

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

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 Skłodowskiej-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 Łaczmańska, 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 Skłodowskiej-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 Zając

Diagnostyka Oncogene Sp. z o. o. w Krakowie

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

CRC – *ang. colorectal carcinoma* – rak jelita grubego

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* – zewnętrznlaboratoryjna 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 hematoksylina 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

Skróty aminokwasów:

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

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

**Diagnostyka genetyczna
nowotworów litych w praktyce**

Rak jelita grubego

Epidemiologia, terapia anty-EGFR, MSI

Rak jelita grubego (*RJG*, ang. *colorectal cancer*, *CRC*) należy do najczęstszych nowotworów złośliwych. Postępowanie terapeutyczne zależy od stopnia zaawansowania i lokalizacji guza. W stadium przerzutowym kluczowe znaczenie ma diagnostyka molekularna.

• Terapia anty-EGFR

- » Leczenie przeciwciałami anty-EGFR (cetuksymab, panitumumab) stosowane jest u chorych **bez mutacji w genach *KRAS* i *NRAS* oraz bez *BRAF* p.Val600Glu (V600E)**.
- » W przypadku mutacji *BRAF* V600E możliwe jest leczenie skojarzone: inhibitor *BRAF* + przeciwciało anty-EGFR.
- » Inhibitory *KRAS* G12C (np. adagrasib, sotorasib) w skojarzeniu z anty-EGFR uzyskały ostatnio rejestrację FDA.

• MSI / MMR

- » 12–15% CRC wykazuje deficyt naprawy niedopasowanych zasad (MMRd) i niestabilność mikrosatelitarną (MSI).
- » MSI/MMRd jest:
 - czynnikiem predykcyjnym odpowiedzi na immunoterapię,
 - czynnikiem rokowniczym (lepsze przeżycie w II stopniu),
 - markerem zespołu Lyncha (3–5% CRC).
- » Pacjenci z nowotworami MSI-H nie odnoszą korzyści z adjuwantowej chemioterapii opartej na 5-FU w II stopniu zaawansowania.
- » Przed leczeniem 5-FU należy wykonać badanie w kierunku niedoboru DPD.

• Materiał do badań molekularnych

- » W stadium IV preferowane jest badanie ogniska przerzutowego, a w przypadku braku dostępności – materiał z guza pierwotnego.

- » Preferowany materiał operacyjny (większa zawartość utkania nowotworowego).
- » Po leczeniu neoadjuwantowym należy rozważyć badanie przerzutu lub materiału biopsyjnego.
- » Minimalny odsetek komórek nowotworowych: $\geq 20\%$.
- » W przypadku niższego odsetka konieczna makro-/mikrodysekcja lub zastosowanie metod wysokoczułych (qPCR, ddPCR, NGS).

Czynniki predykcyjne w przerzutowym RJG

• **RAS (KRAS, NRAS)**

- » Mutacje aktywujące dotyczą głównie kodonów 12 i 13 (90% przypadków).
- » Rzadziej: kodony 59, 61, 117, 146.
- » Obecność mutacji RAS wyklucza terapię anty-EGFR.

• **BRAF**

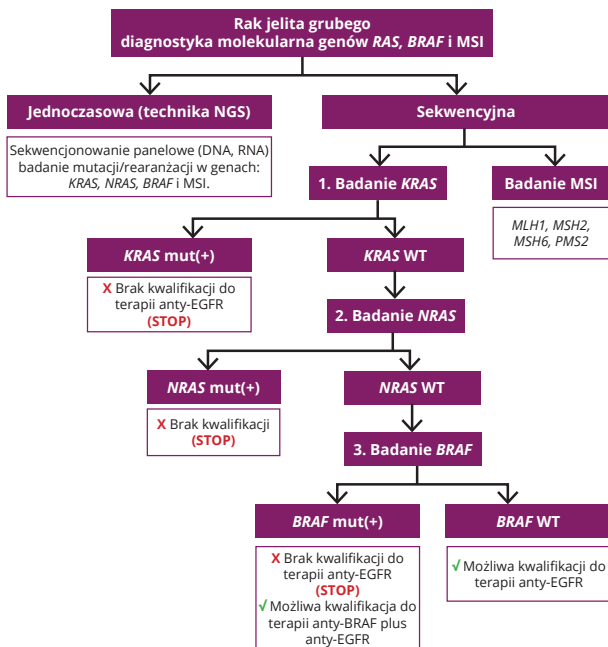
- » Mutacje w 5–22% CRC.
- » Najczęstsza: p.Val600Glu (V600E) (90% mutacji *BRAF*).
- » V600E – czynnik predykcyjny leczenia skojarzonego (anty-BRAF + anty-EGFR).
- » Mutacje *RAS* i *BRAF* współwystępują rzadko (1–2%).

• **MSI**

- » Guzy MSI-H częściej prawostronne, słabo zróżnicowane, z naciekiem limfocytarnym.
- » Zaleca się badanie MSI/MMR we wszystkich resekowanych CRC.

Algorytm diagnostyczny *RAS/BRAF/MSI*

- » Diagnostyka *KRAS*, *NRAS* i *BRAF* może być wykonywana jednocześnie lub sekwencyjnie.
- » W przypadku wykrycia mutacji *KRAS* dalsza analiza (*NRAS/BRAF*) nie jest konieczna dla kwalifikacji do terapii anty-EGFR.
- » Status MSI powinien być oceniany niezależnie (kwalifikacja do immunoterapii, diagnostyka zespołu Lyncha).



Metody oceny *KRAS/NRAS/BRAF* i MSI

• NGS

- » Możliwość jednoczesnej oceny *KRAS*, *NRAS*, *BRAF* i MSI.
- » Umożliwia kompleksowe profilowanie molekularne.
- » Wykrywa rzadkie mutacje oraz fuzje genowe (np. o wysokiej *NTRK*, *RET*).
- » Fuzje *NTRK/RET* (<1% ogółem, >20% w MSI-H bez mutacji *RAS/BRAF*).

• sekwencjonowanie Sanger

- » „Złoty standard”.
- » Wykrywa szerokie spektrum mutacji.
- » Wymaga $\geq 20\%$ komórek nowotworowych.

• qPCR

- » Najczęściej stosowana metoda.
- » Wysoka czułość (1–5%).
- » Obejmuje najczęstsze mutacje (*KRAS/NRAS* kodony 12,13,59,61,117,146; *BRAF* V600E).
- » Nie wykrywa rzadkich wariantów spoza panelu.

• MSI – PCR

- » Analiza markerów BAT-25, BAT-26, NR-21, NR-24, MONO-27.
- » $\geq 40\%$ markerów niestabilnych $\rightarrow$ MSI-H.
- » Wymaga porównania z DNA prawidłowym.
- » Alternatywą są systemy zamknięte (7 markerów; $\geq 2/7$ dodatnie $\rightarrow$ MSI-H) oraz testy wykonywane techniką dPCR.

Alternatywne metody – płynna biopsja

- » Analiza ctDNA z krwi.
- » Wskazana, gdy brak dostępnej tkanki.
- » Wykonywana metodą qPCR, ddPCR lub NGS wysokiej czułości.
- » Wymaga specjalnych probówek stabilizujących DNA.
- » Nie zaleca się rutynowo przy dostępnej tkance (ryzyko wyniku fałszywie ujemnego).

Czas wykonania badania

- » Maksymalny czas od przyjęcia materiału:
 - qPCR/Sanger: do 10 dni roboczych,
 - NGS: do 20 dni roboczych.

**Diagnostyka genetyczna
nowotworów litych w praktyce**

Czerniak

Epidemiologia, podział

Czerniak (*ang. melanoma*) stanowi ok. 2% wszystkich nowotworów w Polsce; globalnie rozpoznaje się ok. 150 tys. nowych przypadków rocznie. Jest nowotworem o wysokim potencjale przerzutowym, wywodzącym się z melanocytów. Najczęściej dotyczy skóry, rzadziej błon śluzowych, oka i innych lokalizacji.

- » Procentowy rozkład mutacji 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%.
- » Czerniaki akralne 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%.
- » 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*.

Badane markery

» Najwyższy odsetek wariantów patogennych występuje w czerniakach w genie *BRAF* (27-70%),

Tabela 1. 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%

» 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 2. Molekularne ścieżki czerniaka

Legenda:	 mutacje aktywujące (<i>gain-of-function</i>)
	 utrata funkcji (<i>loss-of-function</i>)
	 fuzje / rearanżacje
	 amplifikacje
	 mutacje promotora

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

* 5 th edycja klasyfikuje jako melanocytome

Materiał

- » Błoczek FFPE powinien zawierać nie mniej niż 20% utkania nowotworowego.

Metody

• Sekwencjonowanie Sangera

- » analiza eksonu 15 (kodon 600) i 11 genu *BRAF* (NM_004333.6),
- » umożliwia dokładną identyfikację typu substytucji (V600E, V600K, V600D itd.),
- » czułość ok. 15–20%,
- » często stosowane jako metoda weryfikacyjna.

• qPCR (testy komercyjne)

- » szybkie wykrycie mutacji w kodonie 600,
- » zwykle bez rozróżnienia konkretnego wariantu,
- » dedykowane do wybranych mutacji.

Przy wyniku ujemnym i silnym podejrzeniu klinicznym zaleca się weryfikację metodą sekwencjonowania.

• ctDNA (płynna biopsja)

- » analiza DNA nowotworowego z osocza,
- » może odzwierciedlać heterogenność całej masy guza,
- » metody: qPCR, ddPCR, NGS,
- » wymagana czułość <1%,
- » Sanger niezalecany (zbyt niska czułość).

• NGS

- » jednoczesna analiza wielu genów (*BRAF*, *NRAS*, *KIT* i inne),
- » wysoka czułość,
- » możliwość identyfikacji fuzji (RNA-NGS): *BRAF*, *ALK*, *ROS1*, *NTRK1/2/3*,

- » szczególnie przydatne w zaawansowanej chorobie lub przy braku mutacji w badaniach celowanych.

Czas wykonania badania

- » Maksymalny czas od przyjęcia materiału:
 - qPCR / Sanger – do 10 dni roboczych,
 - NGS – do 20 dni roboczych.

