

Wykorzystanie sekwencjonowania nowej generacji (NGS) w diagnostyce molekularnej niedrobnokomórkowego raka płuca: aktualne możliwości i perspektywy na przyszłość

Adam SZPECHCIŃSKI

Zakład Genetyki i Immunologii Klinicznej
Instytut Gruźlicy i Chorób Płuc w Warszawie

Wprowadzenie

Liczne badania bardzo dobrze dokumentują ważną rolę, jaką w patomechanizmie nowotworów złośliwych odgrywa nieprawidłowa aktywność genów uczestniczących w regulacji kluczowych procesów życiowych komórki – jej cyklu, różnicowania, dojrzewania, starzenia i apoptozy. Niekontrolowany wzrost guza nowotworowego jest efektem zachwiania fizjologicznej równowagi poprzez aktywację protoonkogenów, odpowiadających za intensywny wzrost patologicznych tkanek, oraz unieczynnienie genów supresorowych transformacji nowotworowej (ang. *tumour suppressor genes*, TSG). Za sprawą modyfikacji genetycznych (mutacje, aberracje chromosomowe, utrata heterozygotyczności) bądź epigenetycznych (metylacja, aktywność mikroRNA) istotnym zmianom ulega ekspresja wielu genów, w tym onkogenów i genów supresorowych nowotworów, lub czynność kodowanych przez nie białek, w wyniku czego zaburzona zostaje efektywność naturalnych mechanizmów regulujących homeostazę komórek i tkanek organizmu. Od czasu zdefiniowania na nowo raka płuca, jako choroby genetycznej, zmieniło się również podejście do diagnozowania i leczenia tej patologii, co przyczyniło się do rozwoju medycyny personalizowanej. Medycyna personalizowana wymaga zintegrowanego podejścia klinicznego, łączącego precyzyjne diagnozowanie choroby na poziomie molekularnym i terapię z użyciem selektywnych leków, działających specyficznie na komórki nowotworowe obciążone konkretną zmianą genetyczną.

Niedrobnokomórkowy rak płuca (NDRP) jest trudnym celem diagnostycznym zarówno ze względu na znaczące zróżnicowanie klonów komórek nowotworowych w samym guzie, jak i utrudniony dostęp do dobrego jakościowo, informatywnego materiału diagnostycznego.

W miarę rozwoju nowotworu zmienia się również profil ekspresji markerów molekularnych. Dlatego też scharakteryzowanie zaburzeń molekularnych towarzyszących kolejnym stadiom rozwoju NDRP, mających jednocześnie walor diagnostyczny nasyca trudności, pomimo bardzo intensywnych poszukiwań prowadzonych przez wiele ośrodków na całym świecie.

Nowoczesne techniki biologii molekularnej są skutecznym narzędziem diagnostycznym, szeroko stosowanym we współczesnej medycynie. W ostatnich latach rośnie ich znaczenie również w diagnostyce raka płuca, w miarę wdrażania do codziennej praktyki wyników badań naukowych. Obecnie jedną z najintensywniej rozwijanych metod jest sekwencjonowanie nowej generacji. Pomimo ogromnej mocy przerobowej oraz szeregu innych zalet wdrożenie sekwencjonowania nowej generacji do rutynowej diagnostyki molekularnej raka płuca stanowi aktualnie przedmiot wielu kontrowersji.

Podstawowe metody diagnostyki molekularnej raka płuca

Diagnostyka molekularna raka płuca dysponuje szeregiem technik laboratoryjnych umożliwiających skuteczną analizę zmian genetycznych o znaczeniu klinicznym, przede wszystkim mutacji somatycznych i rearanżacji genów. W ciągu ostatniej dekady metody wykorzystujące amplifikację DNA techniką PCR (łańcuchowa reakcja polimerazy – ang. *polymerase chain reaction*) w czasie rzeczywistym, zwaną także ilościowym PCR (ang. *real-time PCR*, *quantitative PCR*, qPCR), oraz sekwencjonowanie DNA metodą Sangera uważano za „złoty standard” w analizie mutacji genu *EGFR*, podobnie jak metodę FISH (ang. *fluorescence in situ hybridization*), w wykrywaniu rearanżacji genów *ALK* i *ROS1*.

Główną zaletą metod opartych na technice *real-time PCR* jest bardzo wysoka czułość detekcji, sięgająca 1% allelu zmutowanego w mieszaninie DNA genomowego (allelospecyficzna amplifikacja PCR), przy jednocześnie

bardzo wysokiej specyficzności i szerokim zakresie dynamicznym, pozwalającym analizować próbki o różnym stężeniu DNA (różnica 6–8 rzędów wielkości). Ponadto amplifikacja krótkich fragmentów DNA, zwykle około 100 par zasad, zapewnia wysoką skuteczność badania materiałów o niskiej jakości DNA, takich jak utrwalone w blockach parafinowych (ang. *formalin-fixed, paraffin-embedded tissue*, FFPE) skrawki tkanki nowotworowej lub materiał cytologiczny z biopsji cienkoigłowej (cytobloki). Inną ważną zaletą *real-time PCR* jest możliwość multipleksowania reakcji, czyli jednoczesnej amplifikacji dwóch i więcej matryc DNA w tej samej mieszaninie reakcyjnej (próbówce), co znacząco skraca czas i zmniejsza koszt wykonania oznaczeń (zamiast kilku reakcji PCR wykonywana jest jedna), pozwala zużyć mniej matrycy DNA (szczególnie ważne, gdy dysponujemy minimalnymi ilościami unikatowego materiału genetycznego), a także daje możliwość zastosowania wewnętrznej kontroli amplifikacji w reakcjach, w których stwierdza się obecność lub brak produktu (dodatni/ujemny). Obecnie najbardziej zaawansowane multiplexy allelospecyficznego PCR w czasie rzeczywistym pozwalają na jednoczesną analizę ponad 40 różnych mutacji w 18, 19, 20 i 21 eksonie genu *EGFR* w 30 próbach DNA podczas jednego cyklu pracy aparatu.

W diagnostyce rearanżacji genu *ALK* metodą FISH zastosowano unikatowe rozwiązanie w postaci pary specyficznych sond typu *break-apart*, rozpoznających wszystkie nieprawidłowe warianty fuzyjne genu, choć bez różnicowania ich. Metoda ta jest jednak praco- i czasochłonna oraz obciążona dużym ryzykiem błędu (zwłaszcza wyników fałszywie dodatnich), ponieważ wiarygodność badania uzależniona jest tu od doświadczenia diagnosty laboratoryjnego w zakresie wykonania procedury i interpretacji obrazu spod mikroskopu fluorescencyjnego. Mimo to próby badania transkryptów mRNA z komórek nowotworowych metodą odwrotnej transkrypcji i PCR w czasie rzeczywistym (RT-qPCR) pod kątem obecności wariantów fuzyjnych *EML4-ALK* nadal nie wydają się wystarczającą alternatywą dla metody FISH, z uwagi na ograniczoną do kilkunastu liczbę możliwych do wykrycia zmian, a przez to duże ryzyko wyników fałszywie ujemnych. Ponadto optymalizacja metod diagnostycznych opartych na RT-qPCR pod kątem identyfikacji niedawno opisanych rzadkich wariantów fuzyjnych *ALK* z genami *TFG* lub *KIF5B* może okazać się bardzo trudna w praktyce.

