

Standardy diagnostyki genetycznej PTGC

Zmiany somatyczne w nowotworach litych dzieci i dorosłych

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

Wydanie II | 2026

Standardy diagnostyki genetycznej PTGC

Zmiany somatyczne w nowotworach litych dzieci i dorosłych

Praca zbiorowa pod redakcją

dr. hab. n. med. Artura Kowalika, prof. UJK



Wydanie II | 2026

Wsparcia finansowego na redagowanie, skład i wydruk udzieliły:

GSK

Roche

AMGEN®

MSD

**ANALITYK
GENETYKA**

biogen

**ThermoFisher
SCIENTIFIC**

MERCK

Johnson&Johnson

INFARMA

Pfizer

BIOCARTIS

DIASELECT

GENHELP
Personalized Medicine

BIO-RAD

IMOGENA
Diagnostyka molekularna

**MENARINI
group**

Stemline®

Promega

**TK
Biotech**

QIAGEN

Tytuł książki:

Standardy diagnostyki genetycznej PTGC

Zmiany somatyczne w nowotworach łitych dzieci i dorosłych

Projekt typograficzny, łamanie i przygotowanie do druku:

Tomasz Sokołowski

Wydanie II

2026

Wstęp do II wydania

Oddajemy do Państwa rąk drugą, zaktualizowaną edycję *Standardów diagnostyki genetycznej PTGC - zmiany somatyczne w nowotworach litych dzieci i dorosłych*, opracowaną przez zespół doświadczonych diagnostów laboratoryjnych, genetyków i biotechnologów skupionych w Sekcji Guzów Litych Polskiego Towarzystwa Genetyki Człowieka. Od czasu publikacji pierwszego wydania (2024 rok) nastąpił dynamiczny rozwój wiedzy w zakresie biologii molekularnej nowotworów, technologii sekwencjonowania następnej generacji (NGS), interpretacji wariantów genetycznych oraz kwalifikacji chorych do terapii ukierunkowanych molekularnie i immunoterapii. Zmiany te obejmują zarówno rozszerzenie paneli genowych, wprowadzenie nowych biomarkerów predykcyjnych i prognostycznych, jak i aktualizacje międzynarodowych klasyfikacji oraz rekomendacji terapeutycznych.

Drugie wydanie uwzględnia najnowsze doniesienia naukowe, aktualne wytyczne kliniczne oraz zalecenia praktyczne dla laboratoriów diagnostycznych. Rozszerzono zakres tematyczny publikacji o nowe rozdziały poświęcone nowotworom, dla których diagnostyka genetyczna zyskała istotne znaczenie kliniczne, w tym: rakowi pęcherza moczowego, rakowi ślinianki oraz rakowi przewodów żółciowych. Włączenie tych jednostek odzwierciedla rosnącą rolę badań genetycznych w kwalifikacji pacjentów do terapii celowanych oraz w podejmowaniu decyzji terapeutycznych w praktyce klinicznej.

Celem niniejszych wytycznych pozostaje przedstawienie zasad organizacji medycznego laboratorium diagnostycznego, wymogów dotyczących personelu oraz dobrej praktyki wykonywania badań z wykorzystaniem metod genetyki molekularnej w diagnostyce i leczeniu pacjentów z nowotworami litymi. Szczególną uwagę poświęcono standaryzacji etapów przedanalizy, analizy i poanalizy, zasadom walidacji metod, kontroli jakości oraz raportowania wyników w sposób użyteczny klinicznie.

Publikacja zachowuje przejrzystą, modułową strukturę krótkich rozdziałów obejmujących informacje ogólne, epidemiologię, klasyfikację oraz algorytmy diagnostyki genetycznej poszczególnych nowotworów, co umożliwi szybkie odnalezienie kluczowych informacji. Jednocześnie drugiemu wydaniu towarzyszyć będzie skrócona wersja kieszonkowa Standardów – opracowana w formacie poręcznym i syntetycznym – przeznaczona do codziennego wykorzystania w praktyce laboratoryjnej i klinicznej.

Standardy kierowane są do diagnostów laboratoryjnych, genetyków i biotechnologów zajmujących się diagnostyką genetyczną nowotworów litych, a także do lekarzy klinicystów oraz innych pracowników ochrony zdrowia zaangażowanych w proces diagnostyczno-terapeutyczny pacjentów onkologicznych.

Wyrażamy nadzieję, że zaktualizowane II wydanie *Standardów* przyczyni się do dalszego podnoszenia jakości badań genetycznych w Polsce, ujednolicenia praktyki diagnostycznej oraz efektywnego wdrażania osiągnięć medycyny precyzyjnej do codziennej opieki nad pacjentem onkologicznym.

Spis treści:

Wstęp do II wydania	5
Spis treści:	6
1. Wykaz skrótów	9
2. Medyczne Laboratoria Diagnostyczne - regulacje prawne	11
2.1. Zasady organizacji laboratorium	11
2.2. Personel MLD	13
2.3. Warunki lokalowe i środowiskowe	15
2.5. Zakres i metody wykonywanych badań	19
2.6. Zarządzanie informacjami w laboratorium	21
2.7. Zewnętrznlaboratoryjna kontrola jakości (EMQN/QCMD i inne)	22
2.8. Ocena i audit	24
3. Funkcjonowanie medycznego laboratorium diagnostycznego	26
3.1. Zlecanie badań molekularnych	26
3.2. Procesy przedanalizacyjne	31
3.3. Wykonywanie badań, procesy badawcze	37
3.4. Sprawozdawanie i wydawanie wyników badań	41
3.5. Procesy poanalizacyjne	45
4. Diagnostyka genetyczna nowotworów litych w praktyce	46
4.1. Rak jelita grubego	46
4.2. Czerniak	54
4.3. Rak jajnika	59
4.4. Rak endometrium	63
4.5. Rak płuca	69
4.6. Nowotwory wieku dziecięcego	80
4.7. Nowotwory mózgu u dorosłych - glejaki	102
4.8. Rak tarczycy	109
4.9. Rak gruczołu krokowego	113
4.10. Rak trzustki	116
4.11. Nowotwór podścieliskowy przewodu pokarmowego (GIST)	119
4.12. Mięsaki	124
4.13. Rak piersi	130
4.14. Rak żołądka	135
4.15. Fuzje NTRK jako przykład markerów niezależnych od tkanki pochodzenia nowotworu	137
4.16. Rak pęcherza moczowego	139
4.17. Rak ślinianki	144
4.18. Rak dróg żółciowych	149
5. Bibliografia	154

Redaktorzy:

dr hab. n. med. Artur Kowalik, prof. UJK

Zakład Diagnostyki Molekularnej, Świętokrzyskie Centrum Onkologii w Kielcach,
Zakład Inżynierii Genetycznej, Świętokrzyskie Centrum Onkologii w Kielcach,
Zakład Biologii Medycznej, Instytut Biologii, Uniwersytet Jana Kochanowskiego
w Kielcach

dr hab. n. med. Agnieszka Adamczyk

Pracownia Molekularno-Genetyczna Narodowego Instytutu Onkologii im. Marii
Sklodowskiej-Curie - Państwowego Instytutu Badawczego, Oddział w Krakowie

prof. dr hab. n. med. i n. o zdr. Marzena Anna Lewandowska, MBA

Zakład Genetyki i Onkologii Molekularnej, Innowacyjne Forum Medyczne,
Centrum Onkologii im Prof. Franciszka Łukaszczyka,
Katedra Chirurgii Klatki Piersiowej i Nowotworów, Collegium Medicum w Bydgoszczy,
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

dr hab. n. med. Izabela Łaczmńska, prof. UMW

Laboratorium Molekularne, Zakład Patomorfologii i Cytologii Klinicznej,
Uniwersytecki Szpital Kliniczny im. Jana Mikulicza-Radeckiego we Wrocławiu,
Zakład Medycyny Molekularnej, Katedra Patologii Klinicznej i Doświadczalnej,
Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu

dr hab. n. med. Małgorzata Oczko-Wojciechowska, MBA

Zakład Genetyki Klinicznej i Molekularnej Narodowego Instytutu Onkologii im. Marii
Sklodowskiej-Curie - Państwowego Instytutu Badawczego, Oddział w Gliwicach

dr n. med. Małgorzata Stawicka-Niełacna

Zakład Genetyki Klinicznej i Patomorfologii Uniwersytetu Zielonogórskiego,
PNG Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego w Poznaniu,
Zakład Diagnostyki Molekularnej Nowotworów Wielkopolskiego Centrum Pulmonologii
i Torakochirurgii w Poznaniu

dr hab. n. med. Joanna Trubicka, prof. IPCZD

Zakład Patologii/Pracownia Onkopatologii i Biostruktury Medycznej, Instytut „Pomnik-
Centrum Zdrowia Dziecka” w Warszawie

dr n. med. Andrzej Tysarowski, MBA

Zakład Diagnostyki Genetycznej i Genomiki, Państwowy Instytut Medyczny MSWiA
w Warszawie

prof. dr hab. n. med. Bartosz Wasąg

Katedra i Zakład Biologii i Genetyki Medycznej, Gdański Uniwersytet Medyczny,
Laboratorium Genetyki Klinicznej, Uniwersyteckie Centrum Kliniczne

dr n. med. Piotr Wójcik

Diagnostyka Oncogene Sp. z o. o. w Krakowie

Redaktorzy pomocniczy:

dr n. med. Małgorzata Chłopek

Zakład Diagnostyki Molekularnej, Świętokrzyskie Centrum Onkologii w Kielcach,
Laboratory of Pathology, National Cancer Institute, Bethesda, MD, USA

dr n. med. Kinga Hińcza-Nowak

Zakład Diagnostyki Molekularnej, Świętokrzyskie Centrum Onkologii w Kielcach,
Klinika Endokrynologii, Świętokrzyskie Centrum Onkologii w Kielcach

dr n. med. Dagmara Michałowska

Zakład Diagnostyki Molekularnej Nowotworów, Dolnośląskie Centrum Onkologii,
Pulmonologii i Hematologii

dr n. med. Katarzyna Seliga

Zakład Diagnostyki Genetycznej i Genomiki, Państwowy Instytut Medyczny MSWiA
w Warszawie

dr n. med. Joanna Wojtysiak

Zakład Genetyki i Onkologii Molekularnej, Innowacyjne Forum Medyczne Centrum
Onkologii im Prof. Franciszka Łukaszczyka w Bydgoszczy

dr n. med. Małgorzata Zajac

Diagnostyka Oncogene Sp. z o. o. w Krakowie

1.

Wykaz skrótów

1.1. Wykaz skrótów:

ASCO – *ang. American Society of Clinical Oncology* – Amerykańskie Towarzystwo Onkologii Klinicznej

BC – *ang. breast cancer* – rak piersi

BMI – *ang. body mass index* – wskaźnik masy ciała

CE-IVD – *ang. conformity declaration for in vitro diagnostics* – wyrób medyczny do diagnostyki in vitro

CNV – *ang. copy number variation* – zmienna liczby kopii

ctDNA – *ang. circulating tumour DNA* – wolnokrążący DNA nowotworowy

ddPCR – *ang. digital droplet PCR* – emulsyjny PCR

DRP – rak drobnokomórkowy

EBV – *ang. Epstein-Barr virus* – wirus Epsteina-Barra

EQA – *ang. external quality assessment* – zewnątrzlaboratoryjna kontrola jakości

ER – *ang. estrogen receptor* – receptor estrogenowy

FDA – *ang. Food and Drug Administration* – Agencja Żywności i Leków

FFPE – *ang. formalin-fixed paraffin embedded* – (materiał) utrwalony w formalinie i zatopiony w parafinie

FISH – *ang. fluorescence in situ hybridization* – fluorescencyjna hybrydyzacja in situ

GC – *ang. gastric cancer* – rak żołądka

GIST – *ang. gastrointestinal stromal tumor* – nowotwór podścieliskowy przewodu pokarmowego

H&E (HE) – *ang. hematoxylin and eosin* – barwienie hematoksyliną i eozyną

HBOC – *ang. hereditary breast and ovarian cancer* – dziedziczna predyspozycja do raka piersi i jajnika

HER2 – *ang. human epidermal growth factor receptor 2* – receptor ludzkiego naskórkowego czynnika wzrostu

HRD – *ang. homologous recombination deficiency* – niedobór naprawy rekombinacji homologicznej

IASLC – *ang. International Association for the Study of Lung Cancer*

IHC – *ang. immunohistochemistry* – badanie immunohistochemiczne

KIDL – Krajowa Izba Diagnostów Laboratoryjnych

KRDL – Krajowa Rada Diagnostów Laboratoryjnych

LDT – *ang. laboratory developed test* – test wytworzony w laboratorium

LGM – laboratoryjna genetyka medyczna

MGM – medyczna genetyka molekularna

MLD – medyczne laboratorium diagnostyczne

MLPA – *ang. multiplex ligation-dependent probe amplification* – multipleksowa amplifikacja sond zależna od ligacji

MMRd – *ang. mismatch repair deficiency* – deficyt naprawy źle sparowanych zasad

MSI – *ang. microsatellite instability* – niestabilność mikrosatelitarna

MSI-H – *ang. MSI-high* – wysoka niestabilność mikrosatelitarna

MSP – *ang. methylation-specific PCR* – metylospecyficzna PCR

MSS – *ang. microsatellite stable* – stabilność mikrosatelitarna

NCCN – *ang. National Comprehensive Cancer Network*

NGS – *ang. next generation sequencing* – sekwencjonowanie następnej generacji

NSCLC – *ang. non-small cell lung cancer, NDRP* – rak niedrobnokomórkowy (płuca)

PARPi – *ang. Poly (ADP-ribose) polymerase inhibitors* – inhibitory PARP

PCA – Polskie Centrum Akredytacji

PCR – *ang. polymerase chain reaction* – reakcja łańcuchowa polimerazy

POLE EDM – *ang. DNA polymerase epsilon (POLE) exonuclease domain* – domena egzonukleazowa POLE

PR – *ang. progesterone receptor* – receptor progesteronowy

QCMD – *ang. quality control for molecular diagnostics* – zewnątrzlaboratoryjna kontrola jakości w zakresie biologii molekularnej

qPCR – *ang. quantitative PCR, Real Time PCR* – ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy

RJG – rak jelita grubego

RT-PCR – *ang. reverse transcription PCR* – reakcja łańcuchowa polimerazy z odwrotną transkrypcją

RUO – *ang. research use only* – (testy) tylko do użytku do badań naukowych

SNaPshot – *ang. single nucleotide polymorphisms (SNPs) typing method, minisequencing* – minisekwencjonowanie

SNV – *ang. single nucleotide variant* – wariant pojedynczego nukleotydu

TKI – *ang. tyrosine kinase inhibitors* – inhibitory kinaz tyrozynowych

WHO – *ang. World Health Organization* – Światowa Organizacja Zdrowia

1.2. Skróty aminokwasów:

Skrót jednoliterowy	Skrót trzyliterowy	Aminokwas	Skrót trzyliterowy	Skrót jednoliterowy	Aminokwas
A	Ala	Alanina	Ala	A	Alanina
C	Cys	Cysteina	Arg	R	Arginina
D	Asp	Kwas asparaginowy	Asn	N	Asparagina
E	Glu	Kwas glutaminowy	Asp	D	Kwas asparaginowy
F	Phe	Fenylalanina	Cys	C	Cysteina
G	Gly	Glicyna	Gln	Q	Glutamina
H	His	Histydyna	Glu	E	Kwas glutaminowy
I	Ile	Izoleucyna	Gly	G	Glicyna
K	Lys	Lizyna	His	H	Histydyna
L	Leu	Leucyna	Ile	I	Izoleucyna
M	Met	Metionina	Leu	L	Leucyna
N	Asn	Asparagina	Lys	K	Lizyna
P	Pro	Prolina	Met	M	Metionina
Q	Gln	Glutamina	Phe	F	Fenylalanina
R	Arg	Arginina	Pro	P	Prolina
S	Ser	Seryna	Ser	S	Seryna
T	Thr	Treonina	Thr	T	Treonina
V	Val	Walina	Trp	W	Tryptofan
W	Trp	Tryptofan	Tyr	Y	Tyrozyna
Y	Tyr	Tyrozyna	Val	V	Walina

2.

Medyczne Laboratoria Diagnostyczne

regulacje prawne

2.1. Zasady organizacji laboratorium

Działalność MLD w Polsce regulują m. in. następujące dokumenty:

Ustawy:

- » **Ustawa z dnia 15 września 2022 r. o medycynie laboratoryjnej** (Dz.U. 2022 poz. 2280; tekst jednolity: Dz.U. z 2025 r., poz. 1295) - podstawowy akt prawny regulujący organizację i funkcjonowanie medycyny laboratoryjnej w Polsce.
- » **Ustawa z dnia 15 kwietnia 2011 r. o działalności leczniczej** (Dz.U. 2011 nr 112 poz. 654; tekst jednolity: Dz.U. z 2025 r., poz. 450) - reguluje organizację, zasady prowadzenia oraz nadzór nad działalnością leczniczą w Polsce, w tym MLD.
- » **Ustawa z dnia 10 maja 2018 r. o ochronie danych osobowych** (Dz.U. 2018 poz. 1000) - wdraża w Polsce przepisy RODO i reguluje zasady przetwarzania oraz ochrony danych osobowych.
- » **Ustawa z dnia 7 kwietnia 2022 r. o wyrobach medycznych** (Dz.U. 2022 poz. 974) – reguluje zasady wprowadzania do obrotu, dystrybucji, stosowania oraz nadzoru nad wyrobami medycznymi i ich reklamą w Polsce.
- » **Ustawa z dnia 24 lutego 2017 r. o uzyskiwaniu tytułu specjalisty w dziedzinach mających zastosowanie w ochronie zdrowia** (Dz. U. z 2017 r. poz. 599; zmiany - Dz. U. z 2025 r. poz. 342), w zakresie uzyskanej specjalizacji.

Rozporządzenia Ministra Zdrowia:

- » **Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 7 grudnia 2023 r. w sprawie ustawicznego rozwoju zawodowego diagnosty laboratoryjnego** (Dz.U. 2023 poz. 2684)
- » **Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 20 marca 2023 r. w sprawie ustawicznego rozwoju zawodowego osób uprawnionych do wykonywania czynności medycyny laboratoryjnej w laboratorium** (Dz.U. 2023 poz. 675)
- » **Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 26 marca 2019 r. w sprawie wymagań dla pomieszczeń i urządzeń podmiotu wykonującego działalność leczniczą** (Dz.U. 2019 poz. 595; z późn. zm.)

- » **Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 6 kwietnia 2020 r.** w sprawie dokumentacji medycznej i sposobu jej przetwarzania (Dz.U. 2020 poz. 666; z późn. zm.)
- » **Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 16 lipca 2024 r.** w sprawie wymagań, jakim powinno odpowiadać medyczne laboratorium diagnostyczne, oraz kwalifikacji personelu (Dz.U. 2024 poz. 1188)
- » **Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 30 czerwca 2025 r.** w sprawie standardów jakości dla laboratoriów (Dz.U. 2025 poz. 961)
- » **Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 26 czerwca 2023 r.** w sprawie specjalizacji i uzyskiwania tytułu specjalisty przez diagnostów laboratoryjnych
- » **Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 18 grudnia 2017 r.** w sprawie standardów organizacyjnych opieki zdrowotnej w dziedzinie patomorfologii (Dz. U. 2017 r. poz. 2435)

Obwieszczenia

- » **Obwieszczenie Ministra Zdrowia z dnia 6 września 2024 r.** w sprawie standardów akredytacyjnych dla działalności leczniczej w rodzaju całodobowe i stacjonarne świadczenia zdrowotne szpitalne (Dz. Urz. MZ 2024 poz. 73)
- » **Standardy Akredytacyjne CMJ – Szpitale / Laboratoria** - wytyczne opracowane na podstawie obwieszczeń Ministra Zdrowia (wydanie wznowione 2025).
- » **Obwieszczenie Ministra Zdrowia z dnia 24 września 2021 r.** w sprawie standardów akredytacyjnych w zakresie udzielania świadczeń zdrowotnych oraz funkcjonowania jednostek diagnostyki patomorfologicznej.

Wytyczne branżowe, dobre praktyki i inne

- » **Good Laboratory Practice (GLP) - Dobra Praktyka Laboratoryjna** - zasady ogólne, dotyczące jakości, bezpieczeństwa i kwalifikacji personelu.
- » **Wytyczne dla laboratoriów genetyki nowotworów litych** - Pieńkowska-Grela B. i in., NOWOTWORY 2016, tom 1, nr 2, 184–189 - przykład specjalistycznych wytycznych dla laboratoriów genetyki molekularnej.
- » **Diagnostyka molekularna nowotworów – podejście praktyczne** Tysarowski A. i in., Onkol Prakt Klin Edu 2026;12:e04926014.
- » **Załącznik nr 6 do uchwały 202/VI/2025 z dnia 21 lutego 2025** w sprawie Regulaminu działalności wizytatorów Krajowej Rady Diagnostów Laboratoryjnych oraz prowadzenia i wykonywania kontroli praktyk diagnostów laboratoryjnych.

Zgodnie z art. 106 ust. 1 pkt. 1) ustawy o działalności leczniczej z dnia 15 kwietnia 2011 r. (tekst jednolity: Dz.U. z 2025 r., poz. 450) organem prowadzącym rejestr podmiotów wykonujących działalność leczniczą jest wojewoda **właściwy dla siedziby albo podmiotu leczniczego**. MLD jest zobligowane do uzyskania wpisu do rejestru podmiotów wykonujących działalność leczniczą prowadzonego przez właściwego wojewodę.

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

2.2. Personel MLD

Personel MLD stanowią: m. in. kierownik laboratorium (i zastępca kierownika), kierownik pracowni, diagności laboratoryjni (stanowiska: młodszy/starszy asystent medycyny laboratoryjnej), biolodzy, biotechnolodzy, mikrobiolodzy (stanowiska: młodzi/starsi technolodzy laboratoryjni) a także inni pracownicy np. lekarz o którym mowa w art. 5 ust. 4 ustawy z dnia 15 września 2022 r. o medycynie laboratoryjnej (stanowisko młodszy asystent), technik analityki medycznej, pomoc laboratoryjna, sekretarka medyczna, rejestratorka medyczna. Wymagane kwalifikacje zawodowe personelu MLD określa załącznik do rozporządzenia MZ z dnia 16 lipca 2024 (poz. 1188).

W Ustawie o Medycynie Laboratoryjnej w Rozdz. 2 Art. 5 zapisano m. in., że osobą uprawnioną do wykonywania czynności medycyny laboratoryjnej w laboratorium jest również osoba, która (...) ukończyła jednolite studia magisterskie lub studia pierwszego i drugiego stopnia w zakresie: a) biologii, biologii medycznej, mikrobiologii lub mikrobiologii medycznej i uzyskała tytuł zawodowy magistra lub b) biotechnologii lub biotechnologii medycznej i uzyskała tytuł zawodowy magistra lub magistra inżyniera (...) Osoba (...) wykonuje czynności medycyny laboratoryjnej samodzielnie po uzyskaniu tytułu specjalisty w dziedzinie (...) medycznej genetyki molekularnej (MGM) na podstawie ustawy z dnia 24 lutego 2017 r. o uzyskiwaniu tytułu specjalisty w dziedzinach mających zastosowanie w ochronie zdrowia (Dz. U. z 2021 r. poz. 1297), w zakresie uzyskanej specjalizacji. Zapis ten daje prawo do samodzielnego wykonywania czynności medycyny laboratoryjnej oraz autoryzacji badań w zakresie biologii molekularnej biologom/biotechnologom ze specjalizacją MGM.

Dobra Praktyka Laboratoryjna (Good Laboratory Practice, GLP) może być skutecznie realizowana tylko wtedy, gdy pracownicy posiadają odpowiednie wykształcenie i umiejętności.

- » Laboratorium powinno zatrudniać odpowiednią liczbę pracowników w zależności od:
 - zakresu wykonywanych badań,
 - liczby badań,
 - specjalizacji (np. diagnosta laboratoryjny, specjalista laboratoryjnej genetyki medycznej – LGM, biolog/biotechnolog - specjalista medycznej genetyki molekularnej – MGM).
- » Brak jest obecnie szczegółowych wytycznych określających minimalną liczbę diagnostów czy specjalistów LGM/MGM w laboratorium. Jedynym przepisem, który odnosi się do personelu kierowniczego, jest ustawa z dnia 15 września 2022 r. o medycynie laboratoryjnej (Dz.U. 2022 poz. 2280). Art. 30–33 ustawy o medycynie laboratoryjnej określa wymagania wobec kierownika MLD - m.in. jego formę zatrudnienia, kwalifikacje i obowiązki.
- » Oprócz specjalizacji LGM, która jest specjalizacją z dziedziny medycyny laboratoryjnej, diagności laboratoryjni o wykształceniu biologicznym mogą uzyskać specjalizację w dziedzinie medycznej genetyki molekularnej (MGM) należącej do grupy specjalizacji mających zastosowanie w ochronie zdrowia.

- » Wymagania dla pozostałego personelu MLD reguluje rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 16 lipca 2024 r. w sprawie wymagań, jakim powinno odpowiadać medyczne laboratorium diagnostyczne, oraz kwalifikacji personelu (Dz.U. 2024 poz. 1188), kwestie dotyczące liczby pozostałego personelu pozostają w gestii kierownika laboratorium, zgodnie z zasadami GLP i wewnętrzną organizacją laboratorium.
- » Personel laboratorium wykonujący czynności medycyny laboratoryjnej zobowiązany jest do uczestnictwa **w szkoleniach i doskonaleniu zawodowym** zgodnie z obowiązującymi przepisami:
 - Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 7 grudnia 2023 r. w sprawie ustawicznego rozwoju zawodowego diagnosty laboratoryjnego (Dz.U. 2023 poz. 2684).
 - Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 20 marca 2023 r. w sprawie ustawicznego rozwoju zawodowego osób uprawnionych do wykonywania czynności medycyny laboratoryjnej w laboratorium (Dz.U. 2023 poz. 675).
- » Szkolenia zewnętrzne oraz wewnętrzne powinny obejmować zarówno zagadnienia dotyczące bieżących doniesień naukowych, technik laboratoryjnych, standardów i wytycznych dla MLD, ale także wiadomości z zakresu zarządzania jakością, walidacji metod, niepewności pomiarów itp.
- » Personel powinien również co roku **czynnie** uczestniczyć w zewnętrznych programach kontroli jakości oraz wewnątrzlaboratoryjnej kontroli jakości planowanej przez Kierownictwo MLD.
- » Laboratorium powinno posiadać procedurę wprowadzania i szkolenia nowo zatrudnionych pracowników.
- » Upoważnienia do poszczególnych czynności w MLD powinny być nadawane pracownikowi stopniowo, w odniesieniu do jego umiejętności, stażu pracy w MLD, odbywanych szkoleń wewnętrznych oraz oceny pracy w obecności innego pracownika MLD - opiekuna.
- » Sprawdzenie kompetencji nowo zatrudnionego personelu oraz pozytywna ocena jego pracy (np. ocena wyników uzyskanych dla próbek kontrolnych, ankieta na zakończenie okresu adaptacji) przez Kierownictwo MLD jest warunkiem koniecznym nadania upoważnień.

Odpowiedzialność Kierownika MLD

Odpowiedzialność kierownika obejmuje kwestie zawodowe, naukowe, konsultacyjne, organizacyjne, administracyjne i edukacyjne (co określa ustawa o medycynie laboratoryjnej). Kierownik ponosi odpowiedzialność za całość działań i zarządzanie laboratorium. Obowiązki kierownika określa Art. 21, rozdz. 4 ustawy o medycynie laboratoryjnej (Obowiązki kierownika laboratorium oraz obowiązki i prawa diagnosty laboratoryjnego)

Kierownik może delegować część w/w odpowiedzialności na zastępcę kierownika MLD a także na wybrany personel, posiadający do tego odpowiednie kompetencje. Delegowanie obowiązków powinno być pisemne.

Rozdział i przegląd zadań personelu

Oprócz ogólnego zakresu obowiązków i odpowiedzialności określanych przez pracodawcę kierownictwo MLD ustala na piśmie szczegółowy zakres obowiązków i odpowiedzial-

ności personelu (w tym delegowanie zadań) oraz zależnie od potrzeb, ale nie rzadziej niż raz w roku dokonuje przeglądu zadań i sporządza odpowiednie zapisy. Kierownictwo MLD dokonuje także oceny okresowej pracownika na podstawie ustalonych kryteriów i skali ocen, nie rzadziej niż raz na dwa lata.

Wskaźniki jakości - personel

Ustawa z dnia 15 września 2022 r. o medycynie laboratoryjnej (tekst jednolity: Dz.U. z 2025 r. poz. 1295) reguluje obowiązek ustawicznego rozwoju zawodowego diagnostów laboratoryjnych, w tym uzyskiwania punktów edukacyjnych. Konkretną liczbę punktów edukacyjnych i sposób ich liczenia określają rozporządzenia Ministra Zdrowia z 7.12.2023 (obowiązujące od 12.12.2023) oraz rozporządzenie MZ z 20 marca 2023. Diagnosta laboratoryjny a także technolog laboratoryjny musi uzyskać określoną liczbę punktów (100) w okresie rozliczeniowym i udokumentować to w karcie doskonalenia zawodowego. Potwierdzenie zrealizowania w/w obowiązku w przypadku diagnostów należy do KIDL a w przypadku technologów do kierownika MLD.

Ponadto ocena kompetencji personelu powinna być dokonywana co najmniej raz w roku na odpowiednim formularzu przez kierownika laboratorium. Ocenie mogą podlegać m.in.: udział w zewnątrzlaboratoryjnych programach kontroli jakości, liczba procedowanych próbek kontrolnych, liczba szkoleń, liczba niezgodności, liczba opóźnień wyników, liczba skarg i inne. Ustalenie kluczowych wskaźników jakości dla personelu należy do kierownika laboratorium.

Tabela 2.1. Tabela wskaźników jakości – Personel

Wskaźnik jakości	Metoda pomiaru / Dokumentacja
Odsetek personelu posiadającego wymagane kwalifikacje zawodowe (np. diagnosta laboratoryjny, specjalista LGM, MGM)	Sprawdzenie dokumentów kwalifikacyjnych, rejestry karty, karty opisu stanowisk
Odsetek personelu uczestniczącego w szkoleniach i zdobywającego punkty edukacyjne w wymaganym okresie	Karty doskonalenia zawodowego, raporty ze szkoleń, certyfikaty
Wyniki ocen okresowych kompetencji i audytów wewnętrznych	Protokoły ocen, raporty audytów wewnętrznych
Udział w testach biegłości (EQA) i poprawność wyników	Raporty z udziału w EQA, certyfikaty zgodności
Liczba wykrytych niezgodności	Raporty audytów wewnętrznych, protokoły kontrolne

2.3. Warunki lokalowe i środowiskowe

Rozporządzenie Ministra Zdrowia (Dz. U. 2024, poz. 1188) określa szczegółowe wymagania dla pomieszczeń MLD wykonującego diagnostykę metodami biologii molekularnej, które obejmują:

1. pomieszczenia główne (punkt przyjęć materiału do badań, punkt rozdziatu materiału do badań i pomieszczenia do wykonywania czynności medycyny laboratoryjnej)
2. pomieszczenia specjalne (np. magazynowe);
3. pomieszczenia socjalne (pokoje socjalne, urządzenia sanitarno-higieniczne oraz szatnia dla personelu)
4. pomieszczenie służące do obsługi pacjentów w przypadku, gdy na terenie laboratorium jest pobierany materiał do badań laboratoryjnych i są wykonywane próby czynnościowe (pokój pobrań oddzielony od innych pomieszczeń laboratorium oraz poczekalnia z urządzeniami sanitarno-higienicznymi dla pacjentów)
5. pomieszczenie administracyjne (Dz. U. 2024, poz. 1188).

Podczas planowania pracy w MLD wykonującym badania molekularne należy zwrócić szczególną uwagę na rozdział przestrzenny i czasowy procesów diagnostycznych ze względu na wysokie wymagania co do czystości i ryzyko kontaminacji.

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

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

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

Niezbędne wyposażenie: m.in. lodówka, zamrażarka -20°C, miniwirówka, pipety, vortex, komora PCR z UV.

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

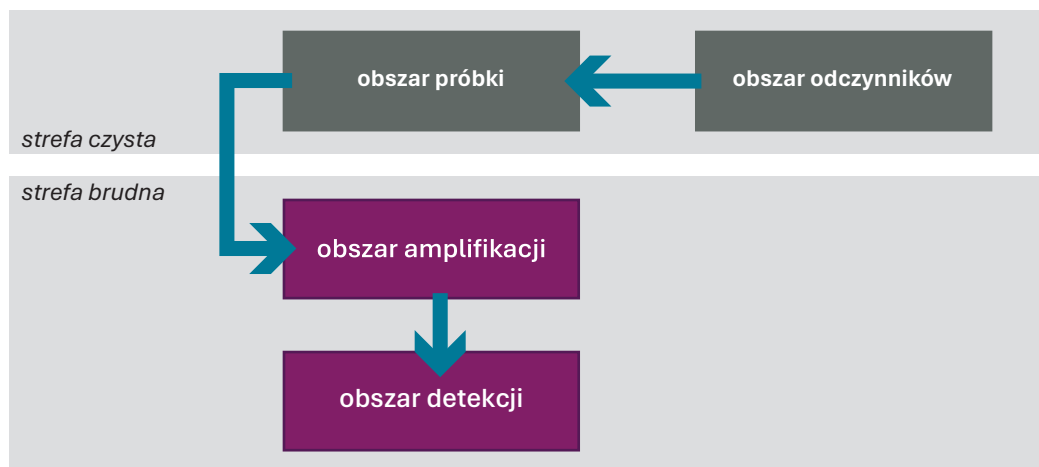
Niezbędne wyposażenie: m.in. lodówka, zamrażarka -20°C, zamrażarka -80°C, zalecane jest użytkowanie komory BSL-2 (jeśli materiał jest potencjalnie zakaźny, np. krew, świeże tkanki), wirówka, izolator kwasów nukleinowych, komora PCR z UV i termocykler do cDNA (w tym obszarze nie ma amplifikacji materiału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

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

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

Niezbędne wyposażenie: m.in. lodówka, zamrażarka -20°C, wirówka, komora PCR z UV, pipety, vortex, konieczny sprzęt pomiarowy: termocykler, aparat do real-time PCR, zestaw do elektroforezy żelowej, transiluminator, urządzenie służące do automatycznej analizy jakości i ilości kwasów nukleinowych, sekwenator kapilarny, sekwenator NGS, aparat do automatycznej elektroforezy DNA i RNA, ddPCR i inne.

Rys. 2.1. Rozdział pracy w MLD, zaznaczono kierunek procesu



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

Dostęp do pomieszczeń MLD powinien być ograniczony i kontrolowany (powinien istnieć wykaz osób upoważnionych do odbioru kluczy i przebywania na terenie MLD). Przebywanie osób spoza personelu na terenie laboratorium powinno być monitorowane i dokumentowane na odpowiednim formularzu.

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

2.4. Wyposażenie laboratorium

Aparatura

- » Aparatura pomiarowo-badawcza oraz rodzaj wymaganej dokumentacji zostały określone w rozporządzeniu MZ (Dz. U. 2024, poz. 1188) w par. 4, 5 i 6.
- » Wyposażenie laboratorium obejmuje: wyposażenie podstawowe, aparaturę pomiarowo-badawczą, wyposażenie umożliwiające wystandaryzowane pobieranie materiału, wyposażenie zapewniające bezpieczeństwo i higienę pracy.
- » Ponadto MLD posiada urządzenia telekomunikacyjne i systemy teleinformatyczne (np. systemy do monitorowania warunków środowiskowych)
- » Jeśli to możliwe, sprzęt do badań medycznych powinien posiadać certyfikat CE IVD.
- » Oprócz wymaganych przeglądów technicznych zapewniających bezpieczeństwo użytkowania, urządzenia pomiarowe wymagają regularnych (zwykle corocznych) przeglądów w autoryzowanym serwisie.
- » Wybrane typy urządzeń: np. termometry, wagi, pipety, termocyklery, jeśli mają kluczowe znaczenie dla procesu diagnostycznego, wymagają wzorcowań w odpowiednim zakresie

w laboratorium posiadającym akredytację w odniesieniu do PN-EN ISO/IEC 17025:2018-02 w danym zakresie.

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

Materiały kontrolne

Materiały kontrolne stanowią:

- » materiały odniesienia i wzorce (np. markery mas, wzorce wagi)
- » materiały do kontroli jakości (np. próbki uzyskane z EQA/QCMD, wcześniej zbadane próbki uzyskane od pacjentów (jeśli pacjent podpisał zgodę na anonimowe użycie materiału). Uwaga: wg Rozporządzenia MZ z dnia 30 czerwca 2025, załącznik 3 (Dz. U 2025, poz. 961) w punkcie 6.10. określono że “w przypadku gdy nie są dostępne stabilne materiały kontrolne, wewnętrzną kontrolę jakości badania genetycznego przeprowadza się co najmniej w formie kontroli poprawności lub odtwarzalności, na podstawie badań genetycznych wykonywanych **na materiale biologicznym pochodzącym od pacjentów, który został przebadany dwiema metodami lub w dwóch niezależnych laboratoriach**”.
- » Laboratorium powinno posiadać wykaz stosowanych materiałów odniesienia.

Odczynniki

- » Laboratorium stosuje metody diagnostyczne zgodne z Rozporządzeniem Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) 2017/746 z dnia 5 kwietnia 2017 r. w sprawie wyrobów medycznych do diagnostyki *in vitro*, które umożliwiają uzyskanie wiarygodnego wyniku diagnostycznego i są:
 1. certyfikowane CE-IVD zgodnie z Rozporządzeniem IVDR i używane zgodnie z wytycznymi producenta wyrobu, lub
 2. w przypadku braku metody certyfikowanej CE-IVD spełniającej wymagania laboratorium dopuszczone jest zastosowanie:
 - a. zestawów certyfikowanych CE-IVD używanych poza wskazaniami lub modyfikowanych we własnym zakresie, pod warunkiem spełnienia kryteriów o których mowa w rozdziale II, art. 5, p. 5 Rozporządzenia IVDR.
 - b. zestawów do badań naukowych (RUO), pod warunkiem i spełnienia kryteriów o których mowa w rozdziale II, art. 5, p. 5 Rozporządzenia IVDR.
 - c. metod opracowanych przez laboratorium (laboratory-developed tests, LDT) wykorzystywanych na skalę nieprzemysłową na potrzeby instytucji zdrowia publicznego pod warunkiem i spełnienia kryteriów o których mowa w rozdziale II, art. 5, p. 5 Rozporządzenia IVDR.

- » Laboratorium powinno posiadać procedurę walidacji metod. Obowiązek walidacji metody diagnostycznej spoczywa na producencie testów komercyjnych z certyfikatem CE-IVD, jeśli stosowane są ściśle według procedury producenta a w każdym innym przypadku na laboratorium.
- » W przypadku używania do diagnostyki odczynników LDT zgodnie z rozporządzeniem Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) 2017/746 z dnia 5 kwietnia 2017 r. w sprawie wyrobów medycznych do diagnostyki *in vitro* oraz uchylecia dyrektywy 98/79/WE i decyzji Komisji 2010/227/UE MLD musi prowadzić działalność według systemu zarządzania jakością zgodnego z wymaganiami normy PN-EN ISO 15189:2023-02 oraz dopełnić wymogów formalnych, w tym informować swoich „klientów” o stosowaniu takich odczynników i zakresie ich stosowania.”
- » Laboratorium powinno określić kryteria wyboru dostawców odczynników.

2.5. Zakres i metody wykonywanych badań

Próbki pierwotne w MLD wykonującym badania molekularne w nowotworach litych

Próbki pierwotne

- » Materiał tkankowy utrwalony w formalinie, zatopiony w parafinie (*ang. formalin-fixed paraffin-embedded, FFPE*) – materiał histologiczny uzyskiwany w trakcie biopsji (m.in. biopsja gruboigłowa, mammotomiczna, bronchofiberoskopia, biopsja chirurgiczna), lub w trakcie zabiegu operacyjnego. Materiał powinien być utrwalony w 10% zbuforowanej formalinie (4% roztwór wodny aldehydu mrówkowego) o pH 7,2-7,4, w temperaturze nie wyższej niż pokojowa. W przypadku małego materiału histologicznego czas utrwalania powinien wynosić 6-48 godzin, natomiast w przypadku dużego materiału histologicznego 24-48 godzin. Standardy przygotowania i opracowania materiału tkankowego opisane są w obwieszczeniu Ministra Zdrowia z dnia 24 września 2021 r. w sprawie standardów akredytacyjnych w zakresie udzielania świadczeń zdrowotnych oraz funkcjonowania jednostek diagnostyki patomorfologicznej. Przed przystąpieniem do badania molekularnego, każdy materiał przeznaczony do analizy, zarówno bloczek parafinowy, jak i odpowiadający mu preparat mikroskopowy barwiony hematoksyliną i eozyną, musi zostać wcześniej oceniony przez lekarza patomorfologa. Ocena ta obejmuje potwierdzenie rozpoznania oraz weryfikację obecności utkania nowotworowego wraz z określeniem odsetka komórek nowotworowych w preparacie oraz informację o występowaniu martwicy. Badania molekularne wykonywane są z użyciem niebarwionych skrawków parafinowych o grubości 4-10µm.
- » Materiał cytologiczny np. w formie cytobloku – materiał utrwalony podobnie jak materiał tkankowy bezpośrednio po zaaspirowaniu, czas utrwalania najczęściej 6-24 godziny.
- » Materiał tkankowy mrożony, świeży - materiał zabezpieczony bezpośrednio po pobraniu, bez wstępnego utrwalania w formalinie metodą „snap freezing”.
- » Krew obwodowa pobrana do próbek z EDTA
- » Płynna biopsja – (*ang. ccfDNA – circulating cell free DNA, inna nazwa: ctDNA – circulating tumour DNA*) – krew obwodowa (osocze) pobrana do próbek z EDTA lub do specjalnych próbek ze stabilizatorem ccfDNA.

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

- » DNA
- » RNA (cDNA)
- » ctDNA

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

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

Na przechowywanie materiału po wykonaniu badania i wydaniu sprawozdania powinna być udzielona pisemna zgoda pacjenta (np. na formularzu świadomej zgody na badanie genetyczne) – w przeciwnym wypadku materiał, z wyjątkiem materiałów patomorfologicznych, powinien być utylizowany po wykonaniu badania i wydaniu sprawozdania, z wyjątkiem bloczków FFPE, które powinny być zwrócone do jednostek, z których zostały wypożyczone. Czasy przechowywania materiału do badań genetycznych przed i po wykonaniu określa załącznik 7 do rozporządzenia MZ (Dz. U. 2025, poz. 961)

Techniki używane w diagnostyce genetycznej guzów litych:

Techniki cytogenetyki klasycznej i molekularnej:

- » cytogenetyka klasyczna (*G-banding using trypsin and Giemsa, GTG, lub G-banding using trypsin and Wright's, GWG*) – analiza prążkowa chromosomów,
- » FISH - fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ* (*Fluorescent in situ Hybridization*), metoda oparta na hybrydyzacji specyficznych, fluorescencyjnych sond do określonych regionów genomu,
- » aCGH - porównawcza hybrydyzacja genomowa do mikromacierzy (*array Comparative Genomic Hybridization*), metoda oparta na porównaniu genomu badanego do wzorcowego.

Techniki biologii molekularnej:

- » PCR (i jej odmiany: PCR-RFLP, ASA-PCR, ddPCR - reakcja łańcuchowa polimerazy (*Polymerase Chain Reaction*))
- » qPCR – ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy (*quantitative PCR, Real Time PCR*)
- » RT-PCR - reakcja łańcuchowa polimerazy z odwrotną transkrypcją (*Reverse Transcription PCR*)
- » MLPA – multipleksowa amplifikacja sond zależna od ligacji (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*)
- » sekwencjonowanie metodą Sanger'a
- » sekwencjonowanie następnej generacji (*Next Generation Sequencing, NGS*)
- » optyczne mapowanie genomu (*Optical Genome Mapping, OGM*)

Wybrane bazy danych i inne strony:

- » <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> - BLAST
- » <http://varnomen.hgvs.org/> - zasady zapisu zmian w genach/białkach itp.
- » https://tark.ensembl.org/web/mane_project/ - obowiązujące sekwencje referencyjne
- » <https://www.ensembl.org/index.html> - baza informacji dotyczących genomów
- » <https://www.genenames.org/> - obowiązujące nazwy genów
- » <https://varsome.com/> - baza wariantów
- » <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/> - baza wariantów
- » <https://www.oncokb.org/> - baza wariantów somatycznych
- » <https://varseak.bio/> - baza wariantów, przewidywanie miejsc splicingu
- » <http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr> - PCR in silico
- » <https://tp53.isb-cgc.org/> - baza wariantów genu TP53
- » <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php> - The Human Gene Mutation Database
- » <https://mutalyzer.nl/> - m.in. nazewnictwo, m.in. przewidywanie wpływu wariantu na białko
- » <https://gnomad.broadinstitute.org/> - częstości wariantów
- » <https://www.cancergenomeinterpreter.org/home> - interpretacja wykrytych wariantów
- » <https://www.cbioportal.org/> - interpretacja wykrytych wariantów
- » <https://www.clinicaltrials.gov/> - baza badań klinicznych
- » <https://genebe.net/> - baza wariantów
- » <https://spliceailookup.broadinstitute.org/> - przewidywanie znaczenia wariantów splicingowych
- » <https://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php> - baza wariantów
- » <https://mobidetails.chu-montpellier.fr/> - interpretacja wariantów
- » <https://franklin.genoox.com/> - interpretacja wariantów
- » <https://www.lovd.nl/> - baza wariantów

2.6. Zarządzanie informacjami w laboratorium

- » Laboratorium powinno mieć dostęp do danych i informacji potrzebnych do realizacji swojej działalności oraz udokumentowaną procedurę zapewniającą zarządzanie informacjami i bezpieczeństwo informacji dotyczących pacjenta.
- » Systemy informatyczne laboratorium używane do gromadzenia, przetwarzania, zapisywania, raportowania, przechowywania i odzyskiwania danych powinny być sprawdzone pod względem funkcjonalności przed ich wdrożeniem.
- » Laboratorium powinno określić uprawnienia i odpowiedzialność personelu mającego dostęp do danych i informacji o pacjentach, wprowadzającego i edytującego dane i wyniki badań pacjentów, autoryzującego sprawozdania z badań.
- » Zarządzanie informacjami w laboratorium powinno opierać się na zastosowaniu Systemu Zarządzania Informacją Laboratoryjną LIMS (*ang. Laboratory Information Management System*).

Wymagania dla systemów zarządzania informacją:

- » walidacja przez dostawcę oraz weryfikacja funkcjonalności przez laboratorium przed uruchomieniem i wdrożeniem do pracy rutynowej,
- » zabezpieczenie przed nieupoważnionym dostępem,
- » ochrona przed naruszeniem, uszkodzeniem lub utratą danych,
- » zapewnienie integralności wszystkich informacji,
- » uwzględnienie możliwości awarii systemu rejestracji oraz rejestrowanie dokonanych korekt przy zachowaniu oryginalnego wpisu,
- » zgodność z krajowymi i międzynarodowymi wymaganiami dotyczącymi ochrony danych.

Funkcjonalności systemu zarządzania informacjami w laboratorium powinny obejmować m.in. zarządzanie informacjami dotyczącymi:

- » próbek - przyjęcie i zarejestrowanie próbek wraz z danymi pacjenta;
- » badań - przypisanie, zaplanowanie i śledzenie prac analitycznych związanych z próbkami;
- » obiegu dokumentów - zapewnienie poprawnego formatu i treści oraz dostęp do dokumentów.

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

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

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

2.7. Zewnętrznlaboratoryjna kontrola jakości

- » Laboratorium powinno uczestniczyć w zewnętrznlaboratoryjnych programach kontroli jakości (*EQA – External Quality Assessment*) w zakresie wykonywania badań i laboratoryjnej interpretacji ich wyników.
- » Programy kontroli jakości powinny być prowadzone przez odpowiednie instytucje np. EMQN (*European Molecular Genetics Quality Network*), GenQA (*Genomix Quality Assessment*), Quality Control for Molecular Diagnostics (*QCMD*), lub inne posiadające akredytację wg normy ISO 17043.
- » W przypadku braku programu badania biegłości dla danej metody laboratorium powinno uczestniczyć w porównaniach międzylaboratoryjnych.
- » Laboratorium powinno ustanowić udokumentowaną procedurę uczestnictwa w badaniach biegłości określającą odpowiedzialność i zawierającą opis uczestnictwa oraz kryteria wyboru organizatorów kontroli jakości.

- » Ponadto MLD powinno wypełniać zalecenia pokontrolne, organizować spotkania informacyjne z pracownikami MLD w celu szczegółowego omówienia wyników uczestnictwa w międzynarodowej/zewnętrznlaboratoryjnej kontroli jakości oraz podejmować działania korygujące w przypadku uzyskania niesatysfakcjonującego rezultatu kontroli.
- » MLD uczestniczy w kontroli jakości w celu sprawdzenia swojej całej procedury badawczej począwszy od otrzymania materiału, oceny komórkowości (jeżeli dotyczy), izolacji DNA/RNA, przeprowadzenia badania (wykonania części analitycznej) oraz przygotowania sprawozdania z badania. Udział w programie ma pokazać ewentualne braki, które trzeba poprawić, nie należy zatem przykładać „niestandardowego wysiłku” do uczestnictwa w kontroli.
- » Certyfikat EQA powinien zawierać informację o ocenie z kontroli.
- » Laboratorium powinno posiadać coroczny harmonogram zewnętrznlaboratoryjnej kontroli jakości, gromadzić certyfikaty z kontroli oraz prowadzić zapisy z poszczególnych kontroli.
- » Uczestnictwo w poszczególnych programach powinno być planowane tak, żeby zapewnić wymaganą (np. roczną) ważność certyfikatu.
- » Próbkę dostarczane przez organizatora testu lub próbki z porównań międzylaboratoryjnych powinny być traktowane jak próbki od pacjentów i badane ściśle według sprawdzanej procedury pozwalającej na kontrolowanie pełnego procesu wykonywania badań, łącznie z procedurami przedanalitycznymi i poanalitycznymi. W przypadku uczestnictwa w programach międzynarodowych sprawozdania z badań są sporządzane zgodnie z wymogami organizatora.
- » Laboratorium powinno uczestniczyć w kontrolach co najmniej raz w roku, a jeśli to niemożliwe co najmniej raz na dwa lata dla danego zakresu badań.
- » W przypadku braku możliwości uczestnictwa w kontrolach zewnętrznlaboratoryjnych laboratorium sprawdza metodę poprzez stosowanie próbek zdiagnozowanych wcześniej w ośrodkach rekomendowanych przez towarzystwa naukowe w Polsce i zagranicą, stosowanie „próbek o znanym statusie” (własnych, wcześniej zbadanych próbek, które zostały przebadane dwiema metodami lub w dwóch niezależnych laboratoriach, vide rozporządzenie MZ w sprawie standardów jakości) oraz stosowanie materiałów odniesienia dostarczonych przez producentów metod.

Poniżej przedstawiono proponowane kryteria wyboru zewnątrzlaboratoryjnych programów kontroli jakości:

Wymagane

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

Pożądane

- » Program jest ogólnoeuropejski/ogólnoswiatowy, liczba uczestników przekracza 50 ośrodków.
- » Dostępne są zasady i warunki płatności za udział, koszt udziału w badaniach i koszt opłat członkowskich jest konkurencyjny w stosunku do innych programów.
- » Istnieje udokumentowany harmonogram badań i oceny.
- » Renoma rynkowa organizatora jest wysoka.

