogenomowa, MLPA • sekwencjonowanie metodą Sangera • NGS	–	Niekorzystny czynnik rokowniczy
***Congenital mesoblastic nephroma* (CMN)**	• t(12;15) • *ETV6::NTRK3* • *EGRF – ITD*	• FISH • RT • PCR • sekwencjonowanie metodą Sangera	+	–
Clear cell sarcoma of kidney (CCSK)	• *BCOR* – ITDs • t(10;17)(q22;p13) • *YWHAE::NUTM2B* • *t(12;22)(q13;q12)* • *EWSR1::AFT1* • *BCOR::CCNB3*	• sekwencjonowanie metodą Sangera • NGS • FISH • RT-PCR	+	–
Rak nerki związany z translokacjami MiTF/TFE	• t(X;1)(p11.2;q21.2) • TFE3::PRCC t(X;17) • (p11.2;q25) TFE3::ASPL • (ASPSCR1) t(X;1) • (p11.2;p34) TFE3::SFPQ • (PSF), i inne	• NGS • FISH • RT-PCR	+	–
***Malignant rhabdoid tumor of kidney* (MRTK)**	• *SMARCB1* • *SMARCA4*	• MLPA • mikromacierz • sekwencjonowanie metodą Sangera • NGS	+	Niekorzystny czynnik rokowniczy
Metanephric tumors	• *BRAF* (p.V600E)	• sekwencjonowanie metodą Sangera • NGS	+	–

4.6.2.4. Nowotwory złośliwe kości, w tym kostniakomięsak i mięsak Ewinga

- W Polsce rocznie stwierdza się ok. 60–100 nowych zachorowań na pierwotne nowotwory kości u dzieci.
- Wśród tej grupy nowotworów najczęściej występują:
  - mięsak kościopochodny (*osteosarcoma*) – 56%,
  - mięsak Ewinga (*Ewing sarcoma*) – 34%,
  - chrzęstniakomięsak (*chondrosarcoma*) – 10%.
- Rekomendowane badania molekularne obejmują m.in.:
  - ocenę obecności translokacji charakterystycznych dla *Ewing sarcoma* i *chondrosarcoma*,
  - określenie statusu patogennych wariantów w genie *H3F3A* istotnych w diagnostyce guza olbrzymiokomórkowego (*giant cell tumor of soft tissue*),
  - ocenę obecności amplifikacji MDM2, PRIM1, CDK4 do różnicowania *osteosarcoma* o niższym stopniu złośliwości.
- Zestaw markerów genetycznych o istotnym znaczeniu klinicznym dla nowotworów złośliwych kości wieku rozwojowego zamieszczono w poniższej tabeli.

Tab. 4.10. Markery genetyczne – nowotwory złośliwe kości

Typ nowotworu	Geny/charakterystycznie zmienione profile molekularne	Metoda	Marker diagnostyczny	Markery prognostyczne (rokownicze), predykcyjne
Osteosarcoma	• *TP53* • *RB1* • 8q21-24 (amplifikacja) • *MDM2* (amplifikacja) • rozległe i kompleksowe • rearanżacje chromosomowe	• sekwencjonowanie metodą Sangera NGS • MLPA • FISH • kariotyp	+	–
Ewing sarcoma	• t(11;22)(q24;q12) • *EWSR1::FLI1* • t(21;22)(q12;q12) • *EWSR1::ERG* • t(2;22)(q33;q12) • *EWSR1::CREB1* • t(7;22)(p22;q12) • *EWSR1::ETV1* • t(17;22)(q12;q12) • *EWSR1::E1AF* • inv(22)(q12;q12) • *EWSR1::ZSG* • t(16;21)(p11;q22) • *FUS::ERG* • i inne	• FISH • NGS • RT-PCR • inne	+	–
Chondrosarcoma	• *HEY1::NCOA2* • *t(1;5)(q42;q32)* • *RF2BP2::CDX1* • *IDH1* • *IDH2v* • *TP53*	• FISH • NGS • RT-PCR • sekwencjonowanie metodą Sangera • NGS	+	–
Giant cell tumor of soft tissue	• *H3F3A* • *HRAS* • *TP53*	• sekwencjonowanie metodą Sangera • NGS	+	–

4.6.2.5. Mięsaki tkanek miękkich

Mięsaki tkanek miękkich

- Heterogenna grupa szybko rosnących, wysoce złośliwych nowotworów pochodzących z zarodkowej tkanki mezenchymalnej i neuroektodermalnej. Obejmują nowotwory mięśni, tkanki łącznej, tkanki podporowej i naczyniowej.
- Większość zachorowań dotyczy dzieci w wieku 2–6 lat oraz młodzieży powyżej 12. roku życia. Wskaźnik zachorowalności, niezależnie od płci, waha się w granicach 0,2–1,0/100 000 rocznie.

Mięsak prążkowanokomórkowy (*rhabdomyosarcoma* – RMS)

- Najczęstszy nowotwór w tej grupie (70%).
- Identyfikacja podtypu pęcherzykowego (*alveolar* RMS) ma znaczenie dla postępowania terapeutycznego ze względu na gorsze rokowanie.

Mięsaki nieprążkowanokomórkowe – NRSTS (ang. *nonrhabdomyosarcoma soft tissue sarcomas*)

- Diagnozowane głównie u starszych dzieci i młodych dorosłych.
- W tej grupie najczęściej występują nowotwory typu:

- *synovial sarcoma*,
- MPNST (ang. *malignant peripheral nerve sheath tumor*).

Pozostałe jednostki chorobowe występują u dzieci znacznie rzadziej.

- Zestaw markerów genetycznych o istotnym znaczeniu klinicznym dla pediatrycznych mięsaków tkanek miękkich zamieszczono w poniższej tabeli.

Tab. 4.11. Markery genetyczne – mięsaki tkanek miękkich

Typ nowotworu	Geny/charakterystycznie zmienione profile molekularne	Metoda	Marker diagnostyczny
Rhabdomyosarcoma Alveolar	• t(2;13)(q35;q14) • *PAX3::FOXO1* • t(1;13)(p36;q14) • *PAX7::FOXO1* • t(2;2)(q35;p23) • *PAX3::NCOA1* • t(X;2)(q35;q13) • *PAX3::AFX*	• FISH • NGS • RT-PCR • inne	+
Rhabdomyosarcoma Embryonal	• Utrata heterozygotyczności 11p15 • trisomie chrom. 2, 8 i 20	• MLPA • FISH • NGS • kariotyp	+
Synovial sarcoma	• t(X;18)(p11,q11) • *SS18::SSX1* • *SS18::SSX2* • *SS18::SSX4*	• FISH • NGS • RT-PCR • inne	+
Malignant peripheral nerve sheath tumor	• złożone aberracje chromosomowe • patogenne zmiany w genach *SUZ12 i EED* • inaktywacja *NF1*	• FISH • kariotyp • NGS • sekwencjonowanie metodą Sangera • inne	+
Alveolar soft-part sarcoma	• t(X;17)(p11;q25) • *ASPL(ASPSCR1)::TFE3*	• FISH • NGS • RT-PCR • inne	+
Angiomatoid fibrous histiocytoma	• t(12;16)(q13:p11) • *FUS::ATF1* • t(2;22)(q33;q12) • *EWSR1::CREB1* t(12;22)(q13;q12) • *EWSR1::ATF1*	• FISH • NGS • RT-PCR • inne	+
BCOR-rearranged sarcoma	• Inv(X)(p11.4p11.22) • *BCOR::CCNB3* • t(X;4)(p11;q31) • *BCOR::MAML3* • t(X;22)(p11;q13) • *ZC3H7B::BCOR*	• FISH • NGS • RT-PCR • inne	+
CIC-rearranged sarcoma	• t(4;19)(q35;q13) • t(10; 19)(q26;q13) • *CIC::DUX4* • t(X;19)(q13;q13.3) • *CIC::FOXO4*	• FISH • NGS • RT-PCR • inne	+

Typ nowotworu	Geny/charakterystycznie zmienione profile molekularne	Metoda	Marker diagnostyczny
Clear cell sarcoma	• t(12;22)(q13;q12) • *EWSR1::ATF1* • t(2;22)(q33;q12) • *EWSR1::CREB1*	• FISH • NGS • RT-PCR • inne	+
Dermatofibrosarcoma protuberans	• t(17;22)(q21;q13) • *COL1A1::PDGFB,* • chromosome pierścieniowy • r(17;22)	• FISH • NGS • RT-PCR • kariotyp • inne	+
Desmoid-type fibromatosis	• 5q21 loss • trisomia 8, 20 • patogenne zmiany w genie *CTNNB1*	• FISH • NGS • RT-PCR • mikromacierz całogenomowa • kariotyp • sekwencjonowanie metodą Sangera	+
Desmoplastic small round cell tumor	• t(11;22)(p13;q12) • *EWSR1::WT1*	• FISH • NGS • RT-PCR • inne	+
Dedifferentiated Liposarcoma	• Chromosom pierścieniowy • i markerowy, amplifikacja regionu • 12q13–15: *MDM2, CDK4*	• FISH • NGS • MLPA • inne	+
Epithelioid sarcoma	• Delecja 22q • *SMARCB1* • t(8;22)(q22;q11) • t(10;22)	• FISH • NGS • RT-PCR • MLPA • mikromacierz całogenomowa • sekwencjonowanie metodą Sangera	+
Epithelioid hemangioendothelioma	• t(1;3)(p36;q25) • *WWTR1::CAMTA1* • t(X;11)(p11;q22) • *YAP1::TFE3*	• FISH • NGS • RT-PCR • inne	+
Extraskeletal myxoid chondrosarcoma	• t(9;22)(q22;q12) • *EWSR1::NR4A3* • t(9;17)(q22;q11) • *TAF15 (TAF2N)::NR4A3* • t(9;15)(q22;q21) • *TCF12::NR4A3* • t(3;9)(q11;q22) • *TFG::NR4A3 fusion* • t(9;17)(q22;q11) • *RBP56::NR4A3 fusion*	• FISH • NGS • RT-PCR • inne	+
Giant cell fibroblastoma	• t(17;22)(q22;q13) • *COL1A1::PDGFB*	• FISH • NGS • RT-PCR • inne	+
Infantile fibrosarcoma	• t(12;15)(p13;q25) • *ETV6::NTRK3* • t(2;15)(p21;q25) • *EML4::NTRK3* • *LMNA::NTRK1* • 1q delecja • trisomia 8, 11, 17, 20	• FISH • NGS • RT-PCR • MLPA • mikromacierz całogenomowa • kariotyp	+
Inflammatory myofibroblastic tumor	• translokacje z udziałem regionu 2p23 • fuzje z udziałem genu ALK • (z wieloma partnerami lokalnymi) • t(3;6)(q12;q22) • *TFG::ROS1*	• FISH • NGS • RT-PCR • inne	+

Typ nowotworu	Geny/charakterystycznie zmienione profile molekularne	Metoda	Marker diagnostyczny
Leiomyosarcoma	• Złożone aberracje, często z delecją 1p	• FISH • kariotyp • NGS • mikromacierz całogenomowa • inne	+
Lipoblastoma	• t(7;8) (q21q12) • *COL1A2::PLAG1* • Del(8) (q12q24) • *HAS2::PLAG1* • t(8;14) (q12;q24) • *PLAG1::RAD51L1* • t(2;8) (q31;q12.1) • *COL3A1::PLAG1*	• FISH • NGS • RT-PCR • inne	+
Low-grade fibromyxoid sarcoma	• t(7;16)(q33;p11) • *FUS::CREB3L2* • t(11;16)(p11;p11) v*FUS::CREB3L1*	• FISH • NGS • RT-PCR • inne	+
Mesenchymal chondrosarcoma	• t(8;8)(q13;q21) • *HEY1::NCOA2*	• FISH • NGS • RT-PCR • inne	+
Myoepithelioma	• t(6;22)(p21;q12) • *EWSR1::POU5F1* • t(1;22)(q23;q12) • *EWSR1::PBX1* • (19;22)(q13;q12) • *EWSR1::ZNF444*	• FISH • NGS • RT-PCR • inne	+
Myxoid round cell liposarcoma	• t(12;16)(q13;p11) • *FUS::DDIT3* • t(12;22)(q13;q12) • *EWSR1::DDIT3 (CHOP)*	• FISH • NGS • RT-PCR • inne	+
Myxoinflammatory fibroblastic sarcoma	• t(1;10)(p22;q24) • *TGFBR3::MGEA5*	• FISH • NGS • RT-PCR • inne	+
Myxofibrosarcoma	• chromosom pierścieniowy	• kariotyp • FISH • inne	+
Solitary fibrous tumor	• Inv(12)(q13q13) • *NAB2::STAT6*	• FISH • NGS • RT-PCR • inne	+
Undifferentiated embryonal sarcoma of the liver	• t(11;19)(q13,q13) • *MALAT1::MHLB1*	• FISH • NGS • RT-PCR • inne	+

4.6.2.6. Nowotwory z pierwotnych komórek rozrodczych

- Nowotwory germinalne są zmianami wywodzącymi się z pierwotnych komórek rozrodczych na różnych etapach ich różnicowania. Charakteryzują się dużą różnorodnością lokalizacyjną, histologiczną i biologiczną.
- Stanowią ok. 3–6% wszystkich nowotworów złośliwych wieku rozwojowego.
- W Polsce rozpoznaje się rocznie 40–90 przypadków nowotworów germinalnych u dzieci i młodzieży poniżej 18. roku życia. Najczęściej występują między 1. i 6. rokiem życia.
- Należą do nowotworów o wysokim odsetku wyleczalności, sięgającym 85–90%.

- Obecnie zalecanymi badaniami molekularnymi w ramach diagnostyki i terapii nowotworów germinalnych są:
  - badania kariotypu u pacjentów z cechami dysgenezji gonad i nowotworów śródpiersia (u chłopców) oraz obustronnych nowotworów jajników (u dziewczynek), z *gonadoblastoma*, w celu identyfikacji/wykluczenia obecności zespołów genetycznych takich jak: zespół Turnera, Swyera, Klinefeltera, Frasera, Denysa-Drasha i innych,
  - dane literaturowe wskazują również na obecność somatycznych rearanżacji dotyczących chromosomów 1, 6, 11, 12, 16, 20 i 22, których znaczenie kliniczne obecnie nie jest znane.

4.6.2.7. Nowotwory wątroby, w tym wątrobiak zarodkowy (*hepatoblastoma*)

- Rocznie jest rozpoznawanych w Polsce ok. 15 nowych zachorowań u dzieci na pierwotne nowotwory wątroby.

Hepatoblastoma (wątrobiak zarodkowy)

- Najczęstszy wśród pierwotnych nowotworów wątroby.
- Częstość występowania określana jest na 2–3 przypadki na 1 mln dzieci do 15. roku życia, jednak u ok. 98% przypadków występuje u dzieci do 5. roku życia.
- Średni wiek w momencie rozpoznania to 18 miesięcy.
- Zmiany molekularne występują:
  - głównie w genach, których białkowe produkty regulują szlak WNT i NF-κB, takich jak: *CTNNB1* (80–90%), *APC* (2–3%), *AXIN1*, *AXIN2* i *PIK3CA* oraz *TERT* (2–6%) i *NFE2L2* (5–10%),
  - w obrębie chromosomów 1, 2, 8 i 20 (rearanżacje), niemniej ich znaczenie kliniczne nie jest jednoznacznie określone.

Celem obecnie trwającego badania Pediatric Hepatic International Tumor Trial (PHITT [NCT03017326]) jest określenie znaczenia klinicznego szerokiego spektrum zmian molekularnych identyfikowanych poprzez pełne profilowanie genomowe, transkryptomiczne i epigenomiczne.

Rak wątrobowokomórkowy (*hepatocellular carcinoma*, HCC)

- Bardzo rzadko diagnozowany u dzieci, zwykle u dzieci starszych, w wieku 12–14 lat. Rokowanie jest złe, tylko 30% dzieci uzyskuje 3-letnie przeżycie.
- Najczęściej raportowanymi zmianami somatycznymi są zmiany w genie *TP53* (25–30%).
- Podłoże molekularne tego nowotworu nie jest w pełni poznane.

Niezróżnicowany zarodkowy mięsak wątroby (*undifferentiated embryonal sarcoma of the liver*, UES)

- Rzadki nowotwór wątroby, który zwykle rozwija się u dzieci w wieku od 6 do 10 lat.
- Podłoże molekularne UES nie jest w pełni poznane, niemniej wg danych literaturowych charakterystyczne dla tego nowotworu są:
  - częste i rozległe rearanżacje chromosomowe, również w postaci chromothripsis77,
  - zmiany w obrębie regionu 19q13.4, w tym translokacja t(11;19)(q13;q13.4) oraz nadekspresja regionu C19MC (klaster miRNA),
  - zmiany w genie TP53.
- Zestaw markerów genetycznych o istotnym znaczeniu klinicznym dla nowotworów nerki wieku rozwojowego zamieszczono w poniższej tabeli.

Tab. 4.12. Markery genetyczne nowotworów wątroby

Typ nowotworu	Geny/charakterystycznie zmienione profile molekularne	Metoda	Marker diagnostyczny	Markery prognostyczne (rokownicze), predykcyjne
Hepatoblastoma	• *CTNNB1*	• sekwencjonowanie metodą Sangera • NGS	+	–
	• *APC*	• sekwencjonowanie metodą Sangera • NGS • MLPA • mikromacierz	+/–	–
	• *NFE2L2*	• sekwencjonowanie metodą Sangera • NGS	–	Niekorzystny czynnik rokowania
***Undifferentiated embryonal sarcoma of the liver* (UES)**	• t(11;19)(q13;q13.4) • *MALAT1::MHLB1*	• FISH • NGS	+	–
	• zmiany w regionie C19MC	• FISH • NGS	+	–

4.6.2.8. Siatkówczak (*retinoblastoma*)

- Najczęstszy pierwotny nowotwór złośliwy gałki ocznej u dzieci i drugi po czerniaku naczyniówki nowotwór złośliwy oka we wszystkich grupach wiekowych.
- Częstość zachorowań wynosi 1 na 15 000–18 000 żywo urodzonych dzieci. W Polsce odnotowuje się ok. 25–30 nowych przypadków rocznie.
- Występuje kilka postaci klinicznych *retinoblastoma*:
  a. obustronna lub wieloogniskowa (25–30% przypadków, postać dziedziczna),
  b. jednostronna lub jednoogniskowa (70–75% przypadków, postać sporadyczna),
  c. postać trójstronna, w której zmianom obuocznym towarzyszy zarodkowy guz wewnątrzczaszkowy (*pineoblastoma*) zlokalizowany w linii środkowej (4% – tylko u dzieci z dziedziczną postacią choroby).
- Najczęściej rozpoznawany jest między 1. a 3. rokiem życia. Obuoczna postać siatkówczaka jest rozpoznawana wcześniej, przed 1. rokiem życia. Rzadko stwierdza się występowanie choroby po 5. roku życia.
- Związany jest z występowaniem zmian w genie *RB1* o wysokiej penetracji (90–95%). W ostatnim czasie pojawiły się również doniesienia o występowaniu w *retinoblastoma* zmian molekularnych w innych niż *RB1* genach – tab. 4.13.

Tab. 4.13. Markery genetyczne – siatkówczak

Typ nowotworu	Geny/charakterystycznie zmienione profile molekularne	Metoda	Marker diagnostyczny	Markery prognostyczne (rokownicze), predykcyjne
Retinoblastoma	***RB1*** • SNP: eksony 1-27 genu z uwzględnieniem oceny miejsc splicingowych oraz zmian typu mozaiki • CNV • metylacja regionu promotorowego	• sekwencjonowanie metodą Sangera • NGS • MLPA • QM-PCR • MS-MLPA	+	–
	BCOR • SNP • fuzje	• sekwencjonowanie metodą Sangera • NGS • FISH • RT-PCR	–	Marker niekorzystnego rokowania
	MYCN (amplifikacja)	• FISH • MLPA	–	Marker niekorzystnego rokowania

4.6.2.9. Inne nowotwory złośliwe pochodzenia nabłonkowego i czerniak złośliwy

Czerniak

- Nowotwór złośliwy skóry, błon śluzowych lub błony naczyniowej oka wywodzący się z melanocytów.
- Częstość występowania określana jest na 1 przypadek na 1 mln dzieci do 15. roku życia.
- W grupie pediatrycznej czerniak może mieć jedną z 3 postaci:
  a. *spitzoid melanoma* (SM), najczęstsza postać,
  b. czerniak, który powstaje na bazie wrodzonego znamienia melanocytowego (CNM),
  c. klasyczny czerniak („czerniak typu dorosłego"), najbardziej podobny pod względem przyczyn i czynników ryzyka do czerniaka diagnozowanego u osób dorosłych.
- Występowanie związane jest głównie z obecnością zmian molekularnych w genach regulujących szlak MAPK.
- Zestaw markerów genetycznych o istotnym znaczeniu klinicznym dla nowotworów złośliwych pochodzenia nabłonkowego i czerniaka wieku rozwojowego zamieszczono w poniższej tabeli.

Tab. 4.14. Markery molekularne – czerniak

Typ nowotworu	Geny/charakterystycznie zmienione profile molekularne	Metoda	Marker diagnostyczny	Markery prognostyczne (rokownicze), predykcyjne
Spitzoid melanoma **(SM)**	• Fuzje z udziałem genów *ROS1*, *NTRK1*, *NTRK3*, *ALK*, *BRAF*, *MAPK*, *MET*, *RET*,	• NGS, FISH, RT-PCR	+	Potencjalne cele terapeutyczne
	• Rearanżacje segmentowe w obrębie chromosomów	• mikromacierz całogenomowa, FISH	-	–
	• Homozygotyczna delecja regionu 9p21	• MLPA, mikromacierz • FISH	+	Marker niekorzystnego rokowania
	• *TERT* (zmiany w obrębie promotora – rzadko)	• sekwencjonowanie metodą Sangera • NGS	-	Marker niekorzystnego rokowania

Typ nowotworu	Geny/charakterystycznie zmienione profile molekularne	Metoda	Marker diagnostyczny	Markery prognostyczne (rokownicze), predykcyjne
Czerniak, na bazie wrodzonego znamienia melanocytowego (CNM)	• *NRAS* (najczęściej p.Q61K/R) • *BRAF* (najczęściej p.V600E) • *TERT* (hipermetylacja promotora) • rearanżacje segmentowe w obrębie chromosomów	• sekwencjonowanie metodą Sangera • NGS • mikromacierz całogenomowa, FISH	+ – + –	Potencjalne cele terapeutyczne (w zależności od wykrytej zmiany)
Klasyczny czerniak („czerniak typu dorosłego")	• *BRAF* (najczęściej p.V600E) • *TERT* (zmiany w obrębie promotora) • rearanżacje segmentowe w obrębie chromosomów	• sekwencjonowanie metodą Sangera • NGS • mikromacierz całogenomowa • FISH	+ + + –	Potencjalne cele terapeutyczne (w zależności od wykrytej zmiany)
NUT midline carcinoma	• translokacje z udziałem genu *NUT* (15q14), najczęściej z genem *BRD4* (19p13)	• FISH	+	–

4.6.2.10. Inne

Nowotwory jajnika

- Występowanie nowotworów jajnika u dziewczynek może być związane z występowaniem zespołów takich jak DICER1 czy RTPS (ang. *rhabdoid tumor predisposition syndrome*), stąd obserwowane są również zmiany zarówno germinalne, jak i somatyczne w genach *DICER1* (*sertoli-Leydig cell tumors*) i *SMARCA4* (pierwotny rak drobnokomórkowy jajnika, typ hiperkalcemiczny – SCCOHT).