Należy podkreślić, że pomimo szeregu zalet zarówno *real-time PCR*, jak i FISH są technikami o niskiej przepustowości, umożliwiającymi analizę kilku–kilkudziesięciu znanych zmian molekularnych w obrębie zaledwie jednego genu i w ograniczonej liczbie próbek (zwykle im

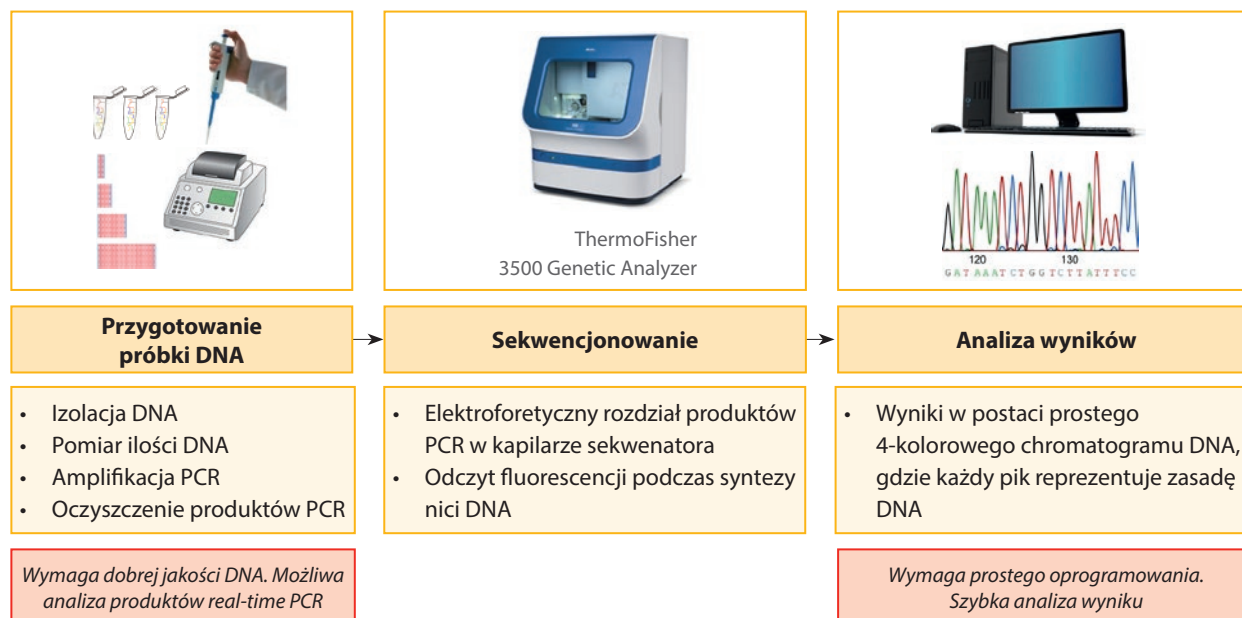
większa liczba wykrywanych zmian molekularnych, tym mniejsza liczba próbek badanych w jednym cyklu pracy).

Sekwencjonowanie DNA metodą Sangera

Sekwencjonowanie DNA, w ogólnym pojęciu, obejmuje zbiór technik laboratoryjnych wykorzystywanych w genetyce i biologii molekularnej do odczytywania sekwencji, czyli kolejności par nukleotydowych w cząsteczce DNA. Podstawy metodyki sekwencjonowania DNA stworzyły niezależnie dwa zespoły naukowców w latach 70. XX w.: zespół Fredericka Sangera, który opracował metodę opartą na syntezie DNA przez polimerazę DNA *in vitro* (tzw. sekwencjonowanie Sangera), oraz zespół Waltera Gilberta, którego metoda wykorzystywała specyficzną, chemiczną degradację DNA (tzw. metoda Maxama–Gilberta, obecnie rzadko stosowana). W metodzie Sangera do reakcji dodaje się niewielką ilość trifosforanów dideoksynukleotydów (ddNTP), które są wbudowywane w DNA, ale ich dołączenie uniemożliwia dalsze wydłużanie nici. W ten sposób otrzymuje się fragmenty DNA o różnej długości zakończone specyficznym nukleotydem. Produkty reakcji rozdziela się elektroforetycznie, co powoduje ich segregację pod względem wielkości.

Dzięki automatyzacji enzymatycznego procesu syntezy nici DNA, rozdziału elektroforetycznego w kapilarze i odczytu sekwencji na podstawie pozycji znakowanych fluorescencyjnie trifosforanów dideoksynukleotydów (cztery różne znaczniki fluorescencyjne dla każdego z czterech nukleotydów: adeninowego, guaninowego, cytozynowego i tyminowego) metoda Sangera była przez niemal trzy dekady najpopularniejszą techniką sekwencjonowania DNA, powszechnie wykorzystywaną w badaniach naukowych i diagnostyce genetycznej. Najnowocześniejsze sekwenatory kapilarne mogą analizować sekwencje 384 prób DNA w jednym cyklu pracy, choć najpopularniejsze są aparaty 8- i 16-kapilarne. Przybliżony czas odczytu 1000 nukleotydów to 125 min (ryc. 1).

Klasyczna metoda Sangera wciąż stanowi standard sekwencjonowania DNA i jest powszechnie wykorzystywana w rutynowej diagnostyce genetycznej, często służąc do sprawdzania wiarygodności wyników uzyskiwanych w urządzeniach o większej przepustowości. W diagnostyce molekularnej raka płuca ta metoda sekwencjonowania DNA jest najczęściej używana do potwierdzania wyników testów opartych na technice PCR w czasie rzeczywistym z certyfikatem IVD, głównie w analizie somatycznych mutacji genu *EGFR*. Możliwość odczytu stosunkowo długich fragmentów w pojedynczej reakcji (100–1000 par zasad) przy jednoczesnej bardzo dużej trafności i jednoznaczności uzyskiwanych wyników powoduje, że metoda Sangera jest szeroko stosowana do analizy sekwencji DNA w po-



Ryc. 1. Schemat prezentujący główne etapy procedury sekwencjonowania DNA metodą Sanger

szukiwaniu mutacji pojedynczych nukleotydów, a także niewielkich delecji i insercji.

Pomimo wysokiej specyficzności podstawowym problemem ograniczającym zastosowanie metody Sanger w diagnostyce mutacji somatycznych nowotworów jest relatywnie niska czułość. W optymalnych warunkach, wykorzystując matrycę DNA o wysokiej jakości, sekwencjonowanie metodą Sanger może osiągać czułość detekcji do 20–25% allelu zmutowanego na tle wariantu natywnego (ang. *wild-type allele*) dla danego genu. Wiele materiałów diagnostycznych, przede wszystkim utrwalonych FFPE, charakteryzuje się jednak wysokim stopniem degradacji DNA, co ma istotnie negatywny wpływ na odczyt i interpretację analizowanej sekwencji. Zaleca się zatem, aby w praktyce diagnostycznej metodą sekwencjonowania kapilarnego analizować jedynie materiały zawierające przynajmniej 50% komórek nowotworowych. Sekwencjonowanie metodą Sanger doskonale nadaje się do analizy sekwencji pojedynczych genów, jest jednak zbyt kosztowne i pracochłonne, by można je było efektywnie zastosować do badania kilkudziesięciu czy kilkuset genów w standardowych warunkach laboratoryjnych.

Sekwencjonowanie nowej generacji

Rozwój technik sekwencjonowania DNA, niejako w odpowiedzi na potrzebę stworzenia metody doskonałej, wolnej od głównych ograniczeń rozwiązań pierwszej generacji, czyli niskiej przepustowości i czułości analitycznej, zaowocował opracowaniem szeregu innowacyj-

nych koncepcji technologicznych, które miały wprowadzić analizę sekwencji DNA w XXI w. Metody te nazywa się ogólnie sekwencjonowaniem nowej generacji (ang. *next generation sequencing*, NGS) lub równoległym sekwencjonowaniem wielu fragmentów DNA (ang. *massively parallel sequencing*, MPS).

W porównaniu z klasycznymi sekwencjatorami sangerowskimi urządzenia NGS charakteryzuje wyższa przepustowość, pozwalająca sekwencjonować w tym samym czasie wiele regionów w obrębie genomu, w dużej liczbie próbek DNA (np. od różnych pacjentów), pod kątem różnych zmian genetycznych (mutacje punktowe, insercje, delecje, CNV), w ciągu jednego cyklu pracy maszyny (tab. 1). Ponadto techniki NGS są znacznie czulsze od sekwencjonowania pierwszej generacji, wymagają więc próbek o wielokrotnie niższym stężeniu DNA. Czułość detekcji najpopularniejszych systemów NGS pozwala wykrywać 2–10% allelu zmutowanego w tle wariantu natywnego, a istnieją specjalne protokoły (m.in. dla pozakomórkowego DNA) umożliwiające jeszcze czulszą analizę. W dodatku NGS jest metodą zarówno jakościową (odczyt sekwencji DNA, wykrycie mutacji), jak i ilościową, gdyż zapewnia dokładny pomiar liczby kopii fragmentów DNA zawierających daną mutację. Ma to także szczególne znaczenie przy analizie zaburzeń genetycznych polegających na zwielokrotnieniu liczby kopii danego genu w obrębie genomu (ang. *copy number variation*, CNV).

