

**Kamila Wojas-Krawczyk¹, Patryk Jasielski¹, Paweł Krawczyk¹, Tomasz Jankowski¹,
Magdalena Wójcik-Superczyńska¹, Katarzyna Reszka², Izabela Chmielewska¹,
Jarosław Buczkowski¹, Tomasz Kucharczyk¹, Justyna Szumiło³, Jarosław Kołb-Sielecki⁴,
Youssef Sleiman⁵, Aleksandra Szczęśna⁶, Tomasz Ciszewski⁷, Rodryg Ramlau⁸,
Grażyna Jagiełło⁹, Piotr Krudys¹⁰, Janusz Milanowski¹**

¹Katedra i Klinika Pneumologii, Onkologii i Alergologii, Uniwersytet Medyczny w Lublinie

²Instytut Genetyki i Immunologii GENIM Sp. z o.o. w Lublinie

³Katedra i Zakład Patomorfologii Klinicznej, Uniwersytet Medyczny w Lublinie

⁴Samodzielny Publiczny Zespół Gruzlicy i Chorób Płuc w Olsztynie

⁵Wojewódzki Szpital Specjalistyczny im. św. Rafała w Czerwonej Górze

⁶Mazowieckie Centrum Leczenia Chorób Płuc i Gruzlicy w Otwocku

⁷Szpital Wojewódzki im. św. Ojca Pio w Przemyślu

⁸Klinika Onkologii, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

⁹Kujawsko-Pomorskie Centrum Pulmonologii w Bydgoszczy

¹⁰Izerskie Centrum Pulmonologii i Chemioterapii w Szklarskiej Porębie

Ocena rearanżacji genu *ROS1* za pomocą fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* w niedrobnokomórkowym raku płuca

Analysis of *ROS1* gene rearrangement incidence among NSCLC patients with fluorescent *in situ* hybridization technique

Artykuł jest tłumaczeniem pracy:

Wojas-Krawczyk K, Jasielski P, Krawczyk P, et al. Analysis of *ROS1* gene rearrangement incidence among NSCLC patients with fluorescent *in situ* hybridization technique. *Oncol Clin Pract* 2020; 16. DOI: 10.5603/OCPr.2020.0024.

Należy cytować wersję pierwotną.

Adres do korespondencji:

Dr hab. n. med. Kamila Wojas-Krawczyk
Katedra i Klinika Pneumologii,
Onkologii i Alergologii
Uniwersytet Medyczny w Lublinie
ul. Jaczewskiego 8, 20-954 Lublin
Tel. +48 81 724 42 93
e-mail: kamilawojas@wp.pl

STRESZCZENIE

Wstęp. Rearanżację genu kodującego protoonkogen ROS (*ROS1*) obserwuje się u bardzo niewielkiego odsetka (1–2%) chorych na niedrobnokomórkowego raka płuca (NDRP). Charakterystyka kliniczna chorych z omawianym zaburzeniem genu *ROS1* jest podobna jak w grupie chorych z rearanżacją genu *ALK*. Wykrycie nieprawidłowości w genie *ROS1* stanowi niezmiernie ważny czynnik predykcyjny, umożliwiający zastosowanie kryzotyribu w pierwszej linii leczenia u chorych na NDRP w stopniu IIIB (chorzy poza możliwością leczenia radykalnego) lub IV. W związku z dodaniem kryzotyribu do listy leków refundowanych od stycznia 2019 roku analiza tej zmiany genetycznej powinna być częścią panelu badań molekularnych wykonywanych u chorych na miejscowo zaawansowanego i zaawansowanego NDRP w ramach kwalifikacji do leczenia ukierunkowanego molekularnie.

Cel badania. Celem badania była analiza częstości występowania rearanżacji genu *ROS1* wśród chorych na NDRP w stadium IIIB lub IV, kwalifikowanych do terapii ukierunkowanych molekularnie. Przedstawiono także trudności metodologiczne badania fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH), wykonywanego w celu wykrycia tej nieprawidłowości genetycznej.

Materiał i metody. Analiza rearanżacji genu *ROS1* została przeprowadzona za pomocą metody fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* w próbkach materiału pobranego od 573 chorych na NDRP o typie innym niż plaskonabłonkowy w trakcie rutynowej diagnostyki patomorfologicznej.

Wyniki. Analizie poddano materiał uzyskany z guza nowotworowego, utrwalony w formalinie i zarchiwizowany w parafinie. U 408 chorych uzyskano materiał histologiczny, a u 165 — cytologiczny (cytobłok). U 439 chorych otrzymano wiarygodny (diagnostyczny) wynik badania rearanżacji genu *ROS1* (76,61%). Głównymi przeszkodami w dokonaniu analizy w pozostałych przypadkach były mała liczba komórek nowotworowych oraz wysokie zakłócenia fluorescencyjne tła i fragmentacja jąder komórkowych. Rearanżację genu *ROS1* wykryto u 9 chorych na raka gruczołowego (1,57% wszystkich chorych), w tym u 5 mężczyzn i 4 kobiet. U 19 chorych zaobserwowano inne

nieprawidłowości dotyczące genu *ROS1*, przede wszystkim polisomią badanego fragmentu genu *ROS1* (3,32%). Polisomia nie współistniała z rearanżacją genu *ROS1*.

