

BADANIE MOLEKULARNYCH MARKERÓW WYKORZYSTYWANYCH W LECZENIU CHORYCH NA RAKA JELITA GRUBEGO

PAWEŁ DOMAGAŁA¹, ARTUR KOWALIK²

¹Zakład Patomorfologii, Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie

²Zakład Diagnostyki Molekularnej, Świętokrzyskie Centrum Onkologii w Kielcach

1. Wstęp

Terapia spersonalizowana, tzn. skrojona na miarę i potrzeby konkretnego pacjenta, stanowi ideał, do którego dąży współczesne leczenie nowotworów. Rak jelita grubego jest jednym z czterech raków, obok raka sutka, żołądka i płuca, w których do praktyki klinicznej wprowadzono udane próby terapii celowanej. Aby taka terapia była skuteczna, powinna być dostosowana do tego i tylko do tego unikalnego nowotworu, który występuje u danego pacjenta. Inaczej mówiąc, powinna to być terapia precyzyjnie celowana, a ona wymaga oceny markerów predykcyjnych, takich jak mutacje, amplifikacje lub białka (białka receptorowe lub inne białka, które odgrywają istotną rolę w procesach: proliferacji, apoptozy, angiogenezy, inwazji i migracji komórek nowotworowych lub naprawy uszkodzonego DNA). Wyniki oceny tych markerów stanowią integralny element rozpoznania histopatologicznego, ponieważ tylko pacjenci, których nowotwory będą wykazywały obecność pewnych czynników predykcyjnych, mogą odnieść korzyści z leczenia celowanego. Terapia celowana wymaga precyzyjnej diagnostyki opartej na testach diagnostycznych wykorzystujących materiał tkankowy i to materiał utrwalony w formalinie i zatopiony w parafinie, jeżeli mają mieć rutynowe zastosowanie kliniczne. Od współczesnego patologa wymaga się, aby rozpoznanie raka jelita grubego zawierało ocenę odpowiednich markerów predykcyjnych, co pozwala na identyfikację chorych, którzy mogą odnieść korzyści z leczenia celowanego. Rutynowy test predykcyjny powinien być względnie prosty w wykonaniu, szybki, niezbyt drogi oraz charakteryzować się wysoką czułością i specyficznością [1].

Dotychczas sposób leczenia nowotworów wyznaczały typ histologiczny, stopień histologicznej złośliwości i stadium klinicznego zaawansowania choroby. Jednak cechy mikroskopowe nowotworów, szczegól-

nie w raku jelita grubego, chociaż mogą mieć znaczenie prognostyczne, nie mają niestety znaczenia predykcyjnego. Wprowadzenie terapii celowanej do pewnego stopnia zrewolucjonizowało diagnostykę histopatologiczną nowotworów, ponieważ terapeuta oczekuje precyzyjnej informacji predykcyjnej. Zagadnienie to jest jeszcze nieco bardziej skomplikowane, ponieważ może się zdarzyć, że dany nowotwór wykazuje ekspresję kilku markerów predykcyjnych i wtedy odpowiednie opcje terapeutyczne są dostępne tylko dla pacjentów z takimi nowotworami [2, 3]. A zatem scharakteryzowanie nowotworu pod względem znanych markerów predykcyjnych umożliwia zastosowanie opcji terapeutycznych, które są dostępne tylko dla pacjenta z danym nowotworem (nawet jeżeli odsetek takich nowotworów w ogólnej populacji jest niewielki) [4]. W erze terapii spersonalizowanej, aby uniknąć nadmiernej toksyczności leczenia, pacjent ma prawo oczekiwać, że stosowane leczenie będzie odpowiednie do statusu molekularnego jego nowotworu. Aby takie leczenie było możliwe, potrzebna jest precyzyjna ocena celów terapii. W raku jelita grubego dla oceny celów predykcyjnych wykorzystuje się markery molekularne (np. mutacje w genach *KRAS*, *NRAS*, *BRAF*, *PIK3CA*) [1, 5–7] i immunohistochemiczne (np. białka TS, P21, PTEN) [8–12]. Markery molekularne w raku jelita grubego można podzielić na mutacje somatyczne i niestabilność mikrosatelitarną (*microsatellite instability* – MSI).

2. Mutacje somatyczne

2.1. *KRAS*

Ocena mutacji w *KRAS* jest przykładem zastosowania testu molekularnego potrzebnego do wprowadzenia terapii celowanej w określonej grupie chorych, w tym przypadku chorych na raka jelita grubego z przerzutami. Współcześnie stanowi ona badanie rutynowe niezbędne do podjęcia decyzji w leczeniu tej grupy chorych.

2.1.1. Ścieżki sygnałowe związane z mutacją w *KRAS*

Gen *KRAS* koduje małe białko, które bierze udział w aktywacji kaskady ścieżek sygnałowych, w tym ścieżki sygnałowej receptora dla naskórkowego czynnika wzrostu (*epidermal growth factor receptor* – EGFR), która jest uważana za podstawową w regulacji proliferacji, wzrostu i transformacji nowotworowej komórek nabłonkowych [13]. Białko RAS funkcjonuje jako przekaźnik sygnału od aktywowanego EGFR. Aktywacja EGFR (przez połączenie z jego ligandem) prowadzi do aktywacji ścieżek sygnałowych RAS/RAF/MAPK i PI3K/AKT, a następnie do wzmożonej proliferacji i zahamowania apoptozy komórek nowotworowych [14]. Zastosowanie monoclonalnych przeciwciał przeciw EGFR (mAb anty-EGFR), takich jak cetuksimab i panitumumab, powoduje, że w komórkach raka jelita grubego bez mutacji w RAS uniemożliwione zostaje połączenie EGFR z jego ligandem i w następstwie dochodzi do inaktywacji ww. ścieżek sygnałowych i do apoptozy komórek rakowych. W komórkach prawidłowych białko RAS oscyluje między stanem aktywnym (RAS-GTP) a nieaktywnym (RAS-GDP). W wyniku mutacji w RAS powstaje kodowane przez zmutowany gen białko, które ze względu na utrudnioną hydrolizę ciągle pozostaje w postaci aktywnej (RAS-GTP). W komórkach z mutacją w *KRAS* dochodzi zatem do konstytutywnej (permanentnej) aktywacji ścieżek sygnałowych RAS/RAF/MAPK i PI3K/AKT i ciągłego przekazywania sygnału indukującego mitogenezę, niezależnie od tego, czy receptor EGF jest aktywowany, czy też nie [15].

2.1.2. Przesłanki kliniczne

W związku z powyższym, leczenie chorych na raka jelita grubego z przerzutami, w którym stwierdza się mutacje *KRAS* za pomocą mAb anty-EGFR rozpoznających i inaktywujących zewnątrzkomórkową domenę EGFR, jest nieskuteczne (badania kliniczne II i III fazy) [16–18]. Na podstawie opublikowanych wyników 5 kontrolowanych badań klinicznych z randomizacją dotyczących stosowania cetuksimabu i panitumumabu oraz 5 badań retrospektywnych Amerykańskie Towarzystwo Onkologii Klinicznej (*American Society for Clinical Oncology* – ASCO) wydało w 2009 r. wstępny opinię, która precyzowała, że raki wszystkich pacjentów z rakami jelita grubego z przerzutami, którzy są kandydatami do terapii anty-EGFR, powinny być testowane w akredytowanych laboratoriach na obecność mutacji w *KRAS* i jeżeli stwierdza się mutacje w kodonie 12 lub 13 eksonu 2, pacjenci ci nie powinni otrzymać tego rodzaju leczenia [16]. Odpowiednia selekcja pacjentów z rakiem jelita grubego z przerzutami do terapii za pomocą mAb anty-EGFR ma istotne znaczenie, ponieważ ten rodzaj leczenia może powodować poważne powikłania oraz oporność

po kilku miesiącach stosowania, a także jest bardzo kosztowny [19].

2.1.3. Spektrum badanych mutacji

Analiza mutacji w *KRAS* pozwala stratyfikować chorych na raka jelita grubego z przerzutami do terapii za pomocą mAb anty-EGFR, a mutacje w *KRAS* stanowią **negatywny czynnik predykcyjny** dla tej terapii [20]. Mutacje w *KRAS* w raku jelita grubego najczęściej występują w kodonach 12, 13 eksonu 2 (w blisko 40% raków jelita grubego). Rzadziej spotyka się aktywujące mutacje *KRAS* w kodonach 59, 61, 117 i 146. Pierwotnie zarówno Europejska Agencja ds. Leków (*European Medicines Agency* – EMEA), jak i Amerykańska Agencja ds. Żywności i Leków (*Food and Drug Administration* – FDA) zaaprobowały stosowanie tej terapii tylko u chorych na raka jelita grubego z przerzutami bez mutacji w *KRAS*. W lipcu 2013 r. EMEA uaktualniła kryteria kwalifikacji do terapii anty-EGFR, wprowadzając obowiązkowe badanie nie tylko mutacji w eksonie 2 genu *KRAS*, lecz także w eksonach 3 i 4 *KRAS* oraz eksonach 2, 3 i 4 *NRAS*, ponieważ profile ekspresji genów i cechy kliniczno-patologiczne „nietypowych” rzadkich mutacji, a także przeżycie pacjentów z rakiem jelita grubego z przerzutami z tymi mutacjami są podobne do mutacji *KRAS* w kodonach 12 i 13 [21]. Pacjenci z tymi rzadkimi mutacjami w *KRAS* i *NRAS* będą niewrażliwi na leczenie anty-EGFR, do którego zostali zakwalifikowani tylko na podstawie braku mutacji w *KRAS* 12/13 [7]. Również wg opublikowanych w 2014 r. rekomendacji dla Wielkiej Brytanii [22] analiza mutacji w *KRAS* i *NRAS* jako czynnika predykcyjnego powinna obejmować mutacje w *KRAS* przynajmniej w kodonach 12, 13, 59, 61, 117 i 146 (eksony 2, 3 i 4), podobnie w *NRAS* (choćby autoryzacja nie rekomenduje na razie badania kodonów 117 i 146 w *NRAS* ze względu na brak wystarczających dowodów na kliniczne znaczenie tych mutacji).

Według szczegółowej metaanalizy 9 artykułów, obejmującej blisko 6000 pacjentów, przypuszczalnie ok. 53% raków jelita grubego (42% z mutacjami w eksonie 2 *KRAS* i 11% z mutacjami w eksonach 3 lub 4 *KRAS* lub 2, 3 i 4 *NRAS*) będzie opornych na leczenie za pomocą mAb anty-EGFR [7]. Ponadto stosowanie tego leczenia u chorych na raka jelita grubego z przerzutami i mutacjami w *KRAS* może nawet wpływać negatywnie na przeżycie pacjentów [23]. Na obecnym etapie badań nie wiadomo, czy efekty leczenia pacjentów z rakiem jelita grubego za pomocą mAb anty-EGFR (OS, DFS) zależą od typu mutacji w *KRAS* i *NRAS*. Uważa się, że obecność jakiegokolwiek mutacji w *KRAS* i *NRAS* stanowi przeciwwskazanie do terapii anty-EGFR, jednak zagadnienie to wymaga dalszych badań. Jednoznacznie wykazano natomiast, że efekty leczenia anty-EGFR zależą od metody zastosowanej do oceny mutacji *KRAS*.

Im czułość metody wykrywania mutacji *KRAS* jest wyższa, tym wyniki leczenia są lepsze [24–32].

2.1.4. Status *KRAS* jako czynnik predykcyjny

Ostatnio prowadzone są przedkliniczne i kliniczne badania nad zastosowaniem inhibitorów (inhibitory BRAF w rakach jelita grubego z przerzutami z mutacją w *BRAF*, inhibitory MEK i SEK, inhibitory transferazy farnesylowej), które mogą uczułać raka jelita grubego z przerzutami z mutacją w *KRAS* na działanie cetuksimabu [33]. Można więc powiedzieć, że **czynnikiem predykcyjnym jest nie tylko mutacja w *KRAS*, ale w ogóle status *KRAS***. Gdy mutacja nie występuje, chory na raka jelita grubego z przerzutami może być leczony cetuksimabem. Jeżeli stwierdza się mutację, możliwe są inne metody leczenia, analizowane obecnie w próbach przedklinicznych i klinicznych.