Procedury analityczne większości dostępnych systemów NGS zawierają te same etapy, z których najbardziej

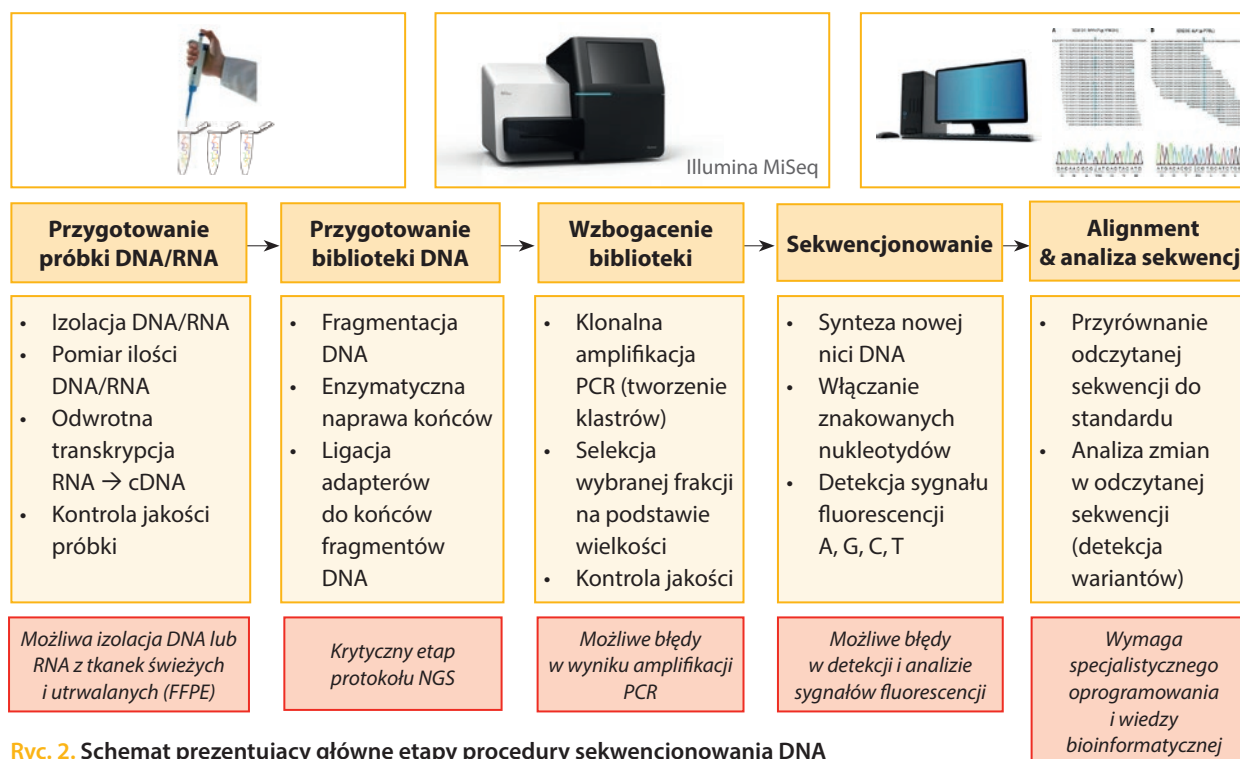
Producent/System	Amplifikacja DNA	Sekwencjonowanie	Wymagana ilość DNA w próbce	Maksymalna długość odczytu (par zasad)	Maksymalna przepustowość (par zasad/1 cykl pracy)	Poziom błądu	Czas 1 cyklu pracy
Sekwencjonowanie metodą Sangera (pierwsza generacja)							
LifeTechnologies 3500 Genetic Analyzer (8 kapilar)	PCR	przez syntezę DNA (<i>dideoxy chain termination</i>)	10–150 ng*	1000	8 Kb	> 0,001%	2 godz.
3730xl DNA Analyzer (96 kapilar)					~84 Kb		3 godz.
Sekwencjonowanie nowej generacji							
Roche 454 GS Junior	Clonal emulsion PCR	pirosekwencjonowanie	500 ng	400	35 Mb	0,5%	10 godz.
Roche 454 FLX Titanium	PCR			1000	700 Mb		24 godz.
LifeTechnologies 5500 SOLID	Clonal emulsion PCR	przez ligację	10 ng – 5 µg	75	90 Gb	0,1%	7 dni
LifeTechnologies Ion Torrent PGM	Clonal emulsion PCR	przez syntezę DNA (detekcja H ⁺)	50 ng – 1 µg	400	2 Gb	1%	8 godz.
LifeTechnologies Ion Torrent Proton				200	10 Gb		4 godz.
Illumina MiSeq	Clonal bridge PCR	przez syntezę DNA (<i>reversible termination</i>)	30 ng – 2 µg	2 x 300 2 x 150	15 Gb	0,2%	48 godz.
Illumina HiSeq					600 Gb		11 dni

* Zależnie od długości sekwencjonowanego fragmentu DNA

Tab. 1. Zestawienie najważniejszych parametrów technicznych popularnych systemów NGS

praco- i czasochłonne jest przygotowanie tzw. bibliotek DNA (lub RNA) oraz analiza bioinformatyczna surowych danych (ryc. 2). Na rynku dostępnych jest wiele różnych zestawów odczynnikowych, przeznaczonych dla danego systemu NGS oraz różnych aplikacji diagnostycznych i naukowych, np. sekwencjonowanie panelu kilkudziesięciu onkogenów pod kątem obecności mutacji soma-

tycznych w danym typie nowotworu (sekwencjonowanie celowane – ang. *targeted sequencing*), sekwencjonowanie transkryptomu (ang. *RNA sequencing*, RNA-Seq), sekwencjonowanie całego eksomu (ang. *whole exome sequencing*, WES), sekwencjonowanie genomu (ang. *whole genome sequencing*, WGS), sekwencjonowanie mikroRNA (ang. *small RNA sequencing*, smallRNA-Seq) i in.



Ryc. 2. Schemat prezentujący główne etapy procedury sekwencjonowania DNA metodami drugiej generacji, wspólne dla większości popularnych systemów NGS

Aktualne możliwości wykorzystania NGS w diagnostyce molekularnej raka płuca

Zgodnie z założeniami koncepcji medycyny personalizowanej efektywna identyfikacja onkogennych zaburzeń genetycznych w tkance nowotworowej stwarza lepsze możliwości diagnozowania, rokowania i wyboru optymalnej strategii terapeutycznej dla konkretnego pacjenta. Liczne prace badawcze opublikowane w ostatnim 5-leciu dowodzą, że wprowadzenie metody NGS do praktyki klinicznej raka płuca może znacząco poprawić skuteczność leczenia. Dla przykładu Lim et al. wykazali, że 58% badanych z grupy chorych na NDRP z negatywnym wynikiem badania molekularnego na obecność zaburzeń somatycznych w genach *EGFR*, *KRAS*, *ALK*, przeprowadzonego za pomocą metod podstawowych, nadal prezentowało szereg innych zmian molekularnych, dla których obecnie rozwijane są terapie celowane (możliwość uczestniczenia w badaniu klinicznym), gdy badanie powtórzono metodą NGS [1]. Z kolei Scarpa et al. już w 2013 roku dowiedli skuteczności badania molekularnego metodą NGS w skąpokomórkowym materiale cytologicznym od chorych na NDRP typu gruczołowego, pomimo że większość zestawów odczynnikowych była wówczas optymalizowana pod kątem tkanek FFPE [2]. Stworzyło to szansę na pogłębioną diagnostykę molekularną i analizę setek zaburzeń genetycznych, jednocześnie na podstawie bardzo małej ilości DNA (> 10 ng), co do tej pory nie było możliwe przy użyciu metod podstawowych. W szerszej perspektywie nawet 60% chorych na NDRP mogłoby skorzystać z diagnostyki opartej na metodzie NGS, ponieważ taki odsetek pacjentów jest diagnozowany w późnych stadiach zaawansowania choroby, kiedy możliwości uzyskania tkanki nowotworowej do badania drogą resekcji są ograniczone, a biopsja nie dostarcza materiału o odpowiedniej jakości lub ilości.