**Diagnostyka genetyczna
nowotworów litych w praktyce**

Rak jajnika

Epidemiologia, etiologia

- » **2023 r.:** zachorowania – **3 525**, zgony – **2 520**
- » **Zachorowania:** 6 miejsce wśród nowotworów u kobiet
- » **Zgony:** 5 miejsce w przyczynach zgonów nowotworowych
- » **Szczyt zachorowań:** 60–69 r.ż.
- » **5-letnie przeżycie:** 30–50%
- » **Rozpoznanie w stadium zaawansowanym:** ~70% przypadków

Predyspozycje dziedziczne

- » *BRCA1/BRCA2*: 10-18% przypadków
- » W zespole Lyncha (*MSH2, MSH6, MLH1, PMS2*): 0,9-2,7% przypadków
- » Zalecenie: każda pacjentka z rakiem jajnika → konsultacja genetyczna

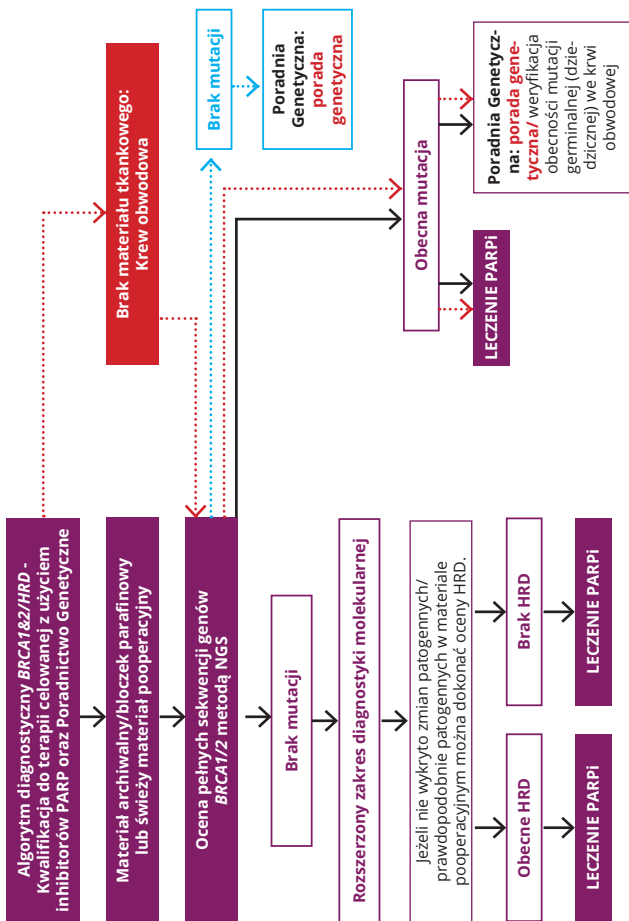
Podtypy raka jajnika

Tabela 1. Molekularna i histokliniczna klasyfikacja raków jajnika

	Rak surowiczy wysokiego stopnia- niskozróżnicowany	Rak surowiczy niskiego stopnia – wysokozróżnicowany
Częstość występowania (%)	70%	<5%
Pochodzenie	*Głównie jajowód	Endosalpingioza/ jajowód
Zmiana prekursorowa	Śródnabłonkowy rak surowiczy (STIC – serous tubal intraepithelial carcinoma)	Surowiczy guz o granicznej złośliwości (Serous borderline tumor)
Najczęstsze korelacje z zespołami dziedzicznej predyspozycji do nowotworów	dziedziczna predyspozycja do raka piersi i jajnika, powodowana przez warianty patogenne genów m. in. <i>BRCA1/2</i> (HBOC)	-
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>

Rak endometrioidalny	Rak jasnokomórkowy	Rak śluzowy
10%	6-10%	3-4%
Endometrioza	Endometrioza	Potworniak/ Nieznane
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)
Zespół Lyncha	Zespół Lyncha	-
<i>CTNNB1</i> <i>PIK3CA</i> <i>PTEN</i> <i>KRAS</i> <i>ARID1A</i> <i>MSI</i> <i>POLE</i> <i>TP53</i>	<i>ARID1A</i> <i>PIK3CA</i> <i>PTEN</i> <i>MSI</i>	<i>CDKN2A</i> utrata liczby kopii <i>KRAS</i> <i>HER2</i> amplifikacja <i>TP53</i>

Algorytm diagnostyczny raka jajnika



Materiał

- » Krew obwodowa → NGS BRCA (tylko mutacje germinalne)
- » Materiał pooperacyjny FFPE → NGS BRCA (mutacje germinalne i somatyczne) + HRD
- » Rodzaj materiału FFPE: archiwalny, skrawki niebarwione
- » Minimalny odsetek komórek nowotworowych materiale:
20% NGS, 30% HRD

Czas wykonania badania

- » Maksymalny czas od przyjęcia materiału:
 - NGS – do 20 dni roboczych.

**Diagnostyka genetyczna
nowotworów litych w praktyce**

Rak endometrium

Epidemiologia, etiologia

- » **2023 r.:** zachorowania – **6 519**, zgony – **1 803**
- » **Szczyt zachorowań:** 55–64 r.ż.
- » **5-letnie przeżycie:** 77–84% (Europa)
- » **Główne czynniki ryzyka:** otyłość, czynniki reprodukcyjne

Predyspozycje dziedziczne do raka endometrium

- » W zespole Lyncha obok raka jelita grubego występuje najwyższe ryzyko raka endometrium,
- » Mutacje w genach *BRCA1/2* wiążą się ze zwiększonym ryzykiem rozwoju surowiczego typu raka endometrium.

Typy histologiczne

- » Najczęstsze podtypy histologiczne:
 - 80-90% - rak endometrioidalny
 - 5-10% - rak surowiczy
 - 1-2% - rak jasnokomórkowy
 - 1-2% - gruczolakorak mieszanokomórkowy
 - 1% - mięsakorak
- » MMRd jest powszechny w guzach endometrioidalnych, HRD w guzach nieendometrioidalnych.

Podtypy molekularne

Tabela 1. 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	POLE (100%)	PTEN (88%)	PTEN (77%)	TP53
	DMD (100%)	PIK3CA (54%)	PIK3CA (53%)	PIK3CA (47%)
	CSMD1 (100%)	PIK3R1 (42%)	CTNNB1 (52%)	FBXW7 (22%)
	FAT4 (100%)	RPL22 (37%)	ARID1A (42%)	PPP2R1A (22%)
	PTEN (94%)	ARID1A (37%)	PIK3R1 (33%)	PTEN (10%)
Odsetek	5%	25%	45%	25%
Wiek	~ 50-60	~ 60	~60	~70
BMI	Niskie	Wysokie	Wysokie	Niskie
Progniza	Wczesny etap i doskonała	Średnia (Zespół Lyncha)	Średnia	Wysoki stopień zaawansowania i zła
	Hamowanie immunologicznych punktów kontrolnych.	Inhibicja immunologicznego punktu kontrolnego. Skierowanie do programu opieki nad rodzinami z dziedziczną predyspozycją do nowotworów w przypadku podejrzenia zespołu Lyncha.	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: POLEmut>p53abn, MMR>p53abn lub POLEmut>MMRd>p53abn. **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).

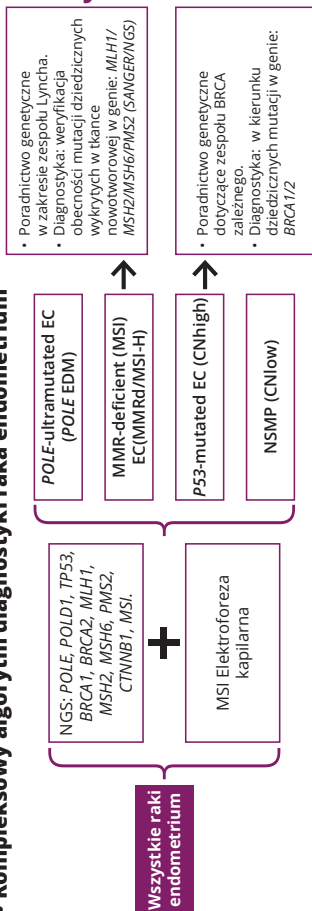
Tabela 2. Patogenne mutacje w genie POLE.

L.p.	ekson	Mutacja w białku	Mutacja w genie (cDNA)
1	9	p.Asp275Gly, D275G	c.824A>G
2	9	p.Glu277Gly, p.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

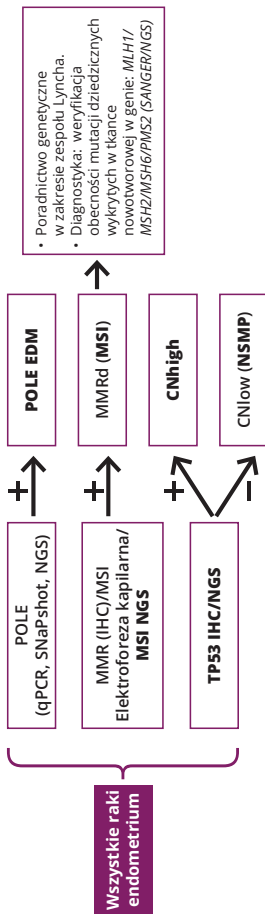
L.p.	ekson	Mutacja w białku	Mutacja w genie (cDNA)
22	13	p.Val411Ala, V411A	c.1232T>C
23	13	p.Leu424Ile, L424I	c.1270C>A
24	13	p.Leu424Val, L424V	c.1270C>G
25	13	p.Leu424Pro, L424P	c.1271T>C
26	13	p.Ala426Val, A426V	c.1277C>T
27	13	p.Asp435_Pro436delinsGluSer, D435_P436delinsES	c.1305_1306delinsAT
28	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
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

Badane markery

• Kompleksowy algorytm diagnostyki raka endometrium



Minimalny algorytm diagnostyki raka endometrium



Materiał

- » Rodzaj materiału FFPE: archiwalny, skrawki niebarwione
- » Minimalny odsetek komórek nowotworowych nie mniej niż 20% przy wykorzystaniu technologii NGS w materiale: 20% NGS.

Metody

- » *POLE* EDM: SNaPshot, qPCR, NGS.
- » MSI: PCR z elektroforezą lub real-time PCR lub NGS.
- » Panel genów: NGS.

Czas wykonania badania molekularnego

- 10 dni roboczych dla metody qPCR, SNaPshot oraz elektroforezy kapilarnej,
- 20 dni roboczych dla metody NGS.

**Diagnostyka genetyczna
nowotworów litych w praktyce**

Rak płuca

Epidemiologia

Rak płuca (*ang. lung cancer*) jest w Polsce jednym z najczęstszych nowotworów złośliwych (ok. 21 tys. zachorowań rocznie) i najczęstszą przyczyną zgonów onkologicznych (ponad 23 tys. rocznie). Około 80% przypadków rozpoznawanych jest w stadium zaawansowanym. 5-letnie przeżycie wynosi ok. 14%.

Głównym czynnikiem ryzyka jest palenie tytoniu. Znaczenie mają również: ekspozycja na azbest i czynniki środowiskowe, dodatni wywiad rodzinny.