Tab. 4.15. Markery genetyczne – nowotwory jajnika

Typ nowotworu	Geny/charakterystycznie zmienione profile molekularne	Metoda	Marker diagnostyczny	Markery prognostyczne (rokownicze), predykcyjne
Sertoli-Leydig cell tumors	• *DICER1*	• sekwencjonowanie metodą Sangera • NGS • MLPA • mikromacierz	+	–
Pierwotny rak drobnokomórkowy jajnika, typ hiperkalcemiczny, SCCOHT	• *SMARCA4*	• sekwencjonowanie metodą Sangera • NGS • MLPA • mikromacierz	+	–

4.6.2.11. Zmiany germinalne

- Występowanie nowotworów wieku dziecięcego może być uwarunkowane obecnością zmian odpowiedzialnych za występowanie zespołów genetycznych:
  - szacuje się, że obecnie znanych jest ponad 200 takich zespołów i liczba ta sukcesywnie wzrasta,
  - występowanie nowotworów wrodzonych dodatkowo podkreśla znaczenie zmian germinalnych w patogenezie nowotworów wieku dziecięcego,
  - szacuje się, że ok. 7–8% nowotworów hematologicznych i litych u dzieci uwarunkowanych jest zmianami germinalnymi.

- Ocena obecności zmian germinalnych może mieć znaczenie w optymalizacji postępowania terapeutycznego:
  - u wybranych pacjentów z germinalną zmianą skutkującą niestabilnością chromosomową lub występującą w genach naprawy DNA rozważana jest redukcja dawki naświetlania,
  - występowanie zmian germinalnych może być związane z częstszym występowaniem nowotworów wtórnych,
  - występowanie zmian germinalnych może być również związane z lepszym lub gorszym rokowaniem, co wpływa na podejmowane leczenie.
- Obecność zmiany germinalnej może również przyczyniać się do wcześniejszego występowania nowotworów.

Stąd wysoce zasadne wydaje się wprowadzenie do algorytmu postępowania diagnostyczno-terapeutycznego w nowotworach dziecięcych badania statusu zmian germinalnych.

- Poniższe tabele przedstawiają wybrane zespoły genetyczne, w przebiegu których dochodzi do wystąpienia nowotworów wieku rozwojowego, jak również zawierają informacje, jakie geny powinny podlegać ocenie w wybranych nowotworach pediatrycznych.

Tab. 4.16. Wybrane zespoły genetyczne związane z występowaniem nowotworów wieku dziecięcego

Zespół	Nowotwory	Gen/r. chromosomowy
Li-Fraumeni	Mięsaki, białaczki, nowotwory mózgu, *hepatoblastoma*	• *TP53*
Xeroderma pigmentosum	Czerniak	• *XPA*, *XPC*, *DDB2*, *ERCC2*
Nerwiakowłókniakowatość typu 1	Chłoniaki, nowotwory mózgu, mięsaki, glejaki nerwu wzrokowego, nerwiaki nerwu VIII, oponiaki, guz Wilmsa, *rhabdomiosarcoma*	• *NF1*, *SPRED1*
Ataksja-telangiectasia	Nowotwory OUN, układu pokarmowego, białaczki	• *ATM*
Zespół Blooma	Ostra białaczka, nowotwory przewodu pokarmowego	• *BLM*
Anemia Fanconiego	Ostra białaczka, guzy wątroby	• *FANCA*, *FANCB*, *FANCC*, *PALB2* i inne
Zespół Nijmegen	Białaczki, chłoniaki, *medulloblastoma*, *glioma*, *rhabdomiosarcoma*	• *NBN*
Zespół Beckwitha-Wiedemanna	*Nephroblastoma*, *hepatoblastoma*, *rabdomyosarcoma*, *gonadoblastoma*	• *CDKN1C*/11p15
Zespoły chromosomowe (zespół Downa, Klinefeltera)	Białaczki, nowotwory OUN	• trisomia 21 47XXY
Rodzinna postać siatkówczaka	*Retinoblastoma*	• *RB1*
Rodzinna postać guza Wilmsa	*Nephroblastoma*	• *WT1*, *WT2* i inne
Rodzinna polipowatość jelita grubego	*Hepatoblastoma*	• *APC*, *MUTYH*
Zespół sercowo-twarzowo-skórny (CFC)	Ostra białaczka limfoblastyczna, *rhabdomyosarcoma*, *hepatoblastoma*, chłoniaki	• *BRAF*, *MAP2K1*, *MAP2K2*, *KRAS*
Zespół Noonana	*Neuroblastoma*, ostra białaczka limfatyczna, *glioma*, *rhabdosarcoma*	• *PTPN11*, *RAF1*, *BRAF*, *SOS1*, *NRAS*, *CBL*
Zespół Costello	*Rhabdosarcoma*, *neuroblastoma*, *fibrosarcoma*	• *HRAS*
Zespół Sotosa	Guz Wilmsa, *neuroblastoma*, *hepatoblastoma*	• *NSD1*
Zespół von Hippla-Lindaua	Nowotwory nerek, OUN – szczególnie móżdżku, nadnerczy i siatkówki	• *VHL*

Zespół	Nowotwory	Gen/r. chromosomowy
Zespół Gorlina	*Medulloblastoma*	• *PTCH1*
Zespół Rubinsteina-Taybiego	*Medulloblastoma*, oponiaki, ostra białaczka limfatyczna, *pheochromocytoma*, *rhabdomiosarcoma*	• *CREBBP*
Zespół Turcota	*Medulloblastoma*, glejaki	• *APC*
Zespół DICER	*Pleuropulmonary blastoma, nephroblastoma*, mięsaki nerek i mózgu, gruczolaki i raki tarczycy, guzy gonadalne	• *DICER1*
Mnoga gruczolakowatość wewnątrzwydzielnicza typu 1 i 2	Gruczolaki/raki układu wewnątrzwydzielniczego	• *MEN1* i *RET*
Stwardnienie guzowate	Nowotwory mózgu i nerek	• *TSC1* i *TSC2*
Trisomia 18	*Hepatoblastoma*	–
Zespół Simpsona-Golabi-Behmel typu 1	*Hepatoblastoma*	• *GPC3*
Choroba spichrzeniowa glikogenu typu 1a, III, IV, VI	*Hepatoblastoma*	• *G6PC*, *AGL*, *GBE1*, *PYGL*
Tyrozynemia typu 1	*Hepatocellular carcinoma*	• *FAH*

Tab. 4.17. Zmiany germinalne w wybranych nowotworach OUN u dzieci

Typ nowotworu	Gen (MIM#)
AT/RT	• *SMARCB1* (MIM 601607, 35%) • *SMARCA4* (MIM 603254)
Choroid plexus carcinoma	• *TP53* (MIM 191170, 16–35%)
Congenital melanocytic nevi	• *MC1R* (MIM 155555)
Familial melanomas	• *CDKN2A* (MIM 600160) • *CDK4* (MIM 123829)
Glioma of the optic pathway	• *NF1* (MIM 613675, 30%)
Hemangioblastoma	• *VHL* (MIM 608537)
Malignant nerve sheath tumor	• *NF1* (MIM 613675) • *TP53* (MIM 191170)
Medulloblastoma	• *APC* (MIM 611731) • *BRCA2* (MIM 600185) • *MLH1* (MIM 120436) • *MSH2* (MIM 609309) • *MSH6* (MIM 600678) • *PMS2* (MIM 600259) • *PALB2* (MIM 610355) • *PTCH1* (MIM 601309) • *SUFU* (MIM 607035) • *SMOH* (MIM 601500) • *TP53* (MIM 191170) • *CREBBP* (MIM 600140) • *GLI3* (MIM 175700)
Meningioma	• *NF2* (MIM 607379) • *PTCH1* (MIM 601309) • *PTEN* (MIM 601728) • *SMARCB1* (MIM 601607 • *SMARCE1* (MIM 603111) • *SUFU* (MIM 607035) • *WRN* (MIM 604611) • *MEN1* (MIM 613733)

Typ nowotworu	Gen (MIM#)
Pineoblastoma	• *DICER1* (MIM 606241, 20%) • *RB1* (MIM 614041)
Schwannoma	• *NF2* (MIM 607379) • *PRKAR1A* (MIM 188830)
Schwannomatosis	• *LZTR1* (MIM 600574) • *SMARCB1* (MIM 601607, 50%)
Spinal cord ependymoma	• *NF2* (MIM 607379, 14%)
Subependymal giant cell astrocytoma	• *TSC1/TSC2* (MIM 605284/191092)
Neuroblastoma	• *PHOX2B* (MIM 603851) • *ALK* (MIM 105590)
Hepatoblastoma	• *APC* (MIM 611731) *disomia jednorodzicielska* w 11p15.5
Retinoblastoma	• *RB1* (MIM 614041)

4.6.3. Materiał do badań

- Punktem wyjścia dla większości protokołów diagnostycznych i terapeutycznych, stosowanych w pediatrycznych nowotworach litych, jest próbka tkanki nowotworowej. Do badań genetycznych pobierany jest niewielki fragment guza (0,5–1 cm^3). Najbardziej powszechną formą zabezpieczania tkanki jest jej utrwalenie w formalinie i zatopienie w parafinie (FFPE), niemniej do protokołów opartych na technologii NGS dużo korzystniejsze jest zabezpieczanie tkanki poprzez mrożenie. W wybranych nowotworach (np. *neuroblastoma*) materiałem do badań genetycznych mogą być preparaty odciskowe tkanki guza. Do identyfikacji zmian germinalnych oprócz tkanki nowotworowej zabezpieczana jest również próbka krwi obwodowej pacjenta.
- Ze względu na heterogenną budowę nowotworów rekomendowane jest pobranie co najmniej dwóch wycinków z danej tkanki nowotworowej. W przypadku stwierdzenia wznowy, z uwagi na możliwą zmianę profilu molekularnego tkanki nowotworowej w czasie, wskazane jest ponowne pobranie materiału do badań.
- Każda próbka tkanki nowotworowej zakwalifikowana do badań molekularnych powinna podlegać ocenie pod kątem odsetka komórek nowotworowych w badanym preparacie (optymalnie 60–100% utkania nowotworowego). Rutynowo ocena ta dokonywana jest przez patomorfologa. W przypadku dostępności większej liczby próbek biologicznych należy dokonać wyboru najbardziej adekwatnej próbki, biorąc pod uwagę rodzaj planowanego badania molekularnego, dostępność materiału biologicznego oraz jego zapotrzebowanie na kolejnych etapach diagnostyki.
- Bardzo duże znaczenie ma również zachowanie sterylności przy pobieraniu materiału do badań molekularnych. Metody NGS umożliwiają wykrycie zmian typu mozaiki na bardzo niskim poziomie. Kontaminacja materiału nawet bardzo niewielką ilością materiału pochodzącego od innego pacjenta może przyczynić się do otrzymania fałszywych wyników.

4.6.4. Czas wykonania

- Obecnie nie ma regulacji wskazujących na czas wykonania badania molekularnego w nowotworach dziecięcych. Stąd przyjmuje się, że badanie molekularne niezbędne do postawienia diagnozy powinno być wykonane w jak najkrótszym czasie, uwzględniając złożoność procesu diagnostycznego zależnego od typu badanego nowotworu (~2–4 tygodnie).

- Wyniki badań molekularnych umożliwiających wdrożenie terapii celowanej są rozważane przy braku skuteczności pierwszej linii leczenia, stąd czas na ich wykonanie jest dłuższy (~6–12 tygodni). Oznaczenia markerów germinalnych w nowotworach wieku dziecięcego są wykonywane równolegle do badań markerów somatycznych. Czas wykonania tego typu badań jest również zależny od celu, w jakim mają być wykonane: markery diagnostyczne, prognostyczne i predykcyjne (~2–4 tygodnie), markery predyspozycyjne (~6–24 tygodnie).

4.7. Nowotwory mózgu u dorosłych – glejaki

4.7.1. Epidemiologia, etiologia

- Guzy mózgu są grupą nowotworów stanowiącą 2% zachorowań na nowotwory złośliwe w Polsce.
- Nowotwory mózgu stanowią 3% zgonów nowotworowych dorosłych w Polsce u obu płci.
- Mogą to być nowotwory pierwotne lub przerzutowe (wtórne).
- Według raportu CBTRUS ok. 30,2% wszystkich guzów mózgu to guzy złośliwe, a 69,8% niezłośliwe, co sprawia, że guzy niezłośliwe są ponaddwukrotnie częstsze niż guzy złośliwe.
- Najczęstszymi pierwotnymi niezłośliwymi nowotworami mózgu są oponiaki i stanowią 37,6% wszystkich guzów oraz 53,3% guzów niezłośliwych.
- Glejaki są najczęstszymi złośliwymi nowotworami OUN. Odpowiadają za ok. 80% wszystkich złośliwych guzów OUN i zdecydowaną większość zgonów spowodowanych pierwotnymi guzami mózgu.
- Częstość występowania glejaków u dorosłych waha się od 1,9 do 9,6 na 100 000 w zależności od wieku, płci, pochodzenia etnicznego i położenia geograficznego.

4.7.2. Badane biomarkery w glejakach rozlanych

Piąta edycja Klasyfikacji Nowotworów Ośrodkowego Układu Nerwowego WHO (WHO CNS5) zawiera liczne zmiany molekularne o znaczeniu kliniczno-patologicznym, które są istotne dla najdokładniejszej klasyfikacji nowotworów OUN.

- W tym systemie klasyfikacji podstawowe markery genetyczne dla rozlanych glejaków to mutacja genu *IDH1/2*, kodelecja ramion chromosomów 1p i 19q, mutacja histonu *H3*, stan metylacji promotora *MGMT*, homozygotyczna delecja *CDKN2A/B*, amplifikacja *EGFR*, jednoczesne nabycie chromosomu 7 i utrata chromosomu 10 (7+/10–) i mutacja promotora genu *TERT*.
- Mutacje genów *IDH* w glejakach zlokalizowane są w 2 kluczowych kodonach: 132 w genie *IDH1* oraz 172 w genie *IDH2*. Mutacja *IDH1* p.R132H (c.395G>A, ekson 4 kodon 132) jest zdecydowanie najczęstszą zmianą w genach *IDH* (>80%). Mutacje *IDH* odgrywają kluczową rolę w klasyfikacji glejaków. Zwłaszcza w glejakach rozlanych u dorosłych, gdzie wszystkie typy wymagają oceny *IDH*: skąpodrzewiak (oligodendroglioma, IDH-mutant), gwiaździak (astrocytoma, IDH-mutant), glejak wielopostaciowy (glioblastoma, IDH-wild type). Należy mieć na uwadze, że dostępny test IHC daje możliwość detekcji tylko 1 wariantu mutacji p.R132H. W rzeczywistości możliwych mutacji jest znacznie więcej i powinny być preferowane techniki molekularne dające możliwość wykrycia pełnego spektrum mutacji (szczególnie w przypadkach IHC-negatywnych i niejednoznacznych).

Tab. 4.18. Warianty patogenne genów *IDH1* i *IDH2* zarejestrowane w bazie COSMIC

Gen/kodon	Zmiana DNA	Zmiana aminokwasowa	Nr w bazie COSMIC
IDH1 kodon 132	c.394C>A	p.Arg132Ser	COSM28748
IDH1 kodon 132	c.394C>G	p.Arg132Gly	COSM28749
IDH1 kodon 132	c.394C>T	p.Arg132C	COSM28747
IDH1 kodon 132	c.394_395delinsAT	p. Arg132Ile	COSM6942014
IDH1 kodon 132	c.394_395delinsGT	p. Arg132Val	COSM28751
IDH1 kodon 132	c.394_395delinsTC	p. Arg132Ser	COSM1169216
IDH1 kodon 132	c.395G>A	p. Arg132His	COSM28746
IDH1 kodon 132	c.395G>T	p. Arg132Leu	COSM28750
IDH1 kodon 132	c.395_396inv	p. Arg132His	COSM86993
IDH2 kodon 172	c.514A>G	p. Arg172Gly	COSM33731
IDH2 kodon 172	c.514A>T	p. Arg172Trp	COSM34039
IDH2 kodon 172	c.514_515delinsTT	p. Arg172Leu	COSM7410538
IDH2 kodon 172	c.515G>A	p. Arg172Lys	COSM33733
IDH2 kodon 172	c.515G>C	p. Arg172Thr	COSM1636997
IDH2 kodon 172	c.515G>T	p. Arg172Met	COSM33732
IDH2 kodon 172	c.515_516delinsAA	p. Arg172Lys	COSM5885267
IDH2 kodon 172	c.515_516delinsAT	p. Arg172Asn	COSM256046
IDH2 kodon 172	c.516G>C	p. Arg172Ser	COSM133672
IDH2 kodon 172	c.516G>T	p. Arg172Ser	COSM34090

- Mutacje w genach *IDH1* i *IDH2* są pozytywnymi czynnikami prognostycznymi. W porównaniu z glejakami IDH-wild type pacjenci z glejakami z mutacją *IDH* mają znacznie lepsze rokowanie.
- Kodelecja 1p/19q jest zaburzeniem cytogenetycznym oznaczającym współistniejącą delecję krótkiego ramienia chromosomu 1 (1p) i długiego ramienia chromosomu 19 (19q). Ta cecha stanowi korzystny czynnik prognostyczny związany z lepszym PFS i OS. Zgodnie z aktualną klasyfikacją, aby rozpoznać skąpodrzewiaka, konieczne jest potwierdzenie obecności kodelecji 1p/19q łącznie z mutacją *IDH*.
- Obecność homozygotycznej delecji CDKN2A/B jest markerem najwyższego stopnia złośliwości w grupie rozlanych gwiaździaków z mutacją *IDH*.
- Amplifikacja genu EGFR jest jednym z trzech markerów molekularnych (obok aberracji 7+/10- i mutacji w promotorze *TERT*) warunkujących postawienie diagnozy glejaka o najwyższym stopniu złośliwości w guzach bez mutacji *IDH*, bez względu na obraz histopatologiczny. W dotychczasowych badaniach udowodniono negatywną wartość prognostyczną amplifikacji genu *EGFR*.
- U ok. 70% wszystkich dorosłych glejaków pierwotnych obecna jest mutacja promotora *TERT*. Mutacje promotora *TERT* są istotnie związane z gorszym OS i PFS, szczególnie w glejakach IDH-wild type. Obecność mutacji w promotorze *TERT* w glejakach IDH-wild type jest wskazaniem do rozpoznania *glioblastoma* IDH-wild type.
- Aberracja 7+/10- jest negatywnym czynnikiem rokowniczym w glejakach. Rozlane glejaki bez mutacji *IDH* niespełniające kryteriów morfologicznych dla glejaka wielopostaciowego, ale posiadające cechę 7+/10-, mają przebieg kliniczny podobny do jednoznacznego morfologicznie glejaka wielopostaciowego i należy je obecnie klasyfikować jako glioblastoma IDH-wild type. Zgodnie z aktualną klasyfikacją WHO cecha

7+/10- dotyczy jedynie zaburzenia liczby całych chromosomów. Należy mieć na uwadze, że możliwa jest również rzadziej występująca częściowa utrata chromosomu 10 (szczególnie 10q), która związana jest również ze złym rokowaniem.

- U młodych dorosłych w przypadku glejaka rozlanego bez mutacji *IDH* zlokalizowanego w linii środkowej (*midline*) lub półkulach mózgu należy rozważyć dodatkową analizę mutacji genów histonu H3: *H3-3A* (dawniej *H3F3A*), *H3C2* (dawniej *HIST1H3B*), *H3C3* (dawniej *HIST1H3BC*) jako element poszerzonej diagnostyki różnicowej glejaka wielopostaciowego (*glioblastoma*, IDH-wt). Mutacje w tych genach zlokalizowane są w jednym z dwóch kluczowych kodonów p.Lys28 lub p.Gly35 (wg starszego nazewnictwa niekompatybilnego z nomenklaturą HGVS są to odpowiednio pozycje Lys27 i Gly34). Mutacje występują głównie w genie *H3-3A*, ale odnotowano również rzadziej występujące przypadki z mutacją genu *H3C2* lub *H3C3*. Aktualna klasyfikacja WHO wymienia dwa rozpoznania zależne od mutacji histonu H3: rozlany glejak linii środkowej ze zmianą H3 K27 (*diffuse midline glioma*, H3 K27-altered), rozlany glejak półkul z mutacją H3 G34 (*diffuse hemispheric glioma*, H3 G34-mutant). Oba rozpoznania zaliczane są do rozlanych glejaków typu pediatrycznego o wysokim stopniu złośliwości.
- Metylacja promotora genu *MGMT* ma znaczenie prognostyczne. Poziom ekspresji *MGMT* w glejakach może wpływać na odpowiedź na leki alkilujące. Metylacja promotora reguluje ekspresję *MGMT* poprzez epigenetyczne wyciszanie genu. Pacjenci z metylacją promotora *MGMT* odnoszą korzyść z temozolomidu (TMZ), podczas gdy pacjenci bez metylacji nie.

4.7.3. Diagnostyka różnicowa gwiaździaka (*astrocytoma* IDH-mutant) i glejaka wielopostaciowego (*glioblastoma* IDH-wt)

- Według CNS5 WHO 2021 klasyfikacja gwiaździaka powinna opierać się na podstawie oceny histopatologicznej, jak i analizie biomarkerów genetycznych. Obecnie warunkiem koniecznym do rozpoznania gwiaździaka jest mutacja genu *IDH1* lub *IDH2* oraz stwierdzenie utraty ekspresji ATRX testem immunohistochemicznym lub obecności mutacji genu *ATRX* testem molekularnym lub wykluczenie kodelecji 1p/19q. Należy zachować szczególną ostrożność w interpretacji odczynów negatywnych ATRX IHC w sytuacji braku ekspresji w wewnętrznej kontroli pozytywnej (np. śródbłonek) i rozważyć weryfikację wyniku testem molekularnym.
- Homozygotyczna delecja *CDKN2A/B* w gwiaździakach z mutacją *IDH* jest markerem najwyższego stopnia złośliwości.
- W rozlanych glejakach astrocytarnych bez mutacji *IDH* obecność jednego lub więcej z trzech parametrów genetycznych (amplifikacja genu *EGFR*, warianty patogenne promotora *TERT* [SNV] lub połączenie nabycia chromosomu 7 i utraty chromosomu 10 [7+/10-]) zobowiązują do zaklasyfikowania guza jako glejaka wielopostaciowego stopień 4 (*glioblastoma* IDH-wt).

