

## Prawne i metodologiczne aspekty genetycznych testów diagnostycznych w kwalifikacji chorych na nowotwory do terapii ukierunkowanych molekularnie

Paweł Krawczyk<sup>1</sup>, Tomasz Kucharczyk<sup>1, 5</sup>, Janusz Limon<sup>2</sup>, Rafał Dziadziuszko<sup>3</sup>, Janusz Milanowski<sup>1, 4</sup>, Jacek Jassem<sup>3</sup>

Wprowadzenie w onkologii nowych terapii ukierunkowanych molekularnie spowodowało powstanie wielu laboratoriów, które zajmują się wykrywaniem somatycznych mutacji w komórkach nowotworowych, na podstawie których kwalifikuje się chorych do różnych rodzajów leczenia. Funkcjonowanie takich laboratoriów powinno być regulowane przez ścisłe przepisy prawne uwzględniające sposoby ich zarządzania, wymogi personalne i lokalowe oraz wyposażenie w certyfikowaną aparaturę, a testy genetyczne stosowane w diagnostyce *in vitro* powinny zawierać znak CE/IVD. Niestety, polskie laboratoria genetyczne, z powodu braku rozwiązań związanych z finansowaniem terapeutycznych programów lekowych w chorobach nowotworowych, działają często niezgodnie z niektórymi przepisami. Równocześnie w ostatnich latach rozwinęły się nowe techniki biologii molekularnej i cytogenetyki (*real-time* PCR, FISH), które w łatwy i coraz tańszy sposób umożliwiają wiarygodne wykrycie takich zaburzeń genetycznych, jak mutacje w eksonach 18–21 genu *EGFR*, określające grupę chorych, u których stosuje się inhibitory kinazy EGFR w niedrobnokomórkowym raku płuca, mutacje w kodonach 12, 13 i 61 genu *KRAS* związane z małą skutecznością przeciwciał anti-EGFR w raku jelita grubego czy nadmierna liczba kopii genu *HER2* warunkująca skuteczność terapii anti-HER2 w raku piersi.

### Legal and methodological aspects of genetic diagnostic tests used to select cancer patients to molecularly targeted therapies

Introduction of novel molecularly targeted therapies resulted in rapid development of diagnostic laboratories focused on detection of somatic mutations in tumour cells that allow selection of patients to particular treatments. Such laboratories should function according to strict legislation, including their management, working space, personnel requirements and certified equipment, and use genetic tests dedicated to *in vitro* diagnostics (CE/IVD marking). Unfortunately, several Polish genetic laboratories do not meet these requirements, mainly owing to the lack of financing mechanisms for therapeutic drug programs in cancer. At the same time, new reliable techniques of molecular and cytogenetic diagnostics, such as *real-time* PCR and FISH have been developed. These methods provide simpler and cheaper means of detecting several genetic abnormalities, such as exon 18–21 mutations of *EGFR* gene, defining group of non-small cell lung cancer patients who benefit from EGFR tyrosine kinase inhibitors mutations in codons 12, 13 and 61 of *KRAS* gene, associated with lower effectiveness of anti-EGFR antibodies in colorectal cancer, or *HER2* gene amplification, predictive of the efficacy of anti-HER2 therapies in breast cancer.

NOWOTWORY Journal of Oncology 2013; 63, 1: 1–7

**Słowa kluczowe:** przepisy prawne, nowotwory złośliwe, testy genetyczne, terapie ukierunkowane molekularnie, mutacje kierujące

**Key words:** legislation, malignant neoplasms, genetic tests, molecularly targeted therapies, driver mutations

<sup>1</sup>Katedra i Klinika Pneumonologii, Onkologii i Alergologii, Uniwersytet Medyczny w Lublinie

<sup>2</sup>Katedra i Zakład Biologii i Genetyki, Gdański Uniwersytet Medyczny

<sup>3</sup>Katedra i Klinika Onkologii i Radioterapii, Gdański Uniwersytet Medyczny

<sup>4</sup>Institut Medycyny Wsi w Lublinie

<sup>5</sup>Studium Medycyny Molekularnej, Warszawski Uniwersytet Medyczny

## Wprowadzenie

Znajomość sekwencji ludzkiego genomu i poznanie różnych jego wariantów — mutacji lub polimorfizmów — pozwoliło na wykrycie przyczyn wielu chorób o podłożu genetycznym, a także nowych czynników predykcyjnych (warunkujących skuteczność leczenia) oraz prognostycznych (związanych z przebiegiem choroby). Wyniki badań w dziedzinie farmakogenetyki sprawiły, że co roku powstają dziesiątki leków ukierunkowanych molekularnie, z których znacząca część znajduje zastosowanie w leczeniu chorób nowotworowych. Terapie te ukierunkowane są na wadliwe białka, odgrywające zasadniczą rolę w przekazywaniu sygnałów do aktywacji i proliferacji komórek nowotworowych. Nieprawidłowa (zazwyczaj nadmierna) funkcja białka uwarunkowana jest mutacją genetyczną. Często tzw. mutacje kierujące (*driver mutations*) w komórkach nowotworowych są jedynym zaburzeniem genetycznym warunkującym rozwój nowotworu. W takim przypadku zablokowanie nieprawidłowego szlaku sygnałowego skutkuje zahamowaniem rozwoju komórek nowotworowych posiadających określone mutacje genetyczne. Wiele guzów nowotworowych wykazuje jednak heterogenność, co oznacza, że zawierają one różne klony komórkowe — wrażliwe i niewrażliwe na działanie leków ukierunkowanych molekularnie. Celem testów genetycznych jest zatem wykrycie zarówno mutacji warunkujących wrażliwość, jak i oporność komórek nowotworowych na terapie ukierunkowane molekularnie. Oznacza to, że bez wykonania tych testów właściwa kwalifikacja chorych do leczenia ukierunkowanego molekularnie jest niemożliwa.