• Podział histologiczny:

- » Rak drobnokomórkowy (DRP) – ok. 15%
- » Rak niedrobnokomórkowy (NDRP) – 80–85%
 - gruczolakorak (~40%)
 - rak płaskonabłonkowy (~30%)
 - rak wielkokomórkowy (~10%)

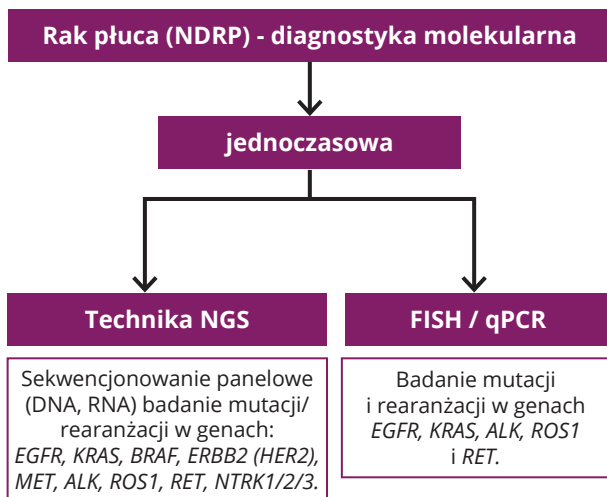
Biomarkery molekularne w NDRP

Biomarker/gen	Typ alteracji (typowe)	Częstość w NDRP
<i>EGFR</i>	mutacje aktywujące (eksony 18–21)	10–14% (Europa)
<i>ALK</i>	rearanżacje / fuzje	2–7%
<i>ROS1</i>	rearanżacje / fuzje	1–2%
<i>RET</i>	rearanżacje / fuzje	0,7–2%
<i>NTRK1/2/3</i>	fuzje	<0,5%
<i>MET</i>	zaburzenia splicingowe i/lub CNV	3–4%
<i>BRAF</i>	mutacje punktowe	1–3%
<i>KRAS</i>	mutacje aktywujące	~30%
<i>NRG1</i>	fuzje	<1%
<i>NUTM1</i>	fuzje	<1%
<i>STK11</i>	mutacje / utrata funkcji	15–25% (gruczolakorak)
<i>KEAP1</i>	mutacje / aktywacja osi NRF2	

Najczęstsze warianty / uwagi kliniczne	Leczenie predykcyjne
del19 (~45%), p.Leu858Arg (~40%); mutacja oporności p.Thr790Met w trakcie terapii	TKI EGFR (I-III gen.); przy T790M → TKI III gen.
najczęściej EML4::ALK ; typowo młodszy, niepalący, gruczolakorak; rzadko współistnieje z EGFR/KRAS	TKI ALK (I-III gen.)
istotne klinicznie także przy przerzutach do OUN	TKI ROS1 (w tym skuteczne w OUN)
częściej u niepalących, młodszych pacjentów	selektywne TKI RET
zwykle brak współwystępowania z EGFR/ALK/KRAS; rozważyć przy braku innych driverów	inhibitory TRK
najczęściej: MET exon 14 skipping, amplifikacja	TKI MET
najczęściej p.Val600Glu (V600E) ; częściej u palaczy	inhibitory BRAF ± MEK
częściej u palaczy; kluczowy wariant: p.Gly12Cys (G12C)	inhibitor KRAS G12C
głównie gruczolakorak śluzowy	potencjalnie p/ciała anty-HER2/HER3
NUT carcinoma – bardzo agresywny przebieg; wymaga NGS/CGP	decyzje w oparciu o NGS/CGP (diagnostyka kluczowa)
„zimny” fenotyp immunologiczny; gorsza odpowiedź na ICI	marker negatywny dla ICI (predykcyjno-prognostyczny)
aktywacja NRF2; gorsze rokowanie; możliwie słabsza odpowiedź na ICI	czynnik niekorzystny (prognostyczny/ICI-modulujący)

Ścieżki diagnostyczne

Rys. 1. Molekularne ścieżki diagnostyczne raka płuca



Metody

• NGS

- » Pokrycie minimalne: $\geq 250\times$ (zalecane $500\times$)
- » częstość alleliczna (VAF) wiarygodne $\geq 5\%$
- » Fuzje RNA: ≥ 100 odczytów transkryptu
- » Preferowane testy CE-IVD
- » Rzadkie warianty – potwierdzenie metodą alternatywną (np. Sanger)

- **qPCR**

- » *EGFR* (≥ 29 wariantów)
 - » *KRAS* (kodony 12, 13; szczególnie G12C)
 - » *BRAF* V600E
 - » *HER2* (insercja ekson 20)
- Minimalna zawartość utkania nowotworowego: $\geq 5\%$.

- **FISH**

- » Ocena rearanżacji *ALK/ROS1*.
Rearanżacja obecna gdy:
 - 50% z 50 komórek
lub
 - $\geq 15\%$ z 100 komórek.

Materiał

- » Akceptowany materiał:
 - FFPE
 - cytobloki
 - preparaty histologiczne i cytologiczne

Wymagania

- **NGS:**

- $\geq 20\%$ utkania nowotworowego
- ≥ 3000 komórek nowotworowych
- 10–200 ng DNA/RNA

- **qPCR:**

- $\geq 5\%$ komórek nowotworowych

- **FISH:**

- skrawki 4–6 μm

Materiał kwalifikowany przez patomorfologa.

Czas wykonania

- qPCR / Sanger: ≤ 10 dni roboczych
- FISH: ≤ 10 dni roboczych
- NGS: ≤ 20 dni roboczych

**Diagnostyka genetyczna
nowotworów litych w praktyce**

**Nowotwory lite
wieku dziecięcego**

Jednostka	Marker	Status i rola	Dlaczego istotny
-----------	--------	---------------	------------------

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 (IDH1, IDH2) • H3-wild type (H3-3A, HIST1H3B, HIST1H3C)	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)

Pediatric-type diffuse high-grade gliomas

<i>Diffuse midline glioma, H3 K27-altered</i>	• H3-3A, HIST1H3B, HIST1H3C: p.K28M • TP53 • ACVR1 • PDGFRA • EGFR • EZHIP	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)
--	---	-----------------	---

Jednostka	Marker	Status i rola	Dlaczego istotny
<i>Diffuse hemispheric glioma, H3 G34-mutant</i>	• H3-3A:p.G35R/V • TP53 • ATRX • MGMT	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>	• IDH-wild type (IDH1, IDH2) • H3-wild type (H3-3A, HIST1H3B, HIST1H3C) • PDGFRA • MYCN • EGFR • (ocena metylomu)	KU: R/Dx	KU: E/Tx(T2) Potencjalne cele dla terapii celowanej (w zależności od wykrytej zmiany)
<i>Infant-type hemispheric glioma</i>	• NTRK1/2/3 • ALK • ROS1 • MET	KU: R/Dx	KU: E/Tx(T1) Potencjalny cel dla inhibitorów kinaz tyrozynowych (w zależności od wykrytej zmiany)
<i>Circumscribed astrocytic gliomas</i>			
<i>Pilocytic astrocytoma</i>	• KIAA1549::BRAF • BRAF • NF1 • fuzje z udziałem genów NTRK1 i NTRK2	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

Jednostka	Marker	Status i rola	Dlaczego istotny
<i>High-grade astrocytoma with piloid features</i>	- IDH-wild type (<i>IDH1/IDH2</i>) - brak amplifikacji <i>EGFR</i> - ścieżka sygnałowa MAPK głównie: <i>BRAF</i> (głównie fuzje), <i>NF1</i> <i>ATRX</i> <i>CDKN2A/B</i> - ocena metylomu	KU: R/Dx	KU: E/Tx(T2) Potencjalne cele dla inhibitorów kinaz tyrozynowych (w zależności od wykrytej zmiany)
<i>Pleomorphic xanthoastrocytoma</i>	<i>BRAF</i> <i>CDKN2A/B</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>	<i>TSC1</i> <i>TSC2</i>	KU: R/Dx	KU: E/Tx(T2) Potencjalne cele dla inhibitorów szlaku mTOR
<i>Astroblastoma, MN1-altered</i>	<i>MN1</i> (głównie fuzja z <i>BEND2</i>)	KU: R/Dx	KU: R/Px Korzystny czynnik rokowniczy
<i>Glioneuronal and neuronal tumors</i>			
<i>Ganglioglioma</i>	- ścieżka sygnałowa 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)

Jednostka	Marker	Status i rola	Dlaczego istotny
<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-wil 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

Jednostka	Marker	Status i rola	Dlaczego istotny
<i>Supratentorial ependymoma, YAP1 fusion-positive</i>	• YAP1::MAMLD1	KU: R/Dx	KU: R/Px Fuzja z udziałem genu YAP1 - korzystny czynnik prognostyczny
<i>Posterior fossa ependymoma</i>			
<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
<i>Spinal ependymoma</i>			
<i>Spinal ependymoma, MYCN-amplified</i>	• NF2 • MYCN	KU: R/Dx	KU: R/Px MYCN - niekorzystny czynnik prognostyczny
<i>Choroid plexus tumors</i>			
<i>Choroid plexus carcinoma</i>	• TP53		KU: R/Px; E/Tx(T2) Niekorzystny czynnik rokowniczy związany z ograniczeniem wskazań do radioterapii
<i>Embryonal tumors</i>			
<i>Medulloblastomas, molecularly defined</i>			
<i>Medulloblastoma, WNT-activated</i>	• CTNNB1 • APC	KU: R/Dx	KU: R/Px Korzystne czynniki rokownicze

Jednostka	Marker	Status i rola	Dlaczego istotny
<i>Medulloblastoma, SHH-activated and TP53-wild type</i>	• TP53-wild type • PTCH1 • SUFU • SMO • MYCN • GLI2 • (ocena metylomu)	KU: R/Dx	KU: R/Px; E/Tx(T2) Potencjalne cele dla inhibitorów szlaku SHH. Niekorzystne czynniki rokownicze (MYCN)
<i>Medulloblastoma, SHH-activated and TP53-mutant</i>	• TP53 • PTCH1 • SUFU • SMO • MYCN • GLI2 • (ocena metylomu)	KU: R/Dx	KU: R/Px; E/Tx(T2) Potencjalne cele dla inhibitorów szlaku SHH. Niekorzystne czynniki rokownicze (TP53, MYCN)
<i>Medulloblastoma, non-WNT/non-SHH</i>	• MYC • MYCN • PRDM6 • (ocena metylomu)	KU: R/Dx	-
<i>Other CNS embryonal tumors</i>			
<i>Atypical teratoid/rhabdoid tumor</i>	• SMARCB1 • SMARCA4 • rearanżacje chrom. 22	KU: R/Dx	KU: R/Px SMARCB1 - niekorzystny czynnik rokowniczy, SMARCA4 - niekorzystny czynnik rokowniczy
<i>Embryonal tumor with multilayered rosettes</i>	• C19MC, DICER1	KU: R/Dx	-
<i>CNS neuroblastoma, FOXR2-activated</i>	• FOXR2	KU: R/Dx	-
<i>CNS tumor with BCOR internal tandem duplication</i>	• BCOR	KU: R/Dx	KU: R/Px Niekorzystny czynnik rokowniczy

Jednostka	Marker	Status i rola	Dlaczego istotny
-----------	--------	---------------	------------------

Pineal tumors

Pineoblastoma	• <i>RB1</i> • <i>DICER1</i>	KU: R/Dx	-
Desmoplastic myxoid tumor of the pineal region, <i>SMARCB1</i>-mutant	• <i>SMARCB1</i>	KU: R/Dx	-

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 (<i>segmental chromosomal aberration</i>) • 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 dotyczyą.
ALK • zmiany typu SNP (najczęściej: p.F1174L, p.F1245C, p.R1275Q) • amplifikacje • fuzje	• sekwencjonowanie metodą Sanger, a • sekwencjonowanie następnej generacji (<i>Next Generation Sequencing – NGS</i>) • 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

Nowotwory nerek

Geny/ charakterystycznie zmienione profile molekularne	Metoda	Marker diagnostyczny	Markery prognostyczne (rozkownicze), predykcyjne
Guz Wilmsa (nephroblastoma)			
• <i>WT1</i> (11p13)	• MLPA, • sekwencjonowanie metodą Sangera, • sekwencjonowanie następnej generacji (<i>Next Generation Sequencing</i> – NGS)	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 Sangera (<i>TP53</i>).	-	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 Sangera	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 Sangera • NGS • FISH • RT-PCR	KU: R/Dx	-

Geny/ charakterystycznie zmienione profile molekularne	Metoda	Marker diagnostyczny	Markery prognostyczne (rozkownnicze), predykccyjne
--	--------	----------------------	--

