

Mutacje genu *IDH1* — stanowisko ekspertów

Andrzej Marszałek^{1, 2}, Agnieszka Wierzbowska^{3, 4}, Marta Libura⁵, Tomasz Kubiawski⁶,
 Bartosz Wasąg^{7, 8}, Maciej Krzakowski⁹

¹Uniwersytet Medyczny w Poznaniu

²Wielkopolskie Centrum Onkologii w Poznaniu

³Uniwersytet Medyczny w Łodzi

⁴Wojewódzkie Wielospecjalistyczne Centrum Onkologii i Traumatologii w Łodzi

⁵Uniwersytet Medyczny w Warszawie

⁶Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

⁷Gdański Uniwersytet Medyczny

⁸Uniwersyteckie Centrum Kliniczne w Gdańsku

⁹Narodowy Instytut Onkologii — Państwowy Instytut Badawczy w Warszawie

Artykuł przedrukowano za zgodą z: Onkologia w Praktyce Klinicznej.

Należy cytować powyższe źródło

Streszczenie

Iwosydenib jest silnym — stosowanym doustnie — inhibitorem szlaku zależnego od IDH1. Przedkliniczne dowody wartości iwosydenibu zostały potwierdzone przez wyniki prospektywnych badań klinicznych u chorych na ostrą białaczkę szpikową i raka dróg żółciowych z mutacją w genie IDH1. Optymalne wykorzystanie iwosydenibu — podobnie do innych ukierunkowanych leków przeciwnowotworowych — zależy od sprawnej i dokładnej diagnostyki morfologicznej i molekularnej. Artykuł został przygotowany w celu przedstawienia obecnych metod oceny stanu genu IDH1 i naukowego uzasadnienia dla stosowania iwosydenibu w ostrej białaczce szpikowej oraz raku dróg żółciowych.

Słowa kluczowe: gen *IDH1*, ostra białaczka szpikowa, rak dróg żółciowych, leczenie ukierunkowane molekularnie, iwosydenib

Hematologia — Edukacja 2022; 3–4: 113–124

Abstract

Ivosidenib is a potent — administered orally — inhibitor of IDH1-dependent pathway. Preclinical evidence of its efficacy has been confirmed by the results of prospective clinical trials in patients with IDH1-mutated acute myeloid leukemia and cholangiocarcinoma. Optimal use of ivosidenib — similarly to other targeted anti-cancer agents — depends on the efficient and precise morphological and molecular diagnostic procedures. The aim of this publication is to present current methods of IDH1 testing and scientific evidence on the use of ivosidenib in patients with acute myeloid leukemia as well as cholangiocarcinoma.

Key words: *IDH1* gene, acute myeloid leukemia, cholangiocarcinoma, molecular targeted therapy, ivosidenib

Hematologia — Edukacja 2022; 3–4: 113–124

Adres do korespondencji: Maciej Krzakowski, Narodowy Instytut Onkologii — Państwowy Instytut Badawczy im. Marii Skłodowskiej-Curie, ul. Roentgena 5, 02–781 Warszawa, e-mail: maciej.krzakowski@pib-nio.pl

Wprowadzenie

Poznanie biologii komórek nowotworu i mikrośrodowiska wskazało możliwości blokowania wielu dróg przekazywania sygnałów wewnątrzkomórkowych, co pozwala na hamowanie progresji nowotworów. Przykładowymi zaburzeniami o istotnym znaczeniu w patogenezie nowotworów są mutacje w genie *IDH1*, który koduje dehydrogenazę izocytrynianową. Mutacje w genie *IDH1* są wykrywane między innymi w komórkach ostrej białaczki szpikowej (AML, *acute myeloid leukemia*) i raka dróg żółciowych (CCA, *cholangiocarcinoma*). Rokowanie chorych na ostrą białaczkę szpikową z obecnością mutacji w genie *IDH1* jest prawdopodobnie gorsze, co również dotyczy chorych z rozpoznaniem raka wewnątrzwątrobowych dróg żółciowych (iCCA, *intrahepatic cholangiocarcinoma*) [1, 2] i uzasadnione jest szukanie nowych metod leczenia ukierunkowanego. Iwosydenib stosowany doustnie jest inhibitorem *IDH1*, który ma potwierdzoną skuteczność u chorych na oba wymienione wyżej nowotwory.

Celem niniejszego opracowania jest przedstawienie uzasadnienia dla określania stanu genu *IDH1* oraz wskazanie metodyki badań naukowo uzasadnionej w klinicznej praktyce (w tym obejmującej badania patomorfologiczne i molekularne).

Zasady diagnostyki patomorfologicznej

Badanie patomorfologiczne obejmuje formułowanie jednostki kliniczno-morfologicznej na podstawie dostępnych danych klinicznych, oceny makro- i mikroskopowej nadesłanego do badania materiału oraz — o ile niezbędne — w połączeniu z interpretacją odczynów histochemicznych, reakcji immunohistochemicznych i w wybranych przypadkach wyników badań technikami biologii molekularnej. Wymieniona wyżej podręcznikowa definicja niesie ze sobą różne wymagania, których spełnienie ma wpływ na jakość badania patomorfologicznego i — w dalszej perspektywie — możliwość wykorzystania materiału do celów medycyny personalizowanej, czyli leczenia ukierunkowanego molekularnie. Wskazania niezbędnych działań mających na celu możliwość przeprowadzenia badania patomorfologicznego wymaganej jakości przedstawiono poniżej.

Badanie patomorfologiczne jest wykonywane jako swoista konsultacja między lekarzami różnych specjalności, stąd skierowanie na badanie musi zawierać odpowiednią ilość danych. Zgodnie z obwieszczeniem Ministra Zdrowia [3] w sprawie stan-

dardów akredytacyjnych dla jednostek diagnostyki patomorfologicznej (JDP), którymi są zakład lub pracownia patomorfologii/histopatologii, skierowanie na badanie patomorfologiczne musi zawierać:

- dane identyfikacyjne chorego;
- rozpoznanie kliniczne (wskazanie jednostki chorobowej lub jej podejrzenie);
- rodzaj materiału;
- typ zabiegu;
- lokalizację anatomiczną zmiany lub miejsce pobrania materiału;
- rodzaj zastosowanego utrwalacza;
- datę i godzinę pobrania materiału;
- datę i godzinę utrwalenia materiału oraz — o ile dotyczy:
- informacje o uprzednim leczeniu (szczególnie o hormonoterapii, chemioterapii oraz radioterapii);
- informacje o wcześniej rozpoznanej innej chorobie nowotworowej;
- wyniki badań obrazowych;
- wyniki badań laboratoryjnych.

Większość wymienionych wyżej pozycji — związana z czysto klinicznymi danymi oraz wynikami badań laboratoryjnych — nie budzi zastrzeżeń. Należy zwrócić uwagę, że wprowadzono wymóg określenia daty i godziny pobrania materiału do badania, daty i godziny utrwalenia materiału oraz rodzaju zastosowanego utrwalacza. Wymienione pozycje są niezwykle ważne dla jakości badania patomorfologicznego.

Zgodnie z zaakceptowanymi wytycznymi i wprowadzonymi zasadami [4, 5] procedury w JDP podlegają poniższym wymaganiom.

Czas utrwalania materiału oraz rodzaj zastosowanego utrwalacza mają bezpośredni wpływ na możliwość wykonania wiarygodnych odczynów immunohistochemicznych oraz wykorzystania materiału do badań z zakresu biologii molekularnej. Zbyt krótki lub zbyt długi czas utrwalania oraz nieodpowiedni utrwalacz mogą ograniczyć możliwości diagnostyczne, a odczyny immunohistochemiczne mogą zostać ocenione jako wyniki nieprawdziwie ujemne. Dodatkowo, przy złym utrwaleniu nie będą możliwe do wykonania badania z zakresu biologii molekularnej.

Standardowym utrwalaczem jest 10% zburowana formalina (4% roztwór formaldehydu) o pH wynoszącym od 7,2 do 7,4 w temperaturze pokojowej. W celu właściwego utrwalenia objętość utrwalacza powinna być 10-krotnie większa od objętości utrwalanego materiału. W przypadku dużych materiałów, przy kontroli pH formaliny i zmianach parametrów wyjściowych, wymagana jest wymiana

na „świeży utrwalacz” w celu zapewnienia odpowiedniego utrwalenia tkanek. Reakcje chemiczne zachodzące w czasie utrwalenia prowadzą do degradacji formaliny oraz zakwaszenia środowiska. W takiej sytuacji bez wymiany utrwalacza materiał podlega autolizie (zniszczeniu) i wykonanie badań molekularnych może być ograniczone ze względu na degradację materiału genetycznego, a czasem wręcz niemożliwe. Mając na uwadze potencjalne wykorzystanie materiału do badań molekularnych, nie stosuje się mieszanin formaliny z dodatkiem metali ciężkich (lit, rtęć) ani innych dodatków (cynk, EDTA, EGTA, roztwory kwasów).