2.2. *NRAS*

Mutacje w *NRAS* są również czynnikiem predykcyjnym wskazującym na oporność na leczenie cetuksimabem [34, 35]. Z dotychczasowych badań wynika, że mutacje w *NRAS* występują w ok. 3–5% kolejnych raków jelita grubego (głównie są to mutacje w kodonie 61) [36, 37]. Związek tych mutacji z czynnikami kliniczno-patologicznymi znajduje się obecnie w fazie badań [38]. Tym niemniej, **ocena mutacji w *NRAS* w przypadkach, w których nie stwierdzono mutacji w *KRAS*, pozwala dokładniej wyselekcjonować chorych na raka jelita grubego z przerzutami do leczenia cetuksimabem [35]**. Podobnie jak w *BRAF*, mutacje w *NRAS* i *KRAS* wzajemnie się wykluczają [34, 39]. Od 2013 r. badanie mutacji w eksonach 2, 3 i 4 *NRAS* jest elementem rutynowego testu predykcyjnego w kwalifikacji pacjentów z rakiem jelita grubego z przerzutami do terapii anty-EGFR.

2.3. *BRAF*

BRAF to cytoplazmatyczna niereceptorowa kinaza serynowo-treoninowa. Uczestniczy w przekazywaniu sygnałów z zewnątrz komórki do jądra komórkowego w szlaku RAS/RAF/MAPK [40]. Jest to jedna z częściej zmutowanych kinaz w nowotworach. Najczęściej wykrywana jest mutacja c.1799T>A (p.V600E) w eksonie 15. W eksonie tym mogą również występować inne mutacje lokujące się w pobliżu kodonu 600. Zmutowane białko BRAF jest ciągle aktywne [40]. Częstość występowania mutacji jest zróżnicowana w różnych nowotworach. W przypadku czerniaka może dochodzić nawet do ok. 70% [40]. Bardzo często, w ok. 50–70% przypadków, mutacje w *BRAF* wykrywa się w rakach brodawkowatych tarczycy [41, 42]. Z kolei w rakach jelita grubego mutacje w *BRAF* stwierdza się w zależności od badanej populacji w ok.

5–20% przypadków [5, 43, 44]. Mutacje w genie *BRAF* korelują z subtypem molekularnym raka jelita grubego, który charakteryzuje się MSI i fenotypem zmutowanych wysp CpG (*CpG-island methylator phenotype* – CIMP) [45]. Zmutowane białko BRAF wykrywa się również w zmianach przednowotworowych. Bardzo rzadko wykrywa się mutacje w *BRAF* w gruczolakach (0,4%), natomiast znacznie częściej w gruczolakach zębkwanych (ok. 70–100%) [46, 47]. *BRAF* jako składnik szlaku RAS/RAF/MAPK oceniano jako czynnik prognostyczny i predykcyjny w raku jelita grubego. Mutacje w *BRAF* w raku jelita grubego są związane z niekorzystnym przebiegiem choroby, natomiast znaczenie predykcyjne *BRAF* nie jest jednoznaczne i jest ciągle intensywnie badane [43, 44].

2.4. *PIK3CA*

PI3K to lipidowe kinazy cytoplazmatyczne uczestniczące w przekazywaniu sygnału z białka RAS do wnętrza jądra komórkowego za pośrednictwem szlaku PI3K/AKT/PKB. Szlak odpowiada za blokowanie apoptozy oraz stymulację wzrostu i proliferacji komórek. Szlak ten podlega negatywnej regulacji przez białko PTEN. Utrata funkcjonowania PTEN poprzez mutacje może również prowadzić do aktywacji tego szlaku [48]. Gen *PIK3CA* koduje podjednostkę p110 α kinazy PI3K. Mutacje w *PIK3CA* występują w ok. 15–30% raków jelita grubego. Mutacje grupują się w *hot spotach* w eksonie 9 w kodonach E542K i E545K oraz w eksonie 20 w kodonie H1047R [49, 50]. Obecność mutacji w *PIK3CA* jest związana z niekorzystnym przebiegiem choroby, jak również z brakiem odpowiedzi na leczenie mAb anty-EGFR [50–52]. Siła prognostyczna i predykcyjna *PIK3CA* w raku jelita grubego zwiększa się, gdy jest on oceniany w kombinacji z ekspresją PTEN. Obecnie trwają intensywne badania dotyczące ich użyteczności klinicznej [53, 54].

2.5. Związek mutacji somatycznych z czynnikami kliniczno-patologicznymi

Określono specyficzne kliniczno-patologiczne i epidemiologiczne cechy związane z mutacjami w *KRAS* [55]. Stwierdzono związek lokalizacji raka jelita grubego oraz miejsca występowania przerzutów z obecnością mutacji w *KRAS*. U pacjentów z mutacjami w kodonach 12 i 13 występowało większe prawdopodobieństwo umiejscowienia raka jelita grubego prawostronnie w porównaniu z chorymi na raka jelita grubego bez mutacji *KRAS* [21]. Również mutacje w *BRAF* też mają związek z prawostronnym rakiem jelita grubego w porównaniu z nowotworami bez mutacji. Raki jelita grubego z mutacjami w *KRAS* (również z rzadkimi) częściej dają przerzuty do płuc w porównaniu z rakami jelita grubego bez tych mutacji.

3. Sygnatura genowej ekspresji *RAS* jako czynnik predykcyjny

Następstwem mutacji w *KRAS* lub *NRAS* jest permanentna aktywacja ścieżki sygnałowej *RAS* i ta informacja, jak wspomniano powyżej, została wykorzystana do selekcji chorych na raka jelita grubego z przerzutami do celowanego leczenia za pomocą mAb anti-EGFR. Trzeba sobie jednak zdawać sprawę z tego, że badanie mutacji w *KRAS* lub *NRAS* pozwala określić tylko jeden z wielu możliwych sposobów (mechanizmów) aktywacji *RAS*. Aktywowany *RAS* oddziałuje na ponad 20 białek efektorowych, które m.in. regulują proliferację i różnicowanie komórek [56]. Molekularna ścieżka sygnałowa *RAS* jest skomplikowaną siecią połączeń. Ścieżkę tę aktywuje nie tylko EGFR, lecz także szereg innych czynników wzrostu, takich jak np. receptor płytkopochodnego czynnika wzrostu (*platelet-derived growth factor receptor* – PDGFR), transformujący czynnik wzrostu α (*transforming growth factor α* – TGF- α), epiregulina, amfiregulina. Deregulacja elementów składowych tej ścieżki powyżej lub poniżej *RAS* może spowodować jej aktywację nawet bez mutacji w *RAS*, ponieważ mutacja jest tylko jednym z wielu sposobów aktywacji ścieżki *RAS*. Możliwość aktywacji *RAS* przez wiele mechanizmów utrudnia w znacznym stopniu precyzyjne określenie nowotworów z rzeczywiście aktywowanym *RAS*. Dlatego istotnym zagadnieniem jest wyselekcjonowanie tych nowotworów, które mają aktywną ścieżkę sygnałową *RAS* niezależnie od mechanizmu tej aktywacji (tzn. nie tylko przez mutacje w *KRAS* lub *NRAS*). W przeciwieństwie do oceny pojedynczych mutacji w *RAS*, zastosowanie sygnatury genowej ekspresji *RAS* pozwala mierzyć aktywację (lub jej brak) sieci ścieżek sygnałowych *RAS*. W badaniach na komórkach raka drobnokomórkowego płuc wykazano ostatnio, że zastosowanie kombinacji erlotinibu (inhibitor EGFR) i trametinibu (inhibitor MEK) blokuje dwa ramiona ścieżek sygnałowych aktywnego *RAS*, tzn. EGFR-RAS-RAF-ERK i EGFR-PI3K-AKT-RPS6, co prowadzi do apoptozy komórek nowotworowych. Z badań tych wynika, że pacjenci z wysoką aktywnością ścieżki sygnałowej *RAS* mogą być kandydatami do leczenia wspólnie inhibitorami EGFR i MEK [56].

Podsumowując, badanie mutacji pozwala określić tylko jeden z wielu możliwych sposobów (mechanizmów) aktywacji *RAS*, a genomowy marker (sygnatura genowa) określa aktywność całej ścieżki sygnałowej.

4. Niestabilność mikrosatelitarna jako marker predykcyjny

W patogenezie raka jelita grubego odgrywają ważną rolę zaburzenia różnych ścieżek molekularnych.

Większość raków jelita grubego powstaje na drodze niestabilności chromosomowej, ale w mniej więcej 15% sporadycznych raków jelita grubego oraz w zespole Lyncha stwierdza się inaktywację genów mutatorowych (*MLH1*, *MSH2*, *PMS2* i *MSH6*), co prowadzi do MSI [57]. Ocena MSI na podstawie wyizolowanego DNA jest procedurą dość skomplikowaną i kosztowną. Nowotwór wykazuje MSI, jeżeli określona w rekomendacjach Bethesda [58] liczba sekwencji mikrosatelitarnych uległa mutacji. Gdy nie ma mutacji w panelu mikrosatelitarnym, to guz uważa się za mikrosatelitarnie stabilny (MSS) [57]. Wśród sporadycznych raków jelita grubego z fenotypem mutatorowym większość (ok. 95%) wykazuje inaktywację *MLH1* (spowodowaną hipermetylacją promotora). Inaktywacja *MSH2* i *MSH6* występuje znacznie rzadziej (odpowiednio 5% i 1%) [59].

Niestabilność mikrosatelitarna jest markerem dobrego rokowania (czynnik prognostyczny), szczególnie w stadium II i III raka jelita grubego [60]. Przyczyny tego związku z dobrym rokowaniem nie zostały dokładnie poznane. Jedną z nich może być rzadkie występowanie mutacji *APC*, *TP53* i *KRAS* w rakach jelita grubego z MSI. Alternatywną hipotezą wyjaśniającą dobre rokowanie raka jelita grubego z MSI jest obecność masywnego nacieku guza przez limfocyty [61]. Wydatną aktywację przeciwnowotworowej odpowiedzi immunologicznej tłumaczy się produkowaniem dużej liczby swoistych dla nowotworu antygenów typu *frameshift* powstałych w wyniku niesprawności układu naprawy niesparowanych zasad DNA (*miss match repair* – MMR). Komórki nowotworowe opłaszczone takimi antygenami mogą silnie aktywować układ odpornościowy chorego [62]. Raki jelita grubego powstałe na drodze inaktywacji genów mutatorowych mają charakterystyczny obraz kliniczno-patologiczny: zwykle umiejscowione są proksymalnie, są rakami śluzotwórczymi z naciekiem limfocytarnym i odczynem zapalnym.

Status MSI jest uważany za **marker predykcyjny dla terapii opartej na 5-fluorouracylu**. Na etapie badań jest status MSI jako markera predykcyjnego terapii z wykorzystaniem inhibitorów topoizomerazy, inhibitorów PARP1 i inhibitorów ścieżki PI3K-AKT-mTOR. Wysoki stopień MSI znamionuje brak wrażliwości na terapię adiuwantową z zastosowaniem 5-fluorouracylu, a korzyści z takiego leczenia odnoszą chorzy na raka jelita grubego MSS [63, 64]. Brak korzyści z tego typu leczenia sugeruje, że pacjenci ci nie powinni otrzymywać leczenia adiuwantowego opartego na 5-fluorouracylu. Trzeba jednak wspomnieć, że wyniki niektórych badań sugerują, że podział raków jelita grubego na MSI i MSS jest wprowadzającą w błąd nadmierną symplifikacją [65].

Z badań przedklinicznych wynika, że linie komórkowe raka jelita grubego z MSI mogą być bardziej wrażliwe na irinotekan [66]. Jednak wy-

Tabela I. Ocena niestabilności mikrosatelitarnej. Kolorem czerwonym oznaczono brak ekspresji, a kolorem zielonym obecność ekspresji białka (wg Pino i wsp. [57]).

STATUS MIKROSATELITARNY	INAKTYWACJA GENU	BIAŁKO			
		MLH1	MSH2	MSH6	PMS2
MSS	–				
MSI	<i>MLH1</i>				
MSI	<i>MSH2</i>				
MSI lub MSS	<i>MSH6</i>				
MSI	<i>PMS2</i>				

niki badań związku MSI z odpowiedzią na chemioterapię opartą na irinotekanie w raku jelita grubego są niejednoznaczne. Ostatnio podjęto próby wykorzystania mechanizmu *synthetic lethality* [67, 68], testując inhibitory PARP1 na liniach komórkowych raka jelita grubego z MSI. Wykazano też, że takie komórki są wrażliwe na inhibitory ścieżki PI3K-AKT-mTOR [69].

