

**Piotr Rutkowski<sup>1</sup>**, **Monika Prochorec-Sobieszek<sup>2</sup>**, **Michał Wągradzki<sup>2</sup>**, **Katarzyna Seliga<sup>4</sup>**,  
**Maciej Krzakowski<sup>5</sup>**, **Anna M. Czarnecka<sup>1, 6</sup>**, **Tomasz Świtaj<sup>1</sup>**, **Andrzej Kawecki<sup>7</sup>**,  
**Anna Raciborska<sup>8</sup>**, **Andrzej Tysarowski<sup>3, 4</sup>**

<sup>1</sup>Klinika Nowotworów Tkanek Miękkich, Kości i Czerniaków, Narodowy Instytut Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie — Państwowy Instytut Badawczy w Warszawie

<sup>2</sup>Zakład Patologii i Diagnostyki Laboratoryjnej, Narodowy Instytut Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie — Państwowy Instytut Badawczy w Warszawie

<sup>3</sup>Pracownia Diagnostyki Genetycznej i Molekularnej Nowotworów, Narodowy Instytut Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie — Państwowy Instytut Badawczy w Warszawie

<sup>4</sup>Pracownia Wdrażania i Walidacji Molekularnych Techniek Diagnostycznych, Narodowy Instytut Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie — Państwowy Instytut Badawczy w Warszawie

<sup>5</sup>Klinika Nowotworów Płuca i Klatki Piersiowej, Narodowy Instytut Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie — Państwowy Instytut Badawczy w Warszawie

<sup>6</sup>Zakład Farmakologii Doświadczalnej, Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN w Warszawie

<sup>7</sup>Klinika Nowotworów Głowy i Szyi, Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN w Warszawie

<sup>8</sup>Klinika Onkologii i Chirurgii Onkologicznej Dzieci i Młodzieży, Instytut Matki i Dziecka w Warszawie

# Diagnostyka z wykorzystaniem sekwencjonowania następnej generacji (NGS) w mięsakach — rekomendacje

Next generation sequencing (NGS) in sarcomas diagnostics — recommendations

## Adres do korespondencji:

Prof. dr hab. n. med. Piotr Rutkowski  
 Klinika Nowotworów Tkanek Miękkich,  
 Kości i Czerniaków  
 Narodowy Instytut Onkologii  
 im. Marii Skłodowskiej-Curie  
 — Państwowy Instytut Badawczy  
 ul. Roentgena 5, 02-781 Warszawa  
 Tel.: 22 546 21 84, faks: 22 643 93 75  
 e-mail: piotr.rutkowski@coi.pl

## STRESZCZENIE

Mięsaaki tkanek miękkich i kości to grupa rzadkich, heterogennych nowotworów o wysokim stopniu śmiertelności, z których każdy ma inną biologię i przebieg kliniczny. Stanowią 20% wszystkich nowotworów wieku dziecięcego i około 1% wszystkich nowotworów złośliwych występujących u dorosłych. Zaawansowana diagnostyka patologiczno-molekularna z zastosowaniem klasycznych metod często jest niewystarczająca w ustaleniu ostatecznego rozpoznania, co związane jest z wdrożeniem właściwej terapii. W takich przypadkach pomocna staje się technologia sekwencjonowania następnej generacji (NGS), która umożliwia przeanalizowanie wielu genów oraz klas mutacji w pojedynczym oznaczeniu, przy minimalnym zużyciu materiału tkankowego. Szerokie profilowanie genetyczne umożliwia, w wielu przypadkach, nie tylko postawienie prawidłowej diagnozy, ale również identyfikację potencjalnych celów terapeutycznych dla nowoczesnych terapii celowanych w onkologii. W niniejszej pracy przedstawiono rekomendacje dotyczące zastosowania metody NGS w zaawansowanej diagnostyce genetycznej mięsaków występujących u dorosłych, dzieci i młodzieży.

**Słowa kluczowe:** mięsaaki, NGS, rekomendacje, fuzje genowe, diagnostyka, terapie celowane, *NTRK*

## ABSTRACT

Soft tissue and bone sarcomas are a group of rare, heterogeneous, high-mortality cancers, each with a different biology and clinical course. They constitute 20% of all childhood cancers and about 1% of all adult malignancies. Advanced pathomorphological-molecular diagnostics using classic methods is often insufficient to make the final diagnosis, and thus implement the right therapy. In these cases, next generation sequencing technology (NGS) is helpful, which allows for analysis of many genes and classes of mutations in one assay with minimal consumption of tissue material. Wide genetic profiling enables, in many cases, not only to make the correct diagnosis, but also to identify potential therapeutic goals for modern targeted therapies in oncology. In this paper, we present recommendations on the use of the NGS method in advanced genetic diagnosis of sarcomas in adults, children and adolescents.

**Key words:** sarcomas, NGS, recommendations, gene fusions, diagnostics, targeted therapy, *NTRK*

## Wprowadzenie

Mięsaki to heterogenna grupa nowotworów złośliwych, obejmująca niemal 100 (70–100) różnych unikalnych podtypów histologicznych. Klasyfikacja tych nowotworów w dużej mierze opiera się na diagnostyce przy użyciu narzędzi biologii molekularnej oraz cytogenetyki. Co więcej, niektóre spośród technik biologii molekularnej przyczyniły się do zastosowania osiągnięć onkologii precyzyjnej u chorych na mięsaki. Klasycznym przykładem jest profilowanie genetyczne nowotworów podścieliskowych przewodu pokarmowego (GIST, *gastrointestinal stromal tumours*) w celu przewidywania odpowiedzi na leczenie ukierunkowane przy zastosowaniu imatynibu. Odkrycie w ostatnim czasie fuzji genowych obejmujących np. gen receptorowej kinazy tyrozynowej dla neurotrofin (*NTRK*, *neurotrophic tyrosine receptor kinase*) jako onkogenów typowych dla wielu grup histologicznych nowotworów wiąże się z rozwojem nowych opcji terapeutycznych (larotrektylib, entrektylib) również u chorych na mięsaki [1, 2].

Niniejsze rekomendacje koncentrują się na wskazaniach do diagnostycznego i terapeutycznego zastosowania technologii sekwencjonowania następnej generacji (NGS, *next-generation sequencing*) u chorych na mięsaki.