## Regulacje prawne dotyczące genetycznych laboratoriów diagnostycznych

Do najważniejszych stosowanych obecnie metod w diagnostyce genetycznej chorób nowotworowych należy sekwencjonowanie DNA, *real-time* PCR oraz metody hybrydyzacji *in situ* (*in situ* hybrydyzacja — ISH), przy czym w rutynowej diagnostyce najczęściej stosuje się *real-time* PCR i FISH (*fluorescent in situ* hybrydyzacja). Do metod tych przygotowano szereg molekularnych testów diagnostycznych.

Czym jednak są testy diagnostyczne? Dyrektywa unijna 98/79/EC z 27 października 1998 roku opisuje urządzenia diagnostyczne *in vitro* jako „dowolny wyrób, który jest odczynnikiem, produktem odczynnika, wzorcem, materiałem kontrolnym, zestawem, przyrządem, aparaturą, urządzeniem lub systemem stosowanym samodzielnie lub w połączeniu, przewidzianym przez wytwórcę do stosowania *in vitro* w celu badania próbek, w tym krwi i tkanek dawcy pochodzących z ciała ludzkiego, wyłącznie lub głównie w celu dostarczenia informacji dotyczących stanu fizjologicznego lub patologicznego lub dotyczącej wrodzonej nieprawidłowości, lub określenia bezpieczeństwa i zgodności z potencjalnym biorcą, a także monitorowania środków terapeutycznych” [1].

Testy diagnostyczne stosowane w diagnostyce molekularnej należą właśnie do tej grupy i ich legalne stosowanie wymaga posiadania przez nie świadectwa dopuszczenia na rynek medyczny w danym kraju oraz na terenie Unii Europejskiej. Podobnie, aby rozpoznanie postawione na podstawie testu mogło być uznane za wiarygodne i wykorzystane w celu zakwalifikowania chorego do odpowiedniej terapii ukierunkowanej molekularnie, test ten powinien być poddany odpowiedniej walidacji i dopuszczony do stosowania poprzez oznaczenie go znakiem CE/IVD (*in vitro* diagnostics), co oznacza spełnienie warunków wspomnianej dyrektywy. Niezależnie od tego, aby cała procedura diagnostyczna była prawidłowo przeprowadzona, również urządzenia oraz oprogramowanie, jakie będą używane w tym procesie, muszą być zatwierdzone do diagnostyki *in vitro*, a co za tym idzie, powinny posiadać także oznaczenia CE/IVD. Wszystkie urządzenia muszą być „zaprojektowane i wyprodukowane w taki sposób, że gdy będą stosowane zgodnie z warunkami i przeznaczeniem, nie będą zagrażały bezpośrednio lub pośrednio warunkom klinicznym ani bezpieczeństwu pacjentów, bezpieczeństwu lub zdrowiu użytkowników” [1]. Europejskie Stowarzyszenie Producentów Diagnostycznych (*European Diagnostic Manufacturers Association* — EDMA) jest ciałem, które reprezentuje przemysł IVD na terenie UE [2]. EDMA wyznacza producenta urządzeń IVD jako producenta instrumentów analitycznych i odczynników dla testów IVD. W Polsce poza nadrzędną dyrektywą unijną obowiązuje również ustawa o wyrobach medycznych z dnia 20 maja 2010 (Dz.U.10.107.679) [3], która opisuje między innymi zasady wprowadzania do obrotu i użytkowania wyrobów medycznych do diagnostyki *in vitro*.

W tym miejscu można zadać pytanie: czy testy ze znakiem CE/IVD są rzeczywiście niezbędne w kwalifikacji chorych do terapii ukierunkowanej molekularnie, czy też są narzucone wymogami prawa? Stosowane dotychczas przez wiele laboratoriów tanie metody molekularne, opracowywane w poszczególnych ośrodkach, charakteryzują się różną czułością i swoistością, a także małą powtarzalnością wyników. Natomiast chory ma prawo i musi otrzymać wiarygodny wynik badania genetycznego w kwalifikacji do leczenia. Istnieje zatem konieczność wprowadzenia certyfikowanych testów diagnostycznych, zapewniających — przy zrealizowaniu wszystkich innych wymogów funkcjonowania laboratoriów — rzetelny i obiektywny wynik badania genetycznego. Nieprawidłowy wynik tego badania pociąga bowiem za sobą poważne konsekwencje. Z jednej strony chory może zostać nieprawidłowo zakwalifikowany do kosztownej terapii ukierunkowanej molekularnie, co opóźni lub uniemożliwi zastosowanie właściwego leczenia i narazi go na powikłania, z drugiej — mimo predyspozycji genetycznej — może nie zostać zakwalifikowany do tej terapii i otrzyma mniej skuteczne, potencjalnie toksyczne leczenie.