Poniżej opisano aktualne możliwości zastosowania metody NGS w diagnostyce molekularnej raka płuca i przedstawiono potencjalne korzyści kliniczne płynące z pogłębionej analizy genetycznej, które pogrupowano według dostępnych strategii leczenia personalizowanego.

Wykorzystanie NGS w analizie zmian molekularnych warunkujących skuteczność leczenia inhibitorami kinazy tyrozynowej EGFR

Skuteczność kliniczna ukierunkowanej molekularnie terapii raka płuca zależy przede wszystkim od właściwej kwalifikacji chorych na podstawie wiarygodnej oceny statusu biomarkerów predykcyjnych, m.in. aktywujących mutacji genu *EGFR* dla leczenia inhibitorami kinazy tyrozynowej EGFR (IKT EGFR). Największym ograniczeniem stosowania

IKT EGFR jest oporność na te leki. Może ona mieć charakter pierwotny, warunkowany głównie przez tzw. mutacje oporności, od początku obecne w komórkach guza, równoległe do mutacji aktywujących, albo charakter nabyty, kiedy mutacje oporności i inne zmiany epigenetyczne rozwijają się w trakcie terapii IKT EGFR. Niemal wszyscy chorzy na niedrobnokomórkowego raka płuca, którzy początkowo wykazują korzystną odpowiedź na IKT EGFR, z czasem nabywają oporność na te leki, zwykle między 9 a 12 miesiącem leczenia. Zrozumienie mechanizmów oporności nabywanej przez chorych w trakcie pierwszej linii leczenia IKT EGFR (erlotynib, gefitynib, afatynib) ma szczególne znaczenie dla wyboru późniejszej strategii terapeutycznej (leczenie II linii).

Do najczęstszych mechanizmów pierwotnej i nabytej oporności na leczenie IKT EGFR zalicza się mutacje oporności w genie *EGFR* (T790M, D761Y, L747S, T854A, C797S), zmiany w szlaku sygnałowym MAPK/ERK (mutacje genów *KRAS* i *BRAF*), aktywację obocznych ścieżek sygnałowych (amplifikacja *MET*, nadekspresja *HGF*, mutacje w genie *PIK3CA*, utrata *PTEN*, fuzja genów *EML4-ALK*). Szacuje się, że u 30% chorych mechanizmy nabytej oporności na IKT EGFR są wciąż nieznane.

Guz pierwotny płuca jest genetycznie heterogeny. Oznacza to, że możliwe jest współistnienie klonów komórek nowotworowych z mutacją aktywującą *EGFR* i z natywną formą genu, a nawet komórek wrażliwych i opornych na leczenie IKT EGFR. Prowadzenie terapii ukierunkowanej molekularnie powoduje eliminację klonu wrażliwego i selekcję komórek bez mutacji aktywujących lub mutacji warunkujących oporność, co klinicznie daje obraz częściowej remisji/wznowy czy też ograniczonej odpowiedzi na leczenie – w zależności od udziału odsetkowego poszczególnych populacji komórkowych w guzie.

Wraz z pogłębianiem naszej wiedzy w zakresie mechanizmów molekularnych, warunkujących skuteczność leczenia inhibitorami kinazy tyrozynowej EGFR, rośnie również potrzeba poszerzenia listy zaburzeń genetycznych analizowanych w ramach rutynowej diagnostyki molekularnej raka płuca. Wydaje się oczywiste, że najpowszechniej wykorzystywane metody diagnostyki molekularnej – *real-time PCR*, FISH, sekwencjonowanie sangerowskie – nie będą w stanie zapewnić wystarczającej mocy przerobowej dla większej liczby badanych genów i nowych terapii celowanych. Sekwencjonowanie nowej generacji oferuje rozwiązania komercyjne przeznaczone do pogłębionej diagnostyki punktowych mutacji somatycznych, insercji i delecji w obrębie kilkudziesięciu genów tworzących główne szlaki sygnałowe, zaangażowane w odpowiedź na leczenie IKT EGFR (tab. 2).

<i>ABL1</i>	<i>EGFR</i>	<i>GNAS</i>	<i>MLH1</i>	<i>RET</i>
<i>AKT1</i>	<i>ERBB2</i>	<i>HNF1A</i>	<i>MPL</i>	<i>SMAD4</i>
<i>ALK</i>	<i>ERBB4</i>	<i>HRAS</i>	<i>NOTCH1</i>	<i>SMARCB1</i>
<i>APC</i>	<i>FBXW7</i>	<i>IDH1</i>	<i>NPM1</i>	<i>SMO</i>
<i>ATM</i>	<i>FGFR1</i>	<i>JAK2</i>	<i>NRAS</i>	<i>SRC</i>
<i>BRAF</i>	<i>FGFR2</i>	<i>JAK3</i>	<i>PDGFRA</i>	<i>STK11</i>
<i>CDH1</i>	<i>FGFR3</i>	<i>KDR</i>	<i>PIK3CA</i>	<i>TP53</i>
<i>CDKN2A</i>	<i>FLT3</i>	<i>KIT</i>	<i>PTEN</i>	<i>VHL</i>
<i>CSF1R</i>	<i>GNA11</i>	<i>KRAS</i>	<i>PTPN11</i>	–
<i>CTNNB1</i>	<i>GNAQ</i>	<i>MET</i>	<i>RB1</i>	–

Tab. 2. Przykładowa lista 48 genów zaangażowanych w proces nowotworzenia, o potencjalnym znaczeniu klinicznym, które można badać zestawem odczynnikowym TruSeq Amplicon – Cancer Panel firmy Illumina pod kątem mutacji somatycznych na aparatach MiSeq i HiSeq (Illumina).

Na kolorowo zaznaczono geny o największym znaczeniu klinicznym z punktu widzenia istniejących (kolor zielony) lub aktualnie rozwijanych terapii ukierunkowanych molekularnie (kolor szary) dla raka niedrobnokomórkowego płuca. Zestaw zwalidowany do badania stosunkowo niewielkiej ilości DNA (< 250 ng) izolowanego z materiałów diagnostycznych w postaci bloków parafinowych (FFPE) w ciągu 12 godzin roboczych. Maksymalna długość odczytu rzędu 150–300 par zasad w aparatach Illumina spełnia wymagania analityczne dotyczące badania pofragmentowanego DNA z FFPE (opracowano na podstawie broszury handlowej Illumina)

Sekwencjonowanie transkryptomu w diagnostyce rearanżacji genów *ALK*, *ROS1* i *RET*

Stale udoskonalane technologie NGS umożliwiają efektywną analizę transkryptów wszystkich wariantów fuzyjnych dla wielu genów jednocześnie w zaledwie kilkunastu–kilkudziesięciu nanogramach całkowitego RNA izolowanego z FFPE (tab. 3). W przypadku diagnostyki molekularnej raka płuca największą wartość predykcyjną dla aktualnie dostępnej terapii ukierunkowanej molekularnie mają rearanżacje genów *ALK* i *ROS1* (w leczeniu kryzotynibem). Prowadzone są również badania kliniczne oceniające skuteczność inhibitorów skierowanych przeciwko białkom receptorowym, kodowanym przez fuzyjne warianty genów *RET*, *NTRK1* i *FGFR1/2/3*.

Niedawno opublikowane wyniki z obserwacji klinicznej 55 chorych na NDRP typu gruczołowego z potwierdzoną metodą IHC/FISH rearanżacją *ALK*, leczonych kryzotynibem, wskazują, że odpowiedź chorego na lek jest w istotny sposób uzależniona od typu wariantu fuzyjnego [3]. W niniejszym badaniu mediana czasu wolnego od progresji była istotnie wyższa w grupie chorych z wariantem typu 1 [$n = 19$; 11 miesięcy (95% CI: 6,5–43,0 miesiące)] niż w grupie z innymi wariantami fuzyjnymi [$n = 16$; 4,2 miesiące (95% CI: 1,6–10,2 miesiąca), $p < 0,05$].