Rak nerki związany z translokacjami MiTF/TFE

t(X;1)(p11.2;q21.2)			
<i>TFE3::PRCC</i>			
t(X;17)(p11.2;q25)	NGS	KU: R/Dx	-
<i>TFE3::ASPL (ASPSCR1)</i>	FISH		
t(X;1)(p11.2;p34)	RT-PCR		
<i>TFE3::SFPQ (PSF)</i>			
i inne			

Malignant rhabdoid tumor of kidney (MRTK)

<i>SMARCB1</i> <i>SMARCA4</i>	- MLPA - mikromacierz, - sekwencjonowanie metodą Sangera - NGS	KU: R/Dx	KU: R/Px Niekorzystny czynnik rokowniczy
--	---	----------	---

Metanephric tumors

<i>BRAF</i> (p.V600E)	- sekwencjonowanie metodą Sangera - NGS	KU: R/Dx	-
---	--	----------	---

Nowotwory kości

Geny/ charakterystycznie zmienione profile molekularne	Metoda	Marker diagnostyczny	Markery progno- styczne (ro- kownicze), 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	-

Mięsaki tkanek miękkich

Geny/charakterystyczne zmienione profile molekularne	Metoda	Marker diagnostyczny
<i>Rhabdomyosarcoma Alveolar</i>		
• t(2;13)(q35;q14) • <i>PAX3::FOXO1</i> • t(1;13)(p36;q14) • <i>PAX7::FOXO1</i> • t(2;2)(q35;p23) • <i>PAX3::NCOA1</i> • t(X;2)(q35;q13) • <i>PAX3::AFX</i>	• 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) • <i>SS18::SSX1</i>, • <i>SS18::SSX2</i>, • <i>SS18::SSX4</i>	• 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

Geny/charakterystyczne zmiany profile molekularne	Metoda	Marker diagnostyczny
<i>Alveolar soft-part sarcoma</i>		
- t(X;17)(p11;q25) - ASPL(ASPSCR1)::TFE3	- FISH - NGS - RT-PCR - inne	KU: R/Dx
<i>Angiomatoid fibrous histiocytoma</i>		
- t(12;16)(q13;p11) - FUS::ATF1 - t(2;22)(q33;q12) - EWSR1::CREB1 t(12;22) (q13;q12) - EWSR1::ATF1	- FISH - NGS - RT-PCR - inne	KU: R/Dx
<i>BCOR-rearranged sarcoma</i>		
- Inv(X)(p11.4p11.22) - BCOR::CCNB3 - t(X;4)(p11;q31) - BCOR::MAML3 - t(X;22)(p11;q13) - ZC3H7B::BCOR	- FISH - NGS - RT-PCR - i inne	KU: R/Dx
<i>CIC-rearranged sarcoma</i>		
- t(4;19)(q35;q13) - t(10; 19)(q26;q13) - CIC::DUX4 - t(X;19)(q13;q13.3) - CIC::FOXO4	- FISH - NGS - RT-PCR - i inne	KU: R/Dx
<i>Clear cell sarcoma</i>		
- t(12;22)(q13;q12) - EWSR1::ATF1 - t(2;22)(q33;q12) - EWSR1::CREB1	- FISH - NGS - RT-PCR - i inne	KU: R/Dx

Geny/charakterystyczne zmiany profile molekularne	Metoda	Marker diagnostyczny
<i>Dermatofibrosarcoma protuberans</i>		
- t(17;22)(q21;q13) COL1A1::PDGFB, - 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 CTNNB1	- FISH - NGS - RT-PCR - mikromacierz całogenomowa - kariotyp - sekwencjonowanie m. Sangera	KU: R/Dx
<i>Desmoplastic small round cell tumor</i>		
t(11;22)(p13;q12) EWSR1::WT1	- FISH - NGS - RT-PCR - inne	KU: R/Dx
<i>Dedifferentiated Liposarcoma</i>		
- Chromosom pierścieniowy i markerowy, - amplifikacja regionu 12q13-15: MDM2, CDK4	- FISH - kariotyp - NGS - MLPA - i inne	KU: R/Dx
<i>Epithelioid sarcoma</i>		
- Delecja 22q - SMARCB1 - t(8;22)(q22;q11) - t(10;22)	- FISH - NGS - RT-PCR - MLPA - mikromacierz całogenomowa - sekwencjonowanie m. Sangera	KU: R/Dx

Geny/charakterystyczne zmiany profile molekularne	Metoda	Marker diagnostyczny
<i>Epithelioid hemangioendothelioma</i>		
- t(1;3)(p36;q25), - WWTR1::CAMTA1, - t(X;11)(p11;q22) - YAP1::TFE3	- FISH - NGS - RT-PCR - Inne	KU: R/Dx
<i>Extraskieletal myxoid chondrosarcoma</i>		
- t(9;22)(q22;q12) - EWSR1::NR4A3 - t(9;17)(q22;q11) - TAF15 (TAF2N)::NR4A3 - t(9;15)(q22;q21) - TCF12::NR4A3 - t(3;9)(q11;q22) - TFG::NR4A3 fusion - t(9;17)(q22;q11) - RBP56::NR4A3 fusion	- FISH - NGS - RT-PCR - i inne	KU: R/Dx
<i>Giant cell fibroblastoma</i>		
- t(17;22)(q22;q13) - COL1A1::PDGFB	- FISH - NGS - RT-PCR - i inne	KU: R/Dx
<i>Infantile fibrosarcoma</i>		
- t(12;15)(p13;q25) - ETV6::NTRK3, - t(2;15)(p21;q25) - EML4::NTRK3, - LMNA::NTRK1, 1q delecja, - trisomia 8, 11, 17, 20	- FISH - NGS - RT-PCR - MLPA - mikromacierz całogenomowa - kariotyp	KU: R/Dx; E/Tx(T1)
<i>Inflammatory myofibroblastic tumor</i>		
- translokacje z udziałem regionu 2p23; - fuzje z udziałem genu ALK (z wieloma partnerami lokalnymi) - t(3;6)(q12;q22) - TFG::ROS1	- FISH - NGS - RT-PCR - i inne	KU: R/Dx; E/Tx(T1)

Geny/charakterystyczne zmiany profile molekularne	Metoda	Marker diagnostyczny
<i>Leiomyosarcoma</i>		
• Złożone aberracje, często z delecją 1p	• FISH • kariotyp • NGS • mikromacierz całogenomowa • i inne	KU: R/Dx
<i>Lipoblastoma</i>		
• t(7;8)(q21;q12) • COL1A2::PLAG1 • Del(8)(q12;q24) • HAS2::PLAG1 • t(8;14)(q12;q24) • PLAG1::RAD51L1 • t(2;8)(q31;q12.1) • COL3A1::PLAG1	• FISH • NGS • RT-PCR • i inne	KU: R/Dx
<i>Low-grade fibromyxoid sarcoma</i>		
• t(7;16)(q33;p11) FUS::CREB3L2 • t(11;16)(p11;p11) FUS::CREB3L1	• FISH • NGS • RT-PCR • i inne	KU: R/Dx
<i>Mesenchymal chondrosarcoma</i>		
• t(8;8)(q13;q21) HEY1::NCOA2	• FISH • NGS • RT-PCR • i inne	KU: R/Dx
<i>Myoepithelioma</i>		
• t(6;22)(p21;q12) EWSR1::POU5F1 • t(1;22)(q23;q12) EWSR1::PBX1 • (19;22)(q13;q12) • EWSR1::ZNF444	• FISH • NGS • RT-PCR • i inne	KU: R/Dx

Geny/charakterystyczne zmiany profile molekularne	Metoda	Marker diagnostyczny
<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

Nowotwory wątroby

Geny/ charakterystycznie zmienione profile molekularne	Metoda	Marker diagnostyczny	Markery prognostyczne (rokownicze), predykcyjne
<i>Hepatoblastoma</i>			
• <i>CTNNB1</i>	• sekwencjonowanie metodą Sangerą, • NGS	KU: R/Dx	-
• <i>APC</i>	• sekwencjonowanie metodą Sangerą, • NGS • MLPA, • mikromacierz	KU: E/Dx	-
• <i>NFE2L2</i>	• sekwencjonowanie metodą Sangerą, • 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	-

Siatkówczak

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

Inne nowotwory złośliwe pochodzenia nabłonkowego i czerniak złośliwy

Geny/ charakterystycznie zmieni- one profile molekularne	Metoda	Marker diagno- styczny	Markery pro- gnostyczne (rokownicze), predykcyjne
<i>Spitzoid melanoma (SM)</i>			
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)	- sekwencjonowa- nie m. Sangera - NGS	-	marker niekorzystnego rokowania
Czerniak, na bazie wrodzonego znamienia melanocytowego (CNM)			
<i>NRAS</i> (najczęściej p.Q61K/R) <i>BRAF</i> (najczęściej p.V600E) <i>TERT</i> (hipermetylacja promotora) - rearanżacje segmentowe w obrębie chromosomów	- sekwencjono- wanie m. Sangera - NGS - mikromacierz całogenomowa, FISH	KU: R/Dx + - + -	KU: E/Tx(T1) potencjalne cele terapeutyczne (w zależności od wykrytej zmiany)

Geny/ charakterystycznie zmienione profile molekularne	Metoda	Marker diagnostyczny	Markery prognostyczne (rokownicze), predykcyjne
--	--------	----------------------	---

Klasyczny czerniak („czerniak typu dorosłego”)

		KU: R/Dx	KU: E/Tx(T1)
• <i>BRAF</i> (najczęściej p.V600E) • <i>TERT</i> (zmiany w obrębie promotora) • rearanżacje segmentowe w obrębie chromosomów,	• sekwencjonowanie m. Sangera • NGS • mikromacierz całogenomowa, • FISH	+ + -	potencjalne cele terapeutyczne (w zależności od wykrytej zmiany)

NUT midline carcinoma

• translokacje z udziałem genu <i>NUT</i> (15q14), najczęściej z genem <i>BRD4</i> (19p13)	• FISH	KU: R/Dx	-
--	--	----------	---

Nowotwory jajnika

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

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>
Nerwiakowłókniakowość 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, glioma, rhabdomyosarcoma</i>	<i>NBN</i>
Zespół Beckwitha-Wiedemanna	<i>nephroblastoma, hepatoblastoma, rhabdomyosarcoma, 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	Nowotwory	Gen/r. chromosomowy
Zespół sercowo-twarzowo-skróny (CFC),	ostra białaczka limfoblastyczna, <i>rhabdomyosarcoma</i> , <i>hepatoblastoma</i> , chłoniaki	<i>BRAF</i> , <i>MAP2K1</i> , <i>MAP2K2</i> , <i>KRAS</i> ,
Zespół Noonana	<i>neuroblastoma</i> , ostra białaczka limfatyczna, <i>glioma</i> , <i>rhabdosarcoma</i>	<i>PTPN11</i> , <i>RAF1</i> , <i>BRAF</i> , <i>SOS1</i> , <i>NRAS</i> , <i>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 Rubinstein-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 wewnętrzwydzielnicza typu 1 i 2	gruczolaki/raki układu wewnętrzwydzielniczego	<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>

Zespół	Nowotwory	Gen/r. chromosomowy
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>

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>SMOH</i> (MIM 601500) <i>TP53</i> (MIM 191170) <i>CREBBP</i> (MIM 600140) <i>GLI3</i> (MIM 175700)

<i>Meningioma</i>	NF2 (MIM 607379) PTCH1 (MIM 601309) PTEN (MIM 601728) SMARCB1 (MIM 601607) SMARCE1 (MIM 603111) SUFU (MIM 607035) WRN (MIM 604611) MEN1(MIM 613733)
<i>Pineoblastoma</i>	DICER1 (MIM 606241, 20%) RB1 (MIM 614041)
<i>Schwannoma</i>	NF2 (MIM 607379) PRKAR1A (MIM 188830)
<i>Schwannomatosis</i>	LZTR1 (MIM 600574) SMARCB1 (MIM 601607, 50%)
<i>Spinal cord ependymoma</i>	NF2 (MIM 607379, 14%)
<i>Subependymal giant cell astrocytoma</i>	TSC1/TSC2 (MIM 605284/191092)
<i>Neuroblastoma</i>	PHOX2B (MIM 603851) ALK (MIM 105590)
<i>Hepatoblastoma</i>	APC (MIM 611731), disomia jednorodzicielska w 11p15.5
<i>Retinoblastoma</i>	RB1 (MIM 614041)

Zastosowane skróty dot. kliniczniej użyteczności (KU):

» **Marker:**

- 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/rekomentowana (AMP Tier I; zwykle ESCAT I–II), T2 = terapia w badaniach klinicznych/off-label (AMP Tier II; zwykle ESCAT III–IV).