2.8. Ocena i audit

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

- » Sprawdzenia czy wszystkie procesy są realizowane w sposób spełniający standardy i odpowiadający na potrzeby użytkowników,
- » zapewnienia zgodności z systemem zarządzania jakością,
- » ciągłego doskonalenia systemu zarządzania jakością.

Ocena działalności laboratorium powinna obejmować:

- » Okresowe przeglądy zleceń oraz przydatności procedur i wymagań dotyczących próbek.
- » Ocenę informacji zwrotnych od użytkowników/zleciiodawców.

- » Propozycje i uwagi personelu.
- » Audit wewnętrzny.
- » Zarządzanie ryzykiem.
- » Wskaźniki jakości.
- » Kontrole przeprowadzane przez organizacje zewnętrzne.

Wybrane jednostki uprawnione do kontroli MLD:

- » Kierownictwo jednostki nadrzędnej (szpitala, poradni, sieci laboratoriów) – w pełnym zakresie.
- » Zespół wizytatorów Krajowej Rady Diagnostów Laboratoryjnych (KRDL) na podstawie załącznika nr 6 do uchwały 202/VI/2025 z dnia 21 lutego 2025 w sprawie Regulaminu działalności wizytatorów Krajowej Rady Diagnostów Laboratoryjnych oraz prowadzenia i wykonywania kontroli praktyk diagnostów laboratoryjnych. Przeprowadzenie postępowania kontrolnego ma na celu ocenę wykonywania czynności diagnostyki laboratoryjnej przez diagnostę laboratoryjnego, dokonaną na podstawie ustalonego stanu faktycznego, przy zastosowaniu przyjętych kryteriów kontroli. W przypadku stwierdzenia nieprawidłowości, celem postępowania kontrolnego jest również ustalenie ich zakresu, przyczyn i skutków, a także sformułowanie zaleceń zmierzających do usunięcia nieprawidłowości.
- » Stacja Sanitarno-Epidemiologiczna (SANEPID) – w zakresie spełniania warunków sanitarno-epidemiologicznych.
- » Państwowa Inspekcja Pracy (PIP) – w zakresie bezpieczeństwa i higieny pracy oraz legalności zatrudnienia.
- » Narodowy Fundusz Zdrowia (NFZ) – w zakresie prowadzenia działalności diagnostycznej, jeżeli MLD lub jego jednostka nadrzędna posiada kontrakt w NFZ.
- » Konsultant wojewódzki ds. laboratoryjnej genetyki medycznej z ramienia wojewody - w zakresie prowadzenia działalności diagnostycznej w danym województwie.
- » Konsultant krajowy ds. laboratoryjnej genetyki medycznej - w zakresie prowadzenia działalności diagnostycznej.
- » Zleceniodawcy – w zakresie prowadzenia działalności diagnostycznej, którą podzlecają w MLD.
- » Polskie Centrum Akredytacji (PCA) – w zakresie akredytowanych procedur, na żądanie MLD.

3.

Funkcjonowanie medycznego laboratorium diagnostycznego

3.1. Zlecenie badań molekularnych

Zgodnie z Rozporządzeniem Ministra Zdrowia w sprawie standardów jakości dla laboratoriów z dnia 30 czerwca 2025 r. (Dz. U. poz. 961) laboratorium powinno opracować i wdrożyć procedurę zlecenia laboratoryjnego badania genetycznego oraz udostępnić ją zlecaniodawcom.

Formularz zlecenia na badanie genetyczne powinien zawierać:

- » dane pacjenta (imię i nazwisko, adres zamieszkania albo oddział szpitalny pobytu pacjenta, płeć, pochodzenie etniczne, numer PESEL lub numer i serię dokumentu potwierdzającego tożsamość, numer identyfikacyjny pacjenta),
- » datę wystawienia zlecenia,
- » podpis i oznaczenie lekarza zlecającego,
- » nazwę i adres zlecaniodawcy,
- » dane do kontaktu z lekarzem zlecającym badanie genetyczne (numer telefonu, adres e-mail),
- » imię i nazwisko osoby upoważnionej do odbioru sprawozdania z badania genetycznego;
- » rodzaj materiału biologicznego i jego pochodzenie,
- » informację o zleconym badaniu genetycznym,
- » tryb wykonywania badania genetycznego w zależności od wybranej metody diagnostycznej;
- » datę i godzinę pobrania materiału biologicznego do badania genetycznego,
- » imię i nazwisko oraz podpis osoby pobierającej materiał biologiczny do badania genetycznego,
- » datę i godzinę przyjęcia materiału biologicznego do laboratorium,
- » istotne dane kliniczne dotyczące pacjenta, ustalane indywidualnie dla rodzaju zlecanego badania, w szczególności:
 - informację o wcześniejszych badaniach genetycznych oraz ich wynikach, jeżeli były wykonywane,
 - datę i godzinę dostarczenia materiału biologicznego do zakładu patomorfologii,
 - rozpoznanie patomorfologiczne z oceną odsetka komórek nowotworowych,
 - podpis i oznaczenie lekarza patomorfologa stawiającego rozpoznanie patomorfologiczne,
 - oznaczenie zakładu patomorfologii, w którym postawiono rozpoznanie, zawierające nazwę i adres tego zakładu.

Na jednym formularzu zlecenia na badanie genetyczne może być zlecone więcej niż jedno badanie genetyczne z tego samego materiału biologicznego. Do zlecenia na badanie genetyczne jest dołączany formularz pisemnej zgody na wykonanie badania genetycznego, o której mowa w art. 18 ustawy z dnia 6 listopada 2008 r. o prawach pacjenta i Rzeczniku Praw Pacjenta (Dz. U. z 2024 r. poz. 581).

**Poniżej przedstawiono wzór formularza świadomej zgody opracowany przez PTGC
(do pobrania na stronie internetowej PTGC)**

Deklaracja świadomej zgody na wykonanie badania genetycznego - wersja 1 z dnia 28.10.2025

NAZWA PODMIOTU LECZNICZEGO
Ul. xxxxx, KOD, miejscowość
tel.: faks: e-mail:
NIP, Regon, KRS

LOGO

**DEKLARACJA ŚWIADOMEJ ZGODY NA WYKONANIE BADANIA
GENETYCZNEGO**

W KIERUNKU

DANE OSOBY BADANEJ

Imię i Nazwisko	
Data urodzenia (DD-MM-RRRR)	
PESEL (jeśli brak - nazwa i numer dokumentu potwierdzającego tożsamość)	

DANE PRZEDSTAWICIELA USTAWOWEGO (JEŚLI DOTYCZY)

Imię i Nazwisko	
Data urodzenia (DD-MM-RRRR)	
PESEL (jeśli brak - nazwa i numer dokumentu potwierdzającego tożsamość)	

Podpisując niniejszą deklarację świadomej zgody oświadczam, że:

- 1) Zostałem/-am w sposób zrozumiały poinformowany/-a o istocie podejrzewanej choroby i znaczeniu wykonywanych badań genetycznych dla ustalenia rozpoznania / leczenia lub oceny predyspozycji / przebiegu choroby lub potwierdzenia / wykluczenia nosicielstwa choroby.
- 2) Przyjmuję do wiadomości, że wynik badania genetycznego powinien być skonsultowany z lekarzem genetykiem w celu omówienia jego znaczenia dla mnie / mojego dziecka / mojego podopiecznego i innych członków rodziny.
- 3) Przyjmuję do wiadomości, że zastosowany schemat diagnostyczny może nie przynieść wyników informatywnych lub jednoznacznych. W przypadku wdrożenia w przyszłości nowych metod analizy, diagnostyka pod kątem określonego wskazania klinicznego zostanie wznowiona na zlecenie lekarza kierującego.
- 4) Zdaję sobie sprawę, że udzielenie prawidłowej porady genetycznej może wiązać się z koniecznością wykonania badań genetycznych u innych członków rodziny. W przypadku, gdy pokrewieństwo

* niepotrzebne skreślić

Strona 1 z 4

Deklaracja świadomej zgody na wykonanie badania genetycznego - wersja 1 z dnia 28.10.2025

NAZWA PODMIOTU LECZNICZEGO
Ul. xxxxx, KOD, miejscowość
tel.: faks: e-mail:
NIP, Regon, KRS

LOGO

między członkami badanej rodziny jest inne niż deklarowane, otrzymany wynik i jego interpretacja mogą być niezgodne z rzeczywistością.

- 5) Zostałem poinformowany o możliwości wycofania zgody na wykonanie badania genetycznego w dowolnym momencie oraz o możliwości rezygnacji z otrzymania informacji o wynikach badania. Zdaję sobie sprawę, że dokumentacja medyczna, która powstała do tego momentu w procesie diagnostycznym, będzie przechowywana przez co najmniej 20 lat.
- 6) Przyjmuję do wiadomości, że w przypadku, gdy materiał genetyczny uległ degradacji i/lub jego ilość jest niewystarczająca do wykonania analiz, może zaistnieć konieczność ponownego pobrania materiału od osoby badanej.
- 7) Przyjmuję do wiadomości, że laboratoryjne wyniki badań genetycznych oraz wyniki analizy bioinformatycznej nie stanowią załącznika do sprawozdania z analizy genetycznej.
- 8) Wyrażam zgodę na przetwarzanie moich danych osobowych zawartych w skierowaniu, zgodnie z przepisami ustawy o ochronie danych osobowych (Dz.U. z 2019, poz. 1781) oraz ustawy o prawach pacjenta i Rzeczniku Praw Pacjenta (Dz. U. z 2023, poz. 1318, 1545, 1675, 1692 i 1972).

oraz wyrażam zgodę na

☐ pobranie ode mnie / mojego dziecka / mojego podopiecznego:

☐ krwi/ ☐ wycinka skóry/ ☐ płynu owodniowego/ ☐ trofoblastu/ ☐ szpiku kostnego/ ☐ innej tkanki
.....

☐ wykorzystanie zabezpieczonego materiału biologicznego/materiału genetycznego:

☐ DNA/ ☐ RNA/ ☐ materiału archiwalnego/ ☐ innego

i wykonanie genetycznych diagnostycznych badań genetycznych.

Wyrażam zgodę na zabezpieczenie i przechowywanie materiału genetycznego na potrzeby wykonania w przyszłości ewentualnych dodatkowych badań diagnostycznych dla mnie lub członków mojej rodziny. W przypadku niewyrażenia zgody na przechowywanie materiału, zostanie on zniszczony niezwłocznie po wydaniu sprawozdania z analizy genetycznej.	TAK	NIE
Wyrażam zgodę na przechowywanie i anonimowe wykorzystanie materiału genetycznego do badań naukowych, mających na celu rozszerzenie wiedzy na temat podłoża diagnozowanej choroby, zgodnie z wymogami polskiego prawa i standardami etycznymi, po uzyskaniu pozytywnej opinii właściwej komisji bioetycznej.	TAK	NIE
Dotyczy zlecenia całej lub fragmentu diagnostycznej procedury genetycznej do podwykonawcy: Wyrażam zgodę na przekazanie materiału mojego / mojego dziecka / podopiecznego innym placówkom, w których będzie wykonywana procedura diagnostyczna / etap procedury diagnostycznej.	TAK	NIE

* niepotrzebne skreślić

Strona 2 z 4

Deklaracja świadomej zgody na wykonanie badania genetycznego - wersja 1 z dnia 28.10.2025

NAZWA PODMIOTU LECZNICZEGO

Ul. xxxxx, KOD, miejscowość

tel.: faks: e-mail:

NIP, Regon, KRS

LOGO

Dotyczy badań wielogenowych, w tym całokosomowych (WES), całogenomowych (WGS), mikromacierzowych (aCGH)

Analiza danych z molekularnych badań wielogenowych może wymagać ich przesłania na serwery znajdujące się poza terytorium Polski, co jest niezbędne dla procesu diagnostycznego. Dane te przekazywane są w sposób zanonimizowany, bez podania danych osobowych. Czy wyraża Pan / Pani zgodę na przesłanie danych na serwery zlokalizowane w krajach zrzeszonych w Organizacji Współpracy Gospodarczej i Rozwoju (OECD)?	TAK	NIE
Brak zgody jest równoznaczny z brakiem możliwości wykonania badania tego typu.		
W przypadku prowadzenia badań wielogenowych wyrażam zgodę na raportowanie w wyniku przypadkowo wykrytych wariantów patogennych / potencjalnie patogennych w genach ujętych w rekomendacji ACMG (American College of Medical Genetics, Green RC i wsp. Genet Med. 2013, 15(7):565-74 PMID: 23788249), nie mających bezpośredniego związku z diagnozowaną chorobą, ale powiązanych z chorobami, w których wskazane jest wdrożenie odpowiedniego postępowania diagnostycznego, profilaktycznego lub klinicznego.	TAK	NIE
Dotyczy tylko osób pełnoletnich: W przypadku prowadzenia u mnie badań z wykorzystaniem metod wielogenowych / całogenomowych wyrażam zgodę na raportowanie w wyniku nosicielstwa patogennych / potencjalnie patogennych wariantów nie mających związku z diagnozowaną chorobą, ale mogących mieć wpływ na ryzyko wystąpienia choroby u mojego potomstwa.	TAK	NIE
Dotyczy tylko osób pełnoletnich: W przypadku prowadzenia u mnie badań z wykorzystaniem metod wielogenowych / całogenomowych wyrażam zgodę na raportowanie w wyniku badania wariantów patogennych / potencjalnie patogennych nie mających bezpośredniego związku z aktualnie diagnozowaną chorobą, ale mogących mieć wpływ na ryzyko wystąpienia u mnie chorób o późnym początku.	TAK	NIE

Data i podpis Osoby Badanej (pełnoletniej lub niepełnoletniej, jeżeli ukończyła 16 r.ż.).	
Data i podpis Rodzica / Przedstawiciela Ustawowego (dotyczy pacjenta: małoletniego do 18 r.ż., całkowicie ubezwłasnowolnionego lub niezdolnego do świadomego wyrażenia zgody)	
Oświadczam, iż poinformowałam/-em pacjenta o szczegółach dotyczących rodzaju badania i możliwych wynikach badań genetycznych.	
Data, pieczęć i podpis lekarza kierującego	

* niepotrzebne skreślić

Strona 3 z 4

Deklaracja świadomej zgody na wykonanie badania genetycznego - wersja 1 z dnia 28.10.2025

NAZWA PODMIOTU LECZNICZEGO
Ul. xxxxx, KOD, miejscowość
tel.: faks: e-mail:
NIP, Regon, KRS

LOGO

UPOWAŻNIENIE:

Upoważniam (imię i nazwisko).....,
PESEL (lub rodzaj i nr dokumentu tożsamości)
do odbioru Sprawozdania z badania genetycznego.

.....
data i podpis Osoby Badanej / Rodzica / Przedstawiciela ustawowego*

KONIEC DOKUMENTU

* niepotrzebne skreślić

Strona 4 z 4

3.2. Procesy przedanalityczne

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

- A. wycinek tkankowy, zatopiony w bloku parafinowym lub preparat histologiczny barwiony lub niebarwiony H&E (*hematoxylin and eosin*);
- **Blok parafinowy** – utrwalony wycinek tkankowy zatopiony w parafinie.
 - **Preparat histologiczny** – skrawek tkankowy z bloku parafinowego, umieszczony na szkiełku podstawowym.
 - **Skrawek tkankowy** – fragment tkanki o grubości 4-10 μm , skrojony z bloku parafinowego przy pomocy mikrotomu (urządzenia do precyzyjnego skrawiania materiału tkankowego).
 - **Makrodysekcja** - wydzielenie fragmentu wycinka tkankowego, z bloku parafinowego. Fragment podlegający makrodysekcji patomorfolog zaznacza pisakiem na ocenianym preparacie histologicznym barwionym HE.
- B. preparat cytologiczny barwiony lub niebarwiony H&E;
- **Preparat cytologiczny** – utrwalony rozmaz komórkowy na szkiełku podstawowym.
 - **Cytoblok** - zawiesina komórkowa utrwalana podobnie jak materiał tkankowy.
- C. materiał mrożony i przechowywany w dedykowanych kasetkach w temperaturze -70°C .

3.2.1.1. Standardy utrwalania materiału biologicznego w formalinie do badań molekularnych

Materiał tkankowy

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

Utrwalanie w formalinie

- » Utrwalanie w formalinie polega na chemicznym zatrzymaniu procesów biologicznych w tkance oraz zatrzymaniu kolonizacji przez mikroorganizmy. Istotą tej reakcji jest tworzenie przez formaldehyd mostków metylenowych, które sieciują i inaktywują białka w utrwalanym materiale.
- » Utrwalanie nie pozostaje bez wpływu na kwasy nukleinowe. Zbyt późne rozpoczęcie utrwalania lub niedostatecznie utrwalenie materiału powoduje degradację biologiczną pod wpływem nukleaz. Zbyt długi kontakt z formaldehydem przyczynia się natomiast od szeregu trwałych chemicznych zmian w DNA i RNA.

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

Najważniejsze zmiany chemiczne w DNA/RNA pod wpływem formaldehydu:

- Fragmentacja związana ze zrywaniem wiązań fosfodiesterowych
- Tworzenie wiązań krzyżowych poprzez mostki metylenowe w obrębie kwasu nukleinowego i z sąsiadującymi białkami
- Deaminacja cytozyny prowadząca do artefaktów w sekwencji C>T, G>A
- Deaminacja adeniny prowadząca do artefaktów w sekwencji A>G, T>C

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

Najważniejsze parametry utrwalania w formalinie:

Stężenie: 4% formaldehyd

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

10% formalina to zwyczajowa nazwa 4% wodnego roztworu formaldehydu

Maksymalne stężenie formaldehydu w roztworze wodnym nie przekracza 40%.

Historycznie utrwalacz uzyskiwano przez 10-krotne rozcieńczenie takiego roztworu.

Neutralne pH, optymalnie 7,2-7,4

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

Czas utrwalania 6-48 godzin

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

Grubość utrwalanego materiału nie większa niż 10mm

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

Objętość utrwalacza co najmniej 10-krotnie większa od utrwalanego materiału

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

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

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

Tabela 3.1. Najczęściej popełniane błędy utrwalania w formalinie

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

Odwapnianie

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

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

- Fragmentacja związana ze zrywaniem wiązań fosfodiesterowych.
- Powstawanie miejsc apurynowych związane ze zrywaniem wiązań glikozydowych.

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

- Zalecany odczynnik do odwapniania: Roztwór EDTA.

Procesor tkankowy

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

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

Materiał cytologiczny

- **rozsmaz** – do jego utrwalenia wykorzystuje się alkohol etylowy (95-96%). Utrwalanie powinno się rozpocząć natychmiast (1-2s) po zakończeniu biopsji. W związku z powyższym jakość DNA oraz RNA jest bardzo dobra. Mankamentem jest nie zawsze wystarczająca ilość komórek nowotworowych oraz jego wykorzystanie wiąże się ze zniszczeniem rozmazu.
- **cytoblok** – materiał bezpośrednio ze strzykawki wpuszcza się do utrwalacza z wykorzystaniem 10% zbuforowanej formaliny (4% roztwór formaldehydu) o pH 7,2-7,4. Czas utrwalania materiału cytologicznego powinien wynosić 6-24 godzin, (maksymalnie 48 godzin) bezpośrednio po zaaspirowaniu. Odradza się utrwalanie materiału do badań genetycznych w komercyjnych utrwalaczach cytologicznych opartych na mieszaninie alkoholi. Takie utrwalacze nie zabezpieczają RNA przed degradacją (kluczowe znaczenie w diagnostyce genów fuzyjnych – m.in. w raku płuca).

Drobny materiał cytologiczny jest podatny na degradację. Utrwalanie należy rozpocząć niezwłocznie po pobraniu.

3.2.2.2. Zabezpieczenie tzw. świeżej tkanki

Pobrany do badań genetycznych materiał tkankowy może zostać zabezpieczony bezpośrednio po pobraniu (bez wstępnego utrwalania w formalinie, tzw. materiał świeży) poprzez zamrożenie techniką „snap freezing” (np. w ciekłym azocie lub na suchym lodzie) a następnie przechowywany w temperaturze -70°C przez czas nieograniczony. Do przechowywania tkanek w takich warunkach stosuje się probówki z odpowiednich tworzyw sztucznych odpornych na działanie niskich temperatur. Należy unikać kilkukrotnego zamrażania i rozmrażania materia-

tu. Wykonywanie badań na tak zabezpieczonym materiale pozwala uniknąć występowania artefaktów utrwalania, które mogą utrudnić analizę uzyskanych danych genetycznych.

3.2.3. Ocena przydatności materiału do badania molekularnego:

A. Typowanie reprezentatywnego materiału biologicznego przez lekarza patomorfologa:

lekarz patomorfolog wybiera biologicznie reprezentatywny materiał biologicznie (FFPE, cytoblok, preparat cytologiczny, preparat H&E) na podstawie którego dokonuje oceny jego przydatności do badania genetycznego:

- liczba komórek nowotworowych
- odsetek komórek nowotworowych
- zaznaczenie pól martwicy

B. Przygotowanie próbek przez Zakład Patomorfologii:

» Przygotowywanie materiału biologicznego z bloków parafinowych:

Preparaty niebarwione przeznaczone na badanie molekularne lub FISH, dodatkowo, do tak przygotowanych preparatów, dołącza się kolejny preparat histologiczny barwiony metodą HE (lub zdjęcie) z zaznaczonym przez lekarza patomorfologa obszarem utkania nowotworowego i zaznaczeniem pól martwicy.

» Przygotowywanie materiału biologicznego z cytobloków:

Preparaty niebarwione przeznaczone na badanie molekularne lub FISH, dodatkowo, do tak przygotowanych preparatów, dołącza się kolejny preparat barwiony metodą HE (lub zdjęcie), z zaznaczonym przez lekarza patomorfologa obszarem, w którym znajdują się komórki nowotworowe.

» Przygotowanie materiału biologicznego cytologicznego:

Preparat cytologiczny/rozmaz po ocenie patomorfologicznej przekazywany jest w całości do badań genetycznych. Na preparacie cytologicznym przeznaczonym do badania FISH lekarz patomorfolog zaznacza markerem obszar, w którym znajdują się komórki nowotworowe.

» Przygotowanie materiału biologicznego zabezpieczonego poprzez mrożenie:

Z zabezpieczonego materiału przygotowuje się preparat histologiczny barwiony metodą HE, który podlega ocenie lekarza patomorfologa pod kątem wskazania obszaru, w którym znajdują się komórki nowotworowe oraz oceny odsetka utkania nowotworowego. Następnie wyselekcjonowany obszar materiału jest krojony do probówek typu Eppendorf i poddawany kolejnym etapom badań molekularnych.

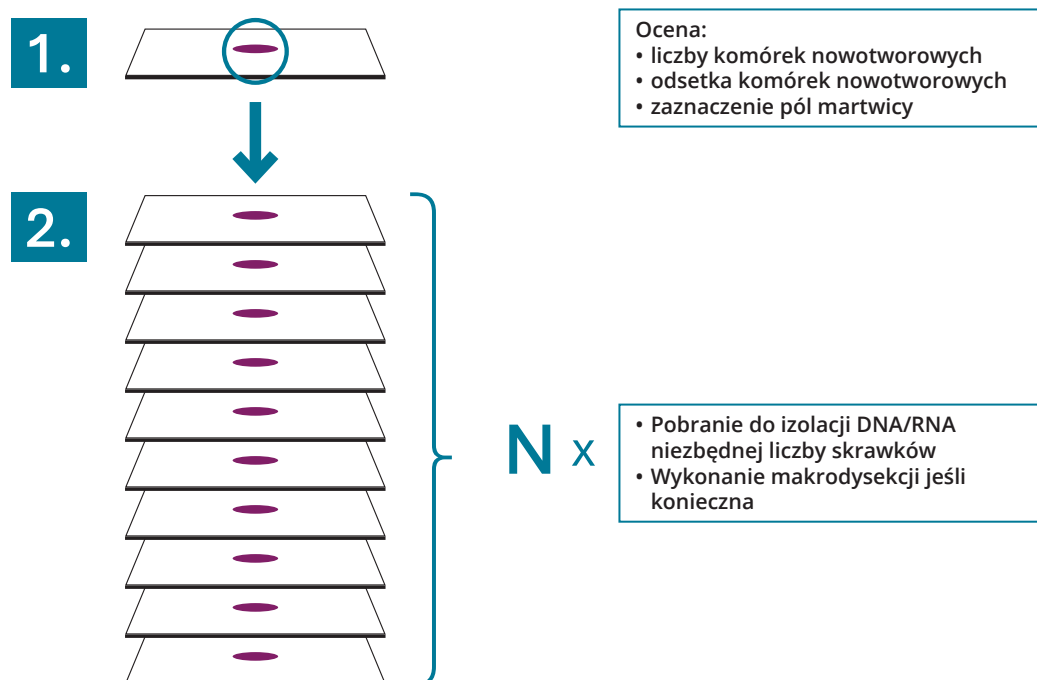
C. Laboratorium na podstawie informacji od patomorfologa podejmuje decyzję o liczbie skrawków przeznaczonych do izolacji kwasów nukleinowych do planowanego badania.

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

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

Jeśli zachodzi konieczność dokonania makrodysekcji, to wykonuje się ją z serii preparatów, a nie bloczka parafinowego.

Należy obchodzić się z materiałem pacjenta oszczędnie, ponieważ może zachodzić konieczność wykorzystania go również w przyszłości.



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

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

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

3.2.5. Ekstrakcja kwasów nukleinowych, ocena ilościowa i jakościowa

- A. Proces ekstrakcji kwasów nukleinowych z tkanki zatopionej w parafinie powinien być wydajny i umożliwiać oczyszczanie z inhibitorów reakcji enzymatycznych.
- B. Przed wykonaniem analizy genetycznej należy ocenić ilość i jakość wyizolowanego materiału genetycznego. Ocenę wykonuje się metodą spektrofotometryczną lub bardziej precyzyjną - fluorymetryczną.

3.2.6. Kryteria odrzucenia próbki przez MLD:

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

Wartości alarmowe:

- » bardzo mała (<9mm², 3x3mm) powierzchnia materiału do izolacji DNA/RNA,
- » wartości alarmowe poniżej 5% komórek nowotworowych, lub poniżej 300 komórek nowotworowych (**ze wszystkich skrawków skrojonych do wykonania badania patrz 3.2.3 c**) dla metod qPCR, FISH oraz wartości alarmowe poniżej 20% komórek nowotworowych lub poniżej 3000 komórek dla NGS,
- » wartości alarmowe w molekularnych badaniach cytogenetycznych poniżej 50 komórek nowotworowych w nowotworach niehematologicznych,
- » brak zastosowania makrodysekcji dla materiału z odsetkiem komórek nowotworowych ≤20% (należy zawsze procent komórek nowotworowych w preparacie porównać z czułością i wymaganiami stosowanej metody),
- » brak zaznaczenia pola preparatu z komórkami nowotworowymi do badania FISH,
- » skrawki parafinowe o nieznannej grubości [μm],
- » przekroczenie dopuszczalnego czasu/terminu przekazania próbek do badań (CTC, badania RNA),
- » niekompletnie wypełnione skierowanie, brak zgody pacjenta na wykonanie badania,
- » niekompletnie wypełniony patomorfologiczny wynik kwalifikacji materiału do badania.

3.3. Wykonywanie badań, procesy badawcze

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

1. certyfikowane CE-IVD zgodnie z Rozporządzeniem IVDR i używane zgodnie z wytycznymi producenta wyrobu, lub

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

Walidacja lub weryfikacja metody w laboratorium jest udokumentowana.

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

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

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

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

Standardy badań molekularnych uwzględniają:

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

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

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

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

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

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

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

3.3.1. Postępowanie z próbkami do badania:

1. Próbkę materiału biologicznego opracowywane są przez przeszkolony i wykwalifikowany personel medyczny laboratorium zgodnie ze sposobami postępowania opisanymi w wewnętrznych procedurach laboratoryjnych.
2. Wszystkie czynności dotyczące przygotowania aparatów do pracy oraz wykonania badania przeprowadzane są zgodnie z instrukcjami producenta i/lub procedurami badawczymi laboratorium przez przeszkolonych pracowników.
3. Do każdego diagnostycznego badania genetycznego pracownik wykonuje wewnątrzlaboratoryjną kontrolę jakości.
4. Personel medyczny MLD szczegółowo analizuje wyniki badań zgodnie ze sposobami postępowania opisanymi w wewnętrznych procedurach laboratoryjnych. Poprawność uzyskanych wyników ocenia się poprzez dokładną weryfikację wyników zgodnie ze szczegółowymi zaleceniami producenta testu wykorzystywanego do diagnostyki, a także zastosowaniem aktualnych baz danych, wytycznych i literatury.

Badanie przeprowadzane jest przez wykwalifikowany personel, z użyciem odpowiedniego wyposażenia, podlegającego okresowym kontrolom i (jeśli tego wymaga) wzorcowaniu i od-

powiedniej jakości odczynników. Analiza uzyskanych danych dokonywana jest przy pomocy dedykowanego oprogramowania.

Mimo, iż oferta różnorodnych wyrobów medycznych do diagnostyki *in vitro* dynamicznie się poszerza, nadal często zdarza się sytuacja, w której na rynku brakuje gotowej certyfikowanej metody służącej do identyfikacji zmian genetycznych, które mogą być przyczyną różnych chorób lub stanowią istotny czynnik ryzyka rozwoju chorób nowotworowych. W takiej sytuacji laboratorium ma możliwość opracowania własnego testu lub metody diagnostycznej i ma prawo ich wykorzystywania w procesie diagnostycznym wtedy, gdy posiada akredytację na zgodność z normą ISO 15189:2023.

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

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

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

3.4. Sprawozdawanie i wydawanie wyników badań

- » Laboratorium powinno prowadzić dokumentację badań genetycznych, która pozwala odtworzyć cały ich przebieg oraz zweryfikować prawidłowość zastosowanych metod i procedur diagnostycznych.
- » Celem sprawozdania z badania molekularnego jest przekazanie wyników badań w formacie, który jest jasny i zrozumiały dla lekarzy podejmujących na ich podstawie decyzje kliniczne. Ten aspekt jest regulowany przez rozporządzenie Ministra Zdrowia w sprawie standardów jakości dla laboratoriów z dnia 30 czerwca 2025 laboratorium (Dz. U. 2025, poz. 961).

Na formularzu sprawozdania powinny znajdować się następujące informacje:

1. Dane laboratorium wykonującego badanie (nazwa jednostki, nazwa laboratorium, numer wpisu w rejestrze KRDL, adres; nr telefonu, email).
2. Sekcja dane pacjenta:
 - a. Imię i nazwisko pacjenta;
 - b. PESEL/lub nr i seria dokumentu/PESEL matki;
 - c. Pochodzenie etniczne: nie podaje/gr. etniczna: europejska /inna;
 - d. Płeć: K/M/inna;
 - e. Data urodzenia: DD.MM.RRRR;
 - f. Adres zamieszkania: ul. nazwa, numer, kod, miasto/ Oddział szpitalny: Klinika (jeśli nie ma adresu);
 - g. Imię i nazwisko osoby upoważnionej do odbioru sprawozdania z badania.
3. Sekcja dane zlecającego:
 - a. Dane jednostki zlecającej: nazwa, adres (miejsce przestania sprawozdania), telefon;
 - b. Dane lekarza zlecającego: tytuł zawodowy, imię nazwisko, nr PWZ, specjalizacja;
 - c. Rozpoznanie (i/lub ICD-10);
 - d. Wskazanie do badania: np. kwalifikacja do leczenia celowanego;
 - e. Informacja o uzyskaniu zgody na badanie genetyczne.
4. Sekcja dane materiału
 - a. Stan próbki: bez zastrzeżeń/nieoptymalny – krótki opis np. materiał skąpy;
 - b. Rodzaj próbki i materiał: pierwotna (krew pełna/szpik kostny/tkanka/osocze/tkanka FFPE / wtórna (izolat DNA);
 - c. Nr próbki pierwotnej;
 - d. Nr próbki wtórnej;
 - e. Data i godzina pobrania próbki: DD.MM.RRRR, 00:00;
 - f. Data i godzina zlecenia badania (dla archiwalnych): DD.MM.RRRR, 00:00;
 - g. Data i godzina przyjęcia próbki: DD.MM.RRRR, 00:00;
 - h. Numer bloczka parafinowego;
 - i. Dane lekarza patomorfologa kwalifikującego (imię i nazwisko, PWZ);
 - j. Rozpoznanie patomorfologiczne;
 - k. Odsetek komórek nowotworowych.

5. Sekcja dane badania:

- a. Nazwa badania;
- b. Nr identyfikacyjny badania nadany przez laboratorium;
- c. Tryb badania: rutynowe/cito;
- d. Data i godzina wykonania badania;
- e. Data wydania wyniku.

6. Sekcja wynik badania:

- a. Informacja o wykrytych wariantach patogennych i prawdopodobnie patogennych;
- b. Zapis HGVS;
- c. Dla wariantów somatycznych: głębokość sekwencjonowania w miejscu wariantu, częstość alleliczna wariantu (VAF); w przypadku fuzji genowych: liczba i odsetek stwierdzonych odczytów fuzyjnych;
- d. Wynik opisowy.

7. Sekcja wyniki niejednoznaczne VUS i/lub spoza zakresu badania:

- a. Zapis HGVS;
- b. Głębokość sekwencjonowania w miejscu wariantu; częstość alleliczna wariantu; dla fuzji genowych: liczba odsetek stwierdzonych odczytów fuzyjnych;
- c. Wynik opisowy.

8. Sekcja laboratoryjna interpretacja wyniku:

- a. Określenie: wynik prawidłowy/nieprawidłowy/niejednoznaczny;
- b. Opisanie działania wariantu na kodowane białko, a w przypadku czynników predykcyjnych dla terapii ukierunkowanych molekularnie potencjalny wpływ obecnego wariantu na odpowiedź na dany lek;
- c. Interpretacja o możliwym pochodzeniu germinalnym.

9. Sekcja zalecenia:

- a. Zalecenia dotyczące konsultacji z lekarzem onkologiem;
- b. Zalecenia dotyczące potwierdzenia wyniku z drugiego, niezależnego pobrania materiału;
- c. Zalecenia dotyczące ustalenia pochodzenia zmiany [germinalna (wrodzona)/somatyczna (nabyta)] i konsultacji z lekarzem genetykiem.

10. Sekcja uwagi:

- a. Np. informacja o innych wykonanych badaniach genetycznych.

11. Sekcja informacji o metodzie:

- a. Parametry danego badania: np. pokrycie, wymagana głębokość sekwencjonowania;
- b. Czulość, specyficzność, swoistość;
- c. Metodyka badania, nazwa i oznaczenie procedury;
- d. Zakres badania genetycznego;
- e. Ograniczenia metody;
- f. Informacja o nieraportowaniu wariantów łagodnych i potencjalnie łagodnych;
- g. Wytyczne na podstawie których sklasyfikowano warianty;
- h. Informacja o polityce raportowania VUS;
- i. Literatura: do przypadku.

12. Sekcja dodatkowe informacje:

- a. Numer produktu rozliczeniowego (nieobowiązkowe);
- b. Informacja o uczestnictwie laboratorium w europejskim programie badania biegłości.

13. Dane osób wykonujących i autoryzujących wynik:

Wykonał, dokonał przeglądu (dla ISO15189), autoryzował (imię, nazwisko, PWZDL tyt. zawodowy, specjalizacja, w przypadku MGM: nr dyplomu).

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

Opis wariantów genetycznych i ich klasyfikacja

1. W raporcie należy używać oficjalnych nazw genów zatwierdzonych przez HUGO Gene Nomenclature Committee (<https://www.genenames.org/>). Należy podać oznaczenie sekwencji referencyjnej preferowane wg. NCBI, ENSEMBL, lub MANE (https://tark.ensembl.org/web/mane_project/). Wskazane jest umieszczenie dodatkowo nazwy zwyczajowej genów/wariantów, jeżeli może ona pomóc w interpretacji wyników przez lekarza kierującego.
2. Na sprawozdaniach powinny być raportowane warianty patogene oraz prawdopodobnie patogene; decyzja o raportowaniu wariantów o nieznanym znaczeniu klinicznym (VUS) należy do kierownika laboratorium. W wyjątkowych przypadkach VUS może być raportowany na prośbę genetyka klinicznego. Informacja o przyjętej polityce raportowania VUS powinna być zamieszczona na wyniku.
3. Zidentyfikowane warianty należy zapisywać zgodnie z wytycznymi Human Genome Variation Society (<http://varnomen.hgvs.org/>). Dla badań cytogenetycznych należy stosować się do reguł aktualnego wydania ISCN (obecnie ISCN 2024).
4. Przypadkowo wykryte zmiany, tzw. „Incidental findings” niezwiązane ze wskazaniem do badania należy raportować zgodnie z wytycznymi (PMID: 38565640; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/docs/acmg/>).
5. Warianty należy klasyfikować zgodnie z wytycznymi ACMG, odpowiednio dla wariantów germinalnych (PMID: 25741868) i somatycznych (PMID: 27993330). Informacja potwierdzająca ten fakt powinna znaleźć się na sprawozdaniu.
 - a. zawarte w raporcie dowody potwierdzające klasyfikację powinny być przedstawione w jasny i zrozumiały sposób,
 - b. należy zacytować publikacje zawierające istotne informacje mające wpływ na klasyfikację wariantu,
 - c. należy stosować pełne nazwy poszczególnych klas, np. takie jak „prawdopodobnie patogene”, a nie numer kategorii (np. „klasa 4”),

- d. w przypadku niektórych grup pacjentów lub genów, istnieją międzynarodowe konsorcja eksperckie, które klasyfikują poszczególne warianty i według kryteriów ACMG 2015 jest to jedna ze składowych klasyfikacji wariantu,
- e. w przypadku metody NGS sprawozdanie powinno zawierać informację, jaki odsetek badanej sekwencji został zsekwencjonowany z wymaganą głębokością.

Metodyka

Opis metodyczny powinien zawierać informacje na temat:

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

Ponadto, laboratorium powinno mieć opracowaną procedurę dotyczącą: Przekazania sprawozdań z badań pacjentom/zlecającemu.

Format wyniku

- » Strony wyniku powinny być numerowane w sposób identyfikujący ich całkowitą liczbę np. 1/2 oraz 2/2. Każda strona w nagłówku lub stopce powinna zawierać dane identyfikacyjne pacjenta (imię, nazwisko, PESEL, data pobrania materiału, numer i data wydania sprawozdania z badania, nazwa i adres jednostki wykonującej badanie). Koniec sprawozdania powinien być jasno oznaczony.
- » Wynik autoryzuje specjalista laboratoryjnej genetyki medycznej, lub medycznej genetyki molekularnej.

3.5. Procesy poanalityczne

1. W przypadku gdy materiał biologiczny (krew, FFPE, materiał tkankowy świeży/mrożony lub izolaty DNA/RNA) zostaną wykorzystane w całości należy to odnotować w dokumentacji związanej z wykonywanym badaniem molekularnym.
2. Po uzyskaniu świadomej zgody od pacjenta na przechowywanie materiału biologicznego na potrzeby ewentualnego powtarzania badania lub rozszerzenia badania lub na potrzeby badań naukowych materiał (np. krew lub izolaty DNA/RNA) po zakończeniu badania można przechowywać w terminie określonym przez dane laboratorium zgodnie z załącznikiem 7 rozporządzenia o standardach (Dz. U. 2025, poz. 961).

4.

Diagnostyka genetyczna nowotworów litych w praktyce

4.1. Rak jelita grubego

4.1.2. Rak jelita grubego - epidemiologia, terapia anty-EGFR, immunoterapia

- » Rak jelita grubego (RJG) (*ang. colorectal cancer, CRC*) należy do najczęściej występujących nowotworów złośliwych na świecie.
- » Metody leczenia uzależnione są od takich czynników jak stopień zaawansowania oraz lokalizacja.
- » Nowoczesne terapie celowane wymagające molekularnej diagnostyki czynników predykcyjnych ukierunkowane są przede wszystkim na receptor EGF (EGFR).
- » Terapia anty-EGFR z wykorzystaniem przeciwciał monoklonalnych ukierunkowanych na receptor naskórkowego czynnika wzrostu stosowana jest obecnie w Polsce jako leczenie pierwszego rzutu u chorych na zaawansowanego raka jelita grubego.
- » Przeciwciała monoklonalne anty-EGFR takie jak cetuksymab i panitumumab mogą być stosowane w monoterapii lub w leczeniu skojarzonym z chemioterapią u pacjentów bez patogennych wariantów w genach *KRAS*, *NRAS* oraz *BRAF* p.Val600Glu (p.V600E).
- » Inhibitory *KRAS* G12C (adagrasib i storasib) w kombinacji z panitumumabem lub cetuksymabem zostały zarejestrowane do leczenia CRC przez FDA
- » W przypadku obecności wariantu *BRAF* p.Val600Glu w przerzutowym raku jelita grubego istnieje możliwość zastosowania przeciwciała monoklonalnego anty-EGFR w skojarzeniu z inhibitorem kinazy *BRAF*.
- » Dostępne dane wskazują, że chorzy na MMRd/MSI CRC (*ang. Mismatch Repair Deficiency/Microsatellite Instability*) w II stopniu zaawansowania mają doskonałe rokowanie i nie odnoszą korzyści z chemioterapii adjuwantowej opartej na 5-fluorouracylu (5-FU).
- » Obecność deficytu naprawy źle sparowanych zasad/niestabilności mikrosatelitarnej (MMRd/MSI) jest czynnikiem predykcyjnym odpowiedzi na immunoterapię.

- » Przed rozpoczęciem chemioterapii opartej na 5-FU należy przeprowadzić badanie w kierunku niedoboru dehydrogenazy dihydropyrimidynowej (DPD).

4.1.3. Materiał do badań molekularnych

- » W przerzutowym raku jelita grubego (IV stopień zaawansowania klinicznego) w pierwszej kolejności należy rozważyć badanie ogniska wtórnego nowotworu. Jeżeli guz przerzutowy nie jest dostępny, należy oceniać tkankę pochodzącą z guza pierwotnego.
- » W badaniu mutacji preferowany jest w pierwszej kolejności materiał operacyjny z guzem pierwotnym lub wtórnym, niż drobny materiał z kolonoskopii zawierający znacznie mniej tkanki.
- » Jeśli zastosowano przedoperacyjną radio/chemioterapię i wynik badania histopatologicznego zawiera informację o widocznej odpowiedzi na leczenie, w pierwszej kolejności należy rozważyć badanie ogniska wtórnego (np. przerzut do wątroby) lub materiału z kolonoskopii. Guz pierwotny z materiału operacyjnego w takim przypadku może zawierać niewystarczającą ilość utkania nowotworu.
- » Jeżeli u pacjenta występowały co najmniej dwa ogniska pierwotne w jelicie grubym (synchroniczne lub metachroniczne), należy w pierwszej kolejności przeznaczyć do badania ognisko wtórne, w celu ustalenia statusu mutacji w klonie odpowiedzialnym za rozsiew choroby.
- » Badanie MSI może być wykonane na świeżej, zamrożonej lub zatopionej w parafinie tkance nowotworowej przy użyciu testu opartego o NGS lub na PCR do wykrywania niestabilności.
- » Wybrany preparat do diagnostyki zmian genetycznych w genach *KRAS/NRAS/BRAF* i MSI powinien zawierać odpowiedni odsetek komórek nowotworowych w ilości nie mniejszej niż 20% dla mutacji i 20% dla MSI.
- » W przypadkach kiedy w preparatach obserwuje się znaczną ilość tkanki prawidłowej należy wykonać makro- lub mikrodysekcję w celu wyodrębnienia utkania nowotworowego. Dopuszcza się stosowanie preparatów zawierających mniejsze utkanie nowotworowe niż 20%, jednak w takich przypadkach zastosowana metoda analityczna powinna cechować się wysoką czułością, może to być np. ilościowa reakcja łańcuchowej polimerazy (qPCR) lub PCR emulsyjny (qPCR lub ddPCR) lub NGS. W takim przypadku nie zaleca się stosowania metody sekwencjonowania Sangera, której czułość jest na poziomie około 20%.
- » Liczba skrawków powinna być uzależniona od wielkości fragmentu tkanki nowotworowej. W przypadku dużych fragmentów (o średnicy wycinka ok. 1 cm) wystarczające są 2-3 skrawki (o grubości nieprzekraczającej 4–5 µm), natomiast w przypadku niewielkich wycinków (o średnicy 2–3 mm) wymagana jest analiza co najmniej 10 skrawków. Liczba skrawków powinna zostać ustalona w wewnętrznych procedurach walidacyjnych dla metody diagnostycznej.
- » Konieczny podkreślenia jest fakt, iż preparat wybarwiony HE do oceny zawartości procentowej nowotworu musi być wykonany bezpośrednio przed preparatem do analizy molekularnej. W przeciwnym razie zawartość komórek guza w preparacie wybarwionym HE i w preparatach przygotowanych do badania molekularnego może się znacząco różnić, a to z kolei może negatywnie wpływać na wynik badania molekularnego.

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

Białka RAS

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

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

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

Gen	Ekson	Kodon	Zapis mutacji na poziomie białkowym	Zapis mutacji na poziomie nukleotydowym
NRAS	2	12	p.Gly12Cys	c.34G>T
			p.Gly12Ser	c.34G>A
			p.Gly12Ala	c.35G>C
			p.Gly12Asp	c.35G>A
		13	p.Gly12Val	c.35G>T
			p.Gly13Arg	c.37G>C
	3	61	p.Gly13Val	c.38G>T
			p.Gly13Asp	c.38G>A
		61	p.Ala59Thr	c.175G>A
			p.Gln61Lys	c.181C>A
			p.Gln61Leu	c.182A>T
			p.Gln61Arg	c.182A>G
	4	117	p.Gln61His	c.183A>T
			p.Gln61His	c.183A>C
		146	p.Lys117Asn	c.351G>C
			p.Lys117Asn	c.351G>T
		146	p.Ala146Thr	c.436G>A
			p.Ala146Val	c.437C>T

UWAGA!

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

- KRAS c.34_35delinsCT; p.Gly12Leu
- KRAS c.34_35delinsTA; p.Gly12Tyr
- KRAS c.34_35delinsTT; p.Gly12Phe
- KRAS c.34_35delinsTT; p.Gly12Leu
- KRAS c.35_36delinsAA; p.Gly12Glu
- KRAS c.38_39delinsAA; p.Gly13Glu
- KRAS c.38_39delinsAT; p.Gly13Asp
- KRAS c.38_39delinsTT; p.Gly13Val
- KRAS c.175G>T; p.Ala59Ser
- KRAS c.180_181delinsCA; p.Gln61Lys
- KRAS c.181_183delinsTAC; p.Gln61Tyr
- KRAS c.182A>C; p.Gln61Pro
- KRAS c.350A>G; p.Lys117Arg
- NRAS c.436G>T; p.Ala146Ser
- KRAS c.27_29dup; p.Gly10dup
- KRAS c.29_31dup; p.Gly10dup
- KRAS c.30_35dup; p.Ala11_Gly12dup
- KRAS c.36_38dup; p.Gly13dup
- KRAS c.38_40dup; p.Gly13dup

Białko BRAF

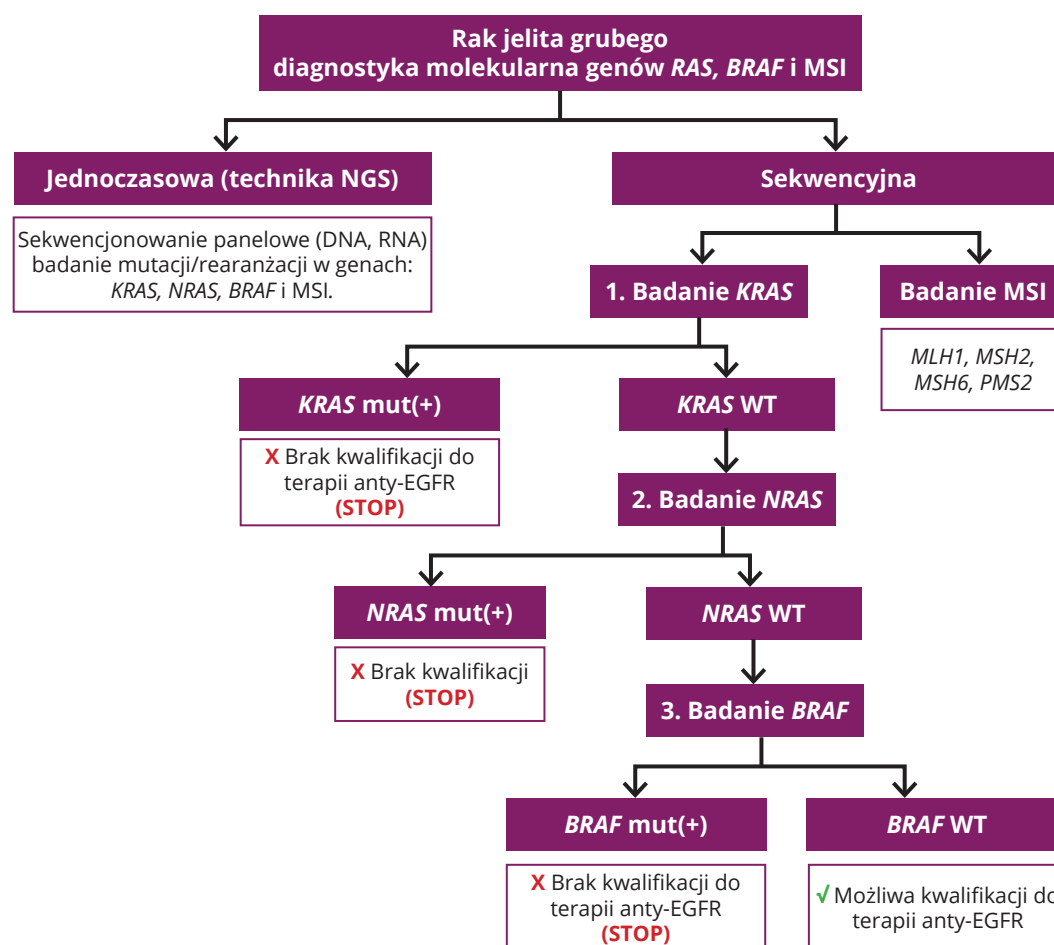
- » Poza białkami RAS bardzo istotną rolę warunkującą skuteczność odpowiedzi na terapię celowaną w RJG odgrywa białko BRAF.
- » Mutacje w *BRAF* występują w 5% - 22% raków jelita grubego. Zidentyfikowano dotąd ponad 40 rodzajów mutacji *BRAF* występujących w 24 różnych kodonach.
- » Najczęściej (90% przypadków) identyfikowaną mutacją w RJG jest zlokalizowana w domenie kinazowej substytucja waliny w pozycji 600 kwasem glutaminowym (c.1799T>A; p.Val600Glu; nazwa zwyczajowa V600E).
- » Mutacja *BRAF* p.V600E jest obecnie czynnikiem predykcyjnym dla leczenia skojarzonego inhibitor anty-BRAF i przeciwciała monoklonalne anty-EGFR.
- » Mutacje w genach *BRAF*, *KRAS* i *NRAS* współwystępują z częstością 1-2%
- » Mutacje *BRAF* klasy III (inne niż V600E) nie są powiązane z gorszym rokowaniem, natomiast rola mutacji klasy II pozostaje niejasna.