Czas utrwalenia dla drobnego materiału wynosi od 8 do 48 godzin, a dla materiału dużego (np. cały narząd lub jego fragment) może być wydłużony do 72 godzin. Należy pamiętać, że czas utrwalenia liczony jest od momentu umieszczenia materiału w utrwalaczu aż do chwili jego dalszej „obróbki” w JDP. Oznacza to, że po pobraniu materiału i umieszczeniu w utrwalaczu należy go niezwłocznie dostarczyć do JDP w celu podjęcia dalszych działań technologicznych. Materiały o średnicy przekraczającej 2 cm są w JDP dodatkowo przekrawane w celu umożliwienia dostępu utrwalacza i właściwego zabezpieczenia całej objętości materiału tkankowego. Nie dopuszcza się utrwalenia materiału tkankowego poniżej 6 godzin, ponieważ ma to negatywny wpływ na możliwość uzyskania dobrych jakościowo preparatów przeznaczonych do rutynowego barwienia HE (hematoksylina i eozy-na) oraz ocenę wyników odczynów immunohistochemicznych, a także badań metodą hybrydyzacji fluorescencyjnej *in situ* (FISH, *fluorescence hybridization in situ*). Utrwalanie materiału powyżej 48 godzin może być natomiast związane z degradacją DNA oraz RNA, co może uniemożliwić wykonanie badania molekularnego lub — ze względu na suboptymalną „wartość” materiału genetycznego — znacznie je ograniczyć.

Po właściwym utrwaleniu i pobraniu odpowiednich — zgodnie z wytycznymi — fragmentów tkankowych, materiał podlega tak zwanemu przeprowadzeniu, czyli jest poddawany przeprowadzeniu w procesorze tkankowym. Obecnie należy stosować wyłącznie protokoły zautomatyzowane, zapewniające stałe i powtarzalne warunki procesu, gwarantujące odpowiednie zabezpieczenie materiału oraz zachowanie maksymalnie dobrego materiału do dalszych badań — między innymi immunohistochemicznych oraz z zakresu biologii molekularnej. Procedura „przeprowadzania” materiału musi doprowadzić do całkowitego odwodnienia materiału, co jest warunkiem właściwego zabezpieczenia.

Obecnie wprowadzane są protokoły bezkyslenowe, co zwiększa bezpieczeństwo pracy. Kolejnym etapem jest zatopienie materiału w parafinie. Mając na uwadze utrzymanie jak najlepszej jakości materiału genetycznego, materiał powinien być zatopiony w tak zwanej parafinie o niskiej temperaturze topnienia, to znaczy będącej w stanie płynnym w zakresie temperatury od 55 do 60 stopni Celsjusza.

Przedstawione powyżej szczegółowe wytyczne mają na celu zapewnienie optymalnej jakości materiału do badania patomorfologicznego. Odpowiednio przygotowany materiał może zostać wykorzystany do wykonania dodatkowych procedur (np. odczynów immunohistochemicznych) oraz do badań z zakresu biologii molekularnej (np. FISH) i — po odzyskaniu materiału genetycznego — także z wykorzystaniem reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR, *polymerase chain reaction*) oraz sekwencjonowania metodą Sangera lub sekwencjonowania kolejnej generacji (NGS, *next-generation sequencing*).

Jeżeli materiał zatopiony w parafinie ma zostać wykorzystany do badań materiału kwasów nukleinowych, należy pamiętać, że wybranie/wskazanie materiału odpowiedniego do dalszych procesów dokonuje patomorfolog, wskazując obszar w bloczku parafinowym (na podstawie oceny adekwatnego preparatu mikroskopowego), zawierający co najmniej 40% (według niektórych autorów 30%) utkania nowotworowego tak zwanego żywego (tzn. bez martwicy oraz zmian wstecznych). W kolejnym etapie wykonywane są czynności uwzględniające oczyszczenie powierzchni bloczka (96% roztworem etanolu), a następnie skrojenie 3–5 skrawków (lub więcej w przypadkach bloczków starszych niż 2 lata), które są utylizowane, a dopiero kolejne skrojenia (skrawki) są przeznaczone do badań molekularnych. Liczba i grubość skrawków do badań molekularnych zależy od „zawartości” utkania nowotworowego oraz potrzeb ilości izolowanego materiału. W celu uniknięcia kontaminacji obcym materiałem skrawanie materiału na potrzeby biologii molekularnej wykonuje się z każdorazową wymianą noża oraz wskazane jest stosowanie jednorazowych pojemników do przenoszenia materiału, a także eliminacja wykorzystania łaźni wodnej. Czynności należy wykonywać w odpowiednich rękawiczkach, a do celów dezynfekcyjnych nie stosuje się środków zawierających DNA-zę i/lub substancje wpływające na hamowanie reakcji PCR.

Wykorzystanie materiału archiwalnego

Po ogłoszeniu rozporządzenia Ministra Zdrowia w sprawie zasad organizacji ochrony zdrowia w dziedzinie patomorfologii [6] materiał w blocz-

kach parafinowych jest przechowywany 20 lat. Mając na uwadze zachowanie jak najlepszej jakości materiału, do ewentualnego przyszłego wykorzystania w terapii celowanej, zostały także określone warunki przechowywania. Dla blozków parafinowych optymalne warunki przechowywania określono w zakresie temperatury od 14 do 25 stopni Celsjusza, a wilgotność powietrza na poziomie 30–60% wilgotności względnej (RH, *relative humidity*) przy dobowym wahanii $\pm 5\%$ RH. Zachowanie wskazanych warunków jest kluczowe dla utrzymania jakości diagnostycznej materiału archiwalnego.

Kliniczne znaczenie mutacji genu *IDH1* w ostrej białaczce szpikowej

Ostra białaczka szpikowa jest agresywnym nowotworem układu krwiotwórczego, który charakteryzuje się niekontrolowaną i klonalną proliferacją niskozróżnicowanych komórek linii mieloidalnej [7]. Dynamiczny rozwój technik molekularnych — szczególnie wprowadzenie metody NGS — umożliwił lepsze poznanie mechanizmów leżących u podstaw patogenezy AML. Wyniki badań molekularnych wskazują, że AML jest nowotworem bardzo zróżnicowanym pod względem genetycznym, który ma u podłoża szereg powtarzalnych aberracji genomowych i epigenetycznych (m.in. regulatory cyklu komórkowego, kinazy, czynniki transkrypcyjne, kohezyny i tzw. regulatory epigenetyczne) [8].

Dehydrogenazy izocytrynianowe (*IDH1*, *IDH2*, *IDH3*) są grupą enzymów, które regulują metabolizm i adaptację do niedotlenienia komórki oraz są regulatorem epigenetycznym, którego zaburzone funkcje stwierdza się w AML [1]. W warunkach fizjologicznych izoforma *IDH3* generuje fosforan zredukowanego dinukleotydu nikotynamidoadeninowego (NADPH) w cyklu Krebsa, podczas gdy *IDH1* (izoforma zlokalizowana w cytoplazmie i peroksosomach) i *IDH2* (izoforma zlokalizowana w mitochondriach) katalizują dekarboksylację oksydacyjną izocytrynianu w celu wytworzenia α -ketoglutaranu (α -KG) i dwutlenku węgla oraz zredukowanego NADPH z NADP⁺, odgrywając kluczową rolę w utrzymaniu wewnątrzkomórkowej zmniejszonej puli glutationu i zachowaniu homeostazy komórkowej [9].

Mutacje w genie *IDH1* występują u około 7–14% chorych na AML i najczęściej obejmują substytucję argininy przez cysteinę lub histydynę w miejscu 132 (odpowiednio *R132C* i *R132H*) [1, 9, 10]. W wyniku mutacji *IDH1* lub *IDH2* dochodzi do zaburzenia regulacji cyklu Krebsa i wytwarzania D-2-hydroksyflu-

taranu (D-2HG), co powoduje zwiększoną metylację DNA i histonów, niestabilność genetyczną i zahamowanie różnicowania komórkowego, które sprzyjają samoodnowie komórek prekursorowych i nowotworowej transformacji. Mutacje *IDH1* są uważane za tak zwane mutacje kierujące (*driver mutations*), które odgrywają rolę w leukemogenezie i powstają na wczesnych etapach transformacji białaczkowej [1, 9, 10]. Warto zauważyć, że nabycie mutacji *IDH1* może sprzyjać transformacji zespołów mieodysplastycznych lub przewlekłych zespołów mieloproliferacyjnych do AML. Mutacje *IDH1* występują w prawie wszystkich podtypach AML wyróżnianych według klasyfikacji FAB (*French-American-British*). W porównaniu z AML bez mutacji *IDH*, chorzy z mutacjami są zazwyczaj starsi (mediana wieku 67 lat wobec 61 lat) i mają tendencję do większej liczby płytek krwi, wyższego odsetka blastów w szpiku kostnym i krwi obwodowej oraz głębszej neutropenii w chwili rozpoznania. Ponadto mutacje *IDH* są częściej obserwowane u chorych z prawidłowym kariotypem lub kariotypem pośredniego ryzyka (w tym z trisomią chromosomu 8 [1, 9]).