## Wskazania do badania NGS i wybór właściwego panelu genowego

Po pierwsze, zastosowanie NGS powinno dotyczyć tych rodzajów mięsaków, w których takie postępowanie może być przydatne w doborze terapii (zmiana decyzji terapeutycznej, głównie przypadki nieresekcyjne lub przerzutowe) oraz pogłębieniu szczegółowej diagnostyki [3, 4]. Analiza techniką NGS powinna być wykonywana w trudnych przypadkach diagnostycznych, w ocenie patologiczno-radiologicznej, bądź w wynikach wątpliwych otrzymanych inną metodą (np. FISH) [5]. Zastosowanie techniki NGS pozwoli na: analizę wielu genów jednocześnie, identyfikację znanych, jak również scharakteryzowanie nowych zmian genetycznych istotnych do różnicowania i weryfikacji rozpoznania oraz wykrycie potencjalnych celów terapeutycznych.

Taka diagnostyka patomorfologiczno-genetyczna powinna być prowadzona całościowo w ośrodkach referencyjnych dla chorych na mięsaki, które w swej strukturze posiadają laboratoria genetyczne, przystępujące do międzynarodowych kontroli jakości w zakresie stosowanych technik biologii molekularnej. Co więcej, decyzje dotyczące kwalifikacji oraz znaczenia wykrywanych zaburzeń molekularnych powinny być omawiane w ramach utworzonego w ośrodku wielospecjalistycznego panelu eksperckiego *Molecular Tumor Board* (MTB, konsylium molekularne) [6]. Chociaż istotny odsetek mięsaków,

w których występują zaburzenia molekularne identyfikowane w NGS [7], może potencjalnie poddawać się działaniom terapeutycznym, to wciąż brakuje dowodów, aby zalecać tę technologię do rutynowego zastosowania [8]. Występowanie rearanżacji *NTRK* w mięsakach typu *leiomyosarcoma* (LMS), *undifferentiated pleomorphic sarcoma* (UPS), *pleomorphic liposarcoma/rhabdomyosarcoma* (P-LPS/P-RMS), *angiosarcoma*, *malignant peripheral nerve sheath tumor* (MPNST), *myxofibrosarcoma*, *fibrosarcoma* podlega ocenie w badaniu prospektywnym RNASARC (NCT03375437), prowadzonym w *Centre Léon Bérard* w Lyonie, które ma objąć 750 chorych i zakończyć się w styczniu 2021 roku.

Obecnie wykonywanie badań NGS jest przeciwwskazane i nie dostarcza dodatkowej informacji diagnostyczno-terapeutycznej w przypadku mięsaków związanych ze specyficznymi translokacjami (T-mięsaki, jak mięsak Ewinga czy *synovial sarcoma*), GIST z obecnymi mutacjami *KIT/PDGFR* lub związanymi z NF1, tłuszczakomięsaków (*liposarcoma*) z amplifikacją *MDM2/CDK4* oraz guza olbrzymiokomórkowego kości (GCT, *giant cell tumor*).

Wykonanie NGS można rozważyć (w celu poszukiwania nowych celów terapeutycznych) w następujących typach mięsaków:

- *inflammatory myofibroblastic tumor* (IMT);
- GIST — *wild type* (początkowo negatywny) niezwiązany z NF1 lub *SDH-deficient*;
- *intimal sarcoma*;
- *uterine sarcoma high grade*;
- *infantile fibrosarcoma* (IFS);
- niezróżnicowane mięsaki tkanek miękkich i kości (złożony kariotyp bez zdefiniowanych rearanżacji), takie jak:
  - *myxofibrosarcoma* (mięsak włóknisto-mięśniowy),
  - *undifferentiated pleomorphic sarcoma* (niezróżnicowany mięsak pleomorficzny),
  - *leiomyosarcoma/myogenic sarcoma*, NOS (*not otherwise specified*)/*intimal sarcoma* (mięśniakomięsak gładkokomórkowy/mięsak bez określonego typu/mięsak wyściółkowy),
  - *malignant peripheral nerve sheath tumor* (MPNST), złośliwy nowotwór osłonek nerwów obwodowych.

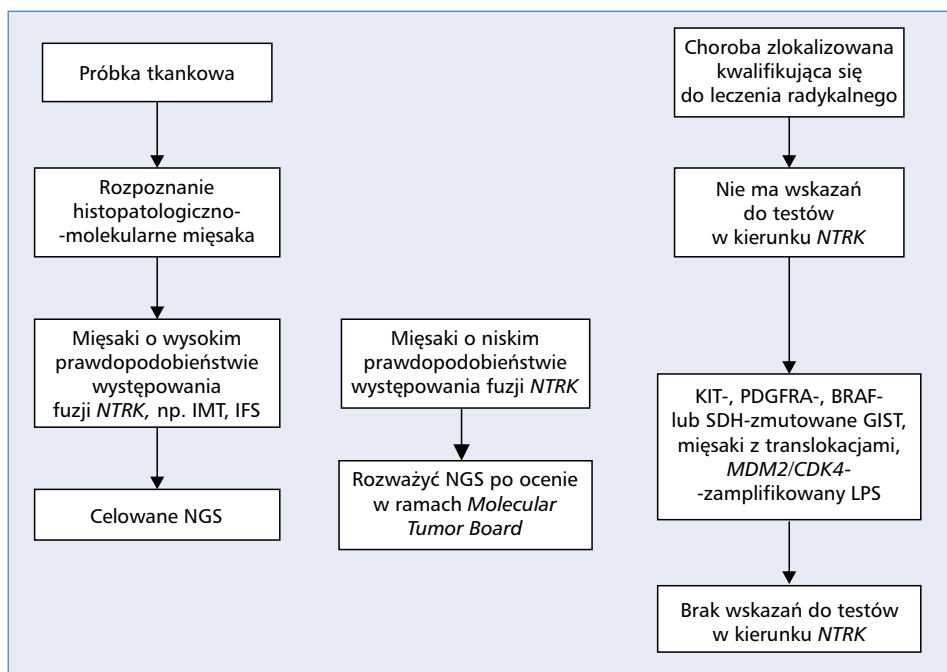
Częstość fuzji genowych *NTRK* zidentyfikowanych w mięsakach przedstawiono w tabeli 1.