Wnioski. Fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ* stanowi użyteczne narzędzie w wykrywaniu rearanżacji genu *ROS1*. Badanie może być przeprowadzone w materiale zarówno histologicznym, jak i cytologicznym (cytoblok). Niezmiernie istotne dla uzyskania wiarygodnego wyniku są jednak prawidłowe utrwalenie materiału oraz odpowiednia liczba komórek nowotworowych w badanym preparacie.

Słowa kluczowe: rearanżacja genu *ROS1*, fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ*, niedrobnokomórkowy rak płuca, kryzotynib

ABSTRACT

Introduction. The rearrangement of the gene encoding ROS protooncogene (*ROS1*) is observed in a very small percentage (1–2%) of patients with non-small cell lung cancer (NSCLC). The clinical characteristics of *ROS1*-positive patients are similar to those observed in the group of patients with *ALK* gene rearrangement. Detection of *ROS1* gene rearrangement is an extremely important predictive factor enabling the use of crizotinib in the 1st line of NSCLC patients with stage IIIB or IV. Due to the addition of crizotinib to the list of reimbursed drugs from January 2019, the analysis of this genetic change should be part of a molecular tests panel performed in patients with locally advanced and advanced NSCLC in the qualification for molecularly targeted treatment.

Aim of the study. Analysis of *ROS1* gene rearrangement incidence among NSCLC patients in stage IIIB or IV qualified for molecularly targeted therapies. Presentation of methodological difficulties with fluorescent *in situ* hybridization (FISH) technique which is used to detect *ROS1* genetic abnormality.

Materials and methods. The analysis of *ROS1* gene rearrangement was carried out using fluorescent *in situ* hybridization technique in tissue samples taken from 573 NSCLC patients of non-squamous cell type during routine pathomorphological diagnostics.

Results. The material obtained from the tumor was fixed in formalin and archived in paraffin. Histological material was obtained from 408 patients, and from 165 — cytological (cytoblock). A reliable (diagnostic) result of the *ROS1* gene rearrangement was obtained in 439 patients (76.61%). The main difficulties for *ROS1* gene analysis were low number of cancer cells, as well as high background fluorescence interference and fragmentation of cell nuclei. *ROS1* gene rearrangement was detected in 9 patients with adenocarcinoma (1.57% among all patients), including 5 men and 4 women. In 19 patients, other abnormalities regarding the *ROS1* gene were observed, primarily the polysomy of the examined *ROS1* gene fragment (3.32%). Polysomy did not coexist with the *ROS1* rearrangement.

Conclusion. Fluorescent *in situ* hybridization is a useful tool in detecting *ROS1* gene rearrangement. The test can be performed in both histological and cytological material (cytoblock). However, the correct fixation of the material and the appropriate number of tumor cells in the tested samples is extremely important for obtaining a reliable result.

Key words: *ROS1* rearrangement, fluorescence *in situ* hybridization, non-small cell lung cancer, crizotinib

Wprowadzenie

Rozpoczęcie procesu karcynogenezy związane jest z pojawieniem się somatycznej (niedziedzicznej), pojedynczej mutacji w onkogenie, która skutkuje zaburzeniem podstawowych procesów fizjologicznych, a w konsekwencji prowadzi do niekontrolowanych podziałów komórek. W odniesieniu do tego podstawowego założenia terapia ukierunkowana molekularnie to leczenie blokujące nieprawidłowy szlak sygnałowy w komórkach nowotworowych. Skuteczność terapii ukierunkowanej molekularnie zależy zatem od obecności (lub braku) mutacji kierującej (*driver mutation*) [1, 2].

Obecnie dostępnych jest kilka terapii ukierunkowanych molekularnie w leczeniu chorych na niedrobnokomórkowego raka płuca (NDRP). Znaczącą odpowiedź kliniczną po zastosowaniu inhibitorów kinazy tyrozyno-

wej (IKT) EGFR (takich jak gefitynib, erlotynib, afatynib, ozymertynib, dakomitynib) obserwuje się u chorych na NDRP z wykrytą mutacją aktywującą w genie kodującym receptor dla naskórkowego czynnika wzrostu (EGFR, *epidermal growth factor receptor*). W Polsce refundowane są gefitynib, erlotynib, afatynib oraz — dla wybranych chorych — ozymertynib. Inny rodzaj terapii ukierunkowanej molekularnie polega na zastosowaniu inhibitorów kinazy chłoniaka anaplastycznego (ALK, *anaplastic lymphoma kinase*) u chorych ze stwierdzoną rearanżacją genu *ALK*. W tej grupie leków refundacją w Polsce objęte są kryzotynib, cerytynib i alektynib, natomiast rejestrację na terenie Unii Europejskiej (UE) mają jeszcze brygatynib i lorlatynib [3–5]. U chorych na NDRP z mutacjami w genie *BRAF* w krajach UE z powodzeniem stosuje się inhibitory BRAF i MEK: dabrafenib i trametynib, a w przypadku rearanżacji ge-

nów NTRK — larotrektytib i entrektytib (leki w Polsce nierefundowane) [5].