Badania diagnostyczne z wykorzystaniem genetycznych testów ze znakiem CE/IVD mogą być wykonywane wyłącznie w odpowiednio do tego przystosowanych pracowniach oraz przez osoby uprawnione do prowadzenia tego rodzaju działalności. Testy genetyczne mogą być wykonywane przez diagnostów laboratoryjnych lub przez techników, pod bezpośrednim nadzorem i po zweryfikowaniu wyniku badania przez diagnostów laboratoryjnych. Wymagania do uzyskania uprawnień diagnosty laboratoryjnego, jego kompetencje i obowiązki, opisuje ustawa o diagnostyce laboratoryjnej z dnia 27 lipca 2001 roku (Dz.U.01.100.1083) [4] wraz z kolejnymi nowelizacjami, a ciałem sprawującym nadzór nad pracą diagnostów jest Krajowa Izba Diagnostów Laboratoryjnych (KIDL) [5], która dopuszcza do wykonywania tego zawodu osoby odpowiednio przeszkolone. Natomiast ogólne standardy, które musi spełnić laboratorium genetyczne, reguluje ustawa w sprawie wymagań, jakim powinno odpowiadać medyczne laboratorium diagnostyczne z dnia 3 marca 2004 (Dz.U.04.43.408) [6]. Ustawa ta nie tylko omawia strukturę, wyposażenie oraz wymagania lokalowe laboratorium, ale również przedstawia wymagania kadrowe dla takiej placówki. Szczegółowy opis zasad funkcjonowania laboratorium genetyki medycznej, w którym powinny być przeprowadzane genetyczne testy diagnostyczne, reguluje załącznik 4 do rozporządzenia Ministra Zdrowia w sprawie standardów jakości dla medycznych laboratoriów diagnostycznych i mikrobiologicznych z dnia 23 marca 2006 [7]. Załącznik ten omawia „standardy jakości w zakresie czynności laboratoryjnej genetyki medycznej, oceny ich jakości i wartości diagnostycznej oraz laboratoryjnej interpretacji i autoryzacji wyniku badań”.

Laboratorium takie nie tylko musi znajdować się w ewidencji laboratoriów prowadzonym przez Krajową Radę Diagnostów Laboratoryjnych, ale także w rejestrze podmiotów wykonujących działalność leczniczą, prowadzonym przez odpowiedniego wojewodę. Najważniejszym punktem wymagań personalnych stawianym laboratorium genetycznym jest pełnienie funkcji kierownika laboratorium przez diagnostę ze specjalizacją z laboratoryjnej genetyki medycznej. Należy przy tym zwrócić uwagę na niezbyt precyzyjny zapis dotyczący konieczności przeprowadzania przez laboratoria kontroli wewnętrznej i zewnętrznej procedur diagnostycznych oraz udziału w programach walidacji wyników testów genetycznych. O ile większość laboratoriów wykonujących rutynową diagnostykę laboratoryjną spełnia takie wymagania, a także wdraża system zarządzania zgodny z normą PN-EN ISO/IEC 17025 [8] „Ogólne wymagania dotyczące kompetencji laboratoriów badawczych i wzorcujących”, to laboratoria genetyczne zajmujące się diagnostyką nowotworowych guzów litych nie zawsze posiadają certyfikaty akredytacji wydane przez Polskie Centrum Akredytacji. W Polsce trwa obecnie dyskusja nad możliwością sprawo-

wania realnej kontroli nad sposobem funkcjonowania genetycznych laboratoriów diagnostycznych.