MSI

- » Około 12-15% raków jelita grubego ma upośledzoną naprawę błędnie sparowanych zasad DNA (MMRd), która w guzie charakteryzuje się niestabilnością mikrosatelitarną (MSI).
- » Guzy z MMRd/MSI najczęściej rozwijają się w związku z epigenetyczną inaktywacją genu *MLH1* (metylacja promotora), lub w wyniku germinalnej mutacji w genie MMR (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2*), czyli związane są z zespołem Lyncha (3-5% CRC), lub częściej w związku z epigenetyczną inaktywacją genu *MLH1*.
- » CRC ze statusem MMRd/MSI mają odrębny fenotyp, który obejmuje predylekcję do proksymalnej części okrężnicy, słabe zróżnicowanie i obfity naciek limfocytarny guza.
- » Pacjenci z CRC ze statusem MMRd/MSI mają lepsze przeżycie skorygowane o stopień zaawansowania w porównaniu z guzami o statusie funkcjonalnym MMR lub stabilnymi mikrosatelitarnie (MSS) i mogą inaczej odpowiadać na chemioterapię adjuwantową opartą na 5-fluorouracylu.
- » W celu zwiększenia identyfikacji pacjentów z MMRd/MSI w praktyce klinicznej, która obejmuje osoby z zespołem Lyncha, zaleca się, aby wszystkie resekcjonowane CRC były analizowane pod kątem statusu MMR/MSI. Należy mieć na uwadze niższą czułość testu MMR (IHC) w wykrywaniu zespołu Lyncha. Około 3-10% guzów w zespole Lyncha posiada mutację, która nie powoduje zauważalnej utraty antygenu w teście immunohistochemicznym.
- » Na podstawie statusu MSI, CRC można podzielić na dwie grupy: MSI-H (o wysokiej niestabilności „-high”) oraz stabilne mikrosatelitarnie (*ang. microsatellite stable (MSS)*).

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

- » Diagnostykę molekularną genów z rodziny *RAS* i *BRAF* wykonuje się jednocześnie lub w ramach odrębnych, prowadzonych kolejno analiz: *KRAS*, *NRAS* i *BRAF*, w zależności od wskaźnika wykrywania mutacji. Jeżeli u danego pacjenta wykryto mutację w *KRAS*, wyniki dla pozostałych genów nie mają znaczenia, ponieważ możliwość wdrożenia terapii anti-EGFR u tego pacjenta została już wykluczona (Rys 4.1.)



Rys. 4.1. Algorytm diagnostyczny raka jelita grubego

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

- » Metodą z wyboru jest obecnie NGS i badanie mutacji (*KRAS*, *NRAS* i *BRAF*, fuzji z udziałem *NTRK*, *RET* i *MSI*) w jednym teście. Należy mieć na uwadze, że celowane panele NGS badające fuzje oraz warianty CNV i *MSI* wymagają wytworzenia bibliotek do sekwencjonowania w dwóch pulach z DNA i RNA, co zwiększa wymagania dotyczące objętości materiału tkankowego i może stanowić ograniczenie w przypadku drobnych biopsji.

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

NGS

- » Wielkoskalowe techniki badawcze, takie jak sekwencjonowanie następnej generacji (NGS), również mogą być wykorzystywane do diagnostyki genetycznej w analizie kwalifikacyjnej do terapii celowanej. Aktualnie dla terapii anty-EGFR w RJG wymagana jest ocena molekularna tylko trzech markerów molekularnych (*KRAS*, *NRAS* i *BRAF*), co można zbadać już przy zastosowaniu małych paneli NGS. Natomiast kompleksowe profilowanie genetyczne NGS umożliwia również ocenę MSI oraz fuzji genowych, istotnych przy kwalifikacji do terapii tkankowo agnostycznych takich jak zastosowanie inhibitorów TRK, związanych z występowaniem rearanżacji genów *NTRK1/2/3*.
- » Małe panele NGS ukierunkowane na geny fuzyjne mogą mieć zastosowanie w przerzutowym raku jelita grubego u pacjentów, dla których brak zadowalających opcji terapeutycznych. W ogólnej populacji pacjentów z rakiem jelita grubego częstość genów fuzyjnych *RET* i *NTRK1/2/3* jest niska (<1%), a ich obecność wyklucza się wzajemnie z mutacjami *RAS* i *BRAF*. W odpowiednio zawężonej populacji do raków prawostronnych jelita bez mutacji *RAS* i *BRAF* lub raków jelita z niestabilnością mikrosatelitarną (MSI-H) bez mutacji *RAS* i *BRAF* częstość genów fuzyjnych jest znacznie wyższa. Częstość wyników z fuzją *RET* lub *NTRK* w grupie MSI-H bez mutacji *RAS* i *BRAF* wynosi ponad 20%.

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

Płynna biopsja

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

4.1.8. Czas wykonania badania molekularnego

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

4.2. Czerniak

4.2.1. Epidemiologia, podział

- » Czerniak (*ang. melanoma*) stanowi około 2% wszystkich zachorowań na nowotwory w Polsce. Rocznie na świecie odnotowuje się około 150 000 nowych przypadków zachorowań na ten nowotwór.
- » Czerniak należy do nowotworów skóry, charakteryzuje się złym rokowaniem i często daje przerzuty. Wywodzi się z komórek melanocytarnych. Najczęściej mamy do czynienia z czerniakiem skóry, ale nowotwór ten może się również lokalizować w błonach śluzowych, gałce ocznej lub w innych mniej typowych obszarach.
- » Dotychczasowe klasyfikacje podtypów czerniaka uwzględniały m.in. takie cechy jak charakter wzrostu, typu komórki i lokalizacja natomiast z genetycznego punktu widzenia najistotniejsza jest najnowsza klasyfikacja histologiczna Światowej Organizacji Zdrowia WHO (*WHO classification of Skin Tumours 5th Edition 2025*). Czerniaki zostały tu podzielone na te związane etiologicznie z ekspozycją na słońce oraz te, niezależne od ekspozycji natomiast uwarunkowane profilem genetycznym, lokalizacją anatomiczną i epidemiologią.
- » Podtypy czerniaków powiązane są ze specyficznymi zmianami genetycznymi. Ocena statusów wybranych genów umożliwia właściwe różnicowanie nowotworu. W czerniakach skóry występują zmiany w genach *BRAF*, *CDKN2A*, *NRAS*, *KIT*. Procentowy rozkład mutacji w genach rutynowo oznaczanych na potrzeby diagnostyki molekularnej wynosi dla czerniaków skóry nienarażonych na długotrwałe działanie słońca: *BRAF* – 50%; *NRAS* – 20% a dla czerniaków skóry narażonych na długotrwałe działanie słońca: *BRAF* - 10%, *NRAS* - 10%, a *KIT* - 2%.
- » W przypadku czerniaków błon śluzowych zmiany dotyczą genów *SF3B1* - 22%, *KIT* - 20%, *NRAS* - 15% i *BRAF* - 5%.
- » Czerniakiakralne charakteryzują się zmianami w genach *NF1* - 14%, *KIT* - 15%, *NRAS* - 15% i *BRAF* - 15%.
- » Czerniaki wywodzące się ze znamienia błękitnego oraz narządu wzroku posiadają mutacje w genach *GNAQ* - 50%, *GNA11* - 32%, zmiany *BRAF* w tym podtypie czerniaka występują poniżej 1% przypadków.
- » Diagnostyka mutacji występujących w promotorze genu *TERT* i genu *HRAS* wykorzystywana jest w celu właściwej klasyfikacji zmian melanocytowych typu spitzoidnego ze szczególnym uwzględnieniem różnicowania z czerniakiem. W przypadku nowotworów typu spitzoidnego należy rozważyć poszukiwanie fuzji genowych z udziałem genów *NTRK1* lub *NTRK3*.

4.2.2. Badane markery

- » Najwyższy odsetek wariantów patogennych występuje w czerniakach w genie *BRAF* (27-70%). Zidentyfikowano ponad 40 rodzajów wariantów typu zmiany sensu występujących w 24 różnych kodonach. Większość z nich jest wyjątkowo rzadka (0,1% - 2%).
- » Najczęściej występującą mutacją jest substytucja reszty waliny na resztę kwasu glutaminowego o kodonie 600 (p.Val600Glu). Ten rodzaj mutacji dominuje w czerniaku i stanowi około 90%. W wyniku tej mutacji białko ulega aktywacji, co powoduje aktywację ścieżki

RAS/MAPK. W efekcie, jak wykazano w badaniach aktywności kinazy BRAF *in vitro*, białko z wariantem p.Val600Glu jest ponad 500 razy bardziej aktywne od postaci prawidłowej.

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

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

- » Warianty patogenne genu *BRAF* występują na wczesnych etapach transformacji nowotworowej i same w sobie nie są zdolne do inicjacji procesu nowotworowego.
- » W ramach rutynowej diagnostyki zmian melanocytarnych w najbliższym czasie niezbędne będzie wdrażanie badań z wykorzystaniem metody aCGH (*ang. array comparative genomic hybridization*). Badanie będzie umożliwiało ocenę markerów zawartych w aktualnej klasyfikacji WHO m.in. delecje genu *CDKN2A/B*, *TERT*, amplifikacje genu *CCND1*, *MDM2*, *CDK4* jak również możliwość oceny zmian na chromosomach.

Tabela 4.3. Molekularne ścieżki czerniaka

Typ czerniaka / pathway (WHO)	Molekularne ścieżki	Zmiany wtórne / progresja
Low-CSD melanoma (SSM)	● <i>BRAF</i> p.V600E ● <i>NRAS</i>	○ <i>TERT</i> ● <i>CDKN2A</i> ● <i>TP53</i> ● <i>PTEN</i>
BAP1-inactivated (BIM)*	● <i>BRAF</i> lub ● <i>NRAS</i> ● <i>BAP1</i>	○ <i>TERT</i>
WNT-activated DPMN*	● <i>BRAF</i> ● <i>MAP2K1</i> ● <i>NRAS</i> ● <i>CTNNB1</i> ● <i>APC</i>	○ <i>TERT</i> ● <i>CDKN2A</i> ● <i>TP53</i>
PEM melanoma	● <i>BRAF</i> ● <i>PRKAR1A</i>	○ <i>TERT</i>
High-CSD melanoma (LMM)	● <i>NRAS</i> ● <i>BRAF</i> (non-V600E) ● <i>KIT</i> ● <i>NF1</i>	○ <i>TERT</i> ● <i>CDKN2A</i> ● <i>TP53</i> ● <i>PTEN</i> ● <i>RAC1</i>
Desmoplastic melanoma	● <i>NF1</i>	● <i>ERBB2</i> ● <i>MAP2K1</i> ● <i>MAP3K1</i> ● <i>EGFR</i> ● <i>MET</i> ○ <i>TERT</i>
Spitz pathway / Spitz melanoma	● <i>HRAS</i> ● <i>ALK</i> ● <i>ROS1</i> ● <i>RET</i> ● <i>NTRK1</i> ● <i>NTRK3</i> ● <i>BRAF</i> ● <i>MAP3K8</i>	○ <i>TERT</i> ● <i>CDKN2A</i>
Acrall lentiginous melanoma	● <i>KIT</i> ● <i>NRAS</i> ● <i>BRAF</i> ● <i>HRAS</i> ● <i>KRAS</i> ● <i>ALK</i> ● <i>NTRK3</i>	● <i>NF1</i> ● <i>SPRED1</i> ● <i>CDKN2A</i> ○ <i>TERT</i>
Mucosal melanoma	● <i>KIT</i> ● <i>NRAS</i> ● <i>KRAS</i> ● <i>BRAF</i>	● <i>CCND1</i> ● <i>CDK4</i> ● <i>MDM2</i> ● <i>SF3B1</i> ● <i>NF1</i> ● <i>SPRED1</i> ● <i>ATRX</i> ○ <i>TERT</i>
Melanoma in congenital naevus (CN)	● <i>NRAS</i> ● <i>BRAF</i> p.V600E (małe zmiany)	○ <i>TERT</i>

* 5 th edycja klasyfikuje jako melanocytoma

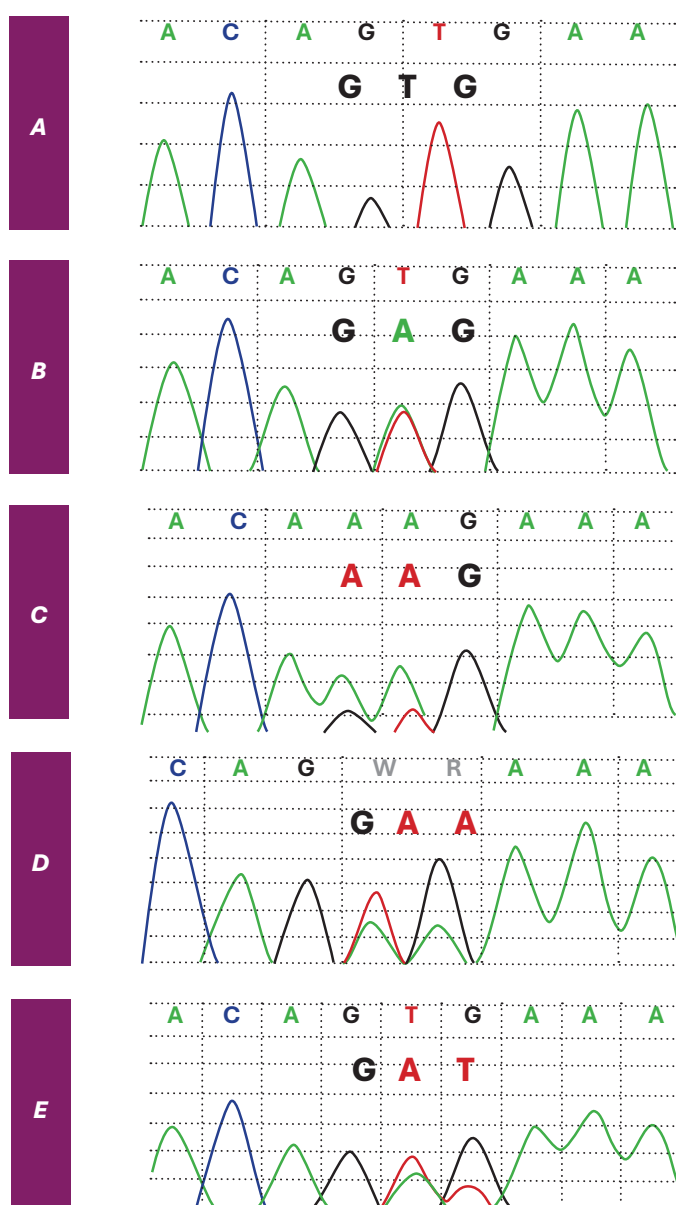
Legenda ● mutacje aktywujące (*gain-of-function*) ● fuzje / rearanżacje ○ mutacje promotora
● utrata funkcji (*loss-of-function*) ● amplifikacje

4.2.3. Materiał

- » Podstawowym materiałem do badań genetycznych w czerniaku jest bloczek parafinowy. Po kwalifikacji materiału przez patomorfologa, laboratorium na bazie preparatu HE, wyodrębnia z preparatu komórki nowotworowe stosując proces mikro- lub makrodysekcji. W przypadku dużych fragmentów wystarczą z reguły 2-3 skrawki, a w przypadku małych wycinków (o średnicy 2-3 mm) minimum 10.
- » Konieczny podkreślenia jest również fakt, iż preparat wybarwiony HE do oceny zawartości procentowej nowotworu musi być wykonany bezpośrednio przed preparatem do analizy molekularnej.
- » Przyjmuje się, że do uzyskania wiarygodnego wyniku, analizowany preparat powinien zawierać nie mniej niż 20% tkanki nowotworowej. W wyjątkowych przypadkach dopuszcza się stosowanie preparatów zawierających mniejsze utkanie nowotworowe, jednak w takich sytuacjach niezbędne jest użycie metody analitycznej o podwyższonej czułości opartej o technologię qPCR lub ddPCR lub NGS.
- » Wybierając metodę należy zwrócić uwagę na następujące parametry: dostępność technologii oraz wymaganego do niej sprzętu, czułość i specyficzność metody, czas niezbędny na przeprowadzenie kompletnej analizy, zakres otrzymywanych wyników.

4.2.4. Metody

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



Rys. 4.2. Fluorogramy uzyskane w reakcji sekwencjonowania bezpośredniego metodą Sangera przedstawiające warianty mutacji w kodonie 600 genu *BRAF*

A – postać prawidłowa kodonu 600 (GTG); B – wariant *p.(Val600Glu)*, c. 1799T>A, (GAG); C – wariant *p.(Val600Lys)*, c. 1798_1799delinsAA, (AAG); D – wariant *p.(Val600Glu)*, c. 1799_1800delinsAA, (GAA); E – wariant *p.(Val600Asp)*, c. c. 1799_1800delinsAT, (GAT).

Metody oparte o technikę qPCR

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

Zastosowanie ctDNA jako alternatywnej metody analizy genu *BRAF*

- » W przypadku biopsji tkanek tylko część potencjalnie złośliwego guza jest pobierana do celów diagnostycznych i charakterystyki molekularnej. Obserwowany profil mutacji będzie w konsekwencji odzwierciedlać tylko ograniczony fragment dostarczony w zebranym materiale. Natomiast profilowanie genetyczne z wykorzystaniem ctDNA może

odzwierciedlać całkowity profil mutacji całej masy guza, w tym nowych subklonów odpowiedzialnych za przerzuty. Stąd też w płynnej biopsji możliwe jest wykrycie mutacji, która nie jest obecna w pierwotnej biopsji tkanki.

- » Analiza ctDNA wykonywana jest z wykorzystaniem wysokoczułych testów opartych na qPCR lub PCR emulsyjnym (*ang. droplet digital PCR, ddPCR*) i sekwencjonowania następnej generacji (NGS). W przypadku wykonywania badań na ctDNA zastosowany test musi mieć walidację na ten rodzaj materiału i charakteryzować się czułością poniżej 1%. Sekwencjonowanie bezpośrednie metodą Sangera nie znajduje tu zastosowania ze względu na zbyt niski stopień czułości (około 20%), chociaż w niektórych przypadkach również ta technika umożliwia identyfikację mutacji z płynnej biopsji.

NGS

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

4.2.5. Czas wykonania badania

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

4.3. Rak jajnika

4.3.1. Epidemiologia, etiologia

- » W 2023 r. wśród najczęściej rejestrowanych nowotworów u kobiet, rak jajnika (*ang. ovarian cancer*) znajdował się na 6 miejscu (3,7%) oraz 5 miejscu wśród odsetka zgonów z powodu chorób nowotworowych (5,4%).
- » W Polsce w 2023 roku zdiagnozowano 3525 przypadków zachorowania na raka jajnika, i odnotowano 2520 zgonów.
- » Szczyt zachorowań przypada w okresie pomenopauzalnym (między 60, a 69 r. ż.).
- » 5-letnie przeżycie waha się między 30- 50%. W około 70% tych nowotworów choroba wykrywana jest w zaawansowanym stadium.

4.3.2. Predyspozycje dziedziczne

- » Szacuje się, że silne dziedziczne predyspozycje mają wpływ na rozwój ok. 20% nowotworów złośliwych jajnika.
- » Najczęściej przyczyną dziedzicznego podłoża nowotworów złośliwych jajnika, są warianty patogenne genów *BRCA1* i *BRCA2*, stanowiące 70-80% przyczyn dziedzicznych, co odpowiada 10-18% kolejno rozpoznawanych zachorowań.
- » Drugą przyczyną dziedzicznej predyspozycji w nowotworach złośliwych jajnika są geny odpowiedzialne za zespół Lyncha: *MSH2*, *MSH6*, *MLH1*, *PMS2*, *EPCAM*. Łącznie odpowiadają za 10-15% przypadków dziedzicznych co stanowi do 3% kolejnych zachorowań.
- » W zespole Lyncha obserwuje się zwykle inne raki jajnika aniżeli surowicze.
- » Do rzadszych przyczyn dziedzicznych uwarunkowań w raku jajnika – 5-10% należą inne niż *BRCA* geny naprawy DNA: *RAD51C*, *RAD51D*, *BRIP1*, *PALB2*.
- » Każda pacjentka z rozpoznaniem nowotworem złośliwym jajnika bez względu na wiek zachorowania stopień zaawansowania i typ histologiczny powinna uzyskać poradę genetyczną.

4.3.3. Podtypy raka jajnika

- » Zgodnie z nową klasyfikacją (wg WHO 2020), na podstawie badań histopatologicznych, immunoprofilu i analizy molekularnej wyróżnia się co najmniej pięć głównych typów raka jajnika: rak surowiczy wysokiego stopnia- niskozróżnicowany (HGSC, 70%), rak endometrioidalny (EC, 10%), rak jasnokomórkowy (CCC, 6-10%), rak surowiczy niskiego stopnia – wysokozróżnicowany (LGSOC, 5%), oraz rak śluzowy (MC, 3%).
- » Ostatnie postępy w charakterystyce molekularnej guzów, skorelowane z wynikami badań histoklinicznych i molekularnych raków jajnika, ujawniły, że nabłonkowy rak jajnika można podzielić na dwie odrębne grupy określane jako raki typu I i typu II.
- » Typ I –stanowi 25% raków jajnika. Typ ten stanowią LGSOC, raki endometrioidalne, raki śluzowe i raki jasnokomórkowe, wywodzące się z nabłonka jajnika. Raki jajnika Typu I wykazują obecność mutacji *BRAF* i *KRAS* w ok. 65% przypadków. Obecne są także mutacje innych genów (*HER2*, *PIK3CA*, *PTEN*). Raki jajnika Typu I charakteryzują się relatywnie lepszym rokowaniem i wolnym wzrostem, a 5-letnie przeżycie wynosi ok 55%.

- » Typ II –stanowi 75% raków jajnika. Zaliczamy tutaj HGSOC, raka niezróżnicowanego i mięsakoraka. Wywodzą się najprawdopodobniej z dystalnego lub strzępkowego odcinka jajowodu. Charakteryzują się mutacjami w genach *TP53* (ok 90%) i *BRCA1/2* (ok 25%). Raki typu II są zwykle wykrywane w zaawansowanym stadium choroby często już z obecnością przerzutów, a 5-letnie przeżycie nie przekracza 30%.

Tabela 4.4. Molekularna i histokliniczna klasyfikacja raków jajnika

	Rak surowiczy wysokiego stopnia-niskozróżnicowany	Rak surowiczy niskiego stopnia –wysokozróżnicowany	Rak endometrioidalny	Rak jasnokomórkowy	Rak śluzowy
Częstość występowania (%)	70%	<5%	10%	6-10%	3-4%
Pochodzenie	*Głównie jajowód	Endosalpingioza/jajowód	Endometrioza	Endometrioza	Potworniak/Nieznane
Zmiana prekursorowa	Śródnabłonkowy rak surowiczy (STIC – serous tubal intraepithelial carcinoma)	Surowiczy guz o granicznej złośliwości (Serous borderline tumor)	Atypowa endometrioza, endometrioidny guz o granicznej złośliwości (Atypical endometriosis; endometrioid borderline tumor)	Atypowa endometrioza, jasnokomórkowy guz o granicznej złośliwości (Atypical endometriosis; clear cell borderline tumor)	Śluzowy guz o granicznej złośliwości (Mucinous borderline tumor)
Najczęstsze korelacje z zespołami dziedzicznej predyspozycji do nowotworu	dziedziczna predyspozycja do raka piersi i jajnika, powodowana przez warianty patogenne genów <i>BRCA1/2</i> (HBOC)	-	Zespół Lyncha	Zespół Lyncha	-
Warianty (mutacje) somatyczne wykrywane w komórkach nowotworowych	<i>TP53</i> <i>BRCA1/2</i> HRD Aberracje chromosomowe	<i>KRAS</i> <i>NRAS</i> <i>BRAF</i> <i>HER2</i>	<i>CTNNB1</i> <i>PIK3CA</i> <i>PTEN</i> <i>KRAS</i> <i>ARID1A</i> MSI <i>POLE</i> <i>TP53</i>	<i>ARID1A</i> <i>PIK3CA</i> <i>PTEN</i> MSI	<i>CDKN2A</i> utrata liczby kopii <i>KRAS</i> <i>HER2</i> amplifikacja <i>TP53</i>

*70-90% z jajowodu, 5-10% z otrzewnej i ok 5% z powierzchni jajnika

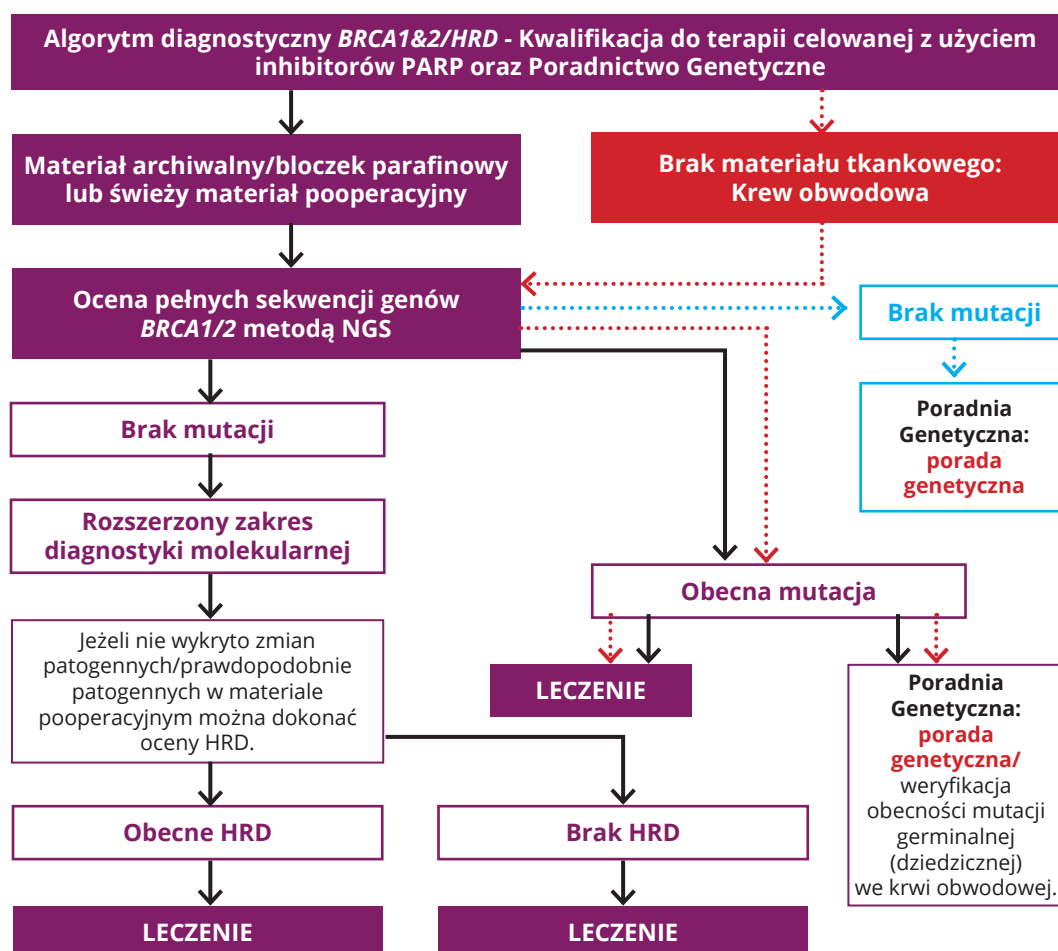
4.3.4. Badane genetyczne markery predykcyjne

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

4.3.5. Algorytm diagnostyczny

- » Identyfikacja wariantów genetycznych kwalifikowanych jako patogenne lub prawdopodobnie patogenne w genach *BRCA1/ BRCA2* oraz zaburzeń homologicznej rekombinacji (*ang. Homologous recombination deficiency, HRD*) jest markerem predykcyjnym dla zastosowania leczenia z wykorzystaniem PARPi.

- » W tym celu konieczne jest odpowiednie zabezpieczenie materiału pooperacyjnego pochodzącego z tkanki nowotworowej. W tego rodzaju materiale identyfikuje się zarówno zmiany germinalne jak i somatyczne.
- » Identyfikacja wariantu patogennego lub prawdopodobnie patogennego w komórkach nowotworowych guza wymaga skierowania pacjentki do poradni genetycznej w celu zlecenia badania genetycznego oceniającego genezę zmiany (germinalna/somatyczna). W tym celu konieczne jest pobranie krwi obwodowej oraz izolacja DNA z leukocytów (Uwaga! Jeżeli pacjentka miała przetaczaną krew pełną badanie należy wykonać ze śliny lub z wymazu z policzka). Jeżeli zmiana patogenna lub prawdopodobnie patogenna zostanie potwierdzona jako germinalna ze skutkiem konstytucyjnym, pacjentka wraz z rodziną powinna zostać objęta opieką genetyka klinicznego w celu przeprowadzenia diagnostyki kaskadowej i określenia nosicielstwa wariantu patogennego markerowego w rodzinie).
- » Również w przypadku uzyskania wyniku niediagnostycznego z materiału tkankowego lub jego braku, należy pobrać krew i zlecić wykonanie badania *BRCA1/2* metodą NGS oraz ocenę dużych rearanżacji metodą MLPA. W przypadku wykrycia mutacji pacjentka powinna zostać skierowana do poradni genetycznej w celu oceny ryzyka i zlecenia badania genetycznego z krwi obwodowej u krewnych chorej. Na rycinie 4.3. przedstawiono schemat postępowania diagnostycznego w zakresie badań genetycznych w raku jajnika.



Rys. 4.3. Algorytm diagnostyki molekularnej raka jajnika

4.3.6. Materiał

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

4.3.7. Czas wykonania badania

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

4.4. Rak endometrium

4.4.1. Epidemiologia, etiologia

- » Dla raka endometrium (*ang. endometrial cancer*) w Polsce w 2023 roku zdiagnozowano 6519 przypadków oraz odnotowano 1803 zgony.
- » Szczyt zachorowań przypada w okresie okołomenopauzalnym (55 a 64 r.ż.).
- » 5-letnie względne przeżycie wynosi 81% dla europejskich kobiet (EUROCORE-6, 2025 r.) wahając się od 77% w Europie wschodniej do 84% w Europie północnej.
- » Oprócz czynników środowiskowych jak czynniki reprodukcyjne i nadwaga, predyspozycje genetyczne są coraz częściej uznawane za główny czynnik ryzyka zachorowania na raka endometrium.

4.4.2. Predyspozycje dziedziczne do raka endometrium

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

4.4.3. Typy histologiczne

- » Rak trzonu rozwija się z w tkance wyściełającej jamę macicy (endometrium). Wyróżniamy następujące najczęstsze podtypy histologiczne:
 - a. 80-90% - rak endometrioidalny
 - b. 5-10% - rak surowiczy

- c. 1-2% - rak jasnokomórkowy
 - d. 1-2% - gruczolakorak mieszanokomórkowy
 - e. 1% - mięsaki.
- » MMRd jest powszechny w guzach endometrioidalnych, natomiast niedobór naprawy rekombinacji homologicznej (*ang. homologous recombination deficiency, HRD*) został opisany w przypadku guzów nieendometrioidalnych.

4.4.4. Podtypy molekularne

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

Tabela 4.5. Molekularne podtypy raka endometrium

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

CNlow - podtyp o niskiej liczbie kopii, NSMP - niespecyficzny profil molekularny,

- » 3-5% raków endometrium wykazuje dowolną kombinację markerów należących do poprzednich kategorii. POLEmut-p53abn, MMRd-p53abn lub POLEmut-MMRd-p53abn. Mutacje *TP53* w ultra- lub hipermutowanych guzach nie są związane z gorszym rokowaniem obserwowanym w rakach endometrium z mutacjami tylko *TP53* i dlatego są uważane za mutacje pasażerskie. Aczkolwiek ostatnio opublikowane dane pokazują, że podwójnie klasyfikatory ze współistniejącą cechą p53abn rokuja lepiej niż grupa p53abn, ale gorzej niż podgrupa z samą mutacją *POLE*. W związku z tym wielokrotne klasyfikatory

trzeba interpretować indywidualnie. Istniała doskonała zgodność między ekspresją białka p53 oznaczoną metodą IHC a statusem mutacji *TP53*, jeśli wyłączono raki endometrium MMRd i POLEmut z analizy (95% zgodności). **Dlatego też, mutacja *TP53* jest tylko markerem CN-high po wykluczeniu podtypów POLEmut i MMRd.**

- » Mutacje patogenne występujące w podtypie **POLE EDM** są tylko zlokalizowane w domenie egzonukleazy (eksony 9-14).

Tabela 4.6. Patogenne mutacje w genie *POLE*

L.p.	ekson	Mutacja w białku	Mutacja w genie (cDNA)
1	9	p.Asp275Gly, D275G	c.824A>G
2	9	p.Glu277Gly, E277G	c.830A>G
3	9	p.Thr278Lys, T278K	c.833C>A
4	9	p.Thr278Met, T278M	c.833C>T
5	9	p.Pro286Ala, P286A	c.856C>G
6	9	p.Pro286Cys, P286C	c.856_857delinsTG
7	9	p.Pro286His, P286H	c.857C>A
8	9	p.Pro286Arg, P286R	c.857C>G
9	9	p.Met295Arg, M295R	c.884T>G
10	9	p.Met295Arg, M295R	c.884_885delinsGA
11	9	p.Ser297Cys, S297C	c.890C>G
12	9	p.Ser297Phe, S297F	c.890C>T
13	11	p.Asn363Asp, N363D	c.1087A>G
14	11	p.Phe367Ile, F367I	c.1099T>A
15	11	p.Phe367Val, F367V	c.1099T>G
16	11	p.Phe367Ser, F367S	c.1100T>C
17	11	p.Phe367Cys, F367C	c.1100T>G
18	11	p.Asp368Tyr, D368Y	c.1102G>T
19	13	p.Val411Met, V411M	c.1231G>A
20	13	p.Val411Leu, V411L	c.1231G>T/C
21	13	p.Val411Ser, V411S	c.1231_1232delinsTC
22	13	p.Val411Ala, V411A	c.1232T>C
23	13	p.Leu424Ile, L424I	c.1270C>A
24	13	p.Leu424Val, L424V	c.1270C>G
25	13	p.Leu424Pro, L424P	c.1271T>C
26	13	p.Ala426Val, A426V	c.1277C>T
27	13	p.Asp435_Pro436delinsGluSer, D435_P436delinsES	c.1305_1306delinsAT
28	13	p.Pro436Ser, P436S	c.1306C>T
29	13	p.Pro436His, P436H	c.1307C>A
30	13	p.Pro436Arg, P436R	c.1307C>G
31	13	p.Met444Lys, M444K	c.1331T>A
32	13	p.Met444Arg, M444R	c.1331T>G
33	14	p.Ala456Pro, A456P	c.1366G>C
34	14	p.Ala456Asp, A456D	c.1367C>A
35	14	p.Ser459Phe, S459F	c.1376C>T

L.p.	ekson	Mutacja w białku	Mutacja w genie (cDNA)
36	14	p.Ser461Lys, S461K	c.1381_1382delinsAA
37	14	p.Ser459Phe, S459F	c.1376C>T
38	14	p.Ser461Lys, S461K	c.1381_1382delinsAA
39	14	p.Ser461Pro, S461P	c.1381T>C
40	14	p.Ser461Leu, S461L	c.1382C>T
41	14	p.Ala463Asp, A463D	c.1388C>A

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

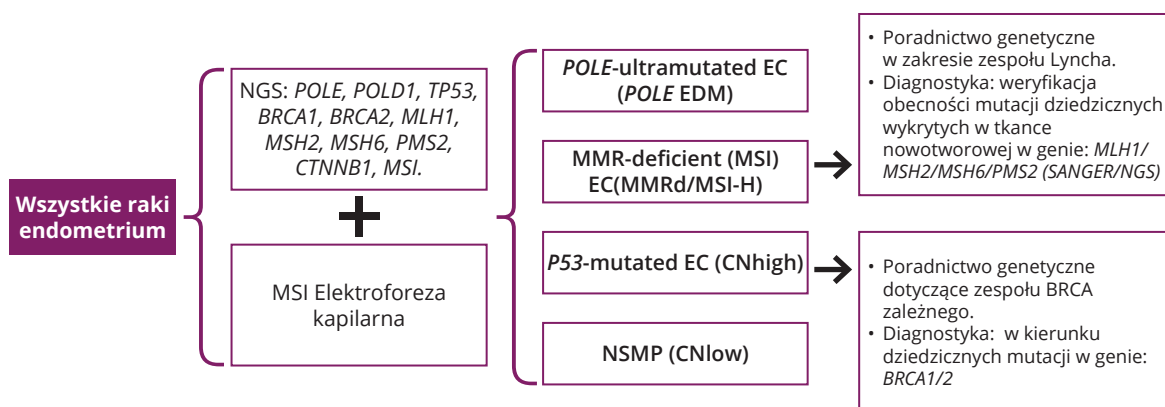
4.4.5. Badane markery

Algorytmy diagnostyczne klasyfikacji molekularnej raka endometrium.

- » Dla wprowadzenia klasyfikacji molekularnej dla rutynowej diagnostyki raka endometrium potrzeba było oceny prostych biomarkerów odzwierciedlających podtypy molekularne.
- » Kompleksowy algorytm jest obecnie metodą z wyboru który ocenia następujące geny metodą NGS (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2*, *TP53*, *POLE*, *POLD1*, *BRCA1*, *BRCA2*, *CTNNB1* (ekson 3), MSI).
- » Analiza występowania mutacji w części genu *POLE* kodującego domenę egzonukleazy oraz ocena IHC obecności MMRd (ocena ekspresji czterech białek: *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2*) lub ocena molekularna MSI i ekspresji p53 (Tabela 4.6.) jest określana jako minimalny pakiet diagnostyczny (PROMISE).
- » Słabą stroną techniki IHC są wyniki fałszywie pozytywne związane z niejednorodnym utrwaleniem materiału. Należy mieć na uwadze niższą czułość testu MMR (IHC) w wykrywaniu zespołu Lyncha. Około 3-10% guzów w zespole Lyncha posiada mutację, która nie powoduje zauważalnej utraty antygenu w teście immunohistochemicznym.
- » W przypadku niejednoznacznych wyników ekspresji metodą IHC, koniecznie należy wykonać analizę MSI z wykorzystaniem testu molekularnego. Zgodność pomiędzy wynikiem badania genetycznego i immunohistochemicznego sięga według niektórych autorów 98%.
- » Istnieją również doniesienia, że zgodność w ocenie pomiędzy metodami MSI a IHC jest na tyle niska, że zaleca się stosownie obu metodologii dla optymalnej stratyfikacji pacjentów.
- » Badanie molekularne sekwencji mikrosatelitarnych jest badaniem do wykrywania MSI jako bezpośredniego dowodu na obecność MMRd w danym nowotworze (złoty standard).
- » Najbardziej kompleksową metodą oceny MSI jest NGS. Jego główną zaletą jest możliwość sprzężenia analizy MSI z określeniem obciążenia mutacyjnego guza (*ang. tumour mutational burden, TMB*). Obecnie wadą tej metody jest konieczność zastosowania dużych paneli (500 genów), co jest związane z dużym kosztem badania oraz jest czasochłonne.

Kompleksowy algorytm diagnostyki raka endometrium

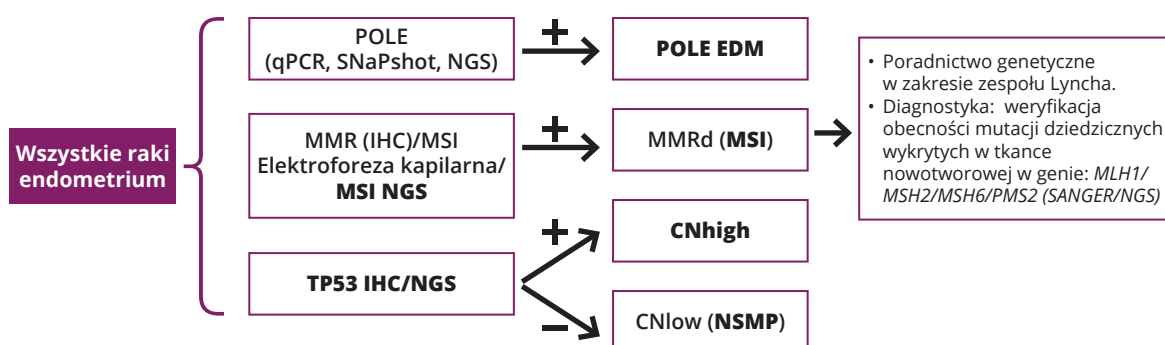
- » Kompleksowym algorytmem jest wykonywanie sekwencjonowania panelowego metodą NGS zarówno dla MSI jak i dla genów: *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2*, *TP53*, *POLE*, *POLD1*, *BRCA1*, *BRCA2*, *CTNNB1* (ekson 3).



Rys. 4.4. Kompleksowy algorytm diagnostyki raka endometrium

- » W przypadku algorytmu kompleksowego wykonuje się badanie NGS oraz PCR-MSI jeśli nie jest możliwa ocena MSI metodą NGS.
- » Zastosowanie tego algorytmu pozwala zaklasyfikować pacjentkę do typu molekularnego oraz umożliwia wytypowanie pacjentek do dalszej diagnostyki w kierunku dziedzicznych predyspozycji do nowotworów jak zespół Lyncha oraz zespoły związane z mutacjami w genach *BRCA1/2*.

Minimalny algorytm diagnostyki raka endometrium



Rys. 4.5. Minimalny algorytm diagnostyki raka endometrium (PROMISE)

- » Ocenę występowania mutacji w *POLE* w domenie egzonukleazy można wykonywać metodą sekwencjonowania Sangera, qPCR, SNaPshot lub NGS.
- » Analiza mutacji w *POLE* z wykorzystaniem metody Sangera, qPCR oraz SNaPshot w przypadku materiału o zawartości komórek nowotworowych poniżej 20% i uzyskania wyniku „brak mutacji” powinna być opatrzona komentarzem o możliwości uzyskania wyniku fałszywie negatywnego i zalecenia powtórzenia wykonania badania z wykorzystaniem czulszej metody w postaci NGS.

- » Ocenę IHC ekspresji białek MMR (MLH1, MSH2, MSH6, PMS2) oraz p53 wykonuje patomorfolog.
- » Wadą zastosowania tego algorytmu jest duża liczba pacjentów z podejrzeniem zespołu Lyncha (MMRd) na poziomie około 25%, którzy wymagają weryfikacji w późniejszych etapach leczenia, zwłaszcza, że występowanie zespołu Lyncha w rakach endometrium jest na poziomie 2-3%.

4.4.6. Materiał

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

4.4.7. Metody

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

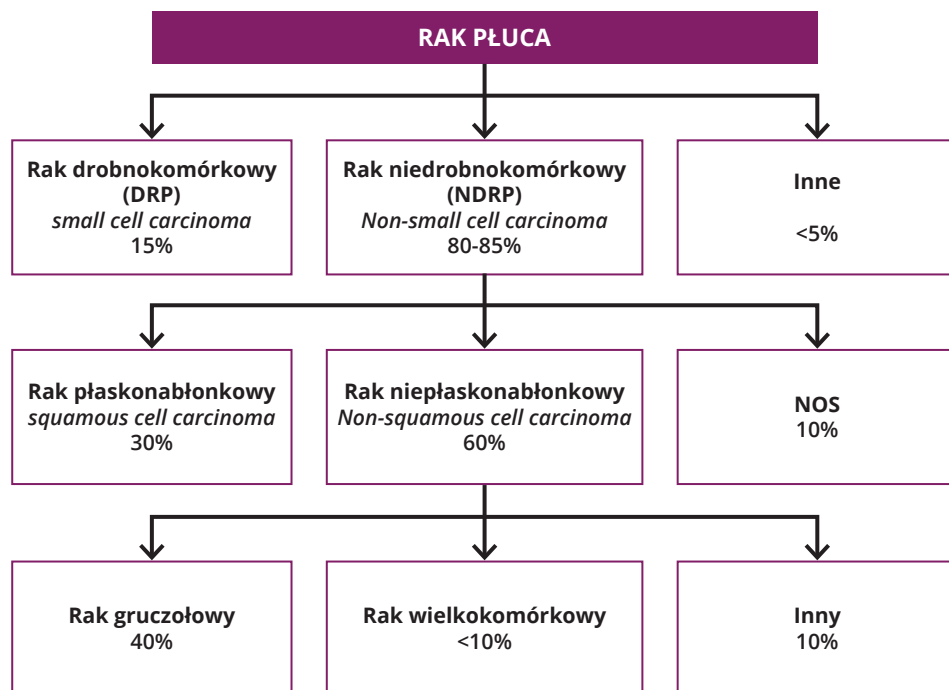
4.4.8. Czas wykonania badania molekularnego

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

4.5. Rak płuca

4.5.1. Epidemiologia

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



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

4.5.2. Biomarkery

Tabela 4.7. Biomarkery predykcyjne w niedrobnokomórkowym raku płuca

Nowotwór	Biomarker	Leki
Niedrobnokomórkowy rak płuca	mutacje <i>EGFR</i>	TKI (I, II, III generacja)
	rearanżacje <i>ALK</i>	TKI (I, II, III generacja)
	rearanżacje <i>ROS1</i>	TKI
	<i>BRAF V600</i>	inhibitor kinazy serynowo-treoninowej BRAF
	<i>MET</i>	TKI
	rearanżacje <i>RET</i>	TKI
	rearanżacje <i>NTRK</i>	TKI
	<i>KRAS p.Gly12Cys (G12C)</i>	inhibitor GTPazy KRAS
	<i>EGFR</i> insercje w eksonie 20	Przeciwciała monoklonalne
	<i>NRG1</i>	Przeciwciała monoklonalne anty HER2/HER3
	Negatywny wynik <i>EGFR</i> , <i>ALK</i> , <i>ROS1</i> , <i>RET</i>	Przeciwciała monoklonalne anty PD-1/PD-L1

4.5.2.1. *EGFR*

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

4.5.2.2. Rearanżacje *ALK*

- » Kinaza chłoniaka anaplastycznego - to gen kodujący receptorową kinazę tyrozynową, należącą do rodziny receptora insulinowego. Rearanżacje genu *ALK* mogą występować w różnych typach nowotworów i prowadzić do konstytutywnie aktywnej kinazy tyrozynowej o potencjale onkogennym. Najczęstszą rearanżacją jest mała inwersja w krótkim ramieniu chromosomu 2 powodująca fuzję pomiędzy częścią 5' genu *EML4*, a częścią 3' genu *ALK*. Inne geny, z którymi *ALK* może tworzyć fuzje to: *KIF5B*, *TFG*, *KLC1*.
- » Liczne badania wykazały wrażliwość komórek nowotworowych z potwierdzonymi rearanżacjami genu *ALK* na działanie inhibitorów kinazy tyrozynowej *ALK*. Rearanżacje genu *ALK* występują w 2-7% NDRP. Pacjenci z tymi rearanżacjami są zwykle młodszy,

niepalący i mają typ histologiczny gruczolakoraka. Współistnienie rearanżacji genu *ALK* z mutacjami *EGFR* lub *KRAS* jest rzadko wykazywane, co potwierdza, że *ALK* jest odrębnym czynnikiem onkogennym.

4.5.2.3. Rearanżacje ***ROS1***

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

4.5.2.4. Rearanżacje ***RET***

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

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

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

4.5.2.6. ***MET***

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

4.5.2.7. **BRAF**

- » Szlak kinaz RAS–RAF–MEK–ERK–MAP pośredniczy w odpowiedzi komórek na sygnały mitogenne. BRAF jest wewnątrzkomórkową kinazą sygnalizacyjną w szlaku kinaz białkowych aktywowanych mitogenami (MAPK).
- » Najczęstszą nieprawidłowością genetyczną obserwowaną w genie *BRAF* jest substytucja c.1799T>A (p.Val600Glu). Obserwowane są również inne warianty zmian w kodonie 600 genu *BRAF*, takie jak np. p.Val600Lys, p.Val600Arg, p.Val600Met oraz zmiany w innych kodonach, które występują niezmiernie rzadko.
- » U chorych z mutacją p.Val600 skuteczne okazały się inhibitory BRAF i MEK.
- » Mutacje *BRAF* (zwykle p.Val600Glu (nazwa zwyczajowa V600E) występują u 3% pacjentów z gruczolakorakiem płuc, zazwyczaj u obecnych lub byłych palaczy. Częstość występowania mutacji *BRAF* innych niż p.Val600Glu jest wyższa w raku płuca niż w czerniaku.

4.5.2.8. **KRAS**

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

4.5.2.9. Fuzje **NRG1**

- » Neuregulina, kodowana przez gen *NRG1*, jest czynnikiem wzrostu i ligandem receptorów ErbB3 i ErbB4. Fuzje genu *NRG1* (neuregulina 1) pełnią rolę silnego onkogenu i prowadzą do nadekspresji białka sygnalizacyjnego.
- » Fuzje *NRG1* występują rzadko w ogólnej populacji pacjentów z niedrobnokomórkowym rakiem płuca (<1% pacjentów), głównie w inwazyjnym gruczolakoraku śluzowym i pacjentów z negatywnym wywiadem nikotynowym.
- » Fuzje *NRG1* występują w wielu wariantach z różnymi partnerami fuzyjnymi, są to m.in.: *CD74::NRG1*, *SDC4::NRG1*, *ATP1B1::NRG1*, *SLC3A2::NRG1*, *CD99::NRG1*.

4.5.2.10. Fuzje **NUTM1**- czynnik prognostyczny w raku płuca

- » Raki płuca z fuzją *NUTM1* są rzadkie (<1%) jednak ze względu na agresywny przebieg kliniczny klasyfikowane są jako odrębna jednostka chorobowa NUT-carcinoma (ICD-O 8023/3).

- » Obecność fuzji *NUTM1* jest niekorzystnym czynnikiem prognostycznym związanym z dużą dynamiką choroby wymagającą agresywnego leczenia.
- » Fuzje *NUTM1* z genami *BRD* (*BRD4::NUTM1* i *BRD3::NUTM1*) stanowią około 80% wariantów fuzyjnych. Inne geny uczestniczące w fuzjach z *NUTM1* to *NSD3*, *ZNF532*, *ZNF592*.
- » W diagnostyce fuzji *NUTM1* stosuje się przede wszystkim panele NGS ukierunkowane na wykrywanie genów fuzyjnych lub szerokie profilowanie genomowe (CGP).

4.5.2.11. Rola nowych biomarkerów genetycznych (*STK11*, *KEAP1*, *KRAS*) w przewidywaniu odpowiedzi na immunoterapię w zaawansowanym NDRP

Dynamiczny rozwój immunoterapii, zwłaszcza inhibitorów punktów kontrolnych układu immunologicznego, takich jak przeciwciała anty-PD-L1, istotnie zmienił standard leczenia zaawansowanego niedrobnokomórkowego raka płuca (NDRP). Mimo to odpowiedź na leczenie jest zróżnicowana, a klasyczne biomarkery predykcyjne – ekspresja PD-L1 oraz obciążenie mutacyjne guza (TMB) – nie w pełni odzwierciedlają złożoność interakcji między guzem a mikrośrodowiskiem immunologicznym. W ostatnich latach rosnące znaczenie przypisuje się dodatkowym biomarkerom molekularnym, w szczególności mutacjom w genach *STK11*, *KEAP1* oraz *KRAS*, które mogą wpływać na skuteczność immunoterapii i rokowanie chorych.

STK11 (LKB1)

- » Gen ***STK11*** (znany również jako *LKB1*) koduje kinazę serynowo-treoninową zaangażowaną w regulację metabolizmu komórkowego, polaryzacji komórek oraz odpowiedzi na stres energetyczny. Mutacje w *STK11* występują u około 15–25% pacjentów z gruczolakorakiem płuca i często współwystępują z mutacjami w genie *KRAS*. Zaburzenia funkcji *STK11* są związane z tzw. „zimnym immunologicznie” fenotypem guza – niską infiltracją limfocytów T, obniżoną ekspresją genów odpowiedzi interferonowej oraz zmniejszoną ekspresją PD-L1. W licznych analizach retrospektywnych wykazano, że obecność mutacji *STK11* koreluje z gorszą odpowiedzią na inhibitory PD-L1 oraz krótszym czasem przeżycia całkowitego u pacjentów leczonych immunoterapią. Tym samym *STK11* uznawany jest za potencjalny negatywny biomarker predykcyjny skuteczności immunoterapii w NDRP.