Prognostyczne znaczenie mutacji *IDH1* w AML nie jest jeszcze jednoznacznie określone, jednak w metaanalizie danych 12 747 chorych obecność mutacji *IDH1* wiązała się z gorszym przeżyciem całkowitym (OS, *overall survival*) i wolnym od zdarzeń (EFS, *event-free survival*) oraz mniejszym prawdopodobieństwem osiągnięcia całkowitej remisji (CR, *complete response*) [11].

Identyfikacja powtarzalnych aberracji genetycznych w AML umożliwiła wprowadzenie do badań klinicznych i praktyki wielu nowoczesnych związków i małych cząsteczek, które w sposób celowany blokują aktywowane szlaki sygnalizacyjne leżące u podłoża choroby. Wyniki badań przedklinicznych potwierdziły, że iwosydenib — selektywny inhibitor *IDH1* — skutecznie hamuje produkcję D2-HG w komórkach białaczkowych z mutacją *IDH1* i indukuje ich różnicowanie [12].

W prospektywnym badaniu I/IB fazy oceniono bezpieczeństwo i skuteczność iwosydenibu w monoterapii u chorych z oporną lub nawrotową AML (R/R AML, *relapsed/refractory AML*) z mutacją *IDH1*, którzy nie kwalifikowali się do intensywnej chemioterapii. Wykazano, że stosowanie iwosydenibu w dobowej dawce 500 mg doustnie było dobrze tolerowane i prowadziło do uzyskania trwałych odpowiedzi u 33% chorych oraz niezależnienia się od przetoczeń u 37% chorych [13]. U 34 chorych z nowo rozpoznaną AML i mutacją *IDH1*, którzy nie kwalifikowali się do standardowej terapii (mediana wieku 76,5 roku) i otrzymali iwosydenib, łączny

odsetek CR i CR z częściową regeneracją hematologiczną (CRh) wynosił 42,4%. Mediana czasu trwania CR + CRh nie została osiągnięta, przy czym 61,5% chorych pozostało w remisji ponad rok. Przy medianie czasu obserwacji 23,5 miesiąca mediana OS wynosiła 12,6 miesiąca. Klirens mutacji *IDH1* obserwowano u 9/14 chorych, którzy osiągnęli CR + CRh. Działania niepożądane odnotowane u co najmniej 25% uczestników badania obejmowały głównie: nudności, biegunkę, zmniejszenie apetytu, zmęczenie, obrzęki, leukocytozę, bóle stawów, bóle brzucha, duszność, zespół różnicowania i bóle mięśni [14]. Na podstawie powyższych wyników Amerykańska Agencja FDA (*Food and Drug Administration*) zatwierdziła iwosydenib do leczenia R/R AML i nowo rozpoznanej AML z mutacją *IDH1* u chorych w wieku ≥ 75 . roku życia lub z chorobami współistniejącymi wykluczającymi stosowanie intensywnej chemioterapii.

Połączenie iwosydenibu i azacytydyny wykazało zachęcającą aktywność kliniczną w badaniu fazy Ib z udziałem chorych z nowo rozpoznaną AML. W badaniu fazy III AGILE porównano skuteczność i bezpieczeństwo leczenia azacytydyną w skojarzeniu z IVO wobec azacytydyny i placebo u chorych nowo rozpoznaną AML z mutacją *IDH*, którzy nie kwalifikowali się do intensywnej chemioterapii indukcyjnej. Iwosydenib stosowano doustnie w jednorazowej dawce dobowej 500 mg w dniach od 1. do 28., a azacytydynę w dawce 75 mg/m² przez 7 dni w cyklach 28-dniowych. Pierwszorzędowym punktem końcowym było EFS (czas od randomizacji do niepowodzenia leczenia — to znaczy brak CR do 24. tygodnia, nawrotu lub śmierci z jakiegokolwiek przyczyny, w zależności od tego, co nastąpiło wcześniej). Przy medianie czasu obserwacji wynoszącej 12,4 miesiąca EFS było istotnie dłuższe w ramieniu z iwosydenibem i azacytydyną niż w grupie kontrolnej ($p = 0,002$). Mediana OS wynosiła 24 miesiące u chorych leczonych iwosydenibem i azacytydyną wobec 7,9 miesiąca w grupie kontrolnej ($p = 0,001$). Częste działania niepożądane stopnia 3. lub wyższego obejmowały gorączkę neutropeniczną i neutropenię. Zespół różnicowania dowolnego stopnia wystąpił u 14% chorych otrzymujących iwosydenib z azacytydyną wobec 8% w grupie kontrolnej [15]. Na podstawie wyników badania AGILE stosowanie iwosydenibu z azacytydyną jest obecnie rekomendowanym leczeniem I linii u chorych nowo rozpoznaną AML z mutacją *IDH*, którzy nie kwalifikują się do intensywnej chemioterapii indukcyjnej [7]. Obecnie trwają badania oceniające skuteczność iwosydenibu w skojarzeniu ze standardową chemioterapią indukującą 3 + 7.

Zasady diagnostyki mutacji genu *IDH1* w ostrej białaczce szpikowej

Diagnostyka genetyczna chorych z rozpoznaniem AML ma coraz większe znaczenie wobec obecnych kryteriów klasyfikacyjnych [16, 17] oraz nowych opcji terapeutycznych, w których zmutowane geny stają się przedmiotem terapii celowanej. Historyczne systemy rokownicze powstawały głównie na podstawie tak zwanych pierwotnych rearanżacji genetycznych, którymi są najczęściej „duże” aberracje materiału genetycznego na poziomie chromosomalnym (np. *RUNX1T1-RUNX1*, *CBFb-MYH11*, *PML-RARA*, monosomie i delecje m.in. chromosomu 5. i 7. i inne) [18]. Rozwój metod badań genetycznych, pozwalających określić aberracje DNA na poziomie pojedynczej zmutowanej zasady, umożliwił diagnostykę chorych na AML pod kątem tak zwanych wtórnych rearanżacji wewnątrzgenowych z uwzględnieniem mutacji punktowych (SNVs, *single-nucleotide variants*), mikrodelecji, inwersji, insercji, duplikacji, aberracji „indel” (CNA, *copy number alterations*). Przez ostatnie dekady złotym standardem w diagnostyce wewnątrzgenowych rearanżacji było sekwencjonowanie Sangera, które umożliwia rozpoznanie mutacji na poziomie jednej pary zasad z czułością zakładającą obecność 15–25% blastów z daną mutacją w badanym materiale. W ciągu ostatnich 10 lat obserwuje się jednak rozwój dodatkowych metod, które umożliwiają wysokowydajne i jednoczesne oznaczanie wielu genów z czułością przekraczającą dotychczasowy próg detekcji. Metoda NGS z zastosowaniem tak zwanych paneli diagnostycznych umożliwia wykrywanie danej mutacji w środowisku innych mutacji współwystępujących (*co-occurring mutations*) oraz ocenę ilościową poziomu występowania każdej mutacji (VAF, *variant allele frequency*). Wdrożenie metody NGS podczas rutynowego badania stanowiło przełom diagnostyczny w AML.

Wdrażanie nowych metod leczenia ukierunkowanego na zaburzenia genetyczne zakłada każdorazowo wdrożenie nowych standardów diagnostycznych. Konieczność możliwie jak najszybszego zastosowania leku (tzn. już w ramach leczenia indukcyjnego) nakłada na lekarza obowiązek przeprowadzenia badań w ramach tak zwanej krótkiej ścieżki diagnostycznej. Jednocześnie „krótkie okienko czasowe” od diagnostyki do podania leku dyktuje niejednokrotnie po stronie laboratoriów konieczność zastosowania mniej zaawansowanych technologii, które są w stanie sprostać czasowym

obostrzeniom. Celem niniejszego podrozdziału jest przybliżenie aktualnych standardów w dziedzinie diagnostyki mutacji genu *IDH1* u polskich chorych na AML opartych na międzynarodowych wytycznych. Podczas wyboru określonej metody — obok czynnika czasowego — istotne mogą być również uwarunkowania finansowe (dostępność aparatury i gotowość poniesienia kosztów zakupu odczynników w ramach systemu publicznej ochrony zdrowia). Proces diagnostyki mutacji *IDH1* rozpoczyna się od izolacji DNA z aspiratu szpiku (przy braku możliwości oceny szpiku źródłem materiału badanego może być krew obwodowa) pobranego w momencie ustalenia rozpoznania.