Tab. 4.19. Podsumowanie cech molekularnych glejaków rozlanych u dorosłych (na podstawie 5 klasyfikacji WHO)

Rozpoznanie	Cechy charakterystyczne
Skąpodrzewiak (WHO: oligodendroglioma, IDH-mutant)	• obecność mutacji genu *IDH1* lub *IDH2* i • obecność kodelecji 1p/19q
Gwiaździak (WHO: astrocytoma, IDH-mutant)	• obecność mutacji genu *IDH1* lub *IDH2* i • obecność utraty ekspresji ATRX (IHC) lub obecna mutacja genu *ATRX* lub • wykluczona kodelecja 1p/19q • często występujące mutacje TP53 (nie są warunkiem koniecznym do postawienia rozpoznania)
Glejak wielopostaciowy (WHO: glioblastoma, IDH-wild type)	• brak mutacji genu *IDH1* i *IDH2* oraz • brak mutacji histonu H3 (*H3-3A*, *H3C2*, *H3C3*) oraz co najmniej jedna z poniższych cech: - martwica - proliferacja naczyń - mutacja promotora genu *TERT* - amplifikacja genu *EGFR* - aberracja 7+/10-

4.7.4. Algorytm diagnostyczny rozlanych glejaków

Strategie diagnostyczne rozlanych glejaków

1. Jednoczasowa analiza mutacji wielogenowym testem NGS oraz zaburzeń cytogenetycznych w analizie CNV. Test powinien obejmować co najmniej analizę prostych mutacji (SNV, indel): *ATRX*, *IDH1*, *IDH2*, *H3-3A*, *H3C2*, *H3C3*, *TP53*, promotor *TERT* oraz analizę CNV: delecja *CDKN2A/B*, amplifikacja *EGFR*, chromosom 1, 7, 10, 19 – z pokryciem sekwencji wystarczającym do detekcji kodelecji 1p/19q, trisomii 7, monosomii 10.
2. Jednoczasowa analiza mutacji wielogenowym testem NGS bez analizy CNV oraz analiza zaburzeń cytogenetycznych innymi metodami (FISH, MLPA). Test powinien obejmować co najmniej analizę prostych mutacji (SNV, indel): *ATRX*, *IDH1*, *IDH2*, *H3-3A*, *H3C2*, *H3C3*, *TP53*, promotor *TERT*. Obecne mutacje *ATRX* i *IDH1/2* są wystarczające do postawienia rozpoznania gwiaździaka (*astrocytoma*, IDH-mutant). W przypadku, gdy nie ma dostępu do mikromacierzy całogenomowych, test FISH CDKN2A/B może być pomocny do potwierdzenia lub wykluczenia gwiaździaka o 4 stopniu złośliwości. W przypadku obecnej mutacji IDH1/2 i braku zaburzeń ATRX wskazane jest badanie kodelecji 1p/19q w celu potwierdzenia lub wykluczenia rozpoznania skąpodrzewiaka (WHO: *oligodendroglioma*, IDH-mutant). Brak mutacji genów IDH1/2 oraz obecna mutacja promotora TERT będą wystarczające do postawienia rozpoznania glejaka wielopostaciowego (*glioblastoma*, IDH-wt). Brak mutacji genów *IDH1/2*, promotora *TERT* oraz histonu H3 przemawia za kontynuacją diagnostyki w kierunku glejaka wielopostaciowego (*glioblastoma*, IDH-wt): analiza cech histologicznych oraz molekularnych: amplifikacja *EGFR*, aberracja 7+/10-.
3. Niezależna analiza genów i chromosomów pojedynczymi testami. Diagnostykę różnicową należy rozpocząć od analizy mutacji *IDH1/2* (zalecane metody: sekwencjonowanie Sangera lub qPCR). Pozytywny wynik *IDH* zawęża diagnostykę różnicową do gwiaździaka i skąpodrzewiaka, w której rozstrzygające może być badanie kodelecji 1p/19q (FISH, MLPA). W przypadku gwiaździaka należy rozważyć badanie delecji *CDKN2A/B* (FISH, MLPA) w celu ustalenia stopnia złośliwości wg WHO. Negatywny wynik *IDH* oraz brak histologicznych cech stopnia 4 WHO (martwica i/lub proliferacja naczyń) wymagają kontynuacji diagnostyki molekularnej w kierunku glejaka wielopostaciowego (*glioblastoma*, IDH-wt): badanie mutacji promotora genu *TERT* (sekwencjonowanie Sangera), amplifikacja *EGFR* (FISH), aberracja 7+/10- (MLPA lub mikromacierze całogenomowe lub FISH).

4.7.5. Inne pierwotne nowotwory ośrodkowego układu nerwowego pochodzenia glejowego diagnozowane z zastosowaniem technik molekularnych

Tab. 4.20. Charakterystyczne cechy molekularne innych nowotworów gleju u dorosłych (na podstawie 5 klasyfikacji WHO)

Typ nowotworu (WHO)		Charakterystyczne cechy molekularne
Ograniczony glejak astrocytarny (*circumscribed astrocytic glioma*)	Niskozróżnicowany gwiaździak z cechami piloidnymi (*high-grade astrocytoma with piloid features*)	• zaburzenia genów szlaku MAPK (fuzje *BRAF*, mutacje *FGFR1*, *NG1*) • homozygotyczna delecja *CDKN2A/2B* lub amplifikacja *CDK4* • mutacja *ATRX* lub utrata jądrowej ekspresji ATRX (ok. 45%)
	Żółtakogwiaździak pleomorficzny (*pleomorphic xanthoastrocytoma*)	• mutacja *BRAF* p.V600E (60–80% przypadków) • homozygotyczna delecja *CDKN2A/2B* • inne zaburzenia w genach związanych ze szlakiem MAPK (*BRAF*, *NTRK1*, *NTRK2*, *NTRK3*, *RAF1*, *NF1*) w przypadku braku mutacji BRAF p.V600E
	Glejak struniakowaty splotu naczyniówkowego (*chordoid glioma*)	• mutacja p.D463H w genie *PRKCA*
Wyściółczak (*ependymoma*)	Wyściółczak nadnamiotowy z fuzją *ZFTA* (*supratentorial ependymoma, ZFTA fusion-positive*)	• obecność genu fuzyjnego z udziałem genu *ZFTA* (niekorzystny czynnik rokowniczy)
	Wyściółczak rdzenia kręgowego z amplifikacją *MYCN* (*spinal ependymoma, MYCN-amplified*)	• amplifikacja genu *MYCN* (niekorzystny czynnik rokowniczy) • może zachodzić konieczność wykluczenia mutacji histonu H3 w diagnostyce różnicowej

4.7.6. Materiał

- Tkanka guza utrwalona w formalinie i zatopiona w parafinie (FFPE) do barwienia histologicznego i immunohistochemicznego jest także materiałem do molekularnych badań genetycznych i cytogenetycznych. Wymagany odsetek komórek nowotworowych w badanym materiale >20%. Materiał powinien zawierać nie mniej niż 100 komórek nowotworowych na jeden preparat FISH.
- Jeśli to możliwe, część tkanki nowotworowej należy poddać kriokonserwacji w celu późniejszej oceny molekularnej wymagającej wysokiej jakości DNA i RNA.

4.7.7. Metody

- Aberracje chromosomowe obserwowane w glejakach można szybko przeanalizować za pomocą techniki FISH dzięki zastosowaniu odpowiednio dobranych sond.
- Zastosowanie przeciwciał monoklonalnych specyficznych dla zmutowanego białka umożliwiło w pierwszych latach diagnostyki w glejakach włączenie IHC do standardowych protokołów przesiewowych jednej mutacji punktowej *IDH1* p.Arg132His. Późniejsze doniesienia wykazały, że mutacje niekanoniczne w genach *IDH1/2* – które nie są wykrywane za pomocą IHC – występują w dużym odsetku (do 80%) w niektórych lokalizacjach glejaków (np. guzy podnamiotowe). Dlatego metodą referencyjną do genetycznej oceny *IDH1/2* jest sekwencjonowanie (metoda Sangera lub NGS) lub qPCR (pod warunkiem zapewnienia detekcji szerokiego zakresu wariantów patogennych). Test MLPA ze względu na ograniczony zakres wykrywalnych wariantów IDH nie jest zalecany.

- qPCR jest najczulszą metodą wykrywania zmian molekularnych, takich jak mutacje punktowe lub małe delecje. Niemniej jednak qPCR jest również często zastępowany przez NGS, ponieważ zwiększa się liczba genów, u których wymagana jest ocena mutacji somatycznych.
- Biorąc pod uwagę obecną klasyfikację WHO z 2021 r., która wymaga analizy wielu zmian genetycznych, praktyka kliniczna diagnostyki glejaka powinna opierać się na wysokoprzepustowych technologiach, takich jak NGS, i być wspomagana odpowiednio metodą FISH lub NGS z dodatkową analizą CNV dla 1p/19q, +7/-10, amplifikacji *EGFR*, delecji *CDKN2A/B*.

4.7.8. Czas wykonania badania molekularnego

- Wynik powinien być uzyskany w jak najkrótszym czasie, który nie powinien przekraczać od momentu otrzymania materiału:
  - 10 dni roboczych dla metody FISH, qPCR, MSP, MLPA oraz sekwencjonowania Sangera,
  - 20 dni roboczych dla metody NGS.

4.8. Rak tarczycy

4.8.1. Epidemiologia, etiologia

- Rak tarczycy (ang. *thyroid carcinoma*) jest najczęstszym nowotworem układu endokrynnego, stanowiącym 1–2% wszystkich nowotworów złośliwych.
- U chorych na raka tarczycy płeć żeńska obserwowana jest prawie czterokrotnie częściej, w szczególności pomiędzy 20. a 50. rokiem życia.
- Rozwój nowotworu w obrębie gruczołu tarczowego jest uwarunkowany działaniem czynników środowiskowych (zróżnicowane i niskozróżnicowane raki tarczycy) oraz podłożem genetycznym (rak rdzeniasty tarczycy).
- Do głównych czynników środowiskowych zwiększających ryzyko wystąpienia choroby zalicza się: ekspozycję na promieniowanie jonizujące oraz dieta uboga w jod.

4.8.2. Predyspozycje genetyczne

- Większość raków zróżnicowanych tarczycy charakteryzuje się obecnością wariantów somatycznych w kodonie p.Val600 w eksonie 15 genu *BRAF* oraz zmian w obszarze promotorowym genu *TERT* (c.250, c.228).
- Ponad 90% przypadków raka rdzeniastego tarczycy jest wynikiem obecności germinalnego wariantu patogennego w protoonkogenie *RET* i stanowi składową zespołu mnogich nowotworów gruczołów wewnątrzwydzielniczych MEN2 (MEN2A lub MEN2B).
- Warianty patogenne protoonkogenu *RET* obserwowane są najczęściej w obrębie siedmiu eksonów: 8, 10, 11, 13, 14, 15 i 16. Wariant eksonu 8 wykrywany jest głównie w populacji greckiej.

Tab. 4.21. Najczęstsze warianty patogenne protoonkogenu *RET* i sposoby postępowania wśród nosicieli według rekomendacji ATA (American Thyroid Association)

Typ mutacji genu *RET* (częstość występowania), %	Postępowanie
MEN2B/Kodon 918 (95)	Tyreoidektomia w 1. roku życia
MEN2A/Kodony: 634, 883 (<5)	Tyreoidektomia przed 5. rokiem życia pod warunkiem systematycznej kontroli poziomu kalcytoniny
MEN2A/Kodony: 512, 533, 609, 611, 618, 620, 621, 666, 768, 790, 791, 804, 891 (<5)	Całkowite wycięcie tarczycy w chwili wzrostu markera biochemicznego kalcytoniny lub w dzieciństwie przy braku zgody rodziców na wydłużenie okresu obserwacyjnego

4.8.3. Typy histologiczne

- 95% nowotworów złośliwych tarczycy wywodzi się z komórek pęcherzykowych. Poszczególne typy histologiczne różnią się między sobą zdarzeniami genetycznymi zachodzącymi podczas rozwoju.
- 3–5% stanowią raki rdzeniaste rozwijające się z komórek okołopęcherzykowych, określanych mianem komórek C.

Tab. 4.22. Typy histologiczne raków zróżnicowanych tarczycy i frekwencja występowania mutacji w genie *BRAF* oraz *TERT*

Typ histologiczny raka	Markery molekularne (częstość występowania), %
NIFTP	• *BRAF* p.Lys601Glu (3–7) (K601E)
Rak brodawkowaty tarczycy	
Wariant klasyczny	• *BRAF* p.Val600Glu (45–50) (V600E)
Wariant pęcherzykowy	• *BRAF* p.Lys601Glu (5) (K601E)
Wariant wysokokomórkowy	• *BRAF* p.Val600Glu (80–100) (V600E) • mutacje promotora *TERT* (22–27)
Rak pęcherzykowy tarczycy	• mutacje promotora *TERT* (10–20)
Rak z komórek Hurtle'a	–
Niskozróżnicowany rak tarczycy	• mutacje promotora *TERT* (40) • *BRAF* p.Val600Glu (10–20) (V600E)
Rak anaplastyczny	• mutacje promotora *TERT* (40–50) • *BRAF* p.Val600Glu (20–40) (V600E)

4.8.4. Terapia celowana

- Postępowanie terapeutyczne w raku tarczycy jest złożone i wielodyscyplinarne (leczenie chirurgiczne, leczenie jodem promieniotwórczym oraz farmakologiczne).
- Zaawansowane, nieoperacyjne oraz oporne na leczenie jodem promieniotwórczym postacie raka zróżnicowanego tarczycy są poddawane leczeniu z wykorzystaniem inhibitorów kinaz tyrozynowych (inhibitory o szerokim spektrum działania blokują np. VEGFR, FGFR, RET).
- Chorzy z rozpoznaniem raka anaplastycznego oraz obecnością wariantu genu *BRAF* p.(Val600Glu) mogą zostać poddani równoległemu leczeniu farmakologicznemu z zastosowaniem inhibitorów BRAF oraz MEK.
- Leczenie zaawansowanych oraz jodoopornych postaci raka brodawkowatego tarczycy opiera się na zastosowaniu terapii celowanej w oparciu o wysoce selektywny inhibitor TRK w przypadku, gdy w próbce tkankowej wykryje się fuzje z udziałem *NTRK1*, *NTRK2* lub *NTRK3*.

- Chorzy z postacią przerzutową raka rdzeniastego tarczycy są leczeni z wykorzystaniem inhibitorów kinaz tyrozynowych (chorzy z wariantami genu *RET* p.(Met918Thr) lepiej odpowiadają na leczenie multikinazowymi inhibitorami białek RET, MET, VEGFR lub białek RET, VEGFR2, EGFR).
- Dla pacjentów z zaawansowanym rakiem rdzeniastym tarczycy z obecnością wariantów genu *RET* (somatyczny lub germinalny) dostępny jest program lekowy w II linii leczenia pacjentów.

4.8.5. Diagnostyka genetyczna

- W przypadku podejrzenia zespołu MEN2A badanie należy wykonać u dzieci pomiędzy 2. a 3. rokiem życia, maksymalnie do momentu ukończenia 5 lat. W rodzinach z zespołem MEN2B badanie przeprowadza się przed ukończeniem 1. roku życia, zwykle najwcześniej, jak jest to możliwe.
- Ze względu na powiązanie genotypu z fenotypem raka rdzeniastego tarczycy wyróżnia się odmienne postępowanie kliniczne w zależności od typu wariantu patogennego genu *RET*.
- Obecnie nie ustalono zasadności wykonywania rutynowych badań przesiewowych w celu oznaczenia mutacji somatycznych w protoonkogenie *RET*. Natomiast ocena wariantu somatycznego genu *RET* ma znaczenie w kwalifikacji do programu lekowego.
- Badanie statusu wariantów somatycznych genu *BRAF* oraz obszarze promotorowym genu *TERT* pozwala na ocenę stratyfikacji ryzyka w oparciu o rekomendacje ATA (Amerykańskie Towarzystwo Tyreologiczne).

4.8.6. Materiał

- Do wykonania badania molekularnego w przypadku raków zróżnicowanych oraz oznaczenia statusu mutacji somatycznych protoonkogenu *RET* wykorzystuje się materiał pooperacyjny w formie skrojonych i niebarwionych skrawków parafinowych. W skrawkach odsetek komórek raka tarczycy wynosi przynajmniej 20%.
- Dla zmian germinalnych materiałem do badań jest krew obwodowa.

4.8.7. Metody

- Badanie statusu wariantów protoonkogenu *RET* przeprowadza się za pomocą sekwencjonowania NGS lub sekwencjonowania Sangera. W przypadku zastosowania NGS zaleca się ocenę pełnej sekwencji genu *RET*.
- Status mutacji p.(Val600Glu) w eksonie 15 genu *BRAF* oraz zmian w obszarze promotorowym genu *TERT* (c.250, c.228) oznaczany jest przy pomocy metody qPCR lub sekwencjonowania Sangera.

4.8.8. Czas wykonania badania molekularnego

- Wynik powinien być uzyskany w jak najkrótszym możliwym czasie, który nie powinien przekraczać od momentu otrzymania materiału:
    - 10 dni roboczych dla metody qPCR oraz sekwencjonowania Sangera,
    - 20 dni roboczych dla metody NGS.

4.9. Rak gruczołu krokowego

4.9.1. Epidemiologia, etiologia

- Rak gruczołu krokowego (ang. *prostate cancer*) jest drugim (po raku płuca) najczęściej występującym nowotworem złośliwym u mężczyzn i stanowi ponad 14% wszystkich zachorowań.
- W Polsce współczynnik zapadalności na raka gruczołu krokowego jest względnie niski w porównaniu z innymi krajami europejskimi, a zgony dotyczą 4000 mężczyzn rocznie.
- W Polsce obserwuje się wzrost zachorowalności na raka gruczołu krokowego od 50. roku życia, natomiast szczyt nowych rozpoznań (75% zachorowań) oraz 90% zgonów dotyczy mężczyzn po 75. roku życia.
- Do głównych czynników ryzyka zalicza się: wiek, otyłość, dietę wysokotłuszczową, narażenie na męskie hormony płciowe (androgeny) oraz predyspozycje dziedziczne.

4.9.2. Predyspozycje genetyczne

- Rak gruczołu krokowego zdiagnozowany u najbliższych krewnych, choroba u trzech lub większej liczby krewnych pierwszej linii lub u dwóch osób w wieku poniżej 55. roku życia.
- Częstość patogennych wariantów germinalnych u chorych będących w zaawansowanym stadium choroby wynosi 11–30%, dotyczą one głównie genów *BRCA1/2*. Natomiast na uwagę zasługują także zmiany w obrębie innych genów zaangażowanych w naprawę DNA: *ATM*, *CDK12*, *FANC2* oraz *RAD51*.
- Nosiciele wariantu dziedzicznego *BRCA2* częściej są diagnozowani w młodszym wieku, mają bardziej agresywny przebieg choroby i o połowę krótszy czas przeżycia w porównaniu z pacjentami bez mutacji. Badania wykazały, że warianty dziedziczne *BRCA1/2* są związane ze złym rokowaniem i gorszą odpowiedzią na leczenie.
- Wytyczne NCCN dotyczące raka gruczołu krokowego zalecają, aby panele testów genetycznych (dziedzicznych i somatycznych) obejmowały geny związane z zespołem Lyncha (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2*) oraz inne geny zaangażowane w naprawę DNA (*BRCA1/2*, *ATM*, *PALB2*, *CHEK2*).
- W zależności od kontekstu klinicznego odpowiednie może być testowanie dodatkowych genów. Na przykład HOXB13 jest genem ryzyka raka prostaty, chociaż obecność wariantów w tym genie nie ma obecnie wyraźnych implikacji terapeutycznych w zaawansowanej chorobie. Testowanie tego genu może mieć jednak zastosowanie w poradnictwie rodzinnym.
- W przypadku wykrycia wariantów w *BRCA1/2*, *ATM*, C*HEK2* lub *PALB2* pacjenci powinni być kierowani do poradni genetycznej w celu oceny możliwości wystąpienia dziedzicznej predyspozycji do raka piersi i jajnika (ang. *hereditary breast and ovarian cancer*, HBOC), zwiększonego ryzyka zachorowania na raka trzustki, jelita grubego i prostaty. W przypadku wykrycia wariantu germinalnego poradnictwem należy objąć krewnych probanta.

Tab. 4.23. Frekwencja mutacji germinalnych i somatycznych u chorych na raka gruczołu krokowego

Gen naprawy uszkodzeń DNA	Mutacje germinalne (częstość), %	Mutacje somatyczne (częstość), %
BRCA1	0,9	1
BRCA2	5,4	6–7
ATM	1,6	3,7–5
CDK12	–	2,8–10
RAD51B	–	3
RAD51D	0,4	2,7
CHEK2	1,9	–

4.9.3. Diagnostyka molekularna

- Ocena profilu molekularnego chorego umożliwia podjęcie decyzji odnośnie do sposobu leczenia, przeprowadzenia diagnostyki w rodzinie oraz pozwala na udział chorego w badaniach klinicznych.
- Znajomość statusu mutacji w genach *BRCA1/2* u chorych na zaawansowaną i oporną na hormonoterapię postać raka prostaty zgodnie z decyzją amerykańskiej Agencji ds. Żywności i Leków (FDA) pozwala na stosowanie PARPi (olaparib), który wpływa na wydłużenie czasu wolnego od progresji choroby i wydłużenie czasu całkowitego przeżycia.

4.9.4. Materiał

- Materiał pooperacyjny w formie skrojonych i niebarwionych skrawków parafinowych lub biopsyjny powinien zawierać przynajmniej 20% komórek nowotworowych. Materiał pooperacyjny (guz pierwotny/przerzut) tkanka utrwalona w formalinie i zatopiona w parafinie (FFPE), biopsja.
- Osocze krwi obwodowej (w przypadku braku materiału tkankowego lub jego niskiej jakości) można wykorzystać do badania genetycznego. Wynik negatywny badania wolnokrążącego DNA (cfDNA) z próbki osocza nie wyklucza obecności wariantu w guzie. Ze względu na klonalną hematopoezę i możliwość wykrywania mutacji pochodzących z limfocytów interpretacja wyników może być błędna (nieprawidłowa kwalifikacja do terapii PARPi). W celu wykluczenia wariantów klonalnej hematopoezy badanie cfDNA powinno dodatkowo obejmować sparowaną kontrolę w postaci analizy mutacji z leukocytów krwi obwodowej (znacznie wyższy koszt badania).
- Badanie wariantów dziedzicznych – krew obwodowa.

4.9.5. Metody

Ze względu na różnorodność wariantów występujących w genach *BRCA1* i *BRCA2* oraz konieczność zbadania pełnych sekwencji eksonowych i na granicach ekson/intron badania wykonuje się metodą NGS.