KEAP1

- » Gen *KEAP1* odgrywa kluczową rolę w regulacji szlaku NRF2, który odpowiada za odpowiedź komórki na stres oksydacyjny. Mutacje *KEAP1* prowadzą do konstytutywnej aktywacji NRF2, co sprzyja przeżyciu komórek nowotworowych, ich adaptacji metabolicznej oraz oporności na leczenie. W kontekście immunoterapii mutacje *KEAP1* są związane z agresywniejszym przebiegiem choroby, gorszym rokowaniem oraz obniżoną skutecznością inhibitorów punktów kontrolnych. Podobnie jak w przypadku *STK11*, mutacje w *KEAP1* często współistnieją z mutacjami *KRAS* i mogą modulować mikrośrodowisko guza w sposób ograniczający skuteczność odpowiedzi immunologicznej. Obecność mutacji *KEAP1* bywa uznawana za czynnik prognostyczny niekorzystny, niezależnie od rodzaju zastosowanego leczenia systemowego.

KRAS/KEAP1/STK11

- » W odróżnieniu od *STK11* i *KEAP1*, sama obecność mutacji *KRAS* nie jest jednoznacznie związana z brakiem odpowiedzi na immunoterapię. W wielu analizach wykazano, że guzy z mutacją *KRAS* charakteryzują się wyższym TMB oraz większą immunogennością, co może sprzyjać skuteczności inhibitorów PD-L1. Jednak współwystępowanie mutacji *KRAS* z mutacjami *STK11* lub *KEAP1* istotnie pogarsza wyniki leczenia immunoterapią, co podkreśla znaczenie kompleksowej oceny profilu molekularnego, a nie pojedynczych zmian genetycznych.
- » Wprowadzenie swoistych inhibitorów *KRAS* (np. dla mutacji G12C) dodatkowo komplikuje algorytmy terapeutyczne i zwiększa znaczenie precyzyjnej diagnostyki genetycznej na etapie rozpoznania choroby zaawansowanej.

Znaczenie kliniczne i implikacje dla paneli NGS

- » Zgromadzone dane wskazują, że mutacje w genach *STK11*, *KEAP1* oraz *KRAS* mają istotne znaczenie prognostyczne i potencjalnie predykcyjne w kontekście immunoterapii w zaawansowanym NDRP. Ich obecność może identyfikować podgrupy pacjentów o gorszym rokowaniu oraz mniejszym prawdopodobieństwie uzyskania trwałej odpowiedzi na leczenie inhibitorami punktów kontrolnych. W związku z tym zasadne jest, aby geny te były rutynowo uwzględniane w rozszerzonych panelach sekwencjonowania następnej generacji (NGS) stosowanych w diagnostyce zaawansowanego niedrobnokomórkowego raka płuca. Kompleksowa analiza molekularna pozwala nie tylko na identyfikację zmian kwalifikujących do terapii celowanych, ale również na lepszą stratyfikację pacjentów pod kątem immunoterapii oraz planowanie optymalnej strategii leczenia (monoterapia vs. terapia skojarzona).
- » Integracja klasycznych biomarkerów (PD-L1, TMB) z nowymi markerami genetycznymi, takimi jak *STK11*, *KEAP1* i *KRAS*, stanowi krok w kierunku bardziej precyzyjnej i spersonalizowanej terapii zaawansowanego NDRP.

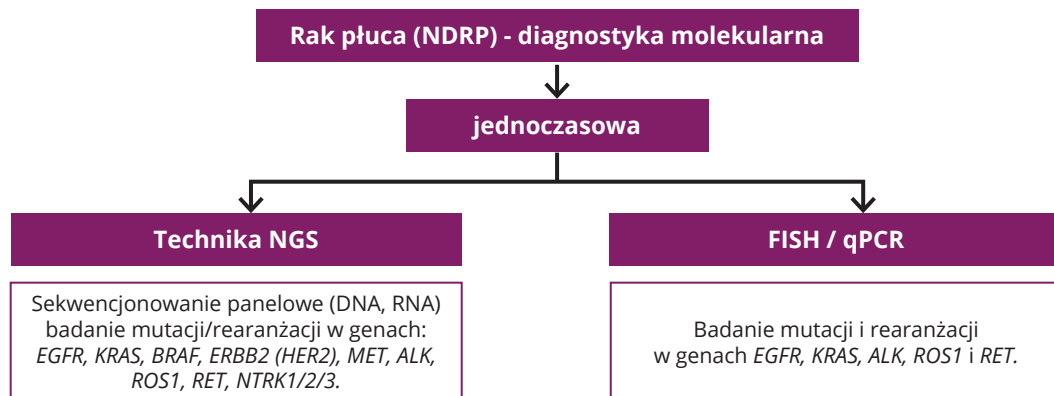
4.5.3. Ścieżki diagnostyczne

- » Ze względu na systematycznie wzrastającą liczbę markerów, obecnie konieczną do oceny metodą diagnostyki raka płuca z wyboru jest sekwencjonowanie NGS. W przypadku braku dostępu do sekwencjonowania NGS lub ograniczeń związanych z ilością lub jakością materiału tkankowego laboratorium prowadzi diagnostykę w oparciu o kombinacje metod qPCR oraz FISH. Wybór panelu NGS i badanych biomarkerów jest zależny od aktualnych programów lekowych w Polsce. Sugeruje się wybieranie paneli o jak najszerszym zakresie badanych genów, preferuje się analizę wszystkich w/w genów, obowiązkowo tych które są w aktualnych programach lekowych.

Diagnostyka genetyczna umożliwia 2 ścieżki diagnostyczne wykorzystujące tylko NGS lub NGS wspomagany qPCR i/lub FISH (Rys. 4.7.).

- » Jednoczasowy NGS z obydwu kwasów nukleinowych (DNA/RNA)
 - Wszystkie markery predykcyjne badane są w tym samym czasie z użyciem technologii – NGS, która może analizować obydwa kwasy nukleinowe. W przypadku panelu genów do oceny zmian somatycznych w raku płuca zaleca się izolację DNA i RNA

z tego samego materiału i przygotowanie biblioteki NGS z DNA i RNA → cDNA wraz z jednoczasowym sekwencjonowaniem obydwu bibliotek NGS. Zaletą jednoczasowego sekwencjonowania bibliotek wykonanych z DNA i RNA/cDNA z komórek nowotworowych raka płuca jest możliwość jednoczasowego badania z jednej porcji materiału wielu klas mutacji *EGFR*, *KRAS*, *BRAF*, *ERBB2 (HER2)*, *MET* w tym fuzji genowych: *ALK*, *ROS1*, *RET*, *NTRK1/2/3*, *HER2*, *MET*, *NRG1*. Jednoczasowy NGS i badanie FISH z tego samego materiału, jeżeli jest to możliwe. Wszystkie markery predykcyjne badane są w tym samym czasie z wykorzystaniem różnych technik takich jak: qPCR, FISH – w zależności od materiału, dostępności technologii, aparatury i kompetencji zespołu badawczego. Wadą jest dostępność minimum 50 komórek nowotworowych na badanie FISH, trudności przeprowadzenia wszystkich analiz biomarkerów z materiału drobinowego czy cytologicznego. Natomiast zaletą jest możliwość przeprowadzenia badania w trybie CITO w przeciągu 2-3 dni od otrzymania materiału biologicznego, niski koszt aparatury i ich eksploatacji, niski koszt odczynników oraz mniejsza pracochłonność.



Rys. 4.7. Molekularne ścieżki diagnostyczne raka płuca

4.5.4. Metody

Sekwencjonowanie następnej generacji (NGS)

- » Panele NGS dedykowane do badania raka płuca są ukierunkowane przede wszystkim na ocenę wariantów genetycznych w postaci zmian pojedynczych nukleotydów oraz małych delecji/insercji w takich genach jak *EGFR*, *BRAF*, *KRAS*, *HER2* oraz fuzji genowych w genach *ALK*, *ROS1*, *NTRK*, *RET*, *NRG1*, czy różnych wariantów fuzyjnych lub splicingowych w genie *MET*. Zmiany oceniane mogą być na poziomie RNA i DNA. Należy podkreślić, że w przypadku identyfikacji fuzji genowych obecnie złotym standardem jest ich identyfikacja metodą NGS na poziomie RNA. Podstawowe zalety przemawiające za identyfikacją fuzji genowych metodą NGS to: wysoka czułość i specyficzność, możliwość identyfikacji wielu fuzji genowych w jednym badaniu, możliwość identyfikacji partnerów fuzyjnych oraz dokładnych miejsc pęknięć u zidentyfikowanych partnerów fuzyjnych, możliwość oceny czy fuzja zawiera się w ramce odczytu (czy jest wariant patogenny – funkcjonalny, czy niefunkcjonalny bez znaczenia klinicznego).
- » Głębokość sekwencjonowania: w przypadku zmian somatycznych badane regiony powinny być odczytane nie mniej niż 250 razy. Rekomendowane jest, aby generowane odczyty były na poziomie 500. Przy takim pokryciu przyjmuje się, że warianty zidentyfikowane na poziomie nie mniejszym niż 5% (VAF = 5%) można uznać za wiarygodne.

- » Rekomendowane jest zastosowanie testów CE-IVD. W przypadku odczynników RUO mogących generować wyniki fałszywie pozytywne dla wariantów fuzyjnych, dobrą praktyką laboratoryjną i elementem kontroli wewnętrznej laboratorium jest potwierdzanie inną metodą gdy identyfikowany jest rzadki wariant, lub nieraportowany dotąd wariant fuzyjny. Do potwierdzania takich zmian zwykle stosuje się sekwencjonowanie bezpośrednie metodą Sangera, które może weryfikować warianty na DNA lub złącza fuzyjne na cDNA.

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

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

Fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ* (FISH)

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

4.5.5. Materiał

Do badań molekularnych wykorzystuje się następujący materiał tkankowy lub komórkowy:

- bloczki parafinowe (*formalin-fixed paraffin-embedded, FFPE*),
- cytobloki,
- niebarwione preparaty histopatologiczne,
- niebarwione preparaty cytologiczne (rozmary).

Materiał biologiczny przeznaczony do badań genetycznych jest kwalifikowany przez lekarza specjalistę w dziedzinie patomorfologii. Patomorfolog dokonuje wyboru najbardziej reprezentatywnego obszaru nowotworu, określa procentowy udział utkania nowotworowego oraz wskazuje zakres materiału przeznaczonego do izolacji kwasów nukleinowych lub do dalszych analiz molekularnych. Rodzaj materiału i wymagania jakościowe zależą od techniki molekularnej:

a) Sekwencjonowanie następnej generacji (NGS)

Materiałem do badania jest DNA i/lub RNA izolowane z:

- bloczka parafinowego (FFPE),
- materiału cytologicznego (w tym cytobloku).

Wymagania jakościowe:

- » Minimalna zawartość utkania nowotworowego w analizowanym materiale: $\geq 20\%$.
- » Ilość kwasów nukleinowych wymagana do analizy (w zależności od zastosowanego zestawu diagnostycznego): około 10–200 ng.
- » Ilościową ocenę DNA/RNA należy przeprowadzać z wykorzystaniem metody fluorymetrycznej, opartej na specyficznych barwnikach wiążących kwasy nukleinowe.

b) Reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym (qPCR)

Materiał do badania stanowi:

- wycinek tkankowy w postaci bloczka parafinowego (FFPE),
- materiał cytologiczny pobrany podczas zabiegu chirurgicznego.

Wymagania jakościowe:

- » Minimalna zawartość komórek nowotworowych w materiale przeznaczonym do analizy: $\geq 5\%$.
- » W przypadku testów wykorzystujących RNA jeżeli zestaw diagnostyczny nie zawiera wewnętrznej kontroli jakości i integralności RNA/cDNA, należy przeprowadzić ocenę integralności RNA metodą elektroforezy lub inną zwalidowaną metodą.

c) Fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ* (FISH)

Materiał do badania stanowi:

- niebarwione preparaty histopatologiczne,
- niebarwione preparaty cytologiczne (rozmaży).

Wymagania jakościowe:

- » Grubość skrawków ustalana jest zgodnie z wewnętrzną procedurą walidacyjną dla metody FISH.
- » Standardowa grubość preparatu wynosi 4–6 μm .

4.5.6. Czas wykonania badania molekularnego

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

4.5.7. Rak płuca – uzupełnienie diagnostyki genetycznej o badanie ctDNA

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

Płynna biopsja ma zastosowanie w badaniach przesiewowych nowotworów, określaniu stopnia zaawansowania nowotworu, charakteryzowaniu heterogeniczności wewnątrznowotworowej, monitorowaniu progresji nowotworu i odpowiedzi na terapię w celu dobrania zindywidualizowanego leczenia. W odniesieniu do raka płuca, największe zastosowanie znajduje badanie ctDNA w zaawansowanych stadiach NDRP pozwalając na ocenę wariantów typu SNV genu *EGFR* umożliwiając zakwalifikowanie pacjenta do terapii inhibitorami kinazy tyrozynowej *EGFR* (*ang. tyrosine kinase inhibitors*, *TKIs*). Szczególnie istotne jest to w przypadku braku materiału pooperacyjnego (błoczka parafinowego) lub niediagnostycznego wyniku z tkanki. Dodatkowo płynna biopsja pozwala na ocenę wariantów genu *EGFR* predysponujących do oporności pojawiającej się w trakcie terapii ukierunkowanej w trakcie terapii inhibitorami TKI I i II generacji.

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

Zgodnie z wytycznymi NCCN z 2024r można wykonywać kompleksowe profilowane genomowe (*EGFR*, *KRAS*, *ALK*, *ROS1*, *BRAF*, *NTRK1/2/3*, *MET*, *RET*, *ERBB2*) zarówno z tkanki jak i biopsji płynnej.

Schemat opracowany w ujęciu wytycznych NCCN, ESMO, ASCO, IASLC z 2022r, wskazuje na możliwość zastosowania biopsji płynnej u pacjentów z zaawansowaną chorobą w sytuacji, gdy materiał tkankowy uległ skrojeniu lub zawiera niewystarczającą ilość materiału nowotworowego (% utkania nowotworowego) do badania. Ponadto ctDNA jako narzędzie z wyboru powinno być zastosowane u pacjentów u których doszło do progresji po zastosowaniu inhibitorów kinaz.

Każdorazowo przy uzyskaniu wyniku ujemnego wskazana jest rebiopsja z tkanki.

Opisano również rzadkie przypadki wykrycia wariantów genu *KRAS* niezwiązanych z nowotworem (klonalna hematopoeza), co sugeruje ostrożność w interpretacji tych wyników.

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

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

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

1. Pobranie krwi obwodowej w celu wykrycia wariantów genowych w ctDNA

- » Maksymalny czas od pobrania krwi powinien wynosić 0,5 godziny dla próbek z EDTA oraz do 5 dni dla dedykowanych próbek ze stabilizatorem K3EDTA.
- » Objętość pobranej krwi powinna wynosić do 10 mL.

2. Przechowywanie osocza do badania ctDNA

- » Uzyskane osocze bezkomórkowe powinno być przechowywane w temperaturze -80°C (w suchym lodzie na czas transportu), przy czym długoterminową stabilność DNA w osoczu wykazano w temperaturze -80°C.

3. Uwagi dotyczące próbek wykorzystywanych do badania oraz przechowywania ctDNA

- » Krew należy pobierać do odpowiednich próbek, aby zapobiec lizie komórek jądrazstych krwi.
- » Probówki dedykowane do pobierania materiału ctDNA w zależności od producenta mogą stabilizować ctDNA maksymalnie do 14 dni w temperaturze pokojowej (18-25°C). Doświadczenia użytkowników wskazują jednak, że im krótszy jest czas przechowywania i transportu do laboratorium tym lepsze uzyskuje się wyniki badania genetycznego. Zaleca się, aby próbkę przechowywać po pobraniu od 3 do 5 dni. W celu uzyskania najlepszej jakości i wydajności ctDNA zalecana izolacja materiału w dniu dostarczenia próbki.
- » Krew pobrana na antykoagulant (EDTA) wymaga natychmiastowego przetwarzania (oddzielenie osocza od pozostałych elementów krwi)
- » W miarę możliwości należy unikać powtarzających się cykli zamrażania i rozmrażania wyizolowanego ctDNA a już bezwarunkowo nie należy rozmrażać wielokrotnie osocza przed wykonaniem izolacji cfDNA.

4.6. Nowotwory wieku dziecięcego

- » W skali kraju każdego roku diagnozowanych jest około 1000-1200 dzieci z nowotworami litymi.
- » Profil zmian molekularnych występujących w nowotworach wieku dziecięcego w istotny sposób różni się od profilu zmian obserwowanych w nowotworach diagnozowanych u dorosłych. Stąd bezpośrednia ekstrapolacja wiedzy i doświadczenia w zakresie markerów molekularnych opracowanych i stosowanych w onkologii osób dorosłych na grunt onkologii pediatricznej nie jest możliwa.
- » Wiedza na temat specyficznych dla nowotworów wieku dziecięcego zmian genetycznych, obecnych w komórkach nowotworowych (markerów somatycznych) jak i zmian germinalnych, jest użyteczna na wszystkich etapach procesu diagnostyczno-terapeutycznego:
 - znane są już markery genetyczne specyficzne dla poszczególnych typów histologicznych nowotworów, które umożliwiają postawienie właściwego rozpoznania (**grupa markerów diagnostycznych**),
 - identyfikowane są markery molekularne korelujące ze stopniem złośliwości nowotworów, umożliwiające ocenę przebiegu choroby i rokowanie (**grupa markerów prognostycznych**) jak również umożliwiające ocenę skuteczności podejmowanych terapii (**grupa markerów predykcyjnych**),
 - ocenie podlegają również zmiany molekularne identyfikowane w materiale genetycznym pochodzącym z krwi obwodowej pacjentów (zmiany germinalne); umożliwiają one określenie czy wystąpienie danego nowotworu było wynikiem obecności defektu molekularnego (**grupa markerów predysponujących**),
 - obecnie największe nadzieje pokłada się w **markerach molekularnych** umożliwiających kwalifikację pacjentów **do terapii celowanej**.
- » Diagnostyka powinna mieć charakter zintegrowany (uwzględniać cechy histopatologiczne oraz profil molekularny danego nowotworu) i być prowadzona zgodnie z aktualnymi klasyfikacjami WHO. Zaleca się również omawianie uzyskanych wyników badań oraz danych klinicznych pacjenta w zespole interdyscyplinarnym (tzw. *Molecular Tumor Board*) w celu wypracowania optymalnych standardów diagnostycznych i terapeutycznych.

4.6.1. Epidemiologia

- » Choroby nowotworowe wieku dziecięcego stanowią drugą co do częstości przyczynę zgonów w populacji pediatricznej. Występują one z częstością 2-5 przypadków na 100 000 dzieci do 15 roku życia. Stanowią 0,8% nowotworów całej populacji. Nowotwory łitte stanowią około 60% wszystkich nowotworów złośliwych wieku dziecięcego.
- » Międzynarodowa klasyfikacja nowotworów dziecięcych (*International Classification of Childhood Cancer* – ICC, trzecia edycja ICD-O-3/IARC 2017) wyróżnia szerokie spektrum dziecięcych nowotworów litych:
 1. Nowotwory ośrodkowego układu nerwowego (OUN) inne nowotwory wewnątrzczaszkowe i wewnątrzrdzeniowe (~ 20-23%)*,
 2. Nerwiak zarodkowy (neuroblastoma) i inne nowotwory układu współczulnego (8-10%)*,

3. Nowotwory nerek, w tym guz Wilmsa (7-8%*),
4. Nowotwory złośliwe kości, w tym kostniakomięsak i mięsak Ewinga (~7%*),
5. Mięsaki tkanek miękkich i inne mięsaki pozakostne (~7%*),
6. Nowotwory z pierwotnych komórek rozrodczych (3-6%),
7. Nowotwory wątroby w tym wątrobiak zarodkowy – *hepatoblastoma* (0,5-2%),
8. Siatkówcza (2,5-3%)*,
9. Inne nowotwory złośliwe pochodzenia nabłonkowego i czerniak złośliwy (<1%),
10. Inne i nieokreślone nowotwory złośliwe.

* wszystkich nowotworów złośliwych wieku rozwojowego

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

4.6.2. Markery genetyczne

Celem niniejszego opracowania jest wskazanie markerów genetycznych, kluczowych dla postępowania diagnostyczno-terapeutycznego w nowotworach litych wieku dziecięcego. Rekomendacje przygotowano na podstawie protokołów terapeutycznych, wytycznych międzynarodowych komitetów i towarzystw naukowych oraz przeglądu aktualnego piśmiennictwa. W prezentowanych tabelach dla wskazanych markerów określono użyteczność kliniczną (KU):

KU:

- R (rutynowy/standard);
- E (rozszerzony – w wybranych sytuacjach / MTB);
- B (badawczy).

Typ:

- Dx (diagnostyczny/klasyfikacja do konkretnego typu nowotworu);
- Px (rokowniczy/stratyfikacja ryzyka);
- Tx (predykcyjny – kwalifikacja do terapii).

Dla markerów Tx: T1 = terapia zarejestrowana/rekomendowana (AMP Tier I; zwykle ESCAT I–II), T2 = terapia w badaniach klinicznych/off-label (AMP Tier II; zwykle ESCAT III–IV).

Uwaga: klasyfikacja KU dotyczy przydatności w diagnostyce klinicznej; ocena aktywności Tx wymaga każdorazowo weryfikacji w MTB i aktualnych protokołach.

4.6.2.1. Nowotwory ośrodkowego układu nerwowego

- » Nowotwory ośrodkowego układu nerwowego (OUN) zajmują **drugie miejsce po białaczkach pod względem częstości występowania** i są najczęstszą przyczyną zgonów z powodu nowotworów u dzieci. W Polsce rocznie rozpoznaje się ok. 220-240 nowych zachorowań. Ponadto, pacjenci wyleczeni z nowotworu mózgu mają ciężkie odległe następstwa związane z przebytą chorobą i leczeniem.

- » Jest to najlepiej poznana pod względem molekularnym grupa nowotworów litych wieku dziecięcego. To właśnie w przypadku nowotworów mózgu takich jak np. rdzeniak zarodkowy (*medulloblastoma*, MDB) wyniki badań z zakresu transkryptomiki i genomiki, po raz pierwszy przyczyniły się do zdefiniowania podgrup molekularnych, których identyfikacja ma konkretne przełożenie na postępowanie kliniczne (np. podgrupa z aktywacją szlaku Wnt (MDB typ molekularny WNT) związana jest z lepszym rokowaniem i redukcją dawki naświetlania, co przyczynia się do zmniejszenia długoterminowych skutków prowadzonej terapii).
- » Aktualne podejście (WHO CNS, 2021 oraz kolejne aktualizacje cIMPACT-NOW) opiera się na zintegrowanej diagnozie (pod uwagę brane są cechy histopatologiczne oraz profil molekularny danego nowotworu). W diagnostyce nowotworów OUN rekomenduje się rutynową ocenę zmian definiujących jednostkę (m.in. fuzje, amplifikacje, zmiany w genach kodujących histony) oraz w przypadkach niejednoznacznych lub o rozbieżnej morfologii zastosowanie całogenomowego profilowania metylomu DNA jako narzędzia klasyfikacyjnego i pomocniczego w różnicowaniu.
- » Obserwowany jest wzrost liczby leków ukierunkowanych molekularnie. Wybór optymalnej terapii bezwzględnie wymaga oceny obecności bądź braku określonych zmian genetycznych.
- » Zestaw markerów genetycznych o istotnym znaczeniu klinicznym dla pediatrycznych nowotworów ośrodkowego układu nerwowego zamieszczono w poniższej tabeli.

Tabela 4.8. Markery molekularne - nowotwory ośrodkowego układu nerwowego wieku rozwojowego

Typ nowotworu	Geny/ charakterystycznie zmienione profile molekularne	Marker diagnostyczny	Marker prognostyczny (rokowniczy), predykcyjny, predysponujący
Gliomas, glioneuronal tumors, and neuronal tumors			
Pediatric-type diffuse low-grade gliomas	<i>Diffuse astrocytoma, MYB- or MYBL1-altered</i>	• MYB • MYBL1 • IDH-wild type (<i>IDH1</i>, <i>IDH2</i>) • H3-wild type (<i>H3-3A</i>, <i>HIST1H3B</i>, <i>HIST1H3C</i>)	KU: R/Dx KU: R/Px Zmiany z udziałem genów MYB i MYBL1: korzystny czynnik rokowniczy
	<i>Angiocentric glioma</i>	• MYB (najczęściej fuzja MYB::QKI)	KU: R/Dx KU: R/Px Korzystny czynnik rokowniczy
	<i>Polymorphous low-grade neuroepithelial tumor of the young</i>	• BRAF • FGFR2/3	KU: R/Dx KU: E/Tx(T2) Potencjalne cele dla inhibitorów kinaz tyrozynowych (w zależności od wykrytej zmiany)
	<i>Diffuse low-grade glioma, MAPK pathway-altered</i>	• FGFR1 • BRAF	KU: R/Dx KU: E/Tx(T2) Potencjalne cele dla inhibitorów kinaz tyrozynowych (w zależności od wykrytej zmiany)

Typ nowotworu	Geny/ charakterystycznie zmienione profile molekularne	Marker diagnostyczny	Marker prognostyczny (rokowniczy), predykcyjny, predysponujący
Pediatric-type diffuse high-grade gliomas	<i>Diffuse midline glioma, H3 K27-altered</i>	KU: R/Dx	KU: R/Px; E/Tx(T2) Patogenne warianty w genach kodujących histon H3.3 - niekorzystny czynnik rokowniczy. Potencjalne cele dla terapii celowanej (w zależności od wykrytej zmiany)
	<i>Diffuse hemispheric glioma, H3 G34-mutant</i>	KU: R/Dx	KU: R/Px MGMT - korzystny czynnik prognostyczny związany z większą wrażliwością na temozolomid
	<i>Diffuse pediatric-type high-grade glioma, H3-wild type and IDH-wild type (podgrupy pedRTK1, pedRTK2, pedMYCN)</i>	KU: R/Dx	KU: E/Tx(T2) Potencjalne cele dla terapii celowanej (w zależności od wykrytej zmiany)
	<i>Infant-type hemispheric glioma</i>	KU: R/Dx	KU: E/Tx(T1) Potencjalny cel dla inhibitorów kinaz tyrozynowych (w zależności od wykrytej zmiany)
Circumscribed astrocytic gliomas	<i>Pilocytic astrocytoma</i>	KU: R/Dx	KU: R/Px; E/Tx(T1) Potencjalne cele dla inhibitorów kinaz tyrozynowych (w zależności od wykrytej zmiany) KIAA1549::BRAF - korzystny czynnik prognostyczny
	<i>High-grade astrocytoma with piloid features</i>	KU: R/Dx	KU: E/Tx(T2) Potencjalne cele dla inhibitorów kinaz tyrozynowych (w zależności od wykrytej zmiany)
	<i>Pleomorphic xanthoastrocytoma</i>	KU: R/Dx	KU: E/Tx(T2) Potencjalne cele dla inhibitorów kinaz tyrozynowych (w zależności od wykrytej zmiany)
	<i>Subependymal giant cell astrocytoma</i>	KU: R/Dx	KU: E/Tx(T2) Potencjalne cele dla inhibitorów szlaku mTOR
	<i>Astroblastoma, MN1-altered</i>	KU: R/Dx	KU: R/Px Korzystny czynnik rokowniczy

Typ nowotworu	Geny/ charakterystycznie zmienione profile molekularne	Marker diagnostyczny	Marker prognostyczny (rokowniczy), predykcyjny, predysponujący
Glioneuronal and neuronal tumors	<i>Ganglioglioma</i> • ścieżka sygnałna MAPK: • <i>BRAF</i> • <i>RAS</i> • <i>FGFR1/2</i> • <i>RAF1</i> • <i>NTRK2</i> • <i>NF1</i>	KU: R/Dx	KU: E/Tx(T1) Potencjalne cele dla inhibitorów kinaz tyrozynowych (w zależności od wykrytej zmiany)
	<i>Desmoplastic infantile ganglioglioma / desmoplastic infantile astrocytoma</i> • ścieżka sygnałowa MAPK: głównie <i>BRAF</i>	KU: R/Dx	KU: E/Tx(T2) Potencjalne cele dla inhibitorów kinaz tyrozynowych (w zależności od wykrytej zmiany)
	<i>Dysembryoplastic neuroepithelial tumor</i> • <i>FGFR1</i>	KU: R/Dx	KU: E/Tx(T2) Potencjalne cele dla inhibitorów receptora kinazy tyrozynowej <i>FGFR1</i>
	<i>Rosette-forming glioneuronal tumor</i> • <i>FGFR1</i> • <i>PIK3CA</i> • <i>NF1</i>	KU: R/Dx	KU: E/Tx(T2) Potencjalne cele terapeutyczne (w zależności od wykrytej zmiany)
	<i>Myxoid glioneuronal tumor</i> • <i>PDGFRA</i>	KU: R/Dx	-
	<i>Diffuse leptomeningeal glioneuronal tumor</i> • ścieżka sygnałowa MAPK, głównie fuzja <i>KIAA1549::BRAF</i> • rearanżacje strukturalne 1p • (ocena metylomu)	KU: R/Dx	KU: E/Tx(T2) Potencjalne cele dla inhibitorów kinaz tyrozynowych (w zależności od wykrytej zmiany)
	<i>Dysplastic cerebellar gangliocytoma (Lhermitte-Duclos disease)</i> • <i>PTEN</i>	KU: R/Dx	-
	<i>Extraventricular neurocytoma</i> • IDH-wild type (<i>IDH1</i> , <i>IDH2</i>), <i>FGFR (FGFR1::TACC1 fusion)</i>	KU: R/Dx	-
Ependymal tumors			
Supratentorial ependymoma	<i>Supratentorial ependymoma, ZFTA fusion-positive</i> • <i>ZFTA::RELA</i>	KU: R/Dx	KU: R/Px Fuzja z udziałem genu <i>ZFTA</i> - niekorzystny czynnik rokowniczy
	<i>Supratentorial ependymoma, YAP1 fusion-positive</i> • <i>YAP1::MAMLD1</i>	KU: R/Dx	KU: R/Px Fuzja z udziałem genu <i>YAP1</i> - korzystny czynnik prognostyczny
Posterior fossa ependymoma	<i>Posterior fossa ependymoma, group PFA</i> • globalna redukcja H3 K27me3 • (ocena metylomu)	KU: R/Dx	KU: R/Px Niekorzystny czynnik rokowniczy
	<i>Posterior fossa ependymoma, group PFB</i> • H3 K27me3 (utrzymanie poziomu metylacji) • (ocena metylomu)	KU: R/Dx	KU: R/Px Korzystne czynniki rokownicze
Spinal ependymoma	<i>Spinal ependymoma, MYCN-amplified</i> • <i>NF2</i> • <i>MYCN</i>	KU: R/Dx	KU: R/Px <i>MYCN</i> - niekorzystny czynnik prognostyczny

Typ nowotworu	Geny/ charakterystycznie zmienione profile molekularne	Marker diagnostyczny	Marker prognostyczny (rokowniczy), predykcyjny, predysponujący
Choroid plexus tumors			
Choroid plexus carcinoma	TP53		KU: R/Px; E/Tx(T2) Niekorzystny czynnik rokowniczy związany z ograniczeniem wskazań do radioterapii
Embryonal tumors			
Medulloblastomas, molecularly defined	Medulloblastoma, WNT-activated	KU: R/Dx	KU: R/Px Korzystne czynniki rokownicze
	Medulloblastoma, SHH-activated and TP53-wild type	KU: R/Dx	KU: R/Px; E/Tx(T2) Potencjalne cele dla inhibitorów szlaku SHH. Niekorzystne czynniki rokownicze (MYCN)
	Medulloblastoma, SHH-activated and TP53-mutant	KU: R/Dx	KU: R/Px; E/Tx(T2) Potencjalne cele dla inhibitorów szlaku SHH. Niekorzystne czynniki rokownicze (TP53, MYCN)
	Medulloblastoma, non-WNT/non-SHH	KU: R/Dx	-
	Atypical teratoid/ rhabdoid tumor	KU: R/Dx	KU: R/Px SMARCB1 - niekorzystny czynnik rokowniczy, SMARCA4 - niekorzystny czynnik rokowniczy
Other CNS embryonal tumors	Embryonal tumor with multilayered rosettes	KU: R/Dx	-
	CNS neuroblastoma, FOXR2-activated	KU: R/Dx	-
	CNS tumor with BCOR internal tandem duplication	KU: R/Dx	KU: R/Px Niekorzystny czynnik rokowniczy
Pineal tumors			
Pineoblastoma	- RB1 - DICER1	KU: R/Dx	-
Desmoplastic myxoid tumor of the pineal region, SMARCB1-mutant	SMARCB1	KU: R/Dx	-

4.6.2.2. Nerwiak zarodkowy współczulny (neuroblastoma - NBL)

- » Najczęstszy nowotwór współczulnego układu nerwowego (97%) i najczęstszy nowotwór w okresie niemowlęcym; mediana wieku rozpoznania wynosi 17 miesięcy. Odpowiada za 15% zgonów z powodu choroby nowotworowej u dzieci. W Polsce rocznie rozpoznaje się ok. 70 nowych zachorowań.
- » Rozwija się komórek progenitorowych grzebienia nerwowego, stąd może wystąpić w dowolnym miejscu współczulnego układu nerwowego, w tym w zwojach szyjnych górnych, przykręgosłupowych i trzewnych. Najczęstsze umiejscowienia ogniska pierwotnego to: okolica zaotrzewnowa jamy brzusznej (60–80%), tylne śródpiersie (15%), szyja (2–5%), miednica (2–5%). U ~50% pacjentów NBL rozpoznaje się w 4. stopniu zaawansowania.
- » Największe znaczenie prognostyczne w NBL mają wiek dziecka w momencie rozpoznania i stopień zaawansowania choroby; u dzieci poniżej 1 r.ż., nawet w przypadku zaawansowanej choroby, rokowanie jest bardzo dobre, w przeciwieństwie do dzieci starszych, u których mimo intensywnych i złożonych protokołów leczniczych wyniki leczenia są ciągle niezadawalające.
- » Przy ustalaniu rokowania, oprócz wymienionych danych klinicznych, uwzględnia się również profil molekularny nowotworu obejmujący zarówno ocenę stopnia ploidii komórek nowotworowych, obecność amplifikacji onkogenu *MYCN* oraz występowanie strukturalnych i liczbowych aberracji chromosomowych.
- » Dodatkowo coraz większe znaczenie prognostyczne i stratyfikacyjne przypisuje się mechanizmom utrzymania telomerów (aktywacja telomerazy, rearanżacje genu *TERT*, utrata funkcji *ATRX/ALT*), szczególnie u pacjentów z chorobą wysokiego ryzyka.
- » W przypadku nawrotu/progresji zalecane jest rozważenie ponownego pobrania materiału i wykonania rozszerzonego profilu molekularnego (NGS DNA/RNA), gdyż spektrum zmian identyfikowanych w nowotworze może ulegać ewolucji i mieć znaczenie predykcyjne (częste występowanie zmian w genach regulujących szlak RAS/MAPK).
- » Zestaw markerów genetycznych o istotnym znaczeniu klinicznym dla neuroblastoma zamieszczono w poniższej tabeli.

Tabela 4.9. Markery genetyczne - neuroblastoma

Geny/ charakterystycznie zmienione profile molekularne	Metoda	Marker diagnostyczny	Markery prognostyczne (rokownicze), predykcyjne
MYCN (amplifikacja)	• I-FISH (ang. <i>interphase fluorescence in situ hybridization</i>) - metoda rekomendowana	-	KU: R/Px Niekorzystny czynnik rokowniczy niezależnie od wieku pacjenta. Występowanie amplifikacji genu <i>MYCN</i> związane jest z wielokrotnie wyższym ryzykiem wznowy i zgonu z powodu progresji.
NCA (numerical chromosomal abnormalities) • liczbowe aberracje chromosomowe w materiale genetycznym komórek nowotworowych	• mikromacierz całogenomowa, MLPA	-	KU: R/Px; E/Tx(T2) Diploidia obserwowana w materiale genetycznym tkanki nowotworowej związana jest z niekorzystnym przebiegiem choroby. U niemowląt hiperdiploidia jest korzystnym czynnikiem rokowniczym (związana jest z dobrą odpowiedzią na chemioterapię).

Geny/ charakterystycznie zmienione profile molekularne	Metoda	Marker diagnostyczny	Markery prognostyczne (rokownicze), predykcyjne
SCA (segmental chromosomal aberration) • strukturalne aberracje chromosomowe - najczęściej obejmujące regiony chromosomowe 1p, 1q, 2p, 3p, 6p, 6q, 4p, 11q i 17q i inne.	• mikromacierz całogenomowa, MLPA	-	KU: R/Px Najczęściej są obserwowane w zaawansowanych stadiach choroby u starszych dzieci, są to niekorzystne czynniki rokownicze, zwiększające ryzyko nawrotu choroby, niezależnie od tego, której pary chromosomów dotyczą.
ALK • zmiany typu SNP (najczęściej: p.F1174L, p.F1245C, p.R1275Q) • amplifikacje • fuzje	• sekwencjonowanie metodą Sanger, • sekwencjonowanie następnej generacji (Next Generation Sequencing – NGS) • FISH • RT-PCR	-	KU: R/Px; E/Tx(T2) Potencjalny cel dla inhibitorów kinazy ALK, niekorzystny czynnik rokowniczy
TERT (rearanżacje/promotor), ATRX (utrata funkcji), ALT (alternatywne wydłużanie telomerów); zmiany nabyte w nawrocie (głównie w genach regulujących szlak RAS/MAPK)	• NGS DNA/RNA (w tym CNV), • ocena ATRX (IHC/NGS), • ocena ALT (np. FISH)	-	KU: R/Px; E/Tx(T2) Niekorzystne czynniki rokownicze (aktywacja telomerazy/ALT); potencjalne znaczenie predykcyjne zmian nabytych w nawrocie

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

Najczęstszym nowotworem złośliwym nerek wieku dziecięcego jest nerczak płodowy (*nephroblastoma*), stanowiący ponad 90% nowotworów w tej lokalizacji. Jest to drugi co do częstości, po *neuroblastoma* pozaczaszkowy guz lity u dzieci.

Do innych, rzadziej występujących nowotworów zaliczane są:

- mięsak jasnokomórkowy nerki (*clear cell sarcoma of kidney* – CCSK),
- rak nerki związany z translokacjami MiTF/TFE,
- złośliwy nowotwór rabdoidny nerki (*malignant rhabdoid tumor of kidney* – MRTK),
- wrodzona postać nerczaka (*congenital mesoblastic nephroma* – CMN) oraz inne.

Nerczak płodowy

- » W Polsce liczba nowych zachorowań na guza Wilmsa wynosi od 45 do 50 rocznie.
- » Szacunkowa zapadalność na ten nowotwór to 7/1 000 000 dzieci poniżej 16. rż.
- » Nerczak płodowy najczęściej diagnozowany jest u dzieci w wieku 1–5 lat. Średni wiek w momencie rozpoznania to 44 miesiące u pacjentów z jednostronną postacią nowotworu i 31 miesięcy u pacjentów z obustronnym guzem. Po 15. rż. ten typ nowotworu występuje bardzo rzadko.
- » Przypadki rodzinne stanowią 1,5%.
- » Zmiany molekularne:
 - w około jednej trzeciej przypadków guza Wilmsa obserwowane są zmiany w genach *WT1*, *CTNNB1* lub *AMER1 (WTX)* - w genach supresorowych regulujących wzrost, różnicowanie i proliferację zarodkowej tkanki nerkotwórczej,

- kolejną istotną grupą są geny: *DROSHA*, *DGCR8*, *DICER1* i *XPO5*, których białkowe produkty regulują procesowanie miRNA,
- inną ważną grupą są geny, których ekspresja odgrywa znaczącą rolę na wczesnych etapach rozwoju nerek, takie jak: *SIX1* i *SIX2*, *EP300 (CREBBP)*, *MLLT1*, *BCOR* i *MYCN*,
- zmiany w genie *TRIM28* związane są z podtypem nabłonkowym guza Wilmsa,
- w typach anaplastycznych guza Wilmsa obserwuje się występowanie zmian w genie *TP53*,
- obserwowana utrata heterozygotyczności w obrębie regionów chromosomowych 1p i 16q oraz zwiększenie ilości materiału genetycznego w obrębie chromosomu 1q związane są z niekorzystnym rokowaniem. Ponadto zaobserwowano gorsze rokowanie w przypadku aberracji w regionach chromosomu 11p13 i 11p15,
- zestaw markerów genetycznych o istotnym znaczeniu klinicznym dla nowotworów nerki wieku rozwojowego zamieszczono w poniższej tabeli.

Tabela 4.10. Markery genetyczne - nowotwory nerki u dzieci

Typ nowotworu	Geny/ charakterystycznie zmienione profile molekularne	Metoda	Marker diagnostyczny	Markery prognostyczne (rokownicze), predykcyjne
Guz Wilmsa (nephroblastoma)	• <i>WT1 (11p13)</i>	• MLPA, • sekwencjonowanie metodą Sanger, a • sekwencjonowanie następnej generacji (<i>Next Generation Sequencing – NGS</i>)	KU: R/Dx	KU: R/Px Brak jednoznacznych danych
	• LOH 1p/16q (w wybranych protokołach), • gain 1q, • 11p15 (LOH/LOI; inne zaburzenia imprintingu), • <i>TP53</i> (anaplazja/wybrane przypadki).	• mikromacierz całogenomowa i/lub MLPA (w tym MS-MLPA dla 11p15), • NGS DNA (SNV/ indel + CNV/LOH) / sekwencjonowanie Sanger (TP53).		KU: R/Px Niekorzystny czynnik rokowniczy
Congenital mesoblastic nephroma (CMN)	• t(12;15) <i>ETV6::NTRK3</i> • <i>EGFR-ITD</i>	• NGS • FISH • RT-PCR • sekwencjonowanie metodą Sanger	KU: R/Dx; E/ Tx(T1)	-
Clear cell sarcoma of kidney (CCSK)	• <i>BCOR</i> - ITDs • t(10;17)(q22;p13) <i>YWHAE::NUTM2B</i> • t(12;22)(q13;q12) <i>EWSR1::ATF1</i> • <i>BCOR::CCNB3</i>	• sekwencjonowanie metodą Sanger • NGS • FISH • RT-PCR	KU: R/Dx	-
Rak nerki związany z translokacjami MiTF/ TFE	• t(X;1)(p11.2;q21.2) <i>TFE3::PRCC</i> • t(X;17)(p11.2;q25) <i>TFE3::ASPL (ASPSR1)</i> • t(X;1)(p11.2;p34) <i>TFE3::SFPQ (PSF)</i> , • i inne	• NGS • FISH • RT-PCR	KU: R/Dx	-
Malignant rhabdoid tumor of kidney (MRKT)	• <i>SMARCB1</i> • <i>SMARCA4</i>	• MLPA • mikromacierz, • sekwencjonowanie metodą Sanger • NGS	KU: R/Dx	KU: R/Px Niekorzystny czynnik rokowniczy
Metanephric tumors	• <i>BRAF</i> (p.V600E)	• sekwencjonowanie metodą Sanger • NGS	KU: R/Dx	-

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

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

Tabela 4.11. Markery genetyczne – nowotwory złośliwe kości

Typ nowotworu	Geny/ charakterystycznie zmienione profile molekularne	Metoda	Marker diagnostyczny	Markery prognostyczne (rokownicze), predykcyjne
<i>Osteosarcoma</i>	• <i>TP53</i> • <i>RB1</i> • 8q21-24 (amplifikacja) • <i>MDM2</i> (amplifikacja) • rozległe i kompleksowe rearanżacje chromosomowe	• sekwencjonowanie m. Sangera • NGS • MLPA • FISH • kariotyp	KU: R/Dx	-
<i>Ewing sarcoma</i>	• t(11;22)(q24;q12) <i>EWSR1::FLI1</i> • t(21;22)(q12;q12) <i>EWSR1::ERG</i> • t(2;22)(q33;q12) <i>EWSR1::CREB1</i> • t(7;22)(p22;q12) <i>EWSR1::ETV1</i> • t(17;22)(q12;q12) <i>EWSR1::E1AF</i> • inv(22)(q12;q12) <i>EWSR1::ZSG</i> • t(16;21)(p11;q22) <i>FUS::ERG</i> • i inne.	• FISH, • NGS, • RT-PCR, • inne	KU: R/Dx	-
<i>Chondrosarcoma</i>	• <i>HEY1::NCOA2</i> • t(1;5)(q42;q32) • <i>RF2BP2::CDX1</i> • <i>IDH1</i> • <i>IDH2</i> • <i>TP53</i>	• FISH, • NGS, • RT-PCR, • sekwencjonowanie m. Sangera • NGS	KU: R/Dx	-
<i>Giant cell tumor of soft tissue</i>	• <i>H3F3A</i> • <i>HRAS</i> • <i>TP53</i>	• sekwencjonowanie m. Sangera • NGS	KU: R/Dx	-

4.6.2.5. Mięsaki tkanek miękkich

Mięsaki tkanek miękkich

- » Heterogenna grupa szybko rosnących, wysoce złośliwych nowotworów pochodzących z zarodkowej tkanki mezenchymalnej i neuroektodermalnej. Obejmują nowotwory mięśni, tkanki łącznej, tkanki podporowej i naczyniowej.
- » Większość zachorowań dotyczy dzieci w wieku 2-6 lat oraz młodzieży powyżej 12. r.ż. Wskaźnik zachorowalności, niezależnie od płci, waha się w granicach 0,2-1,0/100 000 rocznie.
- » **Mięsak prążkowanokomórkowy (*rhabdomyosarcoma* - RMS)**
 - Najczęstszy nowotwór w tej grupie (70%).
 - Identyfikacja podtypu pęcherzykowego (*alveolar* RMS) ma znaczenie dla postępowania terapeutycznego ze względu na gorsze rokowanie.
- » **Mięsaki nieprążkowanokomórkowe - NRSTS (*ang. nonrhabdomyosarcoma soft tissue sarcomas*)**
 - Diagnozowane głównie u starszych dzieci i młodych dorosłych.
 - W tej grupie najczęściej występują nowotwory typu:
 - *synovial sarcoma*,
 - MPNST (*ang. malignant peripheral nerve sheath tumor*).
 - Pozostałe jednostki chorobowe występują u dzieci znacznie rzadziej.
- » Zestaw markerów genetycznych o istotnym znaczeniu klinicznym dla pediatrycznych mięsaków tkanek miękkich zamieszczono w poniższej tabeli.

Tabela 4.12. Markery genetyczne - mięsaki tkanek miękkich

Typ nowotworu	Geny/charakterystycznie zmienione profile molekularne	Metoda	Marker diagnostyczny
<i>Rhabdomyosarcoma Alveolar</i>	• t(2;13)(q35;q14) • PAX3::FOXO1 • t(1;13)(p36;q14) • PAX7::FOXO1 • t(2;2)(q35;p23) • PAX3::NCOA1 • t(X;2)(q35;q13) • PAX3::AFX	• FISH • NGS • RT-PCR • inne	KU: R/Dx
<i>Rhabdomyosarcoma Embryonal</i>	• utrata heterozygotyczności 11p15, • trisomie chrom. 2, 8 i 20	• MLPA • FISH • NGS • kariotyp	KU: R/Dx
<i>Synovial sarcoma</i>	• t(X;18)(p11,q11) • SS18::SSX1, • SS18::SSX2, • SS18::SSX4	• FISH • NGS • RT-PCR • inne	KU: R/Dx
<i>Malignant peripheral nerve sheath tumor</i>	• Złożone aberracje chromosomowe, • patogenne zmiany w genach <i>SUZ12</i> i <i>EED</i>, inaktywacja <i>NF1</i>	• FISH • kariotyp • NGS • sekwencjonowanie m. Sangera • inne	KU: R/Dx
<i>Alveolar soft-part sarcoma</i>	• t(X;17)(p11;q25) • ASPL(ASPSCR1)::TFE3	• FISH • NGS • RT-PCR • inne	KU: R/Dx

Typ nowotworu	Geny/charakterystycznie zmienione profile molekularne	Metoda	Marker diagnostyczny
<i>Angiomatoid fibrous histiocytoma</i>	- t(12;16)(q13;p11) <i>FUS::ATF1</i> - t(2;22)(q33;q12) <i>EWSR1::CREB1</i> t(12;22)(q13;q12) <i>EWSR1::ATF1</i>	- FISH - NGS - RT-PCR - inne	KU: R/Dx
<i>BCOR-rearranged sarcoma</i>	- Inv(X)(p11.4p11.22) <i>BCOR::CCNB3</i> - t(X;4)(p11;q31) <i>BCOR::MAML3</i> - t(X;22)(p11;q13) <i>ZC3H7B::BCOR</i>	- FISH - NGS - RT-PCR - i inne	KU: R/Dx
<i>CIC-rearranged sarcoma</i>	- t(4;19)(q35;q13) - t(10;19)(q26;q13) <i>CIC::DUX4</i> - t(X;19)(q13;q13.3) <i>CIC::FOXO4</i>	- FISH - NGS - RT-PCR - i inne	KU: R/Dx
<i>Clear cell sarcoma</i>	- t(12;22)(q13;q12) <i>EWSR1::ATF1</i> - t(2;22)(q33;q12) <i>EWSR1::CREB1</i>	- FISH - NGS - RT-PCR - i inne	KU: R/Dx
<i>Dermatofibrosarcoma protuberans</i>	- t(17;22)(q21;q13) <i>COL1A1::PDGFB</i>, - chromosom pierścieniowy - r(17;22)	- FISH - NGS - RT-PCR - kariotyp - i inne	KU: R/Dx
<i>Desmoid-type fibromatosis</i>	5q21 loss; - trisomia 8, 20 - patogenne zmiany w genie <i>CTNNB1</i>	- FISH - NGS - RT-PCR - mikromacierz catogenomowa - kariotyp - sekwencjonowanie m. Sangera	KU: R/Dx
<i>Desmoplastic small round cell tumor</i>	t(11;22)(p13;q12) <i>EWSR1::WT1</i>	- FISH - NGS - RT-PCR - inne	KU: R/Dx
<i>Dedifferentiated Liposarcoma</i>	- Chromosom pierścieniowy i markerowy, - amplifikacja regionu 12q13–15: <i>MDM2</i>, <i>CDK4</i>	- FISH - kariotyp - NGS - MLPA - i inne	KU: R/Dx
<i>Epithelioid sarcoma</i>	- Delecja 22q <i>SMARCB1</i> - t(8;22)(q22;q11) - t(10;22)	- FISH - NGS - RT-PCR - MLPA - mikromacierz catogenomowa - sekwencjonowanie m. Sangera	KU: R/Dx
<i>Epithelioid hemangioendothelioma</i>	- t(1;3)(p36;q25), <i>WWTR1::CAMTA1</i>, - t(X;11)(p11;q22) <i>YAP1::TFE3</i>	- FISH - NGS - RT-PCR - Inne	KU: R/Dx
<i>Extraskeletal myxoid chondrosarcoma</i>	- t(9;22)(q22;q12) <i>EWSR1::NR4A3</i> - t(9;17)(q22;q11) <i>TAF15 (TAF2N)::NR4A3</i> - t(9;15)(q22;q21) <i>TCF12::NR4A3</i> - t(3;9)(q11;q22) <i>TFG::NR4A3</i> fusion - t(9;17)(q22;q11) <i>RBP56::NR4A3</i> fusion	- FISH - NGS - RT-PCR - i inne	KU: R/Dx

Typ nowotworu	Geny/charakterystycznie zmienione profile molekularne	Metoda	Marker diagnostyczny
<i>Giant cell fibroblastoma</i>	t(17;22)(q22;q13) <i>COL1A1::PDGFB</i>	- FISH - NGS - RT-PCR - i inne	KU: R/Dx
<i>Infantile fibrosarcoma</i>	- t(12;15)(p13;q25) <i>ETV6::NTRK3</i>, - t(2;15)(p21;q25) <i>EML4::NTRK3</i>, <i>LMNA::NTRK1</i>, 1q delecja, - trisomia 8, 11, 17, 20	- FISH - NGS - RT-PCR - MLPA - mikromacierz catogenomowa - kariotyp	KU: R/Dx; E/Tx(T1)
<i>Inflammatory myofibroblastic tumor</i>	- translokacje z udziałem regionu 2p23; - fuzje z udziałem genu <i>ALK</i> (z wieloma partnerami lokalnymi) - t(3;6)(q12;q22) <i>TFG::ROS1</i>	- FISH - NGS - RT-PCR - i inne	KU: R/Dx; E/Tx(T1)
<i>Leiomyosarcoma</i>	Złożone aberracje, często z delecją 1p	- FISH - kariotyp - NGS - mikromacierz catogenomowa - i inne	KU: R/Dx
<i>Lipoblastoma</i>	- t(7;8) (q21;q12) <i>COL1A2::PLAG1</i> - Del(8) (q12q24) <i>HAS2::PLAG1</i> - t(8;14) (q12;q24) <i>PLAG1::RAD51L1</i> - t(2;8) (q31;q12.1) <i>COL3A1::PLAG1</i>	- FISH - NGS - RT-PCR - i inne	KU: R/Dx
<i>Low-grade fibromyxoid sarcoma</i>	- t(7;16)(q33;p11) <i>FUS::CREB3L2</i> - t(11;16)(p11;p11) <i>FUS::CREB3L1</i>	- FISH - NGS - RT-PCR - i inne	KU: R/Dx
<i>Mesenchymal chondrosarcoma</i>	t(8;8)(q13;q21) <i>HEY1::NCOA2</i>	- FISH - NGS - RT-PCR - i inne	KU: R/Dx
<i>Myoepithelioma</i>	- t(6;22)(p21;q12) <i>EWSR1::POU5F1</i> - t(1;22)(q23;q12) <i>EWSR1::PBX1</i> (19;22)(q13;q12) <i>EWSR1::ZNF444</i>	- FISH - NGS - RT-PCR - i inne	KU: R/Dx
<i>Myxoid round cell liposarcoma</i>	- t(12;16)(q13;p11) <i>FUS::DDIT3</i> - t(12;22)(q13;q12) <i>EWSR1::DDIT3 (CHOP)</i>	- FISH - NGS - RT-PCR - i inne	KU: R/Dx
<i>Myxoinflammatory fibroblastic sarcoma</i>	t(1;10)(p22;q24) <i>TGFBR3::MGEA5</i>	- FISH - NGS - RT-PCR - i inne	KU: R/Dx
<i>Myxofibrosarcoma</i>	chromosom pierścieniowy	- kariotyp - FISH - i inne	KU: R/Dx
<i>Solitary fibrous tumor</i>	Inv(12)(q13q13) <i>NAB2::STAT6</i>	- FISH - NGS - RT-PCR, - i inne	KU: R/Dx
<i>Undifferentiated embryonal sarcoma of the liver</i>	t(11;19)(q13;q13) <i>MALAT1::MHLB1</i>	- FISH - NGS - RT-PCR - i inne	KU: R/Dx

4.6.2.6. Nowotwory z pierwotnych komórek rozrodczych

- » Nowotwory germinalne są zmianami wywodzącymi się z pierwotnych komórek rozrodczych na różnych etapach ich różnicowania. Charakteryzują się dużą różnorodnością lokalizacyjną, histologiczną i biologiczną.
- » Stanowią około 3-6% wszystkich nowotworów złośliwych wieku rozwojowego. W Polsce rozpoznaje się rocznie 40-90 przypadków nowotworów germinalnych u dzieci i młodzieży poniżej 18. roku życia. Najczęściej występują między 1. i 6. rokiem życia.
- » Należą do nowotworów o wysokim odsetku wyleczalności, sięgającym 85-90%.
- » Obecnie zalecanymi badaniami molekularnymi w ramach diagnostyki i terapii nowotworów germinalnych są:
 - badania kariotypu u pacjentów z cechami dysgenezy gonad i nowotworów śródpiersia (u chłopców) oraz obustronnych nowotworów jajników (u dziewczynek), z gonadoblastoma, w celu identyfikacji/wykluczenia obecności zespołów genetycznych takich jak: zespół Turnera, Swyera, Klinefeltera, Frasera, Denysa-Drasha i innych.
 - dane literaturowe wskazują również na obecność somatycznych rearanżacji dotyczących chromosomów 1, 6, 11, 12, 16, 20 i 22, których znaczenie kliniczne obecnie nie jest znane.