**Diagnostyka genetyczna
nowotworów litych w praktyce**

**Nowotwory mózgu
u dorosłych - glejaki**

Badane biomarkery w glejakach rozlanych

(WHO CNS5) zawiera liczne zmiany molekularne o znaczeniu kliniczno-patologicznym, które są istotne dla najdokładniejszej klasyfikacji nowotworów OUN.

- » Podstawowe markery genetyczne dla rozlanych glejaków według piątej edycji Klasyfikacji Nowotworów Ośrodkowego Układu Nerwowego WHO: 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 w genach *IDH1* p.Arg132 i *IDH2* p.Arg172 są czynnikiem predykcyjnym w leczeniu gwałtownego 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). 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 gwałtowniaków z mutacją *IDH*.
- » Amplifikacja genu *EGFR*, aberracja 7+/10-, mutacje w promotorze *TERT* są cechami genetycznymi warunkującymi postawienie diagnozy glejaka o najwyższym stopniu złośliwości *glioblastoma* IDH-wild type w guzach bez mutacji *IDH*, bez względu na obraz histopatologiczny.

- » 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 pediatrycznego o wysokim stopniu złośliwości.
- » Metylacja promotora genu *MGMT* ma znaczenie prognostyczne i predykcyjne. Metylacja promotora reguluje ekspresję *MGMT* poprzez epigenetyczne wyciszenie genu. Pacjenci z metylacją promotora *MGMT* odnoszą korzyść z leczenia temozolomidem (TMZ).

Diagnostyka różnicowa gwiaździaka (*astrocytoma IDH-mutant*) i glejaka wielopostaciowego (*glioblastoma IDH-wt*)

- » Do rozpoznania skąpodrzewiaka konieczne jest potwierdzenie obecności kodelecji 1p/19q łącznie z mutacją *IDH*.
- » Według CNS5 WHO 2021 klasyfikacja gwiaździaka powinna opierać się na podstawie oceny histopatologicznej jak i analizie biomarkerów genetycznych. Obecnie warunkiem koniecznym do rozpoznania gwiaździaka 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 gwiaździakach 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 1. 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
Gwiaździak (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 - proliferaacja naczyń - mutacja promotora genu <i>TERT</i> - amplifikacja genu <i>EGFR</i> - aberracja 7+/10-

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

Tabela 2. Charakterystyczne cechy molekularne innych nowotworów gleju u dorosłych (na podstawie 5 klasyfikacji WHO).

Typ nowotworu (WHO)	Charakterystyczne cechy molekularne
<i>Ograniczony glejak astrocytarny (circumscribed astrocytic glioma)</i>	
<i>Niskozróżnicowany gwiaździak z cechami piloidnymi (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%)
<i>Żółtakogwiaździak pleomorficzny (Pleomorphic xanthoastrocytoma)</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
<i>Glejak struniakowaty spłotu naczyńiówkowego (Chordoid glioma)</i>	• mutacja p.D463H w genie <i>PRKCA</i>
<i>Wyściółczak (ependymoma)</i>	
<i>Wyściółczak nadnamiotowy z fuzją ZFTA (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> (Spinal ependymoma, <i>MYCN</i> -amplified)	• amplifikacja genu <i>MYCN</i> (niekorzystny czynnik rokowniczy) • może zachodzić konieczność wykluczenia mutacji histonu H3 w diagnostyce różnicowej

Materiał

- » Tkanka guza (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.

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, metoda referencyjną do genetycznej oceny *IDH1/2* jest sekwencjonowanie (metoda Sangera 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 wysokoprzepustowych 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*.

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 kwencjonowania Sangera,
 - 20 dni roboczych dla metody NGS

**Diagnostyka genetyczna
nowotworów litych w praktyce**

Rak tarczycy

Epidemiologia, etiologia

- » Rak tarczycy (*ang. thyroid carcinoma*) to najczęstszy nowotwór endokrynnny (1–2% wszystkich nowotworów złośliwych).
- » W Polsce >4000 nowych rozpoznań rocznie; umieralność stabilna i niska.
- » Częściej u kobiet (ok. 7 miejsce wśród nowotworów kobiet).
- » Średni wiek rozpoznania: 50 lat (K: 49, M: 54).
- » Dominują raki brodawkowe w niskim stadium – efekt szerokiej dostępności USG i BAC.
- » Czynniki ryzyka: promieniowanie jonizujące, zaburzenia podaży jodu, predyspozycje genetyczne.

Predyspozycje genetyczne

• Raki zróżnicowane (DTC)

- » Najczęściej sporadyczne.
 - Somatyczne:
 - *BRAF* p.(Val600Glu) – szczególnie w raku brodawkowym.
 - Mutacje promotora *TERT* (c.-124C>T, c.-146C>T).
 - Germinalne (rzadko): np. *CHEK2*.

• Rak rdzeniasty (MTC)

- » W blisko 90% przypadków rodzinnych obserwuje się germinalne warianty protoonkogenu *RET*.
- » Występuje jako:
 - rodzinny MTC,
 - element zespołu MEN2A/MEN2B.
- » Najczęstsze eksony: 8, 10, 11, 13–16 w których lokują się mutacje.

• **Postępowanie wg ATA (*American Thyroid Association*):**

Typ mutacji genu <i>RET</i> (Częstość występowania), %	Postępowanie
<i>MEN2B</i> /Kodon 918 (95%)	Tyreoidektomia w 1. roku życia
<i>MEN2A</i> /Kodony: 634, 883 (<5%)	Tyreoidektomia przed 5. rokiem życia pod warunkiem systematycznej kontroli poziomu kalcytoniny
<i>MEN2A</i> /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

Typy histologiczne

• **Raki zróżnicowane (ok. 95%) – z komórek pęcherzykowych:**

- » Rak brodawkowy (najczęstszy):
 - wariant klasyczny – *BRAF* V600E (45–50%),
 - wariant wysokokomórkowy – *BRAF* V600E (80–100%),
 - wariant pęcherzykowy – rzadziej *BRAF* (5%),
- » Rak pęcherzykowy – częste mutacje promotora *TERT* (10-20%).
- » Niskozróżnicowany i anaplastyczny – wysoka częstość wariantów w promotorze *TERT* (40%) oraz *BRAF* V600E (10-20%).

• **Rak rdzeniasty (3–5%) – z komórek C:**

- Silnie związany z wariantami *RET* (germinalnymi (90%) lub somatycznymi).

Terapia celowana

Leczenie zależy od stadium i typu histologicznego: chirurgia + radiojod + leczenie systemowe.

• DTC jodooporne / zaawansowane:

- » Nieselektywne inhibitory kinaz tyrozynowych (VEGFR/FGFR/RET).
- » Fuzje *NTRK1-3* → inhibitory TRK.
- » Fuzje *RET* → selektywne inhibitory RET (np. selperkatynib – warunkowa autoryzacja EMA; w Polsce brak refundacji dla DTC).

• Rak anaplastyczny z *BRAF V600E*:

- » Inhibitor BRAF (dabrafenib) + inhibitor MEK (trametynib).

• Rak rdzeniasty przerzutowy:

- » I linia: nieselektywne TKI.
- » II linia (program lekowy): selektywne inhibitory RET – wymaga potwierdzenia patogennego wariantu *RET* (somatycznego lub germinalnego).

Diagnostyka genetyczna

• Wskazania germinalne:

- » Podejrzenie MEN2A → badanie *RET* między 2–5 r.ż.
- » MEN2B → badanie przed ukończeniem 1 r.ż.

• Wskazania somatyczne:

- » Stratyfikacja ryzyka (ATA): *BRAF V600E*, mutacje promotora *TERT*.
- » Kwalifikacja do terapii celowanej:
 - *RET* (mutacje/fuzje),

- *NTRK1-3*,
 - *BRAF*.
- » Rekomendowane panele wielogenowe obejmujące co najmniej: *RET*, *BRAF*, *TERT*, *NTRK1-3*.

Materiał

- » Zmiany somatyczne: materiał pooperacyjny FFPE ($\geq 20\%$ komórek nowotworowych).
- » Zmiany germinalne: krew obwodowa.

Metody

- » *RET* – NGS (preferowana pełna sekwencja genu) lub sekwencjonowanie Sanger.
- » *BRAF* V600E i mutacje promotora *TERT* – qPCR lub Sanger; wątpliwe wyniki → weryfikacja NGS.
- » W praktyce klinicznej preferowane NGS (ocena mutacji punktowych i fuzji w jednym badaniu).

Czas wykonania badania molekularnego

- » Od momentu przyjęcia materiału:
- qPCR / Sanger – do 10 dni roboczych,
 - NGS – do 20 dni roboczych.

**Diagnostyka genetyczna
nowotworów litych w praktyce**

Rak gruczołu krokowego

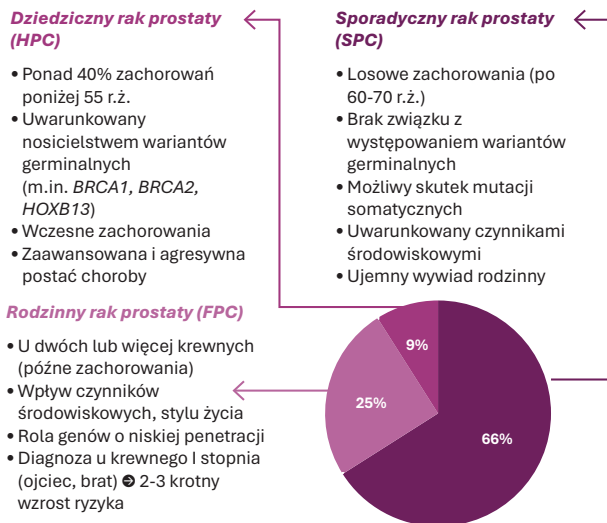
Epidemiologia, etiologia

- » W 2023 zdiagnozowano 23710, a zgony 5859
- » W Polsce 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.