4.9.6. Czas wykonania badania molekularnego

- Wynik powinien być uzyskany w jak najkrótszym możliwym czasie, który nie powinien przekraczać od momentu otrzymania materiału:
  - 20 dni roboczych dla metody NGS.

4.10. Rak trzustki

4.10.1. Epidemiologia, etiologia

- Rak trzustki (ang. *pancreatic cancer*, PC) to jeden z najbardziej agresywnych nowotworów złośliwych, w którym 5-letnie przeżycie obserwuje się u mniej niż 5% chorych.
- 95% przypadków stanowią gruczolakoraki przewodowe wywodzące się z części zewnątrzwydzielniczej w głowie trzustki, pozostałe rozpoznania to pochodzące z części wewnątrzwydzielniczej, które charakteryzują się lepszym rokowaniem.
- Rak trzustki nieco częściej występuje u mężczyzn, a ponad 80% przypadków raka trzustki rozwija się powyżej 55. roku życia.
- Oprócz płci i wieku główne czynniki ryzyka rozwoju choroby to: palenie tytoniu, nadużywanie alkoholu w konsekwencji prowadzące do rozwoju cukrzycy, dieta bogata w tłuszcz zwierzęcy i czerwone mięso, otyłość brzuszna, przewlekłe zapalenie trzustki oraz predyspozycje genetyczne.

4.10.2. Predyspozycje genetyczne

- Prawie 10% nowych przypadków raka trzustki stanowią chorzy ze stwierdzoną predyspozycją genetyczną. Warianty patogenne takich genów jak: *BRCA2*, *CDKN2A*, *ATM*, *STK11*, *PRSS1/PRSS2*, *SPINK1*, *PALB2* i genów naprawy niesparowanych zasad DNA są powiązane ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia raka trzustki.
- Rodzinne występowanie raka trzustki (choroba u więcej niż trzech krewnych pierwszego stopnia oraz zachorowania poniżej 50. roku życia) ponad 30-krotnie zwiększa ryzyko wystąpienia choroby.
- Rodzinne postacie gruczolakoraków są związane z występowaniem zespołu Lyncha/HNPCC oraz dziedzicznej predyspozycji do raka piersi i/lub jajnika, które są uwarunkowane wariantami patogennymi w genach *BRCA1* i *BRCA2*.
- Częstość występowania germinalnych wariantów patogennych w genie *BRCA2* wynosi 5–10% przypadków, natomiast w *BRCA1* ok. 1%.
- Inne zespoły rodzinne związane z rakiem trzustki to: dziedziczna predyspozycja do zapalenie trzustki, zespół Peutza-Jeghersa, ataksja-teleangiektazja, rodzinny atypowy czerniak mnogi (FAMMM – *familial atypical multiple mole melanoma*) i zespół Li–Fraumeni.

4.10.3. Diagnostyka molekularna

- Obecność germinalnych wariantów patogennych w genach *BRCA1/2* u chorych z zaawansowaną i nieoperacyjną postacią raka trzustki pozwala na zastosowanie inhibitorów PARP, co daje korzyści w postaci wydłużenia przeżycia wolnego od progresji.
- Fuzje genów NTRK (*NTRK1*, *NTRK2*, *NTRK3*) (możliwość zastosowania inhibitorów TRK).

4.10.4. Materiał

- Materiał pooperacyjny (guz pierwotny/przerzut) – tkanka utrwalona w formalinie i zatopiona w parafinie (FFPE), biopsja. Odsetek komórek raka powinien wynosić minimum 20%.
- Badanie wariantów dziedzicznych – krew obwodowa.

4.10.5. Metody

- Ze względu na różnorodność mutacji występujących w genach *BRCA1* i *BRCA2* oraz konieczność zbadania pełnych sekwencji eksonowych oraz na granicach ekson/intron badanie wariantów typu SNV wykonuje się w oparciu o sekwencjonowanie NGS z zastosowaniem paneli.
- Sekwencjonowanie nowej generacji – badanie fuzji *NTRK* (z użyciem RNA nowotworowego) umożliwia identyfikację partnerów fuzyjnych oraz punktów złamań.
- RT-PCR – badanie fuzji *NTRK* (określenie partnera jest możliwe, jeśli jest on znany).
- FISH – badanie fuzji *NTRK* (dla sond 3'/5' dla genu *NTRK* bez określenia partnera, określenie partnera jest technicznie możliwe, jeśli jest on znany).
- IHC (NTRK) – badanie fuzji *NTRK* (bez określenia partnera), wymaga potwierdzenia NGS.

4.10.6. Czas wykonania badania molekularnego

- Wynik powinien być uzyskany w jak najkrótszym możliwym czasie, który nie powinien przekraczać od momentu otrzymania materiału:
  - 10 dni roboczych dla metody FISH, RT-PCR oraz sekwencjonowania metodą Sangera,
  - 20 dni roboczych dla metody NGS.

4.11. Nowotwór podścieliskowy przewodu pokarmowego (GIST)

4.11.1. Epidemiologia, etiologia

- Nowotwór podścieliskowy przewodu pokarmowego GIST (ang. *gastrointestinal stromal tumor*) jest najczęstszym pierwotnym nowotworem mezenchymalnym przewodu pokarmowego. Komórki nowotworu wykazują różnicowanie w kierunku śródmiąższowych komórek Cajala.
- Cechami charakterystycznymi są ekspresja antygenów CD117 (KIT) i DOG1 oraz mutacje genów *KIT* i *PDGFRA* (ok. 85–90% przypadków).
- Częstość występowania szacuje się na 1,1–1,5 nowych przypadków/100 000 osób na rok. Szczyt zachorowalności przypada w siódmej dekadzie życia (mediana wieku 60–65 lat) z porównywalną częstością u obu płci.
- Najczęstszą lokalizacją jest żołądek (ok. 54%), w dalszej kolejności jelito cienkie (30%), okrężnica i odbytnica (5%), przełyk (1%). Około 10% GIST rozpoznawanych jest w stadium rozsiewu w jamie otrzewnej.
- Pediatryczne przypadki GIST są rzadkie i związane głównie z mutacjami genów kodujących podjednostki dehydrogenazy bursztynianowej (*SDHA*, *SDHB*, *SDHC*, *SDHD*) lub metylacją promotora genu *SDHC*, częściej występują u płci żeńskiej, a najczęstszą lokalizacją jest żołądek.

Tab. 4.24. Lokalizacja GIST

Lokalizacja	Częstość
Przełyk (C15)	1%
Żołądek (C16)	54%
Jelito cienkie (C17)	30%
Okrężnica i odbytnica (C18/C20)	5%
Przestrzeń zaotrzewnowa i otrzewnowa (C48)	10%

4.11.2. Patologia molekularna GIST

Cechą charakterystyczną nowotworów podścieliskowych przewodu pokarmowego jest obecność mutacji genu *KIT* lub *PDGFRA* występujących w ok. 85–90% przypadków. Mutacje *KIT* i *PDGFRA* wzajemnie się wykluczają, mają charakter aktywujący i zlokalizowane są w kluczowych dla aktywności receptora domenach:

Lokalizacja mutacji w genie *KIT*:
- ekson 9 (domena zewnątrzbłonowa odpowiedzialna za wiązanie ligandu),
- ekson 11 (domena przybłonowa odpowiedzialna za autoinhibicję wolnego receptora),
- ekson 13 (domena kinazy tyrozynowej),
- ekson 17 (domena kinazy tyrozynowej).

Lokalizacja mutacji w genie *PDGFRA*:
- ekson 12 (domena przybłonowa odpowiedzialna za autoinhibicję wolnego receptora),
- ekson 14 (domena kinazy tyrozynowej),
- ekson 18 (domena kinazy tyrozynowej).

Mutacje zlokalizowane w eksonie 8 genu *KIT* są bardzo rzadkie (0,1–0,2%) i nieuwzględniane w testach diagnostycznych.

Najważniejsze cechy GIST z mutacją genu *KIT*:
- najczęściej komórki nowotworu o wrzecionowatej morfologii,
- związane z wrażliwością na TKI, ograniczona wrażliwość w przypadku mutacji zlokalizowanych w eksonie 9,
- guzy z mutacją w eksonie 9 są zwykle zlokalizowane w jelicie cienkim,
- nowotwory z delecją obejmującą kodony 557 i 558 wykazują agresywny fenotyp i niekorzystne rokowanie.

Najważniejsze cechy GIST z mutacją genu *PDGFRA*:
- obecny komponent o epitelioidnej morfologii komórki nowotworowej,
- mogą być CD117-negatywne,
- zlokalizowane głównie w żołądku,
- związane z wrażliwością na TKI, pierwotna oporność w przypadku mutacji p.Asp842Val,
- mniejsze ryzyko przerzutów w porównaniu z mutacją KIT.

Nowotwory podścieliskowe przewodu pokarmowego *KIT* i *PDGFRA*-negatywne stanowią heterogenną grupę nowotworów. Część z nich charakteryzuje dysfunkcja dehydrogenazy bursztynianowej związana z mutacją (zwykle germinalną) jednego z genów kodujących podjednostki enzymu (*SDHA*, *SDHB*, *SDHC*, *SDHD*) lub epigenetyczną supresją związaną z metylacją promotora genu (zwykle *SDHC*). Wśród nowotworów z zachowaną funkcją dehydrogenazy bursztynianowej opisano dotychczas przypadki mutacji p.Val600Glu genu *BRAF* oraz rearanżacje genów *BRAF*, F*GFR1*, *NTRK1*, *NTRK3*.

Nowotwór podścieliskowy przewodu pokarmowego może być związany z zespołem predysponującym do rozwoju nowotworów:

- Zespół Carneya-Stratakisa

  Cechą charakterystyczną zespołu jest występowanie przyzwojaków i GIST. Zespół Carneya-Stratakisa ma charakter dziedzicznej predyspozycji i związany jest z mutacją jednego z genów kodujących podjednostkę dehydrogenazy bursztynianowej *SDHA*, *SDHB*, *SDHC* lub *SDHD.*
- Triada Carneya

  Zespół charakteryzujący się występowaniem nowotworów podścieliskowych żołądka, chrzęstniaka płucnego (chondroma płuc), pozanadnerczowego przyzwojaka (paraganglioma). Triada Carneya nie ma dziedzicznej predyspozycji. Charakterystycznym zaburzeniem epigenetycznym w nowotworze jest metylacja promotora genu *SDHC*.
- Nurofibromatoza typu I

  Zwiększone ryzyko wystąpienia nowotworów podścieliska przewodu pokarmowego obserwuje się u pacjentów z nerwiakowłókniakowatością typu I obciążonych germinalną mutacją genu *NF1*. Nowotwory podścieliska przewodu pokarmowego u tych pacjentów są zwykle indolentne.
- Rodzinny GIST

  Rodzinna agregacja nowotworów podścieliska przewodu pokarmowego może być związana z germinalną mutacją genu *KIT* lub *PDGFRA*. Dotychczas opisano w literaturze przypadki germinalnych patogennych wariantów zlokalizowanych w eksonach 8, 11, 13, 17 *KIT* oraz 12, 18 *PDGRA* odpowiedzialnych za rodzinne występowanie choroby.

Tab. 4.25. Mutacje genów *KIT* i *PDGFRA*

Lokalizacja mutacji	Mutacje
Mutacje genu *KIT* (ok. 75–80% przypadków GIST)	
Ekson 9 genu *KIT*	• ok. 4–6% GIST
	• >100 wariantów zarejestrowanych w bazie COSMIC • głównie duplikacje i insercje in-frame obejmujące kodony 502 i 503 związane z ograniczoną wrażliwością na TKI • mutacje punktowe
Ekson 11 genu *KIT*	• ok. 68–72% GIST • >800 wariantów zarejestrowanych w bazie COSMIC • mutacje punktowe zlokalizowane głównie między kodonami 553 i 572 • delecje in-frame, w tym delecje obejmujące fragment intronu 10 zlokalizowane głównie między kodonami 550 i 560 • insercje i duplikacje in-frame lokalizowane głównie między kodonami 572 i 592
Ekson 13 genu *KIT*	• 1–2% GIST • głównie mutacje punktowe, najczęściej w kodonie 642
Ekson 17 genu *KIT*	• <1% GIST • głównie mutacje punktowe, najczęściej w kodonie 822
Mutacje genu *PDGFRA* (ok. 10% przypadków GIST)	
Ekson 12 genu *PDGFRA*	• 1% GIST • głównie mutacje punktowe, najczęściej w kodonie 561
Ekson 14 genu *PDGFRA*	• <1% GIST • głównie mutacje punktowe, najczęściej w kodonie 659
Ekson 18 genu *PDGFRA*	• 7–8% GIST • mutacja p.D842V związana z pierwotną opornością na TKI, rzadko inne mutacje punktowe • delecje in-frame obejmujące kodony 842–847

Tab. 4.26. Patologia molekularna GIST z prawidłowym statusem genów *KIT* i *PDGFRA* (*wild-type*)

Gen	Zaburzenia molekularne
GIST z upośledzeniem funkcji dehydrogenazy bursztynianowej (*SDH-deficient*)	
• *SDHA* • *SDHB* • *SDHC* • *SDHD*	• mutacje w genach *SDH* kodujących podjednostki dehydrogenazy bursztynianowej • metylacja promotora genu *SDHC*
GIST z prawidłową aktywnością dehydrogenazy bursztynianowej (*SDH-competent*)	
• *NF1*	• mutacje związane z neurofibromatozą typu I
• *BRAF*	• pierwotna mutacja p.Val600Glu • geny fuzyjne z udziałem genu *BRAF*
• *FGFR1*	• geny fuzyjne z udziałem genu *FGFR1*
• *NTRK1* • *NTRK3*	• geny fuzyjne z udziałem genów *NTRK*, głównie *NTRK3*

4.11.3. Diagnostyka molekularna

Zakres badania czynników predykcyjnych do leczenia imatynibem:

- Gen *KIT* – cała sekwencja kodująca w eksonach 9, 11, 13, 17 (ze szczególnym uwzględnieniem sekwencji intronu 10 flankującej ekson 11),
- Gen *PDGFRA* – cała sekwencja kodująca w eksonach 12, 14, 18.

Ze względu na różnorodność mutacji występujących w genach *KIT* i *PDGRA* zalecane są techniki sekwencjonowania (sekwencjonowanie Sangera, NGS) dające możliwość zbadania pełnej sekwencji eksonów 9, 11, 13, 17 genu *KIT* oraz 12, 14, 18 genu *PDGFRA*.

W przypadku GIST bez mutacji *KIT* i *PDGFRA* miejscowo zaawansowanych lub przerzutowych oraz niemających zadowalających opcji leczenia należy wykonać badanie rearanżacji genów *NTRK1*, *NTRK2*, *NTRK3* techniką NGS będących czynnikami predykcyjnymi dla inhibitorów kinaz TRK.

4.11.4 Materiał

- Do wykonania badania molekularnego wykorzystuje się krew obwodową lub materiał pooperacyjny w formie skrojonych i niebarwionych skrawków parafinowych (FFPE). Wyboru najbardziej reprezentatywnego fragmentu do badania molekularnego dokonuje patomorfolog. Liczba skrawków powinna zostać ustalona w wewnętrznych procedurach walidacyjnych dla metody diagnostycznej. W skrawkach odsetek komórek raka piersi wynosi przynajmniej 20%.

4.11.5. Czas wykonania badania

Zaawansowany nieoperacyjny GIST lub w stadium rozsiewu:

- Wynik powinien być uzyskany w jak najkrótszym możliwym czasie, który nie powinien przekraczać:
  - 10 dni roboczych dla metody sekwencjonowania Sangera,
  - 20 dni roboczych dla metody NGS.

Guzy poddane resekcji z ryzykiem nawrotu:

- Zgodnie z kryteriami kwalifikacji do leczenia uzupełniającego TKI czas od operacji pierwotnego GIST do wdrożenia leczenia uzupełniającego nie powinien przekroczyć 4 miesięcy. Diagnostyka mutacji *KIT* i *PDGFRA* powinna być wykonana w czasie pozwalającym na rozpoczęcie leczenia.

- Wynik powinien być gotowy w jak najkrótszym możliwym czasie, który nie powinien przekraczać od momentu otrzymania materiału:
  - 10 dni roboczych dla metody sekwencjonowania Sangera,
  - 20 dni roboczych dla metody NGS.

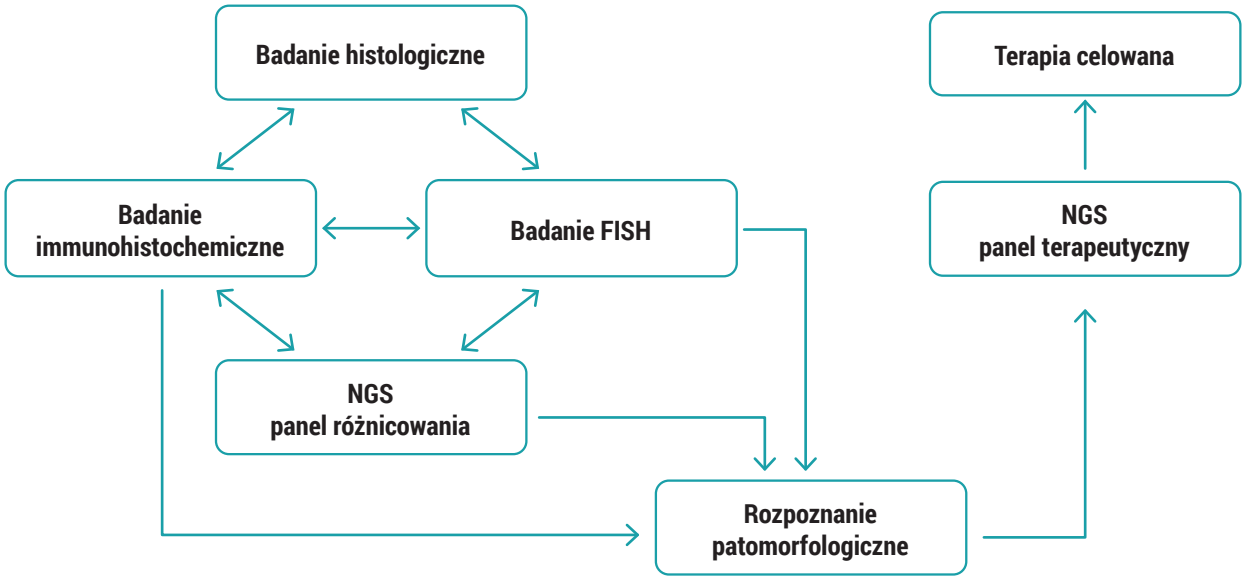
4.12. Mięsaki

4.12.1. Biologia, epidemiologia

- Mięsaki (ang. *sarcomas*) to grupa rzadkich, heterogennych i agresywnych nowotworów o wysokim stopniu śmiertelności. To grupa nowotworów mezenchymalnych, obejmująca ok. 100 unikalnych podtypów histologicznych.
- Ze względu na tak dużą różnorodność można podzielić je na mięsaki tkanek miękkich i kości. Guzy tkanek miękkich i kości to nie tylko zmiany agresywne (mięsaki), ale również nowotwory łagodne.
- Podział mięsaków dokonany jest również ze względu na wiek pacjentów, klasyfikację miejsca występowania i zróżnicowania stopnia złośliwości. Stanowią one 15–21% wszystkich nowotworów wieku dziecięcego i ok. 1% wszystkich nowotworów złośliwych występujących u dorosłych.
- Patogeneza wielu grup nowotworów tkanek miękkich jest słabo poznana, przez co diagnostyka mięsaków stanowi duże wyzwanie dla patomorfologa stawiającego rozpoznanie, diagnosty laboratoryjnego wykonującego badanie genetyczne, jak i onkologa klinicznego decydującego o schemacie terapeutycznym.
- Mięsaki scharakteryzowane są w liczne podtypy, z których każdy ma inną biologię i przebieg kliniczny. Najnowsza klasyfikacja WHO 2020 wskazuje na coraz większą rolę biologii molekularnej w prawidłowym podziale tych nowotworów, w tym stanowi podstawę definicji części jednostek.
- Ocena morfologiczna w badaniu histologicznym odgrywa podstawową rolę w diagnostyce nowotworów tkanek miękkich i kości. Do postawienia definitywnego rozpoznania konieczny jest zespół interdyscyplinarny oraz odpowiedni dobór narzędzi biologii molekularnej.

Pomocnym narzędziem dla diagnostyki nowotworów tkanek miękkich i kości jest wypracowany schemat diagnostyczny, który wprowadza kolejno etapy postępowania.

Ryc. 4.8. Etapy postępowania w diagnostyce nowotworów tkanek miękkich i kości



1. Na podstawie obrazu morfologicznego patomorfolog dokonuje rozpoznania wstępnego. W celu weryfikacji w pierwszej kolejności zleca badania immunohistochemiczne.
2. W przypadku zgodności badania histologicznego z badaniem IHC wykonywane jest jedynie badanie FISH w celu potwierdzenia rozpoznania.
3. Rozbieżne wyniki IHC – FISH, wskazane jest wykonanie badania NGS.
4. Jeśli rozpoznanie wstępne przemawia za rozpoznaniem mięsaka niezróżnicowanego, jednoczasowo wykonuje się badania immunohistochemiczne i genetyczne (NGS).
5. W celu poszukiwania markerów terapeutycznych wykonuje się badania panelem terapeutycznym z użyciem sekwencjonowania następnej generacji.

4.12.2. Badane markery

Sondy FISH, które powinny być wykorzystywane w diagnostyce mięsaków, możemy podzielić na dwie grupy.

- Panel podstawowy powinien zawierać sondy dla genów: *EWSR1*, *SS18*, *FOXO1*, *FUS*, *PDGFB*, *MDM2* (amplifikacja), *USP6*.
- Druga grupa powinna uwzględnić panel z użyciem sond dla genów: *TFE3*, *MAML2*, *YWHAE*, *JAZF1*, *RB1*, *PHF1*, *CAMTA1*, *DDIT3*, *c-MYC* (amplifikacja), *BCOR*.
- W mięsakach tkanek miękkich możemy również identyfikować warianty somatyczne – zmiany punktowe, małe delecje/insercje w obrębie jednego genu. Do oceny takich wariantów genetycznych najczęściej stosuje się sekwencjonowanie metodą Sangera, które umożliwia weryfikację obecności istotnych klinicznie zmian genetycznych (np. ocena statusu genów: *H3F3A*, *H3F3B*, *GNAS*, *IDH1*, *IDH2*) oraz pozwala na weryfikację obecności wariantów fuzyjnych wykrytych w technologii NGS.

  Istotne klinicznie zmiany punktowe i małe delecje/insercje w mięsakach:
- mutacje w genach *KIT*, *PDGFRA*, nowotwory desmoidne (mutacje w genach *CTNNB1*, *APC*) (GIST);
- mutacje w genach *H3F3A*, *H3F3B* – w diagnostyce różnicowej guza olbrzymiokomórkowego i chrzęstniakomięsaka (chondrosarcoma);
- mutacje w genach *IDH1/2* w diagnostyce chondrosarcoma;

- mutacje w genie *GNAS* w diagnostyce różnicowej dysplazji włóknistej i śluzaków (zmiany łagodne) z myxofibrosarcoma (nowotwór złośliwy);
- często wykrywane są mutacje w genach *TP53*, *ATRX*, *RB1*, *CDKN2A*, *CDKN2B*, *NF1* w różnych typach mięsaków.