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

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

» ***Hepatoblastoma (wątrobiak zarodkowy)***

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

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

» ***Rak wątrobowokomórkowy (hepatocellular carcinoma, HCC)***

- Bardzo rzadko diagnozowany u dzieci, zwykle u dzieci starszych, w wieku 12-14 lat. Rokowanie jest złe, tylko 30% dzieci uzyskuje 3-letnie przeżycie.

- Najczęściej raportowanymi zmianami somatycznymi są zmiany w genie *TP53* (25-30%),
- Podłoże molekularne tego nowotworu nie jest w pełni poznane,

» **Nie zróżnicowany zarodkowy mięsak wątroby (*undifferentiated embryonal sarcoma of the liver, UES*)**

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

Tabela 4.13. Markery genetyczne - nowotwory wątroby

Typ nowotworu	Geny/ charakterystycznie zmienione profile molekularne	Metoda	Marker diagnostyczny	Markery prognostyczne (rokownicze), predykcyjne
<i>Hepatoblastoma</i>	• <i>CTNNB1</i>	• sekwencjonowanie metodą Sangera, • NGS	KU: R/Dx	-
	• <i>APC</i>	• sekwencjonowanie metodą Sangera, • NGS • MLPA, • mikromacierz	KU: E/Dx	-
	• <i>NFE2L2</i>	• sekwencjonowanie metodą Sangera, • NGS	-	KU: R/Px niekorzystny czynnik rokowania
<i>Undifferentiated embryonal sarcoma of the liver (UES)</i>	• t(11;19)(q13;q13.4) • <i>MALAT1::MHLB1</i>	• FISH, • NGS	KU: R/Dx	-
	• zmiany w regionie C19MC	• FISH, • NGS	KU: R/Dx	-

4.6.2.8. Siatkówczak (*retinoblastoma*)

- » Najczęstszy pierwotny nowotwór złośliwy gałki ocznej u dzieci i drugi po **czerniaku naczyńiówki** nowotwór złośliwy oka we wszystkich grupach wiekowych.
- » Częstość zachorowań wynosi 1 na 15 000-18 000 żywo urodzonych dzieci. W Polsce odnotowuje się ok. 25-30 nowych przypadków rocznie.
- » Występuje kilka postaci klinicznych retinoblastoma:
 - a. obustronna lub wieloogniskowa (25-30% przypadków, postać dziedziczna),
 - b. jednostronna lub jednoogniskowa (70-75% przypadków, postać sporadyczna),
 - c. postać trójstronna, w której zmianom obuocznym towarzyszy zarodkowy guz wewnętrzzaskowy (*pineoblastoma*) zlokalizowany w linii środkowej (4% - tylko u dzieci z dziedziczną postacią choroby).

- » Najczęściej rozpoznawany jest w między 1. a 3. r.ż. Obuoczna postać siatkówczaka jest rozpoznawana wcześniej, przed 1. r.ż. Rzadko stwierdza się występowanie choroby po 5. r.ż.
- » Związany jest z występowaniem zmian w genie *RB1* o wysokiej penetracji (90-95%). W ostatnim czasie pojawiły się również doniesienia o występowaniu w *retinoblastoma* zmian molekularnych w innych niż *RB1* genach – Tab. 4.14.

Tabela 4.14. Markery genetyczne - siatkówczak

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

4.6.2.9. Inne nowotwory złośliwe pochodzenia nabłonkowego i czerniak złośliwy

Czerniak

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

Tabela 4.15. Markery molekularne - czerniak

Typ nowotworu	Geny/ charakterystycznie zmienione profile molekularne	Metoda	Marker diagnostyczny	Markery prognostyczne (rokownicze), predykcyjne
<i>Spitzoid melanoma</i> (SM)	• Fuzje z udziałem genów <i>ROS1</i> , <i>NTRK1</i> , <i>NTRK3</i> , <i>ALK</i> , <i>BRAF</i> , <i>MAPK</i> , <i>MET</i> , <i>RET</i> ,	• NGS, FISH, RT-PCR	KU: R/Dx +	KU: R/Px; E/Tx(T1) potencjalne cele terapeutyczne
	• Rearanżacje segmentowe w obrębie chromosomów,	• mikromacierz całogenomowa, FISH	-	-
	• Homozygotyczna delecja regionu 9p21,	• MLPA, mikromacierz, FISH	+	marker niekorzystnego rokowania
	• <i>TERT</i> (zmiany w obrębie promotora - rzadko)	• sekwencjonowanie m. Sangera • NGS	-	marker niekorzystnego rokowania
Czerniak, na bazie wrodzonego znamienia melanocytowego (CNM)	• <i>NRAS</i> (najczęściej p.Q61K/R)	• sekwencjonowanie m. Sangera	KU: R/Dx +	KU: E/Tx(T1) potencjalne cele terapeutyczne
	• <i>BRAF</i> (najczęściej p.V600E)	• NGS	-	(w zależności od wykrytej zmiany)
	• <i>TERT</i> (hipermetylacja promotora)	• mikromacierz całogenomowa, FISH	+	
	• rearanżacje segmen- towe w obrębie chromo- somów		-	
Klasyczny czerniak („czerniak typu dorosłego”)	• <i>BRAF</i> (najczęściej p.V600E)	• sekwencjonowanie m. Sangera	KU: R/Dx +	KU: E/Tx(T1) potencjalne cele terapeutyczne
	• <i>TERT</i> (zmiany w obrębie promotora)	• NGS	+	(w zależności od wykrytej zmiany)
	• rearanżacje segmen- towe w obrębie chromo- somów,	• mikromacierz całogenomowa, • FISH	-	
<i>NUT midline carcinoma</i>	• translokacje z udziałem genu <i>NUT</i> (15q14), naj- częściej z genem <i>BRD4</i> (19p13)	• FISH	KU: R/Dx	-

4.6.2.10. Inne

Nowotwory jajnika

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

Tabela 4.16. Markery genetyczne - nowotwory jajnika

Typ nowotworu	Geny/ charakterystycznie zmienione profile molekularne	Metoda	Marker diagnostyczny	Markery prognostyczne (rokownicze), predykcyjne
<i>Sertoli-Leydig cell tumors</i>	• <i>DICER1</i>	• sekwencjonowanie metodą Sanger, NGS • MLPA, mikromacierz	KU: R/Dx	-
Pierwotny rak drobnokomórkowy jajnika, typ hiperkalcemiczny, SCCOHT	• <i>SMARCA4</i>	• sekwencjonowanie metodą Sanger, NGS • MLPA, mikromacierz	KU: R/Dx	-

4.6.2.11. Zmiany germinalne

- » Występowanie nowotworów wieku dziecięcego może być uwarunkowane obecnością zmian odpowiedzialnych za występowanie zespołów genetycznych;
 - szacuje się, że obecnie znanych jest ponad 200 takich zespołów i ilość ich sukcesywnie wzrasta,
 - występowanie nowotworów wrodzonych dodatkowo podkreśla znaczenie zmian germinalnych w patogenezie nowotworów wieku dziecięcego,
 - szacuje się, że około 7-8% nowotworów hematologicznych i litych u dzieci uwarunkowanych jest zmianami germinalnymi.
- » Ocena obecności zmian germinalnych może mieć znaczenie w optymalizacji postępowania terapeutycznego;
 - u wybranych pacjentów z germinalną zmianą skutkującą niestabilnością chromosomową lub występującą w genach naprawy DNA rozważana jest redukcja dawki naświetlania,
 - występowanie zmian germinalnych może być związane częstszym występowaniem nowotworów wtórnych,
 - występowanie zmian germinalnych może być również związane z lepszym lub gorszym rokowaniem, co wpływa na podejmowane leczenie.
- » Obecność zmiany germinalnej może również przyczyniać się do wcześniejszego występowania nowotworów.

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

- » Wskazania do diagnostyki germinalnej (przykłady) obejmują:
 - obecność rozpoznania i/lub markerów sugerujących występowanie predyspozycji (np. siatkówczak, obustronny/wieloogniskowy guz Wilmsa, złośliwe nowotwory rabdoidne (z utratą *SMARCB1/SMARCA4*), nowotwory nadnerczy;
 - bardzo wczesny wiek zachorowania, występowanie nowotworów mnogich i/lub obustronnych, przebieg nietypowy lub występowanie ciężkiej toksyczności podczas leczenia;
 - dodatni wywiad rodzinny lub obecność wad wrodzonych/cech zespołowych.

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

Tabela 4.17. Wybrane zespoły genetyczne związane z występowaniem nowotworów wieku dziecięcego

Zespół	Nowotwory	Gen/r. chromosomowy
Li-Fraumeni	mięsaki, białaczki, nowotwory mózgu, <i>hepatoblastoma</i>	<i>TP53</i>
Xeroderma pigmentosum	czerniak	<i>XPA, XPC, DDB2, ERCC2</i>
Nerwiakowłókniakowatość typu 1	chłoniaki, nowotwory mózgu, mięsaki, glejaki nerwu wzrokowego, nerwiaki nerwu VIII, oponiaki, guz Wilmsa, <i>rhabdomyosarcoma</i>	<i>NF1, SPRED1</i>
Ataksja-teleangiektazja	nowotwory OUN, układu pokarmowego, białaczki	<i>ATM</i>
Zespół Blooma	ostra białaczka, nowotwory przewodu pokarmowego	<i>BLM</i>
Anemia Fanconiego	ostra białaczka, guzy wątroby	<i>FANCA, FANCB, FANCC, PALB2</i> i inne
Zespół Nijmegen	białaczki, chłoniaki, <i>medulloblastoma</i> , <i>glioma</i> , <i>rhabdomyosarcoma</i>	<i>NBN</i>
Zespół Beckwitha-Wiedemanna	<i>nephroblastoma</i> , <i>hepatoblastoma</i> , <i>rhabdomyosarcoma</i> , <i>gonadoblastoma</i>	<i>CDKN1C/11p15</i>
Zespoły chromosomowe (zespół Downa, Klinefeltera)	białaczki, nowotwory OUN,	trisomia 21, 47XXY
Rodzinna postać siatkówczaka	<i>retinoblastoma</i>	<i>RB1</i>
Rodzinna postać guza Wilmsa	<i>nephroblastoma</i>	<i>WT1, WT2</i> i inne
Rodzinna polipowatość jelita grubego	<i>hepatoblastoma</i>	<i>APC, MUTYH</i>
Zespół sercowo-twarzowo-skinny (CFC),	ostra białaczka limfoblastyczna, <i>rhabdomyosarcoma</i> , <i>hepatoblastoma</i> , chłoniaki	<i>BRAF, MAP2K1, MAP2K2, KRAS,</i>
Zespół Noonana	<i>neuroblastoma</i> , ostra białaczka limfatyczna, <i>glioma</i> , <i>rhabdosarcoma</i>	<i>PTPN11, RAF1, BRAF, SOS1, NRAS, CBL</i>
Zespół Costello	<i>rhabdosarcoma</i> , <i>neuroblastoma</i> , <i>fibrosarcoma</i> ,	<i>HRAS</i>
Zespół Sotosa	guz Wilmsa, <i>neuroblastoma</i> , <i>hepatoblastoma</i>	<i>NSD1</i>
Zespół von Hippa-Lindaua	nowotwory nerek, OUN - szczególnie mózdzku, nadnerczy i siatkówki.	<i>VHL</i>
Zespół Gorlina	<i>medulloblastoma</i>	<i>PTCH1</i>
Zespół Rubinsteina-Taybiego	<i>medulloblastoma</i> , oponiaki, ostra białaczka limfatyczna, <i>pheochromocytoma</i> , <i>rhabdomyosarcoma</i>	<i>CREBBP</i>
Zespół Turcota	<i>medulloblastoma</i> , glejaki	<i>APC</i>
Zespół DICER	<i>pleuropulmonary blastoma</i> , <i>nephroblastoma</i> , mięsaki nerek i mózgu, gruczolaki i raki tarczycy, guzy gonadalne	<i>DICER1</i>
Mnoga gruczolakowatość wewnątrzwydzielnicza typu 1 i 2	gruczolaki/raki układu wewnątrzwydzielniczego	<i>MEN1</i> i <i>RET</i>
Stwardnienie guzowate	nowotwory mózgu, nerek, serca	<i>TSC1</i> i <i>TSC2</i>
Trisomia 18	<i>hepatoblastoma</i>	-
Zespół Simpsona-Golabi-Behmel typu 1	<i>hepatoblastoma</i>	<i>GPC3</i>
Choroba spichrzeniowa glikogenu typu 1a, III, IV, VI)	<i>hepatoblastoma</i>	<i>G6PC, AGL, GBE1, PYGL</i>
Tyrozynemia typu 1	<i>Hepatocellular carcinoma</i>	<i>FAH</i>

Tabela 4.18. Zmiany germinalne w wybranych nowotworach litych u dzieci

Typ nowotworu	Gen (MIM#)
<i>AT/RT</i>	<i>SMARCB1</i> (MIM 601607, 35%) <i>SMARCA4</i> (MIM 603254)
<i>Choroid plexus carcinoma</i>	<i>TP53</i> (MIM 191170, 16–35%)
<i>Congenital melanocytic nevi</i>	<i>MC1R</i> (MIM 155555)
<i>Familial melanomas</i>	<i>CDKN2A</i> (MIM 600160), <i>CDK4</i> (MIM 123829)
<i>Glioma of the optic pathway</i>	<i>NF1</i> (MIM 613675, 30%)
<i>Hemangioblastoma</i>	<i>VHL</i> (MIM 608537)
<i>Malignant nerve sheath tumor</i>	<i>NF1</i> (MIM 613675), <i>TP53</i> (MIM 191170)
<i>Medulloblastoma</i>	<i>APC</i> (MIM 611731) <i>BRCA2</i> (MIM 600185) <i>MLH1</i> (MIM 120436) <i>MSH2</i> (MIM 609309) <i>MSH6</i> (MIM 600678) <i>PMS2</i> (MIM 600259) <i>PALB2</i> (MIM 610355) <i>PTCH1</i> (MIM 601309) <i>SUFU</i> (MIM 607035) <i>SMO</i> (MIM 601500) <i>TP53</i> (MIM 191170) <i>CREBBP</i> (MIM 600140) <i>GLI3</i> (MIM 175700)
<i>Meningioma</i>	<i>NF2</i> (MIM 607379) <i>PTCH1</i> (MIM 601309) <i>PTEN</i> (MIM 601728) <i>SMARCB1</i> (MIM 601607) <i>SMARCE1</i> (MIM 603111) <i>SUFU</i> (MIM 607035) <i>WRN</i> (MIM 604611) <i>MEN1</i> (MIM 613733)
<i>Pineoblastoma</i>	<i>DICER1</i> (MIM 606241, 20%) <i>RB1</i> (MIM 614041)
<i>Schwannoma</i>	<i>NF2</i> (MIM 607379) <i>PRKAR1A</i> (MIM 188830)
<i>Schwannomatosis</i>	<i>LZTR1</i> (MIM 600574) <i>SMARCB1</i> (MIM 601607, 50%)
<i>Spinal cord ependymoma</i>	<i>NF2</i> (MIM 607379, 14%)
<i>Subependymal giant cell astrocytoma</i>	<i>TSC1/TSC2</i> (MIM 605284/191092)
<i>Neuroblastoma</i>	<i>PHOX2B</i> (MIM 603851) <i>ALK</i> (MIM 105590)
<i>Hepatoblastoma</i>	<i>APC</i> (MIM 611731), <i>disomia jednorodzicielska w 11p15.5</i>
<i>Retinoblastoma</i>	<i>RB1</i> (MIM 614041)

4.6.3. Materiał do badań

- » Punktem wyjścia dla większości protokołów diagnostycznych i terapeutycznych, stosowanych w pediatrycznych nowotworach litych, jest próbka tkanki nowotworowej. Do badań genetycznych pobierany jest niewielki fragment guza (0,5-1 cm³). Najbardziej powszechną formą zabezpieczania tkanki jest jej utrwalenie w formalinie i zatopienie

w parafinie (FFPE), niemniej do protokołów opartych na technologii NGS dużo korzystniejsze jest zabezpieczanie tkanki poprzez mrożenie. W wybranych nowotworach (np. *neuroblastoma*) materiałem do badań genetycznych mogą być preparaty odciskowe tkanki guza. Do identyfikacji zmian germinalnych oprócz tkanki nowotworowej zabezpieczana jest również próbka krwi obwodowej pacjenta.

- » Ze względu na heterogenną budowę nowotworów rekomendowane jest pobranie co najmniej dwóch wycinków z danej tkanki nowotworowej. W przypadku stwierdzenia wznowy, z uwagi na możliwą zmianę profilu molekularnego tkanki nowotworowej w czasie, wskazane jest ponowne pobranie materiału do badań.
- » Każda próbka tkanki nowotworowej zakwalifikowana do badań molekularnych powinna podlegać ocenie pod kątem odsetka komórek nowotworowych w badanym preparacie (optymalnie 60-100% utkania nowotworowego). Rutynowo ocena ta dokonywana jest przez patomorfologa. W przypadku dostępności większej liczby próbek biologicznych należy dokonać wyboru najbardziej adekwatnej próbki biorąc pod uwagę rodzaj planowanego badania molekularnego, dostępność materiału biologicznego oraz jego zapotrzebowanie na kolejnych etapach diagnostyki.
- » Bardzo duże znaczenie ma również zachowanie sterylności przy pobieraniu materiału do badań molekularnych. Metody NGS umożliwiają wykrycie zmian typu mozaiki na bardzo niskim poziomie. Kontaminacja materiału nawet bardzo niewielką ilością materiału pochodzącego od innego pacjenta może przyczynić się do otrzymania fałszywych wyników.

4.6.4. Czas wykonania

Rekomendowany czas wykonania (TAT, od przyjęcia materiału w laboratorium):

- » badania niezbędne do postawienia rozpoznania wstępnego i kwalifikacji do badań genetycznych (IHC oraz testy celowane, np. FISH/RT-PCR, ocena % utkania nowotworowego): ≤ 7-10 dni roboczych,
- » NGS DNA/RNA (SNV/indel + CNV/LOH oraz fuzje) i/lub profil metylacji DNA w nowotworach OUN: zwykle 10-14 dni roboczych (maks. 21 dni),
- » badania kwalifikacji do terapii celowanej w przypadku wystąpienia nawrotu/progresji: 14-21 dni roboczych (tryb pilny po uzgodnieniu),
- » badania predyspozycji genetycznych (germinalne): zwykle 4-12 tygodni (krócej w trybie pilnym po uzgodnieniu).

4.6.5. Raportowanie badań molekularnych

Raport badania molekularnego powinien być czytelny klinicznie i zawierać co najmniej:

- » dane dotyczące materiału biologicznego (typ, sposób utrwalenia, szacunkowa zawartość komórek nowotworowych) oraz zakres badania,
- » opis metody (NGS/FISH/RT-PCR/metylom), parametry dotyczące kontroli jakości i ograniczeń dotyczących zastosowanego testu (m.in. granica detekcji),
- » wyniki zapisane w standardzie HGVS (SNV/indel, CNV/LOH, fuzje) wraz z parametrami istotnymi dla interpretacji (np. VAF),

- » klasyfikację znaczenia klinicznego wariantów (somatyczne: AMP/ASCO/CAP; germinalne: ACMG/AMP),
- » interpretację kliniczną uzyskanych wyników, w tym: znaczenie diagnostyczne/prognostyczne/predykcyjne, rekomendacje dalszych badań oraz wskazanie do omówienia w *Molecular Tumor Board* w przypadkach złożonych. Ocena uzyskanych wyników powinna podlegać okresowej reewaluacji wraz z rozwojem wiedzy i dostępności terapii celowanych.

4.6.6. Płynna biopsja

W piśmiennictwie pojawia się coraz więcej doniesień wskazujących na istotne znaczenie płynnej biopsji w postępowaniu diagnostyczno-terapeutycznym w wielu nowotworach, także pediatrycznych. Postęp technologiczny umożliwia coraz skuteczniejsze pozyskiwanie i analizę tego typu materiału biologicznego. Badanie ctDNA/ctRNA może dostarczać wiarygodnych informacji o statusie choroby nowotworowej, umożliwiać monitorowanie odpowiedzi na leczenie, wykrywanie zmian nabytych we wznowie, a w wybranych sytuacjach wspierać proces diagnostyczny (szczególnie w sytuacjach gdy pobranie materiału nowotworowego nie jest możliwe). Wyniki opublikowanych prac dotyczących m.in. *neuroblastoma*, mięsaków, nerczaka płodowego oraz *hepatoblastoma* wydają się obiecujące. Niemniej jednak heterogenność tkanki nowotworowej oraz brak wystandaryzowanych i zwalidowanych metod analitycznych nadal stanowią istotne ograniczenia we wdrażaniu tej technologii do rutynowej praktyki klinicznej. Obecnie płynna biopsja pełni rolę głównie uzupełniającą, nie zastępuje diagnostyki opartej na materiale tkankowym i wymaga walidacji zastosowanej metody w danym ośrodku.

4.7. Nowotwory mózgu u dorosłych - glejaki

4.7.1. Epidemiologia, etiologia

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

4.7.2. Badane biomarkery w glejakach rozlanych

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

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

Tabela 4.19. Warianty patogenne genów *IDH1* i *IDH2* zarejestrowane w bazie COSMIC

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

- » Mutacje w genach *IDH1* i *IDH2* są pozytywnymi czynnikami prognostycznymi. W porównaniu z glejakami IDH-wild type, pacjenci z glejakami z mutacją *IDH* mają znacznie lepsze rokowanie.
- » Mutacje w genach *IDH1* p.Arg132 i *IDH2* p.Arg172 są czynnikiem predykcyjnym w leczeniu gwiaździaka lub skąpodrzewiaka stopnia 2 WHO inhibitorem dehydrogenazy izocytrynianu.
- » Kodelecja 1p/19q jest zaburzeniem cytogenetycznym oznaczającym współistniejącą delecję krótkiego ramienia chromosomu 1 (1p) i długiego ramienia chromosomu 19 (19q). Ta cecha stanowi korzystny czynnik prognostyczny związany z lepszym PFS i OS. Zgodnie z aktualną klasyfikacją aby rozpoznać skąpodrzewiaka konieczne jest potwierdzenie obecności kodelecji 1p/19q łącznie z mutacją *IDH*.
- » Obecność homozygotycznej delecji *CDKN2A/B* jest markerem najwyższego stopnia złośliwości w grupie rozlanych gwiaździaków z mutacją *IDH*.
- » Amplifikacja genu *EGFR* jest jednym z trzech markerów molekularnych (obok aberracji 7+/10- i mutacji w promotorze *TERT*) warunkujących postawienie diagnozy glejaka o najwyższym stopniu złośliwości w guzach bez mutacji *IDH*, bez względu na obraz histopatologiczny. W dotychczasowych badaniach udowodniono negatywną wartość prognostyczną amplifikacji genu *EGFR*.

- » U około 70% wszystkich glejaków pierwotnych występujących u dorosłych obecna jest mutacja promotora *TERT*. Mutacje promotora *TERT* są istotnie związane z gorszym OS i PFS, szczególnie w glejakach IDH-wild type. Obecność mutacji w promotorze *TERT* w glejakach IDH-wild type jest wskazaniem do rozpoznania *glioblastoma* IDH-wild type. Wyróżnić można dwa najczęściej występujące warianty w obrębie promotora genu *TERT* prowadzące do nadmiernej ekspresji, a w konsekwencji zwiększenia aktywności telomerazy. Podtrzymywanie długości telomerów poprzez aktywację *TERT* jest kluczowym czynnikiem w procesie nieśmiertelniania i trwałego wzrostu komórek glejaka.

Prawidłowa nomenklatura dla najczęstszych wariantów istotnych klinicznie występujących w obrębie promotora genu *TERT*.

Nazwa historyczna (spotykana w literaturze)	Zapis HGVS względem transkryptu NM_198253.3 (MANE)	Zapis HGVS genomowy – hg19 (GRCh37)*	Zapis HGVS genomowy – hg38 (GRCh38)*
C228T	NM_198253.3:c.-124C>T	NC_000005.9:g.1295228G>A	NC_000005.10:g.1295113G>A
C250T	NM_198253.3:c.-146C>T	NC_000005.9:g.1295250G>A	NC_000005.10:g.1295135G>A

* Jeśli badamy warianty w promotorze genu *TERT* z wykorzystaniem sekwencjonowania następnej generacji lub sekwencjonowania Sangera, zapis wykrytego wariantu powinien być zgodny z sekwencją referencyjną używaną przez pipeline bioinformatyczny wykorzystywany do analizy.

- » Aberracja 7+/10– jest negatywnym czynnikiem rokowniczym w glejakach. Rozlane glejaki bez mutacji *IDH* niespełniające kryteriów morfologicznych dla glejaka wielopostaciowego, ale posiadające cechę 7+/10–, mają przebieg kliniczny podobny do jednoznacznego morfologicznie glejaka wielopostaciowego i należy je obecnie klasyfikować jako *glioblastoma* IDH-wild type. Zgodnie z aktualną klasyfikacją WHO cecha 7+/10– dotyczy jedynie zaburzenia liczby całych chromosomów. Należy mieć na uwadze, że możliwa jest również rzadziej występująca częściowa utrata chromosomu 10 (szczególnie 10q), która związana jest również ze złym rokowaniem.
- » U młodych dorosłych w przypadku glejaka rozlanego bez mutacji *IDH* zlokalizowanego w linii środkowej (midline) lub półkulach mózgu należy rozważyć dodatkową analizę mutacji genów histonu H3: *H3-3A* (dawniej *H3F3A*), *H3C2* (dawniej *HIST1H3B*), *H3C3* (dawniej *HIST1H3BC*) jako element poszerzonej diagnostyki różnicowej glejaka wielopostaciowego (*glioblastoma*, IDH-wt). Mutacje w tych genach zlokalizowane są w jednym z dwóch kluczowych kodonów p.Lys28 lub p.Gly35 (wg starszego nazewnictwa niekompatybilnego z nomenklaturą HGVS są to odpowiednio pozycje Lys27 i Gly34). Mutacje występują głównie w genie *H3-3A*, ale odnotowano również rzadziej występujące przypadki z mutacją genu *H3C2* lub *H3C3*. Aktualna klasyfikacja WHO wymienia dwa rozpoznania zależne od mutacji histonu H3: rozlany glejak linii środkowej ze zmianą H3 K27 (*diffuse midline glioma*, H3 K27-altered), rozlany glejak półkul z mutacją H3 G34 (*diffuse hemispheric glioma*, H3 G34-mutant). Oba rozpoznania zaliczane są do rozlanych glejaków typu pediatricznego o wysokim stopniu złośliwości.
- » Metylacja promotora genu *MGMT* ma znacznie prognostyczne. Poziom ekspresji *MGMT* w glejakach może wpływać na odpowiedź na leki alkilujące. Metylacja promotora reguluje ekspresję *MGMT* poprzez epigenetyczne wyciszenie genu. Pacjenci z metylacją promotora *MGMT* odnoszą korzyść z temozolomidu (TMZ), podczas gdy pacjenci bez metylacji nie.

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

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

Tabela 4.20. Podsumowanie cech molekularnych glejaków rozlanych u dorosłych (na podstawie 5 klasyfikacji WHO)

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

4.7.4. Algorytm diagnostyczny rozlanych glejaków

Strategie diagnostyczne rozlanych glejaków

1. Jednoczasowa analiza mutacji wielogenowym testem NGS oraz zaburzeń cytogenetycznych w analizie CNV. Test powinien obejmować co najmniej analizę prostych mutacji (SNV, indel): *ATRX*, *IDH1*, *IDH2*, *H3-3A*, *H3C2*, *H3C3*, *TP53*, promotor *TERT* oraz analizę CNV: delecja *CDKN2A/B*, amplifikacja *EGFR*, chromosom 1, 7, 10, 19 – z pokryciem sekwencji wystarczającym do detekcji kodelecji 1p/19q, trisomii 7, monosomii 10.

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

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

Tabela 4.21. Charakterystyczne cechy molekularne innych nowotworów gleju u dorosłych (na podstawie 5 klasyfikacji WHO)

Typ nowotworu (WHO)	Charakterystyczne cechy molekularne
Niskozróżnicowany gwiaździak z cechami piloidnymi (<i>High-grade astrocytoma with piloid features</i>)	• zaburzenia genów szlaku MAPK (fuzje <i>BRAF</i>, mutacje <i>FGFR1</i>, <i>NF1</i>) • homozygotyczna delecja <i>CDKN2A/2B</i> lub amplifikacja <i>CDK4</i> • mutacja <i>ATRX</i> lub utrata jądrowej ekspresji <i>ATRX</i> (ok. 45%)
Ograniczony glejak astrocytarny (<i>circumscribed astrocytic glioma</i>)	• mutacja <i>BRAF</i> p.Val600Glu (V600E) (60-80%) przypadków • homozygotyczna delecja <i>CDKN2A/2B</i> • inne zaburzenia w genach związanych ze szlakiem MAPK (<i>BRAF</i>, <i>NTRK1</i>, <i>NTRK2</i>, <i>NTRK3</i>, <i>RAF1</i>, <i>NF1</i>) w przypadku braku mutacji <i>BRAF</i> p.V600E
Żółtakogwiaździak pleomorficzny (<i>Pleomorphic xanthoastrocytoma</i>)	
glejak struniakowaty splotu naczyniówkowego (<i>Chordoid glioma</i>)	• mutacja p.D463H w genie <i>PRKCA</i>

Typ nowotworu (WHO)	Charakterystyczne cechy molekularne
Wyściółczak nadnamiotowy z fuzją <i>ZFTA</i> (<i>Supratentorial ependymoma, ZFTA fusion-positive</i>)	obecność genu fuzyjnego z udziałem genu <i>ZFTA</i> (niekorzystny czynnik rokowniczy)
Wyściółczak rdzenia kręgowego z amplifikacją <i>MYCN</i> (<i>Spinal ependymoma, MYCN-amplified</i>)	- amplifikacja genu <i>MYCN</i> (niekorzystny czynnik rokowniczy) - może zachodzić konieczność wykluczenia mutacji histonu H3 w diagnostyce różnicowej

4.7.6. Materiał

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

4.7.7. Metody

- » Aberracje chromosomowe obserwowane w glejakach można szybko przeanalizować za pomocą techniki FISH dzięki zastosowaniu odpowiednio dobranych sond.
- » Zastosowanie przeciwciał monoklonalnych specyficznych dla zmutowanego białka umożliwiło w pierwszych latach diagnostyki w glejakach włączenie IHC do standardowych protokołów przesiewowych jednej mutacji punktowej *IDH1* p.Arg132His. Późniejsze doniesienia wykazały, że mutacje niekanoniczne w genach *IDH1/2* – które nie są wykrywane za pomocą IHC, występują w dużym odsetku (do 80%) w niektórych lokalizacjach glejaków (np. guzy podnamiotowe). Dlatego, metodą referencyjną do genetycznej oceny *IDH1/2* jest sekwencjonowanie (metoda Sanger lub NGS), lub qPCR (pod warunkiem zapewnienia detekcji szerokiego zakresu wariantów patogennych). Test MLPA ze względu na ograniczony zakres wykrywalnych wariantów IDH nie jest zalecany.
- » qPCR jest najczulszą metodą wykrywania zmian molekularnych, takich jak mutacje punktowe lub małe delecje. Niemniej jednak qPCR jest również często zastępowany przez NGS, ponieważ zwiększa się liczba genów, u których wymagana jest ocena mutacji somatycznych.
- » Biorąc pod uwagę obecną klasyfikację WHO z 2021 r., która wymaga analizy wielu zmian genetycznych, praktyka kliniczna diagnostyki glejaka powinna opierać się na wysoko-przepustowych technologiach, takich jak NGS, i być wspomagana odpowiednio metodą FISH, MLPA lub NGS z dodatkową analizą CNV dla 1p/19q, +7/-10, amplifikacji *EGFR*, delecji *CDKN2A/B*.

4.7.8. Czas wykonania badania molekularnego

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

4.8. Rak tarczycy

4.8.1. Epidemiologia, etiologia

- » Rak tarczycy (*ang. thyroid carcinoma*) jest najczęstszym nowotworem układu endokrynnego, stanowiącym 1-2% wszystkich nowotworów złośliwych.
- » Rozpoznawany częściej u kobiet (7 miejsce pod względem częstości diagnozowania), 22 miejsce u mężczyzn; w roku 2022 w Polsce odnotowano ponad 4000 nowych rozpoznań; liczba zgonów na stałym i stosunkowo niskim poziomie.
- » Nowe rozpoznania dotyczą głównie raka brodawkowatego tarczycy w niskim stadium zaawansowania, co jest najprawdopodobniej konsekwencją lepszej dostępności do badań obrazowych oraz częstym wykonywaniem aspiracyjnych biopsji cienkoigłowych.
- » Średni wiek w chwili rozpoznania: 50 lat (kobiety: 49 lat, mężczyźni 54 lata).
- » Obok płci i wieku do głównych czynników ryzyka rozwoju choroby należą ekspozycja na promieniowanie jonizujące, niedobór/nadmiar jodu w diecie, predyspozycje genetyczne.

4.8.2. Predyspozycje genetyczne

- » Zróżnicowane raki tarczycy wykazują charakter choroby o typie sporadycznym,
- » Większość raków zróżnicowanych tarczycy charakteryzuje się obecnością wariantów somatycznych w kodonie p.(V600E) w eksonie 15 genu *BRAF* oraz zmian w obszarze promotorowym genu *TERT* (c.-124C>T, c.-146C>T).
- » Zidentyfikowano warianty germinalne predysponujące do rozwoju tego typu histologicznego nowotworu jak np. mutacje w genie *CHEK2*.
- » Ponad 90% przypadków raka rdzeniastego tarczycy jest wynikiem obecności germinalnego wariantu patogennego w protoonkogenie *RET* i może występować jako rodzinny rdzeniasty rak tarczycy lub stanowić składową zespołu mnogich nowotworów gruczołów wewnątrzwydzielniczych MEN2 (MEN2A lub MEN2B).
- » Warianty patogene protoonkogenu *RET* obserwowane są najczęściej w obrębie siedmiu eksonów: 8, 10, 11, 13, 14, 15 i 16. Wariant eksonu 8 wykrywany jest głównie w populacji greckiej.

Tabela 4.22. Najczęstsze warianty patogene protoonkogenu *RET* i sposoby postępowania wśród nosicieli według rekomendacji ATA (*American Thyroid Association*)

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

4.8.3. Typy histologiczne

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

Tabela 4.23. Typy histologiczne raków zróżnicowanych tarczycy i frekwencja występowania mutacji w genie *BRAF* oraz *TERT*

Typ histologiczny raka	Markery molekularne (Częstość występowania), %
NIFTP	<i>BRAF</i> p.Lys601Glu (3-7%) (K601E)
Rak brodawkowy tarczycy	
Wariant klasyczny	<i>BRAF</i> p.Val600Glu (45-50%) (V600E)
Wariant pęcherzykowy	<i>BRAF</i> p.Lys601Glu (5%) (K601E)
Wariant wysokokomórkowy	<i>BRAF</i> p.Val600Glu (80-100%) (V600E) mutacje promotora <i>TERT</i> (22-27%)
Rak pęcherzykowy tarczycy	mutacje promotora <i>TERT</i> (10-20%)
Rak z komórek Hurtle'a	-
Nisko zróżnicowany rak tarczycy	mutacje promotora <i>TERT</i> (40%) <i>BRAF</i> p.Val600Glu (10-20%) (V600E)
Rak anaplastyczny	mutacje promotora <i>TERT</i> (40-50%) <i>BRAF</i> p.Val600Glu (20-40%) (V600E)

4.8.4. Terapia celowana

- » Postępowanie terapeutyczne w raku tarczycy jest złożone, wielodyscyplinarne i ściśle związane ze stopniem zaawansowania choroby (leczenie chirurgiczne, leczenie jodem promieniotwórczym oraz farmakologiczne).
- » Zaawansowane, nieoperacyjne oraz oporne na leczenie jodem promieniotwórczym postaci raka zróżnicowanego tarczycy są poddawane leczeniu z wykorzystaniem inhibitorów kinaz tyrozynowych (inhibitory o szerokim spektrum działania blokują np. VEGFR, FGFR, RET).
- » Chorzy z rozpoznaniem raka anaplastycznego oraz obecnością wariantu genu *BRAF* p.(Val600Glu) mogą zostać poddani równoległemu leczeniu farmakologicznemu z zastosowaniem inhibitorów BRAF (dabrafenib) oraz MEK (trametynib).
- » Leczenie zaawansowanych oraz jodoopornych postaci raka brodawkowego tarczycy opiera się na zastosowaniu terapii celowanej w oparciu o wysoce selektywny inhibitor TRK w przypadku, gdy w próbce tkankowej wykryje się fuzję z udziałem *NTRK1* lub *NTRK2* lub *NTRK3*.
- » Chorzy ze zróżnicowanym rakiem tarczycy, u których nie odniesiono korzyści terapeutycznych w wyniku zastosowania leczenia I linii, a w badaniu genetycznym wykryto fuzję genu *RET*, mogą zostać poddani terapii w oparciu o selektywne inhibitory RET (selperkatynib i pralsetynib). Leczenie w oparciu o selperkatynib i pralsetynib u chorych z DTC

i fuzjami genu *RET* zostało jak dotąd zatwierdzone przez FDA w Stanach Zjednoczonych. Tylko selperkatynib uzyskał warunkową autoryzację EMA do stosowania na terenie Unii Europejskiej. Natomiast refundacja jest zależna od wewnętrznych decyzji państwowych instytucji płatniczych. Na chwilę obecną w Polsce, nie ma dostępności do tych leków w ramach programów lekowych dla chorych z DTC.

- » Chory z postacią przerzutową raka rdzeniastego tarczycy są leczeni z wykorzystaniem nieselektywnych inhibitorów kinaz tyrozynowych (chorzy z wariantami genu *RET* p.Met918Thr lepiej odpowiadają na leczenie mutlikinazowymi inhibitorami białek RET, MET, VEGFR lub białek RET, VEGFR2, EGFR).
- » Dla chorych z nieoperacyjnym, miejscowo zaawansowanym lub przerzutowym rakiem rdzeniastym tarczycy dostępny jest program lekowy w II linii leczenia, ukierunkowany molekularnie i opierający się na zastosowaniu selektywnych inhibitorów RET.
- » Warunkiem koniecznym kwalifikacji do programu jest potwierdzenie obecności patogennego/prawdopodobnie patogennego wariantu somatycznego w genie *RET*, progresja po leczeniu I linii, bądź brak odpowiedzi na wcześniejsze terapie. Obecność mutacji o charakterze germinalnym w genie *RET* jest dopuszczalnym kryterium przy braku możliwości wykonania badań na materiale z tkanki nowotworowej.

4.8.5. Diagnostyka genetyczna

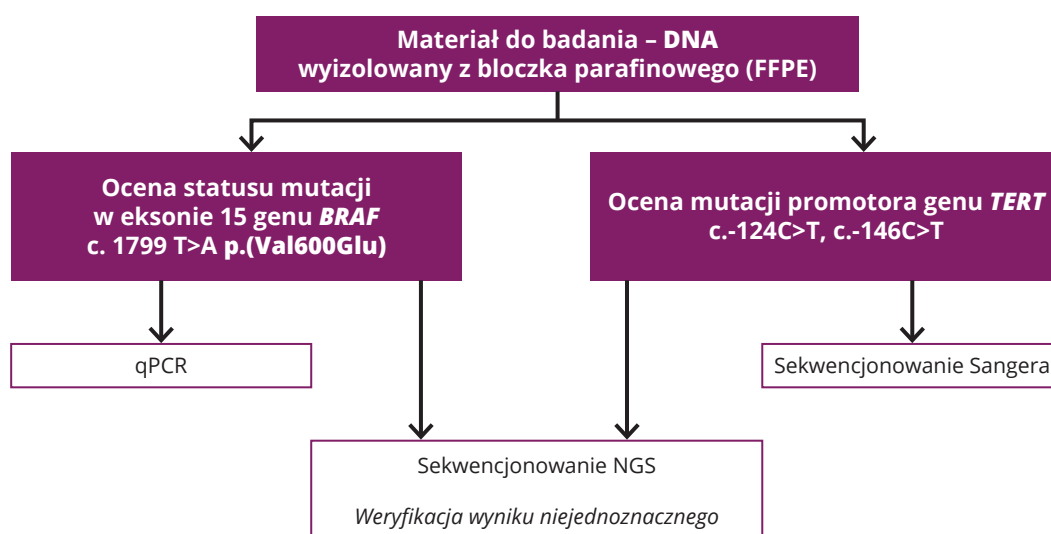
- » W przypadku podejrzenia zespołu MEN2A badanie należy wykonać u dzieci pomiędzy 2-3 rokiem życia, maksymalnie do momentu ukończenia 5 lat badanie genu *RET*. W rodzinach z zespołem MEN2B badanie przeprowadza się przed ukończeniem 1 roku życia, zwykle najwcześniej jak jest to możliwe.
- » Obecnie nie ustalono zasadności wykonywania rutynowych badań przesiewowych w celu wykrycia mutacji somatycznych w protoonkogenie *RET*. Natomiast ocena wariantu somatycznego genu *RET* ma znaczenie w kwalifikacji do programu lekowego.
- » Badanie statusu wariantów somatycznych genu *BRAF* oraz w obszarze promotorowym genu *TERT* pozwala na ocenę stratyfikacji ryzyka w oparciu o rekomendacje ATA (Amerykańskie Towarzystwo Tyreologiczne).
- » Personalizacja leczenia oraz możliwość zastosowania leków w ramach terapii ukierunkowanych molekularnie wiąże się z potrzebą wykonywania badań w oparciu o panele wielogenowe oceniające obecność mutacji przynajmniej w genie *RET*, *BRAF*, fuzje z udziałem *RET*, *NTRK1-3*.

4.8.6. Materiał

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

4.8.7. Metody

- » Badanie statusu wariantów protoonkogenu *RET* przeprowadza się za pomocą sekwencjonowania NGS lub sekwencjonowania Sangera. W przypadku zastosowania NGS zaleca się ocenę pełnej sekwencji genu *RET*.
- » Status mutacji p.(Val600Glu) w eksonie 15 genu *BRAF* oraz zmian w obszarze promotorowym genu *TERT* (c.-124C>T, c.-146C>T) oznaczany jest przy pomocy metody qPCR lub sekwencjonowania Sangera. Uzyskanie wyniku niejednoznacznego należy zweryfikować w oparciu o zastosowanie sekwencjonowania metodą NGS.



Rys. 4.8. Zastosowanie diagnostyki genetycznej do oceny wariantów somatycznych genu *BRAF* i *hTERT* w rakach zróżnicowanych tarczycy

4.8.8. Czas wykonania badania molekularnego

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

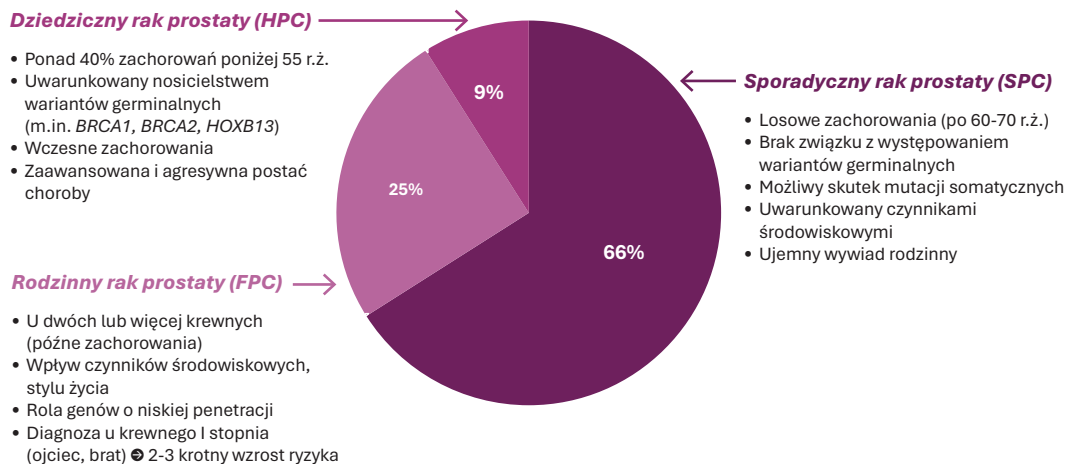
4.9. Rak gruczołu krokowego

4.9.1. Epidemiologia, etiologia

- » Wśród nowych rozpoznań w 2023 roku dla nowotworów złośliwych u mężczyzn rak gruczołu krokowego (*ang. prostate cancer*) był diagnozowany najczęściej (23710 pacjentów) i stanowił 24,5% wszystkich zachorowań. W Polsce współczynnik zapadalności na raka gruczołu krokowego jest względnie niski w porównaniu do innych krajów europejskich, a zgonu dotyczą 5859 mężczyzn rocznie.
- » W Polsce obserwuje się wzrost zachorowalności na raka gruczołu krokowego od 50 roku życia, natomiast szczyt nowych rozpoznań (75% zachorowań) oraz 90% zgonów dotyczy mężczyzn po 75 roku życia.
- » Do głównych czynników ryzyka zalicza się: wiek, otyłość, dietę wysokotłuszczową, narażenie na męskie hormony płciowe (androgeny) oraz predyspozycje dziedziczne.

4.9.2. Predyspozycje genetyczne

- » Ze względu na uwarunkowania genetyczne i wywiad rodzinny rak prostaty dzieli się na 3 główne typy: rak sporadyczny (*ang. sporadic prostate cancer, SPC*), rak rodzinny (*ang. familial prostate cancer, FPC*) i rak dziedziczny (*ang. hereditary prostate cancer, HPC*) (Ryc nr 4.9.)



Rys. 4.9. Podział raków prostaty z uwzględnieniem etiologii i częstości występowania

- » Częstość patogennych wariantów germinalnych u chorych będących w zaawansowanym stadium choroby wynosi 11%-30%, dotyczą one głównie genów *BRCA1/2*. Natomiast na uwagę zasługują, także zmiany w obrębie innych genów zaangażowanych w naprawę DNA: *ATM*, *CDK12*, *FANCD2* oraz *RAD51*.
- » Nosiciele wariantu dziedzicznego *BRCA2* częściej są diagnozowani w młodszy wieku, mają bardziej agresywny przebieg choroby i o połowę krótszy czas przeżycia w porównaniu do pacjentów bez mutacji. Badania wykazały, że warianty dziedziczne *BRCA1/2* są związane ze złym rokowaniem i gorszą odpowiedzią na leczenie.
- » Warianty o charakterze prawdopodobnie patogennym i patogennym w genie *BRCA1* również zwiększają ryzyko wystąpienia choroby, ale w mniejszym stopniu niż dla genu *BRCA2*.