W przypadku niektórych spośród tych mięsaków poszukiwanie zaburzeń genów *NTRK1/2/3* (które występują u chorych na mięsaki z wyjątkiem IFS i IMT ekstremalnie rzadko < 1%; tab. 1) można wzbogacić o przesiewowe badania immunohistochemiczne. Za wynik dodatni należy uznać ekspresję pan-TRK o dowolnej intensywności powyżej tła w  $\geq 1\%$  komórek nowotworowych. Jednak od 2019 roku testowanie fuzji genowych *NTRK1/2/3* przy wykorzystaniu techniki NGS opartej na RNA powinno być wykonywane jako „złoty

Tabela 1. Częstość fuzji genowych *NTRK* zidentyfikowanych w mięsakach

Podtypy mięsaków z wykrytymi fuzjami <i>NTRK</i>	Metoda analityczna	Odsetek zidentyfikowanych fuzji <i>NTRK</i>	Geny <i>NTRK</i> i partnerskie fuzyjne	Badanie
<i>Congenital fibrosarcoma</i> (dziecięce)	RT-PCR	91% (10/11)	<i>ETV6-NTRK3</i>	Bourgeois i wsp. [8]
GIST	Celowane RNA NGS	3,2% (1/31) wszystkich [11,9% (1/9) bez innych mutacji]	<i>ETV6-NTRK3</i>	Brenca i wsp. [9]
<i>Myopericytoma</i>	Celowane DNA NGS	0,66% (1/152)	<i>NR</i>	Bui i wsp. [10]
IMT	Celowane RNA NGS	33% (3/9)	<i>ETV6-NTRK3</i>	Chang i wsp. [11]
<i>Fibrosarcoma</i> (n = 2), <i>solitary fibrous tumor</i> (n = 1), <i>hemangioma</i> (n = 1), <i>bone sarcoma</i> (n = 1)	Celowane RNA NGS	1,2% (5/324)	<i>SQSTM1-NTRK1</i> (n = 1), <i>TGF-NTRK3</i> (n = 1) oraz inne geny fuzyjne	Chmielecki i wsp. [12]
IFS	FISH	96% (25/26)	<i>EML4-NTRK3</i>	Church i wsp. [13]
<i>Fibrosarcoma</i> macicy oraz pochwy	Celowane RNA NGS	54% (7/13)	6 <i>TPM3-NTRK1</i> , 1 <i>EML4-NTRK3</i>	Croce i wsp. [14]
1 mięsak tkanek miękkich o wysokim stopniu złośliwości, 1 myksoidny mięsak macicy o wysokim stopniu złośliwości	Celowane RNA NGS	0,42% (2/478)	1 <i>TPM3-NTRK1</i> , 1 <i>SPECC1L-NTRK3</i>	Gatalica i wsp. [15]
GIST	Celowane DNA NGS	0,54% (1/186) ogółem [4,2% (1/24) w poczwórnie ujemnych GIST]	<i>ETV6-NTRK3</i>	Yamazaki i wsp. [16]
IFS (n = 2), tłuszczakowłokniakowatość (n = 2), mięsak macicy (n = 2), mięsak pleomorficzny macicy o wysokim stopniu złośliwości, mięsak wrzecionowatokomórkowy o wysokim stopniu złośliwości, złośliwy mięsak wrzecionowatokomórkowy, mięsak naczyńniowy, S100 mięsak wrzecionowatokomórkowy, mięsak o niskim stopniu złośliwości (każdy: n = 1)	Celowane DNA lub/i RNA NGS	0,68% (13/1915)	<i>LMNA-NTRK1</i> (n = 4), <i>TPM3-NTRK1</i> (n = 3), <i>ETV6-NTRK3</i> (n = 2), <i>TPR-NTRK1</i> , <i>TPM4-NTRK3</i> , <i>EEF1A1-NTRK3</i> , <i>PEAR1-NTRK1</i> (każdy: n = 1)	Solomon i wsp. [17]
IMT		17,7% (3/17)	<i>ETV6-NTRK3</i>	
Mięsak	Wysokoprzepustowe sekwencjonowanie RNA (RNA-seq)	0,97% (1/103)	<i>TPM3-NTRK1</i>	Stransky i wsp. [18]
Mięsak	Celowane RNA NGS	4,4% (2/45)	1 <i>TFG-NTRK3</i> , 1 <i>RBPMS-NTRK3</i>	Surrey i wsp. [19]
IMT	NGS (TBC), IHC	5% (2/40)	<i>ETV6-NTRK3</i>	Yamamoto i wsp. [20]
Tłuszczakowłokniakowatość (n = 2), IFS (n = 1), IMT (n = 1), mięsak NOS (n = 1)	Celowane NGS RNA	2,72% (5/184)	2 <i>ETV6-NTRK3</i> , 2 <i>TPM3-NTRK1</i> , 1 <i>LMNA-NTRK1</i>	Zhu i wsp. [21]
<i>Fibrosarcoma</i> macicy	Celowane NGS RNA, FISH	100% 4/4	<i>RBPMS-NTRK3</i> , <i>TPR-NTRK1</i> , <i>LMNA-NTRK1</i> , <i>TPM3-NTRK1</i>	Chiang i wsp. [22]
Mięsak tkanek miękkich	Celowane NGS RNA	100% 1/1	<i>LMNA-NTRK1</i>	Doebele i wsp. [23]
IFS, IMT	Celowane NGS RNA	0,44% (9/2031)	<i>ETV6-NTRK3</i> , <i>TFG-NTRK3</i> , <i>LMNA-NTRK1</i> warianty I-III, <i>SQSTM1-NTRK1</i> , <i>TPM3-NTRK1</i> , <i>TPR-NTRK1</i>	Pavlick i wsp. [24]

GIST (*gastrointestinal stromal tumours*) — nowotwory podścieliskowe przewodu pokarmowego; IMT — *inflammatory myofibroblastic tumor*; IFS — *infantile fibrosarcoma*; NOS (*not otherwise specified*) — niedający się sklasyfikować



**Rycina 1.** Proponowany algorytm testowania fuzji genowych NTRK. GIST (*gastrointestinal stromal tumours*) — nowotwory podścieliskowe przewodu pokarmowego; IMT — *inflammatory myofibroblastic tumour*; IFS — *infantile fibrosarcoma*; LPS — *liposarcoma*; NGS (*next-generation sequencing*) — technologia sekwencjonowania następnej generacji; NTRK (*neurotrophic tyrosine receptor kinase*) — receptorowa kinaza tyrozynowa dla neurotrofin; STS (*soft tissue sarcoma*) — mięsaki tkanek miękkich

standard” m.in. ze względu na możliwość wykrywania znanych i nowych fuzji z udziałem tych genów (rekomendacje m.in. z Europejskiego Zjazdu Patomorfologii; Nicea 2019). Zastosowanie innych metod tj. metoda immunohistochemiczna (IHC), reakcja łańcuchowa polimerazy z odwrotną transkryptazą (RT-PCR, *reverse transcriptase polymerase chain reaction*) czy fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ* (FISH, *fluorescence in situ hybridization*) rekomendowane są tylko i wyłącznie w przypadku nowotworów, w których z dużym prawdopodobieństwem, spodziewane są fuzje NTRK.