Sekwencjonowanie metodą Sanger

Pierwszą metodą — pod względem dostępności aparatury w polskich ośrodkach referencyjnych do spraw diagnostyki genetycznej w AML — jest sekwencjonowanie metodą Sanger. Granica czasu, wynosząca 48 godzin w przypadku wymienionej metody, teoretycznie jest możliwa do spełnienia. Startery swoiste dla eksonów 4. i 5. pozwalają na namnożenie fragmentu *IDH1* zawierającego kodon R132 (tab. 1) [19, 20]. Warto nadmienić, iż wymienione startery zostały wykorzystane

Tabela 1. Sekwencje starterów zastosowanych do oceny obecności mutacji genu *IDH1*

Rodzaj oligonukleotydu	Sekwencja 5'-3'
Starter sensowny (F)	CGGTCTTCAGAGAAGCCATT
Starter antysensowny (R)	TCACTGGTGTGTAGGTTATC

w wielośrodowym badaniu populacji polskich chorych z rozpoznaniem AML, które potwierdziło odsetek mutacji w genie *IDH1* u 7,5% osób [21]. Skład mieszaniny przedstawiono w tabeli 2. Reakcję przeprowadza się w następujących warunkach termicznych: wstępna denaturacja 94°C przez 5 minut, amplifikacja 94°C — 1 minuta, 60°C — 1 minuta, 72°C — 1 minuta, 35 cykli, końcowe wydłużanie 72°C — 7 minut. Wykrywanie produktu polimerazy i ocenę obecności mutacji genu *IDH1* można przeprowadzić za pomocą sekwencjonowania metodą Sanger w kapilarach sekwenatora ABI 3730 XL (*Applied Biosystems*). W reakcjach stosuje się zestaw ABI Prism BigDye Terminator (*Life Technologies*) oraz polimerazę AmpliTaq DNA, FS (*Life Technologies*). Otrzymane sekwencje można poddać analizie z wykorzystaniem oprogramowania *SequenceAnalysis* (*Applied Biosystems*) lub darmowego programu *Chromas* (*Technelysium*). Do analizy sugeruje się zastosowanie sekwencji referencyjnej genu *IDH1*: NM_005896.3. Zaletą zastosowania metody sekwencjonowania Sanger do oceny stanu genu *IDH1* jest dostępność, niewielki koszt oraz potencjalna możliwość otrzymywania wyników w warunkach „krótkiej ścieżki diagnostycznej”. Wady obejmują stosunkowo małą czułość reakcji (15–25%) oraz brak możliwości jednoczesnej oceny mutacji współtowarzyszących.

Reakcja łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym

Reakcja łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym (RT-PCR, *real-time polymerase chain reaction*) umożliwia szybką ocenę obecności

Tabela 2. Skład mieszaniny reakcyjnej zastosowanej do oceny obecności mutacji genu *IDH1*

Składnik mieszaniny	Stężenie początkowe	Objętość (μl)	Stężenie końcowe
H ₂ O		15,5	
Bufor PCR bez MgCl ₂	10 ×	2,5	1 ×
Roztwór GC	5 ×	1	1 ×
dNTP	10 mM	0,3	0,12 mM
MgCl ₂	25 mM	2	2 mM
Starter sensowny (F)	10 μM	0,5	0,2 μM
Starter antysensowny (R)	10 μM	0,5	0,2 μM
Polimeraza	5 U/μl	0,2	0,04 U/μl
DNA 50 ng		2,5	
Całkowita objętość reakcji		25	

mutacji i ilościowe oszacowanie (w szczególności cyfrowa PCR — *digital PCR*, dPCR). Warto wspomnieć, że FDA podczas zatwierdzania iwosydenibu w AML uznała jednocześnie zestaw dPCR (*Abbott*) za standardowy test diagnostyczny kwalifikujący do stosowania wymienionego leku. Czulość metody wynosi około 0,1%, czyli jest zdecydowanie wyższa niż sekwencjonowanie Sangera.

Inną wersją dPCR jest tak zwany *deep digital PCR*, który wykorzystuje technologię BEAM dPCR (*beads, emulsion, amplification, magnetics*). Zestaw OncoBEAM™ firmy *Sysmex Inostics Inc.* — dzięki połączeniu technologii emulsyjnego PCR z oceną cytofluometryczną produktów PCR — umożliwia wysoką czulość badania wynoszącą 0,02–0,04% ($2-4 \times 10^{-4}$) [13] i — oprócz wykorzystania w diagnostyce — nadaje się do monitorowania odpowiedzi chorych na leczenie.

Wyżej wymienione testy (szczególnie referencyjny test firmy *Abbott*) umożliwiają szybką ocenę i spełniają kryteria diagnostyki „krótkiej ścieżki”. Niewątpliwą ich zaletą jest możliwość wstępnego ustalenia VAF — obciążenia mutacją *IDH1* (*mutational burden*). Wadą natomiast jest większa cena odczynników oraz mniejsza dostępność do aparatury w ośrodkach diagnostycznych w Polsce.

Sekwencjonowanie kolejnej generacji

Sekwencjonowanie kolejnej generacji (NGS, *next-generation sequencing*) stało się przełomem i jest obecnie standardem diagnostycznym w AML, ponieważ umożliwia jednoczesną ocenę mutacji w wielu genach. Niestety, przeprowadzenie diagnostyki NGS zajmuje średnio około 4–6 tygodni, nie spełnia zatem wymogów diagnostyki „krótkiej ścieżki”, a jedynie pozwala na wykorzystanie otrzymanego wyniku do ustalenia leczenia postremisyjnego u chorych z AML. Ostatnio udostępniony przez firmę *ThermoFisher* zestaw *OncoPrint Dx Express Test* umożliwia uzyskanie wyniku w ciągu 24 godzin w całkowicie zautomatyzowanym protokole reakcji. Zestaw obejmuje panel genów, w którym obecny jest również gen *IDH1*, zatem nadaje się do ustalenia wskazań do leczenia ukierunkowanego podczas fazy indukcji. Należy zaznaczyć, iż panel genów obejmuje zestaw mutacji, dla których dostępne są obecnie leki celowane, których większość towarzyszy nowotworom litym. Obok zatem kryteriów czasowych oraz możliwości ilościowej oceny VAF badanie nie może zastąpić NGS z szerokim panelem genów „mieloidalnych”, których ocena wymagana jest do ustalenia ryzyka oraz decyzji na temat postępowania po remisji u chorych na AML. Zestaw może stanowić jednak

cenną alternatywę przesiewowej diagnostyki mutacji genu *IDH1* w pracowniach, w których podejmowana jest równoległa diagnostyka onkologiczna i hematologiczna.

Sekwencjonowanie Sangera jest obecnie masowo zastępowane przez badania NGS, ale w warunkach ograniczonego budżetu publicznej ochrony zdrowia metoda nie ulega dezaktualizacji i może być wykorzystywana w „krótkiej ścieżce diagnostycznej” podczas kwalifikowania do leczenia ukierunkowanego chorych z mutacją *IDH1*. Pracownie, które mają dostęp do aparatury dPCR, mają możliwość wyboru testu RT-PCR (np. firmy *Abbott*) uwzględniając — z jednej strony — droższy koszt odczynników i — z drugiej strony — większą czulość badania, możliwość oceny ilościowej wyjściowego VAF oraz monitorowania minimalnej choroby resztkowej. Jakakolwiek metoda została by wybrana w pracowni referencyjnej zajmującej się diagnostyką genetyczną AML — obok jej wdrożenia — należy wziąć pod uwagę konieczność przeprowadzenia procesu wieloosrodkowej standaryzacji. Procesowi standaryzacji podlegałyby nie tylko sam etap oceny jakościowej próbek, ale przede wszystkim aspekt logistyczny diagnostyki „krótkiej ścieżki” w warunkach praktyki klinicznej. W praktyce laboratoryjnej oznaczać to bowiem będzie konieczność wdrożenia nowych priorytetów rutynowej pracy, co wiąże się między innymi z czasowym wstrzymaniem jednych testów, aby móc podjąć się wykonywania tych, które mogą mieć znaczenie w wyborze spersonalizowanego leczenia indukcyjnego. Proces wdrożenia diagnostyki „krótkiej ścieżki” dla nowego markera zakłada również skoordynowanie współpracy między lekarzami i diagnostami na nowym poziomie, który powinien zakładać szybką wymianę informacji z podejmowaniem adekwatnych decyzji diagnostyczno-terapeutycznych. Dodatkowo, w momencie wdrażania nowych standardów terapeutycznych należy wziąć pod uwagę konieczność zapewnienia szerokiej dostępności leku. Wiąże się to ściśle z dostępnością testów molekularnych (w tym — badania mutacji *IDH1*). Biorąc pod uwagę wyniki szacunkowej oceny liczebności populacji AML w Polsce — przeprowadzonej w ramach projektu „Centralny Rejestr AML PALG — dla chorych, od których został pobrany materiał na badanie genetyczne — można uznać, iż liczba diagnozowanych przypadków z mutacją genu *IDH1* wynosi około 100 na 900 rozpoznań AML zarejestrowanych w bazie danych Stowarzyszenia ds. Leczenia Ostrych Białaczek Osób Dorosłych (PALG, *Polish Adult Leukemia Group*) w Polsce. Wskaźniki