Kolejną grupę leków ukierunkowanych molekularnie, które znalazły zastosowanie u chorych na NDRP, stanowią inhibitory ROS1. Gen *ROS1*, znajdujący się na chromosomie 6 (lokalizacja cytogenetyczna: 6p22), koduje receptor o aktywności kinazy tyrozynowej ROS, należący do rodziny receptorów insulinowych, ewolucyjnie spokrewniony z receptorem ALK [6–8]. Nieprawidłowości molekularne stwierdzone u chorych na NDRP to rearanżacja genu *ROS1*. Nieprawidłowość ta występuje u zaledwie 1–2% chorych z rozpoznaniem raka gruczołowego, a charakterystyka kliniczna chorych z rearanżacją genu *ROS1* jest podobna jak u chorych na NDRP ze stwierdzoną nieprawidłowością w genie *ALK* [6–8].

W grupie chorych z rearanżacją genu *ROS1* istnieje możliwość zastosowania inhibitora kinaz tyrozynowych ALK, ROS1 i MET — kryzotylibu. W prospektywnych badaniach klinicznych na leczenie odpowiadało ponad 70% chorych na NDRP z rearanżacją genu *ROS1* otrzymujących kryzotylib w pierwszej linii leczenia, a mediana czasu wolnego od progresji wynosiła u nich 19,2 miesiąca [8, 9]. Z tych względów diagnostyka rearanżacji genu *ROS1* powinna zostać niezwłocznie włączona do panelu badań molekularnych oferowanych chorym na miejscowo zaawansowanego i zaawansowanego NDRP. W Polsce taka procedura diagnostyczna dostępna jest w coraz szerszym zakresie od stycznia 2019 roku, kiedy to kryzotylib został objęty refundacją dla chorych na gruczołowego raka płuca z rearanżacją genu *ROS1*.

Cel badania

Celem prezentowanego badania była ocena częstości występowania rearanżacji oraz innych nieprawidłowości molekularnych genu *ROS1* oznaczonych przy pomocy fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH, *fluorescence in situ hybridization*) u chorych na miejscowo zaawansowanego i zaawansowanego NDRP. Ponadto przedstawiono trudności metodologiczne badania FISH, stosowanego w celu wykrycia nieprawidłowości genu *ROS1*.

Materiał i metody

Charakterystyka badanej grupy

Analizie poddano materiał uzyskany z guza nowotworowego od 573 chorych na NDRP o typie innym niż rak płaskonabłonkowy, utrwalony w formalinie i zarchiwizowany w parafinie. Badanie rearanżacji genu *ROS1* wykonywano po wykluczeniu obecności mutacji w genie *EGFR* i rearanżacji genu *ALK*. U 408 chorych

Tabela 1. Analiza demograficzna pacjentów poddanych ocenie rearanżacji genu *ROS1*

Płeć [n (%)]	
Kobiety	226 (39,44%)
Mężczyźni	347 (60,56%)
Wiek (lata, średnia ± odchylenie standardowe)	
Kobiety	65,85 ± 8,89
Mężczyźni	66,22 ± 8,13
Rozpoznanie histopatologiczne NDRP	
Gruczolakorak	464 (80,10%)
Pozostałe NDRP o typie innym niż płaskonabłonkowy	109 (19,90%)
Ekspresja TTF1 na komórkach nowotworowych	
Ekspresja TTF1 obecna	270 (47,12%)
Ekspresja TTF1 nieobecna	77 (13,44%)
Ekspresja TTF1 nie była badana	226 (39,44%)
Rodzaj materiału poddanego analizie	
Materiał histologiczny (drobne wycinki i materiał operacyjny)	408 (71,20%)
Cytoblok	165 (28,80%)

TTF1 (*thyroid transcription factor type 1*) — tarczycowy czynnik transkrypcji typu 1

badanie przeprowadzono w materiale histologicznym, a u 165 — cytologicznym (cytoblok). Charakterystykę demograficzną i kliniczną chorych podsumowano w tabeli 1.

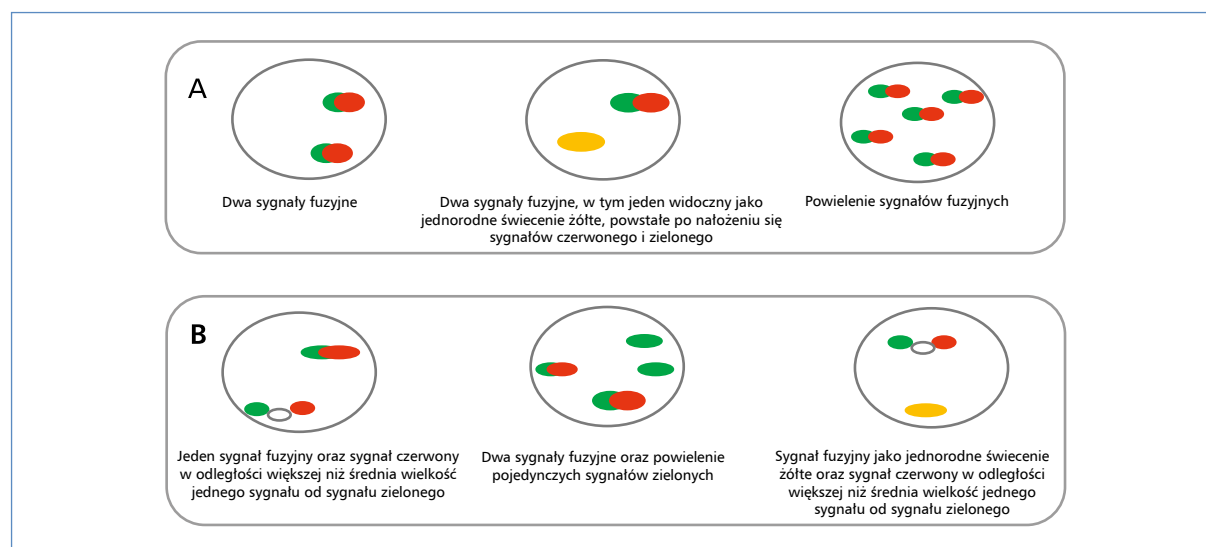
Procedura analizy rearanżacji genu *ROS1* z wykorzystaniem metody FISH