Obecnie w mięsakach zastosowanie mają dwa rodzaje paneli NGS:

- pierwszy — ukierunkowany na mięsaki, służący do różnicowania, który pozwala na wykrywanie fuzji genów związanych z patogenezą mięsaków, zawierający m.in. takie geny, jak: *ALK, CAMTA1, CCNB3, CIC, EPC1, EWSR1, FOXO1, FUS, GLI1, HMGA2, JAZF1, MEAF6, MKL2, NCOA2, NTRK3, PDGFB, PLAG1, ROS1, SS18, STAT6, TAF15, TCF12, TFE3, TFG, USP6, YWHAE, BCOR*;
- drugi — przeznaczony do diagnostyki guzów litych (panel terapeutyczny), w celu poszukiwania punktów uchwytu dla terapii celowanych. Panel powinien pozwalać na identyfikację znanych i nowych fuzji z udziałem takich genów, jak: *ALK, ROS1, NTRK1, NTRK2, NTRK3, FGFR1, FGFR2, FGFR3, BRAF*.

*Molecular Tumor Board* na terenie placówki referencyjnej dla terapii i diagnostyki chorych na mięsaki musi dokonać właściwego wyboru panelu diagnostycznego.

Proponowany algorytm testowania fuzji genowych NTRK przedstawiono na rycinie 1.

## Rozliczenia zaawansowanych badań genetycznych

Warunki, jakie należy spełnić w celu rozliczenia badania genetycznego z materiału archiwalnego

Badanie genetyczne z materiału archiwalnego musi być zlecone w trybie ambulatoryjnym w ramach odpowiednich zakresów w umowie leczenie szpitalne. Warunkiem rozliczenia ww. badania jest modyfikacja ustalonego planu leczenia, którą należy uzasadnić w notatce lekarskiej w dokumentacji medycznej pacjenta. Obowiązkowe jest wystawienie skierowania na diagnostyczne badanie genetyczne (rekomendowane jest generowanie skierowania w szpitalnym systemie informatycznym) oraz podpisanie zgody przez pacjenta na wykonanie badania genetycznego. Badania genetyczne z materiału archiwalnego rozliczane są po uzyskaniu wyniku. Warunkiem rozliczenia badania genetycznego z materiału archiwalnego jest wskazanie produktu: 5.53.01.0005003 — Zaawansowane Badanie Genetycz-

ne wraz z produktem: kod 5.52.01.0001511 — Badanie genetyczne materiału archiwalnego z pierwotną datą pobrania materiału oraz rozpoznania ICD10 zgodnego z załącznikiem nr 7 do zarządzenia — Wykaz badań genetycznych w chorobach nowotworowych.

Warunki, jakie należy spełnić w celu rozliczenia badania genetycznego z materiału pobranego w trakcie hospitalizacji

Istnieje również możliwość rozliczenia badań genetycznych (prostych, złożonych i zaawansowanych) badań genetycznych w chorobach nowotworowych) w odpowiednich zakresach w umowie szpitalnej z materiału pobranego w trakcie hospitalizacji. Po otrzymaniu wyniku badania genetycznego można rozliczyć wskazane produkty rozliczeniowe, wraz grupami z katalogu 1a, w zakontraktowanych przez świadczeniodawcę zakresach, również w pakiecie onkologicznym dla wskazanych rozpoznań ICD10 z załącznika nr 7 Zarządzenia Prezesa NFZ.

### Wskazania do badania NGS i wybór panelu genowego u dzieci i młodzieży

Podobnie jak u chorych dorosłych, panel NGS służy pogłębieniu diagnostyki, doprecyzowaniu rozpoznania (w przypadkach niejasnych bądź trudnych diagnostycznie) — panel diagnostyczny, a także jest wykorzystywany w celu doboru terapii (przede wszystkim w przypadku wznów i progresji choroby) i niekiedy jej intensywności (w I i kolejnej linii leczenia) — panel terapeutyczny. Wśród dzieci wskazania do wykonania panelu diagnostycznego na początku terapii mają również chorzy na mięsaka Ewinga, u których uzyskany wynik może mieć wpływ na intensyfikację leczenia w I linii.

Ze względu na to, że mięsaki występują w populacji dziecięcej rzadko, zawsze wskazana jest konsultacja badania patomorfologicznego w innym ośrodku, mającym doświadczenie w ich diagnostyce. W przypadku rozbieżności co do otrzymanych wyników konieczne jest poszerzenie diagnostyki, w tym wykonanie badania NGS. Algorytm postępowania przedstawiono na rycinach 2 oraz 3.

Diagnostyka molekularna, podobnie jak u dorosłych, powinna być prowadzona w ośrodkach referencyjnych, posiadających doświadczenie oraz odpowiedni sprzęt do wykonywania tego typu badań. W przypadkach nieoczywistych decyzja o wykonaniu badania, a także o rodzaju wykorzystanego panelu powinna zostać podjęta przy udziale onkologa dziecięcego, patomorfologa oraz specjalisty w dziedzinie laboratoryjnej genetyki medycznej (MTB). Gwarantuje to największą rzetelność i trafność uzyskanego wyniku. Należy podkreślić, że na wykonanie badania molekularnego u małoletniego pacjenta

konieczna jest odrębna zgoda jego opiekuna, która powinna być dołączona do dokumentacji medycznej.

Zlecając badanie NGS, trzeba pamiętać, że obecnie jedynie w niewielkim odsetku dziecięcych mięsaków stwierdza się występowanie zaburzeń molekularnych identyfikowanych w NGS i potencjalnie poddających się działaniom terapeutycznym. Dodatkowo wiele z tych preparatów nie ma rejestracji u pacjentów poniżej 18. roku życia, o czym należy pamiętać, ordynując taką terapię.