Genetyczne laboratorium diagnostyczne wykorzystujące certyfikowane testy genetyczne musi być także wyposażone w certyfikowany sprzęt, dzięki któremu możliwe będzie przeprowadzenie oznaczenia. Jak już wspomniano, najczęściej stosowaną metodą do oznaczania mutacji w komórkach nowotworowych jest *real-time* PCR, opierający się na klasycznej metodzie łańcuchowej reakcji polimerazy, jednakże z możliwością śledzenia na bieżąco zmian ilości powstającego produktu. Pozwala on na szybką i względnie prostą analizę materiału genetycznego, co bardzo usprawnia pracę laboratorium genetycznego. Co więcej, metody oparte na technologii *real-time* PCR, wykorzystujące specyficzne sondy molekularne znakowane fluorochromami, charakteryzują się wysoką czułością. Producenci zestawów deklarują zwykle, że metody te pozwalają wykryć mutacje w sytuacji istnienia w badanej próbce 0,1–1% nowotworowego DNA, podczas gdy metoda sekwencjonowania bezpośredniego wymaga obecności niemal 50% komórek nowotworowych. Na rynku dostępnych jest wiele aparatów przeznaczonych do *real-time* PCR, ale nie każdy z nich może być wykorzystany w wymaganych przez laboratorium warunkach. Takie urządzenie, podobnie jak sam test, musi posiadać dopuszczenie do stosowania w branży IVD i większość producentów posiada w swojej ofercie co najmniej jeden taki aparat. Pośród najbardziej znanych należy wymienić Applied Biosystems® 7500 Fast Dx Real-Time PCR (Applied Biosystems, USA), LightCycler® 2.0 Real-Time PCR System, Cobas® TaqMan™ 48 (Roche Diagnostics, Szwajcaria), Rotor-Gene Q® MDx (Qiagen, Anglia), a także m2000® Real Time System (Abbott Molecular, Stany Zjednoczone). Istnieją także sekwenatory i mikroskopy fluorescencyjne, które mogą być wykorzystywane w diagnostyce *in vitro*. Każde z wymienionych urządzeń ma również własne, dostosowane do wymagań dyrektywy unijnej oprogramowanie, które umożliwia szybką analizę zebranych danych. Dyskusyjna jest natomiast możliwość zastosowania testów genetycznych ze znakiem CE/IVD różnych producentów na tym samym urządzeniu. Wymóg stosowania testu na ściśle przeznaczonym do niego urządzeniu może doprowadzić do paradoksu konieczności posiadania kilku niemal identycznie działających aparatów w jednym laboratorium, co zwiększy koszty prowadzenia badań molekularnych. Z drugiej strony, badaniom klinicznym nowych leków ukierunkowanych molekularnie towarzyszy powstawanie testów IVD, stworzonych specjalnie do kwalifikacji chorych do nowych terapii. Takie przykłady są już widoczne w diagnostyce molekularnej. W oznaczaniu mutacji genu *BRAF*, której obecność jest niezbędna do kwalifikacji chorych na czerniaka do terapii wemurafenibem, laboratoria mogą stosować wyłącznie platformę Cobas® i odpowiedni test genetyczny.

Należy bardzo wyraźnie podkreślić, że regulacjom prawnym w funkcjonowaniu genetycznych laboratoriów diagnostycznych musi towarzyszyć przejrzysty system finansowania badań genetycznych w chorobach nowotworowych. Konieczność używania certyfikowanej aparatury i testów genetycznych oraz spełnienie wszystkich norm funkcjonowania laboratorium wiąże się z dużymi kosztami. Obecnie niemal nie ma możliwości finansowania badań genetycznych w ramach stosowanych w chorobach nowotworowych programów lekowych stworzonych przez Narodowy Fundusz Zdrowia. Dotyczy to na przykład badań genetycznych w kwalifikacji do terapii inhibitorami kinazy tyrozynowej EGFR w raku gruczołowym płuca. Teoretycznie test genetyczny finansowany jest w ramach procedury diagnostycznej poprzedzającej leczenie, która obejmuje także m. in. badania laboratoryjne czy tomografię komputerową klatki piersiowej. W związku z tym nie ma wyceny punktowej samego badania genetycznego, a szpitale często rezygnują z wykonania tego rodzaju diagnostyki. Osoby odpowiedzialne za gospodarkę finansową szpitali w ogóle nie widzą potrzeby zawierania odrębnych umów z laboratoriami genetycznymi na wykonanie testów molekularnych. W konsekwencji braku odpowiednich rozwiązań ciężar finansowy badań genetycznych, a nawet cała logistyka związana m. in. z przesyłaniem materiału do laboratoriów genetycznych, są często przejmowane przez firmy farmaceutyczne, które wprowadziły do leczenia omawianą grupę leków. Rozwiązanie to stanowi ukryty konflikt interesów pomiędzy usługodawcą (szpitalem) a producentem leków, przejmującym obowiązki wykraczające poza swoją działalność. Jak wynika z tego przykładu, istnieje paląca potrzeba zmiany wielu przepisów regulujących wykonywanie testów genetycznych. Tymczasem jednak albo trzeba zaakceptować funkcjonowanie laboratoriów działających niezgodnie z wieloma zapisami prawnymi, albo uniemożliwić działalność większości laboratoriów genetycznych. To drugie rozwiązanie spowoduje w niektórych regionach Polski dramatyczny spadek liczby testów molekularnych przeprowadzanych w kwalifikacji chorych do terapii ukierunkowanych molekularnie. Tym samym chorzy ci utracą możliwość otrzymania najbardziej skutecznych metod leczenia.

### **Certyfikowane testy genetyczne w kwalifikacji do terapii ukierunkowanych molekularnie w chorobach nowotworowych**

Rynek leków ukierunkowanych molekularnie stosowanych w chorobach nowotworowych rozwija się bardzo szybko i corocznie pojawia się wiele nowych terapii onkologicznych. Jedną z pierwszych terapii ukierunkowanych molekularnie stosowanych w guzach litych, w przypadku której zastosowano testy genetyczne dla właściwej kwalifikacji do leczenia, był trastuzumab, stosowany w leczeniu raka piersi (obecnie stosowany także w raku żołądka). Tra-