Sposób analizy rearanżacji genu *ROS1* jest analogiczny do sposobu analizy rearanżacji genu *ALK*. W trakcie badania rearanżacji genu *ROS1* ocenia się jego integralność, czyli badamy fakt zaistnienia pęknięcia nici DNA i przemieszczenia się fragmentu genu *ROS1* w inne miejsce w genomie, ale nie badamy rodzaju powstałej fuzji genowej [8]. W metodzie FISH używamy sond molekularnych, czyli krótkich odcinków DNA komplementarnych do interesujących nas sekwencji w badanym DNA. W diagnostyce rearanżacji genu *ROS1* stosuje się dwie sondy: sondę z fluorochromem zielonym (*green*), która pokrywa sekwencje DNA proksymalne, bliżej do regionu wrażliwego na pęknięcia genu *ROS1*, oraz sondę z fluorochromem czerwonym (*red* lub *orange*), której sekwencje są komplementarne dystalnie do regionu wrażliwego na pęknięcia w genie *ROS1* (na podstawie *ZytoLight® SPEC ROS1 Dual Color Break Apart Probe*). Wykonując badanie metodą FISH, należy wziąć pod uwagę fakt, że producenci sond molekularnych mogą znakować je w różny sposób, co ma ogromne znaczenie przy interpretacji uzyskanych wyników.

Tabela 2. Możliwości wykonania oznaczenia rearanżacji genu *ROS1* w różnych materiałach

Materiał tkankowy — bloczek parafinowy	Materiał z biopsji gruboigłowej — bloczek parafinowy	Materiał z kriobiopsji	Materiał cytologiczny — cytoblok	Materiał cytologiczny H+E lub Papanicolaou — szkiełko mikroskopowe	Płynna biopsja — krew obwodowa
+++	+++	+ (Metoda musi zostać zwalidowana przez laboratorium)	++	– (Tylko eksperyment medyczny wykorzystujący stabilność DNA w niektórych preparatach cytologicznych wybarwionych techniką Papanicolaou lub H+E)	– (Tylko eksperyment medyczny wykonywany przy wykorzystaniu wolno krążące komórki nowotworowe)

H+E — hematoksylina + eozyna

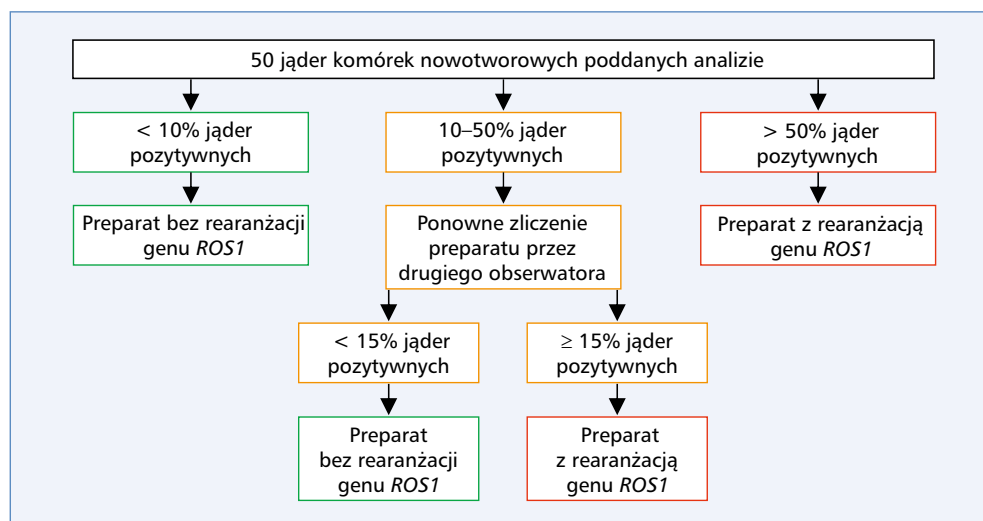
Rycina 1. Schematy możliwych do obserwacji sygnałów z sond fluorescencyjnych w przypadku: A — jąder komórek nowotworowych bez rearanżacji genu *ROS1*; B — jąder komórek nowotworowych z obecną rearanżacją genu *ROS1*

Procedura laboratoryjna postępowania z materiałem do badania rearanżacji genu *ROS1* opiera się na zastosowaniu gotowych zestawów umożliwiających odparafinowanie materiału tkankowego, utrwalenie, trawienie w buforze proteazowym, denaturację oraz hybrydyzację ze swoistą sondą molekularną. W procedurze tej należy postępować zgodnie z instrukcją podaną przez producenta oraz trzeba zwalidować zastosowaną metodykę w laboratorium. W prezentowanej pracy użyto sondy molekularnej *ZytoLight® SPEC ROS1 Dual Color Break Apart Probe* (ZytoVision, Niemcy), zestawu *Vysis Paraffin Pretreatment & Post-Hybridization Wash Buffer Kit* (Abbott, USA), natomiast oceny świecenia sygnałów fluorescencyjnych dokonano w mikroskopie Axio Scope (Zeiss, Niemcy). Należy też pamiętać, że podobnie jak w przypadku analizy rearanżacji genu *ALK*, nie we wszystkich materiałach możliwe jest przeprowadzenie analizy rearanżacji genu *ROS1*. W tabeli 2 zestawiono materiały, które są dostarczane do laboratoriów

i w których istnieje możliwość wykonania oznaczenia metodą FISH.