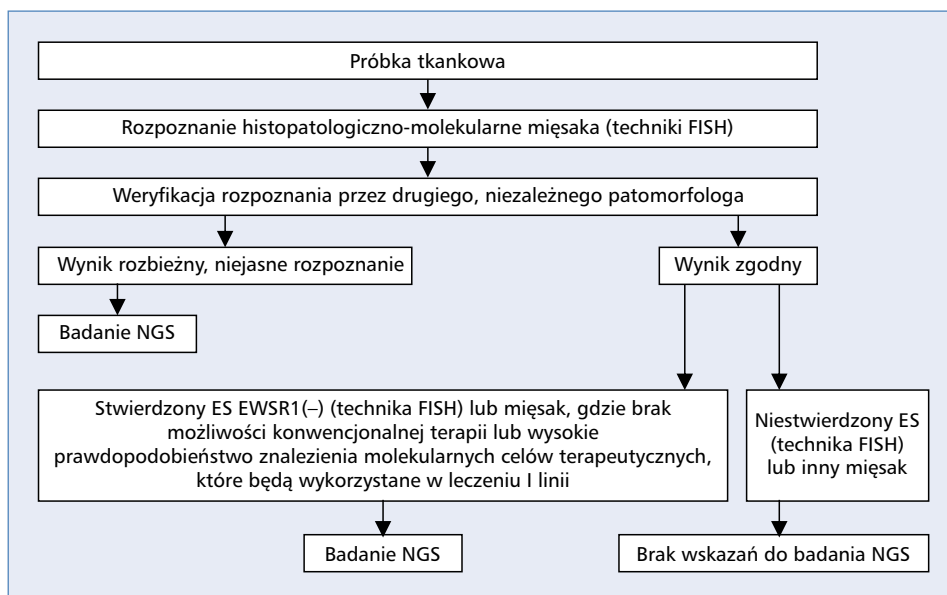
### Inhibitory NTRK

Larotrektylib i entrektylib w monoterapii są wskazane w leczeniu dorosłych oraz dzieci i młodzieży z guzami litymi, które wykazują fuzję genu receptorowej kinazy tyrozynowej dla neurotrofin *NTRK* i są miejscowo zaawansowane, przerzutowe, lub w sytuacji, gdy resekcja chirurgiczna nie jest możliwa oraz nie istnieją zadowalające opcje leczenia. Entrektylib został zatwierdzony przez amerykańską Agencję Żywności i Leków (FDA, *Food and Drug Administration*) 15 sierpnia 2019 roku, a larotrektylib — 26 listopada 2018 roku. We wrześniu 2019 roku Komisja Europejska w ramach procedury centralnej wydała decyzję o dopuszczeniu do obrotu larotrektylibu (EMA/H/C/004919).

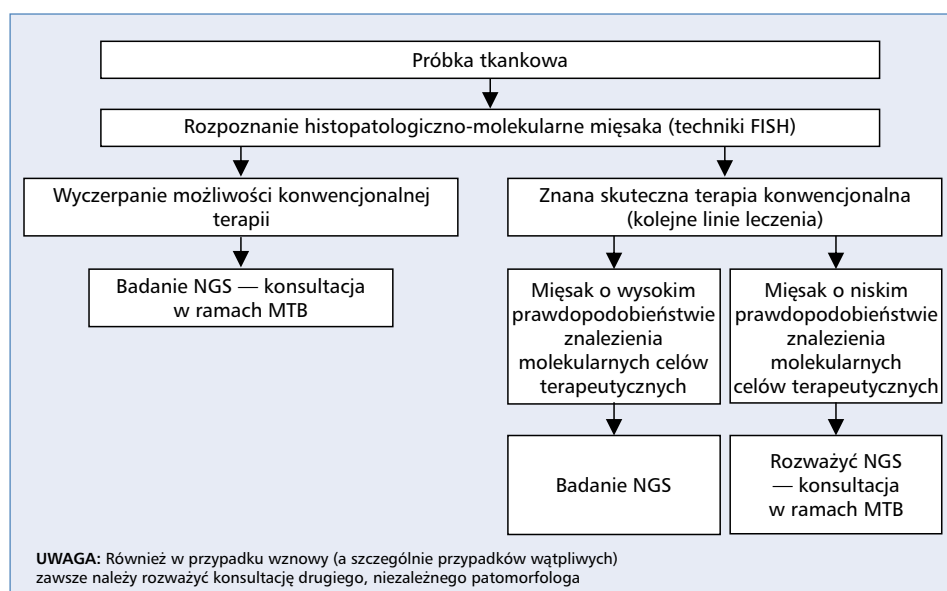
Celem działania larotrektylibu jest rodzina białek TRK, łącznie z TRKA, TRKB i TRKC, które są kodowane odpowiednio przez geny *NTRK1*, *NTRK2* i *NTRK3*. Entrektylib to selektywny inhibitor kinaz tyrozynowych kodowanych przez geny *TRK A/B/C* oraz *ROS1*. Larotrektylib był dotychczas oceniany w badaniach LOXO-TRK-14001 (NCT02122913), SCOUT (NCT02637687) oraz NAVIGATE (NCT02576431), a entrektylib — w badaniach ALKA-372-001 (Eudra CT 2012-000148-88), STARTRK-1 (NCT02097810) oraz STARTRK-2 (NCT02568267).

### Uwarunkowania techniczno-organizacyjne

Laboratorium wykonujące diagnostyczne badania genetyczne u chorych na mięsaki powinno być umiejscowione w strukturze zakładu patomorfologii lub ściśle z nim współpracować w ramach jednego podmiotu leczniczego. Umożliwia to prowadzenie zintegrowanej, interdyscyplinarnej diagnostyki patomorfologiczno-molekularnej w ramach współpracy chirurgów, onkologów klinicznych, patomorfologów oraz biologów molekularnych. Taka struktura i organizacja umożliwiają specjalistyczną i kompleksową diagnostykę w jednym miejscu bez konieczności wysyłania materiału do jednostek zewnętrznych. Dzięki temu czas badania zostaje zredukowany do minimum, zapewniona jest możliwość



Rycina 2. Proponowany algorytm wykonania badania NGS u dzieci i młodzieży na początku leczenia. ES (Ewing’s sarcoma) — mięsak Ewinga



Rycina 3. Proponowany algorytm wykonania badania NGS u dzieci i młodzieży w przypadku wznowy lub progresji choroby. MTB — Molecular Tumor Board

konsultacji przypadku przez specjalistów z różnych dziedzin medycznych, jednocześnie zniwelowane zostaje ryzyko związane z transportem próbki (np. utrata jakości materiału), a także — co niezwykle istotne — materiał jest stale dostępny w razie konieczności ponownej analizy molekularnej.

Laboratorium genetyczne powinno mieć wieloletnie doświadczenie w pracy z materiałem tkankowym oraz z DNA/RNA, potwierdzone międzynarodowymi

certykatami zewnątrzlaboratoryjnej kontroli jakości badań genetycznych w zakresie przygotowania materiału do badania, analiz zmian somatycznych, jak również raportowania wyników w mięsakach. Powinny zostać opracowane i wdrożone procedury i instrukcje laboratoryjne oraz wewnętrzne systemy kontroli jakości. Laboratorium musi być kierowane przez specjalistę z zakresu laboratoryjnej genetyki medycznej, posiadającego udokumentowane doświad-

czenie (certyfikaty, publikacje) w wykonywaniu badań mutacji somatycznych w onkologii. Laboratorium musi spełniać wymagania opisane w Rozporządzeniu Ministra Zdrowia w sprawie standardów jakości dla laboratoriów diagnostycznych i mikrobiologicznych (Dz.U. 2019, poz. 1923).