Pogłębioną analizę różnicującą wyniki FISH przeprowadzono metodą RT-qPCR, która identyfikuje jedynie najczęstsze warianty fuzyjne *EML4-ALK*. W innej pracy istotne różnice w odpowiedzi na leczenie kryzotynibem obserwowano wyłącznie wśród chorych, dla których diagnostykę różnicującą warianty fuzyjne genu *ALK* przeprowadzono metodą NGS ($p = 0,016$). Wyniki z analizy FISH nie różnicowały chorych pod względem odpowiedzi na leczenie ($p = 0,73$) [4]. Bezpośrednia analiza porównawcza metod FISH i NGS w wykrywaniu rearanżacji genu *ALK* w materiałach FFPE od chorych na niedrobnokomórkowego raka płuca wykazała 65-procentową zgodność obu technik (20/31 materiałów) w potwierdzeniu wyniku dodatniego, podczas gdy pozostałe 35% ($n = 11$) przypadków prezentowało wynik dodatni jedynie w metodzie NGS. Przypadki te dotyczyły szczególnie rzadkich wariantów fuzyjnych, m.in. *KIF5B-ALK*, *CLCTC-ALK*, *TFG-ALK*, *PPM1B-ALK*, *EIF2AK3-ALK*, których częstość występowania nie przekracza 2%. Większość (70%) spośród 11 chorych prezentujących wynik FISH-ujemny/NGS-dodatni odpowiedziała na leczenie kryzotynibem [5]. Warto także wspomnieć, że w badaniach porównujących skuteczność trzech różnych systemów NGS w analizie rearanżacji genu *ALK* wykazano niemal 90-procentową zgodność wyników dla tych platform [6].

Powyższe badania dość jednoznacznie wskazują na potrzebę uzupełnienia aktualnie stosowanych metod IHC i FISH w diagnostyce rearanżacji genu *ALK* o czułe testy molekularne, umożliwiające pogłębioną analizę różnicującą warianty fuzyjne. W przeciwieństwie do wspomnianej wcześniej metody RT-qPCR metoda NGS oferuje o wiele szerszy panel wykrywanych wariantów fuzyjnych (w praktyce można identyfikować wszystkie warianty) oraz pozwala na interpretację wyników w kontekście ilościowym (odsetek transkryptów fuzyjnych w mieszaninie całkowitego RNA), co również może mieć znaczenie kliniczne w prognozowaniu odpowiedzi na leczenie.

Jednym z kluczowych czynników warunkujących skuteczność metody NGS w analizie zaburzeń genetycznych jest jakość materiału genetycznego (stopień integralności RNA, RIN > 7), izolowanego z preparatów FFPE, na którą bezpośredni wpływ mają czas utrwalania tkanki, rodzaj użytych utrwalaczy chemicznych oraz odpowiednie zabezpieczenie oczyszczonego RNA przed degradującym działaniem RNaz. Zastosowanie metody NGS w analizie rearanżacji genów wymaga zatem gruntownej optymalizacji całego algorytmu diagnostycznego, ze szczególnym uwzględnieniem fazy przedanalizacyjnej.

Metoda FISH przez długi czas uznawana była za „złoty standard” w diagnostyce rearanżacji genu *ALK*, chociażby z uwagi na protokoły włączania chorych do badań klinicznych pod kątem rejestracji kryzotynibu czy inhibitorów drugiej generacji (certynibu, alektynibu) oraz brak alternatywnych technik diagnostycznych o nie gorszej czułości i specyficzności (IHC i RT-qPCR jako metody uzupełniające). Wobec wysokiego, blisko 35-procentowego odsetka wyników fałszywie ujemnych w metodzie FISH wdrożenie NGS do rutynowej diagnostyki molekularnej raka płuca wydaje się klinicznie i ekonomicznie uzasadnione.

Analiza pozakomórkowego DNA we krwi chorych na raka płuca metodą NGS

Badanie tkanki nowotworowej nadal pozostaje złotym standardem w klinicznej diagnostyce molekularnej raka płuca. Diagnostyka oparta na materiale tkankowym jest jednak obciążona szeregiem ograniczeń, które w istotny sposób wpływają na skuteczność stosowanych metod molekularnych. Przede wszystkim biopsja to inwazyjny zabieg pozyskania próbek tkanki, a pobrany materiał zwykle reprezentuje tylko jedno umiejscowienie nowotworu, co nie pozwala ocenić genetycznych zmian odległych przerzutów. Ponadto heterogenność komórkowa i molekularna tkanki nowotworowej znacząco obniża czułość badania molekularnego. W dobie rozwoju terapii personalizowanej konieczna jest zarówno wiarygodna analiza zaburzeń genetycznych o znaczeniu predykcyjnym

Rodzaj materiału diagnostycznego	Tkanka nowotworowa utrwalona w parafinie (FFPE)
Zastosowanie diagnostyczne	Detekcja somatycznych zaburzeń genetycznych
Identyfikowane zaburzenia	Ponad 70 wariantów fuzyjnych genów <i>ALK</i> , <i>RET</i> , <i>ROS1</i> , <i>NTRK1</i>
Rodzaj analizy molekularnej	Analiza transkryptów mRNA genów fuzyjnych
Konstrukcja testu	83 pary starterów o unikalnych sekwencjach w pojedynczej mieszaninie 85 amplikonów w średniej długości 136 par zasad
Minimalna ilość RNA w próbce	10 ng całkowitego RNA
Czułość testu	Detekcja 1% transkryptów fuzyjnych w mieszaninie całkowitego RNA
Zalecana procedura	Jednoczesna analiza 16 prób na Ion 318 Chip przy co najmniej 20 000 odczytów na bibliotekę

Tab. 3. Charakterystyka testu NGS do analizy transkryptów mRNA genów fuzyjnych *ALK*, *RET*, *ROS1* na przykładzie zestawu Ion AmpliSeq RNA Fusion Lung Cancer Research Panel firmy LifeTechnologies (ThermoFisherScientific).

Zestaw odczynnikowy jest przeznaczony do badania RNA izolowanego ze skrawków tkanki nowotworowej zatopionej w bloczku parafinowym (FFPE), uzyskanej od chorych na raka płuca, na sekwencjonatorach Ion Torrent Life Technologies (opracowano na podstawie broszury handlowej ThermoFisherScientific).

w pierwotnym materiale nowotworowym, uzyskanym od chorego przed wdrożeniem leczenia, jak i monitorowanie statusu szeregu zmian molekularnych warunkujących oporność na leczenie celowane. W praktyce klinicznej wykonanie powtórnej biopsji choremu z progresją raka płuca, w celu pogłębionej analizy molekularnej, jest często trudne, chociażby ze względu na inwazyjność zabiegu.

Analiza pozakomórkowego DNA krążącego w krwiobiegu (ang. *cell-free DNA*, *free-circulating DNA*) chorego na nowotwór jest obecnie wdrażana do diagnostyki molekularnej raka płuca jako alternatywa dla badania tkanki nowotworowej, przede wszystkim w tych przypadkach, gdy tradycyjna biopsja nie jest możliwa lub pozyskany tą drogą materiał tkankowy jest z różnych

przyczyn nieadekwatny do badania. Analiza krwi obwodowej i obecnego w niej materiału genetycznego, pochodzącego bezpośrednio z komórek nowotworu, jako tzw. płynnej biopsji (ang. *liquid biopsy*), oferuje szereg korzyści, które zadecydowały o szerokim zainteresowaniu tym tematem na całym świecie pod kątem oceny potencjalnych aplikacji klinicznych. Oprócz oczywistych zalet – minimalnej inwazyjności, ogólnej dostępności i powtarzalności zabiegu pobrania krwi – płynna biopsja dostarcza DNA pochodzące z różnych lokalizacji ognisk nowotworowych (z guza pierwotnego, z odległych przerzutów, z krążących we krwi mikroprzerzutów) oraz różnych klonów komórek rakowych, natomiast pomija problem heterogenności tkanki nowotworowej. Należy także podkreślić, że pozakomórkowe DNA uwalniane jest przez komórki nowotworowe w sposób ciągły, co zapewnia dostateczną ilość materiału genetycznego do analiz molekularnych przez cały okres rozwoju choroby nowotworowej. Niestety, nie da się jednoznacznie określić, jaki procent w całkowitej mieszance pozakomórkowego DNA stanowią fragmenty pochodzące bezpośrednio z komórek nowotworu (frakcja ctDNA – ang. *circulating tumor DNA*), a jaki fragmenty uwolnione przez komórki prawidłowe. W przypadku diagnostyki mutacji genu *EGFR* chorzy na NDRP z dodatnim wynikiem badania płynnej biopsji odnoszą podobne korzyści kliniczne z leczenia inhibitorami jak ci kwalifikowani na podstawie badania tkanki.