stuzumab, podobnie jak wprowadzane obecnie do terapii pertuzumab i trastuzumab w połączeniu z emtansyną (T-DM1) jest przeciwciałem monoklonalnymi skierowanymi przeciwko receptorowi HER2 na powierzchni komórek nowotworowych. W celu kwalifikacji do terapii tymi lekami [9, 10] oraz terapii lapatynibem [11] (drobnocząsteczkowym inhibitorem kinazy tyrozynowej EGFR i HER2) niezbędne jest określenie ekspresji HER2 metodą immunohistochemiczną (IHC), a w przypadku braku jednoznacznego wyniku tego badania — stwierdzenie nadmiernej liczby kopii genu *HER2* (amplifikacji tego genu) metodą FISH. W zastosowaniu znajduje się kilka certyfikowanych testów diagnostycznych opierających się na metodzie IHC [w Polsce najczęściej wykorzystuje się HercepTest™, Dako, Dania lub test HER2 (4B5), Ventana Medical Systems, USA] oraz na metodzie *in situ* (najczęściej PathVysion HER-2 DNA Probe Kit™, Abbott Molecular, USA lub INFORM *HER2/Neu*, Ventana Medical Systems, USA). Co ważne, wyniki badania IHC, a zwłaszcza FISH, są dość trudne w interpretacji i wymagają dużego doświadczenia nie tylko podczas analizy obrazów mikroskopowych, ale także podczas całej procedury laboratoryjnej. Dlatego też testy diagnostyczne zawierają nie tylko odpowiednie przeciwciała monoklonalne i sondy molekularne, ale także odczynniki niezbędne do preparatyki tkanki nowotworowej oraz dokładny opis procedury postępowania.

Technika FISH wykorzystywana jest powszechnie w hematologii (np. klasyczna już diagnostyka obecności chromosomu Philadelphia i genu fuzyjnego *Bcr-Abl* w przewlekłej białaczce szpikowej) [12] oraz w diagnostyce niektórych mięsaków tkanek miękkich. Natomiast w kwalifikacji do terapii kryzotynibem, nowym lekiem ukierunkowanym, stosowanym u chorych na zaawansowanego niedrobnokomórkowego raka płuca (NDRP), niezbędne jest wykrycie metodą FISH rearanżacji genu *ALK* (najczęściej powstanie genu fuzyjnego *EML4-ALK*) [13, 14] (Vysis LSI *ALK Break Apart Rearrangement Probe Kit*, Abbott Molecular, USA). Podobną metodę stosuje się także do wykrywania wrażliwych na leczenie kryzotynibem zaburzeń genu *ROS1* [15, 16]. Gotowy jest także test IHC, dedykowany do wykrywania nieprawidłowego białka kodowanego przez gen fuzyjny *EML4-ALK*. Rutynowa diagnostyka innych nieprawidłowości genetycznych za pomocą metody FISH (np. genu *BRAF* w kwalifikacji chorych na czerniaka do terapii wemurafenibem oraz genu *EGFR* w kwalifikacji chorych na NDRP do leczenia inhibitorami kinazy tyrozynowej EGFR) wydaje się nieuzasadniona w sytuacji istnienia czułych technik PCR i sekwencjonowania, wykrywających mutacje w tych genach [17, 18], oraz braku zarejestrowanych do terapii inhibitorów innych białek (trwają dopiero badania nad inhibitorami PIK3CA i c-MET). To samo dotyczy oceny ekspresji EGFR u chorych na NDRP techniką IHC, bowiem cecha ta nie jest wyznacznikiem skuteczności terapii inhibitorami kinazy tyrozynowej EGFR.

Materiałem diagnostycznym do badań mających na celu wykrycie mutacji w genach *EGFR*, *KRAS* i *BRAF* jest DNA izolowane z komórek nowotworowych, które są pobierane od chorego w trakcie zabiegów diagnostycznych takich jak bronchoskopia, kolonoskopia czy biopsja cienkoigłowa, lub w trakcie resekcji guza. Materiał ten po utrwaleniu w formalinie trafia do zakładu patomorfologii, a stamtąd do diagnostycznego laboratorium genetycznego, najczęściej w formie bloczków parafinowych z zatopioną w nich tkanką nowotworową (*formalin-fixed, paraffin-embedded* — FFPE) lub komórkami (cytobloki), albo też jako preparat cytologiczny na szkiełku mikroskopowym. Manipulowanie taką tkanką lub preparatem cytologicznym przedstawia różne problemy związane z degradacją kwasów nukleinowych, do której dochodzi podczas utrwalania i zatapiania w parafinie oraz podczas procesu odparafinowywania, a także spowodowane jest bardzo niskim odsetkiem komórek nowotworowych. Dlatego też, z punktu widzenia jakości wyników badania molekularnego, ważny jest sposób izolacji DNA oraz wybór takiego fragmentu tkanki nowotworowej lub pola preparatu cytologicznego, w którym znajduje się najwyższy odsetek nieuszkodzonych komórek nowotworowych. Wykonanie testu genetycznego musi być zatem zawsze poprzedzone dokładnym badaniem patomorfologicznym. Oznacza to, że nieodzownym warunkiem wiarygodności testu genetycznego jest ścisła współpraca patomorfologa i specjalisty z dziedziny laboratoryjnej genetyki medycznej [19, 20].