Ekwiwalentem testu na obecność MSI jest ocena immunohistochemiczna (IHC) ekspresji białek kodowanych przez geny *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* i *PMS2* z wykorzystaniem odpowiednich przeciwciał [57, 70]. Test IHC jest stosunkowo prosty, wyniki powtarzalne w zautomatyzowanej procedurze i łatwo można go włączyć do rutynowej oceny patomorfologicznej raka jelita grubego. Sposób interpretacji wyników zilustrowano w tabeli I. Ponadto brak ekspresji jednego lub kilku białek wskazuje, który z genów mutatorowych najprawdopodobniej uległ inaktywacji (mutacji). Białka kodowane przez geny mutatorowe tworzą heterodimery. Znajomość ekspresji białek tworzących te heterodimery umożliwia analizę inaktywacji poszczególnych genów (tab. I). Potencjalnym ograniczeniem testu IHC jest zależność uzyskiwanych wyników od jakości utrwalenia tkanki, barwienia i subiektywnej oceny reakcji IHC.

5. Nowe molekularno-predykcyjne klasyfikacje raka jelita grubego łączące fenotyp komórki z odpowiedzią na leczenie

Najprostszą molekularną klasyfikacją raków jelita grubego jest podział ze względu na niestabilność mikrosatelitarną i niestabilność chromosomową. Raki wykazujące cechy MSI (ok. 15%) dzieli się z kolei na raki jelita grubego na podłożu konstytucyjnych mutacji przynajmniej w jednym z genów mutatorowych (zespół Lyncha, ok. 3–5% raków jelita grubego) oraz raki jelita grubego sporadyczne (na podłożu inaktywacji *MLH1*, stanowiące ok. 10–15%). Raki jelita grubego z cechami niestabilności chromosomowej (ok. 85%) dzieli się również na raki o podłożu mutacji konstytucyjnych (zespoły FAP lub MAP, ok. 0,5–1%)

oraz raki jelita grubego sporadyczne (ok. 85%). Klasyfikacja ta ma duże znaczenie patogenetyczne, ale niewielkie znaczenie predykcyjne, ponieważ nie dostarcza informacji predykcyjnej w 85% raków jelita grubego (tylko MSI jest markerem braku skuteczności leczenia adiuwantowego opartego na 5-fluorouracylu).

Na podstawie analizy profilu ekspresji genów opublikowano w ostatnich latach wiele propozycji klasyfikacji molekularnych raka jelita grubego o znaczeniu prognostycznym i/lub predykcyjnym [71–73] w nadziei, że poprawią one stratyfikację chorych do leczenia, szczególnie do leczenia celowanego. Poniżej omówiono pokrótce dwie z nich. Nie wiadomo jeszcze, które z tych klasyfikacji ostaną się w przyszłości w praktyce klinicznej i w jakim stopniu oraz pod jakim względem uzupełniają się nawzajem.

Sadanandam i wsp. [74, 75] przedstawili molekularno-predykcyjną klasyfikację raków jelita grubego, która łączy molekularny fenotyp komórek z odpowiedzią na leczenie, czyli jest to **klasyfikacja o znaczeniu predykcyjnym**. Wyróżniono 3, a następnie 6 podtypów raka jelita grubego w zależności od genów, których ekspresja występuje preferencyjnie:

- 1) *goblet-like* (GL) – rak typu komórek kubkowych, o fenotypie podobnym do komórek kubkowych),
- 2) *enterocyte* (E) – rak typu enterocytów, enterocytarny,
- 3) *stem-like* (SL) – rak typu komórek macierzystych, o fenotypie podobnym do komórek macierzystych,
- 4) *inflammatory* (I) – rak zapalny,
- 5) *transit-amplifying* (TA), w którym występują dwa podtypy:
 - 5a) oporny na cetuksimab (CR TA),
 - 5b) wrażliwy na cetuksimab (CS TA).

Podtyp GL charakteryzuje wysoka ekspresja typowych dla komórek kubkowych genów *MUC2* i *TFE3*. Podtyp enterocytarny cechuje się wysoką ekspresją genów typowych dla enterocytu. Podtyp SL wyróżniony został na podstawie wysokiej ekspresji markerów docelowych ścieżki sygnałowej WNT, genów komórek macierzystych, mioepitelialnych i genów mezenchymalnych oraz niskiej ekspresji markerów różnicowania. Podtyp zapalny charakteryzuje się

wysoką ekspresją genów kodujących chemokiny i interferon. Podtyp TA cechuje różna ekspresja genów typowych dla komórek macierzystych oraz markerów ścieżki sygnałowej WNT.

Każdy z tych molekularnych podtypów raka jelita grubego wykazuje podobieństwo do odpowiadającej mu pod względem profilu ekspresji genów komórki prawidłowej krypty jelita grubego, a jednocześnie różny stopień *stemness* (podobieństwa do profilu ekspresji genów komórek macierzystych) i ekspresji ścieżki sygnałowej WNT. Na przykład sygnatura genowa podtypu SL jest prawie identyczna z sygnaturą genową komórek macierzystych, które znajdują się w pobliżu dna krypt. Podtyp SL jest najbardziej niezróżnicowanym rakiem i ma najwyższą ekspresję ścieżki sygnałowej WNT oraz markerów komórek macierzystych. Z drugiej strony, podtyp o fenotypie podobnym do komórek kubkowych (GL) charakteryzuje się niską ekspresją markerów komórek macierzystych i ścieżki WNT (profil ekspresji dobrze zróżnicowanych raków).

Wyżej wymienione podtypy raka jelita grubego można rozpoznać, stosując markery wykrywane za pomocą qRT-PCR albo za pomocą immunohistochemii. W metodzie IHC wykorzystywane są następujące markery: ZEB1, RARRES3, CFTR, FLNA, MUC2, TFF3. Charakterystykę poszczególnych podtypów przedstawiono w tabeli II.

Chociaż cetuksimab stosowany jest w leczeniu raka jelita grubego z przerzutami bez mutacji w *KRAS* i *NRAS*, to jednak wyniki leczenia adiuwantowego są niezadowolające, niezależnie od genotypu *RAS* [76]. W związku z tym podejmowane są próby poszukiwania precyzyjniejszego określenia grupy pacjentów z rakiem jelita grubego, którzy odniosą korzyść z leczenia cetuksimabem. Omawiana w niniejszej pracy nowa molekularna klasyfikacja raka jelita grubego zdaje się spełniać to zadanie. Wykazano związek tej klasyfikacji z odpowiedzią na cetuksimab u chorych na raka jelita grubego z prze-

rzutami do wątroby. Ocena ekspresji *CFTR*, a następnie *FLNA* pozwala wyróżnić wśród raków TA takie, które są wrażliwe na cetuksimab (niska ekspresja *FLNA*) – ok. 50%, i takie, które są niewrażliwe na cetuksimab, a reagują na inhibitory c-MET (wysoka ekspresja *FLNA*). Z kolei tylko ok. 22% raków typu GL i SL wykazało odpowiedź na leczenie cetuksimabem.

Molekularne podtypy raka jelita grubego różnią się nie tylko pod względem odpowiedzi na cetuksimab, ale również na standardową (FOLFIRI) chemioterapię. Wyniki leczenia za pomocą FOLFIRI w leczeniu adiuwantowym lub w leczeniu raka jelita grubego z przerzutami mogą zależeć od podtypu molekularnego (w leczeniu nieselekcjonowanych raków jelita grubego FOLFIRI nie poprawia przeżycia). Najlepsze wyniki leczenia w schemacie FOLFIRI uzyskuje się w leczeniu pacjentów z podtypem SL (w leczeniu adiuwantowym i u chorych z przerzutami) oraz w leczeniu podtypu zapalnego (w leczeniu adiuwantowym). Podtypy TA i GL prawdopodobnie nie będą wrażliwe na FOLFIRI w adiuwancie. Pacjentom tym można oszczędzić toksyczności tego leczenia. Omawiana klasyfikacja ma też znaczenie prognostyczne (tab. II).

Roepman i wsp. [71] opublikowali trzystopniową molekularną klasyfikację raków jelita grubego. Raki typu A charakteryzowały się wysokim odsetkiem aktywujących mutacji w *KRAS* i *BRAF* (ok. 60%), niskim indeksem proliferacyjnym, cechami MSI, brakiem wyraźnego związku z odpowiedzią na leczenie adiuwantowe oparte na 5-fluorouracylu i dobrym rokowaniem. Raki typu B cechowały: niski odsetek ww. mutacji, wysoki indeks proliferacyjny, brak niestabilności mikrosatelitarnej (MSS), dobra odpowiedź na chemioterapię adiuwantową z 5-fluorouracylem, ale złe rokowanie. Raki typu C (o fenotypie mezenchymalnym) charakteryzowały się: niskim indeksem proliferacji, opornością na terapię opartą na 5-fluorouracylu i złym rokowaniem.

Tabela II. Związek molekularnej klasyfikacji raka jelita grubego z rokowaniem i leczeniem (wg Sadanandam i wsp. [74])

	GOBLET-LIKE	ENTEROCYTE	INFLAMMATORY	STEM-LIKE	TRANSIT-AMPLIFYING CR	TRANSIT-AMPLIFYING CS
rokowanie	dobrze	pośrednie	pośrednie	złe	złe	dobrze
leczenie adiuwantowe	nie	FOLFIRI	FOLFIRI	FOLFIRI	nie	nie
leczenie raka jelita grubego z przerzutami	FOLFIRI	?	?	FOLFIRI	inhibitory c-MET	cetuksimab
mRNA	MUC2+ TFF3+	MUC2+ TFF3-	RARRES3+	SFRP2+	CFTR+, FLNA+	CFTR+, FLNA-
IHC	MUC2+ TFF3+	MUC2+ TFF3-	RARRES3?	ZEB1+	CFTR+, FLNA?	CFTR+, FLNA?

6. Krążące komórki nowotworowe i pozakomórkowe DNA (cfDNA) jako źródło materiału diagnostycznego w przyszłości, tzw. biopsja płynów

Wśród chorych onkologicznych za 90% zgonów odpowiada uogólniona choroba nowotworowa [77]. Nierzadko w przypadku zaawansowania choroby nowotworowej (rak płuca, jelita czy piersi) są trudności w pozyskaniu materiału diagnostycznego. Sytuacja ta wprowadza dodatkowy czynnik obciążający i stresujący, obok choroby nowotworowej dla pacjenta. Potrzeba więc poszukiwania innych źródeł materiału, który byłby łatwo pobierany, dostarczał danych diagnostycznych do regularnego monitorowania skuteczności leczenia. Materiałem o takich cechach jest krew obwodowa, która dociera do wszystkich komórek organizmu [78]. Od XIX w. wiadomo, że we krwi pacjentów z nowotworami niehematologicznymi krążą komórki nowotworowe (*circulating tumor cells* – CTC) [79]. Krążące komórki nowotworowe biorą udział w powstawaniu przerzutów odległych. Są to komórki, które pochodzą z guza pierwotnego i za pośrednictwem krwiobiegu docierają w miejsca utworzenia przerzutu odległego [80]. Pierwszy opis CTC pochodzi z 1869 r. [79]. Dotyczy obserwacji występowania we krwi komórek podobnych do tworzących guzy poczynionej przez australijskiego lekarza Thomasa Ashwortha [79]. Jednakże dopiero ponad 130 lat później dzięki postępowi technologicznemu udało się zacząć systematycznie badać CTC [81]. Opublikowane dane wskazują na znaczenie prognostyczne monitorowania ilości CTC w leczeniu raka jelita grubego. Pomiar ilości CTC jest niezależnym czynnikiem rokowniczym w raku jelita grubego [82, 83]. Obecnie dzięki selektywnemu wzbogacaniu tych komórek możliwe stało się wykrywanie w nich mutacji predykcyjnych [24]. Obecnie trwają intensywne badania kliniczne oceniające znaczenie CTC w diagnostyce i monitorowaniu skuteczności leczenia nowotworów litych [84, 85].