Jądro komórki nowotworowej jest oceniane jako pozytywne (z obecną rearanżacją genu *ROS1*), gdy przerwa pomiędzy pomarańczowym lub czerwonym i zielonym sygnałem jest większa niż średnica największego sygnału w parze lub gdy występuje izolowany sygnał zielony przy współwystępowaniu sygnałów fuzyjnych (na podstawie *ZytoLight® SPEC ROS1 Dual Color Break Apart Probe*). Schematy możliwych do obserwacji sygnałów z sond fluorescencyjnych przedstawiono na rycinie 1.

Wynik badania rearanżacji genu *ROS1* uznaje się za pozytywny, gdy w 15% badanych jąder komórek nowotworowych stwierdza się opisane nieprawidłowości sygnałów. Jednak, aby zapobiec błędowi stroniczości, zaleca się, by badanie wykonywało dwóch laborantów [8]. Schemat postępowania diagnostycznego przy ocenie rearanżacji genu *ROS1* zaprezentowano na rycinie 2.



Rycina 2. Algorytm postępowania przy ocenie rearanżacji genu *ROS1* metodą FISH (na podstawie [8])

W celu porównania średnich z dwóch niezależnych od siebie grup użyto testu t-Studenta oraz programu Statistica v. 13.1. Oceny, czy zaobserwowany rozkład danej cechy zależy od innej zmiennej, dokonano przy zastosowaniu testu χ^2 Pearsona. Analizę przeżycia przeprowadzono metodą Kaplana–Meiera za pomocą MedCalc v. 18.11.6.

Wyniki

Analiza częstości występowania nieprawidłowości genu *ROS1*

Badanie rearanżacji genu *ROS1* metodą FISH przeprowadzono u 573 chorych na NDRP o typie innym niż płaskonabłonkowy. W 439 przypadkach (76,61%) udało się otrzymać wiarygodny wynik badania, natomiast aż w 134 (23,39%) przypadkach nie uzyskano wyniku diagnostycznego. Wśród materiałów niediagnostycznych znajdowało się 55 materiałów cytologicznych utrwalonych w postaci cytobłoków (co stanowiło 33% wszystkich cytobłoków nadesłanych do badania) oraz 79 materiałów histologicznych (co stanowiło 19,4% wszystkich materiałów histologicznych). W związku z tym niediagnostyczny wynik badania rearanżacji genu *ROS1* uzyskiwano istotnie częściej w materiałach cytologicznych niż histologicznych ($p = 0,00035$; $\chi^2 = 12,798$).

Ograniczenia analizy rearanżacji genu *ROS1* metodą FISH wynikały przede wszystkim ze zbyt małej liczby komórek nowotworowych w badanym materiale oraz z braku sygnałów sond molekularnych, najprawdopodobniej z powodu nieprawidłowego utrwalenia materiałów przesłanych do badań. Przedlaboratoryjna obróbka materiału histologicznego i cytologicznego ma niezwykle

ważny wpływ na możliwość uzyskania diagnostycznego wyniku badania rearanżacji genów metodą FISH.

W badanej grupie rearanżację genu *ROS1* wykryto u 9 chorych, co stanowiło 1,57% wszystkich badanych osób. Rearanżację wykryto u 5 mężczyzn i u 4 kobiet ($p = 0,757$; $\chi^2 = 0,096$). U wszystkich chorych *ROS1*-pozytywnych rozpoznano gruczolakoraka płuca (1,94% chorych na raka gruczołowego). U 6 chorych *ROS1*-pozytywnych zaobserwowano ekspresję białka TTF1 na komórkach nowotworowych, a u pozostałych 3 nie stwierdzono ekspresji tego markera gruczołowego raka płuca ($p = 0,415$; $\chi^2 = 0,664$). U chorych *ROS1*-pozytywnych mediana odsetka jąder komórek nowotworowych z rearanżacją genu *ROS1* wynosiła 18%, a mediana liczby kopii genu *ROS1* — 2,6.

U 138 (24,08%) chorych zaobserwowano jądra komórek nowotworowych z rearanżacją genu *ROS1*, jednak z wynikiem niespełniającym kryteriów włączenia chorego do leczenia ukierunkowanego molekularnie (< 15% jąder komórek nowotworowych z rearanżacją genu *ROS1*). U 19 chorych (3,32% badanych) odnotowano polisomię genu *ROS1* (≥ 4 kopie genu *ROS1* w jądrze komórkowym), ale w żadnym przypadku nieprawidłowość ta nie współistniała z rearanżacją genu *ROS1*. W całej grupie badanej mediana liczby kopii genu *ROS1* wynosiła 2,4. Nie zależała ona istotnie od płci, wieku, diagnozy patomorfologicznej ani od obecności ekspresji TTF1 i CK7 na komórkach nowotworowych.