zapadalności na AML w innych krajach (Niemcy, Szwecja), wskazują, iż realna populacja chorych na AML w Polsce powinna być zdecydowanie większa (ponad 2 razy), co przekłada się na ponad 200 przypadków z mutacjami *IDH1*. Dane te wyraźnie sugerują, że prawdopodobnie jedynie niecała połowa z występujących w Polsce przypadków AML podlega obecnie diagnostyce genetycznej. Badanie PALG wykazało, iż głównym powodem niekierowania na badania molekularne jest wiek chorych, co powinno zdecydowanie ulec zmianie wobec dostępności leków ukierunkowanych molekularnie stosowanych w ramach nieintensywnych protokołów indukcyjnych (np. iwosydenibu) przez podniesienie świadomości oraz zapewnienie dostępności do genetycznych testów przesiewowych dla wszystkich chorych.

Kliniczne znaczenie mutacji genu *IDH1* w raku dróg żółciowych

Rak dróg żółciowych wywodzi się z komórek nabłonka wewnątrz- lub zewnątrzwątrobowych przewodów żółciowych. Cechuje się on złym rokowaniem — mediana OS chorych z postacią zaawansowaną jest krótsza niż 2 lata, a odsetek przeżyć 5-letnich nie przekracza 10% [22]. Standardem postępowania w I linii leczenia chorych na miejscowo zaawansowanego, nieoperacyjnego lub uogólnionego CCA jest chemioterapia oparta na skojarzeniu cisplatyny i gemcytabiny — podstawą są między innymi wyniki badania ABC-02, w którym zastosowanie leczenia skojarzonego w odniesieniu do monoterapii gemcytabiną prowadziło do wydłużenia mediany OS o 3,6 miesiąca (11,7 wobec 8,1 miesiąca, zmniejszenie ryzyka zgonu o 36%, $p < 0,001$) [23]. Skojarzenie oksaliplatyny z gemcytabiną w leczeniu I linii u chorych z zaawansowanym CCA pozwalało na uzyskanie odsetka odpowiedzi wynoszącego w zależności od badania od 15 do 50% przy jednoczesnym, dość dobrym profilu toksyczności [23]. W przypadku chorych w gorszym stanie ogólnym monoterapię gemcytabiną pozostaje opcją terapeutyczną [23]. Wytyczne postępowania w II i kolejnych liniach leczenia nie zostały ostatecznie ustalone — wykorzystywane są schematy z udziałem oksaliplatyny i fluorouracylu (np. mFOLFOX). Obserwacje z badania fazy III ABC-06 wskazuje, że zastosowanie schematu mFOLFOX w stosunku do najlepszej opieki objawowej nie wiązało się z istotną poprawą mediany OS (6,2 wobec 5,3 miesiąca), ale stwierdzono większy odsetek chorych żyjących w obserwacji 6-miesięcznej (50,6% wobec 35,5%) oraz 12-miesięcznej

(25,9% wobec 11,4%) [23]. Korzyści z zastosowania w II linii leczenia schematów z irynotekaniem, docetakselem lub pochodnymi platyny są podobne — w przeglądzie wyników badań fazy II oraz analiz retrospektywnych wykazano, że mediana OS osiągała od 6,6 do 7,7 miesiąca, a mediana czasu przeżycia wolnego od progresji (PFS, *progression-free survival*) wynosiła 2,8 miesiąca i była zbliżona dla większości schematów [23].

Mutacje w genie kodującym dehydrogenazę izocytrynianową są jednym najczęstszych zaburzeń molekularnych u chorych z rozpoznaniem CCA — częstość szacowana jest na około 13%. Dane przedkliniczne jednoznacznie wskazują na ich rolę w procesie transformacji nowotworowej komórek nabłonka dróg żółciowych, co jest wynikiem bezpośredniego wpływu nieprawidłowych metabolitów na proliferację i różnicowanie progenitorowych komórek nabłonka [24]. Wystąpienie mutacji w genie *IDH1* i w konsekwencji zaburzenie funkcji dehydrogenazy prowadzi do nagromadzenia w komórkach 2-hydroksyglutaminianu, zmniejszenia stężenia α -KG i w konsekwencji pobudzenia szeregu procesów związanych z transformacją nowotworową. Blokowanie funkcji nieprawidłowego białka dehydrogenazy izocytrynianowej stanowi potencjalny cel leczenia ukierunkowanego molekularnie u chorych na CCA.

Iwosydenib jest wybiórczym inhibitorem hamującym funkcję nieprawidłowej formy dehydrogenazy izocytrynianowej, którego skuteczność wykazano między innymi w leczeniu chorych na AML z nawrotem choroby lub wykazujących oporność na dotychczasową terapię. Lek stanowi również opcję terapeutyczną dla chorych pierwotnie nieleczonych, którzy nie kwalifikują się do zastosowania intensywnej chemioterapii. Skuteczność i bezpieczeństwo stosowania iwosydenibu oceniano również u chorych na iCCA oraz zewnątrzwątrobowych dróg żółciowych (eCCA, *extrahepatic cholangiocarcinoma*). W badaniu I fazy wykazano, że zastosowanie iwosydenibu prowadziło do uzyskania PFS na poziomie 3,8 miesiąca, a bez progresji w obserwacjach 6- i 12-miesięcznych żyło — odpowiednio 40,1% i 21,8% chorych otrzymujących leczenie. Mediana OS wyniosła 13,8 miesiąca. Objawami niepożądanymi, których częstość obserwowano u przynajmniej 20% chorych otrzymujących iwosydenib były zmęczenie (3% w stopniu \geq G3), nudności (1% \geq G3), biegunka, ból brzucha (3% \geq G3), utrata apetytu, wymioty. Najczęstszymi działaniami niepożądanymi w stopniu 3. lub większym — obserwowanymi w przebiegu leczenia iwosydenibem — były wodbrzusze (5%), niedokrwistość (4%), zmęczenie (3%) [25]. Wyniki z badań faz wczesnych znalazły

swoje potwierdzenie w wielośrodkowym badaniu fazy III ClarIDHy, które oceniało skuteczność i bezpieczeństwo stosowania iwosydenibu u chorych na CCA [24]. Badaniem objęto chorych z potwierdzoną mutacją genu *IDH1*, u których z powodu choroby neresekcyjnej lub rozsianej zastosowano uprzednio nie więcej niż 2 linie leczenia. Obecność mutacji w genie *IDH1* potwierdzano przy użyciu NGS. Wcześniejsze wykonanie zabiegu embolizacji lub chemoembolizacji zmian w wątrobie nie stanowiło kryterium wyłączenia. Łącznie badaniem objęto 185 chorych przydzielanych losowo w stosunku 2 : 1 do ramienia z iwosydenibem w dawce 500 mg 1 × doustnie przez 28 dni lub placebo. Pierwszorzędowym punktem końcowym w badaniu był PFS w ocenie niezależnej, zaś drugorzędowe punkty końcowe stanowiły między innymi PFS w ocenie badacza, bezpieczeństwo stosowanego leczenia, OS, odsetek odpowiedzi obiektywnych oraz czas trwania odpowiedzi. Mediana PFS w ocenie niezależnej wyniosła 2,7 miesiąca w grupie chorych otrzymujących iwosydenib i była istotnie dłuższa od obserwowanej u chorych otrzymujących placebo (1,4 miesiąca, zmniejszenie ryzyka o 63%, $p < 0,0001$). W obserwacji 6- i 12-miesięcznej bez progresji żyło odpowiednio 32% i 22% chorych. W ramieniu z placebo żaden z chorych nie pozostawał bez progresji choroby przez okres 6 miesięcy lub dłuższy. Analiza w podgrupach wykazała podobną skuteczność leku badanego niezależnie od linii, w której został zastosowany. Mediana OS w populacji wszystkich chorych objętych badaniem wyniosła 10,8 miesiąca dla iwosydenibu oraz 9,7 miesiąca w ramieniu z placebo (zmniejszenie ryzyka zgonu o 31%, $p = 0,060$). Przeżycie całkowite w obserwacji 6- i 12-miesięcznej było udziałem 67% i 48% otrzymujących iwosydenib oraz 59% i 38% w grupie chorych przyjmujących placebo. Analizując wyniki dotyczące OS, należy pamiętać, że w badaniu tym u 70% chorych pierwotnie leczonych w ramieniu z placebo w chwili stwierdzenia progresji choroby zastosowano iwosydenib. Zastosowanie — w celu oceny mediany OS — analizy statystycznej uwzględniającej efekt migracji chorych między grupami w badaniu (RPSFT, *rank-preserving structural failure time*) wykazało istotne skrócenie mediany OS w ramieniu z placebo względem chorych otrzymujących lek badany (odpowiednio — 10,8 wobec 6,0 miesięcy; zmniejszenie ryzyka o 54%, $p = 0,0008$) [24]. W 2021 roku opublikowano aktualizację wyników dla OS [22]. W grupie chorych otrzymujących iwosydenib mediana OS wyniosła 10,3 miesiąca i była większa od stwierdzonej w grupie chorych pierwotnie otrzymujących placebo