W XX w. dowiedziono również, że w osoczu pobranym od pacjentów onkologicznych można wykryć pozakomórkowe kwasy nukleinowe (*circulating tumor DNA* – ctDNA) [86]. Wolno krążące kwasy nukleinowe (*circulating free nucleic acids* – cfNA) mogą być uwalniane przez normalne komórki, komórki podścieliska nowotworu oraz same komórki nowotworowe. Uwalnianie cfNA może być spowodowane nekrozą i apoptozą. Źródłem ctDNA są komórki nowotworowe, które ulegają apoptozie [86, 87]; ctDNA stanowi 1,4–47,9% cfNA w krwiobiegu pacjentów onkologicznych [88]. ctDNA jest obecne u 50–75% pacjentów z zaawansowanym, jak również zlokalizowanym nowotworem (np. rak trzustki, piersi, jelita, nerki, mózgu). W przypadku raka jelita grubego ctDNA można wykryć u 70% pacjen-

tów z chorobą zlokalizowaną oraz do 100% z chorobą uogólnioną [89, 90]. Pochodzące z komórek nowotworowych ctDNA jest zwykle pofragmentowane i małej długości ok. 100 bp [91]. Inni autorzy wskazują, że wielkość ctDNA uwolniona z komórek w wyniku apoptozy wynosi 200 bp. Z kolei cfDNA uwolnione w wyniku nekrozy może być dłuższe niż 200 bp (wielkość nukleosomalnego DNA) [92, 93]. W przypadku raka jelita grubego proporcja zmutowanego allelu *KRAS* może sięgać 0,13–69% (mediana 10,5%) w porównaniu z allelem bez mutacji [90, 91]. Wykazano, że czułość i specyficzność oceny mutacji *BRAF* V600E w ctDNA w porównaniu z tkanką guza wyniosły 100%. W przypadku mutacji w *KRAS* specyficzność i czułość wyniosły odpowiednio 98% i 92% [90]. Udowodniono, że analiza ctDNA (obecność mutacji *KRAS*) może mieć znaczenie diagnostyczne, prognostyczne i predykcyjne (dla terapii celowanych) w raku jelita grubego [92]. Dużą zaletą analizy ctDNA jest możliwość wcześniejszego – nawet do 10 miesięcy – wykrycia progresji choroby w porównaniu z metodami radiologicznymi [28, 94]. W przypadku raka jelita grubego za pomocą analizy ctDNA zrekonstruowano mutacje w całym genomie na poziomie chromosomów (translokacje, delecje, amplifikacje) [88]. Próbuje się również wykorzystać ctDNA jako narzędzie skринingowe [95]. Jednak potrzeba jeszcze czulszych metod do detekcji ctDNA, opartych np. na masowym równoległym sekwencjonowaniu, zdolnych wykryć w próbce allel z mutacją stanowiącą ok. 0,2% cfNA [96].

7. Wybór przypadku

7.1. Wskazania do wykonania testu – zalecenia kliniczne

Zgodnie z zaleceniami NCCN (*National Comprehensive Cancer Network*) [97] **wszyscy pacjenci z przerzutowym rakiem jelita grubego (stadium IV) powinni mieć oznaczony status genów *KRAS* i *NRAS* zvalidowaną metodą.** Badanie mutacji w *BRAF* i *PIK3CA* nie jest zalecane jako rutynowy test predykcyjny. Na razie NCCN rekomenduje badanie mutacji w *BRAF* jako markera prognostycznego u chorych na raka jelita grubego z przerzutami.

7.2. Kiedy powinny zostać wykonane testy *KRAS* i *NRAS*?

Obecnie rekomenduje się oznaczenie mutacji w *KRAS* i *NRAS* u pacjentów z rakiem jelita grubego w momencie zdiagnozowania przerzutów. Nie jest to równoznaczne z rekomendacją stosowania leczenia anty-EGFR w pierwszej linii chemioterapii u pacjentów z rakiem jelita grubego z przerzutami, ale ma na celu lepsze zaplanowanie leczenia. Ten sposób wymaga sprawnego dostarczenia blokków

do pracowni, w której takie badania się wykonuje. Najszybciej można to zrobić, gdy genotypowanie odbywa się w zakładzie patomorfologii, który wykonał badanie histopatologiczne, ponieważ bloczki i preparaty histologiczne (potrzebne do wyboru odpowiedniego bloczka) już się tam znajdują lub gdy pracownie histopatologii i biologii molekularnej są w strukturach jednej jednostki w bliskim kontakcie. Alternatywna propozycja, aby genotypowanie *RAS* wykonywać w każdym przypadku po ustaleniu rozpoznania raka jelita grubego, ma pewne zalety, ale również poważne ograniczenia. Główną zaletą jest to, że od razu wiadomo, czy celowana terapia anty-EGFR w ogóle będzie możliwa u danego chorego. Istnieją dwa ważne argumenty przeciwko takiemu postępowaniu:

- wykonywanie pewnej liczby kosztownych, a jednocześnie niepotrzebnych badań (chorzy, którzy nie będą mieli przerzutów); problem ten można częściowo rozwiązać, ograniczając się do wykonywania genotypowania w momencie ustalenia rozpoznania tylko w ściśle określonej podgrupie chorych na raka jelita grubego z cechami złego rokowania (dużego prawdopodobieństwa wystąpienia przerzutów);
- w miarę jak rośnie liczba genów, w których powinno się oceniać mutacje, aby podjąć decyzję co do leczenia anty-EGFR, należałoby powtórnie testować raki jelita grubego, które już uprzednio genotypowano tylko w ograniczonym zakresie.

7.3. Czy ekspresja białka EGFR ma znaczenie w kwalifikacji pacjentów do badania mutacji w *RAS* i w kwalifikacji do leczenia anty-EGFR?

Nadekspresja białka EGFR występuje w różnych rakach, w tym w 72–97% raków jelita grubego [98, 99]. Immunohistochemiczna ocena ekspresji EGFR jako czynnika predykcyjnego dla terapii za pomocą mAb anty-EGFR nie spełniła pokładanych w niej nadziei, chociaż początkowo (2004 r.) FDA zaaprobowowała diagnostyczny test (EGFR PharmDx™ Kit) i leczenie cetuksimabem lub panitumumabem w raku jelita grubego z ekspresją białka EGFR [100]. W wielu pracach wykazano jednak, że ocena ekspresji białka EGFR w raku jelita grubego za pomocą IHC nie pozwala na przewidywanie odpowiedzi na leczenie, które może być skuteczne również w rakach jelita grubego niewykazujących ekspresji EGFR [101–104].

Oprócz możliwych przyczyn związanych z metodyką IHC i oceną reakcji IHC możliwe są także inne istotne powody, dla których ocena IHC ekspresji EGFR nie zyskała rangi czynnika predykcyjnego w raku jelita grubego. Jakość reakcji IHC na obecność ekspresji EGFR zależy w dużym stopniu od sposobu utrwalenia tkanki oraz czasu przechowywania materiału (nawet w tak krótkim okresie jak 3–24 miesiące) [105]. Ze względu na powyższe można stwierdzić, że publikowane wyniki

korelacji immunohistochemicznej ekspresji EGFR z rokowaniem lub terapią są mało wiarygodne, ponieważ zwykle wykorzystują bloczki z różnych instytucji przechowywane przez różny czas (od miesięcy do lat), w różnych warunkach archiwizacji oraz różnie utrwalone [106]. Ponadto EGFR na powierzchni komórki znajduje się w dwóch postaciach: *high-affinity* i *low-affinity* (stanowi większość receptorów, ale w niewielkim stopniu aktywuje kinazę tyrozynową, co jest niezbędne do aktywacji ścieżki sygnałowej poniżej EGFR). Niestety, stosowane przeciwciała nie „widzą” różnicy między tymi dwoma rodzajami receptorów [107, 108].

Z podanych wyżej powodów rutynowe badanie białka EGFR obecnie nie jest rekomendowane. Zgodnie ze współczesnym stanem wiedzy i jednoznacznymi rekomendacjami, *żaden pacjent nie powinien zostać wykluczony z leczenia cetuksimabem lub panitumumabem na podstawie braku ekspresji białka EGFR w guzie!* [106] Niestety obecnie w Polsce zgodnie z Obwieszczeniem Ministra Zdrowia z dnia 1 stycznia 2015 r. [109] ocena ekspresji białka EGFR jest wymagana przy kwalifikacji do leczenia cetuksimabem i panitumumabem. Za dodatni jest uznawany odczyn „w co najmniej 1% komórek nowotworowych” [109], niezależnie od tego, czy jest to odczyn błonowy czy cytoplazmatyczny, gdyż obwieszczenie tego nie precyzuje. Szczególnie odczyn cytoplazmatyczny daje dużą dowolność interpretacji, co można w obecnym stanie prawnym wykorzystać na korzyść pacjenta. Wiele wysiłku w ostatnich latach włożono, aby badanie mutacji *RAS* wykonywać zwalidowanymi metodami w ośrodkach, które poddają się zewnętrznej kontroli jakości. Niestety, wysiłek ten jest marnowany poprzez badanie ekspresji białka EGFR w rakach jelita grubego z przerzutami niezwalidowanymi metodami, a jakość tych badań nie jest w żaden sposób kontrolowana.

7.4. Znaczenie heterogenności nowotworu pod względem występowania mutacji w *KRAS*

Wyniki ostatnich badań dostarczyły dowodów na niezwykłą heterogenność raka jelita grubego pod względem występowania mutacji w *KRAS* (a również w *BRAF* i *PIK3CA*) [3]. W raku jelita grubego, w którym stwierdza się tzw. klonalną heterogenność pod względem obecności mutacji *KRAS*, występują dwie subpopulacje komórek nowotworowych: jedna z mutacją w *KRAS* i druga bez mutacji, albo dwie subpopulacje, z których każda charakteryzuje się innymi mutacjami. Istnienie niewielkiego klonu komórek nowotworowych z mutacją w *KRAS* w raku jelita grubego „bez mutacji”, może nie tylko mieć znaczenie dla kwalifikacji chorych do leczenia anty-EGFR, ale również zwiastować możliwość powstania oporności w trakcie takiej terapii, ponieważ w czasie lecze-

nia komórki rakowe z mutacją mają szansę uzyskać liczebną przewagę [28, 94]. Niestwierdzenie takiej subpopulacji poważnie utrudnia przewidywanie reakcji na leczenie anty-EGFR [110–112]. Początkowo tylko w pojedynczych pracach w piśmiennictwie opisano przypadki heterogenności pod względem mutacji w *KRAS* w raku jelita grubego (w obrębie guza pierwotnego) [113–117]. Z badań tych wynikało, że mniejszość raków jelita grubego wykazuje mieszanie subpopulacji komórek rakowych z mutacją w eksonach 2 i 3 *KRAS* i subpopulacji bez mutacji. Ponadto, nawet gdy taka sytuacja miała miejsce, komórki nowotworowe z mutacją *KRAS* zajmowały ponad 80% powierzchni badanego skrawka w ponad 75% przypadków raka jelita grubego [116]. Z kolei w 30 przypadkach wykazano całkowitą zgodność genotypu *KRAS* w biopsji z rakiem jelita grubego i w całym usuniętym guzie [118]. Porównując występowanie mutacji w centrum guza i na jego inwazyjnym obwodzie, stwierdzono heterogenność obecności mutacji w *KRAS*, *BRAF* i *PIK3CA* odpowiednio w 8%, 1% i 5% pierwotnych raków jelita grubego [115]. Pirosekwencjonowanie dostarczyło dowodów na dużego stopnia klonalną heterogenność pomiędzy centrum i obwodem raka jelita grubego (różnice występowały w blisko 44% przypadków). Stwierdzono współwystępowanie mutacji w *PIK3CA* i *BRAF* lub *KRAS* w znacznym odsetku przypadków raka jelita grubego. Występowanie dwóch różnych mutacji *KRAS* w różnych częściach tego samego raka jelita grubego, jak również heterogenność mutacji wewnątrz guza (np. obecność mutacji w centrum a nieobecność na obwodzie lub odwrotnie) świadczy o bardzo dużej molekularnej heterogenności raka jelita grubego, która może znajdować odzwierciedlenie w przebiegu choroby i reakcji na leczenie. Z tego punktu widzenia szczególnie interesujące jest współwystępowanie mutacji w *KRAS/PIK3CA*, gdyż powoduje ono jednoczesną aktywację ścieżek sygnałowych PI3K/AKT/mTOR i RAS/RAF/MEK, co może mieć związek z opornością na leczenie inhibitorami PI3K/AKT/mTOR [3].