W przypadku analizy fuzji genowych laboratoria genetyczne powinny dysponować technikami FISH oraz NGS w celu wzajemnej weryfikacji.

Najczęściej definiowane zaburzenia genetyczne w mięsakach tkanek miękkich i kości przedstawiono w tab. 4.27.

Tab. 4.27. Fuzje genowe i amplifikacje w nowotworach tkanek miękkich

Typ mięsaka	Fuzje genowe
Tłuszczak *(lipoma)*	*EBF1-LOC204010, HMGA2-CXCR7, HMGA2-EBF1, HMGA2-LHPF, HMGA2-LPP, HMGA2-NFIB, HMGA2-PPAP2B, HMGA2-LPP, LPP-C12orf9*
Tłuszczak zarodkowy *(lipoblastoma)*	*COL1A2-PLAG1, HAS2-PLAG1, PLAG1-RAD51L1, COL3A1-PLAG1*
Chrzęstniak tłuszczakowaty *(chondroid lipoma)*	*C11orf95-MKL2*
Tłuszczakomięsaki *(myxoid/round liposarcoma)*	*FUS-DDIT3, EWSR1-DDIT3*
Naczyniakowłókniak *(soft tissue angiofibroma)*	*AHRR-NCOA2, GTF2I-NCOA2*
Włókniakomięsak guzowaty skóry *(dermatofibrosarcoma protuberans)*	*COL1A1-PDGFB*
Mięsak włókniako-śluzakowaty wysokozróżnicowany *(low-grade fibromyxoid sarcoma)*	*FUS-CREB3L2, FUS-CREB3L1, EWSR1- CREB3L1*
Mięsak śluzowo-zapalny włóknisty *(myxoinflammatory fibroblastic sarcoma)*	*MGEA5-TGFBR3*
Zapalny guz miofibroblastyczny *(inflammatory myofibroblastic tumor)*	*CARS-ALK, SEC31A-ALK, ATIC-ALK, RANBP2-ALK, CLTC-ALK, TPM3-ALK, TPM4-ALK, PPFIBP1-ALK, RREB1-TFE3*
Śluzakowłókniakomięsak *(myxofibrosarcoma)*	*KIAA2026-NUDT11 , CCBL1-ARL1, AFF3-PHF1*
Guz olbrzymiokomórkowy pochewki ścięgnistej *(tenosynovial giant cell tumor)*	*COL6A3-CSF1*
Pericytoma with t(7;12)t(7;12)	*ACTB-GLI1*
Mięsak prążkowanokomórkowy pęcherzykowy *(alveolar rhabdomyosarcoma)*	*PAX3-FOXO1, PAX7-FOXO1,PAX3-FOXO4, PAX3-NCOA1, PAX3-NCOA2,FOXO1-FGFR1*
Mięsak prążkowanokomórkowy wrzecionowatokomórkowy *(spindle cell rhabdomyosarcoma)*	*SRF-NCOA2, TEAD1-NCOA2*
Angiomatoid fibrous histiocytoma	*EWSR1-CREB1, FUS-ATF1, EWSR1-ATF1*
Guz kostniejący włóknisto-śluzowy *(ossifying fibromyxoid tumor)*	*EP400-PHF1, MEAF6-PHF1, ZC3H7B-BCOR*
Myoepithelioma/mixed tumor	*EWSR1-PBX1, EWSR1-POU5F1, EWSR1-ZNF444 EWSR1-KLF17, EWSR1-PBX3, FUS-KLF17, LIFR-PLAG1, SRF-E2F1*
Mięsak jasnokomórkowy *(clear cell sarcoma)*	*EWSR1-ATF1, EWSR1-CREB1, IRX2-TERT*
Mięsak maziówkowy *(synovial sarcoma)*	*SS18-SSX1, SS18-SSX2, SS18-SSX4, SS18L1-SSX1*
Biphenotypic sinonasal sarcoma	*PAX3-MAML3, PAX3-NCOA1, PAX3-FOXO1*
Mięsak pęcherzykowy tkanek miękkich *(alveolar soft part sarcoma)*	*ASPSCR1-TFE3*
Pozakostny śluzakowaty chrzęstniakomięsak *(extraskeletal myxoid chondrosarcoma)*	*EWSR1-NR4A3, TAF15-NR4A3, TFG-NR4A3, TCF12-NR4A3, HSPA8-NR4A3*
Desmoplastyczny guz okrągłokomórkowy *(desmoplastic small round cell tumor)*	*EWSR1-WT1*
Mięsaki okrągłokomórkowe z rearanżacją *(round cell sarcoma with rearrangement)*	*EWSR1-FLI1, EWSR1-ERG, FUS-ERG, EWSR1-ETV1, EWSR1-ETV4, EWSR1-FEV, EWSR1-NFATC2 EWSR1-PATZ1, EWSR1-SMARCA5, EWSR1-POU5F1, EWSR1-SP3, FUS-FEV, CIC-DUX4, CIC-FOXO4, BCOR-CCNB3, FUS-NCATc2*

Typ mięsaka	Fuzje genowe
Nowotwór podścieliskowy przewodu pokarmowego *(gastrointestinal stromal tumor)*	*ETV6-NTRK3*
Perivascular epithelioid cell tumors	*SFPQ-TFE3*
Chrzęstniak tkanek miękkich *(soft tissue chondroma)*	*HMGA2-LPP*
Chrzęstniakomięsak mezenchymalny *(mesenchymal chondrosarcoma)*	*HEY1-NCOA2* *IRFBP2-CDX1*
Epithelioid hemangioma	*ZFP36-FOSB*
Epithelioid hemangioendothelioma	*WWTR1-CAMTA1, YAP1-TFE3*
Pseudomyogenic hemangioendothelioma	*SERPINE1-FOSB*
Naczyniakomięsak *(angiosarcoma)*	*CIC-LEUTX*
Atypical lipomatous tumor	*MDM2 (and/or CDK4)*
Postradiation angiosarcoma of the breast	*MYC (and/or CDK4)*

Dobór panelu NGS do zaawansowanej diagnostyki uzależniony jest od celu badania. Obecnie stosowane są trzy panele genetyczne, w zależności od rozpoznania, trudności diagnostycznych i dostępności terapii.

1. **pierwszy** – ukierunkowany na podstawowe fuzje występujące w mięsakach, służący do różnicowania, który pozwala na wykrywanie fuzji genów związanych z patogenezą mięsaków, zawierający takie geny jak:

Fuzje genowe
ALK; CAMTA1; CCNB3; CIC; EPC1; EWSR1; FOXO1; FUS; GLI1; HMGA2; JAZF1; MEAF6; MKL2; NCOA2; NTRK3; PDGFB; PLAG1; ROS1; SS18; STAT6; TAF15; TCF12; TFE3; TFG; USP6; YWHAE

2. **drugi** – przeznaczony do diagnostyki guzów litych (panel terapeutyczny), w celu poszukiwania punktów uchwytu dla terapii celowanych. Panel powinien pozwalać na identyfikacje znanych i nowych fuzji z udziałem takich genów jak:

Ocena fuzji genowych	Ocena zarówno fuzji, jak i wariantów genetycznych	Ocena mutacji punktowych, małych delecji/insercji i duplikacji
AKT1; AXL; CALCA; CCND1; DDR2; KRT70; KRT20; MET; NTRK1; NTRK2; NTRK3; NRG1 PPARG; PTH; RAF1; SLC5A5; THADA; TTF1	*ALK; BRAF; FGFR1; FGFR2; FGFR3; MAP2K1; ROS1*	*CTNNB1; EGFR; GNAS; HRAS; IDH1; IDH2; KRAS; NRAS; PIK3CA*

3. **trzeci** – rozbudowany panel przeznaczony do badania przypadków sprawiających bardzo duże trudności na etapie oceny histologicznej, umożliwia różnicowanie w obrębie znanych podjednostek, jak również poznanie nowych markerów diagnostycznych, a także ocenę punktów uchwytu terapeutycznego.

Ocena fuzji genowych	*CAMTA1; CIC; CSF1; EPC1; ERG; ESR1; EWSR1; FOS; FOSB; FOXO1; FUS; GLI1; HMGA2; JAZF1; MDM2; MEAF6; MET; MGEA5; MKL2; NCOA1; NCOA2; NR4A3; NUTM1; PAX3; PDGFB; PHF1; PLAG1; PRKCA; PRKCB; PRKCD; RAF1; SS18; STAT6; TAF15; TCF12; TFE3; TFG; USP6; VGLL2; YAP1; YWHAE*
Ocena fuzji i wariantów (mutacji punktowych, małych delecji/insercji, duplikacji i tandemowych powtórzeń)	*ALK; BCOR; BRAF; EGFR; FGFR1, FGFR2, FGFR3, NTRK1; NTRK2; NTRK3; RET; ROS1*
Ocena mutacji punktowych	*CTNNB1; MYOD1*

Wytyczne ESMO z 2018 r. wskazują na konieczność weryfikacji rozpoznania histologicznego, zwłaszcza jeżeli nie było postawione w ośrodku referencyjnym.

4.12.3. Materiał

- Materiałem wyjściowym do analiz genetycznych w mięsakach jest tkanka utrwalona w postaci bloczka parafinowego.
- W pierwszym etapie patomorfolog dokonuje kwalifikacji materiału poprzez ocenę morfologiczną w celu oznaczenia fragmentu nowotworowego w badanym preparacie. Do przeprowadzenia badań genetycznych wybiera się materiał powyżej 20% żywego utkania nowotworowego.
- W przypadków prowadzonej diagnostyki z fragmentów kostnych, jeżeli konieczne jest odwapnienie materiału (dekalcyfikacji), powinno być wykonane jedynie zbuforowanym do pH 7,4 10% roztworem wersenianu (EDTA).

4.12.4. Metody

Metody biologii molekularnej wykorzystywane w diagnostyce nowotworów tkanek miękkich i kości zgodnie z najnowszymi rekomendacjami to: fluorescencyjna hybrydyzacja in situ – FISH, sekwencjonowanie metodą Sangera oraz sekwencjonowanie następnej generacji (NGS). Dobór odpowiedniej metody uwarunkowany jest wstępnym rozpoznaniem patomorfologicznym.

FISH umożliwia w stosunkowo łatwy i szybki sposób ocenę rearanżacji oraz amplifikacji genów, ale pozwala na ocenę jednej zmiany w jednym badaniu.

Najbardziej zaawansowaną techniką do diagnostyki mięsaków jest sekwencjonowanie następnej generacji (NGS), umożliwiające w zależności od zastosowanego panelu jednoczasową detekcję wielu markerów molekularnych oraz wielu klas wariantów genetycznych, tj. zmian punktowych, małych delecji/insercji, amplifikacji, fuzji genowych przy minimalnym wykorzystaniu materiału tkankowego. Powinna opierać się o analizę RNA, co umożliwia sekwencjonowanie wyłącznie regionów kodujących (analiza RNA po procesie wycinania intronów i składania eksonów) i detekcję zaburzeń tego procesu. Ponadto powinna posiadać możliwość wykrywania zarówno znanych, jak i nowych wariantów fuzyjnych i mieć możliwość odróżnienia fuzji genów w transkrypcji w ramce od fuzji poza ramką odczytu (fuzje funkcjonalne i niefunkcjonalne). Podstawowe wady to: duża zależność od jakości RNA, która może być niska z tkanek utrwalonych w parafinie, kosztowny sprzęt, stosunkowo długi czas wykonania badania, metoda pracochłonna wymagająca personelu o wysokich kwalifikacjach z zakresu biologii molekularnej i bioinformatyki.

4.12.5. Czas wykonania badania molekularnego

- Wynik powinien być uzyskany w jak najkrótszym możliwym czasie, który nie powinien przekraczać od momentu otrzymania materiału:
    - 10 dni roboczych dla metody FISH oraz sekwencjonowania Sangera,
    - 20 dni roboczych dla metody NGS.

4.13. Rak piersi

4.13.1. Epidemiologia, etiologia

- Rak piersi (ang. *breast cancer*, BC) stanowi 23% najczęściej występujących nowotworów złośliwych u kobiet i pozostaje drugą po raku płuc przyczyną zgonów.
- Roczne rozpoznania dotyczą 1,5 mln kobiet na całym świecie, z czego w ok. 400 tys. przypadków choroba kończy się zgonem.
- Największą zachorowalność obserwuje się u kobiet w przedziale wiekowym 55–65 lat.
- Rozpoznanie raka piersi opiera się na badaniu klinicznym w połączeniu z badaniami obrazowymi i jest potwierdzone oceną histopatologiczną.
- Oprócz płci, wieku, czynników hormonalnych i reprodukcyjnych oraz stylu życia głównymi czynnikami ryzyka wystąpienia raka piersi są predyspozycje genetyczne.

4.13.2. Predyspozycje genetyczne

- Charakter dziedzicznej predyspozycji dotyczy 5–10% nowotworów piersi.
- Uważa się, że ponad 90% przypadków dziedzicznej predyspozycji do raka piersi u kobiet jest wynikiem obecności wariantów patogennych w genach *BRCA1/2*.
- U mężczyzn posiadających warianty patogenne w genach *BRCA1/2* szacuje się, że ryzyko zachorowania na raka sutka w ciągu całego życia wynosi odpowiednio od 1,2% do ≤8%.
- Podatność genetyczna na zachorowanie może być również związana z mutacjami w innych genach: np. *PALB2*, *CHEK2*, *RAD51*, *BRIP1*, *STK11*, *TP53* i *CDH1*.

4.13.3. Podtypy molekularne

- Identyfikacja podtypów molekularnych raka piersi opiera się na immunohistochemicznej analizie ekspresji receptora estrogenowego, progesteronowego (odpowiednio ER i PR) i HER2. Dodatkowo w wybranych przypadkach za pomocą techniki FISH (fluorescencyjna hybrydyzacja in situ) prowadzona jest ocena amplifikacji genu *HER2-neu*.
- W oparciu o aktualne rekomendacje (panel ekspertów St. Gallen) prowadzona jest immunohistochemiczna ocena indeksu proliferacyjnego (odsetek jąder komórkowych z ekspresją markera proliferacji – Ki-67).
- Na podstawie powyższych analiz wyróżnia się następujące podtypy molekularne warunkujące różne podejście terapeutyczne:

Tab. 4.28. Podtypy molekularne raka piersi i sposoby ich leczenia

Podtyp raka	Cechy	Leczenie
Luminalny A	• silna ekspresja ER/PR • niski indeks proliferacyjny • bez nadekspresji/amplifikacji HER2/*HER2-neu*	• hormonoterapia bez konieczności stosowania chemioterapii
Luminalny HER2+	• ekspresja ER/PR • nadekspresja/amplifikacja HER2/*HER2-neu*	• chemioterapia • anty-HER2 • hormonoterapia
Luminalny B	• niska ekspresja ER/PR • wysoki indeks proliferacyjny	• hormonoterapia • chemioterapia

Podtyp raka	Cechy	Leczenie
HER2+	• bez ekspresji ER, PR • nadekspresja/amplifikacja HER2/*HER2-neu*	• chemioterapia • anty-HER2
Potrójnie ujemny	• bez ekspresji ER, PR • bez ekspresji/amplifikacji HER2/*HER2-neu*	• chemioterapia

4.13.4. Badane markery

- HER2 – nadekspresja receptora HER2 dotyczy ok. 20% inwazyjnych raków piersi. Diagnostyka w raku sutka najczęściej opiera się na badaniu poziomu ekspresji białek, metodami immunohistochemicznymi (IHC) ocenianymi przez patomorfologa. W przypadku niejednoznacznych wyników ekspresji białka HER2 określanych jako (2+) zawsze wymagana jest weryfikacja statusu genu *HER2-neu* – amplifikacja obecna versus brak amplifikacji, z wykorzystaniem metody cytogenetyki molekularnej, jaką jest technika FISH (analiza jest dokonywana przez diagnostę laboratoryjnego).
- Geny *BRCA1* i *BRCA2*. Białko kodowane przez gen *BRCA1* (ang. *BRCA1 DNA repair associated*) uczestniczy w naprawie podwójnych pęknięć DNA na drodze niehomologicznego łączenia końców (NHEJ – ang. *non homologous end joining*) oraz rekombinacji homologicznej (HR – ang. *homologous recombination*). Geny *BRCA1/BRCA2* pełnią rolę markerów zarówno prognostycznych, jak i predykcyjnych. Pacjenci, u których wykryto obecność wariantów patogennych lub prawdopodobnie patogennych, kwalifikowani są do leczenia celowanego z wykorzystaniem PARPi. Dodatkowo obecność wariantów patogennych lub prawdopodobnie patogennych wiąże się z lepszą odpowiedzią na leczenie związkami platyny u pacjentek z potrójnie ujemnym rakiem piersi (TNBC).
- Mutacje w genie *PIK3CA* występują u prawie 40% pacjentek z zaawansowanym rakiem piersi HR+/HER2. U 80% chorych z zaawansowanym rakiem piersi HR+/HER2- obecne są mutacje w kodonach p.Glu542, p.Glu545 w eksonie 10 (starsza numeracja 9) oraz kodonie p.His1047 w eksonie 21 (starsza numeracja 20) genu *PIK3CA* (MANE SELECT: NM_006218.4).

4.13.5. Materiał

- Do wykonania badania molekularnego wykorzystuje się krew obwodową lub materiał pooperacyjny w formie skrojonych i niebarwionych skrawków parafinowych (FFPE). Wyboru najbardziej reprezentatywnego fragmentu do badania molekularnego dokonuje patomorfolog. Ilość skrawków powinna zostać ustalona w wewnętrznych procedurach walidacyjnych dla metody diagnostycznej. W skrawkach odsetek komórek raka piersi powinien wynosić przynajmniej 20%.
- Dla wykonania badania FISH próbkę do badania stanowi utrwalony w formalinie i zatopiony w parafinie materiał tkankowy w postaci bloczka parafinowego (FFPE). Wyboru najbardziej reprezentatywnego fragmentu do badania FISH dokonuje patomorfolog. Wybrany materiał jest skrawany na mikroskopowe szkiełko podstawowe. Jego grubość ustalana jest w wewnętrznych procedurach walidacyjnych dla metody FISH. Może ona wynosić od 4 do 6 µm. Preparat wytypowany do badania FISH powinien umożliwiać analizę co najmniej 100 komórek nowotworowych.

4.13.6. Metody

- Ze względu na różnorodność wariantów pojedynczego nukleotydu (ang. *single nucleotide variants*, SNV) występujących w genach *BRCA1* i *BRCA2* oraz konieczność zbadania pełnych sekwencji eksonowych i na granicach ekson/intron zaleca się wykonywanie badań metodą NGS. W przypadku znanego wariantu patogennego w rodzinie i prowadzenia badań kosegregacyjnych badania wykonywane są w oparciu o sekwencjonowanie metodą Sangera, PCR HRM lub qPCR.
- Analiza zmian liczby kopii (ang. *copy number variations*, CNV) i dużych rearanżacji (LRG – ang. *large genomic rearrangements*) w genach *BRCA1/2* wykonuje się metodą MLPA (multipleksowa amplifikacja sond zależna od ligacji oparta na hybrydyzacji sond oligonukleotydowych i PCR) lub NGS.
- Dla badania w celu kwalifikacji do leczenia PARPi wykorzystuje się krew obwodową i wykonuje się badanie *BRCA1/2* metodą NGS.
- Do badania w celu kwalifikacji do leczenia inhibitorem PI3K diagnostyka molekularna wykonywana jest za pomocą metody qPCR, natomiast z uwagi na przewagę sekwencjonowania NGS oraz różnorodność zmian w genie *PIK3CA* zaleca się stosowanie tej metody. W przypadku testu qPCR wymagane jest zastosowanie testu pokrywającego wszystkie warianty mutacji wymienione w Charakterystyce Produktu Leczniczego.

4.13.7. Czas wykonania badania molekularnego

- Wynik powinien być uzyskany w jak najkrótszym możliwym czasie, który nie powinien przekraczać od momentu otrzymania materiału:
  - 10 dni roboczych dla metody FISH, qPCR, HRM PCR, MLPA oraz sekwencjonowania metodą Sangera,
  - 20 dni roboczych dla NGS.

4.14. Rak żołądka

4.14.1. Epidemiologia

- Nowotwór żołądka (GC – ang. *gastric cancer*) rozpoznaje się co roku u ok. miliona osób na świecie.
- Rak żołądka jest jednym z pięciu najczęstszych nowotworów, zarówno wśród kobiet, jak i mężczyzn.
- Dane z Europy Środkowo-Wschodniej podają, że częstość zachorowań wynosi 3 na 10 tys. dla płci żeńskiej i 17 na 10 tys. dla płci męskiej.

4.14.2. Etiologia i biologia

- Rak żołądka jest diagnozowany głównie u osób starszych, co tłumaczy się długotrwałą ekspozycją na działanie czynników środowiskowych oraz nagromadzeniem się zmian genetycznych w komórkach, ale także u osób poniżej 45. roku życia.
- Zaledwie 10% przypadków dotyczy pacjentów z dodatnim wywiadem rodzinnym w kierunku genetycznych predyspozycji do raka żołądka, dokładny mechanizm powstawania raka żołądka nadal pozostaje niewyjaśniony.
- Niezależnie od wieku pacjenta w momencie rozpoznania, rokowanie dla pacjenta jest niekorzystne.
- Najczęściej nowotwór jest rozpoznawany już w zaawansowanym stadium uniemożliwiającym dokonanie resekcji.

- Przyszłość badań genetycznych w raku żołądka wiąże się z profilowaniem molekularnym, w którym określenie sygnatury molekularnej danego przypadku pozwoliłoby następnie na określenie podtypu rozrostu: podtyp związany z infekcją wirusem EBV (ang. *Epstein-Barr virus*), podtyp związany z niestabilnością molekularną, podtyp stabilny genomowo, podtyp związany z niestabilnością genomową. Innowacyjne podejście stanowi coraz popularniejsze wykorzystanie wolnego krążącego DNA i RNA nowotworowego.