- » Wytyczne NCCN dotyczące raka gruczołu krokowego zalecają, aby panele testów genetycznych (dziedzicznych i somatycznych) obejmowały geny związane z zespołem Lyncha (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2*) oraz inne geny zaangażowane w naprawę DNA (*BRCA1/2*, *ATM*, *PALB2*, *CHEK2*).
- » W zależności od kontekstu klinicznego odpowiednie może być testowanie dodatkowych genów. Na szczególną uwagę zasługuje wariant patogeniczny c.251G>A p.(Gly84Glu) w eksonie 1 genu *HOXB13*. Na podstawie jak dotąd opublikowanych danych szacuje się, że mężczyźni pochodzenia europejskiego będący nosicielami patogenicznego wariantu G84E wykazują około 2,8- do 4-krotnie większe ryzyko zachorowania na raka prostaty o agresywnym przebiegu. Obecność wariantu nie ma obecnie wyraźnych implikacji terapeutycznych w zaawansowanej chorobie. Testowanie tego genu może mieć jednak zastosowanie w poradnictwie rodzinnym.
- » W przypadku wykrycia wariantów w *BRCA1/2*, *ATM*, *CHEK2*, *PALB2* lub *HOXB13* pacjenci powinni być kierowani do poradni genetycznej w celu oceny możliwości wystąpienia zespołu dziedzicznej predyspozycji do raka piersi i jajnika (ang. *Hereditary Breast and Ovarian Cancer*, *HBOC*), zwiększonego ryzyka zachorowania na raka trzustki, jelita grubego i prostaty. W przypadku wykrycia wariantu germinalnego poradnictwem należy objąć krewnych probanta (obu płci).

Tabela 4.24. Częstość mutacji germinalnych i somatycznych u chorych na raka gruczołu krokowego

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

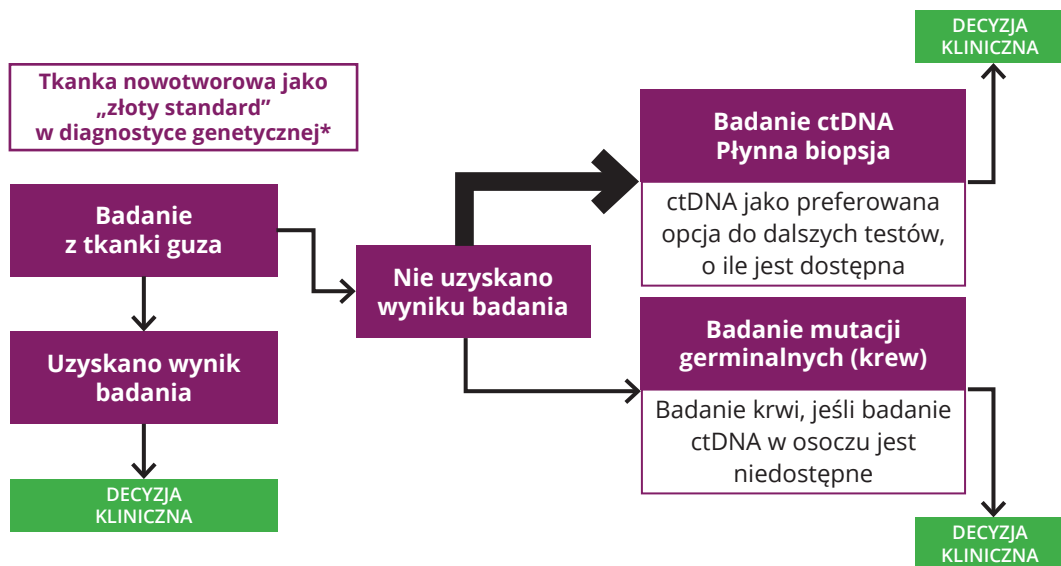
4.9.3. Diagnostyka molekularna

- » Ocena profilu molekularnego chorego umożliwia podjęcie decyzji odnośnie sposobu leczenia, przeprowadzenia diagnostyki w rodzinie oraz pozwala na udział chorego w badaniach klinicznych.
- » Znajomość statusu mutacji w genach *BRCA1/2* oraz *ATM*, *CDK12*, *CHEK2*, *PALB2*, *RAD51C* jest kluczowa u chorych na zaawansowaną i oporną na hormonoterapię postać raka prostaty dla optymalnego leczenia.
- » Obecność mutacji patogenicznej lub prawdopodobnie patogenicznej (germinalnej lub somatycznej) w genie *BRCA1* lub *BRCA2* pozwala na stosowanie PARPi (olaparyb).
- » Obecność patogenicznej lub prawdopodobnie patogenicznej mutacji (germinalnej lub somatycznej) w genie *BRCA1* lub *BRCA2* umożliwia zastosowanie leczenia niraparybem + oc-tanem abirateronu.

- » Obecność patogennej lub prawdopodobnie patogennej mutacji (germinalnej lub somatycznej) w genach HRR (*BRCA2*, *ATM*, *CDK12*, *CHEK2*, *BRCA1*, *PALB2*, *RAD51C*) umożliwia zastosowanie leczenia talazoparybem w skojarzeniu z enzalutamidem.

4.9.4. Materiał

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



Rys 4.10. Algorytm diagnostyczny genów: *BRCA1*, *BRCA2*, *ATM*, *CDK12*, *RAD51B*, *RAD51D*, *CHEK2**

4.9.5. Metody

Ze względu na różnorodność wariantów występujących w genach *BRCA2*, *ATM*, *CDK12*, *CHEK2*, *BRCA1*, *PALB2*, *RAD51C* oraz konieczność zbadania pełnych sekwencji eksonowych i na granicach ekson/intron badania wykonuje się metodą NGS.

4.9.6. Czas wykonania badania molekularnego

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

4.10. Rak trzustki

4.10.1 Epidemiologia, etiologia

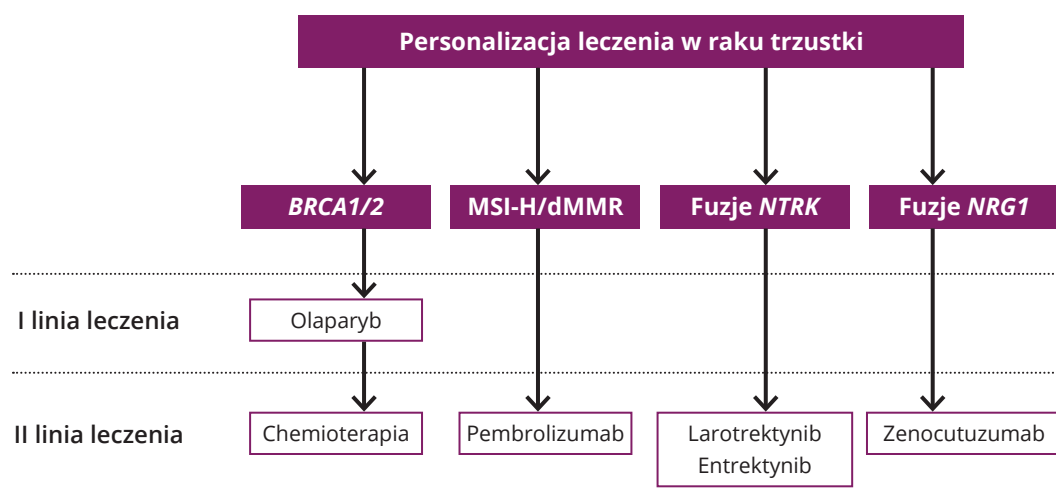
- » Rak trzustki (*ang. Pancreatic cancer, PC*) to jeden z najbardziej agresywnych nowotworów złośliwych, w którym 5-letnie przeżycie obserwuje się u mniej niż 5% chorych.
- » 95% przypadków stanowią gruczolakoraki przewodowe wywodzące się z części zewnątrzwydzielniczej w głowie trzustki, pozostałe rozpoznania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

4.10.2 Predyspozycje genetyczne

- » Prawie 10% nowych przypadków raka trzustki stanowią chorzy ze stwierdzoną predyspozycją genetyczną. Warianty patogenne takich genów jak: *BRCA2*, *CDKN2A*, *ATM*, *STK11*, *PRSS1/PRSS2*, *SPINK1*, *PALB2* i genów naprawy niesparowanych zasad DNA są powiązane ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia raka trzustki (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2*).
- » Rodzinne występowanie raka trzustki (choroba u więcej niż trzech krewnych pierwszego stopnia oraz zachorowania poniżej 50 roku życia) ponad 30-krotnie zwiększa ryzyko wystąpienia choroby.
- » Rodzinne postacie gruczolakoraków są związane występowaniem zespołu Lyncha/HNPCC oraz dziedzicznej predyspozycji do raka piersi i/lub jajnika, które są uwarunkowane wariantami patogennymi w genach *BRCA1* i *BRCA2*.
- » Częstość występowania germinalnych wariantów patogennych w genie *BRCA2* wynosi między 5%-10% przypadków, natomiast w *BRCA1* około 1%.
- » Inne zespoły rodzinne związane z rakiem trzustki to: dziedziczna predyspozycja do zapalenia trzustki, zespół Peutza-Jeghersa, ataksja teleangiektazja, rodzinny atypowy czerniak mnogi (*FAMMM Familial Atypical Multiple Mole Melanoma*) i zespół Li-Fraumeni.
- » Oprócz zmian o charakterze germinalnym, rozwój choroby może być wynikiem zaburzeń genetycznych o charakterze somatycznym (*KRAS*, warianty patogenne obecne w ponad >90% gruczolakorakach trzustki, mutacje inaktywujące w genach supresorowych: *TP53*, *p16/CDKN2A* i *SMAD4*).
- » Chorzy z obciążeniem rodzinnym oraz należący do grup wysokiego ryzyka powinni zostać objęci poradnictwem genetycznym, z uwzględnieniem wykonania analizy mutacji w genach *BRCA1* i *BRCA2*.

4.10.3 Diagnostyka molekularna

- » Obecność germinalnych wariantów patogennych w genach *BRCA1/2* u chorych z zaawansowaną i nieoperacyjną postacią raka trzustki, pozwala na zastosowanie inhibitorów PARP, co daje korzyści w postaci wydłużenia przeżycia wolnego od progresji.
- » Przy braku wykrytych wariantów o charakterze prawdopodobnie patogennym, bądź patogennym w genach *BRCA1* i *BRCA2*, można rozważyć ocenę niestabilności mikrosatelitarnej (MSI) oraz fuzje genów *NTRK* (*NTRK1*, *NTRK2*, *NTRK3*) i *NRG1*.
- » Obecność fuzji genów *NTRK* (*NTRK1*, *NTRK2*, *NTRK3*) pozwala na zastosowanie inhibitorów TRK (larotrektylibu i entrektylibu) lub przeciwciała monoklonalnego anty-HER2/HER3 w przypadku fuzji *NRG1*. Natomiast u chorych z guzami wykazującymi niestabilność satelitarną MSI-H/dMMR algorytm postępowania zaleca zastosowanie pembrolizumabu (Rys. 4.11.).



Rys. 4.11. Algorytm postępowania terapeutycznego w raku trzustki z uwzględnieniem profilu molekularnego guza

4.10.4. Materiał

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

4.10.5. Metody

- » Ze względu na różnorodność mutacji występujących w genach *BRCA1* i *BRCA2* oraz konieczność zbadania pełnych sekwencji eksonowych oraz na granicach ekson/intron badanie wariantów typu SNV wykonuje się w oparciu o sekwencjonowanie NGS z zastosowaniem paneli.
- » Sekwencjonowanie następnej generacji – badanie fuzji *NTRK* (z użyciem RNA nowotworowego), umożliwia identyfikację partnerów fuzyjnych oraz punktów złamań.
- » Ocena niestabilności mikrosatelitarnej (MSI) w oparciu o PCR z elektroforezą kapilarną, lub ddPCR lub NGS.

4.10.6. Czas wykonania badania molekularnego

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

4.11. Nowotwór podścieliskowy przewodu pokarmowego (GIST)

4.11.1. Epidemiologia, etiologia

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

Tabela 4.25. Lokalizacja GIST

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

4.11.2. Genetyka molekularna GIST

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

Lokalizacja mutacji w genie *KIT*:

- ekson 9 (domena zewnątrzłonowa odpowiedzialna za wiązanie ligandu);
- ekson 11 (domena przyłonowa odpowiedzialna za autoinhibicję wolnego receptora);
- ekson 13 (domena kinazy tyrozynowej);
- ekson 17 (domena kinazy tyrozynowej);

Lokalizacja mutacji w genie *PDGFRA*:

- ekson 12 (domena przyłonowa odpowiedzialna za autoinhibicję wolnego receptora);
- ekson 14 (domena kinazy tyrozynowej);
- ekson 18 (domena kinazy tyrozynowej);

- » Mutacje zlokalizowane w eksonie 8 genu *KIT* są bardzo rzadkie (0,1-0,2%) i nie uwzględniane w testach diagnostycznych.

Najważniejsze cechy GIST z mutacją genu *KIT*:

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

Najważniejsze cechy GIST z mutacją genu *PDGFRA*:

- obecny komponent o epitelioidnej morfologii komórki nowotworowej;
- mogą być CD117-negatywne;
- zlokalizowane głównie w żołądku;
- związane z wrażliwością na TKI, pierwotna oporność w przypadku mutacji p.Asp842Val (D842V);
- mniejsze ryzyko przerzutów w porównaniu z mutacją *KIT*.

Nowotwory podścieliskowe przewodu pokarmowego *KIT* i *PDGFRA* - negatywne stanowią heterogenną grupę nowotworów. Część z nich charakteryzuje dysfunkcja dehydrogenazy bursztynianowej związana z mutacją (zwykle germinálną) jednego z genów kodujących podjednostki enzymu (*SDHA*, *SDHB*, *SDHC*, *SDHD*) lub epigenetyczną supresją związaną z metylacją promotora genu (zwykle *SDHC*). Wśród nowotworów z zachowaną funkcją dehydrogenazy bursztynianowej opisano dotychczas przypadki mutacji p.Val600Glu genu *BRAF* oraz rearanżacje genów *BRAF*, *FGFR1*, *NTRK1*, *NTRK3*.

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

Zespół Carneya-Stratakisa

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

Triada Carneya

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

Nurofibromatoza typu I

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

Rodzinny GIST

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

Tabela 4.26. Mutacje genów *KIT* i *PDGFRA*

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

Tabela 4.27. Genetyka molekularna GIST z prawidłowym statusem genów *KIT* i *PDGFRA* (*wild-type*)

Gen	Zaburzenia molekularne
GIST z upośledzeniem funkcji dehydrogenazy bursztynianowej (<i>SDH-deficient</i>)	
<i>SDHA</i>	- Mutacje w genach <i>SDH</i> kodujących podjednostki dehydrogenazy bursztynianowej - Metylacja promotora genu <i>SDHC</i>
<i>SDHB</i>	
<i>SDHC</i>	
<i>SDHD</i>	

Gen	Zaburzenia molekularne
GIST z prawidłową aktywnością dehydrogenazy bursztynianowej (<i>SDH-competent</i>)	
<i>NF1</i>	• Mutacje związane z neurofibromatozą typu I
<i>BRAF</i>	• Pierwotna mutacja p.Val600Glu • Geny fuzyjne z udziałem genu <i>BRAF</i>
<i>FGFR1</i>	• Geny fuzyjne z udziałem genu <i>FGFR1</i>
<i>NTRK1</i> <i>NTRK3</i>	• Geny fuzyjne z udziałem genów <i>NTRK</i> , głównie <i>NTRK3</i>

4.11.3. Diagnostyka genetyczna

Zakres

A. badania czynników predykcyjnych do leczenia imatynibem:

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

B. badania czynników predykcyjnych do leczenia inhibitorami TRK

- rearanżacja genów *NTRK1*, *NTRK2*, *NTRK3* metodą NGS

C. badania czynników predykcyjnych do leczenia inhibitorem BRAF

- Badanie wariantu *BRAF* p.Val600Glu (V600E) może być wykonane w ramach szerszego panelu NGS lub sekwencjonowaniem Sangera lub qPCR.

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

W przypadku GIST bez mutacji *KIT* i *PDGFRA* miejscowo zaawansowanych lub przerzutowych oraz niemających zadowalających opcji leczenia należy wykonać badanie rearanżacji genów *NTRK1*, *NTRK2*, *NTRK3* techniką NGS będących czynnikami predykcyjnymi dla inhibitorów kinaz TRK oraz badanie wariantu *BRAF* p.Val600Glu (V600E) do leczenia skojarzonego inhibitorami BRAF i MEK.

4.11.4. Materiał

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

4.11.5. Czas wykonania badania

- » Zaawansowany nieoperacyjny GIST lub w stadium rozsiewu:

Wynik powinien być uzyskany w jak najkrótszym możliwym czasie, który nie powinien przekraczać:

- 10 dni roboczych dla metody sekwencjonowania Sanger, qPCR,
- 20 dni roboczych dla metody NGS.

- » Guzy poddane resekcji z ryzykiem nawrotu:

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

Wynik powinien być gotowy w jak najkrótszym możliwym czasie, który nie powinien przekraczać od momentu otrzymania materiału:

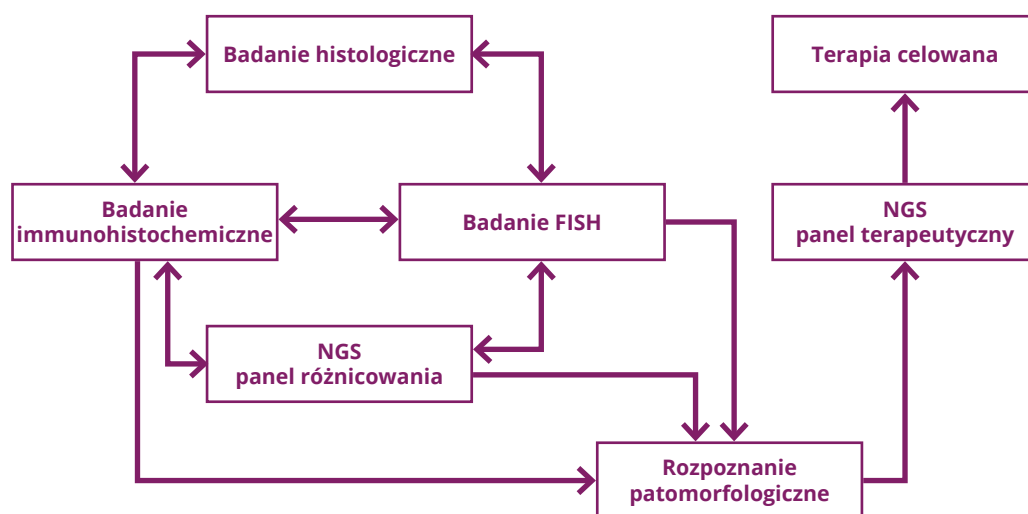
- 10 dni roboczych dla metody sekwencjonowania Sanger,
- 20 dni roboczych dla metody NGS.

4.12. Mięsaki

4.12.1. Biologia, epidemiologia

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

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



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

4.12.2. Badane Markery

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

- » Panel podstawowy powinien zawierać sondy dla genów: *EWSR1*, *SS18*, *FOXO1*, *FUS*, *PDGFB*, *MDM2* (amplifikacja), *USP6*.
- » Druga grupa powinna uwzględnić panel z użyciem sond dla genów: *TFE3*, *MAML2*, *YWHAE*, *JAZF1*, *RB1*, *PHF1*, *CAMTA1*, *DDIT3*, *c-MYC* (amplifikacja), *BCOR*.

W mięsakach tkanek miękkich możemy również identyfikować warianty somatyczne – zmiany punktowe, małe delecje/insercje w obrębie jednego genu. Do oceny takich wariantów genetycznych najczęściej stosuje się sekwencjonowanie metodą Sangera, które umożliwia weryfikację obecności istotnych klinicznie zmian genetycznych (np. ocena statusu genów: *H3-3A*, *H3-3B*, *GNAS*, *IDH1*, *IDH2*) oraz pozwala na weryfikację obecności wariantów fuzyjnych wykrytych w technologii NGS.

Istotne klinicznie zmiany punktowe i małe delecje/insercje w mięsakach:

- » Mutacje w genach *KIT*, *PDGFRA*, nowotwory desmoidne (mutacje w genach *CTNNB1*, *APC*) (*GIST*);
- » Mutacje w genach *H3-3A*, *H3-3B* – w diagnostyce różnicowej guza olbrzymiokomórkowego i chrzęstniakomięsaka (*chondrosarcoma*);
- » Mutacje w genach *IDH1/2* w diagnostyce *chondrosarcoma*;
- » Mutacje w genie *GNAS* w diagnostyce różnicowej dysplazji włóknistej i śluzaków (zmiany łagodne) z *myxofibrosarcoma* (nowotwór złośliwy);
- » Często wykrywane są mutacje w genach *TP53*, *ATRX*, *RB1*, *CDKN2A*, *CDKN2B*, *NF1* w różnych typach mięsaków.

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

Najczęściej definiowane zaburzenia genetyczne w mięsakach tkanek miękkich i kości przedstawiono w tabeli 4.28.

Tabela 4.28. Fuzje genowe i amplifikacje w nowotworach tkanek miękkich

Typ mięsaka	Fuzje genowe
<i>Tłuszczak (Lipoma)</i>	<i>EBF1::LOC204010, HMGA2::CXCR7, HMGA2::EBF1, HMGA2::LHPF, HMGA2::LPP, HMGA2::NFIB, HMGA2::PPAP2B, HMGA2::LPP, LPP::C12orf9</i>
<i>Tłuszczak zarodkowy (Lipoblastoma)</i>	<i>COL1A2::PLAG1, HAS2::PLAG1, PLAG1::RAD51L1, COL3A1::PLAG1</i>
<i>Chrzęstniak tłuszczakowaty (Chondroid lipoma)</i>	<i>C11orf95::MKL2</i>
<i>Tłuszczakomięsaki (Myxoid/round liposarcoma)</i>	<i>FUS::DDIT3, EWSR1::DDIT3</i>
<i>Naczyniakowłókniak (Soft tissue angiofibroma)</i>	<i>AHRR::NCOA2, GTF2I::NCOA2</i>
<i>Włókniakomięsak guzowaty skóry (Dermatofibrosarcoma protuberans)</i>	<i>COL1A1::PDGFB</i>
<i>Mięsak włókniako-śluzakowaty wysokozróżnicowany (Low-grade fibromyxoid sarcoma)</i>	<i>FUS::CREB3L2, FUS::CREB3L1, EWSR1::CREB3L1</i>
<i>Mięsak śluzowo-zapalny włóknisty (Myxoinflammatory fibroblastic sarcoma)</i>	<i>MGEA5::TGFB3</i>
<i>Zapalny guz miofibroblastyczny (Inflammatory myofibroblastic tumor)</i>	<i>CARS::ALK, SEC31A::ALK, ATIC::ALK, RANBP2::ALK, CLTC::ALK, TPM3::ALK, TPM4::ALK, PPFIBP1::ALK, RREB1::TFE3</i>
<i>Śluzakowłókniakomięsak (Myxofibrosarcoma)</i>	<i>KIAA2026::NUDT11, CCBL1::ARL1, AFF3::PHF1</i>
<i>Guz olbrzymiokomórkowy pochewki ścięgna (Tenosynovial giant cell tumor)</i>	<i>COL6A3::CSF1</i>
<i>Pericytoma with t(7;12)t(7;12)</i>	<i>ACTB::GLI1</i>
<i>Mięsak prążkowanokomórkowy pęcherzykowy (Alveolar rhabdomyosarcoma)</i>	<i>PAX3::FOXO1, PAX7::FOXO1, PAX3::FOXO4, PAX3::NCOA1, PAX3::NCOA2, FOXO1::FGFR1</i>
<i>Mięsak prążkowanokomórkowy wrzecionowatokomórkowy (Spindle cell rhabdomyosarcoma)</i>	<i>SRF::NCOA2, TEAD1::NCOA2</i>
<i>Angiomatoid fibrous histiocytoza</i>	<i>EWSR1::CREB1, FUS::ATF1, EWSR1::ATF1</i>
<i>Guz kostniejący włóknisto-śluzowy (Ossifying fibromyxoid tumor)</i>	<i>EP400::PHF1, MEAF6::PHF1, ZC3H7B::BCOR</i>
<i>Myoepithelioma/mixed tumor</i>	<i>EWSR1::PBX1, EWSR1::POU5F1, EWSR1::ZNF444 EWSR1::KLF17, EWSR1::PBX3, FUS::KLF17, LIFR::PLAG1, SRF::E2F1</i>
<i>Mięsak jasnokomórkowy (Clear cell sarcoma)</i>	<i>EWSR1::ATF1, EWSR1::CREB1, IRX2::TERT</i>
<i>Mięsak maziówkowy (Synovial sarcoma)</i>	<i>SS18::SSX1, SS18::SSX2, SS18::SSX4, SS18L1::SSX1</i>
<i>Biphenotypic sinonasal sarcoma</i>	<i>PAX3::MAML3, PAX3::NCOA1, PAX3::FOXO1</i>

Typ mięsaka	Fuzje genowe
Mięsak pęcherzykowy tkanek miękkich (Alveolar soft part sarcoma)	ASPSCR1::TFE3
Pozakostny śluzakowaty chrzęstniakomięsak (Extraskeletal myxoid chondrosarcoma)	EWSR1::NR4A3, TAF15::NR4A3, TFG::NR4A3, TCF12::NR4A3, HSPA8::NR4A3
Desmoplastyczny guz okrągłokomórkowy (Desmoplastic small round cell tumor)	EWSR1::WT1
Mięsaki okrągłokomórkowe z rearanżacją (Round cell sarcoma with rearrangement)	EWSR1::FLI1, EWSR1::ERG, FUS::ERG, EWSR1::ETV1, EWSR1::ETV4, EWSR1::FEV, EWSR1::NFATC2, EWSR1::PATZ1, EWSR1::SMARCA5, EWSR1::POU5F1, EWSR1::SP3, FUS::FEV, CIC::DUX4, CIC::FOXO4, BCOR::CCNB3, FUS::NCATc2
Nowotwór podścieliskowy przewodu pokarmowego (Gastrointestinal stromal tumor)	ETV6::NTRK3
Perivascular epithelioid cell tumors	SFPQ::TFE3
Chrzęstniak tkanek miękkich (Soft tissue chondroma)	HMGA2::LPP
Chrzęstniakomięsak mezenchymalny (Mesenchymal chondrosarcoma)	HEY1::NCOA2 IRFBP2::CDX1
Epithelioid hemangioma	ZFP36::FOSB
Epithelioid hemangioendothelioma	WWTR1::CAMTA1, YAP1::TFE3
Pseudomyogenic hemangioendothelioma	SERPINE1::FOSB
Naczyniakomięsak (Angiosarcoma)	CIC::LEUTX
Atypical lipomatous tumor	MDM2 (and/or CDK4)
Postradiation angiosarcoma of the breast	MYC (and/or CDK4)

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

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

Fuzje genowe

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

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

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

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

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

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

4.12.3. Materiał

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

4.12.4. Metody

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

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

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

4.12.5. Czas wykonania badania molekularnego

Wynik powinien być uzyskany w jak najkrótszym możliwym czasie, który nie powinien przekraczać od momentu otrzymania materiału:

- 10 dni roboczych dla metody FISH oraz sekwencjonowania Sangera,
- 20 dni roboczych dla metody NGS.

4.13. Rak piersi

4.13.1. Epidemiologia, etiologia

- » Rak piersi (*ang. breast cancer, BC*) jest najczęstszym nowotworem złośliwym u kobiet stanowiąc 23% wszystkich zachorowań oraz pozostaje drugą po raku płuc przyczyną zgonów.
- » W Polsce wg danych KRN 2023 na raka piersi zachorowało 21 716 kobiet i 208 mężczyzn, odnotowano 6757 zgonów wśród kobiet i 70 wśród mężczyzn.
- » Największą zachorowalność obserwuje się u kobiet w przedziale wiekowym 55-65 lat, choć aż 19% rozpoznań dotyczy kobiet w wieku 30-50 lat, a zachorowalność poniżej 40 r.ż. wykazuje słaby, ale stały trend wzrostowy.
- » Rozpoznanie raka piersi opiera się na badaniu klinicznym w połączeniu z badaniami obrazowymi i jest potwierdzone oceną histopatologiczną.
- » Oprócz płci, wieku, czynników hormonalnych i reprodukcyjnych oraz stylu życia głównymi czynnikami ryzyka wystąpienia raka piersi są predyspozycje genetyczne.

4.13.2. Predyspozycje genetyczne

- » Cechy silnej dziedzicznej predyspozycji o znanym jednogenowym podłożu genetycznym dotyczą 5-10% nowotworów piersi.
- » Uważa się, że ponad 90% przypadków dziedzicznej predyspozycji do raka piersi u kobiet jest wynikiem obecności wariantów patogennych w genach *BRCA1/2*.
- » Ryzyko raka piersi u nosicielki wariantu patogennego w genie *BRCA1* lub *BRCA2* szacowane jest w zależności od genu na 40-85% w ciągu życia, co oznacza 3 do 7 krotny wzrost w stosunku do populacji ogólnej kobiet.
- » U mężczyzn posiadających warianty patogene w genach *BRCA1/2* szacuje się, że ryzyko zachorowania na raka piersi w ciągu całego życia wynosi odpowiednio od 1,2% do 8% - 10% co oznacza 12 – 100 krotny wzrost ryzyka w stosunku do populacji ogólnej mężczyzn.
- » Około 20-30% przypadków kolejno rozpoznawanych zachorowań na raka piersi ma charakterystyczne cechy rodowodowo-kliniczne wskazujące na predyspozycje genetyczne różnego typu.
- » Podatność genetyczna na zachorowanie może być również związana z mutacjami w innych genach: np. *ATM, BARD1, CDH1, CHEK2, NF1, PALB2, PTEN, STK11, TP53*

4.14.3. Podtypy molekularne

- » Identyfikacja podtypów molekularnych raka piersi (Luminalny A, Luminalny B HER2+, Luminalny B, HER2+, Potrójnie ujemny) opiera się na immunohistochemicznej (IHC) analizie ekspresji receptora estrogenowego, progesteronowego (odpowiednio ER i PR) i receptora ludzkiego naskórkowego czynnika wzrostu typu 2 (HER2). Dodatkowo w przypadkach niejednoznacznych wyników ekspresji HER2 uzyskanych metodą IHC za pomocą techniki FISH (fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ*) prowadzona jest ocena amplifikacji genu *HER2-neu*.

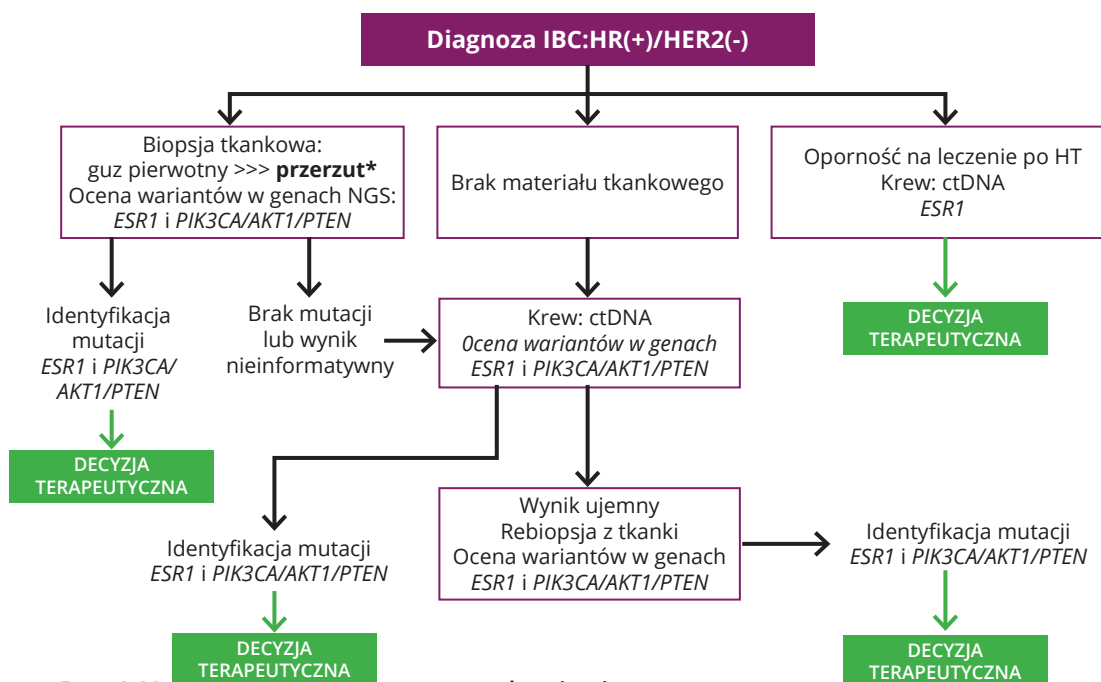
- » W oparciu o aktualne rekomendacje (panel ekspertów St. Gallen) prowadzona jest immunohistochemiczna ocena indeksu proliferacyjnego (odsetek jąder komórkowych z ekspresją markera proliferacji – Ki-67).
- » Na podstawie powyższych analiz wyróżnia się podtypy molekularne warunkujące różne podejście terapeutyczne.

4.13.4. Badane markery

- » HER2 - nadekspresja receptora dotyczy około 20% inwazyjnych raków piersi. Diagnostyka najczęściej opiera się o badanie poziomu ekspresji białek, metodami immunohistochemicznymi (IHC) ocenianymi przez patomorfologa. W przypadku niejednoznacznych wyników ekspresji białka HER2 określanych jako (2+) zawsze wymagana jest weryfikacja statusu genu *HER2-neu* – amplifikacja obecna *versus* brak amplifikacji, z wykorzystaniem metody cytogenetyki molekularnej, jaką jest technika FISH (analiza jest dokonywana przez diagnostę laboratoryjnego).
- » Geny *BRCA1* i *BRCA2*. Wielofunkcyjne białko kodowane przez gen *BRCA1* uczestniczy m.in. w naprawie dwuniciowych pęknięć DNA na drodze rekombinacji homologicznej (*ang. homologous recombination, HR*). Geny *BRCA1/BRCA2* pełnią rolę markerów zarówno prognostycznych, predykcyjnych oraz predyspozycyjnych. U pacjentów, u których wykryto obecność wariantów patogennych lub prawdopodobnie patogennych w genach *BRCA* istnieje możliwość leczenia celowanego z wykorzystaniem PARPi w określonych sytuacjach klinicznych. Dodatkowo obecność wariantów patogennych lub prawdopodobnie patogennych wiąże się z lepszą odpowiedzią na leczenie związkami platyny u pacjentek z potrójnie ujemnym rakiem piersi (TNBC). W przypadku identyfikacji zmiany patogennej lub prawdopodobnie patogennej w genach *BRCA1/BRCA2* pacjentka jest kierowana do poradnictwa genetycznego.
- » Ze względu na złożone podłoże genetycznych predyspozycji do raka piersi szczególnie u pacjentek z wcześniej rozpoznany zachorowaniem (<45 rż.), obustronnym rakiem piersi, TNBC - rakiem piersi z potrójnie ujemnym statusem receptorowym, rak piersi u mężczyzny, z rozpoznany rakiem piersi i rakiem jajnika u tej samej pacjentki, lub w przypadku dodatniego wywiadu rodzinnego należy rozważyć wykonanie szerszego zakresu badań genetycznych (obok *BRCA1/2*) ze szczególnym uwzględnieniem genów *PALB2* i *CHEK2*.
- » Mutacje w genie *PIK3CA* występują u prawie 40% pacjentek z zaawansowanym rakiem piersi HR+/HER2-. U 80% chorych z zaawansowanym rakiem piersi HR+/HER2- obecne są mutacje w kodonach p.Glu542, p.Glu545 w eksonie 10 (starsza numeracja 9) oraz kodonie p.His1047 w eksonie 21 (starsza numeracja 20) genu *PIK3CA*.
- » Mutacje w genie *AKT1* występują u około 3-5% chorych na HR+/HER2- raka piersi. Mutacja E17K jest najczęściej występującą mutacją i stanowi około 70% wszystkich mutacji wykrywanych w *AKT1*.
- » Warianty w genie *PTEN* (mutacje inaktywujące, delecje, utrata ekspresji białka) występują u około 5-12% chorych na HR+/HER2- i mają często charakter wtórny, nabyty i mogą pojawiać się wraz z postępem choroby nowotworowej lub pod wpływem presji terapeutycznej. Implikuje, to, że w przypadku nie wykrycia mutacji w genie *PTEN* należy rozważyć powtarzanie testu genetycznego w trakcie choroby, zwłaszcza po progresji, gdyż utrata tego genu może ujawnić się dopiero w materiale z przerzutu lub w materiale uzyskanym

z osocza krwi obwodowej, z płynnej biopsji.

- » Mutacje w genach *PIK3CA*, *AKT1*, *PTEN* są kluczowym czynnikiem oporności na terapię hormonalną oraz inhibitory CDK4/6, ale również czynnikiem predykcyjnym odpowiedzi na zastosowanie inhibitorów anty PI3K w przypadku tylko obecności mutacji w *PIK3CA* oraz są czynnikiem predykcyjnym odpowiedzi na inhibitory AKT1 w przypadku obecności mutacji w *PIK3CA* lub *AKT1* lub *PTEN*.
- » Mutacje w genach *PIK3CA* i *AKT1* są wzajemnie wykluczające natomiast mutacje w *PTEN* mogą towarzyszyć mutacjom w *PIK3CA* lub *AKT1*.
- » Jednym z głównych czynników oporności na terapię hormonalną (inhibitory aromatazy) są mutacje w genie receptora estrogenowego ER (*ESR1*), które prowadzą do konstytutywnej aktywności transkrypcyjnej (niezależnej od estrogenów). Mutacje w genie *ESR1* są przyczyną progresji u nawet 40% pacjentek z rakiem piersi HR+/HER- leczonych w pierwszej linii z zastosowaniem inhibitorów aromatazy. Mutacje *ESR1* mogą występować w około 5% guzów pierwotnych oraz 30–40% w przypadku przerzutów. Stąd analiza ctDNA pozwala na łatwą, nieinwazyjną metodę monitorowania wariantów patogennych, które mogą pojawić się w trakcie leczenia, co może ostatecznie posłużyć do podejmowania decyzji terapeutycznych. Analiza powinna obejmować minimum (co najmniej) mutacje „hot-spot” w domenie wiążącej ligand (LBD): Y537S/N/C i D538G genu *ESR1*.
- » Mutacje w *ESR1* są markerami predykcyjnymi, które umożliwiają zastosowanie leczenia hormonalnego opartego na nowej generacji SERD (Selektywny Degradator Receptora Estrogenowego).



Rys. 4.12. Algorytm diagnostyczny w raku piersi

IBC – inwazyjny rak piersi, HR+ - dodatni pod względem receptorów estrogenowych i progesteronowych lub tylko estrogenowych, HER(-) komórki nowotworowe z ujemnym wynikiem dla obecności receptorów ludzkiego naskórkowego czynnika wzrostu 2. HT - terapia antyestrogenowa

*Uwaga: Jeśli jest taka możliwość w pierwszej kolejności zalecane badanie materiału z komórek nowotworowych ze zmian przerzutowych

4.13.5. Materiał

- » Do wykonania badania molekularnego wykorzystuje się krew obwodową (*BRCA1/2*) lub materiał pooperacyjny w formie skrojonych i niebarwionych skrawków parafinowych (FFPE) *PIK3CA*, *ESR1*, *AKT1* dla guzów pierwotnych, a *PTEN* wraz z postępem choroby nowotworowej lub pod wpływem presji terapeutycznej. Wyboru najbardziej reprezentatywnego fragmentu do badania molekularnego dokonuje patomorfolog. Ilość skrawków powinna zostać ustalona w wewnętrznych procedurach walidacyjnych dla metody diagnostycznej. W skrawkach odsetek komórek raka piersi powinien wynosić przynajmniej 20% i minimum 3 tys. komórek nowotworowych.
- » Dla wykonania badania FISH (*ERBB2/HER2*) próbkę do badania stanowi utrwalony w formalinie i zatopiony w parafinie materiał tkankowy w postaci bloczka parafinowego (FFPE) wyboru najbardziej reprezentatywnego fragmentu do badania FISH dokonuje patomorfolog. Wybrany materiał jest skrawany na mikroskopowe szkiełko podstawowe. Jego grubość ustalana jest w wewnętrznych procedurach walidacyjnych dla metody FISH. Może ona wynosić od 4 do 6 μm. Preparat wytypowany do badania FISH powinien umożliwiać analizę co najmniej 100 komórek nowotworowych.
- » ctDNA – w przypadku braku materiału z guza pierwotnego, zaleca się wykonanie analizy genetycznej w genie *ESR1* z materiału przerzutowego bądź z ctDNA. Do monitorowania mutacji w genie *ESR1* związanych z obniżoną wrażliwością na hormonoterapię zaleca się ctDNA i metody qPCR, ddPCR i NGS.
- » ctDNA – w przypadku braku materiału z tkanki pierwotnej istnieje możliwość oceny wariantów w genie *PIK3CA* metodą qPCR, bądź w przypadku braku materiału tkankowego w zaawansowanym raku piersi wariantów w genach *PIK3CA*, *AKT1*, *PTEN*, *ESR1* metodą NGS.

4.13.6. Metody

Ze względu na systematycznie wzrastającą liczbę markerów, obecnie konieczną do oceny metodą diagnostyki raka piersi z wyboru jest sekwencjonowanie NGS. Wybór panelu NGS i badanych biomarkerów jest zależny od aktualnych programów lekowych w Polsce. Sugeruje się wybieranie paneli o jak najszerszym zakresie badanych genów, preferuje się analizę wszystkich ww. genów, obligatoryjnie tych które są w aktualnych programach lekowych. W raku piersi optymalne jest wykonanie 2 badań NGS: z krwi obwodowej *BRCA1* i *BRCA2*, z tkanki nowotworowej *PIK3CA*, *ESR1*, *AKT1*, *PTEN*.

- » Ze względu na różnorodność wariantów pojedynczego nukleotydu (*ang. single nucleotide variants, SNV*) występujących w genach *BRCA1* i *BRCA2* oraz konieczność zbadania pełnych sekwencji eksonowych i na granicach ekson/intron zaleca się wykonywanie badań metodą NGS. W przypadku znanego wariantu patogenicznego w rodzinie i prowadzenia badań kosegregacyjnych, badania wykonywane są w oparciu o sekwencjonowanie metodą Sangera, PCR HRM lub qPCR.
- » Analiza zmian liczby kopii (*ang. copy number variations, CNV*) i dużych rearanżacji (*ang. large genomic rearrangements, LGR*) w genach *BRCA1/2* wykonuje się metodą MLPA (multipleksowa amplifikacja sond zależna od ligacji opartą na hybrydyzacji sond oligonukleotydowych i PCR) lub NGS. W przypadku NGS dobrą praktyką jest potwierdzenie wyniku z drugiego pobrania metodą NGS o ile jej rozdzielczość na to pozwala.

- » Dla badania w celu kwalifikacji do leczenia PARPi wykorzystuje się krew obwodową i wykonuje się badanie *BRCA1/2* metodą NGS.
- » Z uwagi na przewagę sekwencjonowania NGS i zwiększającą się liczbę badanych genów (*PIK3CA*, *ESR1*, *AKT1*, *PTEN*) zaleca się stosowanie metody NGS. W przypadku testu qPCR czy ddPCR dla genów *PIK3CA* czy *ESR1* wymagane jest zastosowanie testu pokrywającego wszystkie warianty istotne klinicznie wymienione w Charakterystyce Produktu Leczniczego.
- » FISH amplifikacja *ERBB2* (*HER2*) w przypadku niejednoznacznego wyniku immunohistochemicznego (HER2 ++).

4.13.7. Czas wykonania badania molekularnego

Wynik powinien być uzyskany w jak najkrótszym możliwym czasie, który nie powinien przekraczać od momentu otrzymania materiału:

- 10 dni roboczych dla metody FISH, qPCR, HRM PCR, MLPA oraz sekwencjonowania metodą Sanger,
- 20 dni roboczych dla NGS.

4.14. Rak żołądka

4.14.1. Epidemiologia

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

4.14.2. Etiologia i biologia

- » Rak żołądka jest diagnozowany głównie u osób starszych, co tłumaczy się długotrwałą ekspozycją na działanie czynników środowiskowych oraz nagromadzeniem się zmian genetycznych w komórkach, ale także u osób poniżej 45 roku życia.
- » Zaledwie 10% przypadków dotyczy pacjentów z dodatnim wywiadem rodzinnym w kierunku genetycznych predyspozycji do raka żołądka, dokładny mechanizm powstawania raka żołądka nadal pozostaje niewyjaśniony.
- » Niezależnie od wieku pacjenta w momencie rozpoznania, rokowanie dla pacjenta jest niekorzystne.
- » Najczęściej nowotwór jest rozpoznawany już w zaawansowanym stadium uniemożliwiającym dokonanie resekcji.
- » Przyszłość badań genetycznych w raku żołądka wiąże się z profilowaniem molekularnym, w którym określenie sygnatury molekularnej danego przypadku pozwoliłoby następnie na określenie podtypu rozrostu: podtyp związany z infekcją wirusem EBV (*ang. Epstein-Barr virus*), podtyp związany z niestabilnością molekularną, podtyp stabilny genomowo, podtyp związany z niestabilnością genomową. Innowacyjne podejście stanowi coraz popularniejsze wykorzystanie wolnego krążącego DNA i RNA nowotworowego.

Tabela 4.29. Biomarkery genetyczne w raku żołądka

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

4.14.3. Biomarkery

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

4.14.4. Materiał

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

4.14.5. Metody

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

4.14.6. Czas wykonania badania molekularnego

Wynik powinien być uzyskany w jak najkrótszym możliwym czasie, który nie powinien przekraczać od momentu otrzymania materiału:

- 10 dni roboczych dla metody FISH.

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

4.15.1. Epidemiologia, biologia

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

4.15.2. Materiał

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

4.15.3. Metody

- NGS (panel genowy z użyciem RNA) - jako metoda pierwszego wyboru
- RT-PCR
- FISH

4.15.4. Czas wykonania badania molekularnego

Wynik powinien być uzyskany w jak najkrótszym możliwym czasie, który nie powinien przekraczać od momentu otrzymania materiału:

- 10 dni roboczych dla metody FISH, qPCR oraz sekwencjonowania Sangera,
- 20 dni roboczych dla metody NGS.

4.16. Rak pęcherza moczowego

4.16. Rak pęcherza moczowego

4.16.1. Epidemiologia, etiologia

W Polsce każdego roku diagnozuje się około 7500–8000 nowych przypadków raka pęcherza moczowego (*ang. bladder cancer, BC*), co plasuje go na czwartym miejscu pod względem częstości występowania u mężczyzn i na trzynastym u kobiet. Obserwowana dysproporcja płci (stosunek mężczyzn do kobiet wynosi ok. 3:1 lub 4:1) jest zjawiskiem globalnym, choć w ostatnich latach odnotowuje się wzrost zachorowalności wśród kobiet, co wiąże się ze zmianami w ekspozycji na czynniki środowiskowe, w tym palenie tytoniu.

Szczyt zachorowalności na raka pęcherza przypada na siódmą i ósmą dekadę życia (mediana wieku w momencie diagnozy wynosi ok. 73 lata), co w obliczu starzenia się społeczeństwa implikuje stały wzrost liczby pacjentów wymagających specjalistycznej opieki diagnostycznej i terapeutycznej.

Głównym, udowodnionym czynnikiem etiologicznym, odpowiedzialnym za około 50–60% wszystkich zachorowań, jest dym tytoniowy. Zawarte w nim aminy aromatyczne (oraz wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne są metabolizowane w wątrobie, a następnie wydalane przez nerki, gdzie ulegają koncentracji w moczu, oddziałując bezpośrednio i długotrwale na urotelium pęcherza moczowego. Drugą istotną grupą czynników ryzyka jest ekspozycja zawodowa na substancje chemiczne stosowane w przemyśle barwnikowym, gumowym, tekstylnym i skórzanym. Ponadto, przewlekłe stany zapalne, długotrwałe cewnikowanie, kamica pęcherza oraz infekcje pasożytnicze (*Schistosoma haematobium* – głównie w krajach Afryki i Bliskiego Wschodu) predysponują do rozwoju raka płaskonabłonkowego pęcherza (*ang. squamous cell carcinoma, SCC*), który stanowi odrębną, rzadszą jednostkę o odmiennym profilu molekularnym.

Kluczowy podział kliniczny obejmuje:

- » Rak nienaciekający na mięśniówkę pęcherza moczowego (*Non-Muscle Invasive Bladder Cancer, NMIBC*): obejmuje stadia Ta, T1 oraz carcinoma *in situ* (CIS). Stanowi ok. 75% nowych rozpoznań. Charakteryzuje się wysokim ryzykiem nawrotów (do 70%), ale relatywnie niższym ryzykiem progresji do choroby inwazyjnej i zgonu, pod warunkiem właściwego monitorowania i leczenia.
- » Rak naciekający mięśniówkę pęcherza moczowego (*Muscle Invasive Bladder Cancer, MIBC*): obejmuje stadia T2–T4. Charakteryzuje się agresywnym przebiegiem, wysokim ryzykiem przerzutów odległych (*metastatic Urothelial Carcinoma, mUC*) i wymaga radykalnego leczenia skojarzonego (cystektomia, chemioterapia, immunoterapia).

4.16.2. Charakterystyka molekularna i podtypy genetyczne

Biologia molekularna raka urotelialnego jest niezwykle złożona i odzwierciedla dwie odrębne ścieżki karcynogenezy.

4.16.2.1. Ścieżka brodawczakowata (FGFR3-driven)

Pierwsza ścieżka, związana z rozwojem guzów brodawczakowatych niskiego stopnia (low-grade) nienaciekających błony mięśniowej (Ta/T1), jest zdominowana przez aktywujące warianty genu *FGFR3* (receptora czynnika wzrostu fibroblastów 3). Szacuje się, że warianty *FGFR3* występują w 70–80% przypadków raków NMIBC low-grade. Zmiany te prowadzą do konstytutywnej aktywacji szlaku kinazowego RAS-MAPK, co stymuluje proliferację komórek, ale zazwyczaj nie wiąże się z niestabilnością genomową. Często współwystępują one z wariantami genu *PIK3CA* (ok. 20–25% przypadków), co sugeruje synergizm szlaków FGFR3 i PI3K/AKT na wczesnych etapach procesu nowotworzenia. W tej grupie nowotworów warianty genu *TP53* są rzadkie.

4.16.2.2. Ścieżka dysplastyczna/inwazyjna (TP53/RB1-driven)

Druga ścieżka prowadzi do rozwoju raków inwazyjnych wysokiego stopnia (*high-grade*) oraz raka *in situ* (CIS). Charakteryzuje się ona wczesną utratą funkcji genów supresorowych: *TP53* (mutacje w >50% przypadków MIBC) oraz *RB1*. Inaktywacja tych genów prowadzi do niestabilności chromosomowej, aneuploidii i szybkiej akumulacji kolejnych uszkodzeń genetycznych. W tej grupie guzów często obserwuje się również amplifikacje genów *E2F3*, *SOX4*, *EGFR*, *ERBB2* (HER2) oraz delecje w obrębie genu *PTEN*.

4.16.2.3. Taksonomia molekularna (Podtypy Luminalne i Podstawne)

W ostatnich latach, dzięki kompleksowym analizom transkryptomycznym (m.in. w ramach projektu *TCGA - The Cancer Genome Atlas*), wyodrębniono molekularne podtypy raka pęcherza, które przypominają klasyfikację raka piersi:

- » Podtyp Luminalny (*Luminal-papillary*, *Luminal-infiltrated*): wykazuje ekspresję markerów urotelialnych (*GATA3*, *FOXA1*, *CK20*). W tych guzach często występują warianty w genach *FGFR3* i *PPARG*. Guzy te rokuje lepiej, ale mogą być mniej wrażliwe na chemioterapię opartą na cisplatynie w porównaniu do podtypów podstawnych. Są głównym celem dla inhibitorów FGFR (np. erdafitinib).
- » Podtyp Podstawny (*Basal/Squamous*): charakteryzuje się ekspresją markerów komórek podstawnych (*CK5/6*, *CK14*) i wysoką ekspresją *EGFR*. Częściej wykazuje cechy różnicowania płaskonabłonkowego. Jest wysoce agresywny, z szybką progresją do przerzutów, ale paradoksalnie wykazuje lepszą odpowiedź na neoadjuwantową chemioterapię oraz immunoterapię (ze względu na wyższy poziom infiltracji immunologicznej).
- » Podtyp Neuronalny (Neuroendocrine-like): rzadki, o bardzo złym rokowaniu, często z mutacjami *TP53* i *RB1*, wykazujący pewne podobieństwo do drobnokomórkowego raka płuca.