#### Kwalifikacja materiału do badań molekularnych

Materiał do badań genetycznych, po uprzednim uzyskaniu zgody na diagnostyczne badanie genetyczne, powinien być kierowany bezpośrednio z gabinetów konsultacyjnych, klinik lub z bloku operacyjnego do specjalistów patomorfologów, którzy zakwalifikują materiał do badań molekularnych. W pierwszej kolejności należy badać tkankę pobraną z guza przerzutowego lub nawrotowego, jednak w przypadku jej braku lub niedostatecznej ilości analizie można również poddać guz pierwotny. Materiałem referencyjnym w tym badaniu jest tkanka zatopiona w bloczku parafinowym o dobrej jakości. Technologie używane w badaniach histopatologicznych mogą mieć negatywny wpływ na wyniki badań molekularnych ze względu na możliwość degradacji DNA/RNA, dlatego zaleca się następujące postępowanie z materiałem tkankowym przeznaczonym do izolacji kwasów nukleinowych. Materiał tkankowy przeznaczony do izolacji DNA/RNA powinien być utrwalony w roztworze formaliny 10% rozcieńczonym roztworem soli fizjologicznej zbuforowanym fosforanem (PBS, *phosphate-buffered saline*) (pH ~7) z zachowaniem kontroli jakości procedury (należy unikać zdegradowanych utrwalaczy). Materiał przed utwaleniem powinien zostać właściwie przecięty, tak by zapewnić odpowiednią penetrację utrwalacza (1 mm/h). Zalecana objętość utrwalacza wynosi 10:1. Należy unikać nadmiernego utrwalenia (> 48–72 godzin) i zbyt długiego odwapniania materiału kostnego w kwasach — zalecany odwapniacz to kwas wersenowy (EDTA, *ethylenediaminetetraacetic acid*). Czas utrwalenia jest zależny od wielkości wycinka i wynosi co najmniej 6 godzin dla małych próbek (0,25 g) i ponad 12 godzin dla większych (0,25–1,0 g). Tkanki powinny być procesowane w odpowiednich cyklach czasowych w procesorach automatycznych, z regularną wymianą i kontrolą odczynników; wskazane jest rozdzielanie małych i dużych wycinków. Do zatapiania zaleca się stosowanie parafin o niskiej temperaturze topnienia (55–63°C). Zarchiwizowane bloczki parafinowe powinny być chronione przed wilgocią, ciepłem i światłem. Bloczki parafinowe przeznaczone do badań molekularnych nie powinny być starsze niż 5 lat, a czas trwałości skrojonych preparatów wynosi 4–6 tygodni. Konieczne są standaryzacja i dokumentacja procedur czynności technicznych w zakładach patomorfologii oraz przeprowadzanie kontroli wewnętrznych i zewnętrznych. Do zadań patomorfologa w procesie pro-

filowania molekularnego należą: precyzyjne ustalenie rozpoznania histopatologicznego nowotworu zgodnie z klasyfikacją Światowej Organizacji Zdrowia (WHO, *World Health Organization*), wybór próbki stanowiącej najlepszą reprezentację choroby, ocena procentu utkania nowotworowego, wybór najbardziej odpowiedniego obszaru do badania molekularnego (mikro- i makrodysekcja) oraz ocena artefaktów wynikających z błędów przedanalitycznych, które mogą znacząco wpłynąć na profilowanie molekularne [26]. Przed przystąpieniem do izolacji kwasów nukleinowych (DNA/RNA) z bloczka parafinowego musi zostać wykonany preparat HE, który umożliwia weryfikację morfologiczną pod kątem zawartości i lokalizacji tkanki nowotworowej w preparacie. Patomorfolog, który weryfikuje rozpoznanie, zaznacza obszar, z jakiego należy pobrać komórki do badań molekularnych, umożliwiając tym samym uzyskanie preparatu zawierającego komórki pochodzenia nowotworowego z możliwie najmniejszą objętością towarzyszących komórek prawidłowych. Jest to niezwykle istotny etap w sytuacji, gdy celem badania stanowi detekcja mutacji somatycznych, obecnych z definicji tylko w części utkania nowotworowego.

#### Sprzęt laboratoryjny

Sprawy dotyczące wyposażenia laboratorium w aparaturę medyczną reguluje rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 21 marca 2006 roku (Dz.U. 2006, nr 59, poz. 422 z późn. zm.) w sprawie wymagań, jakim powinno odpowiadać medyczne laboratorium diagnostyczne. Laboratorium wyposaża się w aparaturę pomiarowo-badawczą dostosowaną do rodzaju wykonywanych badań, umożliwiającą stosowanie metod badawczych zgodnych z aktualnym stanem wiedzy.

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

1. Karty gwarancyjne
2. Specyfikacje techniczne
3. Datę rozpoczęcia eksploatacji
4. Wykaz pracowników przeszkolonych i upoważnionych do obsługi oraz bezpośrednio odpowiedzialnych za daną aparaturę lub sprzęt
5. Instrukcje użytkownika
6. Zapisy kalibracji
7. Instrukcje postępowania przy działaniach naprawczych i korygujących
8. Oświadczenie o dopuszczeniu do użytkowania po usunięciu awarii
9. Dane o bieżącej obsłudze i kontroli
10. Dane o konserwacji bieżącej i okresowej prowadzonej zgodnie ze wskazaniami wytwórców przez użytkowników lub podmioty autoryzowane przez dystrybutorów albo wytwórców.

## Techniki molekularne

Biorąc pod uwagę w szczególności limitowaną ilość materiału do badań genetycznych, a także stale powiększającą się liczbę markerów molekularnych koniecznych do przeprowadzenia kompleksowej diagnostyki genetycznej w mięsakach, laboratorium wykonujące takie badania musi dysponować następującymi metodami:

**FISH** — rutynowa diagnostyka rearanzacji genowych oraz możliwość weryfikacji wyników uzyskanych inną metodą diagnostyczną. Do zalet metody należy zaliczyć łatwość wykonania oraz stosunkowo wysoką czułość i specyficzność. Natomiast kluczowe wady to: ograniczona liczba rearanzacji ocenianych w pojedynczym badaniu, możliwość uzyskania wyników fałszywie dodatnich z powodu identyfikowania zmian niefunkcjonalnych (fuzje poza ramką odczytu — niefunkcjonalne) bądź nieprawidłowej hybrydyzacji sondy oraz brak możliwości zidentyfikowania partnera fuzyjnego.