(7,5 miesiąca; zmniejszenie ryzyka o 21%, $p = 0,09$). Po ponownym uwzględnieniu migracji chorych między grupami mediana OS chorych otrzymujących wyłącznie placebo wyniosła 5,1 miesiąca i była nieznacznie mniejsza od obserwowanej pierwotnie (6,0 miesięcy, co oznacza zmniejszenie ryzyka o 51% wobec 54% w pierwotnej publikacji).

Analiza odsetka odpowiedzi obiektywnych u chorych otrzymujących iwosydenib wykazała remisję częściową u 2% chorych oraz stabilizację procesu nowotworowego u kolejnych 51% chorych. W ramieniu kontrolnym nie stwierdzono remisji całkowitych lub częściowych, zaś stabilizacja procesu nowotworowego była udziałem 28% chorych. Mediana czasu trwania odpowiedzi wyniosła 2,8 miesiąca w ramieniu z iwosydenibem oraz 1,6 miesiąca w ramieniu z placebo [22]. Analiza profilu bezpieczeństwa leczenia nie ujawniła nowych działań niepożądanych o istotnym nasileniu. Najczęściej raportowanymi w badaniu działaniami niepożądanymi w stopniach 1. i 2. były nudności, biegunka oraz uczucie zmęczenia. Działania niepożądane w stopniu 3. lub wyższym wystąpiły u mniej niż połowy chorych z każdej grupy (46% w całej grupie otrzymującej iwosydenib wobec 36% dla placebo), przy czym najczęściej obserwowane było wodobrzusze (8% w całej grupie otrzymującej iwosydenib wobec 7% dla placebo). Konieczność przerwania leczenia z powodu toksyczności rzadziej obserwowano w całej grupie otrzymującej iwosydenib niż placebo (6% wobec 8%). Działania niepożądane prowadzące do zmniejszenia dawki leku (3% wobec 0%) lub czasowego wstrzymania leczenia występowały częściej w całej grupie otrzymującej iwosydenib niż dla placebo (odpowiednio — 26% i 17%). Wśród chorych otrzymujących iwosydenib w ciągu 30 dni od zastosowania ostatniej dawki zmarło 14 osób (12%) wobec 10 (17%) z grupy placebo, przy czym w ocenie badaczy zgony nie pozostawały w bezpośrednim związku z leczeniem. Wyniki stosowania iwosydenibu opublikowane na podstawie analiz danych z badania ClarIDHy korelują z wczesnymi obserwacjami z wykorzystywania leku w praktyce klinicznej w II lub trzeciej linii leczenia chorych na zaawansowanego CCA. Rimini i wsp. wykazali, że zastosowanie iwosydenibu prowadziło podczas 9-miesięcznej obserwacji do uzyskania mediany PFS wynoszącej 4,4 miesiąca [26]. W przypadku prowadzonych analiz nie osiągnięto mediany OS. Co ciekawe, w cytowanej pracy nie wykazano istotnych różnic w zakresie mediany PFS w zależności od linii, w której zastosowano leczenie (4,4 miesiąca — II linia i 4,3 miesiąca — III linia).

Zasady diagnostyki mutacji genu *IDH1* w raku dróg żółciowych

Dotychczas przeprowadzone badania w materiale genetycznym wyizolowanym z tkanki nowotworowej chorych z rozpoznaniem CCA pozwoliły na wykrycie wielu zmian genomowych [27]. Wśród patogennych i prawdopodobnie patogennych wariantów genetycznych u prawie 50% chorych z CCA występują zmiany, które mogą stanowić podstawę do podjęcia określonych decyzji terapeutycznych [28, 29]. Leki ukierunkowane molekularnie zostały zatwierdzone w postępowaniu w przypadku choroby nieresekcyjnej i przerzutowej lub w sytuacji progresji po wcześniejszym leczeniu [30], co uzasadnia — według aktualnych wytycznych *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN) — przeprowadzenie badań molekularnych mających na celu identyfikację wariantów punktowych, fuzji lub amplifikacji w genach *IDH1*, *FGFR2*, *BRAF*, *ERBB2*, *NTRK* i *RET* oraz analizę niestabilności mikrosatelitarnej (MSI, *microsatellite instability*) i gęstości mutacji somatycznych (TMB, *tumour mutation burden*) [4]. Dodatkowo, u chorych na CCA z pozytywnym wywiadem rodzinnym wskazane jest wykonanie badań mających na celu identyfikację wariantów germinalnych w genach *BRCA1/2* [30]. Ze względu na tak dużą liczbę potencjalnych biomarkerów — zgodnie z rekomendacjami Europejskiego Towarzystwa Onkologii Medycznej (ESMO, *European Society of Medical Oncology*) — do diagnostyki molekularnej chorych na CCA wskazane jest wykorzystywanie metody NGS [31].

Mutacje w genach *IDH1/2* wykrywane są u 10–30% chorych z rozpoznaniem iCCA oraz około 7% osób z eCCA, przy czym zdecydowaną większość identyfikowanych wariantów (do 90%) stanowią mutacje w genie *IDH1* [29, 32–36]. Należy również zauważyć, że większość wykrywanych zmian stanowią substytucje w kodonie p.R132 genu *IDH1* oraz p/Q140 i p.R172 genu *IDH2* [37]. Wśród mutacji w kodonie 132 genu *IDH1* najczęściej obserwowane są substytucje R132C, R132L, R132G, R132S, R132H (wykryte odpowiednio u 71%, 14%, 11%, 2% i 1,5% chorych) [22].

U chorych z CCA identyfikowane są również inne zmiany molekularne, które mogą mieć wpływ na leczenie tych osób [27, 38]:

- aberracje genów *FGFR* — zarówno amplifikacje, substytucje, jak i fuzje — identyfikowane w wielu nowotworach litych.

U chorych na CCA najczęściej jest identyfikowana fuzja genu *FGFR2* z *BICC1*, przy czym do dzisiaj wykryto ponad 150 partnerów fuzyjnych

genu *FGFR2*. Zaburzenia genów *FGFR1-3* są identyfikowane zdecydowanie częściej u osób z rozpoznaniem iCCA (10–14%) niż u chorych z eCCA (1%);

- amplifikacje genów: *ERBB2* (eCCA — 5–17%, iCCA — 4–8%), *MET* (eCCA — 1%, iCCA — 2–7%);
- mutacje punktowe w genach: *BRAF* (eCCA — 3–7%, iCCA — 3–7%), *PIK3CA* (eCCA — 5–7%, iCCA — 3–9%), *MET* (eCCA — 3–4%);
- fuzje genów: *NTRK* (eCCA — 4%, iCCA — 4%), *RET* (eCCA — ?%, iCCA — ?%).

Ze względu na pojawiające się możliwości leczenia zalecane jest również przeprowadzanie analiz molekularnych mających na celu identyfikację (MS) oraz określenie TMB [27, 30].

Do wykrycia wariantów punktowych w genach *IDH1*, *BRAF* oraz *PIK3CA* można wykorzystać PCR i sekwencjonowanie metodą Sangera. Natomiast identyfikację wariantów strukturalnych (np. amplifikacja lub fuzja genów *FGFR2*, *NTRK1-3*, *MET*, *RET*) można przeprowadzić przy użyciu metody FISH lub techniki MLPA (*multiplex ligation-dependent probe amplification*). Jeżeli dostępne możliwości terapeutyczne uzasadniają konieczność jednoczesnej analizy wielu różnych biomarkerów, to diagnostykę molekularną chorych z rozpoznaniem CCA można wykonać przy użyciu NGS [31]. Badanie metodą NGS pozwala na jednoczesną identyfikację punktowych i strukturalnych wariantów w genach *IDH1*, *FGFR2*, *NTRK1-3*, *BRAF*, *ERBB2*, *PIK3CA*, *MET* oraz *RET*. Możliwe jest również przeprowadzenie analizy całej sekwencji kodującej genów *BRCA1/2* oraz określenie MSI i TMB [27, 30, 31].