Chociaż klasyfikacja transkryptomiczna nie jest jeszcze rutynowo stosowana w polskiej praktyce klinicznej, wiedza o niej pozwala lepiej zrozumieć mechanizmy oporności na leczenie i interpretować wyniki szerokoprofilowych badań NGS. Aktualnie, w kontekście refundacji NFZ, kluczowe pozostają jednak konkretne markery predykcyjne, a nie pełny profil transkryptomiczny.

4.16.3. Markery genetyczne w diagnostyce raka pęcherza

Zgodnie z aktualnymi wytycznymi NCCN (v.3.2025), ESMO (2024/2025) oraz zapisami programu lekowego B.141, medyczne laboratoria diagnostyczne w Polsce powinny być przygotowane do oceny zaburzeń genu *FGFR3*.

4.16.3.2. Gen *FGFR3* (Receptor czynnika wzrostu fibroblastów 3)

Zaburzenia genu *FGFR3* stanowią jeden z najważniejszych celów terapeutycznych w raku pęcherza. Występują u ok. 15–20% pacjentów z zaawansowanym rakiem urotelialnym (mUC) i u ponad 70% z NMIBC.

Diagnostyka musi obejmować:

- » Warianty punktowe (SNV): najczęściej zlokalizowane w eksonach 7, 10 i 15 (domeny zewnątrzkomórkowa, transbłonowa i kinazowa). Do najczęstszych wariantów należą: R248C (c.742C>T), S249C (c.746C>G), G370C (c.1108G>T), Y373C (c.1118A>G). Warianty te prowadzą do konstytutywnej dimeryzacji receptora lub aktywacji domeny kinazowej.
- » Fuzje genowe: powstają w wyniku translokacji chromosomowych, najczęściej obejmujących chromosom 4. Kanoniczną fuzją jest *FGFR3::TACC3*, wynikająca z translokacji t(4;4) lub delecji wewnątrzchromosomowej. Rzadszym wariantem jest fuzja *FGFR3::BAIAP2L1* będąca efektem translokacji t(4;7). Fuzje te powodują utratę domeny C-końcowej FGFR3 (odpowiedzialnej za degradację receptora) i połączenie z domeną *coiled-coil* partnera fuzyjnego, co skutkuje stałą, niezależną od liganda aktywacją sygnalizacji komórkowej.

Potwierdzenie obecności wariantu aktywującego lub fuzji genu *FGFR3* jest warunkiem koniecznym do zastosowania inhibitora kinazy tyrozynowej FGFR3. Lek ten jest refundowany w Polsce w II lub III linii leczenia u pacjentów z progresją choroby po wcześniejszej chemioterapii opartej na platynie lub immunoterapii. Diagnostyka *FGFR3* powinna być wykonana na etapie rozpoznania choroby w stadium miejscowego zaawansowania, aby nie opóźniać decyzji terapeutycznej w przypadku progresji.

4.16.4. Materiał do badań molekularnych

Prawidłowe zabezpieczenie materiału tkankowego jest fundamentem wiarygodnej diagnostyki genetycznej.

1. Tkanka utrwalona w formalinie i zatopiona w parafinie (FFPE): Jest to złoty standard.

Zaleca się wykorzystanie materiału z resekcji (cystektomia) lub głębokiej elektroresekcji (TURBT). Materiał biopsyjny może być niewystarczający do szerokiego profilowania NGS, ale zazwyczaj wystarcza do celowanej oceny PCR.

- **Wymagania ilościowe:** Do badań genetycznych (NGS/PCR) zaleca się bloczek zawierający min. 20% utkania nowotworowego. W przypadku niższej zawartości (np. rozproszony naciek, martwica) konieczna jest makrodysekcja manualna z niebarwionych skrawków pod kontrolą mikroskopową (na podstawie barwionego preparatu H&E).
- **Czas utrwalania:** Krytyczny dla jakości kwasów nukleinowych. Optymalny czas utrwalania w 10% zbuforowanej formalinie to 6–48 godzin. Wydłużone utrwalenie

prowadzi do degradacji DNA/RNA i powstawania artefaktów (deaminacja cytozyny), co utrudnia analizę NGS.

2. Biopsja płynna (ctDNA): Analiza wolnokrążącego DNA nowotworowego (ctDNA) z osocza krwi zyskuje na znaczeniu, szczególnie u pacjentów, u których materiał tkankowy jest niedostępny, zniszczony lub nieaktualny (progresja po długim czasie). Badania wykazały wysoką zgodność między wynikami *FGFR3* z tkanki i osocza/moczu w raku pęcherza.

- **Zastosowanie:** Programy lekowe dopuszczają kwalifikację do leczenia inhibitorami *FGFR* na podstawie wyniku zwalidowanego testu z krwi (płynna biopsja), jeśli biopsja tkankowa jest niemożliwa do wykonania ze względów klinicznych.

3. Mocz: Osad moczu jest potencjalnym źródłem DNA nowotworowego, jednak charakteryzuje się zmienną jakością i obecnością inhibitorów PCR. Testy oparte na materiale genetycznym wyizolowanym z moczu są obiecujące w monitorowaniu wznowy NMIBC, ale w diagnostyce predykcyjnej mUC preferowane jest osocze.

4.16.5. Metody diagnostyczne

Wybór metody analitycznej zależy od badanego biomarkera oraz zasobów laboratorium.

4.16.5.1. RT-qPCR / qPCR (Real-Time PCR)

Metoda dla szybkiej oceny mutacji punktowych genu *FGFR3*.

- **Zalety:** Wysoka czułość (możliwość detekcji mutacji przy 1–5% alleli zmutowanych), krótki czas oczekiwania na wynik (3–5 dni), niższy koszt w porównaniu do NGS.
- **Wady:** Ograniczone spektrum detekcji (tylko znane warianty hot-spot w eksonach 7, 10, 15). Wykrywanie fuzji *FGFR3::TACC3* metodą PCR jest trudne ze względu na zmienność punktów złamań (breakpoints) i wymaga zastosowania techniki RT-qPCR na matrycy RNA.

4.16.5.2. Sekwencjonowanie następnej generacji (NGS)

Metoda preferowana w kompleksowej diagnostyce raka pęcherza.

- **Zakres:** Umożliwia jednoczesną ocenę mutacji punktowych, insercji/delecji (INDELS) oraz zmian liczby kopii (CNV) w wielu genach (*FGFR3*, *TP53*, *PIK3CA*, *HRAS*, *ERBB2*).
- **Wykrywanie fuzji:** Do efektywnej detekcji fuzji *FGFR3* zaleca się stosowanie paneli hybrydowych DNA+RNA, gdyż sekwencjonowanie RNA (RNA-Seq) pozwala na wykrycie transkryptów fuzyjnych niezależnie od lokalizacji punktu złamania w intronach.

4.16.6. Algorytm diagnostyczny w raku pęcherza moczowego

Diagnostyka molekularna powinna być zintegrowana ze ścieżką kliniczną pacjenta.

» Pacjent z progresją po I linii leczenia (II/III linia):

- Zlecenie: badanie wariantów punktowych i fuzji genu *FGFR3* (NGS lub RT-qPCR).
- Cel: kwalifikacja do erdafitinibu.
- Wynik wymagany: obecność patogennego wariantu (np. S249C, Y373C) lub fuzji (np. *FGFR3::TACC3*).

4.16.7. Czas wykonania

- Ocena *FGFR3* (PCR): do 5 dni roboczych.
- Ocena NGS: do 20 dni roboczych. Zaleca się stosowanie szybkich ścieżek diagnostycznych dla pacjentów z mUC wymagających pilnej II linii leczenia.

4.17. Rak ślinianki

4.17.1. Epidemiologia, etiologia

- » Nowotwory złośliwe ślinianek zaliczane są do nowotworów głowy i szyi. Międzynarodowa Klasyfikacja Chorób ICD-10 wyróżnia lokalizacje:
 - C07 – Nowotwór złośliwy ślinianki przyusznej
 - C08 – Nowotwór złośliwy innych i nieokreślonych dużych gruczołów ślinowych
- » Liczba nowych rozpoznań nowotworu złośliwego ślinianki (ICD-10 C07 lub C08) według Krajowego Rejestru Nowotworów wyniosła 447 w roku 2023 w Polsce.
- » Raki ślinianek stanowią zróżnicowaną histologicznie grupę nowotworów: rak śluzowo-naskórkowy (*Mucoepidermoid carcinoma*), rak gruczołowo-torbielowaty (*Adenoid cystic carcinoma*), rak zrazikowokomórkowy (*Acinic cell carcinoma*), rak wydzielniczy (*Secretory carcinoma*), gruczolakorak mikro-wydzielniczy (*Microsecretory adenocarcinoma*), gruczolakorak wielopostaciowy (*Polymorphous adenocarcinoma*), rak jasno-komórkowy szklawiczący (*Hyalinizing clear cell carcinoma*), gruczolakorak podstawnokomórkowy (*Basal cell adenocarcinoma*), rak wewnątrzprzewodowy (*Intraductal carcinoma*), rak przewodowy ślinianek (*Salivary duct carcinoma*), rak mioepitelialny (*Myoepithelial carcinoma*), rak nabłonkowo-mioepitelialny (*Epithelial-myoepithelial carcinoma*), gruczolakorak śluzowy (*Mucinous adenocarcinoma*), gruczolakorak mikro-torbielowaty stwardniający (*Sclerosing microcystic adenocarcinoma*), rak z gruczolaka wielopostaciowego (*Carcinoma ex pleomorphic adenoma*), mięsakorak gruczołów ślinowych (*Carcinosarcoma of the salivary glands*), gruczolakorak łojowy (*Sebaceous adenocarcinoma*), rak limfoepitelialny (*Lymphoepithelial carcinoma*), rak płaskonabłonkowy (*Squamous cell carcinoma*), sialoblastoma.
- » Wśród czynników związanych z etiologią tego nowotworu wymienia się promieniowanie jonizujące, infekcje wirusowe (HPV, EBV, HIV), ekspozycję na substancje chemiczne (nikiel, azbest, pył krzemowy), alkohol i palenie tytoniu.

4.17.2. Najczęstsze zaburzenia genetyczne

Rak śluzowo-naskórkowy (*Mucoepidermoid carcinoma*)

- » Cechą charakterystyczną tego typu histologicznego są rearanżacje obejmujące gen *MAML2* (11q21). Najczęstszą jest translokacja t(11;19)(q21;p13) prowadząca do powstania genu fuzyjnego *CRTC1::MAML2*. Rzadko występującą translokacją jest t(11;15)(q21;q26) *CRTC3::MAML2*. Rearanżacje z udziałem genu *MAML2* występują do 88% raków śluzowo-naskórkowych i są cechą wspierającą rozpoznanie raka śluzowo-naskórkowego. Preferowaną metodą w badaniu fuzji genów z udziałem *MAML2* jest metoda NGS. Wynik pozytywny FISH powinien być potwierdzony w badaniu NGS.

Rak gruczołowo-torbielowaty (*Adenoid cystic carcinoma*)

- » Rak gruczołowo-torbielowaty wyróżnia się obecnością genów fuzyjnych z udziałem genów *MYB*, *MYBL1* i/lub *NFIB*. Najczęstsze są dwa warianty fuzyjne *MYB::NFIB* (translokacja t(6;9)(q22-23;p23-24)) lub *MYBL1::NFIB* (translokacja t(8;9)(q13;p22-p23)), które stanowią do 86% przypadków. Rzadziej spotykane warianty genów fuzyjnych to *MYB::PDCD1LG2*, *MYB::EFR3A*, *MYBL1::RAD51B*, *MYBL1::YTHDF3*. W odosobnionych

przypadkach wykrywany jest gen fuzyjny *NFIB::AIG1*. Wykrycie genów fuzyjnych z partnerami *MYB*, *MYBL1* i/lub *NFIB* wspiera w diagnostyce różnicowej rozpoznanie raka gruczołowo-torbielowatego.

Rak wydzielniczy (*Secretory carcinoma*)

- » Rak wydzielniczy ślinianek charakteryzuje się obecnością genów fuzyjnych z udziałem genu *ETV6*. Najczęściej występuje w tym typie histologicznym translokacja *t(12;15)(p13;q25)* prowadząca do powstania genu fuzyjnego *ETV6::NTRK3*. Inne rzadkie warianty fuzyjne z udziałem genu *ETV6* to: *ETV6::RET*, *ETV6::MAML3*, *ETV6::MET*. Możliwe jest zastosowanie metody FISH z sondami break-apart do detekcji rearanżacji genu *ETV6*, jednak ze względu na predykcyjny charakter genów fuzyjnych *NTRK3* i *RET* zalecana jest metoda NGS i dokładne określenie genu fuzyjnego.

Rak zrazikowokomórkowy (*Acinic cell carcinoma*)

- » Większość przypadków (>80%) raka zrazikowokomórkowego posiada translokację *t(4;9)(q13;q31)* obejmującą gen *NR4A3* (9q31.1). Obecność rearanżacji z udziałem genu *NR4A3* wspiera rozpoznanie raka zrazikowokomórkowego w diagnostyce różnicowej.

Gruczolakorak wielopostaciowy (*Polymorphous adenocarcinoma*)

- » Zaburzenia genetyczne w genach *PRKD* są wysoce swoiste w rozpoznaniu gruczolakoraka wielopostaciowego i obecne są z częstością około 90%. Wariant patogeniczny p.Glu-710Asp (E710D) genu *PRKD1* najczęściej występuje w klasycznym wariantcie gruczolakoraka wielopostaciowego, natomiast rearanżacje z udziałem genów *PRKD1*, *PRKD2* lub *PRKD3* częściej występują w podtypie sitowatym tego nowotworu. W badaniu mutacji i fuzji genów *PRKD* zalecana jest metoda NGS.

Gruczolakorak mikro-wydzielniczy (*Microsecretory adenocarcinoma*)

- » Genetyczną cechą definiującą gruczolakoraka mikro-wydzielniczego jest gen fuzyjny *MEF2C::SS18*. Diagnostykę genetyczną można wykonać metodą FISH z zastosowaniem sond break-apart dla rearanżacji genu *SS18* lub bardziej precyzyjną metodę NGS pozwalającą na identyfikację genu fuzyjnego *MEF2C::SS18*.

Rak wewnątrzprzewodowy (*Intraductal carcinoma*)

- » Rak wewnątrzprzewodowy ślinianek posiada kilka wyróżnionych podtypów histologicznych: wariant typu wstawkowego, onkocytny, apokrynowy, mieszany. Znaczenie diagnostyczne mają przede wszystkim fuzje genu *RET*. Histologiczny wariant typu wstawkowego najczęściej posiada gen fuzyjny *NCOA4::RET*, rzadziej *KIAA1217::RET*. W wariantcie onkocytnym wykrywane są fuzje *TRIM33::RET*, *NCOA4::RET* lub mutacja *BRAF* p.Val-600Glu (V600E). W raku o mieszanym utkaniu wykrywany jest gen fuzyjny *TRIM27::RET* lub rzadziej *NCOA4::RET*. W wariantcie apokrynowym występują również zaburzenia szlaku sygnalizacyjnego PI3K (m.in. *PIK3CA*). NGS to preferowana metoda badania wariantów SNV *BRAF*, *PIK3CA* oraz wariantów fuzyjnych *RET*. Metoda FISH nie jest zalecana ze względu na fałszywie negatywne wyniki uzyskiwane sondami break-apart w przypadku obecności genu fuzyjnego *NCOA4::RET*.

Rak jasnokomórkowy szkliwiejący (*Hyalinizing clear cell carcinoma*)

- » Cechą genetyczną raka jasnokomórkowego szkliwiejącego ślinianki są rearanżacje genu *EWSR1*. Najczęstszy gen fuzyjny powstający w wyniku rearanżacji to *EWSR1::ATF1*, który występuje w kilku wariantach (przede wszystkim *EWSR1(e11)::ATF1(e3)* i *EWSR1(e15)::ATF1(e5)*). Rzadziej rearanżacja prowadzi do powstania genu fuzyjnego *EWSR1::CREM*. W diagnostyce genetycznej może być wykorzystana metoda FISH lub NGS.

Rak przewodowy ślinianek (*Salivary duct carcinoma*)

- » Rak przewodowy ślinianek wykazuje ekspresję antygenu AR związaną z częstymi mutacjami o charakterze aktywującym w genie *AR* (CNV, SNV, warianty splicingowe). Wykrywane są one w około 70% badanych przypadków. Inne powtarzające się zaburzenia genetyczne to: amplifikacja *ERBB2* (do 35%); patogenne warianty *TP53*, *PIK3CA*, *BRAF*, *HRAS* i delecje *PTEN*. W odosobnionych przypadkach zostały opisane geny fuzyjne *ALK* i *NTRK* w tym rozpoznaniu. Warianty genetyczne mające znaczenie predykcyjne: amplifikacja *ERBB2*, *BRAF* p.V600E, fuzje *NTRK*. Metody diagnostyczne mające zastosowanie: FISH, PCR, NGS.

Rak mioepitelialny (*Myoepithelial carcinoma*)

- » Około 50% raków mioepitelialnych posiada rearanżację genu *PLAG1*. Opisano szereg parterów fuzyjnych uczestniczących w fuzjach z genem *PLAG1*: *CHCHD7*, *CTNNB1*, *FGFR1*, *LIFR*, *ND4*, *TGFB3*. Rearanżacja *PLAG1* jest wykrywana w przypadkach raka mioepitelialnego *de novo* jak i powstałego na bazie gruczolaka wielopostaciowego. Opisywana jest również rearanżacja genu *EWSR1* (do 35%) jednak w przypadku raka mioepitelialnego nie prowadzi ona do powstania funkcjonalnego genu fuzyjnego *EWSR1* i nie jest wykrywana na poziomie transkryptu.

Rak nabłonkowo-mioepitelialny (*Epithelial-myoepithelial carcinoma*)

- » Mutacje genu *HRAS* występują w około 80% raków nabłonkowo-mioepitelialnych. Głównie wykrywany jest wariant *HRAS* p.Gln61Arg (Q61R). Badanie mutacji *HRAS* może być wykorzystane w diagnostyce różnicowej tego nowotworu. Metody mające zastosowanie w diagnostyce mutacji (SNV) genu *HRAS*: PCR, Sekwencjonowanie Sangera, NGS.

Gruczolakorak śluzowy (*Mucinous adenocarcinoma*)

- » Powtarzalną cechą genetyczną w tym typie histologicznym jest aktywująca mutacja *AKT1*, głównie wariant p.Glu17Lys (E17K). Obecność wariantu *AKT1* p.Glu17Lys (E17K) wspiera rozpoznanie pierwotnego gruczolakoraka śluzowego ślinianki w diagnostyce różnicowej. Metody mające zastosowanie w diagnostyce wariantu *AKT1* p.Glu17Lys (E17K): PCR, Sekwencjonowanie Sangera, NGS.

Rak z gruczolaka wielopostaciowego (*Carcinoma ex pleomorphic adenoma*)

- » Najczęściej wykrywane są rearanżacje genów *PLAG1* (60%) lub *HMGA2* (20%), które są typowe dla gruczolaka wielopostaciowego. Dodatkowo obecne mogą być amplifikacje genów *MYC* i/lub *EGFR* oraz mutacje genów *TP53*, *HRAS*, *PIK3CA*. Pomocne w diagnostyce różnicowej tego typu histologicznego jest potwierdzenie rearanżacji *PLAG1* lub *HMGA2* metodą FISH lub NGS.

Tabela. 4.30. Nowotworowy złośliwe ślinianek – zaburzenia genetyczne o znaczeniu diagnostycznym

Typ histologiczny	Charakterystyczne cechy genetyczne
Rak śluzowo-naskórkowy (<i>Mucoepidermoid carcinoma</i>)	Rearanżacje genu <i>MAML2</i> (do 88%)
Rak gruczołowo-torbielowaty (<i>Adenoid cystic carcinoma</i>)	Rearanżacje z udziałem genów <i>MYB</i> , <i>MYBL1</i> , <i>NFIB</i> (100%)
Rak wydzielniczy (<i>Secretory carcinoma</i>)	Rearanżacje <i>ETV6</i> (ok. 100%)
Rak zrazikowokomórkowy (<i>Acinic cell carcinoma</i>)	Rearanżacje genu <i>NR4A3</i> (84%)
Gruczolakorak wielopostaciowy (<i>Polymorphous adenocarcinoma</i>)	Wariant SNV p.Glu710Asp (E710D) <i>PRKD1</i> , rearanżacje z udziałem genów <i>PRKD1</i> , <i>PRKD2</i> , <i>PRKD3</i> (ok. 90%)
Gruczolakorak mikro-wydzielniczy (<i>Microsecretory adenocarcinoma</i>)	Gen fuzyjny <i>MEF2C::SS18</i> (100%)
Rak wewnątrzprzewodowy (<i>Intraductal carcinoma</i>)	Geny fuzyjne <i>RET</i> (około 50%) <i>BRAF</i> p.Val600Glu (V600E) Warianty patogenne <i>PIK3CA</i>
Rak jasnokomórkowy szkliwiejący (<i>Hyalinizing clear cell carcinoma</i>)	Rearanżacje <i>EWSR1</i> (80-90%)
Rak mioepitelialny (<i>Myoepithelial carcinoma</i>)	Geny fuzyjne <i>PLAG1</i> (50%)
Rak nabłonkowo-mioepitelialny (<i>Epithelial-myoepithelial carcinoma</i>)	Mutacje <i>HRAS</i> , głównie p.Gln61Arg (Q61R) (80%)
Gruczolakorak śluzowy (<i>Mucinous adenocarcinoma</i>)	<i>AKT1</i> p.Glu17Lys (E17K)
Rak z gruczolaka wielopostaciowego (<i>Carcinoma ex pleomorphic adenoma</i>)	Rearanżacje <i>PLAG1</i> , <i>HMGA2</i> (80%)

Tabela. 4.31. Nowotworowy złośliwe ślinianek – zaburzenia genetyczne o znaczeniu predykcyjnym

Typ histologiczny	Genetyczne warianty predykcyjne
Rak wydzielniczy (<i>Secretory carcinoma</i>)	Fuzje <i>NTRK</i> , <i>RET</i>
Rak przewodowy ślinianek (<i>Salivary duct carcinoma</i>)	amplifikacja <i>ERBB2</i> <i>BRAF</i> p.Val600Glu (V600E) fuzje <i>NTRK</i>

4.17.3. Materiał

- » Do wykonania badania molekularnego wykorzystuje się materiał tkankowy utrwalony w formalinie w postaci skrawków z bloczka parafinowego. W skrawkach odsetek komórek nowotworu wynosi przynajmniej 20%.

4.17.4. Metody

- » Preferowaną metodą jest sekwencjonowanie NGS. Minimalny panel diagnostyczny w nowotworach ślinianek powinien obejmować warianty fuzyjne genów *ETV6*, *EWSR1*, *HMGA2*, *MAML2*, *MYB*, *MYBL1*, *NFIB*, *NR4A3*, *NTRK1*, *NTRK2*, *NTRK3*, *PLAG1*, *PRKD1*, *PRKD2*, *PRKD3*, *RET*, *SS18* oraz warianty SNV: *PRKD1*, *AKT1*, *BRAF*, *HRAS*, *PIK3CA*.
- » PCR i sekwencjonowanie Sangera mogą mieć ograniczone zastosowanie dla wariantów SNV *AKT1*, *BRAF*, *HRAS*.
- » W metodzie FISH powinny być stosowane zwalidowane zestawy, co jest szczególnie istotne w przypadku sond break-apart. Główne zastosowanie testów FISH: amplifikacja *ERBB2*; rearanżacje *ETV6*, *SS18*, *EWSR1*.

4.17.5. Czas wykonania badania molekularnego

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

4.18. Rak dróg żółciowych

4.18.1. Epidemiologia, etiologia

- » Rak dróg żółciowych wywodzi się z komórek nabłonka zewnątrz- lub wewnątrzwątrobowych przewodów żółciowych.
- » Międzynarodowa Klasyfikacja Chorób ICD-10 wyróżnia lokalizacje:
 - C22.1 – Rak przewodów żółciowych wewnątrzwątrobowych
 - C23 – Nowotwór złośliwy pęcherzyka żółciowego
 - C24 – Nowotwór złośliwy innych i nieokreślonych części dróg żółciowych
- » Na podstawie danych Krajowego Rejestru Nowotworów z roku 2023 można oszacować liczbę nowych rozpoznań w Polsce na około 1800 rocznie.
- » Wśród czynników związanych etiologią tego nowotworu wymienia się wirusowe zapalenie wątroby, marskość wątroby, choroby pasożytnicze, przewlekłe stany zapalne w drogach żółciowych, anomalie anatomiczne dróg żółciowych, kamicę żółciową, alkohol, azbest, palenie tytoniu i otyłość. Zwiększone ryzyko raka pęcherzyka żółciowego występuje u pacjentów z zespołem Lyncha i rodzinną polipowatością gruczolakowatą (FAP).

4.18.2. Najczęstsze zmiany genetyczne

Rak przewodów żółciowych wewnątrzwątrobowych

Rak wewnątrzwątrobowych dróg żółciowych (iCCA) stanowi nowotwór o złożonym podłożu molekularnym, w którym profil mutacji różni się znacząco w zależności od lokalizacji. Najważniejszymi i najczęściej występującymi zmianami genomowymi są mutacje w genach *IDH1/2* oraz fuzje genu *FGFR2*, które są niemal całkowicie specyficzne dla tego podtypu i rzadko występują w lokalizacji zewnątrzwątrobowej. Geny *IDH* kodują izoformy dehydrogenazy izocytrynianowej. Mutacje w tych genach mają charakter punktowych substytucji zmieniających aktywność enzymatyczną. Mutacje *IDH1* stwierdza się u około 10–20% pacjentów, przy czym dominują mutacje punktowe w kodonie R132, podczas gdy zmiany w *IDH2* (kodon R172) są rzadsze i występują u około 3–5% chorych. Rearanżacje genu *FGFR2*, kluczowego receptora o aktywności kinazy tyrozynowej, prowadzące do powstania genu fuzyjnego występują u 10–20% pacjentów. Powodują one niekontrolowany wzrost aktywności enzymatycznej kinazy. Gen *KRAS* ulega mutacji u około 10–15% pacjentów z iCCA. Mutacje te uczestniczą w mechanizmie karcynogenezy związanej z pierwotnym stwardniającym zapaleniem dróg żółciowych i kamicą wątroby i korelują z gorszym rokowaniem. Aktywujące mutacje w genie *BRAF*, zwłaszcza wariant p.Val600Glu (V600E), występują u około 2–5% pacjentów. Warianty patogene genów *IDH1/2*, *KRAS*, *FGFR2* bardzo rzadko współwystępują co przemawia za odmiennymi szlakami karcynogenezy raka dróg żółciowych. Mutacje *IDH1/2*, *BRAF* oraz fuzje *FGFR2* obecne są przede wszystkim w raku wywodzącym się z małych przewodów żółciowych. Mutacje *KRAS* występują głównie w raku z dużych wewnątrzwątrobowych przewodów żółciowych. Status wysokiej niestabilności mikrosatelitarnej (MSI-H) lub niedoboru białek naprawy DNA (dMMR) jest w iCCA rzadki i dotyczy około 1–3% przypadków. Amplifikacja genu *ERBB2* jest rzadka i dotyczy 2–7% pacjentów. Do innych istotnych zmian należą delecje locus *CDKN2A/B* i mutacje genów zaangażowanych w organizację chromatyny (*ARID1A*, *PBRM1*, *BAP1*).

Rak pęcherzyka żółciowego

Rak pęcherzyka żółciowego (GBC) odróżnia się profilem molekularnym od innych nowotworów dróg żółciowych. Najczęściej identyfikowaną zmianą genetyczną w GBC jest mutacja genu supresorowego *TP53*, której częstość przekracza 50%. Mutacja ta jest uważana za jedno z najwcześniejszych zdarzeń w karcynogenezie pęcherzyka żółciowego, szczególnie w przypadkach rozwijających się na podłożu przewlekłego stanu zapalnego wywołanego kamicą. Istotną cechą charakterystyczną raka pęcherzyka żółciowego jest również wysoka częstość amplifikacji genu *ERBB2* i związana z nią nadekspresja białka HER2 wykrywana do 30% pacjentów. Mutacje genu *KRAS* występują u około 10% chorych, jednak ich częstość rośnie do 50–80% w przypadkach związanych z anomalią połączenia trzustkowo-żółciowego i refluksem soku trzustkowego. Inne istotne klinicznie zaburzenia obejmują warianty związane z utratą funkcji genów *CDKN2A/B* (około 20%), mutacje w szlaku sygnałowym PI3K (głównie *PIK3CA* z częstością około 10%), oraz zmiany w genach modelujących chromatynę, takich jak *ARID1A* (do 15%). Z punktu widzenia diagnostyki różnicowej kluczowy jest fakt, że w raku pęcherzyka żółciowego niemal nigdy nie stwierdza się mutacji genów *IDH1/2* ani fuzji *FGFR2*.

Rak przewodów żółciowych zewnątrzwątrobowych

Rak zewnętrznych dróg żółciowych (eCCA) dzieli się na raka wnątkowego (pCCA) i dystalnego (dCCA), charakteryzuje się profilem molekularnym, który odróżnia go od nowotworów wewnątrzwątrobowych. Najczęstszymi i najbardziej charakterystycznymi zmianami genetycznymi w eCCA są mutacje w genach *KRAS* i *TP53*. Gen *KRAS* ulega mutacji u około 30% do 45% chorych, co stanowi znacznie wyższy odsetek niż w nowotworach wewnątrzmiąższowych. Najczęściej identyfikowanymi wariantami są *KRAS* p.Gly12Asp i p.Gly12Val, a ich obecność wiąże się z gorszym rokowaniem i mniejszą wrażliwością na leczenie systemowe. Mutacje *TP53* wykrywane są u około 40% pacjentów (34% do 55% według różnych źródeł), przy czym ich częstość jest szczególnie wysoka w raku dystalnym (40–75%) w porównaniu do raka wnątkowego. Kolejnym kluczowym zaburzeniem jest amplifikacja *ERBB2* lub nadekspresja HER2, występująca u 10% do 20% pacjentów z eCCA. Do innych powtarzalnych zaburzeń genetycznych należą inaktywacja genu supresorowego *SMAD4* (8–30%), utrata funkcji *CDKN2A/B* (około 20%) oraz mutacje w genie *ARID1A* (<15%). Istotną cechą diagnostyczną jest fakt, że w raku zewnętrznych dróg żółciowych (podobnie jak w raku pęcherzyka żółciowego) mutacje *IDH1/2* i fuzje *FGFR2* są bardzo rzadkie.

Tabela. 4.32. Geny związane z karcynogenezą w raku przewodów żółciowych

Rak przewodów żółciowych wewnątrzwątrobowych	Rak pęcherzyka żółciowego	Rak przewodów żółciowych zewnątrzwątrobowych
<i>IDH1</i> (do 20%)	<i>IDH1/2</i> (<1%)	<i>IDH1/2</i> (0-3%)
<i>IDH2</i> (5%)	<i>FGFR2</i> (0-3%)	<i>FGFR2</i> (<1%)
<i>FGFR2</i> (do 20%)	<i>KRAS</i> (10%)	<i>KRAS</i> (30-45%)
<i>KRAS</i> (10-15%)	<i>TP53</i> (>50%)	<i>TP53</i> (40%)
<i>TP53</i> (20-40%)	<i>BRAF</i> (3%)	<i>BRAF</i> (<3%)
<i>BRAF</i> (2-5%)	<i>ERBB2</i> (15-30%)	<i>ERBB2</i> (10-20%)
<i>ERBB2</i> (2-7%)	<i>PIK3CA</i> (10%)	<i>PIK3CA</i> (4-10%)
<i>PIK3CA</i> (<10%)	<i>ARID1A</i> (<15%)	<i>SMAD4</i> (8-30%)
<i>BAP1</i> (13-17%)	<i>CDKN2A/B</i> (10-20%)	<i>CDKN2A/B</i> (20%)
<i>CDKN2A/B</i> (15%)		<i>ARID1A</i> (<15%)
<i>ARID1A</i> (15%)		

4.18.3. Zaburzenia genetyczne o charakterze predykcyjnym

Mutacja *IDH1* p.Arg132

- » Mutacje genu dehydrogenazy izocytrynianowej 1 (*IDH1*) są onkogenne i zmieniają aktywność enzymatyczną dehydrogenazy z produkcji alfa-ketoglutaranu na produkcję toksycznego metabolitu 2-hydroksyglutaranu. Kumulujący się metabolit prowadzi to do zaburzeń epigenetycznych. Mutacje genu *IDH1* związane są głównie z rakami wewnątrztrętrowych dróg żółciowych. Patogeny charakter mają warianty typu substytucji w kodonie 132. Częstość poszczególnych substytucji różni się od innych nowotworów i według malejącej częstości kolejność jest następująca: p.Arg132Cys (R132C), p.Arg132Leu (R132L), p.Arg132Gly (R132G), p.Arg132Ser (R132S), p.Arg132His (R132H). Warianty typu substytucji w kodonie p.Arg132 (R132) są czynnikiem predykcyjnym w leczeniu inhibitorem dehydrogenazy izocytrynianowej.

Gen fuzyjny *FGFR2*

- » Gen *FGFR2* koduje błonowy receptor 2 czynnika wzrostu fibroblastów posiadający wewnątrzkomórkową domenę o aktywności kinazy tyrozynowej. W onkogenyngch fuzjach *FGFR2* punkt pęknięcia następuje w intronie 17 lub na początku eksonu 18. Większość onkogenyngch fuzji zachowuje eksony 1–17 *FGFR2* (zawierające domenę kinazy tyrozynowej), tracąc ekson 18 kodujący C-terminalną domenę regulatorową, co prowadzi do konstytutywnej aktywacji receptora. Geny fuzyjne z udziałem genu *FGFR2* występują przede wszystkim w rakach wewnątrztrętrowych dróg żółciowych. Znanych jest około 100 genów uczestniczących w fuzjach z *FGFR2*. Najczęstsze z nich to: *FGFR2::BICC1* (25-40%), *FGFR2::PPHLN1* (10-15%), *FGFR2::AHCYL1* (5-10%), *FGFR2::SHTN1* (3-5%), *FGFR2::TACC3* (2-5%), *FGFR2::CCDC6* (2-4%), *FGFR2::MGEA5* (2-3%). Inni partnerzy fuzyjni stanowią 15-30%, są to m.in. geny: *ATE1*, *KIF5C*, *DBP*, *KIAA1217*, *NOL4*, *MCU*, *AFF4*, *CASP7*, *TDRD1*, *CEP55*, *WAC*, *CEP83*, *KCTD1*, *PARK2*, *CCDC186*, *PIBF1*, *TRIM8*, *OGA*, *DDX21*, *LAMC1*, *NRAP*, *PHC1*, *RABGAP1L*, *RASAL2*, *ROCK1*, *TFEC*, *CELF2*, *DCTN2*, *DNAJC12*, *DZIP1*, *FOXP1*, *LGSN*, *LPXN*, *MYPN*, *PRKN*, *PCM1*, *RNF41*, *SH3GLB1*, *STK3*, *SORBS1*, *TBC1D1*, *UBQLN1*. Geny będące partnerem fuzyjnym dla *FGFR2* mogą mieć kilka punktów pęknięcia chromosomu, co dodatkowo zwiększa liczbę wariantów fuzyjnych. Przykładowo, w przypadku genu fuzyjnego *FGFR2::BICC1*, ekson 17 genu *FGFR2* może ulec zespoleniu z eksonami 2, 3 lub 18 genu *BICC1* (*FGFR2(e17)::BICC1(e2)*, *FGFR2(e17)::BICC1(e3)*, *FGFR2(e17)::BICC1(e18)*). Różnorodność wariantów fuzyjnych ogranicza możliwości detekcji metodą PCR i testami NGS opartymi o proste biblioteki amplikonowe zaprojektowanymi pod wybrane znane warianty. Obecność genu fuzyjnego *FGFR2* jest czynnikiem predykcyjnym w leczeniu raka dróg żółciowych inhibitorem kinazy receptora *FGFR2*.

Niestabilność mikrosatelitarna (MSI)

- » Niestabilność mikrosatelitarna (MSI) występuje w ogólnej populacji pacjentów z rakiem dróg żółciowych z częstością 1-3%. Jest to czynnik predykcyjny w raku dróg żółciowych dla immunoterapii przeciwciałem monoklonalnym anty-PD-1.

Amplifikacja *ERBB2*

- » Amplifikacja genu *ERBB2* i związana z nią wysoka ekspresja białka HER2 występuje przede wszystkim w rakach pęcherzyka żółciowego oraz zewnętrznych dróg żółciowych. Wysoka ekspresja HER2 jest czynnikiem predykcyjnym w leczeniu przeciwciałem monoklonalnym anty-HER2 pacjentów z miejscowo zaawansowanym lub przerzutowym rakiem dróg żółciowych, u których wcześniej stosowano co najmniej jedną linię leczenia ogólnoustrojowego.

Mutacja *BRAF* p.Val600Glu

- » Wariant *BRAF* p.Val600Glu (V600E) jest czynnikiem predykcyjnym w leczeniu skojarzonym inhibitorami kinaz BRAF i MEK pacjentów z nieoperacyjnym lub przerzutowym rakiem dróg żółciowych, u których nastąpiła progresja choroby po wcześniejszym leczeniu i nie ma satysfakcjonujących alternatywnych opcji leczenia.

Geny fuzyjne *NTRK*

- » Geny fuzyjne *NTRK1*, *NTRK2*, *NTRK3* występują rzadko w raku dróg żółciowych z częstością nie przekraczającą 1% (0,2-0,8% wg danych literaturowych). Jednak w sytuacji braku satysfakcjonujących opcji leczenia u nielicznych pacjentów z obecnym genem fuzyjnym istnieje możliwość leczenia inhibitorem kinazy Trk.

Tabela. 4.33. Zaburzenia genetyczne o charakterze predykcyjnym w raku przewodów żółciowych

Genetyczne czynniki predykcyjne	Lek
Mutacje <i>IDH1</i> p.Arg132 (R132)	Inhibitor dehydrogenazy izocytrynianu
Gen fuzyjny <i>FGFR2</i>	Inhibitory kinazy tyrozynowej
Niestabilność mikrosatelitarna (MSI)	przeciwciało monoklonalne anty-PD-1
Mutacja <i>BRAF</i> p.Val600Glu (V600E)	Skojarzone inhibitory kinaz BRAF i MEK
Amplifikacja <i>ERBB2</i>	przeciwciało monoklonalne anty-HER2
Geny fuzyjne <i>NTRK</i>	Inhibitory kinaz tyrozynowych

4.18.4. Materiał

- » Do wykonania badania molekularnego wykorzystuje się materiał tkankowy utrwalony w formalinie w postaci skrawków z błočka parafinowego. W skrawkach odsetek komórek nowotworu wynosi przynajmniej 20%.
- » Należy racjonalnie obchodzić się z drobnym materiałem biopsyjnym i zaplanować diagnostykę genetyczną dobierając odpowiednią metodę i zakres testowanych czynników w przypadku skąpego materiału.

4.18.5. Metody

- » Preferowaną metodą jest sekwencjonowanie NGS ze względu na niewielką objętość materiału biopsyjnego. Celowane panele NGS dają możliwość zbadania wariantów SNV *IDH1*, *BRAF*, *KRAS* oraz genów fuzyjnych *FGFR2* i *NTRK1/2/3*. Alternatywą może być szerokie profilowanie genomowe (CGP) dające również możliwość badania amplifikacji genów i niestabilności mikrosatelitarnej (MSI) w ramach jednego testu. W przypadku testów NGS opartych o proste biblioteki amplikonowe należy ocenić ryzyko wyników fałszywie negatywnych dla wariantów fuzyjnych nieprzewidzianych przez wytwórcę testu.
- » Metoda PCR ma zastosowanie w badaniu niestabilności mikrosatelitarnej (MSI) oraz w badaniu wariantów *IDH1* i *BRAF*. W przypadku badania mutacji *IDH1* należy zwrócić uwagę czy test pokrywa przynajmniej najczęstsze warianty (R132C, R132L, R132G, R132S, R132H) występujące w raku dróg żółciowych.
- » Metoda FISH w diagnostyce raka dróg żółciowych ma zastosowanie głównie do potwierdzania amplifikacji genu *ERBB2* związanej z wysoką ekspresją antygenu HER2. FISH nie jest zalecaną metodą do wykrywania rearanżacji *FGFR2*. Istnieje ryzyko nie wykrycia rearanżacji sondami break-apart w przypadku bliskich partnerów fuzyjnych (*ATE1* lub *TACC2*). Około 10-20% wariantów fuzyjnych *FGFR2* jest fałszywie negatywnych w metodzie FISH.

4.18.6. Czas wykonania badania molekularnego

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

5.

Bibliografia

2. Medyczne Laboratorium Diagnostyczne

- » Ustawa z dnia 15 września 2022 r. o medycynie laboratoryjnej (Dz.U. 2022 poz. 2280)
- » Ustawa z dnia 15 kwietnia 2011 r. o działalności leczniczej (Dz.U. 2011 nr 112 poz. 654)
- » Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 3 marca 2004 r. w sprawie wymagań, jakim powinno odpowiadać medyczne laboratorium diagnostyczne (Dz.U. z 2004 Nr 43, poz. 408 z późn. zm.) – w trakcie aktualizacji, obecnie po konsultacjach społecznych
- » Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 23 marca 2006 r. w sprawie standardów jakości dla medycznych laboratoriów diagnostycznych i mikrobiologicznych (Dz.U. 2006 nr 61 poz. 435) ze zmianami (Dz.U. 2019 poz. 2065), (Dz.U. 2020 poz. 2042) – w trakcie aktualizacji, obecnie po konsultacjach społecznych
- » Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 26 marca 2019 r. w sprawie szczegółowych wymagań, jakim powinny odpowiadać pomieszczenia i urządzenia podmiotu wykonującego działalność leczniczą (Dz.U. 2019 poz. 595)
- » Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 6 kwietnia 2020 r. w sprawie rodzajów, zakresu i wzorów dokumentacji medycznej oraz sposobu jej przetwarzania (Dz.U. 2020 poz. 666) wraz z późniejszymi zmianami.
- » Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 18 grudnia 2017 r. w sprawie standardów organizacyjnych opieki zdrowotnej w dziedzinie patomorfologii (Dz.U. 2017 poz. 2435).
- » Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 30 czerwca 2025 r. w sprawie standardów jakości dla laboratoriów (Dz.U. 2025 poz. 961).
- » Ustawa z dnia 7 kwietnia 2022 r. o wyrobach medycznych (Dz.U. 2022 poz. 974)
- » Ustawa z dnia 10 maja 2018 r. o ochronie danych osobowych (Dz.U. 2018 poz. 1000)
- » Norma PN-EN ISO 15189:2023-02 Laboratoria medyczne. Wymagania dotyczące jakości i kompetencji
- » Raquel V. Viana and Carole L. Wallis (2011). Good Clinical Laboratory Practice (GCLP) for Molecular Based Tests Used in Diagnostic Laboratories, Wide Spectra of Quality Control, Dr. Isin Akyar (Ed.), ISBN: 978-953-307-683-6, InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/wide-spectra-of-quality-control/goodclinical-laboratory-practice-gclp-for-molecular-based-tests-used-in-diagnostic-laboratories>
- » Pieńkowska-Grela B. i in. Wytyczne dla laboratoriów genetyki nowotworów litych. Rekomendacje. Biuletyn Polskiego Towarzystwa Onkologicznego NOWOTWORY 2016, tom 1, nr 2, 184–189

3.1 Zlecenie badań molekularnych

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

3.2 Procesy przedanalizyczne

- » Srinivasan M, Sedmak D, Jewell S. Effect of fixatives and tissue processing on the content and integrity of nucleic acids. *Am J Pathol.* 2002; 161: 1961–71. doi: 10.1016/S0002-9440(10)64472-0.
- » Do H, Dobrovic A. Sequence artifacts in DNA from formalin-fixed tissues: causes and strategies for minimization. *Clin Chem.* 2015; 61: 64–71. doi: 10.1373/clinchem.2014.223040.
- » Kim L, Tsao MS. Tumour tissue sampling for lung cancer management in the era of personalised therapy: what is good enough for molecular testing? *Eur Respir J.* 2014; 44: 1011–22. doi: 10.1183/09031936.00197013.
- » Lewandowska MA, Jóźwicki W, Żurawski B. Ocena patomorfologiczna materiału biologicznego tkankowego oparta jest na modyfikacji metody opisanej w publikacji: "KRAS and BRAF Mutation Analysis in Colorectal Adenocarcinoma Specimens with a Low Percentage of Tumor Cells", *Molecular Diagnosis & Therapy*, 2013, Tom 17, Nr 3, str. 193-203.
- » Serth J, Kuczyk MA, Paeslack U, Lichtinghagen R, Jonas U. Quantitation of DNA extracted after micropreparation of cells from frozen and formalin-fixed tissue sections. *Am J Pathol.* 2000; 156: 1189–96.

3.3 Wykonywanie badań, procesy badawcze

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

4.1 Rak jelita grubego

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

4.2 Czerniak

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

4.3 Rak jajnika

- » Capoluongo E, Ellison G, López-Guerrero JA, Penault-Llorca F, Ligtenberg MJL, Banerjee S, Singer C, Friedman E, Markiefka B, Schirmacher P, Büttner R, van Asperen CJ, Ray-Coquard I, Endris V, Kamel-Reid S, Percival N, Bryce J, Röthlisberger B, Soong R, de Castro DG.

Guidance Statement On BRCA1/2 Tumor Testing in Ovarian Cancer Patients. *Semin Oncol.* 2017 Jun;44(3):187-197. doi: 10.1053/j.seminoncol.2017.08.004. Epub 2017 Sep 15. PMID: 29248130.

- » Koczkowska, M., Krawczynska, N., Stukan, M., Kuzniacka, A., Brozek, I., Sniadecki, M., Debnia, J., Wydra, D., Biernat, W., Kozłowski, P., Limon, J., Wasag, B., & Ratajska, M. (2018). Spectrum and Prevalence of Pathogenic Variants in Ovarian Cancer Susceptibility Genes in a Group of 333 Patients. *Cancers*, 10(11). <https://doi.org/10.3390/cancers10110442>
- » Kowalik, A., Zalewski, K., Kopczyński, J., Siotek, M., Lech, M., Hińcza, K., Kalisz, J., Chrapek, M., Zięba, S., Furmańczyk, J., Jedliński, M., Chłopek, M., Misiek, M., & Góźdz, S. (2019). Somatic mutations in BRCA1&2 in 201 unselected ovarian carcinoma samples – single institution study. *Polish Journal of Pathology*, 70(2), 115–126. <https://doi.org/10.5114/pjp.2019.82905>
- » Ratajska, M., Koczkowska, M., Żuk, M., Gorczyński, A., Kuźniacka, A., Stukan, M., Biernat, W., Limon, J., & Wasąg, B. (2017). Detection of BRCA1/2 mutations in circulating tumor DNA from patients with ovarian cancer. *Oncotarget*, 8(60), 101325–101332. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.20722>
- » Szczerba, E., Kamińska, K., Mierzwa, T., Misiek, M., Kowalewski, J., & Lewandowska, M. A. (2021). BRCA1/2 Mutation Detection in the Tumor Tissue from Selected Polish Patients with Breast Cancer Using Next Generation Sequencing. *Genes*, 12(4), 519. <https://doi.org/10.3390/genes12040519>

4.4 Rak endometrium

- » Cancer Genome Atlas Research Network et al. (2013). Integrated genomic characterization of endometrial carcinoma. *Nature*, 497(7447), 67-73.
- » León-Castillo A, et al. (2020). Interpretation of somatic POLE mutations in endometrial carcinoma. *J Pathol*, 250(3), 323-335.
- » Lynch HT, de la Chapelle A. (2003). Hereditary colorectal cancer. *N Engl J Med*, 348(10), 919-32.
- » Pasanen A, Loukovaara M, Bützow R. (2020). Clinicopathological significance of deficient DNA mismatch repair and MLH1 promoter methylation in endometrioid endometrial carcinoma. *Mod Pathol*, 33(7), 1443-1452.
- » Sznurkowski JJ, Rys J, Kowalik A, Zolciak-Siwinska A, Bodnar L, Chudecka-Glaz A, Blecharz P, Zielinska A, Marszałek A, Bidzinski M, Sawicki W. The Polish Society of Gynecological Oncology Guidelines for the Diagnosis and Treatment of Endometrial Carcinoma (2023). *J Clin Med*. 2023 Feb 13;12(4):1480. doi: 10.3390/jcm12041480. PMID: 36836017; PMCID: PMC9959576.
- » Talhouk A, et al. (2015). A clinically applicable molecular-based classification for endometrial cancers. *Br J Cancer*, 113(2), 299-310.
- » Wong A, et al. (2016). Mutation spectrum of POLE and POLD1 mutations in South East Asian women presenting with grade 3 endometrioid endometrial carcinomas. *Gynecol Oncol*, 141(1), 113-20.

4.5 Rak płuca

- » Planchard D, Popat S, Kerr K, et al. Metastatic non-small cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. CLINICAL PRACTICE GUIDELINES. Updated version published 15 September 2020 by the ESMO Guidelines Committee. <https://www.esmo.org/content/download/347819/6934778/1/ESMO-CPG-mNSCLC-15SEPT2020.pdf> dostęp 12.04.2021 r.
- » Bubendorf, L., Büttner, R., Al-Dayel, F., Dietel, M., Elmberger, G., Kerr, K., López-Ríos, F., Marchetti, A., Öz, B., Pauwels, P., & et al. (2016). Testing for ROS1 in non-small cell lung cancer: A review with recommendations. *Virchows Archiv: An International Journal of Pathology*, 469(5), 489–503. <https://doi.org/10.1007/s00428-016-2000-3>
- » Chrzanowska NM, Kowalewski J, Lewandowska MA (2020). Use of Fluorescence *In Situ* Hybridization (FISH) in Diagnosis and Tailored Therapies in Solid Tumors *Molecules*. 2020 Apr 17;25(8):1864. doi: 10.3390/molecules25081864.
- » Grenda, A., Jarosz, B., Krawczyk, P., Kucharczyk, T., Wojas-Krawczyk, K., Reszka, K., & et al. (2018). Discrepancies between ALK protein disruption and occurrence of ALK gene rearrangement in Polish NSCLC patients. *Journal of Thoracic Disease*, 10(8), 4994–5009. <https://doi.org/10.21037/jtd.2018.07.28>.
- » Lewandowska, M. A., Czubak, K., Klonowska, K., Jozwicki, W., Kowalewski, J., & Kozłowski, P. (2015). The use of a two-tiered testing strategy for the simultaneous detection of small EGFR mutations and EGFR amplification in lung cancer. *PloS One*, 10(2), e0117983. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117983>
- » Lewandowska, M. A., Jóźwicki, W., Jochymowski, C., & Kowalewski, J. (2013). Application of PCR methods to evaluate EGFR, KRAS and BRAF mutations in a small number of tumor cells in cytological material from lung cancer patients. *Oncology Reports*, 30(3), 1045–1052. <https://doi.org/10.3892/or.2013.2579>
- » Martelli, M. P., Sozzi, G., Hernandez, L., Pettirossi, V., Navarro, A., Conte, D., & et al. (2009). EML4-ALK rearrangement in non-small cell lung cancer and non-tumor lung tissues. *The American Journal of Pathology*, 174(2), 661–670. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2009.080755>
- » Charakterystyki Produktów Lecznicych zarejestrowane przez Europejską Agencję Leków <https://www.ema.europa.eu/en/medicines>
- » The IASLC Atlas of ALK and ROS1 Testing in Lung Cancer. <https://www.iaslc.org>
- » Tysarowski Andrzej, Szumera-Ciećkiewicz Anna, Marszałek Andrzej [i in.]: Molecular diagnostics of cancers – practical approach, Nowotwory Journal of Oncology, 2023, vol. 73, nr 3, s.174-186.
- » Wasąg B, Langfort R, Kowalik A, Chorostowska-Wynimko J, Tysarowski A, Dziadziuszko R, Krzakowski M. Nowe cele molekularne w algorytmie diagnostycznym niedrobnokomórkowego raka płuca (NDRP). *Onkologia w Praktyce Klinicznej - Edukacja*. 2023;9:385–389.
- » Krzakowski M, Jassem J, Antczak A, Blasinska-Przerwa K, Chorostowska-Wynimko J, Dziadziuszko R, Głogowski M, Grodzki T, Kowalski DM, Krenke R, Langfort R, Olszewski W, Orłowski T, Śliwiński P, Tysarowski A, Rzyman W, Woźniowski M. Nowotwory klatki piersiowej. *Onkologia w Praktyce Klinicznej - Edukacja*. 2022;8:1–41.