Sondy, które powinny być wykorzystywane w diagnostyce mięsaków, można podzielić na dwie grupy:

— panel podstawowy: *EWSR1*, *SS18*, *FOXO1*, *FUS*, *PDGFB*, *MDM2* (amplifikacja), *USP6*;

— panel rozszerzony: *TFE3*, *MAML2*, *YWHAE*, *JAZF1*, *RB1*, *PHF1*, *CAMTA1*, *DDIT3*, *c-MYC* (amplifikacja), *BCOR*.

**Sekwencjonowanie bezpośrednie metodą Sangera** — możliwość weryfikacji obecności istotnych klinicznie wariantów genetycznych (np. ocena statusu genów: *H3F3A*, *H3F3B*, *GNAS*, *IDH1*, *IDH2*) oraz weryfikacji obecności wariantów fuzyjnych wykrytych technologią NGS. Konieczna jest walidacja metody do preparatów archiwalnych, a dodatkowo odsetek analizowanych komórek nowotworowych nie powinien być mniejszy niż 20% względem wszystkich komórek w preparacie.

**Sekwencjonowanie następnej generacji (NGS)** — technologia przeznaczona do kompleksowej diagnostyki molekularnej w mięsakach, umożliwiająca w zależności od zastosowanego panelu jednoczesną detekcję wielu markerów molekularnych oraz wielu klas zmian genetycznych, tj. zmian punktowych, małych delecji/insercji, amplifikacji, fuzyji genowych przy minimalnym wykorzystaniu materiału tkankowego. Jedną z największych zalet tej techniki w kontekście analiz mięsaków jest możliwość jej wykorzystania do analizy RNA (RNAseq), umożliwiając tym samym sekwencjonowanie wyłącznie regionów kodujących (analiza RNA po procesie wycinania intronów i składania eksonów) i detekcję zaburzeń tego procesu. Analiza taka powinna posiadać możliwość wykrywania zarówno znanych, jak i nowych wariantów fuzyjnych i mieć możliwość odróżnienia fuzyji genów w transkrypcji w ramce od fuzyji poza ramką odczytu (fuzje funkcjonalne i niefunkcjonalne). Podstawowe wady to: duża zależność od jakości RNA, która może być bardzo niska z tkanek utrwalonych w parafinie,

kosztowne wymagania sprzętowe, stosunkowo długi czas wykonania badania, pracochłonność wymagająca personelu o wysokich kwalifikacjach z zakresu biologii molekularnej i bioinformatyki.

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

Wynik badania genetycznego powinien być gotowy w najkrótszym możliwym czasie, który w przypadku kompleksowego profilowania genetycznego technologią NGS nie powinien przekraczać 15 dni roboczych. Raport z przeprowadzonego diagnostycznego badania genetycznego powinien zawierać wynik, jego precyzyjną interpretację zrozumiałą dla onkologa klinicznego oraz patomorfologa, a także opis i zakres zastosowanej metodologii.

## Istotne akty prawne

1. Charakterystyka Produktu Leczniczego VITRAKVI ([https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/vitrakvi-epar-product-information\\_pl.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/vitrakvi-epar-product-information_pl.pdf)).
2. Obwieszczenie Ministra Zdrowia z dnia 5 września 2019 r. w sprawie ogłoszenia jednolitego tekstu rozporządzenia Ministra Zdrowia w sprawie standardów jakości dla medycznych laboratoriów diagnostycznych i mikrobiologicznych (Dz.U. 2019, poz. 1923).
3. Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 21 marca 2006 r. zmieniające rozporządzenie w sprawie wymagań, jakim powinno odpowiadać medyczne laboratorium diagnostyczne (Dz.U. 2006, nr 59, poz. 422).
4. Zarządzenie Nr 77/2019/DSOZ Prezesa Narodowego Funduszu Zdrowia z dnia 27 czerwca 2019 r. zmieniające zarządzenie w sprawie określenia warunków zawierania i realizacji umów w rodzaju leczenie szpitalne oraz leczenie szpitalne — świadczenia wysokospecjalistyczne.

## Piśmiennictwo

1. Cote GM, He J, Choy E. Next-generation sequencing for patients with sarcoma: a single center experience. *Oncologist*. 2018; 23(2): 234–242. doi: 10.1634/theoncologist.2017-0290, indexed in Pubmed: 28860410.
2. Lewin J, Garg S, Lau BY, et al. Identifying actionable variants using next generation sequencing in patients with a historical diagnosis of undifferentiated pleomorphic sarcoma. *Int J Cancer*. 2018; 142(1): 57–65. doi: 10.1002/ijc.31039, indexed in Pubmed: 28891048.
3. Al-Zaid T, Wang WL, Somaiah N, et al. Molecular profiling of sarcomas: new vistas for precision medicine. *Virchows Arch*. 2017; 471(2): 243–255. doi: 10.1007/s00428-017-2174-3, indexed in Pubmed: 28664413.
4. Szurian K, Kashofer K, Liegl-Atzwanger B. Role of next-generation sequencing as a diagnostic tool for the evaluation of bone and soft-tissue tumors. *Pathobiology*. 2017; 84(6): 323–338. doi: 10.1159/000478662, indexed in Pubmed: 28817827.
5. Groisberg R, Roszik J, Conley A, Patel SR, Subbiah V. The Role of Next-Generation Sequencing in Sarcomas: Evolution From Light Microscope to Molecular Microscope. *Curr Oncol Rep*. 2017 Oct 13;19(12):78.