Czas życia chorych z oznaczonym statusem genu *ROS1*

W badanej grupie leczenie ukierunkowane molekularnie za pomocą kryzotyribu otrzymało 6 chorych z rearanżacją genu *ROS1* (u 3 pozostałych osób z tej

grupy przebieg choroby był niekorzystny i uniemożliwił zastosowanie leczenia systemowego). U chorych bez rearanżacji genu *ROS1* leczenie pierwszej linii pembrolizumabem otrzymało 54 chorych wykazujących ekspresję PD-L1 na ponad 50% komórek nowotworowych (9,57%), a 412 chorych otrzymało chemioterapię (73,05%), przy czym immunoterapię drugiej linii otrzymało 16 chorych (liczba ta znacznie wzrosła w trakcie obserwacji, gdyż obserwację chorych autorzy rozpoczęli od stycznia 2019 roku). Żadnego leczenia systemowego ze względu na zły stan sprawności i obecność chorób towarzyszących nie otrzymało 98 chorych (17,38%).

Mediana całkowitego przeżycia (mOS, *median of overall survival*) nie zależała od płci, wieku, diagnozy patomorfologicznej, obecności rearanżacji genu *ROS1* ani liczby kopii genu *ROS1* w jądrach komórek nowotworowych. Wartość mOS u chorych na NDRP typu „niepłaskonabłonkowego” z ekspresją TTF1 na komórkach nowotworowych wynosiła 13 miesięcy, a u chorych bez ekspresji tego markera tylko 7 miesięcy [hazard względny (HR, *hazard ratio*) = 0,5634; $p = 0,01$]. Wartość mOS u chorych otrzymujących chemioterapię pierwszej linii, a następnie immunoterapię drugiej linii wynosiła 29 miesięcy [95-procentowy przedział ufności (95% CI, *confidence interval*): 20,0–29,0], natomiast u chorych otrzymujących tylko chemioterapię — 14 miesięcy (95% CI: 10,0–30,0), a u chorych bez leczenia systemowego (z powodu złego stanu sprawności) — 2 miesiące. Mediana całkowitego przeżycia u chorych z rearanżacją genu *ROS1* leczonych kryzotynibem oraz u chorych z ekspresją PD-L1 na ponad 50% komórek nowotworowych otrzymujących immunoterapię pierwszej linii przy użyciu pembrolizumabu nie została osiągnięta. Różnice te były istotne statystycznie ($p < 0,0001$). W grupie chorych leczonych kryzotynibem w chwili przeprowadzenia analizy statystycznej 5 pacjentów nadal żyło (2–13 miesięcy leczenia), a 1 chory zmarł po 7 miesiącach od wdrożenia leczenia ukierunkowanego molekularnie.

Dyskusja

Rearanżacja genu *ROS1* została po raz pierwszy wykryta u chorego na raka płuca w 2007 roku [10]. Obecnie zmiana ta jest stosunkowo dobrze poznana — szacuje się, że występuje u 1–2% chorych na NDRP. Chorzy z rearanżacją genu *ROS1* to zazwyczaj młodzi chorzy na raka gruczołowego (około 40.–50. roku życia), zauważalny jest jednak wzrost częstości występowania rearanżacji *ROS1* także u chorych powyżej 70. roku życia. Spośród pacjentów z rearanżacją genu *ROS1* 70% nigdy nie paliło tytoniu, a 30% pali aktualnie lub paliło w przeszłości [9, 11]. Nie zaobserwowano znaczących różnic w występowaniu rearanżacji w zależności od rasy chorych na NDRP — w badaniu przeprowadzonym przez IASLC

(*International Association for the Study of Lung Cancer*) rearanżację genu *ROS1* stwierdzono u 2,3% chorych rasy azjatyckiej, u 2% chorych rasy kaukaskiej oraz u 1,6% chorych zamieszkujących Amerykę Północną. Opisuje się jednak różnice lokalne w częstości występowania rearanżacji *ROS1* — w badaniu przeprowadzonym w północnych Indiach nieprawidłowość tę wykryto u 2,8% chorych na NDRP [12]. Jak do tej pory trudno określić częstość występowania tej nieprawidłowości genetycznej w polskiej populacji chorych na NDRP. W prezentowanym badaniu rearanżacja genu *ROS1* została wykryta u 1,57% chorych na NDRP o typie innym niż płaskonabłonkowy oraz u 1,94% chorych na raka gruczołowego, co stanowi potwierdzenie ogólnoświatowej częstości występowania tej nieprawidłowości genetycznej.