4.5.1 Rak płuca biopsja płynna

- » Bettgowda C, Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Sci Transl Med*. 2014 Feb 19;6(224):224ra24.
- » Lewandowska, M. A., Nalejska, E., Żołna, Ł., Chrzęstek, A., Żurawski, B., Wiśniewska, M., Las-Jankowska, M., Roszkowski, K., & Kowalewski, J. (2019). Detection of somatic mutations in ctDNA derived from adenocarcinoma patients—EGFR tyrosine kinase inhibitor monitoring preliminary study. *Contemporary Oncology (Poznan, Poland)*, 23(2), 87–91. <https://doi.org/10.5114/wo.2019.85879>
- » Normanno N. Expert Opin Ther Targets. 2017 Feb;21(2):159-165. doi: Targeting the EGFR T790M mutation in non-small-cell lung cancer.
- » Ntzifa A, Marras T, Georgoulas V, Lianidou E. Liquid biopsy for the management of NSCLC patients under osimertinib treatment. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2024 Feb 2:1-23.
- » Bertoli E, De Carlo E, Basile D, Zara D, Stanzione B, Schiappacassi M, Del Conte A, Spina M, Bearz A. Liquid Biopsy in NSCLC: An Investigation with Multiple Clinical Implications. *Int J Mol Sci*. 2023 Jun 28;24(13):10803. doi: 10.3390/ijms241310803.
- » Vandekerckhove O, Cuppens K, Pat K, Du Pont B, Froyen G, Maes B. Liquid Biopsy in Early-Stage Lung Cancer: Current and Future Clinical Applications. *Cancers (Basel)*. 2023 May 10;15(10):2702. doi: 10.3390/cancers15102702.

4.6 Nowotwory lite wieku dziecięcego

- » Adamkiewicz-Drożyńska, E., K. Potczyńska, J. Stefanowicz & E. Iżycka-Świeszewska (2019) Standardy postępowania diagnostycznego w pozaczaskowych guzach germinalnych u dzieci. *Przegląd Pediatryczny*.2019/ Vol. 48/No. 3/116-128.
- » Ambros, P. F., I. M. Ambros, G. M. Brodeur, M. Haber, J. Khan, A. Nakagawara, G. Schleiermacher, F. Speleman, R. Spitz, W. B. London, S. L. Cohn, A. D. Pearson & J. M. Maris (2009) International consensus for neuroblastoma molecular diagnostics: report from the International Neuroblastoma Risk Group (INRG) Biology Committee. *Br J Cancer*, 100, 1471-82.
- » Anna Raciborska, T. K., Elżbieta Michalak (2019) Standardy postępowania diagnostycznego w guzach kości u dzieci i młodzieży. *Przegląd pediatryczny*/2019/Vol. 48/No. 3/112-115.
- » Balwierz, W., A. Wieczorek, K. Szewczyk, A. Śliwińska, T. Klepacka, G. Drabik, T. Szczepański & J. Styczyński (2019) Standardy postępowania diagnostycznego w nerwiaku zarodkowym współczulnym u dzieci. *Przegląd Pediatryczny*/2019/Vol. 48/No. 3/48.
- » Bernarda Kazanowska, J. W.-T., Teresa & A. S. Klepacka, Jan Godziński (2019) Standardy postępowania w mięsakach tkanek miękkich. *Przegląd pediatryczny*/2019/Vol. 48/No. 3/99-108.
- » Capper, D., D. T. W. Jones, M. Sill, V. Hovestadt, D. Schrimpf, D. Sturm, C. Koelsche, et al. (2018) DNA methylation-based classification of central nervous system tumours. *Nature*, 555, 469-474.
- » Casali, P. G., S. Bielack, N. Abecassis, H. T. Aro, S. Bauer, R. Biagini, S. Bonvalot, I. Boukovinas, J. V. M.. ESMO Guidelines Committee (2018) Bone sarcomas: ESMO-PaedCan-EU-RACAN Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*, 29, iv79-iv95.

- » Chen, X., A. Bahrami, A. Pappo, J. Easton, J. Dalton, E. Hedlund, D. Ellison, S. Shurtleff, G. Wu, L. Wei, M. Parker, M. Rusch, P. Nagahawatte, J. Wu, S. Mao, K. Boggs, H. Mulder, D. Yergeau, C. Lu, L. Ding, M. Edmonson, C. Qu, J. Wang, Y. Li, F. Navid, N. C. Daw, E. R. Mardis, R. K. Wilson, J. R. Downing, J. Zhang, M. A. Dyer & S. J. C. s. R. H. W. U. P. C. G. Project (2014) Recurrent somatic structural variations contribute to tumorigenesis in pediatric osteosarcoma. *Cell Rep*, 7, 104-12.
- » Czauderna, P., B. Haeberle, E. Hiyama, A. Rangaswami, M. Krailo, R. Maibach, E. Rinaldi, Y. Feng, D. Aronson, M. Malogolowkin, K. Yoshimura, I. Leuschner, D. Lopez-Terrada, T. Hishiki, G. Perilongo, D. von Schweinitz, I. Schmid, K. Watanabe, M. Derosa & R. Meyers (2016) The Children's Hepatic tumors International Collaboration (CHIC): Novel global rare tumor database yields new prognostic factors in hepatoblastoma and becomes a research model. *Eur J Cancer*, 52, 92-101.
- » Dembowska-Bagińska, B., O. Rutynowska-Pronicka, W. Hautz, A. Kołodziejczyk, K. Cieślík, A. Olechowski, E. Jurkiewicz, W. Grajkowska, M. Stepaniuk & J. Trubicka (2019) Standardy postępowania diagnostycznego w siatkówczaku. *Przegląd pediatryczny/2019/Vol. 48/No. 3/80-88*
- » Eichenmüller, M., F. Trippel, M. Kreuder, A. Beck, T. Schwarzmayr, B. Häberle, S. Cairo, I. Leuschner, D. von Schweinitz, T. M. Strom & R. Kappler (2014) The genomic landscape of hepatoblastoma and their progenies with HCC-like features. *J Hepatol*, 61, 1312-20.
- » El Beaino, M., J. Roszik, J. A. Livingston, W. L. Wang, A. J. Lazar, B. Amini, V. Subbiah, V. Lewis & A. P. Conley (2018) Mesenchymal Chondrosarcoma: a Review with Emphasis on its Fusion-Driven Biology. *Curr Oncol Rep*, 20, 37.
- » Ellison, D. W., K. D. Aldape, D. Capper, M. Fouladi, M. R. Gilbert, R. J. Gilbertson, C. Hawkins, T. E. Merchant, K. Pajtler, S. Venneti & D. N. Louis (2020) cIMPACT-NOW update 7: advancing the molecular classification of ependymal tumors. *Brain Pathol*, 30, 863-866.
- » Ellison, D. W., C. Hawkins, D. T. W. Jones, A. Onar-Thomas, S. M. Pfister, G. Reifenberger & D. N. Louis (2019) cIMPACT-NOW update 4: diffuse gliomas characterized by MYB, MYBL1, or FGFR1 alterations or BRAFV600E mutation. *Acta Neuropathologica*, 137, 683-687.
- » Fiedorowicz, M., E. Bartnik, P. Sobczuk, P. Teterycz & A. M. Czarnecka (2018) Molecular biology of sarcoma. *Oncology in Clinical Practice*, 14, 307-330.
- » Francis, J. H., A. L. Richards, D. L. Mandelker, M. F. Berger, M. F. Walsh, I. J. Dunkel, M. T. A. Donoghue & D. H. Abramson (2021) Molecular Changes in Retinoblastoma beyond. *Cancers (Basel)*, 13.
- » Godzinski, J. (2015) The current status of treatment of Wilms' tumor as per the SIOP trials. *J Indian Assoc Pediatr Surg*, 20, 16-20.
- » Grundy, P. E., N. E. Breslow, S. Li, E. Perlman, J. B. Beckwith, M. L. Ritchey, R. C. Shamberger, G. M. Haase, G. J. D'Angio, M. Donaldson, M. J. Coppes, M. Malogolowkin, P. Shearer, P. R. Thomas, R. Macklis, G. Tomlinson, V. Huff, D. M. Green & N. W. T. S. Group (2005) Loss of heterozygosity for chromosomes 1p and 16q is an adverse prognostic factor in favorable-histology Wilms tumor: a report from the National Wilms Tumor Study Group. *J Clin Oncol*, 23, 7312-21.

- » Guerreiro Stucklin, A. S., S. Ryall, K. Fukuoka, M. Zapotocky, A. Lassaletta, C. Li, T. Bridge, B. Kim, A. et.al. (2019) Alterations in ALK/ROS1/NTRK/MET drive a group of infantile hemispheric gliomas. *Nat Commun*, 10, 4343.
- » Hu, X., H. Chen, M. Jin, X. Wang, J. Lee, W. Xu, R. Zhang, S. Li & J. Niu (2012) Molecular cytogenetic characterization of undifferentiated embryonal sarcoma of the liver: a case report and literature review. *Mol Cytogenet*, 5, 26.
- » Jünger, S. T., F. Andreiulo, M. Mynarek, E. Dörner, A. Zur Mühlen, S. Rutkowski, A. O. von Bueren & T. Pietsch (2020) Ependymomas in infancy: underlying genetic alterations, histological features, and clinical outcome. *Childs Nerv Syst*, 36, 2693-2700.
- » Klamt, B., M. Schulze, C. Thäte, J. Mares, P. Goetz, R. Kodet, W. Scheulen, A. Weirich, N. Graf & M. Gessler (1998) Allele loss in Wilms tumors of chromosome arms 11q, 16q, and 22q correlate with clinicopathological parameters. *Genes Chromosomes Cancer*, 22, 287-94.
- » Kleinschmidt-DeMasters, B. K. & J. M. Mulcahy Levy (2018) H3 K27M-mutant gliomas in adults vs. children share similar histological features and adverse prognosis. *Clin Neuropathol*, 37 (2018), 53-63.
- » Knudson, A. G. (1971) Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 68, 820-3.
- » Komori, T. (2021) The molecular framework of pediatric-type diffuse gliomas: shifting toward the revision of the WHO classification of tumors of the central nervous system. *Brain Tumor Pathol*, 38, 1-3.
- » Lala, S. V. & N. Strubel (2019) Ovarian neoplasms of childhood. *Pediatr Radiol*, 49, 1463-1475.
- » London, W., R. Castleberry, K. Matthay, A. Look, R. Seeger, H. Shimada, P. Thorner, G. Brodeur, J. Maris & C. Reynolds (2005) Evidence for an age cutoff greater than 365 days for neuroblastoma risk group stratification in the Children's Oncology Group. *Journal of clinical oncology*, 23, 6459-6465.
- » Louis, D. N., C. Giannini, D. Capper, W. Paulus, D. Figarella-Branger, M. B. Lopes, T. T. Batchelor, J. G. Cairncross, M. van den Bent, W. Wick & P. Wesseling (2018) cIMPACT-NOW update 2: diagnostic clarifications for diffuse midline glioma, H3 K27M-mutant and diffuse astrocytoma/anaplastic astrocytoma, IDH-mutant. *Acta Neuropathol*, 135, 639-642.
- » Louis, D. N., A. Perry, P. Wesseling, D. J. Brat, I. A. Cree, D. Figarella-Branger, C. Hawkins, H. K. Ng, S. M. Pfister, G. Reifenberger, R. Soffietti, A. von Deimling & D. W. Ellison (2021) The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Neuro Oncol*, 23, 1231-1251.
- » Louis, D. N., P. Wesseling, K. Aldape, D. J. Brat, D. Capper, I. A. Cree, C. Eberhart, D. Figarella-Branger, M. Fouladi, G. N. Fuller, C. Giannini, C. Haberler, C. Hawkins, T. Komori, J. M. Kros, H. K. Ng, B. A. Orr, S. H. Park, W. Paulus, A. Perry, T. Pietsch, G. Reifenberger, M. Rosenblum, B. Rous, F. Sahm, C. Sarkar, D. A. Solomon, U. Tabori, M. J. van den Bent, A. von Deimling, M. Weller, V. A. White & D. W. Ellison (2020) cIMPACT-NOW update 6: new entity and diagnostic principle recommendations of the cIMPACT-Utrecht meeting on future CNS tumor classification and grading. *Brain Pathol*, 30, 844-856.

- » Ma, X., Y. Liu, Y. Liu, L. B. Alexandrov, M. N. Edmonson, C. Gawad, X. Zhou, Y. Li, M. C. Rusch & J. Easton (2018) Pan-cancer genome and transcriptome analyses of 1,699 paediatric leukaemias and solid tumours. *Nature*, 555, 371-376.
- » Morgenstern, D. A., R. Bagatell, S. L. Cohn, M. D. Hogarty, J. M. Maris, L. Moreno, J. R. Park, A. D. Pearson, G. Schleiermacher, D. Valteau-Couanet, W. B. London & M. S. Irwin (2019) The challenge of defining “ultra-high-risk” neuroblastoma. *Pediatr Blood Cancer*, 66, e27556.
- » Newman, S., J. Nakitandwe, C. A. Kesserwan, E. M. Azzato, D. A. Wheeler, M. Rusch, S. Shurtleff, D. J. Hedges, K. V. Hamilton & S. G. Foy (2021) Genomes for kids: the scope of pathogenic mutations in pediatric cancer revealed by comprehensive DNA and RNA sequencing. *Cancer discovery*, 11, 3008-3027.
- » Olson, T. A., M. J. Murray, C. Rodriguez-Galindo, J. C. Nicholson, D. F. Billmire, M. D. Krailo, H. M. Dang, J. F. Amatruda, C. M. Thornton, G. S. Arul, S. J. Stoneham, F. Pashankar, D. Stark, F. Shaikh, D. M. Gershenson, A. Covens, J. Hurteau, S. P. Stenning, D. R. Feldman, P. S. Grimison, R. A. Huddart, C. Sweeney, T. Powles, L. F. Lopes, S. dos Santos Agular, G. Chinnaswamy, S. Khaleel, S. Abouelnaga, J. P. Hale & A. L. Frazier (2015) Pediatric and Adolescent Extracranial Germ Cell Tumors: The Road to Collaboration. *J Clin Oncol*, 33, 3018-28.
- » Pajtler, K. W., H. Witt, M. Sill, D. T. Jones, V. Hovestadt, F. Kratochwil, K. Wani, R. Tatevossian, C. Punchihewa & P. Johann (2015) Molecular classification of ependymal tumors across all CNS compartments, histopathological grades, and age groups. *Cancer Cell*, 27, 728-743.
- » Pietras, W. (2012) Advances and changes in the treatment of children with nephroblastoma. *Adv Clin Exp Med*, 21, 809-820.
- » Pietras, W., J. Kobos & J. Godziński (2019) Standardy postępowania diagnostycznego i terapeutycznego w guzach nerek. *Przegląd pediatryczny/2019/Vol. 48/No. 3/09-111*
- » Quan, V. L., B. Zhang, L. S. Mohan, K. Shi, M. C. Isales, E. Panah, T. J. Taxter, N. Beaubier, K. White & P. Gerami (2019) Activating Structural Alterations in MAPK Genes Are Distinct Genetic Drivers in a Unique Subgroup Of Spitzoid Neoplasms. *Am J Surg Pathol*, 43, 538-548.
- » Rakheja, D., K. S. Chen, Y. Liu, A. A. Shukla, V. Schmid, T. C. Chang, S. Khokhar, J. E. Wickiser, N. J. Karandikar, J. S. Malter, J. T. Mendell & J. F. Amatruda (2014) Somatic mutations in DROSHA and DICER1 impair microRNA biogenesis through distinct mechanisms in Wilms tumours. *Nat Commun*, 2, 4802.
- » Ryall, S., U. Tabori & C. Hawkins (2020) Pediatric low-grade glioma in the era of molecular diagnostics. *Acta Neuropathol Commun*, 8, 30.
- » Sahm, F., D. Schrimpf, D. T. Jones, J. Meyer, A. Kratz, D. Reuss, D. Capper, C. Koelsche, A. Korshunov, B. Wiestler, I. Buchhalter, T. Milde, F. Selt, D. Sturm, M. Kool, M. Hummel, M. Bewerunge-Hudler, C. Mawrin, U. Schuller, C. Jungk, A. Wick, O. Witt, M. Platten, C. Herold-Mende, A. Unterberg, S. M. Pfister, W. Wick & A. von Deimling (2016) Next-generation sequencing in routine brain tumor diagnostics enables an integrated diagnosis and identifies actionable targets. *Acta Neuropathol*, 131, 903-10.
- » Sekiguchi, M., M. Seki, T. Kawai, K. Yoshida, M. Yoshida, T. Isobe, N. Hoshino, R. Shirai, M. Tanaka, R. Souzaki, K. Watanabe, Y. Arakawa, Y. Nannya, H. Suzuki, Y. Fujii, K. Kataoka, Y. Shiraishi, K. Chiba, H. Tanaka, T. Shimamura, Y. Sato, A. Sato-Otsubo, S. Kimura, Y. Kubota,

- M. Hiwatari, K. Koh, Y. Hayashi, Y. Kanamori, M. Kasahara, K. Kohashi, M. Kato, T. Yoshioka, K. Matsumoto, A. Oka, T. Taguchi, M. Sanada, Y. Tanaka, S. Miyano, K. Hata, S. Ogawa & J. Takita (2020) Integrated multiomics analysis of hepatoblastoma unravels its heterogeneity and provides novel druggable targets. *NPJ Precis Oncol*, 4, 20.
- » Setty, B. A., G. G. Jinesh, M. Arnold, F. Pettersson, C. H. Cheng, L. Cen, S. J. Yoder, J. K. Teer, E. R. Flores, D. R. Reed & A. S. Brohl (2020) The genomic landscape of undifferentiated embryonal sarcoma of the liver is typified by C19MC structural rearrangement and overexpression combined with TP53 mutation or loss. *PLoS Genet*, 16, e1008642.
- » Steliarova-Foucher, E., M. Colombet, L. A. G. Ries, F. Moreno, A. Dolya, F. Bray, P. Hesselting, H. Y. Shin, C. A. Stiller (2017) International incidence of childhood cancer, 2001-10: a population-based registry study. *The Lancet. Oncology*, 18, 719-731.
- » Sturm, D., B. A. Orr, U. H. Toprak, V. Hovestadt, D. T. Jones, D. Capper, M. Sill, I. Buchhalter, P. A. et al. (2016) New Brain Tumor Entities Emerge from Molecular Classification of CNS-PNETs. *Cell*, 164, 1060-72.
- » Styczyński, J., W. Balwierz, B. Dembowska-Bagińska, B. Kazanowska, J. Wachowiak, M. Matysiak, A. Klukowska, M. Krawczuk-Rybak, E. Adamkiewicz-Drożyńska & W. M. Młynarski (2018) Paediatric oncology and haematology in Poland: position paper. *Pediatrics Polska*, 93.
- » Sumazin, P., Y. Chen, L. R. Treviño, S. F. Sarabia, O. A. Hampton, K. Patel, T. A. Mistretta, B. Zorman, P. Thompson, A. Heczey, S. Comerford, D. A. Wheeler, M. Chintagumpala, R. Meyers, D. Rakheja, M. J. Finegold, G. Tomlinson, D. W. Parsons & D. López-Terrada (2017) Genomic analysis of hepatoblastoma identifies distinct molecular and prognostic subgroups. *Hepatology*, 65, 104-121.
- » van den Heuvel-Eibrink, M. M., J. A. Hol, K. Pritchard-Jones, H. van Tinteren, R. Furtwängler, A. C. Verschuur, G. M. Vujanic, I. Leuschner, J. Brok, C. Rübe, A. M. Smets, G. O. Janssens, J. Godzinski, G. L. Ramírez-Villar, B. de Camargo, H. Segers, P. Collini, M. Gessler, C. Bergeron, F. Spreafico, N. Graf & I. S. o. P. O. R. T. S. G. (SIOP-RTSG) (2017) Position paper: Rationale for the treatment of Wilms tumour in the UMBRELLA SIOP-RTSG 2016 protocol. *Nat Rev Urol*, 14, 743-752.
- » VandenBoom, T., V. L. Quan, B. Zhang, E. M. Garfield, B. Y. Kong, M. C. Isales, E. Panah, C. Igartua, T. Taxter, N. Beaubier, K. White & P. Gerami (2018) Genomic Fusions in Pigmented Spindle Cell Nevus of Reed. *Am J Surg Pathol*, 42, 1042-1051.
- » Vokuhl, C., N. Nourkani-Tutdibi, R. Furtwängler, M. Gessler, N. Graf & I. Leuschner (2018) ETV6-NTRK3 in congenital mesoblastic nephroma: A report of the SIOP/GPOH nephroblastoma study. *Pediatr Blood Cancer*, 65.
- » Walentyna, B. & W. Aleksandra. 2021. *Nerwiak zarodkowy współczulny. W: Onkologia i hematologia dziecięca. (red. A. Chybicka, K. Sawicz-Birkowska, B. Kazanowska). Tom 1. Wydawnictwo Lekarskie PZWL.*
- » Weiser, D. A., D. C. West-Szymanski, E. Faint, S. Weiner, M. A. Rivas, C. W. T. Zhao, C. He & M. A. Applebaum (2019) Progress toward liquid biopsies in pediatric solid tumors. *Cancer Metastasis Rev*, 38, 553-571.
- » Wieczorek, A. & W. Balwierz (2010) Występowanie i znaczenie rokownicze wybranych czynników w zwojaku zarodkowym współczulnym u dzieci. *Przegląd Lekarski*. 67 (6): 393-374.

- » Worst, B. C., C. M. van Tilburg, G. P. Balasubramanian, P. Fiesel, R. Witt, A. Freitag, M. Bodalil, C. Previti, S. Wolf & S. Schmidt (2016) Next-generation personalised medicine for high-risk paediatric cancer patients–The INFORM pilot study. *European journal of cancer*, 65, 91-101.
- » Yoshida, Y., S. Nobusawa, S. Nakata, M. Nakada, Y. Arakawa, Y. Mineharu, Y. Sugita, T. Yoshioka, A. Araki, Y. Sato, H. Takeshima, M. Okada, A. Nishi, T. Yamazaki, K. Kohashi, Y. Oda, J. Hirato & H. Yokoo (2018) CNS high-grade neuroepithelial tumor with BCOR internal tandem duplication: a comparison with its counterparts in the kidney and soft tissue. *Brain Pathol*, 28, 710-720.
- » Zhang, J., C. A. Benavente, J. McEvoy, J. Flores-Otero, L. Ding, X. Chen, A. Ulyanov, G. Wu, M. Wilson, J. Wang, R. Brennan, M. Rusch, A. L. Manning, J. Ma, J. Easton, S. Shurtleff, C. Mullighan, S. Pounds, S. Mukatira, P. Gupta, G. Neale, D. Zhao, C. Lu, R. S. Fulton, L. L. Fulton, X. Hong, D. J. Dooling, K. Ochoa, C. Naeve, N. J. Dyson, E. R. Mardis, A. Bahrami, D. Ellison, R. K. Wilson, J. R. Downing & M. A. Dyer (2012) A novel retinoblastoma therapy from genomic and epigenetic analyses. *Nature*, 481, 329-34.
- » <https://clinicaltrials.gov>
- » <https://www.orpha.net>
- » <https://seer.cancer.gov/iccc/iccc-iarc-2017.html#fn>
- » <https://www.pathologyoutlines.com>

4.7 Nowotwory mózgu u dorosłych

- » Chrzanowska NM, Kowalewski J, Lewandowska MA (2020). Use of Fluorescence *In Situ* Hybridization (FISH) in Diagnosis and Tailored Therapies in Solid Tumors *Molecules*. 2020 Apr 17;25(8):1864. doi: 10.3390/molecules25081864.
- » De Preter, K., Speleman, F., Combaret, V., Lunec, J., Laureys, G., Eussen, B. H. J., Francotte, N., Board, J., Pearson, A. D. J., De Paepe, A., Van Roy, N., & Vandesompele, J. (2002). Quantification of MYCN, DDX1, and NAG gene copy number in neuroblastoma using a real-time quantitative PCR assay. *Modern Pathology: An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 15(2), 159–166. <https://doi.org/10.1038/mod-pathol.3880508>
- » Izycka-Swieszewska, E., Brzeskwiniewicz, M., Wozniak, A., Drozyska, E., Grajkowska, W., Perek, D., Balcerska, A., Klepacka, T., & Limon, J. (2010). EGFR, PIK3CA and PTEN gene status and their protein product expression in neuroblastic tumours. *Folia Neuropathologica*, 48(4), 238–245.
- » Kamińska K, Nalejska E, Kubiak M, Wojtysiak J, Żotna Ł, Kowalewski J, Lewandowska MA. (2019) Prognostic and Predictive Epigenetic Biomarkers in Oncology. *Mol Diagn Ther*. 2019 Feb;23(1):83-95. doi: 10.1007/s40291-018-0371-7.
- » Lipska, B. S., Koczkowska, M., Wierzba, J., Płoszynska, A., Iliszko, M., Izycka-Swieszewska, E., Adamkiewicz-Drozyska, E., & Limon, J. (2013). On the significance of germline cytogenetic rearrangements at MYCN locus in neuroblastoma. *Molecular Cytogenetics*, 6(1), 43. <https://doi.org/10.1186/1755-8166-6-43>

- » Rodriguez, F. J., Mota, R. A., Scheithauer, B. W., Giannini, C., Blair, H., New, K. C., Wu, K. J., Dickson, D. W., & Jenkins, R. B. (2009). Interphase cytogenetics for 1p19q and t(1;19)(q10;p10) may distinguish prognostically relevant subgroups in extraventricular neurocytoma. *Brain Pathology (Zurich, Switzerland)*, 19(4), 623–629. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.2008.00206.x>
- » Roszkowski, K., Furtak, J., Zurawski, B., Szyłberg, T., & Lewandowska, M. A. (2016). Potential Role of Methylation Marker in Glioma Supporting Clinical Decisions. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(11). <https://doi.org/10.3390/ijms17111876>
- » Śledzińska, P., Bebyn, M. G., Furtak, J., Kowalewski, J., & Lewandowska, M. A. (2021). Prognostic and Predictive Biomarkers in Gliomas. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(19), 10373. <https://doi.org/10.3390/ijms221910373>
- » Śledzińska P, Bebyn M, Szczerba E, Furtak J, Harat M, Olszewska N, Kamińska K, Kowalewski J, Lewandowska MA. 2022 Glioma 2021 WHO Classification: The Superiority of NGS Over IHC in Routine Diagnostics. *Mol Diagn Ther*. 2022 Nov;26(6):699-713. doi: 10.1007/s40291-022-00612-3. Epub 2022 Sep 2.
- » WHO Classification of Tumours Editorial Board. Central nervous system tumours. Lyon (France): International Agency for Research on Cancer; 2021. (WHO classification of tumours series, 5th ed.; vol. 6). <https://publications.iarc.fr/601>.
- » Komori T. The molecular framework of pediatric-type diffuse gliomas: shifting toward the revision of the WHO classification of tumors of the central nervous system. *Brain Tumor Pathol*. 2021 Jan;38(1):1-3.
- » Stichel D, Ebrahimi A, Reuss D, Schrimpf D, Ono T, Shirahata M, Reifenberger G, Weller M, Hänggi D, Wick W, Herold-Mende C, Westphal M, Brandner S, Pfister SM, Capper D, Sahm F, von Deimling A. Distribution of EGFR amplification, combined chromosome 7 gain and chromosome 10 loss, and TERT promoter mutation in brain tumors and their potential for the reclassification of IDHwt astrocytoma to glioblastoma. *Acta Neuropathol*. 2018 Nov;136(5):793-803.
- » Louis DN, Perry A, Wesseling P, Brat DJ, Cree IA, Figarella-Branger D, Hawkins C, Ng HK, Pfister SM, Reifenberger G, Soffietti R, von Deimling A, Ellison DW. The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Neuro Oncol*. 2021 Aug 2;23(8):1231-1251.
- » Jamshidi P, Brat DJ. The 2021 WHO classification of central nervous system tumors: what neurologists need to know. *Curr Opin Neurol*. 2022 Dec 1;35(6):764-771.
- » Woehrer A, Sander P, Haberler C, Kern S, Maier H, Preusser M, Hartmann C, Kros JM, Haifellner JA; Research Committee of the European Confederation of Neuropathological Societies. FISH-based detection of 1p 19q codeletion in oligodendroglial tumors: procedures and protocols for neuropathological practice - a publication under the auspices of the Research Committee of the European Confederation of Neuropathological Societies (Euro-CNS). *Clin Neuropathol*. 2011 Mar-Apr;30(2):47-55.
- » Weller M, van den Bent M, Preusser M, Le Rhun E, Tonn JC, Minniti G, Bendszus M, Balana C, Chinot O, Dirven L, French P, Hegi ME, Jakola AS, Platten M, Roth P, Rudà R, Short S, Smits M, Taphoorn MJB, von Deimling A, Westphal M, Soffietti R, Reifenberger G, Wick W. EANO guidelines on the diagnosis and treatment of diffuse gliomas of adulthood. *Nat Rev Clin Oncol*. 2021 Mar;18(3):170-186.

- » Brandner S, McAleenan A, Jones HE, Kernohan A, Robinson T, Schmidt L, Dawson S, Kelly C, Leal ES, Faulkner CL, Palmer A, Wragg C, Jefferies S, Vale L, Higgins JPT, Kurian KM. Diagnostic accuracy of 1p/19q codeletion tests in oligodendroglioma: A comprehensive meta-analysis based on a Cochrane systematic review. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2022 Jun;48(4):e12790.

4.8 Rak tarczycy

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

4.9 Rak prostaty

- » Cremers RG, Aben KK, van Oort IM, Sedelaar JP, Vasen HF, Vermeulen SH, Kiemeny LA. The clinical phenotype of hereditary versus sporadic prostate cancer: HPC definition revisited. *Prostate.* 2016 Jul;76(10):897-904. doi: 10.1002/pros.23179. Epub 2016 Mar 14. PMID: 26989049; PMCID: PMC5069637.
- » Ewing CM, Ray AM, Lange EM, Zuhlke KA, Robbins CM, Tembe WD, Wiley KE, Isaacs SD, Johng D, Wang Y, Bizon C, Yan G, Gielzak M, Partin AW, Shanmugam V, Izatt T, Sinari S, Craig DW, Zheng SL, Walsh PC, Montie JE, Xu J, Carpten JD, Isaacs WB, Cooney KA. Germline mutations in HOXB13 and prostate-cancer risk. *N Engl J Med.* 2012 Jan 12;366(2):141-9. doi: 10.1056/NEJMoa1110000. PMID: 22236224; PMCID: PMC3779870.

- » Nyberg T, Govindasami K, Leslie G, Dadaev T, Bancroft E, Ni Raghallaigh H, Brook MN, Husain N, Keating D, Lee A, McMahon R, Morgan A, Mullen A, Osborne A, Rageevakumar R; UK Genetic Prostate Cancer Study Collaborators; Kote-Jarai Z, Eeles R, Antoniou AC. Homeobox B13 G84E Mutation and Prostate Cancer Risk. *Eur Urol*. 2019 May;75(5):834-845. doi: 10.1016/j.eururo.2018.11.015. Epub 2018 Dec 8. PMID: 30527799; PMCID: PMC6470122.
- » Bancroft, E. K., Page, E. C., Castro, E., Lilja, H., Vickers, A., Sjoberg, D., Assel, M., Foster, C. S., Mitchell, G., Drew, K., Mæhle, L., Axcrona, K., Evans, D. G., Bulman, B., Eccles, D., McBride, D., van Asperen, C., Vasen, H., Kiemeny, L. A., ... Eeles, R. A. (2014). Targeted prostate cancer screening in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: Results from the initial screening round of the IMPACT study. *European Urology*, 66(3), 489–499. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2014.01.003>
- » Lau, E., McCoy, P., Reeves, F., Chow, K., Clarkson, M., Kwan, E. M., Packwood, K., Northen, H., He, M., Kingsbury, Z., Mangiola, S., Kerger, M., Furrer, M. A., Crowe, H., Costello, A. J., McBride, D. J., Ross, M. T., Pope, B., Hovens, C. M., & Corcoran, N. M. (2020). Detection of ctDNA in plasma of patients with clinically localised prostate cancer is associated with rapid disease progression. *Genome Medicine*, 12(1), 72. <https://doi.org/10.1186/s13073-020-00770-1>
- » Risdon EN, et al. PARP Inhibitors and Prostate Cancer: To Infinity and Beyond BRCA. *Oncologist*. 2021 Jan;26(1):e115-e129.

4.10 Rak trzustki

- » Conroy T, Pfeiffer P, Vilgrain V, Lamarca A, Seufferlein T, O'Reilly EM, Hackert T, Golan T, Prager G, Haustermans K, Vogel A, Ducreux M; ESMO Guidelines Committee. Electronic address: clinicalguidelines@esmo.org. Pancreatic cancer: ESMO Clinical Practice Guideline for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2023 Nov;34(11):987-1002. doi: 10.1016/j.annonc.2023.08.009. Epub 2023 Sep 9. PMID: 37678671.
- » Rosen MN, Goodwin RA, Vickers MM. BRCA mutated pancreatic cancer: A change is coming. *World J Gastroenterol*. 2021 May 7;27(17):1943-1958.
- » Vietri MT, D'Elia G, Caliendo G, Albanese L, Signoriello G, Napoli C, Molinari AM. Pancreatic Cancer with Mutation in BRCA1/2, MLH1, and APC Genes: Phenotype Correlation and Detection of a Novel Germline BRCA2 Mutation. *Genes (Basel)*. 2022 Feb 9;13(2):321. doi: 10.3390/genes13020321.
- » Wong W, Raufi AG, Safyan RA, Bates SE, Manji GA. BRCA Mutations in Pancreas Cancer: Spectrum, Current Management, Challenges and Future Prospects. *Cancer Manag Res*. 2020 Apr 23;12:2731-2742
- » Szwiec M, Lubiński J, Cybulski C. Recurrent mutations of BRCA1 and BRCA2 in Poland: an update. *Clin Genet*. 2015 Mar;87(3):288-92.

4.11 GIST

- » Astolfi, A., Indio, V., Nannini, M., Saponara, M., Schipani, A., De Leo, A., Altimari, A., Vincenzi, B., Comandini, D., Grignani, G., Secchiero, P., Urbini, M., & Pantaleo, M. A. (2020). Targeted Deep Sequencing Uncovers Cryptic KIT Mutations in KIT/PDGFR/SDH/RAS-P Wild-Type GIST. *Frontiers in Oncology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.00504>

- » Kiwerska, K., Wroblewska, J., Kaluzna, A., & Marszalek, A. (2020). Justification of direct Sanger sequencing application for detection of KIT and PDGFR α gene mutations in formalin-fixed, paraffin-embedded samples from gastrointestinal stromal tumours. *Journal of Clinical Pathology*, 73(4), 213–219. <https://doi.org/10.1136/jclinpath-2019-206225>
- » Lasota, J., Felisiak-Golabek, A., Wasag, B., Kowalik, A., Zięba, S., Chłopek, M., Wang, Z.-F., Coates, T., Kopczynski, J., Gozdz, S., Sarlomo-Rikala, M., & Miettinen, M. (2016). Frequency and clinicopathologic profile of PIK3CA mutant GISTs: Molecular genetic study of 529 cases. *Modern Pathology: An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 29(3), 275–282. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2015.160>
- » Origone, P., Gargiulo, S., Mastracci, L., Ballestrero, A., Battistuzzi, L., Casella, C., Comandini, D., Cusano, R., Dei Tos, A. P., Fiocca, R., Garuti, A., Ghiorzo, P., Martinuzzi, C., Toffolatti, L., Liguria GIST Unit, & Bianchi Scarrà, G. (2013). Molecular characterization of an Italian series of sporadic GISTs. *Gastric Cancer: Official Journal of the International Gastric Cancer Association and the Japanese Gastric Cancer Association*, 16(4), 596–601. <https://doi.org/10.1007/s10120-012-0213-y>
- » Wozniak A, Rutkowski P, Piskorz A, Ciwoniuk M, Osuch C, Bylina E, Sygut J, Chosia M, Rys J, Urbanczyk K, Kruszewski W, Sowa P, Siedlecki J, Debiec-Rychter M, Limon J; Polish Clinical GIST Registry. Prognostic value of KIT/PDGFR α mutations in gastrointestinal stromal tumours (GIST): Polish Clinical GIST Registry experience. *Ann Oncol*. 2012 Feb;23(2):353-60.
- » Casali PG, Abecassis N, Aro HT, Bauer S, Biagini R, Bielack S, Bonvalot S, Boukovinas I, Bovee JVMG, et. al ESMO Guidelines Committee and EURACAN. Gastrointestinal stromal tumours: ESMO-EURACAN Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2018 Oct 1;29(Suppl 4):iv68-iv78.
- » Szucs Z, Thway K, Fisher C, Bulusu R, Constantinidou A, Benson C, van der Graaf WT, Jones RL. Molecular subtypes of gastrointestinal stromal tumors and their prognostic and therapeutic implications. *Future Oncol*. 2017 Jan;13(1):93-107.
- » Shi E, Chmielecki J, Tang CM, Wang K, Heinrich MC, Kang G, Corless CL, Hong D, Fero KE, Murphy JD, Fanta PT, Ali SM, De Siena M, Burgoyne AM, Movva S, Madlensky L, Heestand GM, Trent JC, Kurzrock R, Morosini D, Ross JS, Harismendy O, Sicklick JK. FGFR1 and NTRK3 actionable alterations in “Wild-Type” gastrointestinal stromal tumors. *J Transl Med*. 2016 Dec 14;14(1):339.
- » Blay JY, Kang YK, Nishida T, von Mehren M. Gastrointestinal stromal tumours. *Nat Rev Dis Primers*. 2021 Mar 18;7(1):22.
- » Wu CE, Tzen CY, Wang SY, Yeh CN. Clinical Diagnosis of Gastrointestinal Stromal Tumor (GIST): From the Molecular Genetic Point of View. *Cancers (Basel)*. 2019 May 16;11(5):679.
- » Shen YY, Ma XL, Wang M, Zhuang C, Ni B, Tu L, Liu Q, Zhao WY, Cao H. Exon 11 homozygous mutations and intron 10/exon 11 junction deletions in the KIT gene are associated with poor prognosis of patients with gastrointestinal stromal tumors. *Cancer Med*. 2020 Sep;9(18):6485-6496.
- » WHO Classification of Tumours Editorial Board. Digestive system tumours. Lyon (France): International Agency for Research on Cancer; 2019. (WHO classification of tumours series, 5th ed.; vol. 1). <https://publications.iarc.fr/579>.

4.12 Mięsak

- » Asif, A., Mushtaq, S., Hassan, U., Akhtar, N., Hussain, M., Azam, M., & Qazi, R. (2018). Fluorescence *in Situ* Hybridization (FISH) for Differential Diagnosis of Soft Tissue Sarcomas. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention: APJCP*, 19(3), 655–660. <https://doi.org/10.22034/APJCP.2018.19.3.655>
- » Chen, S., Fritchie, K., Wei, S., Ali, N., Curless, K., Shen, T., Brini, A. T., Latif, F., Sumathi, V., Siegal, G. P., & Cheng, L. (2017). Diagnostic utility of IDH1/2 mutations to distinguish dedifferentiated chondrosarcoma from undifferentiated pleomorphic sarcoma of bone. *Human Pathology*, 65, 239–246. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2017.05.015>
- » Chrzanowska NM, Kowalewski J, Lewandowska MA (2020). Use of Fluorescence *In Situ* Hybridization (FISH) in Diagnosis and Tailored Therapies in Solid Tumors *Molecules*. 2020 Apr 17;25(8):1864. doi: 10.3390/molecules25081864.
- » Cote, G. M., He, J., & Choy, E. (2018). Next-Generation Sequencing for Patients with Sarcoma: A Single Center Experience. *The Oncologist*, 23(2), 234–242. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2017-0290>
- » Koczkowska, M., Lipska-Ziętkiewicz, B. S., Iliszko, M., Ryś, J., Miettinen, M., Lasota, J., Biernat, W., Harazin-Lechowska, A., Kruczak, A., & Limon, J. (2017). Application of high-resolution genomic profiling in the differential diagnosis of liposarcoma. *Molecular Cytogenetics*, 10, 7. <https://doi.org/10.1186/s13039-017-0309-5>
- » Lugowska, I., Teterycz, P., Mikula, M., Kulecka, M., Kluska, A., Balabas, A., Piatkowska, M., Wągródzki, M., Pienkowski, A., Rutkowski, P., & Ostrowski, J. (2018). IDH1/2 Mutations Predict Shorter Survival in Chondrosarcoma. *Journal of Cancer*, 9(6), 998–1005. <https://doi.org/10.7150/jca.22915>
- » McConnell, L., Houghton, O., Stewart, P., Gazdova, J., Srivastava, S., Kim, C., Catherwood, M., Strobl, A., Flanagan, A. M., Oniscu, A., Kroeze, L. I., Groenen, P., Tanriere, P., Salto-Tellez, M., & Gonzalez, D. (2020). A novel next generation sequencing approach to improve sarcoma diagnosis. *Modern Pathology*, 33(7), 1350–1359. <https://doi.org/10.1038/s41379-020-0488-1>
- » Tysarowski Andrzej, Szumera-Ciećkiewicz Anna, Marszałek Andrzej [i in.]: Molecular diagnostics of cancers – practical approach, Nowotwory Journal of Oncology, 2023, vol. 73, nr 3, s.174-186.
- » Rutkowski P, Prochorec-Sobieszek M, Wągródzki M, Seliga K, Krzakowski M, Czarnecka AM, Świtaj T, Kawecki A, Raciborska A, Tysarowski A. Diagnostyka z wykorzystaniem sekwencjonowania następnej generacji (NGS) w mięsakach — rekomendacje. *Onkologia w Praktyce Klinicznej - Edukacja*. 2020;6:1–8.

4.13 Rak piersi

- » Arsenic, R., Treue, D., Lehmann, A., Hummel, M., Dietel, M., Denkert, C., & Budczies, J. (2015). Comparison of targeted next-generation sequencing and Sanger sequencing for the detection of PIK3CA mutations in breast cancer. *BMC Clinical Pathology*, 15. <https://doi.org/10.1186/s12907-015-0020-6>

- » Bofin, A. M., Ytterhus, B., Martin, C., O'Leary, J. J., & Hagmar, B. M. (2004). Detection and quantitation of HER-2 gene amplification and protein expression in breast carcinoma. *American Journal of Clinical Pathology*, 122(1), 110–119. <https://doi.org/10.1309/8A2D-J-FT0-7NE6-EWHE>
- » Catana, A., Apostu, A. P., & Antemie, R.-G. (2019). Multi gene panel testing for hereditary breast cancer—Is it ready to be used? *Medicine and Pharmacy Reports*, 92(3), 220–225. <https://doi.org/10.15386/mpr-1083>
- » Chrzanowska NM, Kowalewski J, Lewandowska MA (2020). Use of Fluorescence *In Situ* Hybridization (FISH) in Diagnosis and Tailored Therapies in Solid Tumors *Molecules*. 2020 Apr 17;25(8):1864. doi: 10.3390/molecules25081864.
- » Kowalik, A., Siótek, M., Kopczyński, J., Krawiec, K., Kalisz, J., Zięba, S., Kozak-Klonowska, B., Wypiórkiewicz, E., Furmańczyk, J., Nowak-Ozimek, E., Chłopek, M., Macek, P., Smok-Kalwat, J., & Góźdz, S. (2018). BRCA1 founder mutations and beyond in the Polish population: A single-institution BRCA1/2 next-generation sequencing study. *PLoS ONE*, 13(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201086>
- » Szczerba E, Kamińska K, Mierzwa T, Misiek M, Kowalewski J, Lewandowska MA. Genes (Basel). 2021 BRCA1/2 Mutation Detection in the Tumor Tissue from Selected Polish Patients with Breast Cancer Using Next Generation Sequencing. Apr 2;12(4):519. doi: 10.3390/genes12040519.

4.14 Rak żołądka

- » Abrahao-Machado, L. F., & Scapulatempo-Neto, C. (2016). HER2 testing in gastric cancer: An update. *World Journal of Gastroenterology*, 22(19), 4619–4625. <https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i19.4619>
- » Ciesielski, M., Szajewski, M., Pęksa, R., Lewandowska, M. A., Zieliński, J., Walczak, J., Szefel, J., & Kruszewski, W. J. (2018). The relationship between HER2 overexpression and angiogenesis in gastric cancer. *Medicine*, 97(42). <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000012854>

4.15 Fuzje NTRK jako przykład markerów niezależnych od tkanki pochodzenia nowotworu

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

4.16 Diagnostyka genetyczna w raku pęcherza moczowego.

- » NCCN Guidelines® Insights: Bladder Cancer, Version 3.2025
- » Williams SV, et al. Oncogenic FGFR3 gene fusions in bladder cancer. *Hum Mol Genet*. 2013. PMID: 23175443
- » Moschini M, et al. Bladder cancer: ESMO Clinical Practice Guideline for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2022. PMID: 35121006

- » Nguyen NJ, et al. Reflex somatic testing for the detection of FGFR alterations in urinary tract carcinomas: A dual-institutional experience. *Am J Clin Pathol.* 2025 Dec 1;164(6):861-869. doi: 10.1093/ajcp/aqaf108.
- » Costa de Padua T, et al. A real-world picture of biomarker testing in metastatic bladder cancer: A comprehensive assessment of 19,979 patients treated in the US and Europe. *J Clin Oncol* 43, 4570(2025). doi: 10.1200/JCO.2025.43.16_suppl.4570

4.17 Rak ślinianki

- » van Herpen C, et al. Salivary gland cancer: ESMO-European Reference Network on Rare Adult Solid Cancers (EURACAN) Clinical Practice Guideline for diagnosis, treatment and follow-up. *ESMO Open.* 2022 Dec;7(6):100602. PMID: 36567082. doi: 10.1016/j.esmoop.2022.100602
- » Toper MH, Sarioglu S. Molecular Pathology of Salivary Gland Neoplasms: Diagnostic, Prognostic, and Predictive Perspective. *Adv Anat Pathol.* 2021 Mar 1;28(2):81-93. PMID: 33405400. doi: 10.1097/PAP.0000000000000291
- » Kaur K, et al. The evolving role of molecular pathology in the diagnosis of salivary gland tumours with potential pitfalls. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2022 Aug;279(8):3769-3783. PMID: 35267084. doi: 10.1007/s00405-022-07326-6
- » de Paiva JPG, et al. Clinicopathological, Prognostic and Molecular Profile of Salivary Gland Intraductal Carcinoma: A Systematic Review. *Head Neck Pathol.* 2024 Nov 30;18(1):127. PMID: 39614957. doi: 10.1007/s12105-024-01732-4
- » Wei S, et al. Molecular pathology of adenoid cystic carcinoma. *Histol Histopathol.* 2025 Oct;40(10):1519-1528. PMID: 40254959. doi: 10.14670/HH-18-915
- » Skálová A, et al. Fusion-positive salivary gland carcinomas. *Genes Chromosomes Cancer.* 2022 May;61(5):228-243. PMID: 34913211. doi: 10.1002/gcc.23020
- » Skálová A, et al. Molecular Profiling of Clear Cell Myoepithelial Carcinoma of Salivary Glands With EWSR1 Rearrangement Identifies Frequent PLAG1 Gene Fusions But No EWSR1 Fusion Transcripts. *Am J Surg Pathol.* 2021 Jan;45(1):1-13. PMID: 33027073. doi: 10.1097/PAS.0000000000001591

4.18 Rak przewodów żółciowych

- » Zhu AX, et al. Final Overall Survival Efficacy Results of Ivosidenib for Patients With Advanced Cholangiocarcinoma With IDH1 Mutation: The Phase 3 Randomized Clinical Clar-IDHy Trial. *JAMA Oncol.* 2021 Nov 1;7(11):1669-1677. PMID: 34554208. doi: 10.1001/jama-oncol.2021.3836
- » Castet F, et al. Best practices in sample management and molecular profiling of cholangiocarcinoma: a practical guide. *Expert Rev Mol Diagn.* 2025 Aug;25(8):479-494. PMID: 40497693. doi: 10.1080/14737159.2025.2518145
- » Astore M, et al. Molecular Alterations and Pathways in Intrahepatic Cholangiocarcinoma: Available Evidence and New Perspectives. *Int J Mol Sci.* 2025 Dec 11;26(24):11961. PMID: 41465387. doi: 10.3390/ijms262411961

- » Banales JM, et al. Cholangiocarcinoma 2026: status quo, unmet needs and priorities. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2026 Jan;23(1):65-96. PMID: 41372578. doi: 10.1038/s41575-025-01153-w
- » Barsch M, et al. Molecular Testing for Intrahepatic Cholangiocarcinoma: What, When, How? *J Gastrointest Cancer*. 2026 Jan 15;57(1):15. PMID: 41535645. doi: 10.1007/s12029-026-01397-y
- » Ellis H, et al. Cholangiocarcinoma Targeted Therapies: Mechanisms of Action and Resistance. *Am J Pathol*. 2025 Mar;195(3):437-452. PMID: 39730074. doi: 10.1016/j.ajpath.2024.11.005
- » Kehmann L, et al. Evolving therapeutic landscape of advanced biliary tract cancer: from chemotherapy to molecular targets. *ESMO Open*. 2024 Oct;9(10):103706. PMID: 39366294. doi: 10.1016/j.esmoop.2024.103706
- » Carotenuto M, et al. Genomic alterations in cholangiocarcinoma: clinical significance and relevance to therapy. *Explor Target Antitumor Ther*. 2022;3(2):200-223. PMID: 36046845. doi: 10.37349/etat.2022.00079
- » Neumann O, et al. First proficiency testing for NGS-based and combined NGS- and FISH-based detection of FGFR2 fusions in intrahepatic cholangiocarcinoma. *J Pathol Clin Res*. 2023 Mar;9(2):100-107. PMID: 36635225. doi: 10.1002/cjp2.308
- » Neumann O, et al. Genomic architecture of FGFR2 fusions in cholangiocarcinoma and its implication for molecular testing. *Br J Cancer*. 2022 Nov;127(8):1540-1549. PMID: 35871236. doi: 10.1038/s41416-022-01908-1
- » Demols A, et al. A Two-Step Diagnostic Approach for NTRK Gene Fusion Detection in Biliary Tract and Pancreatic Adenocarcinomas. *Oncologist*. 2023 Jul 5;28(7):e520-e525. PMID: 36994874. doi: 10.1093/oncolo/oyad075