Tab. 4.29. Biomarkery genetyczne w raku żołądka

Biomarker genetyczny	Cel badania
gen *HER2 (ERBB2)*	amplifikacja genu
geny *ERBB2* i *ERBB3*	mutacje somatyczne
gen *PIK3CA*	mutacje somatyczne
gen *EGFR*	mutacje somatyczne
gen *JAK2*	amplifikacja genu
promotor genu *CDKN2A*	status metylacji promotora genowego (hipermetylacja)
genu *MLH1*	status metylacji promotora genowego (hipermetylacja)
gen *TP53*	mutacje somatyczne
geny *CLDN18* i *ARHGAP26*	fuzja genowa – wynik translokacji chromosomowej t(3;5)(q22;q31)
sekwencje mikrosatelitarnego DNA	niestabilność mikrosatelitarna (ang. *microsatellite instability*, MSI)

4.14.3. Biomarkery

- U chorych z rakiem żołądka możliwe jest podanie humanizowanego przeciwciała monoklonalnego anty-HER2. Zastosowanie leku obostrzone jest wykazaniem zwiększonej ekspresji receptora na powierzchni komórek nowotworowych bądź zwiększonej liczby kopii genu *HER2 (ERBB2)* w genomie komórek raka żołądka. Pomimo iż najczęściej dokonuje się oceny ekspresji z wykorzystaniem metody immunohistochemicznej (IHC – ang. *immunohistochemistry*), to uzyskanie wyniku niejednoznacznego (2+) uniemożliwia podanie przeciwciała. W tych przypadkach rozstrzygający jest wynik analizy genetycznej uzyskiwany najczęściej w badaniu techniką cytogenetyki molekularnej – FISH (ang. *fluorescence in situ hybridization*) (analiza dokonywana przez diagnostę laboratoryjnego).

4.14.4. Materiał

- Próbkę do badania stanowi utrwalony w formalinie i zatopiony w parafinie materiał tkankowy w postaci bloczka parafinowego FFPE.
- Wyboru najbardziej reprezentatywnego fragmentu do badania FISH dokonuje patomorfolog.
- Wybrany przez patomorfologa materiał jest skrawany na mikroskopowe szkiełko podstawowe. Jego grubość ustalana jest w wewnętrznych procedurach walidacyjnych dla metody FISH. Może ona wynosić od 4 do 6 µm.
- Preparat wytypowany do badania FISH powinien umożliwiać analizę co najmniej 100 komórek nowotworowych.

4.14.5. Metody

- Przygotowane preparaty do badania FISH po potwierdzeniu zgodności materiału ze zleceniem na badanie genetyczne zostają poddane preparatyce zgodnie z obowiązującą metodologią dla samej techniki FISH i stosowaną sondą CE-IVD do oceny amplifikacji genu *HER2*.

4.14.6. Czas wykonania badania molekularnego

- Wynik powinien być uzyskany w jak najkrótszym możliwym czasie, który nie powinien przekraczać od momentu otrzymania materiału:
  - 10 dni roboczych dla metody FISH.

4.15. Fuzje NTRK jako przykład markerów niezależnych od tkanki pochodzenia nowotworu

4.15.1. Epidemiologia, biologia

- Geny *NTRK1*, *NTRK2* i *NTRK3* kodują kinazy receptora tropomiozyny – odpowiednio TRKA, TRKB i TRKC. Aktywują je ligandy zwane neutrofinami, które są czynnikami wzrostu i stymulują rozwój układu nerwowego. W wyniku fuzji genu *NTRK* dochodzi do ekspresji białek fuzyjnych TRK, które przez swoją aktywność doprowadzają do proliferacji komórek nowotworowych i wzrostu guza.
- Fuzje z udziałem *NTRK1*, *NTRK2* i *NTRK3* są obecne w wielu nowotworach złośliwych o różnej histologii. Zidentyfikowano ≥19 typów nowotworów z fuzją genu *NTRK* występujących u osób dorosłych i u dzieci.
- Szacuje się, że fuzje genów NTRK mogą występować nawet w 1% wszystkich guzów litych. Najczęściej u dorosłych występują w: wydzielniczych rakach ślinianki (42,9–100%), wydzielniczych rakach piersi (66,7–100%), rakach tarczycy (0–35,7%). W wielu pozostałych nowotworach: raku trzustki, GIST, CRC, NDRP, czerniaku, mięsakach, guzach neuroendokrynnych, raku gruczołu krokowego, białaczkach (AML i ALL) rearanżacje *NTRK1/2/3* występują z częstością 0–3%.
- Fuzje stanowią najczęstszy mechanizm onkogennej aktywacji tych receptorowych kinaz tyrozynowych, a także są biomarkerami dla zastosowania drobnocząsteczkowych inhibitorów TRK.
- Biorąc pod uwagę zróżnicowaną częstotliwość występowania fuzji *NTRK1/2/3*, kluczowe znaczenie dla podawania inhibitorów TRK ma opracowanie optymalnych metod wykrywania aktywujących geny fuzji *NTRK1/2/3* w tkance nowotworowej. Jest to więc przykład diagnostyki molekularnego markera, którego występowanie w większości przypadków nie jest determinowane typem nowotworu, a z niską częstością w dużej liczbie różnych nowotworów.
- Zalecenia ESMO wskazują, że w nowotworach, w których fuzje NTRK są bardzo częste, jako technikę potwierdzającą można zastosować FISH, RT-PCR lub panele NGS z użyciem RNA, natomiast w scenariuszu badania niewyselekcjonowanej populacji, w której fuzje *NTRK1/2/3* są rzadkie, należy zastosować NGS w pierwszej linii lub badanie przesiewowe z zastosowaniem immunohistochemii, a następnie NGS dla przypadków pozytywnych.

4.15.2. Materiał

- Do wykonania badania molekularnego wykorzystuje się materiał pooperacyjny w formie skrojonych i niebarwionych skrawków parafinowych. W skrawkach odsetek komórek nowotworowych powinien wynosić przynajmniej 20%.

4.15.3. Metody

- NGS (panel genowy z użyciem RNA).
- RT-PCR.
- FISH.
- IHC (pozytywny wynik wymaga potwierdzenia NGS).

4.15.4. Czas wykonania badania molekularnego

- Wynik powinien być uzyskany w jak najkrótszym możliwym czasie, który nie powinien przekraczać od momentu otrzymania materiału:
    - 10 dni roboczych dla metody FISH, qPCR oraz sekwencjonowania Sangera,
    - 20 dni roboczych dla metody NGS.

BIBLIOGRAFIA

5

2. Regulacje prawne

- Ustawa z dnia 15 września 2022 r. o medycynie laboratoryjnej (Dz.U. 2022 poz. 2280).
- Ustawa z dnia 15 kwietnia 2011 r. o działalności leczniczej (Dz.U. 2011 Nr 112, poz. 654).
- Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 3 marca 2004 r. w sprawie wymagań, jakim powinno odpowiadać medyczne laboratorium diagnostyczne (Dz.U. z 2004 Nr 43, poz. 408 z późn. zm.) – w trakcie aktualizacji, obecnie po konsultacjach społecznych.
- Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 23 marca 2006 r. w sprawie standardów jakości dla medycznych laboratoriów diagnostycznych i mikrobiologicznych (Dz.U. 2006 Nr 61, poz. 435) ze zmianami (Dz.U. 2019 poz. 2065), (Dz.U. 2020 poz. 2042) – w trakcie aktualizacji, obecnie po konsultacjach społecznych.
- Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 26 marca 2019 r. w sprawie szczegółowych wymagań, jakim powinny odpowiadać pomieszczenia i urządzenia podmiotu wykonującego działalność leczniczą (Dz.U. 2019 poz. 595).
- Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 6 kwietnia 2020 r. w sprawie rodzajów, zakresu i wzorów dokumentacji medycznej oraz sposobu jej przetwarzania (Dz.U. 2020 poz. 666) wraz z późniejszymi zmianami.
- Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 18 grudnia 2017 r. w sprawie standardów organizacyjnych opieki zdrowotnej w dziedzinie patomorfologii (Dz.U. 2017 poz. 2435)
- Ustawa z dnia 7 kwietnia 2022 r. o wyrobach medycznych (Dz.U. 2022 poz. 974).
- Ustawa z dnia 10 maja 2018 r. o ochronie danych osobowych (Dz.U. 2018 poz. 1000).
- Norma PN-EN ISO 15189:2023-02 Laboratoria medyczne. Wymagania dotyczące jakości i kompetencji.
- Pieńkowska-Grela B. i in., *Wytyczne dla laboratoriów genetyki nowotworów litych. Rekomendacje.* „Biuletyn Polskiego Towarzystwa Onkologicznego NOWOTWORY" 2016, t. 1, nr 2, 184–189.
- Viana R.V., Wallis C.L. (2011), *Good Clinical Laboratory Practice (GCLP) for Molecular Based Tests Used in Diagnostic Laboratories, Wide Spectra of Quality Control*, dr Isin Akyar (ed.), ISBN: 978-953- 307-683-6, InTech, Available from: http://www.intechopen.com/books/wide-spectra-of-quality-control/goodclinical-laboratory-practice-gclp-for-molecular-based-tests-used-in-diagnostic-laboratories.

3.1. Zlecanie badań molekularnych

- Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 6 kwietnia 2020 r. w sprawie rodzajów, zakresu i wzorów dokumentacji medycznej oraz sposobu jej przetwarzania (Dz.U. 2020 poz. 666) wraz z późniejszymi zmianami.
- Pieńkowska-Grela B. i in., *Wytyczne dla laboratoriów genetyki nowotworów litych. Rekomendacje.* „Biuletyn Polskiego Towarzystwa Onkologicznego NOWOTWORY" 2016, t. 1, nr 2, 184–189.

3.2 Procesy przedanalityczne

- Do H., Dobrovic A., *Sequence artifacts in DNA from formalin-fixed tissues: causes and strategies for minimization.* „Clin Chem." 2015; 61: 64–71. doi: 10.1373/clinchem.2014.223040
- Kim L., Tsao M.S., T*umour tissue sampling for lung cancer management in the era of personalised therapy: what is good enough for molecular testing?* „Eur Respir J." 2014; 44: 1011–22. doi: 10.1183/09031936.00197013
- Lewandowska M.A., Jóźwicki W., Żurawski B., *Ocena patomorfologiczna materiału biologicznego tkankowego oparta jest na modyfikacji metody opisanej w publikacji: „KRAS and BRAF Mutation Analysis in Colorectal Adenocarcinoma Specimens with a Low Percentage of Tumor Cells"*, „Molecular Diagnosis & Therapy" 2013, t. 17, nr 3, s. 193–203.

- Serth J., Kuczyk M.A., Paeslack U., Lichtinghagen R., Jonas U., *Quantitation of DNA extracted after micropreparation of cells from frozen and formalin-fixed tissue sections.* „Am J Pathol." 2000; 156: 1189–96.
- Srinivasan M., Sedmak D., Jewell S., *Effect of fixatives and tissue processing on the content and integrity of nucleic acids.* „Am J Pathol." 2002; 161: 1961–71. doi: 10.1016/S0002-9440(10)64472-0

3.3. Wykonywanie badań, procesy badawcze

- Deans Z.C., Ahn J.W., Carreira I.M., Dequeker E., Henderson M., Lovrecic L., Õunap K., Tabiner M., Treacy R., van Asperen C.J., *Recommendations for reporting results of diagnostic genomic testing.* „Eur J Hum Genet." 2022 Sep;30(9):1011–1016.
- Gulley M.L., Braziel R.M., Halling K.C. et al (2007). *Molecular Pathology Resource Committee, College of American Pathologists. Clinical laboratory reports in molecular pathology.* „Arch Pathol Lab Med.", 131, 852–863.
- Li M.M., *Standards and Guidelines for the Interpretation and Reporting of Sequence Variants in Cancer: A Joint Consensus Recommendation of the Association for Molecular Pathology, American Society of Clinical Oncology, and College of American Pathologists.* „J Mol Diagn." 2017 Jan;19(1):4–23.
- Miller D.T., Lee K., Gordon A.S., Amendola L.M., Adelman K. et. al, *ACMG Secondary Findings Working Group. Recommendations for reporting of secondary findings in clinical exome and genome sequencing, 2021 update: a policy statement of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG).* „Genet Med." 2021 Aug;23(8):1391-1398.

4.1. Rak jelita grubego

- Argilés G., Tabernero J., Labianca R., Hochhauser D., Salazar R., Iveson T., Laurent-Puig P., Quirke P., Yoshino T., Taieb J., Martinelli E., Arnold D.; *ESMO Guidelines Committee, Localised colon cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up.* „Ann Oncol." 2020 Oct;31(10):1291–1305.
- Belardinilli F., Capalbo C., Malapelle U., Pisapia P., Raimondo D., Milanetti E., Yasaman M., Liccardi C., Paci P., Sibilio P., Pepe F., Bonfiglio C., Mezi S., Magri V., Coppa A., Nicolussi A., Gradilone A., Petroni M., Di Giulio S., … Giannini G. (2020). *Clinical Multigene Panel Sequencing Identifies Distinct Mutational Association Patterns in Metastatic Colorectal Cancer.* „Frontiers in Oncology", 10. https://doi.org/10.3389/fonc.2020.00560
- Charakterystyki Produktów Leczniczych zarejestrowane przez Europejską Agencję Leków https://www.ema.europa.eu/en/medicines
- Guedes J.G., Veiga I., Rocha P., Pinto P., Pinto C., Pinheiro M., Peixoto A., Fragoso M., Raimundo A., Ferreira P., Machado M., Sousa N., Lopes P., Araújo A., Macedo J., Alves F., Coutinho C., Henrique R., Santos L.L. & Teixeira M.R. (2013), *High resolution melting analysis of KRAS, BRAF and PIK3CA in KRAS exon 2 wild-type metastatic colorectal cancer.* „BMC Cancer", 13, 169. https://doi.org/10.1186/1471-2407-13-169
- Luchini C., Bibeau F., Ligtenberg M.J.L., Singh N., Nottegar A., Bosse T., Miller R., Riaz N., Douillard J.Y., Andre F., Scarpa A., *ESMO recommendations on microsatellite instability testing for immunotherapy in cancer, and its relationship with PD-1/PD-L1 expression and tumour mutational burden: a systematic review-based approach.* „Ann Oncol." 2019 Aug 1;30(8):1232–1243.
- Luo Q., Chen D., Fan X., Fu X., Ma T. & Chen D. (2020), *KRAS and PIK3CA bi-mutations predict a poor prognosis in colorectal cancer patients: A single-site report.* „Translational Oncology", 13(12). https://doi.org/10.1016/j.tranon.2020.100874
- Potocki P.M., Wójcik P., Chmura Ł., Goc B., Fedewicz M., Bielańska Z., Swadźba J., Konopka K., Kwinta Ł., Wysocki P.J., *Clinical Characterization of Targetable Mutations (BRAF V600E and KRAS G12C) in Advanced Colorectal Cancer-A Nation-Wide Study.* „Int J Mol Sci." 2023 May 22;24(10):9073.
- Tysarowski A., Nasierowska-Guttmejer A., *Quality and practical aspects of pathological and molecular diagnostics in metastatic colorectal cancer (mCRC).* „Contemporary Oncology/Współczesna Onkologia" 2018;22(2):75-85. doi:10.5114/wo.2018.77047
- Tysarowski A., Szumera-Ciećkiewicz A., Marszałek A. i in., *Molecular diagnostics of cancers – practical approach.* „Nowotwory Journal of Oncology" 2023, vol. 73, nr 3, s. 174–186.
- Van Cutsem E., Cervantes A., Adam R., Sobrero A., Van Krieken J.H., Aderka D., Aranda Aguilar E., Bardelli et al, *ESMO consensus guidelines for the management of patients with metastatic colorectal cancer.* „Ann Oncol." 2016 Aug;27(8):1386–422.
- WHO Classification of Tumours Editorial Board. Digestive system tumours. Lyon (France): International Agency for Research on Cancer; 2019. (WHO classification of tumours series, 5th ed.; vol. 1). https://publications.iarc.fr/579

4.2. Czerniak

- Borkowska A., Szumera-Ciećkiewicz A., Spałek M., Teterycz P., Czarnecka A., Kowalik A. & Rutkowski P. (2020), *Mutation profile of primary subungual melanomas in Caucasians.* „Oncotarget", 11(25), 2404–2413. https://doi.org/10.18632/oncotarget.27642
- Davies H., Bignell G.R., Cox C. (2002), *Mutations of the BRAF gene in human cancer.* „Nature", 417, 6892, 949–954.
- Koczkowska M., Zuk M., Gorczynski A., Ratajska M., Lewandowska M., Biernat W., Limon J. & Kozak K., Kowalik A., Gos A., Wasag B., Lugowska I., Jurkowska M., Krawczynska N., Kosela-Paterczyk H., Switaj T., Teterycz P., Klimczak A., Siedlecki J.A., Chlopek M., Kalisz J., Limon J. & Rutkowski P. (2020), C*ell-free DNA BRAF V600E measurements during BRAF inhibitor therapy of metastatic melanoma: Long-term analysis.* „Tumori Journal", 106(3), 241–248. https://doi.org/10.1177/0300891619900928
- Rutkowski P., Gos A., Jurkowska M., Switaj T., Dziewirski W., Zdzienicki M., Ptaszyński K., Michej W., Tysarowski A., Siedlecki J.A. (2014), *Molecular alterations in clinical stage III cutaneous melanoma: Correlation with clinicopathological features and patient outcome.* „Oncol Lett", 8(1), 47–54.
- Rutkowski P., Wysocki P., Kozak K., Nasierowska-Guttmejer A., Jeziorski A., Wysocki W.M., Kalinka E., Świtaj T., Kamińska-Winciorek G., Czarnecka A.M., Koseła-Paterczyk H., Cybulska-Stopa B., Wiśniewski P., Szumera-Ciećkiewicz A., Zdzienicki M., Ziobro M., Fijuth J., Kawecki A., Tysarowski A., Wysocki W.M., Romanowska-Dixon B., Markiewicz A., Dedecjus M., Kubiatowski T., Dolecki K., Tchórzewska-Korba H., Rudnicka L., Owczarek W., Krzakowski M., *Expert recommendations on diagnostic–therapeutic management of melanoma patients.* „Oncology in Clinical Practice" 2022;18:357–392.
- Sepulveda A.R. i wsp., *Molecular Biomarkers for the Evaluation of Colorectal Cancer: Guideline From the American Society for Clinical Pathology, College of American Pathologists, Association for Molecular Pathology, and the American Society of Clinical Oncology* (2017), „J Clin Oncol", 35(13), 1453–1486.
- Sevilla A., Morales M.C., Ezkurra P.A., Rasero J., Velasco V., Cancho-Galan G., Sánchez-Diez A., Mujika K., Penas C., Smith I., Asumendi A., Cortés J.M., Boyano M.D. & Alonso S. (2020), *BRAF V600E mutational load as a prognosis biomarker in malignant melanoma.* „PLOS ONE", 15(3), e0230136. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0230136
- Tysarowski A., Szumera-Ciećkiewicz A., Marszałek A. i in., *Molecular diagnostics of cancers – practical approach.* „Nowotwory Journal of Oncology" 2023, vol. 73, nr 3, s. 174–186.
- Vanni I., Tanda E.T., Spagnolo F., Andreotti V., Bruno W. & Ghiorzo P. (2020), *The Current State of Molecular Testing in the BRAF-Mutated Melanoma Landscape.* „Frontiers in Molecular Biosciences", 7. https://doi.org/10.3389/fmolb.2020.00113

4.3. Rak jajnika

- Capoluongo E., Ellison G., López-Guerrero J.A., Penault-Llorca F., Ligtenberg M.J.L., Banerjee S., Singer C., Friedman E., Markiefka B., Schirmacher P., Büttner R., van Asperen C.J., Ray-Coquard I., Endris V., Kamel-Reid S., Percival N., Bryce J., Röthlisberger B., Soong R., de Castro D.G., *Guidance Statement On BRCA1/2 Tumor Testing in Ovarian Cancer Patients.* „Semin Oncol." 2017 Jun;44(3):187-197. doi: 10.1053/j.seminoncol.2017.08.004. Epub 2017 Sep 15. PMID: 29248130
- Koczkowska M., Krawczynska N., Stukan M., Kuzniacka A., Brozek I., Sniadecki M., Debniak J., Wydra D., Biernat W., Kozlowski P., Limon J., Wasag B. & Ratajska M. (2018), *Spectrum and Prevalence of Pathogenic Variants in Ovarian Cancer Susceptibility Genes in a Group of 333 Patients.* „Cancers", 10(11). https://doi.org/10.3390/cancers10110442
- Kowalik A., Zalewski K., Kopczyński J., Siołek M., Lech M., Hińcza K., Kalisz J., Chrapek M., Zięba S., Furmańczyk J., Jedliński M., Chłopek M., Misiek M. & Góźdź S. (2019), S*omatic mutations in BRCA1&2 in 201 unselected ovarian carcinoma samples – single institution study.* „Polish Journal of Pathology", 70(2), 115–126. https://doi.org/10.5114/pjp.2019.82905
- Ratajska M., Koczkowska M., Żuk M., Gorczyński A., Kuźniacka A., Stukan M., Biernat W., Limon J. & Wasąg B. (2017), *Detection of BRCA1/2 mutations in circulating tumor DNA from patients with ovarian cancer.* „Oncotarget", 8(60), 101325–101332. https://doi.org/10.18632/oncotarget.20722
- Szczerba E., Kamińska K., Mierzwa T., Misiek M., Kowalewski J. & Lewandowska M.A. (2021), *BRCA1/2 Mutation Detection in the Tumor Tissue from Selected Polish Patients with Breast Cancer Using Next Generation Sequencing.* „Genes", 12(4), 519. https://doi.org/10.3390/genes12040519

4.4. Rak endometrium

- Cancer Genome Atlas Research Network et al (2013), *Integrated genomic characterization of endometrial carcinoma.* „Nature", 497(7447), 67–73.

- León-Castillo A. et al (2020), *Interpretation of somatic POLE mutations in endometrial carcinoma.* „J Pathol", 250(3), 323–335.
- Lynch H.T., de la Chapelle A. (2003), *Hereditary colorectal cancer.* „N Engl J Med", 348(10), 919–32.
- Pasanen A., Loukovaara M., Bützow R. (2020), *Clinicopathological significance of deficient DNA mismatch repair and MLH1 promoter methylation in endometrioid endometrial carcinoma.* „Mod Pathol", 33(7), 1443–1452.
- Sznurkowski J.J., Rys J., Kowalik A., Zolciak-Siwinska A., Bodnar L., Chudecka-Glaz A., Blecharz P., Zielinska A., Marszalek A., Bidzinski M., Sawicki W., T*he Polish Society of Gynecological Oncology Guidelines for the Diagnosis and Treatment of Endometrial Carcinoma (2023).* „J Clin Med." 2023 Feb 13;12(4):1480. doi: 10.3390/jcm12041480. PMID: 36836017; PMCID: PMC9959576
- Talhouk A. et al (2015), A *clinically applicable molecular-based classification for endometrial cancers.* „Br J Cancer", 113(2), 299–310.
- Wong A. et al (2016), *Mutation spectrum of POLE and POLD1 mutations in South East Asian women presenting with grade 3 endometrioid endometrial carcinomas.* „Gynecol Oncol", 141(1), 113–20.