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*).

Rys. 1. 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*.
- » 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.
- » 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 przypadku wykrycia wariantów w *BRCA1/2*, *ATM*, *CHEK2*, *PALB2* lub *HOXB13* pacjenci powinni być kierowani do poradni genetycznej

Tabela 1. 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	-

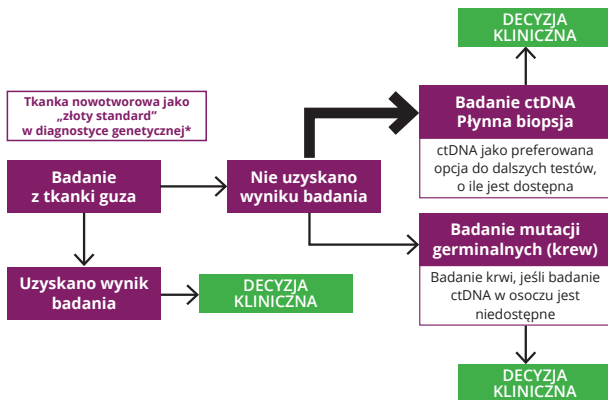
Diagnostyka genetyczna

- » Mutacje germinalne lub somatyczne w *BRCA1/2* - olaparib lub niraparib + octanem abirateronu
- » Mutacje germinalne lub somatyczne w w genach HRR (*BRCA1*, *BRCA2*, *ATM*, *CDK12*, *CHECK2*, *PALB2*, *RAD51C*) - talazoparyb + enzalutamid;

Materiał

- » Badanie wariantów somatycznych - Bloki FFPE z 20% komórek nowotworowych.
- » Badanie wariantów somatycznych - Osocze krwi obwodowej (w przypadku braku materiału tkankowego lub jego niskiej jakości)
- » Badanie wariantów dziedzicznych – krew obwodowa

Rys. 2. Algorytm diagnostyczny genów: *BRCA1*, *BRCA2*, *ATM*, *CDK12*, *RAD51B*, *RAD51D*, *CHEK2*



Metody

» NGS

Czas wykonania badania molekularnego

» 20 dni roboczych dla metody NGS.

**Diagnostyka genetyczna
nowotworów litych w praktyce**

Rak trzustki

Epidemiologia, etiologia

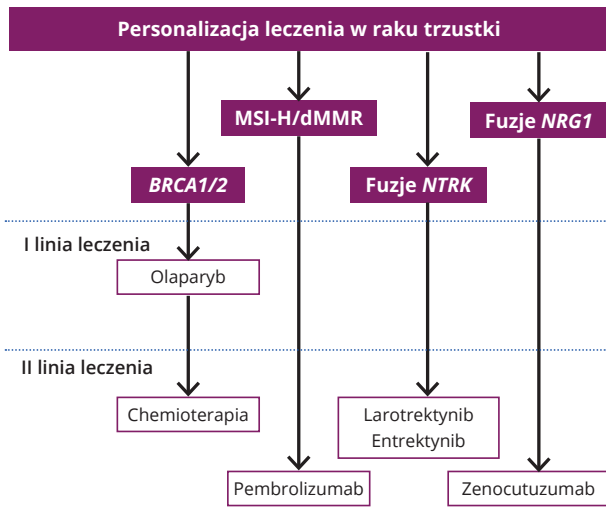
- » Rak trzustki (*ang. pancreatic cancer, PC*) należy do najbardziej agresywnych nowotworów; 5-letnie przeżycie <5%.
- » Około 95% stanowi gruczolakorak przewodowy (PDAC) części zewnątrzwydzielniczej, zwykle zlokalizowany w głowie trzustki; nowotwory neuroendokryne mają lepsze rokowanie.
- » Częściej u mężczyzn; >80% zachorowań po 55 r.ż.
- » Czynniki ryzyka: palenie tytoniu, nadużywanie alkoholu (wtórnie cukrzyca), dieta bogata w tłuszcze zwierzęce i czerwone mięso, otyłość brzuszna, przewlekłe zapalenie trzustki, predyspozycje genetyczne.

Predyspozycje genetyczne

- » Około 10% przypadków ma podłoże dziedziczne.
- » Geny zwiększonego ryzyka: *BRCA2*, *CDKN2A*, *ATM*, *STK11*, *PRSS1/PRSS2*, *SPINK1*, *PALB2* oraz geny MMR (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2*).
- » Rodzinne występowanie (≥3 krewnych I° lub zachorowanie <50 r.ż.) → >30-krotny wzrost ryzyka.
- » Zespoły: zespół Lyncha (HNPCC), HBOC (*BRCA1/2*), Peutz-Jeghers, ataksja-teleangiektazja, FAMMM, Li-Fraumeni, dziedziczne zapalenie trzustki.
- » Częstość wariantów germinalnych: *BRCA2* (5–10%), *BRCA1* (~1%).
- » Zmiany somatyczne w PDAC: *KRAS* (>90%), *TP53*, *CDKN2A/p16*, *SMAD4*.
- » Pacjenci z obciążeniem rodzinnym → poradnictwo genetyczne i badania *BRCA1/2*.

Diagnostyka molekularna

- » Cele kliniczne: kwalifikacja do terapii celowanych i immunoterapii.
- » Warianty germinalne *BRCA1/2* → możliwość leczenia inhibitorami PARP (wydłużenie PFS).
- » W przypadku braku zmian w *KRAS/BRCA1/2* należy rozważyć:
 - MSI/dMMR → kwalifikacja do immunoterapii (np. pembrolizumab).
 - Fuzje *NTRK1/2/3* → inhibitory TRK (larotrektylib, entrektylib).
 - Fuzje *NRG1* → możliwość terapii ukierunkowanej na szlak *HER2/HER3*.



Materiał

- » Tkanka guza (FFPE) z guza pierwotnego lub przerzutu; minimalny odsetek komórek nowotworowych $\geq 20\%$.
- » Badania germlinalne → krew obwodowa.

Metody

- » **NGS (DNA)** – analiza pełnych sekwencji *BRCA1/2* (SNV, indel).
- » **NGS (RNA)** – detekcja fuzji (*NTRK*, *NRG1*) i identyfikacja partnerów fuzyjnych.
- » **MSI** – PCR z elektroforezą kapilarną, ddPCR lub NGS.

Czas wykonania badania molekularnego

- » Od momentu przyjęcia materiału:
 - do 10 dni roboczych – ddPCR,
 - do 20 dni roboczych – NGS.

**Diagnostyka genetyczna
nowotworów litych w praktyce**

**Nowotwór podścieliskowy
przewodu pokarmowego
(GIST)**

Lokalizacja

- » Nowotwór podścieliskowy przewodu pokarmowego GIST (*ang. gastrointestinal stromal tumor*) jest najczęstszym pierwotnym nowotworem mezenchymalnym przewodu pokarmowego. Komórki nowotworu wykazują różnicowanie w kierunku śródmiąższowych komórek Cajala.
- » Cechami charakterystycznymi są ekspresja antygenów CD117 (KIT) i DOG1 oraz mutacje genów *KIT* i *PDGFRA* (około 85-90% przypadków).

Tabela 4.11.1. Lokalizacja GIST

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

Diagnostyka genetyczna

• Zakres

A. badania czynników predykcyjnych do leczenia imatynibem:

- **Gen *KIT*** - cała sekwencja kodująca w eksonach 9, 11, 13, 17 (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 *PDGRA* 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.

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 weryfikacyjnych dla metody diagnostycznej. W skrawkach odsetek komórek raka piersi wynosi przynajmniej 20%.

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 Sangera, 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 Sangera,
 - 20 dni roboczych dla metody NGS.

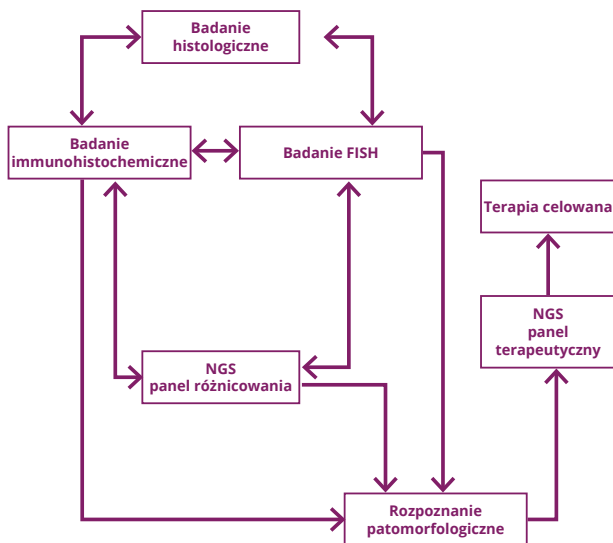
**Diagnostyka genetyczna
nowotworów litych w praktyce**

Mięsaki

Biologia, epidemiologia

- » Mięśniaki (*ang. sarcomas*) to rzadka, heterogenna grupa nowotworów mezenchymalnych (około 100 podtypów), obejmująca mięśniaki tkanek miękkich i kości.
- » Stanowią 15–21% nowotworów wieku dziecięcego oraz ok. 1% nowotworów złośliwych u dorosłych.
- » Charakteryzują się dużą zmiennością biologiczną i kliniczną; rokowanie zależy od typu histologicznego, lokalizacji i stopnia złośliwości.
- » Klasyfikacja WHO 2020 podkreśla kluczową rolę zaburzeń molekularnych w definiowaniu jednostek chorobowych.

• Diagnostyka – schemat postępowania:



- » Rozpoznanie wstępne na podstawie morfologii.
- » Weryfikacja immunohistochemiczna (IHC).
- » Zgodność histologia-IHC → potwierdzenie FISH.
- » Rozbieżność IHC-FISH lub podejrzenie mięsaka niezróżnicowanego → NGS (± równolegle z IHC).
- » W celu identyfikacji markerów terapeutycznych → panel NGS terapeutyczny.