W świetle wyników omówionych powyżej badań trzeba podkreślić niezwykle istotne kliniczne znaczenie metod wykrywania mutacji *RAS*, które charakteryzują się wysoką czułością oraz powtarzalnością wyników i są certyfikowane do badań *in vitro* (CE-IVD), a jednocześnie są to procedury laboratoryjne stosunkowo proste i szybkie. Warto wspomnieć, że terapia anty-EGFR została zaaprobowana na podstawie wyników uzyskanych właśnie z wykorzystaniem metod o wysokiej czułości. Takie testy o wysokiej czułości pozwalają wykryć niewielkie liczebno kłony komórek z mutacjami w *KRAS* w guzach, które byłyby określone jako niewykazujące mutacji przy zastosowaniu metod detekcji mutacji o mniejszej czułości (jak np. sekwencjonowanie metodą Sanger), a tym samym

pozwalają zidentyfikować pacjentów opornych na leczenie anty-EGFR. Malapelle i wsp. [26], wykorzystując metody o wysokiej czułości, zidentyfikowali o 8% więcej mutacji *KRAS* u chorych opornych na leczenie cetuksimabem, a Molinari i wsp. [24] wykazali obecność dodatkowo wykrytych mutacji *KRAS* w prawie 11% raków jelita grubego w porównaniu z wynikami sekwencjonowania. Wykazano też, że ocena mutacji w *KRAS* metodami o wysokiej czułości lepiej koreluje z wynikami terapii anty-EGFR niż ocena za pomocą sekwencjonowania [24–27, 29–31]. Opublikowana ostatnio (w 2014 r.) metaanaliza prowadzi do takich samych wniosków [31]. W podsumowaniu autorzy stwierdzają, że metody detekcji o wysokiej czułości i specyficzności wykorzystujące PCR, wykrywając dodatkowych pacjentów z mutacjami w *KRAS* zwiększają średnie przeżycie chorych i przeżycie do wystąpienia progresji choroby. Ponadto pozwalają chorym z mutacjami w *KRAS* uniknąć niepotrzebnego leczenia anty-EGFR z jego skutkami ubocznymi, a dają tym chorym szansę na wdrożenie odpowiedniego dla nich leczenia. Wykorzystanie metod opartych na PCR do oceny raka jelita grubego, w których uprzednio sekwencjonowaniem nie stwierdzono mutacji miało związek z wydłużeniem czasu przeżycia chorych. Natomiast w grupie chorych z wykrytą już mutacją w *KRAS* efektu tego nie stwierdzono. Zastosowanie metodologii o zwiększonej czułości pozwala wykryć klonalną heterogenność *KRAS* nawet w ok. 50% przypadków raków jelita grubego [3].

Wykrycie klonalnej heterogenności zależy zatem od czułości metody stosowanej do oceny mutacji *KRAS*. Nawet w materiale poddanym mikrodyssekcji subpopulacje komórek nowotworowych z mutacjami w *KRAS* mogą być liczebno niewielkie, co wymaga metod analitycznych o dużej czułości. W idealnej sytuacji, jeżeli materiał uzyskany drogą mikrodyssekcji zawiera ok. 90% komórek rakowych, zastosowana metoda detekcji mutacji *KRAS* powinna dawać możliwość wykrycia subpopulacji ok. 1–2% komórek nowotworowych z mutacją. W odniesieniu do testu o znaczeniu predykcyjnym nie jest to wymaganie specjalnie wygórowane, biorąc pod uwagę, że minimalny wymagany odsetek komórek rakowych wykazujących ekspresję receptora estrogenów w raku sutka wynosi 1% dla terapii antyestrogenowej [119]. Podsumowując, należy stwierdzić, że tylko metody detekcji mutacji cechujące się wysoką czułością i specyficznością pozwalają na stratyfikację chorych na raka jelita grubego, która umożliwi najlepsze wykorzystanie istniejących obecnie sposobów celowanej terapii.

Z praktycznego punktu widzenia można ograniczyć się do następujących rekomendacji. Do badania mutacji *RAS* należy wykorzystywać materiał z usuniętego guza (cały przekrój guza), a nie z biopsji endoskopowej. Jeżeli jedynie taka biopsja jest dostępna

i nie stwierdzono w niej mutacji *RAS*, nie ma uzasadnienia w piśmiennictwie dla ponawiania biopsji, aby wykluczyć ewentualną heterogenność.

7.5. Czy należy genotypować pierwotny rak jelita grubego czy przerzuty?

Wyniki przeprowadzonej metaanalizy [120] wskazują na bardzo wysoki stopień korelacji występowania mutacji w *KRAS* w guzie pierwotnym i w przerzutach (ok. 94% zgodności). Zastosowanie techniki sekwencjonowania następnej generacji (*next generation sequencing* – NGS) wykazało nawet 100-procentową zgodność w przypadku *KRAS*, *NRAS* i *BRAF* pod względem występowania mutacji w guzie pierwotnym i przerzucie (badano niemal wyłącznie przerzuty w wątrobie) [121]. Jednakże ta zgodność wyników w pewnym stopniu zależy od umiejscowienia przerzutów [122] i jest mniejsza w przypadku przerzutów do płuc i węzłów chłonnych. W odniesieniu do węzłów chłonnych heterogenność występowała w 31% (*KRAS*), 4% (*BRAF*) i 13% (*PIK3CA*) przypadków. Ze względu na zbyt duże rozbieżności między guzem pierwotnym i przerzutowym Baldus i wsp. [115] nie rekomendują pobierania materiału do oceny mutacji w *KRAS* z przerzutów w węzłach chłonnych. Chociaż wydaje się, że jeżeli tkanka z przerzutu jest dostępna (z wyjątkiem węzłów chłonnych), wskazane byłoby wykonanie genotypowania w tym materiale, to nie ma dostatecznie udokumentowanych danych w piśmiennictwie, aby rekomendować wykonywanie biopsji przerzutu specjalnie w celu genotypowania *KRAS* i *NRAS*.

8. Kwestie przedanalizyczne badania mutacji somatycznych

8.1. Typ materiału przydatnego do diagnostyki

Do oceny mutacji somatycznych można wykorzystać różnego typu materiał biologiczny: tkankę pooperacyjną świeżą i utrwaloną, materiał cytologiczny świeży i utrwalony.

8.1.1. Tkanka pooperacyjna

Zdecydowanie najlepszym materiałem do diagnostyki jest materiał pooperacyjny. Zwykle wybiera się do diagnostyki materiał dostępny w laboratorium, ponieważ liczy się czas wykonania badania. Zaletą materiału pooperacyjnego jest możliwość oceny jego komórkowości. Umożliwia to wykonanie makro- lub mikrodyssekcji w celu wzbogacenia zawartości komórek nowotworowych wybranych do izolacji DNA. Ułatwia to wybór metody diagnostycznej.

Głównie do diagnostyki jest wykorzystywany materiał utrwalony w 10-procentowej zbuforowanej formalinie. Utrwalenie materiału i wykonanie w postaci bloczków parafinowych powoduje, że jakość

tego materiału jest słabszej jakości. Proces wykonania bloczka prowadzi do fragmentacji DNA [123]. Może to powodować trudności w przeprowadzeniu badania lub nawet całkowicie je uniemożliwić. Opisano, że proces utrwalania może czasami wprowadzać modyfikacje chemiczne nukleotydów, których rezultatem są artefaktowe mutacje [124]. W rezultacie może spowodować to uzyskanie wyniku fałszywie dodatniego, który oznacza dla pacjenta wykluczenie z potencjalnie skutecznej terapii. Obecnie opracowano strategie postępowania z materiałem utrwalonym w formalinie, które minimalizują ryzyko wykrycia artefaktowej mutacji zarówno w badaniu pojedynczych mutacji, jak i w technice NGS [125–127]. Do izolacji DNA potrzeba 3–5 niebarwionych skrawków w zależności od masy guza oraz preparatu HE z zaznaczoną masą guza. Należy nadmienić, że preparaty histopatologiczne po skrojeniu należy wykorzystać w ciągu kilku dni, ponieważ DNA może degradować w wyniku oksydacji.

Diagnostykę raka jelita grubego można również przeprowadzić, wykorzystując do tego celu świeży materiał pooperacyjny, wybrany przez patologa i przekazany do diagnostyki lub materiał uprzednio zamrożony i przechowywany w temperaturze -80°C . Materiał ten jest bardzo dobrej jakości. Wadą jest natomiast brak mikroskopowej oceny zawartości komórek nowotworowych. Rozwiązaniem tego problemu mogłoby być wykonanie preparatu mrożonego i ocena jego komórkowości. W obu przypadkach (materiał świeży lub mrożony) możliwe jest zabezpieczenie materiału metodą awers–rewers. W trakcie pobierania przez patologa materiału do diagnostyki awers jest przekazywany do wykonania preparatu mrożonego lub histopatologicznego (klasycznego), natomiast rewers do mrożenia lub bezpośredniego wykonania badania molekularnego. Dlatego po zakończonej ocenie mikroskopowej możliwe jest oszacowanie komórkowości materiału świeżego lub mrożonego, który zostanie przeznaczony do wykonywania diagnostyki molekularnej.

Obecnie standardem jest prowadzenie diagnostyki molekularnej na bazie bloków parafinowych. Jest to proces najmniej skomplikowany, a badania molekularne są naturalnym uzupełnieniem badania histopatologicznego. Z kolei w przypadku wykorzystania materiału świeżego powstają trudności wynikające z reorganizacji pracy oraz dodatkowych nakładów finansowych.

8.1.2. Materiał cytologiczny

W przypadku braku materiału pooperacyjnego do diagnostyki raka jelita grubego można wykorzystać materiał cytologiczny, który również umożliwia ocenę liczby komórek nowotworowych. Wykorzystanie rozmazów wiąże się ze zniszczeniem preparatu w sytuacji, gdy jest dostępne kilka szkiełek. Z kolei

w przypadku tylko jednego preparatu możliwe jest wybranie przez patologa części preparatu do zeszkrobienia w celu wykonania badania molekularnego, a następnie powtórne zaklejenie preparatu. W ten sposób reszta preparatu pozostaje diagnostyczna i jest ciągle elementem dokumentacji pacjenta. Bezpośrednie i szybkie utrwalanie w alkoholu powoduje, że DNA jest bardzo dobrej jakości do wykonania analiz molekularnych. Nie zaleca się stosowania innych utrwalaczy.

W celu przyspieszenia diagnostyki można również po zakończeniu biopsji i wykonaniu rozmazów zabezpieczyć resztki materiału, dodatkowo przepłukując igłę zbuforowanym roztworem soli fizjologicznej. Tak uzyskany materiał zamraża się w temperaturze -80°C . Decyzję o wykonaniu badania z tego materiału podejmuje się po uzyskaniu wyników z biopsji oceniającej obecność wystarczającej liczby komórek nowotworowych. Jest to bardzo dobrej jakości materiał do wykonania analiz molekularnych.

8.1.3. Cytoblok

Materiał zabezpieczony w postaci cytobloku również może zostać wykorzystany do analizy molekularnej w przypadku, gdy nie ma materiału pooperacyjnego oraz nie można wykorzystać rozmazów. Technika cytobloku umożliwia procentową ocenę zawartości komórek nowotworowych. DNA jest dobrej jakości do wykonania badań molekularnych.

8.2. Zawartość komórek nowotworowych w preparacie

W zależności od czułości zastosowanej metody wymagana zawartość komórek nowotworowych w preparacie może wynosić od 1–5% (techniki qPCR) do 50% (technika sekwencjonowania metodą Sanger'a; tab. III).

8.3. Makro- i mikrodissekcja

W celu zwiększenia odsetka komórek rakowych w badanym preparacie, a co za tym idzie – zwiększenia ilości DNA pochodzącego z komórek rakowych w stosunku do DNA pochodzącego z komórek podścieliska, stosuje się makro- lub mikrodissekcję [128]. Mikrodissekcję można podzielić na manualną (pod mikroskopem) i laserową. Mikrodissekcja laserowa jest najdokładniejszą techniką, zapewniającą niemal 100-procentową populację komórek rakowych w badanym materiale. Jednak aż taki poziom dokładności nie jest wymagany w badaniu mutacji somatycznych, dlatego techniki tej nie wykorzystuje się do rutynowych badań. Poza tym mikrodissekcja laserowa wymaga drogiego sprzętu i jest czasochłonna.

W makrodissekcji preparat zabarwiony HE używany jest jako wzorzec, na którym obrysowuje się utkanie raka. Następnie na niezabarwionym prepara-

cie przeznaczonym do izolacji DNA należy postarać się zidentyfikować miejsce korespondujące z rakiem na preparacie HE i zdrapać do probówki za pomocą sterylnej skalpela lub igły bez otaczającej tkanki (na ile jest to możliwe). Makrodissekcja jest techniką najprostszą, najszybszą, ale najmniej dokładną.