Diagnostyka molekularna chorych z rozpoznaniem CCA powinna być prowadzona w uznanych medycznych laboratoriach diagnostycznych lub pracowniach molekularnych zakładów patomorfologii posiadających odpowiedni personel, doświadczenie oraz sprzęt laboratoryjny niezbędny do przeprowadzenia wymaganych analiz.

Do badań molekularnych należy wykorzystać materiał tkankowy utrwalony w formalinie i zatopiony w parafinie [24, 25]. Materiał pozwala wówczas na identyfikację wariantów somatycznych w genach *IDH1*, *FGFR2*, *NTRK1-3*, *BRAF*, *ERBB2*, *PIK3CA*, *MET* i *RET* oraz germinalnych w genach *BRCA1/2* [27, 31]. Przed przystąpieniem do analiz molekularnych materiał tkankowy powinien podlegać ocenie patomorfologicznej pozwalającej na wybór optymalnej próbki zawierającej niezbędną liczbę komórek nowotworowych.

Do identyfikacji wariantów somatycznych można również wykorzystać krążące nowotwo-

rowe DNA (ctDNA, *circulating tumour DNA*) [27]. W tym przypadku, konieczne jest użycie dedykowanych próbek do pobierania krwi obwodowej chorych oraz odpowiednia preparatyka zabezpieczonego materiału. W badaniach można również wykorzystać kwasy nukleinowe wyizolowane z wymazu szczoteczki lub biopsji cienkoigłowej.

Podsumowanie

Leki ukierunkowane na cele molekularne są przyszłością postępowania przeciwnowotworowego, co szczególnie może dotyczyć sytuacji z ograniczonymi możliwościami konwencjonalnych metod (chemioterapia i hormonoterapia). Obecnie leki ukierunkowane molekularnie są najczęściej wykorzystywane podczas leczenia chorych na nowotwory w stadium zaawansowanym, ale coraz częściej stanowią część postępowania skojarzonego o założeniu radykalnym. Przykładem leku ukierunkowanego, którego wartość została potwierdzona na podstawie wyników prospektywnych badań, jest iwosydenib — jego stosowanie uzupełnia obecnie dostępne możliwości leczenia chorych na AML oraz CCA.

Właściwe wykorzystanie leków ukierunkowanych zależy od prawidłowej diagnostyki patomorfologicznej i molekularnej, która jest niezbędnym elementem kompleksowego postępowania. Bardzo istotne znaczenie ma odpowiednie pobranie i zabezpieczenie materiału tkankowego oraz zastosowanie właściwych metod diagnostycznych. Diagnostyka patomorfologiczna i molekularna powinna być sprawna i wykonana w określonych ramach czasowych, aby umożliwić szybkie rozpoczęcie leczenia. Konieczna jest ścisła współpraca klinicystów ze specjalistami w dziedzinach patomorfologii i biologii molekularnej.

Konflikt interesów

A.M.: nie zgłasza.

A.W.: granty naukowe — firma Jazz Pharmaceuticals; wykłady — firmy Abbvie, Astellas, BMS, Gilead, Janssen, Novartis, Pfizer, Servier; zespoły doradcze — firmy Abbvie, Astellas, BerGenBio, BMS, Gilead, Janssen, Novartis, Pfizer, Servier.

M.L.: firmy Abbvie, Novartis, Servier.

T.K.: wykłady i zespoły doradcze — firmy Roche, Gilead, BMS, MSD, AstraZeneca.

B.W.: wykłady i zespoły doradcze — firma Servier.

M.K.: wykłady i zespoły doradcze — Servier, BMS, Roche, AstraZeneca.

Piśmiennictwo

1. Montalban-Bravo G, DiNardo CD. The role of IDH mutations in acute myeloid leukemia. *Future Oncol.* 2018; 14(10): 979–993, doi: [10.2217/fon-2017-0523](https://doi.org/10.2217/fon-2017-0523), indexed in Pubmed: [29543066](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29543066/).
2. Boscoe AN, Rolland C, Kelley RK. Frequency and prognostic significance of isocitrate dehydrogenase 1 mutations in cholangiocarcinoma: a systematic literature review. *J Gastrointest Oncol.* 2019; 10(4): 751–765, doi: [10.21037/jgo.2019.03.10](https://doi.org/10.21037/jgo.2019.03.10), indexed in Pubmed: [31392056](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31392056/).
3. Obwieszczenie Ministra Zdrowia z dnia 24 września 2021 r. w sprawie standardów akredytacyjnych w zakresie udzielania świadczeń zdrowotnych oraz funkcjonowania jednostek diagnostyki patomorfologicznej. (Dz. Urz. Min. Zdr. 2021 r., poz. 75). http://dziennikmz.mz.gov.pl/DUM_MZ/2021/75/oryginal/akt.pdf (September 24, 2021).
4. Akredytacja w patomorfologii. https://zdrowie.gov.pl/power/strona-1001-akredytacja_w_patomorfologii.html (March 14, 2022).
5. Podręcznik wdrożeniowy. Wdrażanie standardów akredytacyjnych w jednostkach diagnostyki patomorfologicznej. Wskazówki i zalecenia. CMJ, Kraków 2022.
6. Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 18 grudnia 2017 r. w sprawie standardów organizacyjnych opieki zdrowotnej w dziedzinie patomorfologii. <https://isap.sejm.gov.pl/isap.nsf/Doc-Details.xsp?id=WDU20170002435> (December 12, 2017).
7. Döhner H, Wei AH, Appelbaum FR, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2022 recommendations from an international expert panel on behalf of the ELN. *Blood.* 2022; 140(12): 1345–1377, doi: [10.1182/blood.2022016867](https://doi.org/10.1182/blood.2022016867), indexed in Pubmed: [35797463](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35797463/).
8. Papaemmanuil E, Gerstung M, Bullinger L, et al. Genomic classification and prognosis in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 2016; 374(23): 2209–2221, doi: [10.1056/NEJMoa1516192](https://doi.org/10.1056/NEJMoa1516192), indexed in Pubmed: [27276561](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27276561/).
9. Cerchione C, Romano A, Daver N, et al. IDH1/IDH2 Inhibition in acute myeloid leukemia. *Front Oncol.* 2021; 11: 639387, doi: [10.3389/fonc.2021.639387](https://doi.org/10.3389/fonc.2021.639387), indexed in Pubmed: [33898313](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33898313/).
10. Desai P, Mencia-Trinchant N, Savenkov O, et al. Somatic mutations precede acute myeloid leukemia years before diagnosis. *Nat Med.* 2018; 24(7): 1015–1023, doi: [10.1038/s41591-018-0081-z](https://doi.org/10.1038/s41591-018-0081-z), indexed in Pubmed: [29988143](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29988143/).
11. Xu Q, Li Y, Lv Na, et al. Correlation between isocitrate dehydrogenase gene aberrations and prognosis of patients with acute myeloid leukemia: a systematic review and meta-analysis. *Clin Cancer Res.* 2017; 23(15): 4511–4522, doi: [10.1158/1078-0432.CCR-16-2628](https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-2628), indexed in Pubmed: [28246275](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28246275/).
12. Popovici-Muller J, Lemieux RM, Artin E, et al. Discovery of AG-120 (ivosidenib): a first-in-class mutant IDH1 inhibitor for the treatment of IDH1 mutant cancers. *ACS Med Chem Lett.* 2018; 9(4): 300–305, doi: [10.1021/acsmchemlett.7b00421](https://doi.org/10.1021/acsmchemlett.7b00421), indexed in Pubmed: [29670690](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29670690/).
13. DiNardo CD, Stein EM, Botton Sde, et al. Durable remissions with ivosidenib in IDH1-mutated relapsed or refractory AML. *N Engl J Med.* 2018; 378(25): 2386–2398, doi: [10.1056/nejmoa1716984](https://doi.org/10.1056/nejmoa1716984).
14. Roboz GJ, DiNardo CD, Stein EM, et al. Ivosidenib induces deep durable remissions in patients with newly diagnosed IDH1-mutant acute myeloid leukemia. *Blood.* 2020; 135(7): 463–471, doi: [10.1182/blood.2019002140](https://doi.org/10.1182/blood.2019002140), indexed in Pubmed: [31841594](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31841594/).
15. Montesinos P, Recher C, Vives S, et al. Ivosidenib and azacitidine in IDH1-mutated acute myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 2022;