Badane markery

1. FISH – panele podstawowe:

A. Panel podstawowy:

EWSR1, SS18, FOXO1, FUS, PDGFB, MDM2 (amplifikacja), *USP6*

B. Panel rozszerzony:

TFE3, MAML2, YWHAE, JAZF1, RB1, PHF1, CAMTA1, DDIT3, MYC (amplifikacja), *BCOR*

2. Mutacje punktowe i małe indel (Sanger/NGS)

A. Zmiany diagnostyczne / różnicowe:

- *KIT, PDGFRA* – GIST
- *CTNNB1, APC* – nowotwory desmoidne
- *H3-3A, H3-3B* – w diagnostyce różnicowej guza olbrzymiokomórkowego i chrzestniakomięsaka
- *IDH1/2* – *chondrosarcoma*
- *GNAS* – dysplazja włóknista vs. myxofibrosarcoma

B. Częste zmiany nieswoiste:

- *TP53, ATRX, RB1, CDKN2A, CDKN2B, NF1*

3. Najczęstsze fuzje genowe (wybrane przykłady istotne klinicznie)

Tabela 1. 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 wysokorozóżnicowany (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>

Typ mięsaka	Fuzje genowe
<i>Śluzakowłókniakomięsak (Myxofibrosarcoma)</i>	KIAA2026::NUDT11, CCBL1::ARL1, AFF3::PHF1
<i>Guz olbrzymiokomórkowy pochewki ścięgnistej (Tenosynovial giant cell tumor)</i>	COL6A3::CSF1
<i>Pericytoma with t(7;12)t(7;12)</i>	ACTB::GLI1
<i>Mięsak prążkowanokomórkowy pęcherzykowy (Alveolar rhabdomyosarcoma)</i>	PAX3::FOXO1, PAX7::FOXO1, PAX3::FOXO4, PAX3::NCOA1, PAX3::NCOA2, FOXO1::FGFR1
<i>Mięsak prążkowanokomórkowy wrzecionowatokomórkowy (Spindle cell rhabdomyosarcoma)</i>	SRF::NCOA2, TEAD1::NCOA2
<i>Angiomatoid fibrous histiocytoma</i>	EWSR1::CREB1, FUS::ATF1, EWSR1::ATF1
<i>Guz kostniejący włóknisto- śluzowy (Ossifying fibromyxoid tumor)</i>	EP400::PHF1, MEAF6::PHF1, ZC3H7B::BCOR
<i>Myoepithelioma/mixed tumor</i>	EWSR1::PBX1, EWSR1::POU5F1, EWSR1::ZNF444 EWSR1::KLF17, EWSR1::PBX3, FUS::KLF17, LIFR::PLAG1, SRF::E2F1
<i>Mięsak jasnokomórkowy (Clear cell sarcoma)</i>	EWSR1::ATF1, EWSR1::CREB1, IRX2::TERT
<i>Mięsak maziówkowy (Synovial sarcoma)</i>	SS18::SSX1, SS18::SSX2, SS18::SSX4, SS18L1::SSX1
<i>Biphenotypic sinonasal sarcoma</i>	PAX3::MAML3, PAX3::NCOA1, PAX3::FOXO1
<i>Mięsak pęcherzykowy tkanek miękkich (Alveolar soft part sarcoma)</i>	ASPSCR1::TFE3

Typ mięsaka	Fuzje genowe
<i>Pozakostny śluzakowaty chrzęstniakomięsak (Extraskeletal myxoid chondrosarcoma)</i>	<i>EWSR1::NR4A3, TAF15::NR4A3, TFG::NR4A3, TCF12::NR4A3, HSPA8::NR4A3</i>
<i>Desmoplastyczny guz okrągłokomórkowy (Desmoplastic small round cell tumor)</i>	<i>EWSR1::WT1</i>
<i>Mięsaki okrągłokomórkowe z rearanżacją (Round cell sarcoma with rearrangement)</i>	<i>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</i>
<i>Nowotwór podścieliskowy przewodu pokarmowego (Gastrointestinal stromal tumor)</i>	<i>ETV6::NTRK3</i>
<i>Perivascular epithelioid cell tumors</i>	<i>SFPQ::TFE3</i>
<i>Chrzęstniak tkanek miękkich (Soft tissue chondroma)</i>	<i>HMGA2::LPP</i>
<i>Chrzęstniakomięsak mezenchymalny (Mesenchymal chondrosarcoma)</i>	<i>HEY1::NCOA2 IRFBP2::CDX1</i>
<i>Epithelioid hemangioma</i>	<i>ZFP36::FOSB</i>
<i>Epithelioid hemangioendothelioma</i>	<i>WWTR1::CAMTA1, YAP1::TFE3</i>
<i>Pseudomyogenic hemangioendothelioma</i>	<i>SERPINE1::FOSB</i>
<i>Naczyniakomięsak (Angiosarcoma)</i>	<i>CIC::LEUTX</i>

Typ mięsaka	Fuzje genowe
<i>Atypical lipomatous tumor</i>	<i>MDM2 (and/or CDK4)</i>
<i>Postradiation angiosarcoma of the breast</i>	<i>MYC (and/or CDK4)</i>

Panele NGS

A. Panel diagnostyczny (fuzje różnicujące)

Fuzje genowe
<i>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</i>

B. Panel terapeutyczny (guzy lite)

Ocena fuzji genowych	Ocena zarówno fuzji i wariantów genetycznych	Ocena mutacji punktowych, małych delecji/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>

C. Panel rozszerzony (przypadki trudne diagnostycznie)

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 delecji/insercji, duplikacji i tandemowych powtórzeń)

ALK; BCOR; BRAF; EGFR; FGFR1, FGFR2, FGFR3, NTRK1; NTRK2; NTRK3; RET; ROS1

Ocena mutacji punktowych

CTNNB1; MYOD1

Materiał

- » Tkanka FFPE (bloczek parafinowy).
- » Minimalna zawartość żywego utkania nowotworowego: $\geq 20\%$.
- » W materiałach kostnych – dekalcyfikacja wyłącznie 10% EDTA (pH 7,4).

Metody

• FISH

- » Szybka ocena rearanżacji/amplifikacji.
- » Jedna zmiana = jedno badanie.

• Sanger

- » Weryfikacja wybranych mutacji/fuzji.

• NGS (preferencyjnie na bazie RNA)

- » Jednoczasowa detekcja: SNV, indel, amplifikacji, fuzji.
- » Możliwość wykrywania nowych fuzji i oceny ramki odczytu.
- » Ograniczenia: jakość RNA (FFPE), koszt, czas, wymagania bioinformatyczne.

Czas wykonania badania

- FISH / Sanger do 10 dni roboczych,
- NGS do 20 dni roboczych.

**Diagnostyka genetyczna
nowotworów litych w praktyce**

Rak piersi

Epidemiologia, etiologia

- » Rak piersi (BC) – najczęstszy nowotwór złośliwy u kobiet (ok. 23% zachorowań), 2. przyczyna zgonów nowotworowych po raku płuca.
- » Polska (KRN 2023): 21 716 zachorowań kobiet, 208 mężczyzn; 6757 zgonów kobiet, 70 mężczyzn.
- » Szczyt zachorowań: 55–65 r.ż.; ok. 19% przypadków dotyczy kobiet 30–50 lat; trend wzrostowy <40 r.ż.
- » Czynniki ryzyka: wiek, płeć, czynniki hormonalne i reprodukcyjne, styl życia oraz predyspozycje genetyczne.

Predyspozycje genetyczne

- » 5–10% raków piersi – silna jednogenowa predyspozycja.
- » 90% przypadków dziedzicznego raka piersi związane z wariantami patogennymi w *BRCA1/BRCA2*.
- » Ryzyko u kobiet z *BRCA1/2*: 40–85% (3–7× wyższe niż populacyjne).
- » Ryzyko u mężczyzn z *BRCA1/2*: 1,2–10% (12–100× wzrost względem populacji).
- » 20–30% zachorowań wykazuje cechy rodowodowo-kliniczne sugerujące podłoże genetyczne.
- » Inne geny związane z ryzykiem rozwoju raka piersi: *ATM*, *BARD1*, *CDH1*, *CHEK2*, *NF1*, *PALB2*, *PTEN*, *STK11*, *TP53*.
- » U chorych z wczesnym zachorowaniem lub dodatnim wywiadem rodzinnym zaleca się rozszerzone panele genetyczne (szczególnie badanie *PALB2*, *CHEK2*).

Podtypy molekularne

» Identyfikacja na podstawie IHC: ER, PR, HER2 oraz indeksu proliferacyjnego Ki-67 (wg zaleceń St. Gallen). W przypadkach HER2 (2+) – weryfikacja amplifikacji genu metodą FISH.

• Podtypy:

- Luminalny A
- Luminalny B (HER2– lub HER2+)
- HER2+ (nie-luminalny)
- Potrójnie ujemny (TNBC)

Podtyp molekularny determinuje wybór terapii systemowej.

Badane markery

• **HER2 (ERBB2)**

- » Nadekspresja/amplifikacja w ok. 20% raków inwazyjnych.
- » Diagnostyka: IHC; w przypadku 2+ → FISH.

• **BRCA1/BRCA2**

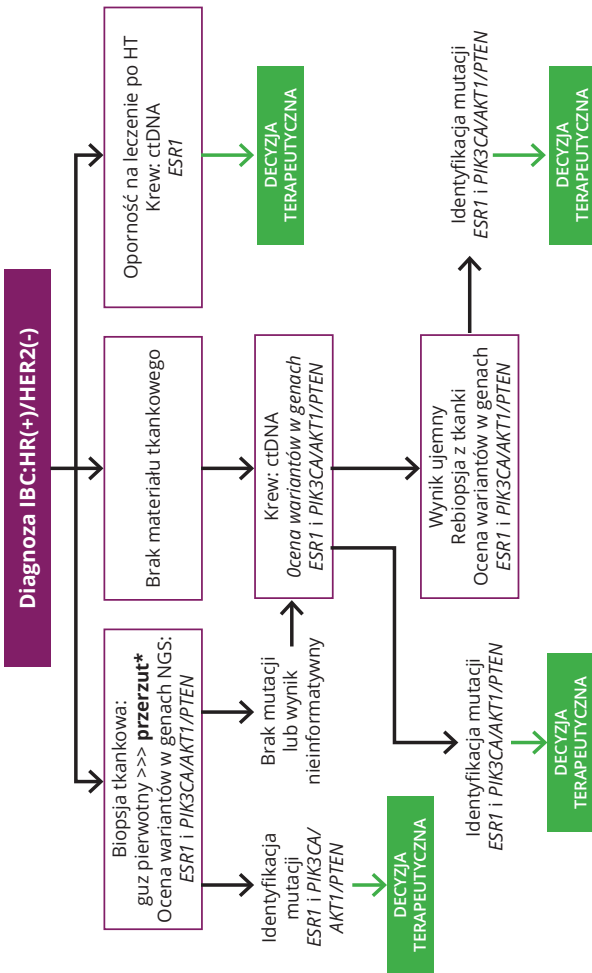
- » Udział w naprawie dwuniciowych pęknięć DNA (DSB).
- » Znaczenie: predyspozycyjne, prognostyczne, predykcyjne.
- » Kwalifikacja do PARPi; lepsza odpowiedź na platynę w TNBC.
- » Pacjentka z wariantem patogennym lub prawdopodobnie patogennym w genie *BRCA1/BRCA2* (+) kierowana do poradnictwa genetycznego

- **Szlak PI3K/AKT/PTEN (HR+/HER2-)**

- » *PIK3CA*: mutacje u ~40% (80% to hot-spot: E542, E545, H1047).
- » *AKT1*: 3-5% (najczęściej E17K).
- » *PTEN*: 5-12% utrata/mutacje wtórne (często w progresji).
- » Mutacje *PIK3CA* i *AKT1* – wzajemnie wykluczające; *PTEN* może współwystępować.
- » Znaczenie: oporność na hormonoterapię/CDK4/6; kwalifikacja do inhibitorów PI3K/AKT.

- **ESR1**

- » Mutacje w domenie LBD (Y537S/N/C, D538G).
- » 5% guzów pierwotnych, 30-40% przerzutów.
- » Czynniki oporności na inhibitory aromatazy (do 40% progresji w I linii).
- » Marker predykcyjny do terapii SERD nowej generacji.
- » Zalecane monitorowanie w ctDNA.



Materiał

- » Krew obwodowa – *BRCA1/2* (badania germinalne).
- » FFPE (guz pierwotny/przerzut) – *PIK3CA*, *ESR1*, *AKT1*, *PTEN*.
- » $\geq 20\%$ komórek nowotworowych; min. 3000 komórek.
- » FISH *HER2* – bloczek FFPE; 4–6 μm ; analiza ≥ 100 komórek.
- » ctDNA – szczególnie *ESR1* (monitorowanie oporności); metody: qPCR, ddPCR, NGS.