Manualna mikrodissekcja [129] wykonywana jest pod standardowym mikroskopem świetlnym lub mikroskopem odwróconym na zabarwionych preparatach, najczęściej fioletem kryzylu lub hematoksyliną. Barwniki te nie wpływają na ilość i jakość izolowanego DNA [130–132]. Użycie barwnika umożliwia łatwe zidentyfikowanie miejsca, gdzie jest rak, i jego dokładniejsze wycięcie bez otaczających tkanek, bez większych pól martwicy i ognisk włóknienia wewnątrz guza oraz bez niezmienionej błony śluzowej jelita oraz części adenomatycznej. Następnie utkanie raka jest zdrapywane ze szkiełka podstawowego do probówki za pomocą sterylnej skalpela lub igły. Można również zrobić odwrotnie – najpierw usunąć za pomocą skalpela lub igły podścielisko i otaczającą tkankę, a później zdrapać to, co zostało, do probówki. Technika ta jest bardzo prosta, nieznacznie bardziej czasochłonna niż makrodissekcja, ale zapewnia większą dokładność i daje pewność, że miejsce, które zostało wycięte, na pewno zawiera utkanie raka. W połączeniu z technikami diagnostycznymi o wysokiej czułości zapewnia jeszcze wyższą jakość badania i daje możliwość wykrycia klonów komórek z mutacjami, co ma znaczenie kliniczne i zapewnia lepszą odpowiedź na leczenie anty-EGFR [24–27, 29–31]. Kombinacja najlepszych technik możliwych do zastosowania w badaniach rutynowych (manualna mikrodissekcja plus technika diagnostyczna o wysokiej czułości) eliminuje konieczność oceny komórkowości w badanym preparacie, która jest elementem bardzo subiektywnym [128, 133, 134] i ocenianym w preparacie HE, który nie zawsze odpowiada zawartości głębiej skrojonych preparatów. Dlatego też manualna mikrodissekcja jako technika najbardziej optymalna powinna być stosowana w każdym przypadku badania mutacji somatycznych.

8.4. Izolacja DNA

Metoda izolacji DNA jest bardzo ważna, ponieważ brak wydajnej izolacji, szczególnie z materiału zdegradowanego lub skąpokomórkowego, może skutkować niemożnością wykonania badania. Ważnym etapem jest pomiar stężenia wyizolowanego DNA i jego czystości (mierzone spektrofotometrycznie stosunek 260/280 powinien zawierać się w przedziale pomiędzy 1,8 a 2,0). Ostatnie badania wskazują jednak, że pomiar spektrofotometryczny pięciokrotnie zawyża wartość stężenia DNA w stosunku do pomiaru prowadzonego za pomocą metod opartych na fluorescencyjnych barwnikach interkalujących DNA czy qPCR [135]. Na rynku jest obecnie wiele zestawów do

Tabela III. Charakterystyka metod wykorzystywanych w diagnostyce molekularnej genów *RAS*

METODA	CZUŁOŚĆ METODY (LOD)*	ZALETY	WADY	CE-IVD
sekwencjonowanie metodą Sangera	10–20%	wykrywa wszystkie mutacje i je identyfikuje	jest pracochłonna i mało czuła, wrażliwa na degradację DNA	brak, wymagana walidacja wewnętrzna
pirosekwencjonowanie	1–5%	wykrywa wszystkie mutacje i je identyfikuje, jest metodą ilościową	jest pracochłonna, analizuje krótkie odcinki	są obecne na rynku testy
HRM	5%	jest tania i szybka	wykrywa wszystkie mutacje, ale ich nie identyfikuje, wrażliwa na jakość DNA	brak, wymagana walidacja wewnętrzna
qPCR	ok. 1%	jest szybka, mniej wrażliwa na degradację DNA	wykrywa ograniczoną liczbę mutacji, testy są drogie	są obecne na rynku testy
NGS	1–5%**	wykrywa wszystkie mutacje i je identyfikuje	jest pracochłonna i droga	brak, wymagana walidacja wewnętrzna

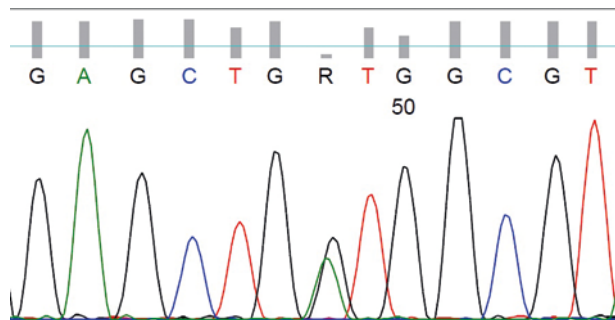
*LOD – granica czułości, oznacza minimalną zawartość procentową allelu z mutacją w preparacie, którą wykrywa dana metoda (limit of detection); CE-IVD – certyfikat do badań *in vitro*; HRM – metoda wysokorozdzielczej analizy krzywych topnienia (high resolution melting); qPCR – reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym (quantitative polymerase chain reaction, real time polymerase chain reaction); NGS – sekwencjonowanie nowej generacji, masowe równoległe sekwencjonowanie (next-generation sequencing, massively parallel sequencing)

**Zwiększając liczbę cząsteczek DNA sekwencjonowanych (pokrycie – ang. coverage) pochodzących z jednej próbki kosztem liczby próbek analizowanych w jednym eksperymencie, można zwiększyć czułość metody

izolacji DNA z bloków parafinowych. Dobrej jakości DNA uzyskuje się, wykorzystując zestawy zawierające kolumnienki ze złożem krzemionkowym oraz kulki magnetyczne (np. Maxwell 16 z CE-IVD, Promega, USA). Użycie zestawów do izolacji zapewnia dobrą jakość i powtarzalność izolacji DNA na potrzeby diagnostyki molekularnej.

9. Metody diagnostyczne wykorzystywane w patologii molekularnej raka jelita grubego

Wybór metody diagnostycznej powinien być uzależniony od jakości materiału oraz zawartości komórek rakowych. Laboratorium powinno dysponować przynajmniej dwiema technikami służącymi do wykrywania mutacji somatycznych, najlepiej testem CE-IVD opartym na qPCR oraz testem z zastosowaniem sekwencjonowania metodą Sangera. W Polsce wciąż jednak jest to kosztowne, podraża wykonanie badania oraz wydłuża czas jego wykonania. Porów-

Rycina 1. *KRAS* w eksonie 2 c.35G>A, p.G12D

nanie najważniejszych metod diagnostycznych wykorzystywanych do wykrywania mutacji somatycznych przedstawiono w tabeli III.

9.1. Sekwencjonowanie metodą Sangera

Sekwencjonowanie metodą Sangera jest uznawane za złoty standard w diagnostyce molekularnej (ryc. 1.). Limit detekcji tej metody to tylko ok. 10–20% komórek nowotworowych w analizowanej próbce (tab. III), co uznaje się za jej wadę [136, 137]. Metoda ta jest czasochłonna i wymaga inwestycji w drogi sprzęt. Jest też wrażliwa na degradację DNA – niejednokrotnie degradacja uniemożliwia uzyskanie wyniku badania. Wielką zaletą tej metody jest to, że wykrywa wszystkie mutacje obecne w porównaniu z testami qPCR, które wykrywają tylko *hot spots*. W trakcie analizy i interpretacji wyników sekwencjonowania należy zwrócić uwagę na: zawartość komórek nowotworowych w preparacie, wykrycie niespotykanych mutacji nieopisywanych w bazie COSMIC (*Catalogue of Somatic Mutations in Cancer*) czy piśmiennictwie, gdyż mogą być wynikiem procesu utrwalania.

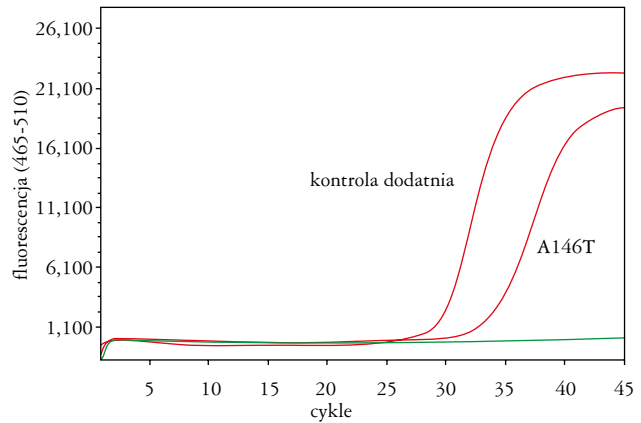
9.2. Pirosekwencjonowanie

Pirosekwencjonowanie to metoda, która opiera się na sekwencjonowaniu poprzez syntezę łańcucha DNA i identyfikowaniu ilości wbudowanego nukleotydu za pomocą wykrycia ilości uwolnionego w czasie wbudowywania nukleotydu pirofosforanu. Charakteryzuje się większą czułością w porównaniu z se-

kwencjonowaniem metodą Sanger (1–5%; tab. III) i wysoką przepustowością (analiza 96 próbek w jednym etapie reakcji) [137, 138]. Jest jednak metodą czasochłonną i wymaga specjalistycznego sprzętu. Wadą jej jest również analiza stosunkowo krótkich odcinków DNA, co powoduje, że aby zanalizować cały ekson trzeba wykonać kilka reakcji. Z drugiej strony wada ta staje się jej zaletą w przypadku zdegradowanego DNA. Zaletą tej metody jest obecność dostępnych na rynku testów CE-IVD. Jest również metodą ilościową. Pozwala zmierzyć ilość allelu z mutacją w stosunku do allelu bez mutacji [139].

9.3. Wysokorozdzielcza analiza krzywych topnienia

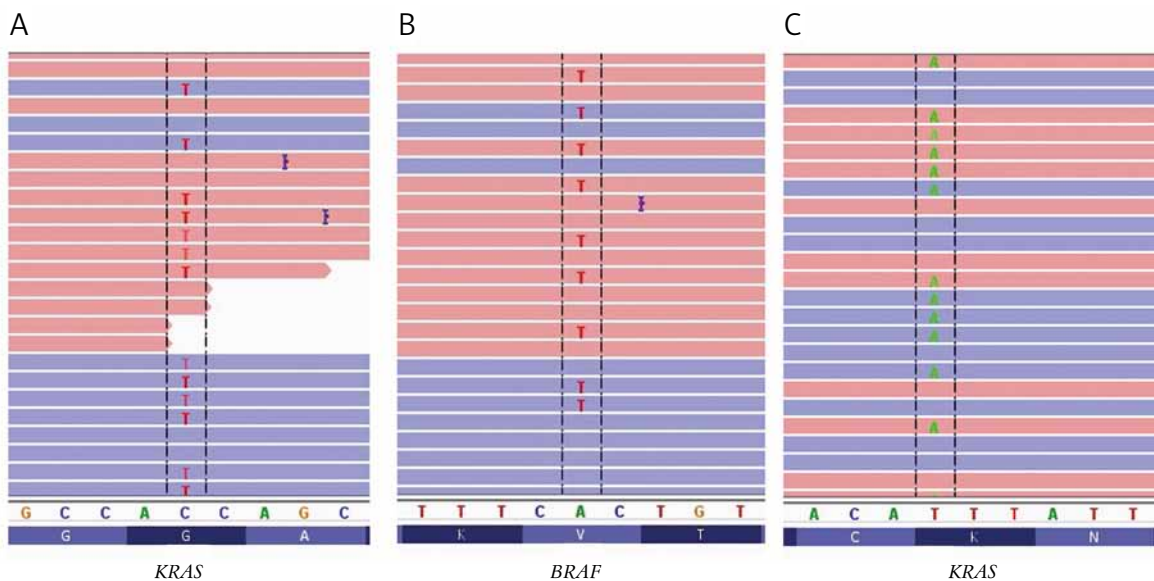
Dzięki postępowi w syntezie fluorescencyjnych interkalujących pomiędzy parami zasad w DNA barwników stała się możliwa precyzyjna ocena denaturacji DNA. Rezultatem tego postępu jest powstanie metody wysokorozdzielczej analizy krzywych topnienia (*high resolution melting* – HRM). Jest to metoda szybka, mało pracochłonna oraz tania. Ma niewielkie wymagania sprzętowe. Charakteryzuje się czułością na poziomie ok. 5% (tab. III). Jej wadą jest brak identyfikacji mutacji, ponieważ metoda ta wykrywa tylko jej obecność. W przypadku wykrycia mutacji w celu jej identyfikacji należy wykonać sekwencjonowanie metodą Sanger. W przypadku obecności mutacji w próbce poniżej 10% nie jest jednak możliwe zidentyfikowanie mutacji za pomocą sekwencjonowania. Metoda ta jest wrażliwa na jakość DNA, ponieważ nierównomierna amplifikowalność może wprowadzić zmiany w profilu denaturacji DNA [140–143].