Technologie NGS już na obecnym etapie rozwoju umożliwiają skuteczną analizę pozakomórkowego DNA z krwi chorych na raka płuca pod kątem szeregu zaburzeń genetycznych o potwierdzonym bądź potencjalnym znaczeniu klinicznym, m.in. mutacji genów, hipermetylacji, zmian liczby kopii genu (CNV) itd. Dostępne są komercyjne zestawy odczynnikowe o podwyższonej czułości detekcji (w zakresie 0,1–0,01% zmutowanego allelu), przeznaczone do analizy pozakomórkowego DNA na konkretnych platformach NGS. Badania ostatnich lat wykazały bardzo wysoką zgodność (60–95%) profili zaburzeń genetycznych oznaczanych metodą NGS w preparatach tkanki nowotworowej i próbach krwi od tych samych chorych. Przewagą metody NGS nad testami opartymi na *real-time PCR* jest możliwość identyfikowania nie jedynie tych zdefiniowanych, lecz wszystkich zmian w obrębie genu, szczególnie rzadkich mutacji genu *EGFR*, które nie są wykrywane technikami podstawowymi (np. mutacji C797S, warunkującej oporność na leczenie ozymertynibem).

W 2016 roku zespół amerykańskich naukowców przeprowadził porównawczą analizę mutacji 70 genów w pozakomórkowym DNA z krwi oraz materiałach tkankowych od 102 chorych na raka płuca, wykorzystując

metodę NGS (*targeted DNA sequencing*). W sumie w płynnej biopsji wykryto 275 zmian w sekwencji 45 genów, z czego 86 (84%) chorych prezentowało przynajmniej jedno zaburzenie genetyczne w pozakomórkowym DNA. Najczęściej obserwowane były mutacje genu *EGFR*; zidentyfikowano 50 mutacji o charakterze aktywującym i 12 mutacji warunkujących oporność. Dodatkowo wykryto zmiany w sekwencjach 22 genów, dla których obecnie rozwijane są nowe terapie ukierunkowane molekularnie. Co ciekawe, sekwencjonowanie DNA z materiału tkankowego powiodło się zaledwie u 50 chorych (49%). Ogólna zgodność dla mutacji *EGFR* wykrytych w tkance i krwi wyniosła 79%, co potwierdza dużą wartość diagnostyczną płynnej biopsji [7].

W badaniu oceniającym skuteczność NGS w analizie wariantów fuzyjnych genu *ALK* w pozakomórkowym DNA od 24 chorych z potwierdzonym uprzednio zaburzeniem w tkance ogólna czułość, specyficzność i precyzja wyniosły odpowiednio 54,2%, 100% i 71,8%. Wyższą czułość (64,7%) osiągnięto w grupie chorych z odległymi przerzutami (M1b). Pomimo nielicznej grupy metoda NGS umożliwiła wykrycie dwóch rzadkich wariantów fuzyjnych: *FAM179A-ALK* oraz *COL25A1-ALK* [8].

W największym jak dotąd badaniu pozakomórkowego DNA metodą NGS przebadano krew od ponad 5 tys. chorych na NDRP, pobraną w celu kwalifikacji do terapii celowanej (15% przypadków) lub w czasie progresji choroby (85% przypadków), z uwagi na brak dostępności odpowiedniego materiału tkankowego. Zaburzenia somatyczne o charakterze mutacji lub rearanżacji genów wykryto u 86% chorych (najczęstsze mutacje *EGFR* – 25% i mutacje *KRAS* – 17%). Co istotne, u 1111 chorych w czasie progresji po leczeniu inhibitorami kinazy tyrozynowej *EGFR* wykryto szereg zaburzeń genetycznych identyfikujących mechanizm nabytej oporności z częstością zbliżoną do tej obserwowanej w badaniach tkanki: mutacja T790M – 47% przypadków, amplifikacja *MET* – 5%, amplifikacja *ERBB2* – 5%, fuzje genu *FGFR3* – 0,4%, fuzje *ALK* – 1%, mutacje *BRAF* – 1,8%, inaktywacja *PTEN* – 2,5%, inaktywacja *NF1* – 3%, mutacje *KRAS* – 1,9% [9].

Powyższe przykłady dowodzą możliwości i zasadności wykorzystania metody NGS w diagnostyce molekularnej raka płuca opartej na krwi obwodowej. Należy jednak mieć na uwadze wciąż pionierski charakter tych badań oraz ogromne doświadczenie naukowców w pracy z technikami NGS, które jest konieczne do osiągnięcia tak spektakularnych wyników. Biorąc pod uwagę tempo rozwoju technik NGS, można oczekiwać, że podobne rozwiązania, walidowane pod kątem diagnostyki molekularnej chorób nowotworowych z płynnej biopsji, staną się dostępne komercyjnie w perspektywie kilku najbliższych lat.

Analiza eksomu w ocenie obciążenia mutacyjnego jako czynnika predykcyjnego dla immunoterapii raka płuca

Postęp badań naukowych nad lepszym zrozumieniem mechanizmów odpowiedzi immunologicznej skierowanej przeciwko komórkom nowotworu zaowocował w ostatnich latach rozwojem nowej strategii leczenia zaawansowanego NDRP – immunoterapii opartej na inhibitorach immunologicznych punktów kontrolnych (ang. *immune checkpoint inhibitors*). Leki te specyficznie blokują szlaki sygnałowe pozostające pod kontrolą białka receptorowego PD-1 (ang. *programmed cell death protein-1*) i jego ligandu PD-L1 (ang. *programmed cell death ligand-1*). Badania kliniczne inhibitorów PD-1/PD-L1 wykazały skuteczność tych leków u chorych na zaawansowane postaci NDRP.

Obecnie w Unii Europejskiej dostępne są trzy leki z grupy inhibitorów immunologicznych punktów kontrolnych: niwolumab i pembrolizumab (inhibitory receptora PD-1 znajdującego się na komórkach immunologicznie kompetentnych) oraz atezolizumab (blokujący ligand dla receptora PD-1, zlokalizowany na komórkach nowotworowych). Stosowanie niwolumabu w krajach UE jest możliwe w grupie chorych na NDRP w II linii leczenia, po niepowodzeniu chemioterapii I linii, bez względu na wynik ekspresji PD-L1, ocenianej immunohistochemicznie na komórkach raka. Z kolei pembrolizumab może być podawany zarówno w I, jak i II linii leczenia w grupie chorych z zaawansowaną postacią NDRP, u których stwierdza się ekspresję PD-L1 w ponad 50% komórek w kwalifikacji do I linii leczenia, natomiast w ponad 1% komórek raka w II linii. Atezolizumab oczekuje obecnie na rejestrację w UE i jest przeznaczony do leczenia II linii u chorych na NDRP, niezależnie od ekspresji PD-L1.

Wobec kontrowersji związanych z efektywnością rokowania odpowiedzi chorych na immunoterapię jedynie na podstawie badań ekspresji PD-L1 na komórkach nowotworu i/lub immunologicznie kompetentnych oraz problemów wynikających ze stosowania różnych testów, dotyczących poszczególnych leków, przy ograniczonej ilości materiału diagnostycznego, nadal poszukuje się dodatkowych biomarkerów predykcyjnych dla tej strategii leczenia raka płuca. Wśród badanych kandydatów są m.in. ekspresja PD-L1 na komórkach układu immunologicznego chorego (limfocytach T, komórkach dendrytycznych, makrofagach), markery aktywacji układu immunologicznego oraz ogólne obciążenie nowotworu mutacjami somatycznymi (ang. *total mutational load*, TML; *total mutational burden*, TMB).