Metody

- » NGS – metoda preferowana (*BRCA1/2*, *PIK3CA*, *ESR1*, *AKT1*, *PTEN*).
- » Sanger/qPCR/HRM – badania wariantu znanego w rodzinie.
- » CNV/LRG (*BRCA1/2*) – MLPA lub NGS (zalecane potwierdzenie z drugiego pobrania metodą MLPA).
- » FISH – weryfikacja *HER2* (IHC 2+).
- » Testy qPCR/ddPCR muszą obejmować wszystkie warianty istotne klinicznie (zgodnie z ChPL).

Czas wykonania badania

- » Od momentu otrzymania materiału:
 - 10 dni roboczych: FISH, qPCR, HRM, MLPA, Sanger,
 - 20 dni roboczych: NGS.

**Diagnostyka genetyczna
nowotworów litych w praktyce**

Rak żołądka

Epidemiologia

- » Rak żołądka (*GC, gastric cancer*) rozpoznawany jest u ok. 1 mln osób rocznie na świecie.
- » Należy do 5 najczęstszych nowotworów u kobiet i mężczyzn.
- » W Europie Środkowo-Wschodniej:
 - » kobiety – ok. 3/10 000
 - » mężczyźni – ok. 17/10 000

Etiologia i biologia

- » Najczęściej diagnozowany u osób starszych (kumulacja czynników środowiskowych i zmian genetycznych), ale może występować także <45 r.ż.
- » Około 10% przypadków wiąże się z dodatnim wywiadem rodzinnym.
- » Rokowanie jest niekorzystne – większość przypadków rozpoznawana w stadium zaawansowanym, bez możliwości radykalnej resekcji.

• Profilowanie molekularne (kierunki rozwoju):

- » Podtyp związany z infekcją EBV
- » Podtyp z niestabilnością mikrosatelitarną (MSI)
- » Podtyp stabilny genomowo
- » Podtyp z niestabilnością chromosomalną
- » Coraz większe znaczenie: analiza krążącego DNA/RNA (ctDNA/ctRNA).

Biomarkery

• HER2 (ERBB2):

- Warunek kwalifikacji do terapii anty-HER2 – wykazanie:
- nadekspresji białka (IHC) lub
- amplifikacji genu (FISH).

• Algorytm diagnostyczny:

1. IHC jako badanie przesiewowe.
2. Wynik 3+ → kwalifikacja do leczenia.
3. Wynik 2+ (niejednoznaczny) → potwierdzenie amplifikacji metodą FISH.

Ocena FISH wykonywana przez diagnostę laboratoryjnego z użyciem testu CE-IVD.

Materiał

- » Materiał: tkanka FFPE (bloczek parafinowy).
- » Wybór reprezentatywnego obszaru – patomorfolog.
- » Skrawki do FISH: 4–6 μm (zgodnie z walidacją wewnętrzną).
- » Minimalna liczba analizowanych komórek nowotworowych: ≥ 100 .

Metody

- » FISH.

Czas wykonania badania molekularnego

- » Wynik FISH: do 10 dni roboczych od momentu otrzymania materiału.

**Diagnostyka genetyczna
nowotworów litych w praktyce**

**Fuzje *NTRK* jako przykład
markerów niezależnych
od pochodzenia tkanki
nowotworu**

Epidemiologia, biologia

- » Geny *NTRK1*, *NTRK2* i *NTRK3* kodują receptory kinazy tropomiozynowej *TRKA*, *TRKB* i *TRKC*, aktywowane przez neurotrofiny – czynniki wzrostu regulujące rozwój i funkcjonowanie układu nerwowego.
- » W wyniku rearanżacji powstają białka fuzyjne TRK, które wykazują konstytutywną aktywność kinazową, prowadząc do niekontrolowanej proliferacji komórek nowotworowych i progresji guza.

• Fuzje *NTRK1/2/3*:

- » występują w ≥ 19 typach nowotworów u dorosłych i dzieci,
- » mogą być obecne w ok. 1% wszystkich guzów litych,
- » mają charakter agnostyczny względem typu tkanki (tumor-agnostic biomarker).

• Wysoka częstość:

- » wydzielniczy rak ślinianki (42,9–100%),
- » wydzielniczy rak piersi (66,7–100%),
- » rak tarczycy (0–35,7%).

» Niska częstość (0–3%):

- » rak trzustki, GIST, rak jelita grubego, NDRP, czerniak, mięsaki, guzy neuroendokrynne, rak prostaty, AML, ALL.
- » Fuzje *NTRK* są biomarkerem predykcyjnym dla zastosowania inhibitorów TRK.
- » W nowotworach o wysokiej częstości fuzji możliwe jest zastosowanie metod celowanych (FISH, RT-PCR, RNA-NGS),
- » W populacjach niewyselekcjonowanych, gdzie częstość jest niska – NGS (RNA) jako metoda pierwszej linii.

Materiał

- » FFPE (skrawki niebarwione).
- » Minimalny odsetek komórek nowotworowych: $\geq 20\%$.
- » Preferowany materiał dobrej jakości RNA (krótki czas utrwalania).

4.15.3 Metody

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

Czas wykonania badania molekularnego

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

**Diagnostyka genetyczna
nowotworów litych w praktyce**

**Diagnostyka genetyczna
raka pęcherza moczowego**

Zachorowania (Polska): ok. 7 500–8 000 nowych przypadków rocznie

- » Częstość występowania:
 - mężczyźni: 4. miejsce wśród nowotworów złośliwych
 - kobiety: 13. miejsce
- » Stosunek płci: M:K $\approx$ 3–4:1 (trend wzrostowy zachorowań u kobiet)
- » Szczyt zachorowań: 7.–8. dekada życia (mediana wieku rozpoznania $\sim$ 73 lata)
- » 5-letnie przeżycie 55-60%: silnie zależne od stadium; 70-80% w NMIBC, istotnie niższe w MIBC (kilka – kilkanaście %)
- » Etiologia i czynniki ryzyka:
 - Palenie tytoniu: główny czynnik etiologiczny ($\sim$ 50–60% zachorowań); aromatyczne aminy i wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne wydalone z moczem działają kancerogennie na urotelium.
 - Ekspozycja zawodowa: przemysł barwnikowy, gumowy, tekstylny, skórzany.
 - Czynniki miejscowe: przewlekłe stany zapalne, długotrwałe cewnikowanie, kamica pęcherza.
 - Czynniki infekcyjne: *Schistosoma haematobium* (endemia Afryka/Bliski Wschód) – predyspozycja do raka płaskonabłonkowego (SCC), rzadszej jednostki o odmiennym profilu molekularnym.

Wskazania do badań genetycznych

- » Rak urotelialny nieresekcyjny lub przerzutowy: na etapie rozpoznania choroby rozsianej (lub przy progresji), aby zaplanować leczenie sekwencyjne (II/III linia).

Kluczowe biomarkery i cele terapeutyczne (program B.141.FM)

Bio-marker	Metoda Detekcji	Materiał	Kryterium	Zastosowanie Kliniczne w Polsce (2026)
FGFR3	RT-PCR	Tkanka (FFPE)	Mutacje punktowe: R248C, S249C, G370C, Y373C	Erdafitinib (II/III linia leczenia mUC). Dla pacjentów z progresją po chemioterapii opartej na platynie i immunoterapii.
	lub NGS	lub Osocze (ctDNA)*	Fuzje genowe: FGFR3::TACC3	Wymagane potwierdzenie wariantu patogennego.

**Biopsja płynna (ctDNA) jest dopuszczalna i refundowana w przypadku braku dostępnej tkanki archiwalnej lub jej niskiej jakości.*

Algorytm postępowania diagnostycznego

• Rak urotelialny nieresekcyjny lub przerzutowy

- » W trakcie I Linia Leczenia: analiza genu *FGFR3* (najlepiej panel NGS DNA+RNA), aby wynik był gotowy na moment progresji.
- » Progresja choroby (II/III Linia).

Raportowanie wyników

- » Raport z badania genetycznego musi zawierać:
 - Metodę badania (np. NGS - panel genów, RT-qPCR - nazwa zestawu komercyjnego).
 - Dokładny zapis wariantu wg nomenklatury HGVS (np. *FGFR3* c.746C>G, p.S249C).
 - Jasną interpretację kliniczną: „Wykryto wariant warunkujący wrażliwość komórek nowotworowych na inhibitory FGFR”.

Materiał tkankowy

- » Materiał: Optymalny jest bloczek parafinowy z min. 20% utkania nowotworu.
- » Czas utrwalania: 6–48 godzin w formalinie buforowanej (kluczowe dla zachowania jakości RNA do detekcji fuzji).
- » Makrodysekcja: zalecana w celu wzbogacenia próbki w komórki nowotworowe przed izolacją kwasów nukleinowych.

Czas wykonania badania

- 5 dni roboczych dla metody RT-qPCR,
- 20 dni roboczych dla metody NGS.

**Diagnostyka genetyczna
nowotworów litych w praktyce**

Rak ślinianki

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

Najczęstsze zaburzenia genetyczne

Tabela 1. 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%)
Gruczołakorak 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%)
Gruczołakorak 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 szkliniący (<i>Hyalinizing clear cell carcinoma</i>)	Rearanżacje <i>EWSR1</i> (80-90%)
Typ histologiczny	Charakterystyczne cechy genetyczne
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%)
Gruzołakorak śluzowy (<i>Mucinous adenocarcinoma</i>)	<i>AKT1</i> p.Glu17Lys (E17K)
Rak z gruczołaka wielopostaciowego (<i>Carcinoma ex pleomorphic adenoma</i>)	Rearanżacje <i>PLAG1</i> , <i>HMG2</i> (80%)

Tabela 2. 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>

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%.

Metody

- » Preferowaną metodą jest 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*.

Czas wykonania badania molekularnego

- 10 dni roboczych dla metody PCR, FISH, sekwencjonowanie Sangera,
- 20 dni roboczych dla metody NGS.

**Diagnostyka genetyczna
nowotworów litych w praktyce**

Rak dróg żółciowych

Klasyfikacja

- » Rak dróg żółciowych wywodzi się z komórek nabłonka ze-wnątrz- lub wewnątrzwątrobowych przewodów żółciowych.
- » Międzynarodowa Klasyfikacja Chorób ICD-10 wyróżnia loka-lizacje:
 - C22.1 – Rak przewodów żółciowych wewnątrzwątrobo-wych
 - C23 – Nowotwór złośliwy pęcherzyka żółciowego
 - C24 – Nowotwór złośliwy innych i nieokreślonych części dróg żółciowych

Najczęstsze zmiany genetyczne

Tabela 1. Geny związane z karcynogenezą w raku przewo-dów żółciowych

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

Zaburzenia genetyczne o charakterze predykcyjnym

Tabela 2. 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

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%.
- » Należy racjonalnie obchodzić się z drobnym materiałem biopsyjnym i zaplanować diagnostykę genetyczną dobierając odpowiednią metodę i zakres testowanych czynników w przypadku skąpego materiału.

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.

Czas wykonania badania molekularnego

- 10 dni roboczych dla metody PCR, FISH, sekwencjonowanie Sangera,
- 20 dni roboczych dla metody NGS.