- 386(16): 1519–1531, doi: [10.1056/NEJMoa2117344](https://doi.org/10.1056/NEJMoa2117344), indexed in Pubmed: [35443108](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35443108/).
16. Arber DA, Orazi A, Hasserjian RP, et al. International Consensus Classification of Myeloid Neoplasms and Acute Leukemias: integrating morphologic, clinical, and genomic data. *Blood*. 2022; 140(11): 1200–1228, doi: [10.1182/blood.2022015850](https://doi.org/10.1182/blood.2022015850), indexed in Pubmed: [35767897](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35767897/).
 17. Döhner H, Wei AH, Appelbaum FR, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2022 recommendations from an international expert panel on behalf of the ELN. *Blood*. 2022; 140(12): 1345–1377, doi: [10.1182/blood.2022016867](https://doi.org/10.1182/blood.2022016867), indexed in Pubmed: [35797463](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35797463/).
 18. Grimwade D, Hills RK, Moorman AV, et al. National Cancer Research Institute Adult Leukaemia Working Group. Refinement of cytogenetic classification in acute myeloid leukemia: determination of prognostic significance of rare recurring chromosomal abnormalities among 5876 younger adult patients treated in the United Kingdom Medical Research Council trials. *Blood*. 2010; 116(3): 354–365, doi: [10.1182/blood-2009-11-254441](https://doi.org/10.1182/blood-2009-11-254441), indexed in Pubmed: [20385793](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20385793/).
 19. Tefferi A, Lasho TL, Abdel-Wahab O, et al. IDH1 and IDH2 mutation studies in 1473 patients with chronic-, fibrotic- or blast-phase essential thrombocythemia, polycythemia vera or myelofibrosis. *Leukemia*. 2010; 24(7): 1302–1309, doi: [10.1038/leu.2010.113](https://doi.org/10.1038/leu.2010.113).
 20. Abbas S, Lugthart S, Kavelaars FG, et al. Acquired mutations in the genes encoding IDH1 and IDH2 both are recurrent aberrations in acute myeloid leukemia: prevalence and prognostic value. *Blood*. 2010; 116(12): 2122–2126, doi: [10.1182/blood-2009-11-250878](https://doi.org/10.1182/blood-2009-11-250878), indexed in Pubmed: [20538800](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20538800/).
 21. Libura M, Białopiotrowicz E, Giebel S, et al. IDH2 mutations in patients with normal karyotype AML predict favorable responses to daunorubicin, cytarabine and cladribine regimen. *Sci Rep*. 2021; 11(1): 10017, doi: [10.1038/s41598-021-88120-y](https://doi.org/10.1038/s41598-021-88120-y), indexed in Pubmed: [33976256](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33976256/).
 22. Zhu AX, Macarulla T, Javle MM, et al. Final overall survival efficacy results of ivosidenib for patients with advanced cholangiocarcinoma with IDH1 mutation: the phase 3 randomized clinical ClarIDHy trial. *JAMA Oncol*. 2021; 7(11): 1669–1677, doi: [10.1001/jamaoncol.2021.3836](https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2021.3836), indexed in Pubmed: [34554208](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34554208/).
 23. Elvevi A, Laffusa A, Scaravaglio M, et al. Clinical treatment of cholangiocarcinoma: an updated comprehensive review. *Ann Hepatol*. 2022; 27(5): 100737, doi: [10.1016/j.aohep.2022.100737](https://doi.org/10.1016/j.aohep.2022.100737), indexed in Pubmed: [35809836](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35809836/).
 24. Abou-Alfa GK, Macarulla T, Javle M, et al. Ivosidenib in IDH1-mutant, chemotherapy-refractory cholangiocarcinoma (ClarIDHy): a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 study. *Lancet Oncol*. 2020; 21(6): 796–807, doi: [10.1016/S1470-2045\(20\)30157-1](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(20)30157-1).
 25. Lowery MA, Burris HA, Janku F, et al. Safety and activity of ivosidenib in patients with IDH1-mutant advanced cholangiocarcinoma: a phase 1 study. *Lancet Gastroenterol Hepatol*. 2019; 4(9): 711–720, doi: [10.1016/S2468-1253\(19\)30189-X](https://doi.org/10.1016/S2468-1253(19)30189-X), indexed in Pubmed: [31300360](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31300360/).
 26. Rimini M, Burgio V, Antonuzzo L, et al. Real-world data on ivosidenib in patients with previously treated isocitrate dehydrogenase 1-mutated intrahepatic cholangiocarcinomas: an early exploratory analysis. *Target Oncol*. 2022; 17(5): 591–596, doi: [10.1007/s11523-022-00917-7](https://doi.org/10.1007/s11523-022-00917-7), indexed in Pubmed: [36114954](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36114954/).
 27. Normanno N, Martinelli E, Melisi D, et al. Role of molecular genetics in the clinical management of cholangiocarcinoma. *ESMO Open*. 2022; 7(3): 100505, doi: [10.1016/j.esmoop.2022.100505](https://doi.org/10.1016/j.esmoop.2022.100505), indexed in Pubmed: [35696744](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35696744/).
 28. Lowery MA, Ptashkin R, Jordan E, et al. Comprehensive molecular profiling of intrahepatic and extrahepatic cholangiocarcinomas: potential targets for intervention. *Clin Cancer Res*. 2018; 24(17): 4154–4161, doi: [10.1158/1078-0432.CCR-18-0078](https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-0078), indexed in Pubmed: [29848569](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29848569/).
 29. Silverman IM, Hollebecque A, Friboulet L, et al. Clinicogenomic analysis of FGFR2-rearranged cholangiocarcinoma identifies correlates of response and mechanisms of resistance to pemigatinib. *Cancer Discov*. 2021; 11(2): 326–339, doi: [10.1158/2159-8290.CD-20-0766](https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-20-0766), indexed in Pubmed: [33218975](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33218975/).
 30. National Comprehensive Cancer Network (NCCN). NCCN clinical practice guidelines in oncology: hepatobiliary cancers v3. https://www.nccn.org/login?ReturnURL=https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/hepatobiliary.pdf (October, 2022).
 31. Mosele F, Remon J, Mateo J, et al. Recommendations for the use of next-generation sequencing (NGS) for patients with metastatic cancers: a report from the ESMO Precision Medicine Working Group. *Ann Oncol*. 2020; 31(11): 1491–1505, doi: [10.1016/j.annonc.2020.07.014](https://doi.org/10.1016/j.annonc.2020.07.014), indexed in Pubmed: [32853681](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32853681/).
 32. Pellino A, Loupakis F, Cadamuro M, et al. Precision medicine in cholangiocarcinoma. *Transl Gastroenterol Hepatol*. 2018; 3: 40, doi: [10.21037/tgh.2018.07.02](https://doi.org/10.21037/tgh.2018.07.02), indexed in Pubmed: [30148225](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30148225/).
 33. Bekaii-Saab TS, Bridgewater J, Normanno N. Practical considerations in screening for genetic alterations in cholangiocarcinoma. *Ann Oncol*. 2021; 32(9): 1111–1126, doi: [10.1016/j.annonc.2021.04.012](https://doi.org/10.1016/j.annonc.2021.04.012), indexed in Pubmed: [33932504](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33932504/).
 34. Simbolo M, Fassan M, Ruzzenente A, et al. Multigene mutational profiling of cholangiocarcinomas identifies actionable molecular subgroups. *Oncotarget*. 2014; 5(9): 2839–2852, doi: [10.18632/oncotarget.1943](https://doi.org/10.18632/oncotarget.1943), indexed in Pubmed: [24867389](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24867389/).
 35. Kipp BR, Voss JS, Kerr SE, et al. Isocitrate dehydrogenase 1 and 2 mutations in cholangiocarcinoma. *Hum Pathol*. 2012; 43(10): 1552–1558, doi: [10.1016/j.humpath.2011.12.007](https://doi.org/10.1016/j.humpath.2011.12.007), indexed in Pubmed: [22503487](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22503487/).
 36. Simbolo M, Vicentini C, Ruzzenente A, et al. Genetic alterations analysis in prognostic stratified groups identified TP53 and ARID1A as poor clinical performance markers in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Sci Rep*. 2018; 8(1): 7119, doi: [10.1038/s41598-018-25669-1](https://doi.org/10.1038/s41598-018-25669-1), indexed in Pubmed: [29740198](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29740198/).
 37. Waitkus MS, DiPas BH, Yan H. Biological role and therapeutic potential of IDH mutations in cancer. *Cancer Cell*. 2018; 34(2): 186–195, doi: [10.1016/j.ccell.2018.04.011](https://doi.org/10.1016/j.ccell.2018.04.011), indexed in Pubmed: [29805076](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29805076/).
 38. De Luca A, Esposito Abate R, Rachiglio AM, et al. FGFR fusions in cancer: from diagnostic approaches to therapeutic intervention. *Int J Mol Sci*. 2020; 21(18), doi: [10.3390/ijms21186856](https://doi.org/10.3390/ijms21186856), indexed in Pubmed: [32962091](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32962091/).