Badania kliniczne wykazały, że czerniak oraz niedrobnokomórkowy rak płuca należą do nowotworów o naj-

wyższym wskaźniku obciążenia mutacjami somatycznymi, co z kolei istotnie koreluje z odsetkiem odpowiedzi na immunoterapię w tych nowotworach. Analiza materiału nowotworowego, najczęściej w postaci FFPE lub cytobloku, pod kątem obciążenia mutacjami somatycznymi wymaga zaprzęgnięcia jednej z technik NGS – sekwencjonowania całego eksomu (WES). Eksomem nazywamy tę część genomu ludzkiego, na którą składają się wyłącznie sekwencje eksonów, a więc fragmenty genów, które kodują białka i ulegają transkrypcji do mRNA. Ludzki eksom składa się z około 180 tys. eksonów długości około 30 mln par zasad (30 Mb), co stanowi zaledwie 1% całkowitego genomowego DNA. Sekwencjonowanie DNA metodą WES pozwala zidentyfikować te zaburzenia genetyczne (mutacje), które mają bezpośredni wpływ na strukturę i funkcjonowanie białek, stanowiących nową klasę neoantygenów nowotworowych. Zwykle wskaźnik całkowitego obciążenia mutacjami somatycznymi (TMB) oblicza się jako liczbę wykrytych zaburzeń genetycznych na 1 mln par zasad całego genomu (liczba mutacji/Mb genomu). Z uwagi na duży stopień skomplikowania całej procedury analitycznej, a zwłaszcza bioinformatycznej analizy wyników, ostatnio zaproponowano uproszczony schemat oceny TMB poprzez sekwencjonowanie mniejszej liczby (230–315) wyselekcjonowanych genów. Wskaźnik TMB obliczony uproszczoną metodą nadal doskonale korelował z wynikami badania metodą WES [10].

W badaniu amerykańskim na grupie 64 chorych na NDRP leczonych inhibitorami PD-1/PD-L1 (niwolumab, pembrolizumab, awelumab) wykazano istotne różnice w medianie czasu leczenia zależnie od wskaźnika TMB: 17 tygodni dla TMB < 15 i 64 tygodnie dla TMB ≥ 15 (HR = 0,396; 95% CI: 0,190–0,825; $P = 0,010$) [11]. W innym badaniu wyższy wskaźnik TMB istotnie korelował z odpowiedzią na leczenie pembrolizumabem w grupie 16 chorych na NDRP. Mediana liczby mutacji u chorych prezentujących częściową lub stabilną odpowiedź na leczenie (powyżej 6 miesięcy) wynosiła 302, w przeciwieństwie do 148 mutacji wykrywanych przeciętnie u chorych nieodpowiadających na immunoterapię ($p = 0,02$). Mediana czasu przeżycia wolnego od progresji w pierwszej grupie wynosiła 14,5 miesiąca, w drugiej – 3,7 miesiąca ($P = 0,01$; HR = 0,19; 95% CI: 0,05–0,70).

Skuteczność immunoterapii powiązano również w istotny sposób ze statusem palenia chorego, liczbą zidentyfikowanych neoantygenów oraz określonymi mutacjami w szlakach naprawy DNA [12].

Wyniki prezentujące skuteczność analizy obciążenia mutacjami somatycznymi jako markera predykcyjnego dla immunoterapii NDRP nadal wymagają potwierdzenia w badaniach prospektywnych na większych gru-

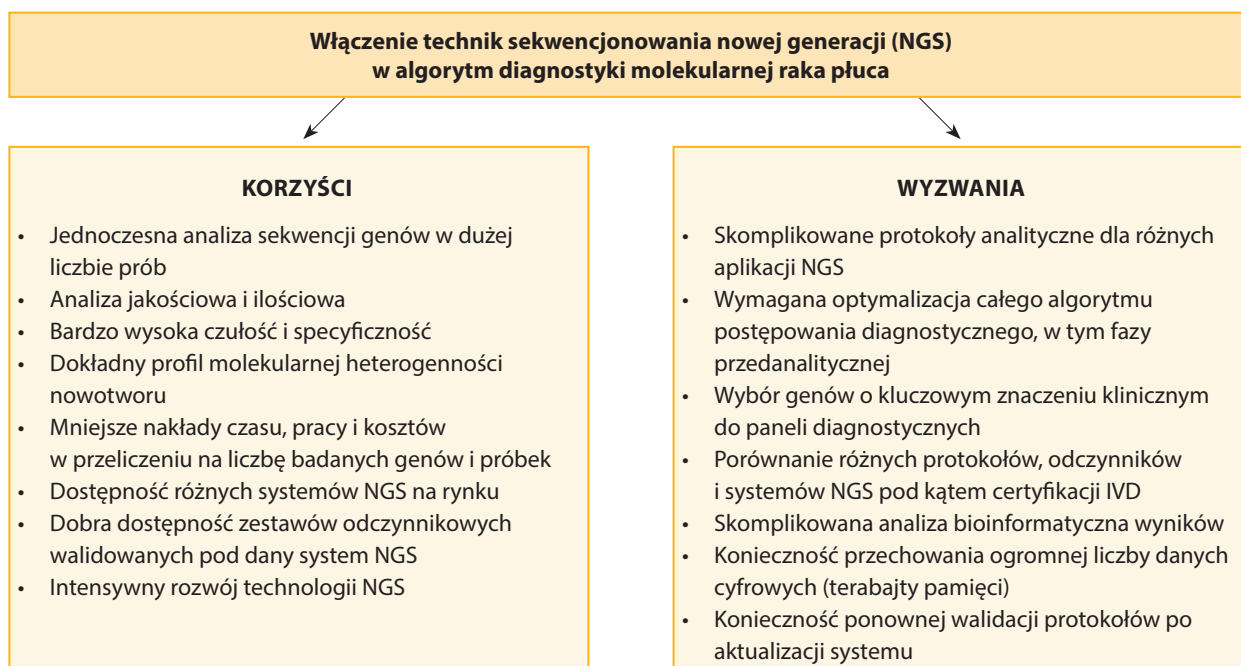
pach chorych. Jednak już dziś widać ogromny potencjał drżemiący w wykorzystaniu technik NGS w profilowaniu molekularnych zaburzeń nowotworu i identyfikowaniu tych o kluczowym znaczeniu dla powodzenia danej strategii leczenia.

Przyszłość metod NGS w diagnostyce molekularnej raka płuca

Sukces technologii NGS w badaniach podstawowych nad molekularną patogenezą raka płuca przez niemal dekadę nie zdołał przełożyć się na powszechne wykorzystanie tej metody w diagnostyce onkologicznej. Można śmiało stwierdzić, że powszechne wprowadzenie metody NGS do laboratoriów diagnostycznych nadal ma tylu zwolenników, co przeciwników. Obydwie strony prezentują jednak różne punkty widzenia i argumenty, których nie da się porównać w sposób jednoznaczny. Oprócz oczywistych korzyści klinicznych, opisanych powyżej, płynących z wykorzystania NGS w diagnostyce molekularnej NDRP, występuje także szereg nierozwiązanych kwestii ekonomicznych, organizacyjnych, prawnych, a nawet etycznych (ryc. 3). Jednym z najważniejszych argumentów przeciwników diagnostyki onkologicznej opartej na metodzie NGS jest bardzo wysoki koszt aparatury, odczynników oraz infrastruktury koniecznej do utrzymania i konserwacji systemu. Obliczeń ekonomicznych należy jednak dokonywać na podstawie

maksymalnej mocy przerobowej systemu NGS, która nakazuje podzielić ogólne koszty przez liczbę badanych prób i liczbę identyfikowanych zaburzeń genetycznych o znaczeniu klinicznym. Okaże się, że NGS jest metodą o wiele bardziej opłacalną niż szereg metod podstawowych, ale tylko w laboratorium o dużej liczbie zleceń na badania molekularne w ciągu roku. Opracowanie i wprowadzenie nowych leków dla ukierunkowanych molekularnie terapii chorych na NDRP spowoduje jednak w przyszłości konieczność oznaczania większej liczby markerów genetycznych, a tym samym wymusi stosowanie metod o wysokiej przepustowości.