Najczęściej izolację kwasów nukleinowych przeprowadza się przy użyciu metody kolumnkowej, wykorzystującej efekt łączenia się DNA lub RNA z warstwą krzemionkową znajdującą się wewnątrz małej, jednorazowej kolumny, przez którą przepuszcza się roztwór zawierający rozpuszczone tkanki nowotworowe. Wśród produktów wykorzystujących tę metodę najpopularniejszymi są QIAamp® DNA FFPE Tissue Kit (Qiagen, Niemcy), blackPREP® FFPE DNA Kit (Analytik Jena, Niemcy) oraz Invisorb® Spin FFPE Tissue Kit (Strattec Molecular, Niemcy). Odmienna metodologicznie jest technologia separacji magnetycznej DNA, która opiera się na powinowactwie cząsteczek DNA do specjalnie zaprojektowanego ligandu związanego z kulkami paramagnetycznymi. Kulki te, ze związanym materiałem genetycznym, osadzają się na ścianie probówki w polu magnetycznym. Supernatant usuwa się za pomocą pipety, a DNA przytwierdzone do kulek przemywa się kilkakrotnie i odzyskuje w postaci eluatu [21]. Technika tę wykorzystują między innymi zestawy Dynabeads® DNA DIRECT™ Universal (Invitrogen, Wielka Brytania) oraz MagNA® Pure LC DNA Isolation Kit i MagNA® Pure 96 System (Roche Diagnostic, Szwajcaria). Techniki oparte na izolacji materiału genetycznego w polu magnetycznym są mniej wydajne niż techniki wykorzystujące złoże krzemionkowe, jednak stwarzają możliwość zautomatyzowania etapu izolacji DNA. W związku z tym w sytuacji niskiego odsetka komórek nowotworowych w badanym

materiale bardziej zasadne wydaje się stosowanie zestawów do izolacji wykorzystujących złoże krzemionkowe [22, 23]. Należy pamiętać, że nie wszystkie zestawy do izolacji i oczyszczania DNA posiadają znak CE/IVD.

Tak wyizolowany i oczyszczony nowotworowy DNA jest materiałem potrzebnym do wykrycia obecności mutacji z wykorzystaniem metody *real-time* PCR lub sekwencjonowania DNA. Wydaje się, że ze względu na czułość obu technik (znacznie wyższa w przypadku *real-time* PCR niż bezpośredniego sekwencjonowania), często złą jakość DNA (fragmentacja) i niski odsetek komórek nowotworowych w badanym materiale metoda bezpośredniego sekwencjonowania ma ograniczone znaczenie w diagnostyce mutacji somatycznych. Czułość sekwencjonowania może zostać zwiększona poprzez poprzedzenie go odpowiednio dobraną reakcją PCR w celu zwielokrotnienia ilości materiału genetycznego, jednak takie postępowanie nie jest już metodą z branży IVD. Istnieją również pojedyncze doniesienia o ograniczonej wartości mikrodysekcji stosowanej w celu wybrania komórek nowotworowych do badania mutacji, bowiem stosowane w tej metodzie promienie lasera mogą spowodować degradację DNA [24]. Pojawiają się jednak zestawy odczynników, które umożliwiają zwiększenie czułości sekwencjonowania kluczowych genów poprzez wprowadzenie nowych technik, np. pirosekwencjonowania. Należy pamiętać, że metody sekwencjonowania wykrywają wszystkie nieprawidłowości genetyczne w badanym odcinku DNA, a nie tylko te, do których służy test *real-time* PCR.

W związku z omówionymi powyżej problemami większość producentów testów diagnostycznych przekwalifikowała się na tworzenie zestawów odczynników wykorzystujących technikę *real-time* PCR. Najbardziej znanymi produktami w tej dziedzinie są testy diagnostyczne pozwalające oznaczyć mutacje w genie *EGFR* w kwalifikacji chorych na NDRP do leczenia inhibitorami kinazy tyrozynowej EGFR (erlotynib, gefitynib) [25, 26]. Większość dostępnych testów wykrywa 29 znanych rodzajów mutacji w eksonach 18–21 kodujących domenę kinazy tyrozynowej EGFR (produkty firm Qiagen — Therascreen® EGFR Mutation Detection Kit, Panagene — PNA Clamp™ EGFR Mutation Detection Kit oraz Entrogen — Entrogen's EGFR mutation analysis kit), natomiast produkt firmy Roche (Cobas® EGFR Mutation Test) wykrywa 41 rodzajów mutacji w genie *EGFR*. Mimo że producenci zestawów deklarują możliwość wykrycia kilkudziesięciu rodzajów mutacji genu *EGFR*, zwykle nie można rozróżnić poszczególnych rodzajów delecji w eksonie 19. tego genu, choć z drugiej strony informacja taka wydaje się nie mieć istotnego znaczenia. Zestawy odczynników wymienionych firm opierają się na różnych rodzajach sond molekularnych wykorzystywanych w diagnostyce *real-time* PCR: TaqMan, Scorpions (metoda SARMS-*real-time* PCR), a także na metodzie PNA-LNA PCR Clamp, w której wysoka czułość uzyskiwana jest dzięki wyciszeniu amplifikacji niezmutowanego genu.