Mimo sporadycznego występowania omawianej rearanżacji genu *ROS1* korzyści z jej rozpoznawania i włączania leczenia ukierunkowanego molekularnie u chorych *ROS1*-pozytywnych mogą być znaczące. W badaniu klinicznym PROFILE1001 leczeniu kryzotynibem poddano 53 chorych na miejscowo zaawansowanego i zaawansowanego NDRP z wykrytą rearanżacją genu *ROS1*. Odsetek odpowiedzi na terapię wyniósł 72%, a mOS wyniosła 51,4 miesiąca [13]. W kolejnym badaniu skuteczność kryzotynibu w pierwszej linii leczenia ($n = 30$) została porównana do chemioterapii opartej na związkach platyny i pemetreksedzie ($n = 47$) u chorych na NDRP z rearanżacją genu *ROS1*. Mediana czasu obserwacji wyniosła 28,1 miesiąca. Odsetek obiektywnych odpowiedzi w grupie otrzymującej kryzotynib był wyższy niż w grupie chorych otrzymujących chemioterapię (odpowiednio: 86,7% vs. 44,7%; $p < 0,001$). Ponadto, w grupie chorych leczonych kryzotynibem obserwowano istotne wydłużenie czasu wolnego od progresji (18,4 miesiąca) w odniesieniu do chorych otrzymujących chemioterapię (8,6 miesiąca; $p < 0,001$). Mediana czasu całkowitego przeżycia dla chorych otrzymujących kryzotynib nie została osiągnięta, natomiast u chorych otrzymujących chemioterapię wyniosła ona 28,4 miesiąca (efekt zjawiska *cross-over*) [14].

Od stycznia 2019 roku kryzotynib uzyskał w Polsce refundację jako terapia ukierunkowana molekularnie dla chorych na NDRP w stopniu IIIB lub IV z rearanżacją genu *ROS1*. Problemem, z którym mogą się zetknąć klinicyści planujący terapię kryzotynibem u chorych *ROS1*-pozytywnych, jest rozwijająca się w trakcie leczenia oporność na ten lek. Gainor i wsp. zaobserwowali, że aż 53% chorych poddanych leczeniu kryzotynibem rozwija oporność, która najprawdopodobniej wiąże się z pojawianiem się nowych mutacji w genie *ROS1* [15]. Problem oporności na kryzotynib mogą rozwiązać badania nad drugą generacją inhibitorów *ROS1*. Przykładem użyteczności tej grupy leków może być udowodniona skuteczność lorlatynibu oraz repotretynibu, obserwowana u pacjentów *ROS1*-pozytywnych, u których

wystąpiła progresja choroby po zastosowaniu kryzotynibu [16].

W Polsce do diagnostyki rearanżacji genu *ROS1* stosuje się metodę fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* z wykorzystaniem specyficznych sond molekularnych. Jest to skuteczna i sprawdzona metoda diagnostyczna, cechująca się wysoką czułością i swoistością, a zestawy do tej diagnostyki posiadają certyfikaty CE-IVD (*franc. Conformance Europeenne-ang. in vitro diagnostic*). Opisywane w literaturze wyniki fałszywie dodatnie mogą wynikać z wykrycia nieaktywnej fuzji w genie *ROS1*, powstałej w wyniku obróbki posttranskrypcyjnej, ale jest to sytuacja kazuistyczna. W rezultacie zachodzącej rearanżacji gen *ROS1* może wchodzić w fuzje z innymi genami, np. *TPD52L1*, znajdującym się niedaleko lokalizacji genu *ROS1*. Zaistnienie takiej fuzji genów partnerskich może być problemem diagnostycznym w metodzie FISH [8, 17]. Jednak do tej pory jest to technika najszerszej wykorzystywana w diagnostyce rearanżacji genu *ROS1*, a jedyne jej ograniczenia to możliwość uszkodzenia materiału genetycznego komórek nowotworowych w trakcie nieprawidłowego utrwalenia i zabezpieczenia materiału tkankowego oraz zbyt niska liczba komórek nowotworowych w ocenianych materiałach. Trwają badania nad możliwością wykrycia obecności nieprawidłowego, fuzyjnego białka zawierającego *ROS1* na powierzchni komórek nowotworowych metodą immunohistochemiczną (IHC) [8], która w ostatnich miesiącach uzyskała certyfikat CE-IVD. W niektórych laboratoriach jest ona już rutynowo wykorzystywana w przesiewowym badaniu występowania nieprawidłowości genu *ROS1*. Należy jednak pamiętać, że wszystkie dodatnie wyniki badania IHC na obecność białka fuzyjnego zawierającego *ROS1* muszą być nadal potwierdzane metodą FISH. Kolejną techniką, która może być stosowana w analizie nieprawidłowości genu *ROS1*, jest sekwencjonowanie nowej generacji (NGS, *next generation sequencing*) [8].

Podsumowując, można stwierdzić, że analiza rearanżacji genu *ROS1* u chorych na miejscowo zaawansowanego lub zaawansowanego niedrobnokomórkowego raka płuca powinna być standardem w diagnostyce czynników predykcyjnych. Chorzy z rearanżacją genu *ROS1*, dzięki nowym generacjom leków, mają szansę na istotne wydłużenie czasu życia i poprawę jego jakości. Metoda FISH stanowi podstawową metodę diagnostyczną, ale należy przede wszystkim pamiętać, że przedlaboratoryjna obróbka materiału histologicznego i cytologicznego ma niezwykle istotny wpływ na możliwość uzyskania

diagnostycznego i wiarygodnego wyniku badania rearanżacji genów tą metodą.