Nadal dużym problemem pozostaną jednak kwestie związane z analizą wyników NGS, zarządzaniem bazami o ogromnej liczbie danych oraz ich awiololetnim przechowywaniem. Obecnie analiza surowych danych z sekwencjonowania eksomu czy genomu wymaga pracy wyspecjalizowanego bioinformatyka. Pomijając koszty wynagrodzenia takiego pracownika, należy zwrócić uwagę na wciąż małą liczbę specjalistów w zakresie bioinformatyki na rynku pracy, która aktualnie mogłaby nie wystarczyć do zapewnienia sprawnej diagnostyki molekularnej w skali kraju, gdyby metoda NGS już dziś stała się narzędziem powszechnie stosowanym. Obecnie pewnym rozwiązaniem tych kwestii byłoby wdrożenie systemu o średniej przepustowości, przeznaczonego do analizy panelu zaburzeń genetycznych o faktycznie



Ryc. 3. Porównanie najważniejszych korzyści i ograniczeń związanych z wykorzystywaniem technologii NGS w diagnostyce molekularnej raka płuca

potwierdzonym znaczeniu klinicznym (dostępne terapie celowane), który nie wymagałby specjalistycznej wiedzy bioinformatycznej, a umożliwiałby jednoznaczną weryfikację danych pod kątem wydania wyniku badania diagnostycznego. System GeneRead Sequencing firmy Qiagen, wprowadzony na rynek w 2016 roku, jest pierwszą próbą stworzenia systemu NGS dostosowanego typowo do potrzeb diagnostyki molekularnej. Nowatorskie podejście do postulowanych problemów polega tu przede wszystkim na zaproponowaniu klientowi systemu kompletnego, obejmującego cały proces analizy NGS: poczynając od zautomatyzowanej izolacji DNA, poprzez wydajne sekwencjonowanie kilkunastu–kilkudziesięciu onkogenów, a na automatycznej analizie danych kończąc, i który uda się zwalidować pod kątem certyfikatu IVD. Należy pamiętać, że w przypadku każdej rewolucji, a taką niewątpliwie jest wprowadzenie technologii NGS do szeroko pojętej onkologii, skutki można ocenić dopiero z perspektywy lat. Wydaje się, że właśnie podążanie przemysłu biotechnologicznego za potrzebami sektora medycznego jest najlepszym kierunkiem w tej rewolucji, w której ostatecznym wygranym będzie pacjent.



Adres do korespondencji

Dr n. med. Adam Szpechciński

Zakład Genetyki i Immunologii Klinicznej
Instytut Gruźlicy i Chorób Płuc
ul. Płocka 26, 01-138 Warszawa
tel.: 22 431 21 58
a.szpehcinski@igichp.edu.pl

Piśmiennictwo

1. Lim SM, Kim EY, Kim HR et al. Genomic profiling of lung adenocarcinoma patients reveals therapeutic targets and confers clinical benefit when standard molecular testing is negative. *Oncotarget* 2016; 7(17): 24172–24178.
2. Scarpa A, Sikora K, Fassan M et al. Molecular typing of lung adenocarcinoma on cytological samples using a multigene next generation sequencing panel. *PLoS One* 2013; 8(11): e80478.
3. Yoshida T, Oya Y, Tanaka K et al. Differential crizotinib response duration among ALK fusion variants in ALK-positive non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2016; 34(28): 3383–3389.
4. Dacic S, Villaruz LC, Abberbock S et al. ALK FISH patterns and the detection of ALK fusions by next generation sequencing in lung adenocarcinoma. *Oncotarget* 2016; 7(50): 82943–82952.
5. Ali SM, Hensing T, Schrock AB et al. Comprehensive genomic profiling identifies a subset of crizotinib-responsive ALK-rearranged non-small cell lung cancer not detected by fluorescence in situ hybridization. *Oncologist* 2016; 21(6): 762–770.
6. Rogers TM, Arnau GM, Ryland GL et al. Multiplexed transcriptome analysis to detect ALK, ROS1 and RET rearrangements in lung cancer. *Sci Rep* 2017; 7: 42259.
7. Thompson JC, Yee SS, Troxel AB et al. Detection of therapeutically targetable driver and resistance mutations in lung cancer patients by next-generation sequencing of cell-free circulating tumor DNA. *Clin Cancer Res* 2016; 22(23): 5772–5782.
8. Cui S, Zhang W, Xiong L et al. Use of capture-based next-generation sequencing to detect ALK fusion in plasma cell-free DNA of patients with non-small-cell lung cancer. *Oncotarget* 2017; 8(2): 2771–2780.
9. Mack PC, Banks KC, Zill OA et al. Plasma next generation sequencing of over 5,000 advanced non-small cell lung cancer patients with clinical correlations. *J Thorac Oncol* 2016; 11(10S): S168–S169.
10. Johnson DB, Frampton GM, Rioth MJ et al. Hybrid capture-based next-generation sequencing (HC NGS) in melanoma to identify markers of response to anti-PD-1/PD-L1. *J Clin Oncol* 2016; 34 (suppl.): abstr. 105.
11. Spigel DR, Betzig Schrock A, Fabrizio D et al. Total mutation burden (TMB) in lung cancer (LC) and relationship with response to PD-1/PD-L1 targeted therapies. *J Clin Oncol* 2016; 34 (suppl.): abstr. 9017.
12. Rizvi NA, Hellmann MD, Snyder A et al. Cancer immunology. Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer. *Science* 2015; 348(6230): 124–128.
13. Chorostowska-Wynimko J, Szpehcinski A. The impact of genetic markers on the diagnosis of lung cancer: a current perspective. *J Thorac Oncol* 2007; 2(11): 1044–1051.

14. Skronski M, Chorostowska-Wynimko J, Szczepulska E et al. Reliable detection of rare mutations in EGFR gene codon L858 by PNA-LNA PCR clamp in non-small cell lung cancer. *Adv Exp Med Biol* 2013; 756: 321–331.
15. Skroński M, Szpechciński A, Chorostowska-Wynimko J. Współczesne metody wykrywania mutacji genu EGFR jako czynnika predykcyjnego dla terapii ukierunkowanej molekularnie chorych na niedrobnokomórkowego raka płuca – czy istnieje „złoty standard” diagnostyczny? *Pneumonol Alergol Pol* 2014; 82(3): 311–322.
16. Sabour L, Sabour M, Ghorbian S. Clinical applications of next-generation sequencing in cancer diagnosis. *Pathol Oncol Res* 2017; 23(2): 225–234.
17. Shen T, Pajaro-Van de Stadt SH, Yeat NC et al. Clinical applications of next generation sequencing in cancer: from panels, to exomes, to genomes. *Front Genet* 2015; 6: 215.
18. Kamps R, Brandão RD, Bosch BJ et al. Next-generation sequencing in oncology: genetic diagnosis, risk prediction and cancer classification. *Int J Mol Sci* 2017; 18(2): pii: E308.
19. Tipu HN, Shabbir A. Evolution of DNA sequencing. *J Coll Physicians Surg Pak* 2015; 25(3): 210–215.
20. Xuan J, Yu Y, Qing T et al. Next-generation sequencing in the clinic: promises and challenges. *Cancer Lett* 2013; 340(2): 284–295.
21. Piątkowski J, Skalniak A, Bodzioch M et al. Wprowadzenie do sekwencjonowania ludzkiego genomu w diagnostyce. *Przegląd Lekarski* 2013; 70(7): 458–462.
22. Szpechcinski A, Chorostowska-Wynimko J, Kupis W et al. Quantitative analysis of free-circulating DNA in plasma of patients with resectable NSCLC. *Expert Opin Biol Ther* 2012; 12 (suppl. 1): S3–S9.