Na rynku testów stosowanych w diagnostyce molekularnej guzów litych najwięcej jest testów umożliwiających kwalifikację chorych na NDRP do terapii inhibitorami kinazy tyrozynowej EGFR. Większość producentów wprowadza jednak także możliwość analizy mutacji innych genów. U chorych na raka jelita grubego konieczne jest oznaczenie obecności mutacji w kodonach 12, 13 i 61 genu *KRAS*, gdyż zaburzenie to prowadzi do nadmiernej proliferacji komórek nowotworowych i związanego z tym braku skuteczności przeciwciał monoklonalnych anty-EGFR — cetuksymabu [27] i panitumumabu [28]. Obecność ekspresji EGFR oraz brak mutacji genu *KRAS* umożliwia kwalifikację chorych do tego rodzaju leczenia. Natomiast mutacja V600E oraz inne rzadkie mutacje w genie *BRAF* warunkują kwalifikację do leczenia wemurafenibem u chorych na czerniaka złośliwego [29].

Istnieją też duże możliwości oznaczania mutacji w innych genach (np. PIK3CA, HER2 czy c-MET), których białkowe produkty w najbliższych latach mogą stać się celem nowych terapii ukierunkowanych molekularnie. Obecnie najważniejsze wydaje się rozszerzenie zaleceń dotyczących diagnostyki molekularnej nowotworów podścieliska przewodu pokarmowego (*gastrointestinal stromal tumors* — GIST) [30, 31], neuroendokrynych raków trzustki i niektórych nowotworów nerek. W przypadku kwalifikacji chorych na te nowotwory do terapii imatinibem [32] konieczne jest jedynie oznaczenie ekspresji białka sygnałowego KIT (CD117), mimo że skuteczność leczenia zależy także od licznych mutacji w genach *KIT* i *PDGFRA* (*platelet-derived growth factor receptor*). Nowe terapie stosowane w tych typach nowotworów (wielokinazowe inhibitory: sunitynib, sorafenib i inne) wymuszają prawdopodobnie rozszerzenie panelu badań molekularnych o oznaczenie mutacji także w genach *RET*, *VEGFR* (*vascular endothelial growth factor*) i innych.

Ciągle postępy w genetyce, genomice i proteomicie znacząco zwiększają możliwości terapii chorób nowotworowych i doprowadzają do jej coraz większej personalizacji. Rozwój ten stwarza jednak nowe wyzwania. Niezbędne stało się opracowanie testów genetycznych, które można zastosować w rutynowej diagnostyce. Co więcej, badania genetyczne powinny być wykonywane w odpowiednio do tego przygotowanych laboratoriach wyposażonych w odpowiednią aparaturę przeznaczoną do diagnostyki *in vitro*. W związku z tym towarzystwa naukowe, jak również niezależne organizacje badawcze, powinny uaktualnić swoje zalecenia, tak aby uwzględniały one wykorzystywanie metod molekularnych. Ponadto należy podjąć starania o stworzenie przejrzystego systemu umożliwiającego kontrolę laboratoriów genetycznych i walidację metod przez nie stosowanych, a także skutecznego i przejrzystego systemu finansowania badań genetycznych. Należy również uwzględnić konieczność stałej aktualizacji zaleceń dotyczących badań i laboratoriów genetycznych, odzwierciedlającej bieżący

stan wiedzy na temat genetycznych podstaw chorób nowotworowych i metod stosowanych w ich diagnostyce i terapii.

#### Dr hab. Paweł Krawczyk

Pracownia Immunologii i Genetyki  
Katedra i Klinika Pneumonologii, Onkologii i Alergologii  
Uniwersytet Medyczny w Lublinie  
ul. Jaczewskiego 8, 20–954 Lublin  
e-mail: krapa@poczta.onet.pl

Otrzymano i przyjęto do druku: 1 grudnia 2012 r.