6. Patel M, Kato SM, Kurzrock R. Molecular tumor boards: realizing precision oncology therapy. *Clin Pharmacol Ther.* 2018; 103(2): 206–209, doi: [10.1002/cpt.920](https://doi.org/10.1002/cpt.920), indexed in Pubmed: [29134641](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29134641/).
7. Italiano A. Is there value in molecular profiling of soft-tissue sarcoma? *Curr Treat Options Oncol.* 2018; 19(12): 78, doi: [10.1007/s11864-018-0589-y](https://doi.org/10.1007/s11864-018-0589-y), indexed in Pubmed: [30523434](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30523434/).
8. Groisberg R, Roszik J, Conley A, et al. The role of next-generation sequencing in sarcomas: evolution from light microscope to molecular microscope. *Curr Oncol Rep.* 2017; 19(12): 78, doi: [10.1007/s11912-017-0641-2](https://doi.org/10.1007/s11912-017-0641-2), indexed in Pubmed: [29030741](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29030741/).
9. Bourgeois JM, Knezevich SR, Mathers JA, et al. Molecular detection of the ETV6-NTRK3 gene fusion differentiates congenital fibrosarcoma from other childhood spindle cell tumors. *Am J Surg Pathol.* 2000; 24(7): 937–946, doi: [10.1097/0000478-200007000-00005](https://doi.org/10.1097/0000478-200007000-00005), indexed in Pubmed: [10895816](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10895816/).
10. Brenca M, Rossi S, Polano M, et al. Transcriptome sequencing identifies ETV6-NTRK3 as a gene fusion involved in GIST. *The Journal of Pathology.* 2016; 238(4): 543–549, doi: [10.1002/path.4677](https://doi.org/10.1002/path.4677).
11. Bui NQ, Przybyl J, Trabucco SE, et al. A clinico-genomic analysis of soft tissue sarcoma patients reveals CDKN2A deletion as a biomarker for poor prognosis. *Clin Sarcoma Res.* 2019; 9: 12, doi: [10.1186/s13569-019-0122-5](https://doi.org/10.1186/s13569-019-0122-5), indexed in Pubmed: [31528332](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31528332/).
12. Chang JC, Zhang L, Drilon AE, et al. Expanding the molecular characterization of thoracic inflammatory myofibroblastic tumors beyond ALK gene rearrangements. *J Thorac Oncol.* 2019; 14(5): 825–834, doi: [10.1016/j.jtho.2018.12.003](https://doi.org/10.1016/j.jtho.2018.12.003), indexed in Pubmed: [30550870](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30550870/).
13. Chmielecki J, Bailey M, He J, et al. Genomic profiling of a large set of diverse pediatric cancers identifies known and novel mutations across tumor spectra. *Cancer Res.* 2017; 77(2): 509–519, doi: [10.1158/0008-5472.CAN-16-1106](https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-1106), indexed in Pubmed: [28069802](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28069802/).
14. Church AJ, Calicchio ML, Nardi V, et al. Recurrent EML4-NTRK3 fusions in infantile fibrosarcoma and congenital mesoblastic nephroma suggest a revised testing strategy. *Mod Pathol.* 2018; 31(3): 463–473, doi: [10.1038/modpathol.2017.127](https://doi.org/10.1038/modpathol.2017.127), indexed in Pubmed: [29099503](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29099503/).
15. Croce S, Hostein I, Longacre TA, et al. Uterine and vaginal sarcomas resembling fibrosarcoma: a clinicopathological and molecular analysis of 13 cases showing common NTRK-rearrangements and the description of a COL1A1-PDGFB fusion novel to uterine neoplasms. *Mod Pathol.* 2019; 32(7): 1008–1022, doi: [10.1038/s41379-018-0184-6](https://doi.org/10.1038/s41379-018-0184-6), indexed in Pubmed: [30877273](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30877273/).
16. Gatalica Z, Xiu J, Swensen J, et al. Molecular characterization of cancers with NTRK gene fusions. *Mod Pathol.* 2019; 32(1): 147–153, doi: [10.1038/s41379-018-0118-3](https://doi.org/10.1038/s41379-018-0118-3), indexed in Pubmed: [30171197](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30171197/).
17. Yamazaki F, Nakatani F, Asano N, et al. Novel NTRK3 fusions in fibrosarcomas of adults. *Am J Surg Pathol.* 2019; 43(4): 523–530, doi: [10.1097/PAS.0000000000001194](https://doi.org/10.1097/PAS.0000000000001194), indexed in Pubmed: [30520818](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30520818/).
18. Solomon JP, Linkov I, Rosado A, et al. NTRK fusion detection across multiple assays and 33,997 cases: diagnostic implications and pitfalls. *Mod Pathol.* 2020; 33(1): 38–46, doi: [10.1038/s41379-019-0324-7](https://doi.org/10.1038/s41379-019-0324-7), indexed in Pubmed: [31375766](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31375766/).
19. Stransky N, Cerami E, Schalm S, et al. The landscape of kinase fusions in cancer. *Nat Commun.* 2014; 5: 4846, doi: [10.1038/ncomms5846](https://doi.org/10.1038/ncomms5846), indexed in Pubmed: [25204415](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25204415/).
20. Surrey LF, MacFarland SP, Chang F, et al. Clinical utility of custom-designed NGS panel testing in pediatric tumors. *Genome Med.* 2019; 11(1): 32, doi: [10.1186/s13073-019-0644-8](https://doi.org/10.1186/s13073-019-0644-8), indexed in Pubmed: [31133068](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31133068/).
21. Yamamoto H, Nozaki Y, Kohashi K, Kinoshita I, Oda Y. Diagnostic utility of pan-Trk immunohistochemistry for inflammatory myofibroblastic tumors. *Histopathology.* 2019.
22. Zhu G, Benayed R, Ho C, et al. Diagnosis of known sarcoma fusions and novel fusion partners by targeted RNA sequencing with identification of a recurrent ACTB-FOSB fusion in pseudomyogenic hemangioendothelioma. *Mod Pathol.* 2019; 32(5): 609–620, doi: [10.1038/s41379-018-0175-7](https://doi.org/10.1038/s41379-018-0175-7), indexed in Pubmed: [30459475](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30459475/).
23. Chiang S, Cotzia P, Hyman DM, et al. NTRK fusions define a novel uterine sarcoma subtype with features of fibrosarcoma. *Am J Surg Pathol.* 2018; 42(6): 791–798, doi: [10.1097/PAS.0000000000001055](https://doi.org/10.1097/PAS.0000000000001055), indexed in Pubmed: [29553955](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29553955/).
24. Doebele RC, Davis LE, Vaishnavi A, et al. An oncogenic NTRK fusion in a patient with soft-tissue sarcoma with response to the tropomyosin-related kinase inhibitor LOXO-101. *Cancer Discov.* 2015; 5(10): 1049–1057, doi: [10.1158/2159-8290.CD-15-0443](https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-15-0443), indexed in Pubmed: [26216294](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26216294/).
25. Pavlick D, Schrock AB, Malicki D, et al. Identification of NTRK fusions in pediatric mesenchymal tumors. *Pediatr Blood Cancer.* 2017; 64(8), doi: [10.1002/pbc.26433](https://doi.org/10.1002/pbc.26433), indexed in Pubmed: [28097808](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28097808/).
26. Hewitt SM, Lewis FA, Cao Y, et al. Tissue handling and specimen preparation in surgical pathology: issues concerning the recovery of nucleic acids from formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. *Arch Pathol Lab Med.* 2008; 132(12): 1929–1935, doi: [10.1043/1543-2165-132.12.1929](https://doi.org/10.1043/1543-2165-132.12.1929), indexed in Pubmed: [19061293](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19061293/).