4.5. Rak płuca

- Bubendorf L., Büttner R., Al-Dayel F., Dietel M., Elmberger G., Kerr K., López-Ríos F., Marchetti A., Öz B., Pauwels P. & et al (2016), *Testing for ROS1 in non-small cell lung cancer: A review with recommendations*. „Virchows Archiv: An International Journal of Pathology", 469(5), 489–503. https://doi.org/10.1007/s00428-016-2000-3
- Charakterystyki Produktów Leczniczych zarejestrowane przez Europejską Agencję Leków https://www.ema.europa.eu/en/medicines.
- Grenda A., Jarosz B., Krawczyk P., Kucharczyk T., Wojas-Krawczyk K., Reszka K. & et al (2018), D*iscrepancies between ALK protein disruption and occurrence of ALK gene rearrangement in Polish NSCLC patients.* „Journal of Thoracic Disease", 10(8), 4994–5009. https://doi.org/10.21037/jtd.2018.07.28
- Krzakowski M., Jassem J., Antczak A., Blasinska-Przerwa K., Chorostowska-Wynimko J., Dziadziuszko R., Głogowski M., Grodzki T., Kowalski D.M., Krenke R., Langfort R., Olszewski W., Orłowski T., Śliwiński P., Tysarowski A., Rzyman W., Woźniewski M., *Nowotwory klatki piersiowej.* „Onkologia w Praktyce Klinicznej – Edukacja" 2022;8:1–41.
- Lewandowska M.A., Czubak K., Klonowska K., Jozwicki W., Kowalewski J. & Kozlowski P. (2015), *The use of a two-tiered testing strategy for the simultaneous detection of small EGFR mutations and EGFR amplification in lung cancer.* „PLOS ONE", 10(2), e0117983. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117983
- Lewandowska M.A., Jóźwicki W., Jochymski C. & Kowalewski J. (2013), *Application of PCR methods to evaluate EGFR, KRAS and BRAF mutations in a small number of tumor cells in cytological material from lung cancer patients.* „Oncology Reports", 30(3), 1045–1052. https://doi.org/10.3892/or.2013.2579
- Martelli M.P., Sozzi G., Hernandez L., Pettirossi V., Navarro A., Conte D. & et al (2009), *EML4-ALK rearrangement in non-small cell lung cancer and non-tumor lung tissues.* „The American Journal of Pathology", 174(2), 661–670. https://doi.org/10.2353/ajpath.2009.080755
- Planchard D., Popat S., Kerr K. et al, *Metastatic non-small cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up.* CLINICAL PRACTICE GUIDELINES. Updated version published 15 September 2020 by the ESMO Guidelines Committee. https://www.esmo.org/ content/download/347819/6934778/1/ESMO-CPG-mNSCLC-15SEPT2020.pdf dostęp: 12.04.2021 r.
- The IASLC Atlas of ALK and ROS1 Testing in Lung Cancer. https://www.iaslc.org
- Tysarowski A., Szumera-Ciećkiewicz A., Marszałek A. i in., *Molecular diagnostics of cancers – practical approach.* „Nowotwory Journal of Oncology" 2023, vol. 73, nr 3, s. 174–186.
- Wasąg B., Langfort R., Kowalik A., Chorostowska-Wynimko J., Tysarowski A., Dziadziuszko R., Krzakowski M., *Nowe cele molekularne w algorytmie diagnostycznym niedrobnokomórkowego raka płuca (NDRP).* „Onkologia w Praktyce Klinicznej – Edukacja" 2023;9:385–389.

4.5.7. Rak płuca biopsja – płynna

- Bertoli E., De Carlo E., Basile D., Zara D., Stanzione B., Schiappacassi M., Del Conte A., Spina M., Bearz A., *Liquid Biopsy in NSCLC: An Investigation with Multiple Clinical Implications.* „Int J Mol Sci." 2023 Jun 28;24(13):10803. doi: 10.3390/ijms241310803

- Bettegowda C., *Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies*. „Sci Transl Med." 2014 Feb 19;6(224):224ra24.
- Lewandowska M.A., Nalejska E., Żołna Ł., Chrząstek A., Żurawski B., Wiśniewska M., Las-Jankowska M., Roszkowski K. & Kowalewski J. (2019), *Detection of somatic mutations in ctDNA derived from adenocarcinoma patients—EGFR tyrosine kinase inhibitor monitoring preliminary study.* „Contemporary Oncology" (Poznan, Poland), 23(2), 87–91. https://doi.org/10.5114/wo.2019.85879
- Normanno N., Expert Opin Ther Targets. 2017 Feb;21(2):159-165. doi: Targeting the EGFR T790M mutation in non--small-cell lung cancer
- Ntzifa A., Marras T., Georgoulias V., Lianidou E., *Liquid biopsy for the management of NSCLC patients under osimertinib treatment.* „Crit Rev Clin Lab Sci." 2024 Feb 2:1-23.
- Vandekerckhove O., Cuppens K., Pat K., Du Pont B., Froyen G., Maes B., *Liquid Biopsy in Early-Stage Lung Cancer: Current and Future Clinical Applications.* „Cancers (Basel)" 2023 May 10;15(10):2702. doi: 10.3390/cancers15102702

4.6. Nowotwory wieku dziecięcego

- Adamkiewicz-Drożyńska E., Połczyńska K., Stefanowicz J. & Iżycka-Świeszewska E. (2019), *Standardy postępowania diagnostycznego w pozaczaszkowych guzach germinalnych u dzieci.* „Przegląd Pediatryczny" 2019, vol. 48, No. 3, 116–128.
- Ambros P.F., Ambros I.M., Brodeur G.M., Haber M., Khan J., Nakagawara A., Schleiermacher G., Speleman F., Spitz R., London W.B., Cohn S.L., Pearson A.D. & Maris J.M. (2009), *International consensus for neuroblastoma molecular diagnostics: report from the International Neuroblastoma Risk Group (INRG) Biology Committee.* „Br J Cancer", 100, 1471–82.
- Balwierz W., Wieczorek A., Szewczyk K., Śliwińska A., Klepacka T., Drabik G., Szczepański T. & Styczyński J. (2019), *Standardy postępowania diagnostycznego w nerwiaku zarodkowym współczulnym u dzieci.* „Przegląd Pediatryczny" 2019, vol. 48, No. 3/48.
- Balwierz W. & Wieczorek A. (2021), *Nerwiak zarodkowy współczulny* [w:] *Onkologia i hematologia dziecięca* (red. A. Chybicka, K. Sawicz-Birkowska, B. Kazanowska), t. 1. Wydawnictwo Lekarskie PZWL.
- Capper D., Jones D.T.W., Sill M., Hovestadt V., Schrimpf D., Sturm D., Koelsche C. et al (2018), *DNA methylation-based classification of central nervous system tumours*. „Nature", 555, 469–474.
- Casali P.G., Bielack S., Abecassis N., Aro H.T., Bauer S., Biagini R., Bonvalot S., Boukovinas I., Bovee J.V.M. ESMO Guidelines Committee (2018), *Bone sarcomas: ESMO-PaedCan-EURACAN Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up.* „Ann Oncol", 29, iv79-iv95.
- Chen X., Bahrami A., Pappo A., Easton J., Dalton J., Hedlund E., Ellison D., Shurtleff S., Wu G., Wei L., Parker M., Rusch M., Nagahawatte P., Wu J., Mao S., Boggs K., Mulder H., Yergeau D., Lu C., Ding L., Edmonson M., Qu C., Wang J., Li Y., Navid F., Daw N.C., Mardis E.R., Wilson R.K., Downing J.R., Zhang J., Dyer M.A. & S. J. C. s. R. H. W. U. P. C. G. Project (2014), *Recurrent somatic structural variations contribute to tumorigenesis in pediatric osteosarcoma.* „Cell Rep", 7, 104–12.
- Czauderna P., Haeberle B., Hiyama E., Rangaswami A., Krailo M., Maibach R., Rinaldi E., Feng Y., Aronson D., Malogolowkin M., Yoshimura K., Leuschner I., Lopez-Terrada D., Hishiki T., Perilongo G., von Schweinitz D., Schmid I., Watanabe K., Derosa M. & Meyers R. (2016), *The Children's Hepatic tumors International Collaboration (CHIC): Novel global rare tumor database yields new prognostic factors in hepatoblastoma and becomes a research model.* „Eur J Cancer", 52, 92–101.
- Dembowska-Bagińska B., Rutynowska-Pronicka O., Hautz W., Kołodziejczyk A., Cieślik K., Olechowski A., Jurkiewicz E., Grajkowska W., Stepaniuk M. & Trubicka J. (2019), *Standardy postępowania diagnostycznego w siatkówczaku.* „Przegląd Pediatryczny" 2019, vol. 48, No. 3, 80–88.
- Eichenmüller M., Trippel F., Kreuder M., Beck A., Schwarzmayr T., Häberle B., Cairo S., Leuschner I., von Schweinitz D., Strom T.M. & Kappler R. (2014), *The genomic landscape of hepatoblastoma and their progenies with HCC-like features.* „J Hepatol", 61, 1312–20.
- El Beaino M., Roszik J., Livingston J.A., Wang W.L., Lazar A.J., Amini B., Subbiah V., Lewis V.& Conley A.P. (2018), *Mesenchymal Chondrosarcoma: a Review with Emphasis on its Fusion-Driven Biology.* „Curr Oncol Rep", 20, 37.
- Ellison D.W., Aldape K.D., Capper D., Fouladi M., Gilbert M.R., Gilbertson R.J., Hawkins C., Merchant T.E., Pajtler K., *Venneti S.& Louis D.N. (2020), cIMPACT-NOW update 7: advancing the molecular classification of ependymal tumors*. „Brain Pathol", 30, 863–866.
- Ellison D.W., Hawkins C., Jones D.T.W., Onar-Thomas A., Pfister S.M., Reifenberger G. & Louis D.N. (2019), *cIMPACT-NOW update 4: diffuse gliomas characterized by MYB, MYBL1, or FGFR1 alterations or BRAFV600E mutation.* „Acta Neuropathologica", 137, 683–687.

- Fiedorowicz M., Bartnik E., Sobczuk P., Teterycz P. & Czarnecka A.M. (2018), *Molecular biology of sarcoma.* „Oncology in Clinical Practice", 14, 307–330.
- Francis J.H., Richards A.L., Mandelker D.L., Berger M.F., Walsh M.F., Dunkel I.J., Donoghue M.T.A. & Abramson D.H. (2021), *Molecular Changes in Retinoblastoma beyond.* „Cancers (Basel)", 13.
- Godzinski J. (2015), *The current status of treatment of Wilms' tumor as per the SIOP trials.* „J Indian Assoc Pediatr Surg", 20, 16–20.
- Grundy P.E., Breslow N.E., Li S., Perlman E., Beckwith J.B., Ritchey M.L., Shamberger R.C., Haase G.M., D'Angio G.J., Donaldson M., Coppes M.J., Malogolowkin M., Shearer P., Thomas P.R., Macklis R., Tomlinson G., Huff V., Green D.M. & N.W.T.S. Group (2005), *Loss of heterozygosity for chromosomes 1p and 16q is an adverse prognostic factor in favorable-histology Wilms tumor: a report from the National Wilms Tumor Study Group*. „J Clin Oncol", 23, 7312–21.
- Guerreiro Stucklin A.S., Ryall S., Fukuoka K., Zapotocky M., Lassaletta A., Li C., Bridge T., Kim B. et. al (2019), *Alterations in ALK/ROS1/NTRK/MET drive a group of infantile hemispheric gliomas.* „Nat Commun", 10, 4343.
- Hu X., Chen H., Jin M., Wang X., Lee J., Xu W., Zhang R., Li S. & Niu J. (2012), *Molecular cytogenetic characterization of undifferentiated embryonal sarcoma of the liver: a case report and literature review.* „Mol Cytogenet", 5, 26.
- Jünger S.T., Andreiuolo F., Mynarek M., Dörner E., Zur Mühlen A., Rutkowski S., von Bueren A.O. & Pietsch T. (2020), *Ependymomas in infancy: underlying genetic alterations, histological features, and clinical outcome.* „Childs Nerv Syst", 36, 2693–2700.
- Kazanowska B., Węcławek-Tompol J., Klepacka T., Szulc A., Godziński J. (2019), *Standardy postępowania w mięsakach tkanek miękkich.* „Przegląd Pediatryczny" 2019, vol. 48, No 3, 99–108.
- Klamt B., Schulze M., Thäte C., Mares J., Goetz P., Kodet R., Scheulen W., Weirich A., Graf N. & Gessler M. (1998), *Allele loss in Wilms tumors of chromosome arms 11q, 16q, and 22q correlate with clinicopathological parameters.* „Genes Chromosomes Cancer", 22, 287–94.
- Kleinschmidt-DeMasters B.K. & Mulcahy Levy J.M. (2018), *H3 K27M-mutant gliomas in adults vs. children share similar histological features and adverse prognosis.* „Clin Neuropathol", 37 (2018), 53–63.
- Knudson A.G. (1971), *Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma.* „Proc Natl Acad Sci U S A", 68, 820–3.
- Komori T. (2021), *The molecular framework of pediatric-type diffuse gliomas: shifting toward the revision of the WHO classification of tumors of the central nervous system*. „Brain Tumor Pathol", 38, 1–3.
- Lala S.V. & Strubel N. (2019), *Ovarian neoplasms of childhood.* „Pediatr Radiol", 49, 1463–1475.
- London W., Castleberry R., Matthay K., Look A., Seeger R., Shimada H., Thorner P., Brodeur G., Maris J. & Reynolds C. (2005), *Evidence for an age cutoff greater than 365 days for neuroblastoma risk group stratification in the Children's Oncology Group.* „Journal of Clinical Oncology", 23, 6459–6465.
- Louis D.N., Giannini C., Capper D., Paulus W., Figarella-Branger D., Lopes M.B., Batchelor T.T., Cairncross J.G., van den Bent M., Wick W. & Wesseling P. (2018), *cIMPACT-NOW update 2: diagnostic clarifications for diffuse midline glioma, H3 K27M-mutant and diffuse astrocytoma/anaplastic astrocytoma, IDH-mutant.* „Acta Neuropathol", 135, 639–642.
- Louis D.N., Perry A., Wesseling P., Brat D.J., Cree I.A., Figarella-Branger D., Hawkins C., Ng H.K., Pfister S.M., Reifenberger G., Soffietti R., von Deimling A. & Ellison D.W. (2021), *The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary.* „Neuro Oncol", 23, 1231–1251.
- Louis D.N., Wesseling P., Aldape K., Brat D.J., Capper D., Cree I.A., Eberhart C., Figarella-Branger D., Fouladi M., Fuller G.N., Giannini C., Haberler C., Hawkins C., Komori T., Kros J.M., Ng H.K., Orr B.A., Park S.H., Paulus W., Perry A., Pietsch T., Reifenberger G., Rosenblum M., Rous B., Sahm F., Sarkar C., Solomon D.A., Tabori U., van den Bent M.J., von Deimling A., Weller M., White V.A. & Ellison D.W. (2020), *cIMPACT-NOW update 6: new entity and diagnostic principle recommendations of the cIMPACT-Utrecht meeting on future CNS tumor classification and grading.* „Brain Pathol", 30, 844–856.
- Ma X., Liu Y., Liu Y., Alexandrov L.B., Edmonson M.N., Gawad C., Zhou X., Li Y., Rusch M.C. & Easton J. (2018), *Pan-cancer genome and transcriptome analyses of 1,699 paediatric leukaemias and solid tumours.* „Nature", 555, 371–376.
- Morgenstern D.A., Bagatell R., Cohn S.L., Hogarty M.D., Maris J.M., Moreno L., Park J.R., Pearson A.D., Schleiermacher G., Valteau-Couanet D., London W.B. & Irwin M.S. (2019), *The challenge of defining „ultra-high-risk" neuroblastoma.* „Pediatr Blood Cancer", 66, e27556.
- Newman S., Nakitandwe J., Kesserwan C.A., Azzato E.M., Wheeler D.A., Rusch M., Shurtleff S., Hedges D.J., Hamilton K.V. & Foy S.G. (2021), *Genomes for kids: the scope of pathogenic mutations in pediatric cancer revealed by comprehensive DNA and RNA sequencing.* „Cancer Discovery", 11, 3008–3027.

- Olson T.A., Murray M.J., Rodriguez-Galindo C., Nicholson J.C., Billmire D.F., Krailo M.D., Dang H.M., Amatruda J.F., Thornton C.M., Arul G.S., Stoneham S.J., Pashankar F., Stark D., Shaikh F., Gershenson D.M., Covens A., Hurteau J., Stenning S.P., Feldman D.R., Grimison P.S., Huddart R.A., Sweeney C., Powles T., Lopes L.F., dos Santos Agular S., Chinnaswamy G., Khaleel S., Abouelnaga S., Hale J.P. & Frazier A.L. (2015), *Pediatric and Adolescent Extracranial Germ Cell Tumors: The Road to Collaboration.* „J Clin Oncol", 33, 3018–28.
- Pajtler K.W., Witt H., Sill M., Jones D.T., Hovestadt V., Kratochwil F., Wani K., Tatevossian R., Punchihewa C. & Johann P. (2015), *Molecular classification of ependymal tumors across all CNS compartments, histopathological grades, and age groups.* „Cancer Cell", 27, 728–743.
- Pietras W. (2012), *Advances and changes in the treatment of children with nephroblastoma.* „Adv Clin Exp Med", 21, 809–820.
- Pietras W., Kobos J. & Godziński J. (2019), *Standardy postępowania diagnostycznego i terapeutycznego w guzach nerek*. „Przegląd Pediatryczny" 2019, vol. 48, No. 3, 09–111.
- Quan V.L., Zhang B., Mohan L.S., Shi K., Isales M.C., Panah E., Taxter T.J., Beaubier N., White K. & Gerami P. (2019), *Activating Structural Alterations in MAPK Genes Are Distinct Genetic Drivers in a Unique Subgroup Of Spitzoid Neoplasms.* „Am J Surg Pathol", 43, 538–548.
- Raciborska A., Klepacka T., Michalak E. (2019), *Standardy postępowania diagnostycznego w guzach kości u dzieci i młodzieży.* „Przegląd Pediatryczny" 2019, vol. 48, No. 3, 112–115.
- Rakheja D., Chen K.S., Liu Y., Shukla A.A., Schmid V., Chang T.C., Khokhar S., Wickiser J.E., Karandikar N.J., Malter J.S., Mendell J.T. & Amatruda J.F. (2014), *Somatic mutations in DROSHA and DICER1 impair microRNA biogenesis through distinct mechanisms in Wilms tumours.* „Nat Commun", 2, 4802.
- Ryall S., Tabori U. & Hawkins C. (2020), P*ediatric low-grade glioma in the era of molecular diagnostics.* „Acta Neuropathol Commun", 8, 30.
- Sahm F., Schrimpf D., Jones D.T., Meyer J., Kratz A., Reuss D., Capper D., Koelsche C., Korshunov A., Wiestler B., Buchhalter I., Milde T., Selt F., Sturm D., Kool M., Hummel M., Bewerunge-Hudler M., Mawrin C., Schuller U., Jungk C., Wick A., Witt O., Platten M., Herold-Mende C., Unterberg A., Pfister S.M., Wick W. & von Deimling A. (2016), N*ext-generation sequencing in routine brain tumor diagnostics enables an integrated diagnosis and identifies actionable targets*. „Acta Neuropathol", 131, 903–10.
- Sekiguchi M., Seki M., Kawai T., Yoshida K., Yoshida M., Isobe T., Hoshino N., Shirai R., Tanaka M., Souzaki R., Watanabe K., Arakawa Y., Nannya Y., Suzuki H., Fujii Y., Kataoka K., Shiraishi Y., Chiba K., Tanaka H., Shimamura T., Sato Y., Sato-Otsubo A., Kimura S., Kubota Y., Hiwatari M., Koh K., Hayashi Y., Kanamori Y., Kasahara M., Kohashi K., Kato M., Yoshioka T., Matsumoto K., Oka A., Taguchi T., Sanada M., Tanaka Y., Miyano S., Hata K., Ogawa S. & Takita J. (2020), I*ntegrated multiomics analysis of hepatoblastoma unravels its heterogeneity and provides novel druggable targets.* „NPJ Precis Oncol", 4, 20.
- Setty B.A., Jinesh G.G., Arnold M., Pettersson F., Cheng C.H., Cen L., Yoder S.J., Teer J.K., Flores E.R., Reed D.R. & Brohl A.S. (2020), *The genomic landscape of undifferentiated embryonal sarcoma of the liver is typified by C19MC structural rearrangement and overexpression combined with TP53 mutation or loss.* „PLOS Genet", 16, e1008642.
- Steliarova-Foucher E., Colombet M., Ries L.A.G., Moreno F., Dolya A., Bray F., Hesseling P., Shin H.Y., Stiller C.A. (2017), *International incidence of childhood cancer, 2001-10: a population-based registry study.* „The Lancet. Oncology", 18, 719–731.
- Sturm D., Orr B.A., Toprak U.H., Hovestadt V., Jones D.T., Capper D., Sill M., Buchhalter I., P.A. et al (2016), *New Brain Tumor Entities Emerge from Molecular Classification of CNS-PNETs.* „Cell", 164, 1060–72.
- Styczyński J., Balwierz W., Dembowska-Bagińska B., Kazanowska B., Wachowiak J., Matysiak M., Klukowska A., Krawczuk-Rybak M., Adamkiewicz-Drożyńska E. & Młynarski W.M. (2018), *Paediatric oncology and haematology in Poland: position paper.* „Pediatria Polska", 93.
- Sumazin P., Chen Y., Treviño L.R., Sarabia S.F., Hampton O.A., Patel K., Mistretta T.A., Zorman B., Thompson P., Heczey A., Comerford S., Wheeler D.A., Chintagumpala M., Meyers R., Rakheja D., Finegold M.J., Tomlinson G., Parsons D.W. & López-Terrada D. (2017), *Genomic analysis of hepatoblastoma identifies distinct molecular and prognostic subgroups.* „Hepatology", 65, 104–121.
- van den Heuvel-Eibrink M.M., Hol J.A., Pritchard-Jones K., van Tinteren H., Furtwängler R., Verschuur A.C., Vujanic G.M., Leuschner I., Brok J., Rübe C., Smets A.M., Janssens G.O., Godzinski J., Ramírez-Villar G.L., de Camargo B., Segers H., Collini P., Gessler M., Bergeron C., Spreafico F., Graf N. & I. S. o. P. O. R. T. S. G. (SIOP–RTSG) (2017), *Position paper: Rationale for the treatment of Wilms tumour in the UMBRELLA SIOP-RTSG 2016 protocol.* „Nat Rev Urol", 14, 743–752.
- VandenBoom T., Quan V.L., Zhang B., Garfield E.M., Kong B.Y., Isales M.C., Panah E., Igartua C., Taxter T., Beaubier N., Whi-

te K. & Gerami P. (2018), *Genomic Fusions in Pigmented Spindle Cell Nevus of Reed.* „Am J Surg Pathol", 42, 1042–1051.
- Vokuhl C., Nourkami-Tutdibi N., Furtwängler R., Gessler M., Graf N. & Leuschner I. (2018), *ETV6-NTRK3 in congenital mesoblastic nephroma: A report of the SIOP/GPOH nephroblastoma study.* „Pediatr Blood Cancer", 65.
- Weiser D.A., West-Szymanski D.C., Fraint E., Weiner S., Rivas M.A., Zhao C.W.T., He C. & Applebaum M.A. (2019), *Progress toward liquid biopsies in pediatric solid tumors.* „Cancer Metastasis Rev", 38, 553–571.
- Wieczorek A. & Balwierz W. (2010), *Występowanie i znaczenie rokownicze wybranych czynników w zwojaku zarodkowym współczulnym u dzieci.* „Przegląd Lekarski", 67 (6): 393–374.
- Worst B.C., van Tilburg C.M., Balasubramanian G.P., Fiesel P., Witt R., Freitag A., Boudalil M., Previti C., Wolf S. & Schmidt S. (2016), N*ext-generation personalised medicine for high-risk paediatric cancer patients–The INFORM pilot study.* „European Journal of Cancer", 65, 91–101.
- Yoshida Y., Nobusawa S., Nakata S., Nakada M., Arakawa Y., Mineharu Y., Sugita Y., Yoshioka T., Araki A., Sato Y., Takeshima H., Okada M., Nishi A., Yamazaki T., Kohashi K., Oda Y., Hirato J. & Yokoo H. (2018), *CNS high-grade neuroepithelial tumor with BCOR internal tandem duplication: a comparison with its counterparts in the kidney and soft tissue.* „Brain Pathol", 28, 710–720.
- Zhang J., Benavente C.A., McEvoy J., Flores-Otero J., Ding L., Chen X., Ulyanov A., Wu G., Wilson M., Wang J., Brennan R., Rusch M., Manning A.L., Ma J., Easton J., Shurtleff S., Mullighan C., Pounds S., Mukatira S., Gupta P., Neale G., Zhao D., Lu C., Fulton R.S., Fulton L.L., Hong X., Dooling D.J., Ochoa K., Naeve C., Dyson N.J., Mardis E.R., Bahrami A., Ellison D., Wilson R.K., Downing J.R. & Dyer M.A. (2012), *A novel retinoblastoma therapy from genomic and epigenetic analyses.* „Nature", 481, 329–34.
- https://clinicaltrials.gov
- https://www.orpha.net
- https://seer.cancer.gov/iccc/iccc-iarc-2017.html#fn
- https://www.pathologyoutlines.com