Piśmiennictwo

- Raparia K, Villa C, DeCamp MM, et al. Molecular profiling in non-small cell lung cancer: a step toward personalized medicine. *Arch Pathol Lab Med.* 2013; 137(4): 481–491, doi: [10.5858/arpa.2012-0287-RA](https://doi.org/10.5858/arpa.2012-0287-RA), indexed in Pubmed: [23544937](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23544937/).
- Rosell R, Bivona TG, Karachaliou N. Genetics and biomarkers in personalisation of lung cancer treatment. *Lancet.* 2013; 382(9893): 720–731, doi: [10.1016/S0140-6736\(13\)61715-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)61715-8), indexed in Pubmed: [23972815](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23972815/).
- Sasaki T, Rodig SJ, Chirieac LR, et al. The biology and treatment of EML4-ALK non-small cell lung cancer. *Eur J Cancer.* 2010; 46(10): 1773–1780, doi: [10.1016/j.ejca.2010.04.002](https://doi.org/10.1016/j.ejca.2010.04.002), indexed in Pubmed: [20418096](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20418096/).
- Takeuchi K, Soda M, Togashi Y, et al. RET, ROS1 and ALK fusions in lung cancer. *Nat Med.* 2012; 18(3): 378–381, doi: [10.1038/nm.2658](https://doi.org/10.1038/nm.2658), indexed in Pubmed: [22327623](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22327623/).
- Jassem J, Krzakowski M. Nowotwory klatki piersiowej. Praktyczny przewodnik dla lekarzy. Wydanie III. Via Medica, Gdańsk 2018.
- Birchmeier C, O'Neill K, Riggs M, et al. Characterization of ROS1 cDNA from a human glioblastoma cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990; 87(12): 4799–4803, doi: [10.1073/pnas.87.12.4799](https://doi.org/10.1073/pnas.87.12.4799), indexed in Pubmed: [2352949](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2352949/).
- Charest A, Lane K, McMahon K, et al. Fusion of FIG to the receptor tyrosine kinase ROS in a glioblastoma with an interstitial del(6)(q21q21). *Gen Chrom Cancer.* 2003; 37(1): 58–71, doi: [10.1002/gcc.10207](https://doi.org/10.1002/gcc.10207), indexed in Pubmed: [12661006](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12661006/).
- Tsao MS, Hirsch RR, Yatabe Y, et al. IASLC Atlas of ALK and ROS1 testing in lung cancer. Second Edition. 2016.
- Shaw AT, Ou SHI, Bang YJ, et al. Crizotinib in ROS1-rearranged non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med.* 2014; 371(21): 1963–1971, doi: [10.1056/NEJMoa1406766](https://doi.org/10.1056/NEJMoa1406766), indexed in Pubmed: [25264305](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25264305/).
- Rikova K, Guo A, Zeng Q, et al. Global survey of phosphotyrosine signaling identifies oncogenic kinases in lung cancer. *Cell.* 2007; 131(6): 1190–1203, doi: [10.1016/j.cell.2007.11.025](https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.025), indexed in Pubmed: [18083107](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18083107/).
- Bergethon K, Shaw AT, Ou SHI, et al. ROS1 rearrangements define a unique molecular class of lung cancers. *J Clin Oncol.* 2012; 30(8): 863–870, doi: [10.1200/JCO.2011.35.6345](https://doi.org/10.1200/JCO.2011.35.6345), indexed in Pubmed: [22215748](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22215748/).
- Mehta A, Saifi M, Batra U, et al. Incidence of -rearranged non-small-cell lung carcinoma in india and efficacy of crizotinib in lung adenocarcinoma patients. *Lung Cancer (Auckl).* 2020; 11: 19–25, doi: [10.2147/LCTT.S244366](https://doi.org/10.2147/LCTT.S244366), indexed in Pubmed: [32158297](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32158297/).
- Shaw AT, Riely GJ, Bang YJ, et al. Crizotinib in ROS1-rearranged advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC): updated results, including overall survival, from PROFILE 1001. *Ann Oncol.* 2019; 30(7): 1121–1126, doi: [10.1093/annonc/mdz131](https://doi.org/10.1093/annonc/mdz131), indexed in Pubmed: [30980071](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30980071/).
- Shen L, Qiang T, Li Z, et al. First-line crizotinib versus platinum-pemetrexed chemotherapy in patients with advanced ROS1-rearranged non-small-cell lung cancer. *Cancer Med.* 2020; 13: 1–9, doi: [10.1002/cam4.2972](https://doi.org/10.1002/cam4.2972), indexed in Pubmed: [32167664](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32167664/).
- Gainor JF, Tseng D, Yoda S, et al. Patterns of metastatic spread and mechanisms of resistance to crizotinib in ROS1-positive non-small-cell lung cancer. *JCO Precis Oncol.* 2017; 10, doi: [10.1200/PO.17.00063](https://doi.org/10.1200/PO.17.00063), indexed in Pubmed: [29333528](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29333528/).
- Shaw A, Felip E, Bauer T, et al. Lorlatinib in non-small-cell lung cancer with ALK or ROS1 rearrangement: an international, multicentre, open-label, single-arm first-in-man phase 1 trial. *Lancet Oncol.* 2017; 18(12): 1590–1599, doi: [10.1016/s1470-2045\(17\)30680-0](https://doi.org/10.1016/s1470-2045(17)30680-0).
- Zhu VW, Upadhyay D, Schrock AB, et al. TPD52L1-ROS1, a new ROS1 fusion variant in lung adenocarcinoma identified by comprehensive genomic profiling. *Lung Cancer.* 2016; 97: 48–50, doi: [10.1016/j.lungcan.2016.04.013](https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2016.04.013), indexed in Pubmed: [27237027](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27237027/).