#### Piśmiennictwo

1. Dyrektywa 98/79/WE Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 27 października 1998 r. w sprawie wyrobów medycznych używanych do diagnostyki *in-vitro* (<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:1998L0079:20031120:pl:PDF>).
2. *Diagnostic Manufacturers Association* — EDMA (<http://edma-ivd.eu/>).
3. Ustawa z dnia 20.05.2010 o wyrobach medycznych ([http://www.mz.gov.pl/wwwfiles/ma\\_struktura/docs/wyrobymedyczne\\_20100918\\_ustawa.pdf](http://www.mz.gov.pl/wwwfiles/ma_struktura/docs/wyrobymedyczne_20100918_ustawa.pdf)).
4. Ustawa z dnia 27.07.2001 o diagnostyce laboratoryjnej (<http://isap.sejm.gov.pl/DetailsServlet?id=WDU20011001083>).
5. Krajowa Izba Diagnostów Laboratoryjnych (<http://www.kidl.org.pl/>).
6. Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 03.03.2004 w sprawie wymagań, jakim powinno odpowiadać medyczne laboratorium diagnostyczne (<http://www.mz.gov.pl/wwwmz/index?mr=q101&ms=&ml=pl&mi=436&mx=0&mt=&my=436&ma=02397>).
7. Załącznik nr 3 do (6) ([http://www.mz.gov.pl/wwwfiles/ma\\_struktura/docs/zal3\\_lab\\_genet\\_7082008p.pdf](http://www.mz.gov.pl/wwwfiles/ma_struktura/docs/zal3_lab_genet_7082008p.pdf)).
8. Norma PN-EN ISO/IEC 17025 (<http://www.centrum.jakosci.pl/standard,iso-17025.html>).
9. Spector NL, Blackwell KL. Understanding the mechanisms behind trastuzumab therapy for human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer. *J Clin Oncol* 2009; 27: 5838–5847.
10. Gail DL, Li G, Dugger DL, Crocker LM i wsp. Targeting HER2-positive breast cancer with trastuzumab-DM1, an antibody-cytotoxic drug conjugate. *Cancer Res* 2008; 68: 9280–9290.
11. Verma S, Miles D, Gianni L i wsp. Trastuzumab emtansine for HER2-positive advanced breast cancer. *N Engl J Med* 2012; 367: 1783–1791.
12. Tohami T, Nagler A, Amariglio N. Laboratory tools for diagnosis and monitoring response in patients with chronic myeloid leukemia. *Isr Med Assoc J* 2012; 14: 501–507.
13. Kwak EL, Bang YJ, Camidge DR i wsp. Anaplastic lymphoma kinase inhibition in non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2010; 363: 1693–1703.
14. Thunnissen E, Bubendorf L, Dietel M i wsp. EML4-ALK testing in non-small cell carcinomas of the lung: a review with recommendations. *Virchows Arch* 2012; 461: 245–257.
15. Bergethon K, Shaw AT, Ou SH i wsp. ROS1 rearrangements define a unique molecular class of lung cancers. *J Clin Oncol* 2012; 30: 863–870.
16. Takeuchi K, Soda M, Togashi Y i wsp. RET, ROS1 and ALK fusions in lung cancer. *Nat Med* 2012; 18: 378–381.
17. Lopez-Rios F, Angulo B, Gomez B i wsp. Comparison of molecular testing methods for the detection of EGFR mutations in formalin-fixed paraffin-embedded tissue (FFPET) specimens of non-small cell lung cancer (NSCLC). *European Society for Medical Oncology (ESMO)*; 28 Sept — 2 Oct 2012; Vienna, Austria; Abstract #270.
18. Lopez-Rios F, Angulo B, Gomez B i wsp. Comparison of molecular testing methods for the detection of BRAF V600E mutations in formalin-fixed paraffin-embedded tissue (FFPET) specimens of malignant melanoma. *European Congress of Pathology (ECP)*, 27 Aug — 1 Sept 2011; Helsinki, Finland; Abstract #PS-22.1-026.
19. Fairley JA, Gilmour K, Walsh K. Making the most of pathological specimens: molecular diagnosis in formalin-fixed, paraffin embedded tissue. *Curr Drug Targets* 2012; 13: 1475–1487.
20. Campos PF, Gilbert TM. DNA extraction from formalin-fixed material. *Methods Mol Biol* 2012; 840: 81–85.
21. Caldarelli-Stefano R, Vago L, Bonetto S i wsp. Use of magnetic beads for tissue DNA extraction and IS6110 Mycobacterium tuberculosis PCR. *Mol Pathol* 1999; 52: 158–160.
22. Malhotra KT, Gulati U, Balzer B, Y Wu H. Comparison of DNA extraction methods from formalin-fixed, paraffin-embedded tissue and their impact on real-time PCR-based mutation assays. *J Med Diagn Meth* 2012; 1: 107.

23. Huijsmans C JJ, Damen J, van der Linden JC i wsp. Comparative analysis of four methods to extract DNA from paraffin-embedded tissues: effect on downstream molecular applications. *BMC Res Notes* 2010; 3: 239.
24. Angen Liu. Laser capture microdissection in the tissue biorepository. *J Biomol Tech* 2010; 21: 120-125.
25. Rosell R, Carcereny E, Gervais R i wsp. Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for European patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (EURTAC): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2012; 13: 239–246.
26. Mitsudomi T, Morita S, Yatabe Y i wsp. Gefitinib versus cisplatin plus docetaxel in patients with non-small-cell lung cancer harbouring mutations of the epidermal growth factor receptor (WJTOG3405): an open label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2010; 11: 121–128.
27. Karapetis CS, Khambata-Ford S, Jonker DJ i wsp. K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. *N Engl J Med* 2008; 359: 1757–1765.
28. Peeters M, Price TJ, Cervantes A i wsp. Randomized phase III study of panitumumab with fluorouracil, leucovorin, and irinotecan (FOLFIRI) compared with FOLFIRI alone as second-line treatment in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2010; 28: 4706–4713.
29. Ravnán MC, Matalka MS. Vemurafenib in patients with BRAF V600E mutation-positive advanced melanoma. *Clin Ther* 2012; 34: 1474–1486.
30. Corless CL, Barnett CM, Heinrich MC. Gastrointestinal stromal tumours: Origin and molecular oncology. *Nature Reviews Cancer* 2011; 11: 865–878.
31. Heinrich MC, Maki RG, Corless CL i wsp. Primary and secondary kinase genotypes correlate with the biological and clinical activity of sunitinib in imatinib-resistant gastrointestinal stromal tumor. *J Clin Oncol* 2008; 26: 5360–5367.
32. Dagher R, Cohen M, Williams G i wsp. Approval summary: imatinib mesylate in the treatment of metastatic and/or unresectable malignant gastrointestinal stromal tumors. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 3034–3038.