4.7. Nowotwory mózgu u dorosłych – glejaki

- Brandner S., McAleenan A., Jones H.E., Kernohan A., Robinson T., Schmidt L., Dawson S., Kelly C., Leal E.S., Faulkner C.L., Palmer A., Wragg C., Jefferies S., Vale L., Higgins J.P.T., Kurian K.M., *Diagnostic accuracy of 1p/19q codeletion tests in oligodendroglioma: A comprehensive meta-analysis based on a Cochrane systematic review.* „Neuropathol Appl Neurobiol." 2022 Jun;48(4):e12790.
- De Preter K., Speleman F., Combaret V., Lunec J., Laureys G., Eussen B.H.J., Francotte N., Board J., Pearson A.D.J., De Paepe A., Van Roy N., & Vandesompele J. (2002), *Quantification of MYCN, DDX1, and NAG gene copy number in neuroblastoma using a real-time quantitative PCR assay.* „Modern Pathology: An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc", 15(2), 159–166. https://doi.org/10.1038/modpathol.3880508
- Izycka-Swieszewska E., Brzeskwiniewicz M., Wozniak A., Drozynska E., Grajkowska W., Perek D., Balcerska A., Klepacka T., & Limon J. (2010), *EGFR, PIK3CA and PTEN gene status and their protein product expression in neuroblastic tumours.* „Folia Neuropathologica", 48(4), 238–245.
- Jamshidi P., Brat D.J., *The 2021 WHO classification of central nervous system tumors: what neurologists need to know.* „Curr Opin Neurol." 2022 Dec 1;35(6):764–771.
- Komori T., *The molecular framework of pediatric-type diffuse gliomas: shifting toward the revision of the WHO classification of tumors of the central nervous system.* „Brain Tumor Pathol." 2021 Jan;38(1):1–3.
- Lipska B.S., Koczkowska M., Wierzba J., Ploszynska A., Iliszko M., Izycka-Swieszewska E., Adamkiewicz-Drozynska E. & Limon J. (2013), *On the significance of germline cytogenetic rearrangements at MYCN locus in neuroblastoma.* „Molecular Cytogenetics", 6(1), 43. https://doi.org/10.1186/1755-8166-6-43
- Louis D.N., Perry A., Wesseling P., Brat D.J., Cree I.A., Figarella-Branger D., Hawkins C., Ng H.K., Pfister S.M., Reifenberger G., Soffietti R., von Deimling A., Ellison D.W., *The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary.* „Neuro Oncol." 2021 Aug 2;23(8):1231–1251.
- Rodriguez F.J., Mota R.A., Scheithauer B.W., Giannini C., Blair H., New K.C., Wu K.J., Dickson D.W. & Jenkins R.B. (2009), *Interphase cytogenetics for 1p19q and t(1;19)(q10;p10) may distinguish prognostically relevant subgroups in extraventricular neurocytoma.* „Brain Pathology (Zurich, Switzerland)", 19(4), 623–629. https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.2008.00206.x
- Roszkowski K., Furtak J., Zurawski B., Szylberg T. & Lewandowska M.A. (2016), P*otential Role of Methylation Marker in Glioma Supporting Clinical Decisions.* „International Journal of Molecular Sciences", 17(11). https://doi.org/10.3390/ijms17111876

- Stichel D., Ebrahimi A., Reuss D., Schrimpf D., Ono T., Shirahata M., Reifenberger G., Weller M., Hänggi D., Wick W., Herold--Mende C., Westphal M., Brandner S., Pfister S.M., Capper D., Sahm F., von Deimling A., *Distribution of EGFR amplification, combined chromosome 7 gain and chromosome 10 loss, and TERT promoter mutation in brain tumors and their potential for the reclassification of IDHwt astrocytoma to glioblastoma.* „Acta Neuropathol." 2018 Nov;136(5):793–803.
- Śledzińska P., Bebyn M.G., Furtak J., Kowalewski J. & Lewandowska M.A. (2021), *Prognostic and Predictive Biomarkers in Gliomas.* „International Journal of Molecular Sciences", 22(19), 10373. https://doi.org/10.3390/ijms221910373
- WHO Classification of Tumours Editorial Board. Central nervous system tumours. Lyon (France): International Agency for Research on Cancer; 2021. (WHO classification of tumours series, 5th ed.; vol. 6). https://publications.iarc.fr/601
- Weller M., van den Bent M., Preusser M., Le Rhun E., Tonn J.C., Minniti G., Bendszus M., Balana C., Chinot O., Dirven L., French P., Hegi M.E., Jakola A.S., Platten M., Roth P., Rudà R., Short S., Smits M., Taphoorn M.J.B., von Deimling A., Westphal M., Soffietti R., Reifenberger G., Wick W., *EANO guidelines on the diagnosis and treatment of diffuse gliomas of adulthood.* „Nat Rev Clin Oncol." 2021 Mar;18(3):170–186.
- Woehrer A., Sander P., Haberler C., Kern S., Maier H., Preusser M., Hartmann C., Kros J.M., Hainfellner J.A., R*esearch Committee of the European Confederation of Neuropathological Societies. FISH-based detection of 1p 19q codeletion in oligodendroglial tumors: procedures and protocols for neuropathological practice – a publication under the auspices of the Research Committee of the European Confederation of Neuropathological Societies (Euro-CNS).* „Clin Neuropathol." 2011 Mar-Apr;30(2):47–55.

4.8. Rak tarczycy

- Hińcza K., Kowalik A., Kowalska A. (2019), *Current Knowledge of Germline Genetic Risk Factors for the Development of Non-Medullary Thyroid Cancer.* „Genes (Basel)", 10(7):482. doi: 10.3390/genes10070482. PMID: 31247975; PMCID: PMC6678600
- Kowalik A., Kowalska A., Walczyk A., Chodurska R., Kopczyński J., Chrapek M., Wypiórkiewicz E., Chłopek M., Pięciak L., Gąsior-Perczak D., Pałyga I., Gruszczyński K., Nowak E., Góźdź S. (2017), *Evaluation of molecular diagnostic approaches for the detection of BRAF p.V600E mutations in papillary thyroid cancer: Clinical implications.* „PLOS ONE", 12(6):e0179691. doi: 10.1371/journal.pone.0179691. PMID: 28636673; PMCID: PMC5479585
- Kuchareczko A., Kopczyński J., Kowalik A., Hińcza-Nowak K., Walczyk A., Pałyga I., Trybek T., Szymonek M., Gąsior--Perczak D., Gadawska-Juszczyk K., Mikina E., Płachta I., Suligowska A., Płusa A., Chrapek M., Łopatyński T., Góźdź S., Kowalska A., *A Significance of Concomitant BRAFV600E and TERT Mutations in Polish Patients with Papillary Thyroid Microcarcinoma: A Retrospective Cohort Study Based on 430 Cases.* „Thyroid." 2022 Nov;32(11):1372-1381. doi: 10.1089/thy.2022.0155. Epub 2022 Sep 9. PMID: 35950639
- Oczko-Wojciechowska M., Pfeifer A., Jarzab M., Swierniak M., Rusinek D., Tyszkiewicz T., Kowalska M., Chmielik E., Zembala-Nozynska E., Czarniecka A., Jarzab B., Krajewska J., *Impact of the Tumor Microenvironment on the Gene Expression Profile in Papillary Thyroid Cancer.* „Pathobiology" 2020;87(2):143-154. doi: 10.1159/000507223. Epub 2020 Apr 22. PMID: 32320975
- Rusinek D., Pfeifer A., Krajewska J., Oczko-Wojciechowska M., Handkiewicz-Junak D., Pawlaczek A., Zebracka-Gala J., Kowalska M., Cyplinska R., Zembala-Nozynska E., Chekan M., Chmielik E., Kropinska A., Lamch R., Jurecka-Lubieniecka B., Jarzab B., Czarniecka A., *Coexistence of TERT Promoter Mutations and the BRAF V600E Alteration and Its Impact on Histopathological Features of Papillary Thyroid Carcinoma in a Selected Series of Polish Patients.* „Int J Mol Sci." 2018 Sep 6;19(9):2647. doi: 10.3390/ijms19092647. PMID: 30200646; PMCID: PMC6163174

4.9. Rak gruczołu krokowego

- Bancroft E.K., Page E.C., Castro E., Lilja H., Vickers A., Sjoberg D., Assel M., Foster C.S., Mitchell G., Drew K., Mæhle L., Axcrona K., Evans D.G., Bulman B., Eccles D., McBride D., van Asperen C., Vasen H., Kiemeney L.A., … Eeles R. A. (2014), *Targeted prostate cancer screening in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: Results from the initial screening round of the IMPACT study.* „European Urology", 66(3), 489–499. https://doi.org/10.1016/j.eururo.2014.01.003
- Lau E., McCoy P., Reeves F., Chow K., Clarkson M., Kwan E.M., Packwood K., Northen H., He M., Kingsbury Z., Mangiola S., Kerger M., Furrer M.A., Crowe H., Costello A.J., McBride D.J., Ross M.T., Pope B., Hovens C.M. & Corcoran N. M. (2020), *Detection of ctDNA in plasma of patients with clinically localised prostate cancer is associated with rapid disease progression.* „Genome Medicine", 12(1), 72. https://doi.org/10.1186/s13073-020-00770-1
- Risdon E.N. et al, *PARP Inhibitors and Prostate Cancer: To Infinity and Beyond BRCA. „Oncologist" 2021 Jan;26(1):e115-e129.*

4.10. Rak trzustki

- Rosen M.N., Goodwin R.A., Vickers M.M., *BRCA mutated pancreatic cancer: A change is coming.* „World J Gastroenterol." 2021 May 7;27(17):1943–1958.
- Szwiec M., Lubiński J., Cybulski C., *Recurrent mutations of BRCA1 and BRCA2 in Poland: an update.* „Clin Genet." 2015 Mar;87(3):288–92.
- Vietri M.T., D'Elia G., Caliendo G., Albanese L., Signoriello G., Napoli C., Molinari A.M., *Pancreatic Cancer with Mutation in BRCA1/2, MLH1, and APC Genes: Phenotype Correlation and Detection of a Novel Germline BRCA2 Mutation.* „Genes (Basel)" 2022 Feb 9;13(2):321. doi: 10.3390/genes13020321
- Wong W., Raufi A.G., Safyan R.A., Bates S.E., Manji G.A., BRCA Mutations in Pancreas Cancer: Spectrum, Current Management, *Challenges and Future Prospects.* „Cancer Manag Res." 2020 Apr 23;12:2731–2742.

4.11. Nowotwór podścieliskowy przewodu pokarmowego GIST

- Astolfi A., Indio V., Nannini M., Saponara M., Schipani A., De Leo A., Altimari A., Vincenzi B., Comandini D., Grignani G., Secchiero P., Urbini M. & Pantaleo M. A. (2020), *Targeted Deep Sequencing Uncovers Cryptic KIT Mutations in KIT/PDGFRA/SDH/RAS-P Wild-Type GIST.* „Frontiers in Oncology", 10. https://doi.org/10.3389/fonc.2020.00504
- Blay J.Y., Kang Y.K., Nishida T., von Mehren M., *Gastrointestinal stromal tumours.* „Nat Rev Dis Primers." 2021 Mar 18;7(1):22.
- Casali P.G., Abecassis N., Aro H.T., Bauer S., Biagini R., Bielack S., Bonvalot S., Boukovinas I., Bovee J.V.M.G. et. al ESMO Guidelines Committee and EURACAN, *Gastrointestinal stromal tumours: ESMO-EURACAN Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up.* „Ann Oncol." 2018 Oct 1;29(Suppl 4):iv68-iv78.
- Kiwerska K., Wroblewska J., Kaluzna A. & Marszalek A. (2020), *Justification of direct Sanger sequencing application for detection of KIT and PDGFRα gene mutations in formalin-fixed, paraffin-embedded samples from gastrointestinal stromal tumours.* „Journal of Clinical Pathology", 73(4), 213–219. https://doi.org/10.1136/jclinpath-2019-206225
- Lasota J., Felisiak-Golabek A., Wasag B., Kowalik A., Zięba S., Chłopek M., Wang Z.-F., Coates T., Kopczynski J., Gozdz S., Sarlomo-Rikala M. & Miettinen M. (2016), *Frequency and clinicopathologic profile of PIK3CA mutant GISTs: Molecular genetic study of 529 cases.* „Modern Pathology: An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc", 29(3), 275–282. https://doi.org/10.1038/modpathol.2015.160
- Origone P., Gargiulo S., Mastracci L., Ballestrero A., Battistuzzi L., Casella C., Comandini D., Cusano R., Dei Tos A.P., Fiocca R., Garuti A., Ghiorzo P., Martinuzzi C., Toffolatti L., Liguria GIST Unit & Bianchi Scarrà G. (2013), *Molecular characterization of an Italian series of sporadic GISTs.* „Gastric Cancer: Official Journal of the International Gastric Cancer Association and the Japanese Gastric Cancer Association", 16(4), 596–601. https://doi.org/10.1007/s10120-012-0213-y
- Shen Y.Y., Ma X.L., Wang M., Zhuang C., Ni B., Tu L., Liu Q., Zhao W.Y., Cao H., E*xon 11 homozygous mutations and intron 10/exon 11 junction deletions in the KIT gene are associated with poor prognosis of patients with gastrointestinal stromal tumors.* „Cancer Med." 2020 Sep;9(18):6485–6496.
- Shi E., Chmielecki J., Tang C.M., Wang K., Heinrich M.C., Kang G., Corless C.L., Hong D., Fero K.E., Murphy J.D., Fanta P.T., Ali S.M., De Siena M., Burgoyne A.M., Movva S., Madlensky L., Heestand G.M., Trent J.C., Kurzrock R., Morosini D., Ross J.S., Harismendy O., Sicklick J.K., F*GFR1 and NTRK3 actionable alterations in „Wild-Type" gastrointestinal stromal tumors.* „J Transl Med." 2016 Dec 14;14(1):339.
- Szucs Z., Thway K., Fisher C., Bulusu R., Constantinidou A., Benson C., van der Graaf W.T., Jones R.L., *Molecular subtypes of gastrointestinal stromal tumors and their prognostic and therapeutic implications.* „Future Oncol." 2017 Jan;13(1):93–107.
- WHO Classification of Tumours Editorial Board. Digestive system tumours. Lyon (France): International Agency for Research on Cancer; 2019. (WHO classification of tumours series, 5th ed.; vol. 1). https://publications.iarc.fr/579
- Wozniak A., Rutkowski P., Piskorz A., Ciwoniuk M., Osuch C., Bylina E., Sygut J., Chosia M., Rys J., Urbanczyk K., Kruszewski W., Sowa P., Siedlecki J., Debiec-Rychter M., Limon J., *Polish Clinical GIST Registry. Prognostic value of KIT/PDGFRA mutations in gastrointestinal stromal tumours (GIST): Polish Clinical GIST Registry experience.* „Ann Oncol." 2012 Feb;23(2):353–60.
- Wu C.E., Tzen C.Y., Wang S.Y., Yeh C.N,. *Clinical Diagnosis of Gastrointestinal Stromal Tumor (GIST): From the Molecular Genetic Point of View.* „Cancers (Basel)" 2019 May 16;11(5):679.

4.12. Mięsaki

- Asif A., Mushtaq S., Hassan U., Akhtar N., Hussain M., Azam M. & Qazi R. (2018), *Fluorescence in Situ Hybridization (FISH) for Differential Diagnosis of Soft Tissue Sarcomas.* „Asian Pacific Journal of Cancer Prevention: APJCP", 19(3), 655–660. https://doi.org/10.22034/APJCP.2018.19.3.655

- Chen S., Fritchie K., Wei S., Ali N., Curless K., Shen T., Brini A.T., Latif F., Sumathi V., Siegal G.P. & Cheng L. (2017), *Diagnostic utility of IDH1/2 mutations to distinguish dedifferentiated chondrosarcoma from undifferentiated pleomorphic sarcoma of bone*. „Human Pathology", 65, 239–246. https://doi.org/10.1016/j.humpath.2017.05.015
- Cote G.M., He J. & Choy E. (2018), *Next Generation Sequencing for Patients with Sarcoma: A Single Center Experience.* „The Oncologist", 23(2), 234–242. https://doi.org/10.1634/theoncologist.2017-0290
- Koczkowska M., Lipska-Ziętkiewicz B.S., Iliszko M., Ryś J., Miettinen M., Lasota J., Biernat W., Harazin-Lechowska A., Kruczak A. & Limon J. (2017), *Application of high-resolution genomic profiling in the differential diagnosis of liposarcoma.* „Molecular Cytogenetics", 10, 7. https://doi.org/10.1186/s13039-017-0309-5
- Lugowska I., Teterycz P., Mikula M., Kulecka M., Kluska A., Balabas A., Piatkowska M., Wagrodzki M., Pienkowski A., Rutkowski P. & Ostrowski J. (2018), *IDH1/2 Mutations Predict Shorter Survival in Chondrosarcoma*. „Journal of Cancer", 9(6), 998–1005. https://doi.org/10.7150/jca.22915
- McConnell L., Houghton O., Stewart P., Gazdova J., Srivastava S., Kim C., Catherwood M., Strobl A., Flanagan A.M., Oniscu A., Kroeze L.I., Groenen P., Taniere P., Salto-Tellez M. & Gonzalez D. (2020), *A novel next generation sequencing approach to improve sarcoma diagnosis.* „Modern Pathology", 33(7), 1350–1359. https://doi.org/10.1038/s41379-020-0488-1
- Rutkowski P., Prochorec-Sobieszek M., Wągrodzki M., Seliga K., Krzakowski M., Czarnecka A.M., Świtaj T., Kawecki A., Raciborska A., Tysarowski A., *Diagnostyka z wykorzystaniem sekwencjonowania następnej generacji (NGS) w mięsakach – rekomendacje.* „Onkologia w Praktyce Klinicznej – Edukacja" 2020;6:1–8.
- Tysarowski A., Szumera-Ciećkiewicz A., Marszałek A. i in., *Molecular diagnostics of cancers – practical approach.* „Nowotwory Journal of Oncology" 2023, vol. 73, nr 3, s. 174–186.

4.13. Rak piersi

- Arsenic R., Treue D., Lehmann A., Hummel M., Dietel M., Denkert C. & Budczies J. (2015), *Comparison of targeted next-generation sequencing and Sanger sequencing for the detection of PIK3CA mutations in breast cancer.* „BMC Clinical Pathology", 15. https://doi.org/10.1186/s12907-015-0020-6
- Bofin A.M., Ytterhus B., Martin C., O'Leary J.J. & Hagmar B.M. (2004), *Detection and quantitation of HER-2 gene amplification and protein expression in breast carcinoma.* „American Journal of Clinical Pathology", 122(1), 110–119. https://doi.org/10.1309/8A2D-JFT0-7NE6-EWHE
- Catana A., Apostu A.P. & Antemie R.G. (2019), *Multi gene panel testing for hereditary breast cancer—Is it ready to be used?* „Medicine and Pharmacy Reports", 92(3), 220–225. https://doi.org/10.15386/mpr-1083
- Kowalik A., Siołek M., Kopczyński J., Krawiec K., Kalisz J., Zięba S., Kozak-Klonowska B., Wypiórkiewicz E., Furmańczyk J., Nowak-Ozimek E., Chłopek M., Macek P., Smok-Kalwat J. & Góźdź S. (2018), *BRCA1 founder mutations and beyond in the Polish population: A single-institution BRCA1/2 next-generation sequencing study.* „PLOS ONE", 13(7). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201086

4.14. Rak żołądka

- Abrahao-Machado L.F. & Scapulatempo-Neto C. (2016), *HER2 testing in gastric cancer: An update.* „World Journal of Gastroenterology", 22(19), 4619–4625. https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i19.4619
- Ciesielski M., Szajewski M., Pęksa R., Lewandowska M.A., Zieliński J., Walczak J., Szefel J. & Kruszewski W.J. (2018), *The relationship between HER2 overexpression and angiogenesis in gastric cancer.* „Medicine", 97(42). https://doi.org/10.1097/MD.0000000000012854

4.15. Fuzje NTRK jako przykład markerów niezależnych od tkanki pochodzenia nowotworu

- Bhamidipati D., Subbiah V., *Impact of tissue-agnostic approvals for patients with gastrointestinal malignancies.* „Trends Cancer." 2023 Mar;9(3):237-249. doi: 10.1016/j.trecan.2022.11.003. Epub 2022 Dec 7. PMID: 36494311; PMCID: PMC9974757
- Cocco E., Scaltriti M., Drilon A., *NTRK fusion-positive cancers and TRK inhibitor therapy.* „Nat Rev Clin Oncol." 2018 Dec;15(12):731–747.

ISBN 978-83-938465-6-6