Rycina 2. Przykład wykrytej mutacji w *KRAS* w eksonie 4 c.436G>A (p.A146T)

9.4. Real-time PCR (qPCR)

Niewątpliwie jedną z najbardziej rozpowszechnionych metod diagnostycznych jest metoda reakcji łańcuchowej polimerazy (*polymerase chain reaction* – PCR) w czasie rzeczywistym (qPCR) (ryc. 2.). W porównaniu z innymi przedstawionymi w niniejszej pracy metodami jest uważana za jedną z najczulszych (ok. 1% allelu z mutacją) (tab. III), a przy tym metoda jest mało pracochłonna i szybka do wykonania [144]. Dodatkowo na rynku dostępnych jest wiele testów do diagnostyki ze znakiem CE-IVD. Dzięki stosowaniu testów możliwe staje się porównywanie diagnostyki pomiędzy laboratoriami. Metoda qPCR wykazuje mniejszą wrażliwość na degradację DNA oraz ma mniejsze wymagania, jeśli chodzi o ilość DNA. Do jej wykonania potrzeba tylko termocyklera PCR z odczytem fluorescencji w czasie rzeczywistym [145]. Wadą tej metody jest wykrywanie tylko określonej



Rycina 3. Przykłady wykrytych mutacji *KRAS* w eksonie 2 c.35G>A (p.G12D), *BRAF* w eksonie 15 c.1799T>A (p.V600E), *KRAS* w eksonie 4 c.351A>T (p.K117N) w raku jelita grubego za pomocą zestawu Cancer Panel (LifeTechnology) z wykorzystaniem sekwenatora PGM IonTorrent

Tabela IV. Informacje, które powinny być zawarte w raporcie z badania mutacji somatycznych

INFORMACJE OGÓLNE
tytuł raportu ¹
nazwa i adres jednostki wykonującej badanie
nazwa i adres instytucji zlecającej badanie i nazwisko zlecającego onkologa
data zlecenia (jeżeli tkanka znajduje się w tym samym zakładzie, w którym będzie wykonane badanie) lub data przyjęcia materiału ze zleceniem
data raportu (wydania wyniku badania)
numer badania mutacji
numer strony i całkowita liczba stron raportu
kody procedur (analityczne i interpretacyjne), które zostały wykonane
INFORMACJE O PACJENCIE
imię, nazwisko i wiek
PESEL lub data urodzenia
CHARAKTERYSTYKA MATERIAŁU OTRZYMANEGO DO BADANIA
numer bloczka/rozsmazu, z którego było wykonane badanie
rodzaj tkanki do badania (np. formalina zbuforowana lub nie, materiał mrożony, biopsja)
pochodzenie tkanki do badania (np. guz pierwotny, przerzut, wznowa)
jakość tkanki, np. nadaje się do badania, nie nadaje się do badania (podać przyczynę)
odsetek komórek rakowych
METODY BADANIA
identyfikacja najlepszego bloczka z największym odsetkiem komórek nowotworowych: tak lub nie
metoda wzbogacenia liczby komórek nowotworowych w wycinku (np. makrodissekcja, mikrodissekcja lub żadna z tych metod)
metoda izolacji DNA
metoda genotypowania
nazwa testu (kitu) diagnostycznego (zalecane są testy z certyfikatami CE-IVD)
czułość metody
lista badanych mutacji ² lub badane eksony/regiony
numer referencyjny sekwencji badanego genu
WYNIK
genotyp ²
interpretacja predykcyjna (dotycząca znaczenia wyniku testu dla terapii) ³
komentarz (jeśli jest potrzebny) ⁴
ODPOWIEDZIALNOŚĆ
imiona, nazwiska i podpisy diagnosty laboratoryjnego i specjalisty patologa, którzy brali udział w wykonaniu badania i interpretacji wyniku ⁵

¹ Powinien zawierać nazwę badanego genu/genów zgodną z wytycznymi HGNC (www.genenames.org)

² Nomenklatura musi być zgodna z rekomendacjami HGVS (www.hgvs.org/mutnomen)

³ Na przykład: obecność mutacji w KRAS wskazuje na prawdopodobną oporność na leczenie anty-EGFR

⁴ Jakość materiału do badania, która mogła wpłynąć na wyniki testu, rekomendacje co do dalszych badań itp.

⁵ To znaczy: interpretacja wyniku w kontekście predykcyjnym i interpretacja danych źródłowych. Interpretacja danych źródłowych nie jest zadaniem jedynie diagnosty laboratoryjnego, ale i patologa, który również ponosi za to odpowiedzialność

liczby mutacji oraz koszt testów. Obecnie na rynku jest dostępnych wiele zestawów do diagnostyki *in vitro* opartych na metodzie qPCR, których wyczerpujący przegląd czytelnik znajdzie w innym opracowaniu [1].

9.5. Sekwencjonowanie nowej generacji

Masowe równoległe sekwencjonowanie jest metodą polegającą na jednoczesnym sekwencjonowaniu wielu milionów pojedynczych fragmentów DNA czy cDNA o długości 30–500 pz. To metoda bardzo czuła (1–5% zmutowanego allelu; tab. III), wykrywająca wszystkie mutacje w próbce w jednej reakcji. Można zwiększyć czułość metody kosztem liczby analizowanych próbek w jednym cyklu pracy, jednak zwiększa to koszt analizy jednej próbki. Dodatkowo jest to także metoda ilościowa, ponieważ oprócz wiadomości o sekwencji poszczególnej molekule DNA użytkownik dostaje również informacje o liczbie poszczególnych cząsteczek z mutacją i bez mutacji [146]. Sekwencjonowanie nowej generacji umożliwia kompleksową ocenę mutacji w materiale diagnostycznym. Wadą tej metody jest złożoność analizy, pracochłonność oraz koszt, jednak metodologia NGS ciągle ewoluuje i się upraszcza. Dotyczy to również analizy danych. Dodatkowo tempo redukcji kosztów wykonania badania tą techniką systematycznie rośnie. W związku z tym należy oczekiwać, że już w niedługim czasie metoda ta prawdopodobnie wyprze wszystkie inne metody diagnostyczne. Zarówno ilość dostarczanych danych, jak i czułość metody są bezkonkurencyjne. Z punktu widzenia personalizacji terapii wielką zaletą NGS jest analiza większej liczby genów w jednym teście (od kilkunastu genów poprzez kilkaset, eksomy czy całe genomy) [147]. Inną wielką zaletą tej metody jest możliwość zastosowania do analizy DNA wyizolowanego z bloczków parafinowych (ryc. 3.). Obecnie w diagnostyce stosuje się panele genowe. W panelu analizuje się zwykle kilka do kilkudziesięciu genów w jednej reakcji. To rozwiązanie ekonomiczne, a przy tym dostarczające bardzo dużej liczby danych [148–150]. W 2013 r. jedno z urzędów dostało certyfikat do diagnostyki przyznany przez FDA [147]. Niewątpliwie przyszłość należy do technologii NGS.

9.6. Walidacja testów *home made*

W przypadku testów z wykorzystaniem metod, takich jak sekwencjonowanie metodą Sangera, HRM czy NGS, przed rozpoczęciem badań diagnostycznych konieczna jest walidacja metody. Walidacja metody polega na określeniu czułości, precyzji i dokładności. Czułość, czyli limit detekcji (*limit of detection* – LOD), oblicza się zwykle na podstawie próbek o znanej zawartości procentowej mutacji w przygotowanych na bazie DNA z nowotworowych linii komórkowych zmieszanych z DNA bez mutacji. Precyzję ocenia się poprzez powtarzanie analizy tej samej próbki w tym

samym eksperymencie, pomiędzy eksperymentami, pomiędzy operatorami i w różnym czasie oraz warunkach. Dokładność odnosi się do prawidłowego wykrycia i zaklasyfikowania w próbce referencyjnej mutacji lub braku mutacji. Ocenia się czułość i specyficzność testu. Wykorzystuje się próbki kliniczne wcześniej genotypowane zwalidowanymi metodami [151].

10. Zewnętrzna kontrola jakości

Złotym standardem w ocenie zdolności laboratorium do oceny mutacji jest zewnętrzna kontrola jakości (*external quality control* – EQC). W odniesieniu do mutacji w *KRAS*, *NRAS* i *BRAF* tego rodzaju kontrola prowadzona jest m.in. pod auspicjami *European Society of Pathology* (ESP) [152, 153]. Medycyna oparta na faktach w dziedzinie badań laboratoryjnych wymaga, aby ocena mutacji somatycznych oraz formułowanie wyniku takiego badania przez różne laboratoria, podlegały walidacji w programie EQC. Udział w zewnątrzlaboratoryjnej kontroli jakości pozwala na identyfikację błędów i ich eliminację, a zarazem na sprawdzenie i walidację zaadaptowanej metodologii i procesu diagnostycznego w laboratorium [133]. W celu zapewnienia odpowiednio wysokiej jakości oceny mutacji powinna być ona przeprowadzana zwalidowanymi metodami, najlepiej z wykorzystaniem testów zaaprobowanych do diagnostyki *in vitro* (CE-IVD) z obowiązkiem periodycznego uczestnictwa w programach EQA (*External Quality Assessment*) organizowanych przez niezależne organizacje europejskie, takie jak np. ESP.

11. Raport badania molekularnego

Raport badania molekularnego jest tylko jednym, ale bardzo ważnym elementem spośród 10 etapów badania molekularnego mutacji somatycznych, w które patolog i diagnosta laboratoryjny są zaangażowani [1]. Wynik badania ma znaczenie kliniczne, dlatego raport badania powinien być zrozumiały zarówno dla pacjenta, jak i dla lekarza (onkologa). Powinien być swego rodzaju syntezą wyników badania mikroskopowego i molekularnego (**raport zintegrowany**) i zawierać informacje zebrane w tabeli IV [16, 133, 152, 154–162]. Dlatego też optymalnym rozwiązaniem jest autoryzowanie wyniku jednocześnie przez patomorfologa i diagnostę laboratoryjnego (najczęściej biologa molekularnego). W tym układzie patomorfolog odpowiada przede wszystkim za właściwe rozpoznanie nowotworu i wybór najbardziej wartościowego materiału do analizy molekularnej, zaś diagnosta laboratoryjny (biolog molekularny) – za wybór i właściwą walidację użytych testów diagnostycznych oraz wynik badania molekularnego. Wspólnie ponoszą odpowiedzialności za interpretację wartości predykcyjnej wyniku przeprowadzonego

testu. Gdy stwierdzono występowanie mutacji, należy podać szczegółowo genotyp wg nomenklatury podanej w rekomendacjach *Human Genome Variation Society* (HGVS) [163]. Istotnym elementem raportu jest interpretacja znaczenia predykcyjnego wyników w kontekście danych klinicznych danego pacjenta. Interpretacja powinna opierać się na najnowszej literaturze przedmiotu, ponieważ rekomendacje precyzujące zasady kwalifikacji chorych na raka jelita grubego do odpowiedniej terapii ulegają zmianom w miarę, jak publikowane są nowe wyniki badań. Interpretacja wyników badania powinna ułatwić onkologowi podjęcie decyzji terapeutycznych.

Piśmiennictwo

- Domagala P, Hybiak J, Sulzyc-Bielicka V, et al. KRAS mutation testing in colorectal cancer as an example of the pathologist's role in personalized targeted therapy: a practical approach. *Pol J Pathol* 2012; 63: 145-164.
- Domagala P, Huzarski T, Lubinski J, et al. Immunophenotypic predictive profiling of BRCA1-associated breast cancer. *Virchows Arch* 2011; 458: 55-64.
- Kosmidou V, Oikonomou E, Vlasi M, et al. Tumor heterogeneity revealed by KRAS, BRAF, and PIK3CA pyrosequencing: KRAS and PIK3CA intratumor mutation profile differences and their therapeutic implications. *Hum Mutat* 2014; 35: 329-340.
- Dietel M, Johrens K, Laffert M, et al. Predictive molecular pathology and its role in targeted cancer therapy: a review focussing on clinical relevance. *Cancer Gene Ther* 2013; 20: 211-221.
- Lasota J, Kowalik A, Wasag B, et al. Detection of the BRAF V600E mutation in colon carcinoma: critical evaluation of the immunohistochemical approach. *Am J Surg Pathol* 2014; 38: 1235-1241.
- Cathomas G. PIK3CA in colorectal cancer. *Front Oncol* 2014; 4: 35.
- Sorich MJ, Wiese MD, Rowland A, et al. Extended RAS mutations and anti-EGFR monoclonal antibody survival benefit in metastatic colorectal cancer: a meta-analysis of randomized, controlled trials. *Ann Oncol* 2015; 26: 13-21.
- Paradiso A, Simone G, Petroni S, et al. Thymidilate synthase and p53 primary tumour expression as predictive factors for advanced colorectal cancer patients. *Br J Cancer* 2000; 82: 560-567.
- Sulzyc-Bielicka V, Domagala P, Bielicki D, et al. Thymidylate synthase expression and p21(WAF1)/p53 phenotype of colon cancers identify patients who may benefit from 5-fluorouracil based therapy. *Cell Oncol (Dordr)* 2014; 37: 17-28.
- Sulzyc-Bielicka V, Domagala P, Urasinska E, et al. Expression of p21WAF1 in Astler-Coller stage B2 colorectal cancer is associated with survival benefit from 5FU-based adjuvant chemotherapy. *Virchows Arch* 2011; 458: 431-438.
- Showalter SL, Showalter TN, Witkiewicz A, et al. Evaluating the drug-target relationship between thymidylate synthase expression and tumor response to 5-fluorouracil. Is it time to move forward? *Cancer Biol Ther* 2008; 7: 986-994.
- Laurent-Puig P, Cayre A, Manceau G, et al. Analysis of PTEN, BRAF, and EGFR status in determining benefit from cetuximab therapy in wild-type KRAS metastatic colon cancer. *J Clin Oncol* 2009; 27: 5924-5930.
- Takai Y, Sasaki T, Matozaki T. Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev* 2001; 81: 153-208.
- Grossmann AH, Samowitz WS. Epidermal growth factor receptor pathway mutations and colorectal cancer therapy. *Arch Pathol Lab Med* 2011; 135: 1278-1282.

15. Harari PM, Allen GW, Bonner JA. Biology of interactions: anti-epidermal growth factor receptor agents. *J Clin Oncol* 2007; 25: 4057-4065.
16. Allegra CJ, Jessup JM, Somerfield MR, et al. American Society of Clinical Oncology provisional clinical opinion: testing for KRAS gene mutations in patients with metastatic colorectal carcinoma to predict response to anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody therapy. *J Clin Oncol* 2009; 27: 2091-2096.
17. Karapetis CS, Khambata-Ford S, Jonker DJ, et al. K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. *N Engl J Med* 2008; 359: 1757-1765.
18. Amado RG, Wolf M, Peeters M, et al. Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2008; 26: 1626-1634.
19. Nowak F, Soria JC, Calvo F. Tumour molecular profiling for deciding therapy-the French initiative. *Nat Rev Clin Oncol* 2012; 9: 479-486.
20. Lievre A, Bachet JB, Le Corre D, et al. KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer. *Cancer Res* 2006; 66: 3992-3995.
21. Morris VK, Lucas FA, Overman MJ, et al. Clinicopathologic characteristics and gene expression analyses of non-KRAS 12/13, RAS-mutated metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol* 2014; 25: 2008-2014.
22. Wong NA, Gonzalez D, Salto-Tellez M, et al. RAS testing of colorectal carcinoma-a guidance document from the Association of Clinical Pathologists Molecular Pathology and Diagnostics Group. *J Clin Pathol* 2014; 67: 751-757.
23. Douillard JY, Oliner KS, Siena S, et al. Panitumumab-FOLFOX4 treatment and RAS mutations in colorectal cancer. *N Engl J Med* 2013; 369: 1023-1034.
24. Molinari F, Felicioni L, Buscarino M, et al. Increased detection sensitivity for KRAS mutations enhances the prediction of anti-EGFR monoclonal antibody resistance in metastatic colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2011; 17: 4901-4914.
25. Bando H, Yoshino T, Tsuchihara K, et al. KRAS mutations detected by the amplification refractory mutation system-Scorpion assays strongly correlate with therapeutic effect of cetuximab. *Br J Cancer* 2011; 105: 403-406.
26. Malapelle U, Carlomagno C, Salatiello M, et al. KRAS mutation detection by high-resolution melting analysis significantly predicts clinical benefit of cetuximab in metastatic colorectal cancer. *Br J Cancer* 2012; 107: 626-631.
27. Kimura T, Okamoto K, Miyamoto H, et al. Clinical benefit of high-sensitivity KRAS mutation testing in metastatic colorectal cancer treated with anti-EGFR antibody therapy. *Oncology* 2012; 82: 298-304.
28. Misale S, Yaeger R, Hobor S, et al. Emergence of KRAS mutations and acquired resistance to anti-EGFR therapy in colorectal cancer. *Nature* 2012; 486: 532-536.
29. Tougeron D, Lecomte T, Pages JC, et al. Effect of low-frequency KRAS mutations on the response to anti-EGFR therapy in metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol* 2013; 24: 1267-1273.
30. Natalicchio MI, Improta G, Zupa A, et al. Pyrosequencing evaluation of low-frequency KRAS mutant alleles for EGF receptor therapy selection in metastatic colorectal carcinoma. *Future Oncol* 2014; 10: 713-723.
31. Shan L, Li M, Ma J, et al. PCR-based assays versus direct sequencing for evaluating the effect of KRAS status on anti-EGFR treatment response in colorectal cancer patients: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One* 2014; 9: e107926.
32. Parsons BL, Myers MB. Personalized cancer treatment and the myth of KRAS wild-type colon tumors. *Discov Med* 2013; 15: 259-267.
33. Brand TM, Wheeler DL. KRAS mutant colorectal tumors: past and present. *Small GTPases* 2012; 3: 34-39.
34. De Roock W, Claes B, Bernasconi D, et al. Effects of KRAS, BRAF, NRAS, and PIK3CA mutations on the efficacy of cetuximab plus chemotherapy in chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer: a retrospective consortium analysis. *Lancet Oncol* 2010; 11: 753-762.
35. De Roock W, De Vriendt V, Normanno N, et al. KRAS, BRAF, PIK3CA, and PTEN mutations: implications for targeted therapies in metastatic colorectal cancer. *Lancet Oncol* 2011; 12: 594-603.
36. Vaughn CP, Zobell SD, Furtado LV, et al. Frequency of KRAS, BRAF, and NRAS mutations in colorectal cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 2011; 50: 307-312.
37. Custodio A, Feliu J. Prognostic and predictive biomarkers for epidermal growth factor receptor-targeted therapy in colorectal cancer: beyond KRAS mutations. *Crit Rev Oncol Hematol* 2013; 85: 45-81.
38. Irahara N, Baba Y, Noshio K, et al. NRAS mutations are rare in colorectal cancer. *Diagn Mol Pathol* 2010; 19: 157-163.
39. Haigis KM, Kendall KR, Wang Y, et al. Differential effects of oncogenic K-Ras and N-Ras on proliferation, differentiation and tumor progression in the colon. *Nat Genet* 2008; 40: 600-608.
40. Davies H, Bignell GR, Cox C, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 2002; 417: 949-954.
41. Xing M. BRAF mutation in thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer* 2005; 12: 245-262.
42. Walczyk A, Kowalska A, Kowalik A, et al. The BRAF(V600E) mutation in papillary thyroid microcarcinoma: does the mutation have an impact on clinical outcome? *Clin Endocrinol (Oxf)* 2014; 80: 899-904.
43. Venderbosch S, Nagtegaal ID, Maughan TS, et al. Mismatch Repair Status and BRAF Mutation Status in Metastatic Colorectal Cancer Patients: A Pooled Analysis of the CAIRO, CAIRO2, COIN, and FOCUS Studies. *Clin Cancer Res* 2014; 20: 5322-5330.
44. Di Nicolantonio F, Martini M, Molinari F, et al. Wild-type BRAF is required for response to panitumumab or cetuximab in metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2008; 26: 5705-5712.
45. Weisenberger DJ, Siegmund KD, Campan M, et al. CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer. *Nat Genet* 2006; 38: 787-793.
46. Spring KJ, Zhao ZZ, Karamatic R, et al. High prevalence of sessile serrated adenomas with BRAF mutations: a prospective study of patients undergoing colonoscopy. *Gastroenterology* 2006; 131: 1400-1407.
47. Mesteri I, Bayer G, Meyer J, et al. Improved molecular classification of serrated lesions of the colon by immunohistochemical detection of BRAF V600E. *Mod Pathol* 2014; 27: 135-144.
48. Courtney KD, Corcoran RB, Engelman JA. The PI3K pathway as drug target in human cancer. *J Clin Oncol* 2010; 28: 1075-1083.
49. Samuels Y, Wang Z, Bardelli A, et al. High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. *Science* 2004; 304: 554.
50. Rosty C, Young JP, Walsh MD, et al. PIK3CA activating mutation in colorectal carcinoma: associations with molecular features and survival. *PLoS One* 2013; 8: e65479.
51. Sartore-Bianchi A, Martini M, Molinari F, et al. PIK3CA mutations in colorectal cancer are associated with clinical resistance to EGFR-targeted monoclonal antibodies. *Cancer Res* 2009; 69: 1851-1857.
52. Ogino S, Noshio K, Kirkner GJ, et al. PIK3CA mutation is associated with poor prognosis among patients with curatively resected colon cancer. *J Clin Oncol* 2009; 27: 1477-1484.
53. Sood A, McClain D, Maitra R, et al. PTEN gene expression and mutations in the PIK3CA gene as predictors of clinical

- benefit to anti-epidermal growth factor receptor antibody therapy in patients with KRAS wild-type metastatic colorectal cancer. *Clin Colorectal Cancer* 2012; 11: 143-150.
54. Razis E, Pentheroudakis G, Rigakos G, et al. EGFR gene gain and PTEN protein expression are favorable prognostic factors in patients with KRAS wild-type metastatic colorectal cancer treated with cetuximab. *J Cancer Res Clin Oncol* 2014; 140: 737-748.
 55. Gonsalves WI, Mahoney MR, Sargent DJ, et al. Patient and tumor characteristics and BRAF and KRAS mutations in colon cancer, NCCTG/Alliance N0147. *J Natl Cancer Inst* 2014; 106: dju106.
 56. El-Chaar NN, Piccolo SR, Boucher KM, et al. Genomic classification of the RAS network identifies a personalized treatment strategy for lung cancer. *Mol Oncol* 2014; 8: 1339-1354.
 57. Pino MS, Chung DC. Microsatellite instability in the management of colorectal cancer. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 2011; 5: 385-399.
 58. Umar A, Boland CR, Terdiman JP, et al. Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *J Natl Cancer Inst* 2004; 96: 261-268.
 59. Cunningham JM, Kim CY, Christensen ER, et al. The frequency of hereditary defective mismatch repair in a prospective series of unselected colorectal carcinomas. *Am J Hum Genet* 2001; 69: 780-790.
 60. Popat S, Hubner R, Houlston RS. Systematic review of microsatellite instability and colorectal cancer prognosis. *J Clin Oncol* 2005; 23: 609-618.
 61. Dolcetti R, Viel A, Doglioni C, et al. High prevalence of activated intraepithelial cytotoxic T lymphocytes and increased neoplastic cell apoptosis in colorectal carcinomas with microsatellite instability. *Am J Pathol* 1999; 154: 1805-1813.
 62. Schwitalle Y, Kloor M, Eiermann S, et al. Immune response against frameshift-induced neopeptides in HNPCC patients and healthy HNPCC mutation carriers. *Gastroenterology* 2008; 134: 988-997.
 63. Ribic CM, Sargent DJ, Moore MJ, et al. Tumor microsatellite-instability status as a predictor of benefit from fluorouracil-based adjuvant chemotherapy for colon cancer. *N Engl J Med* 2003; 349: 247-257.
 64. Sargent DJ, Marsoni S, Monges G, et al. Defective mismatch repair as a predictive marker for lack of efficacy of fluorouracil-based adjuvant therapy in colon cancer. *J Clin Oncol* 2010; 28: 3219-3226.
 65. Whitehall VL, Wynter CV, Walsh MD, et al. Morphological and molecular heterogeneity within nonmicrosatellite instability-high colorectal cancer. *Cancer Res* 2002; 62: 6011-6014.
 66. Vilar E, Scaltriti M, Balmana J, et al. Microsatellite instability due to hMLH1 deficiency is associated with increased cytotoxicity to irinotecan in human colorectal cancer cell lines. *Br J Cancer* 2008; 99: 1607-1612.
 67. Dedes KJ, Wilkerson PM, Wetterskog D, et al. Synthetic lethality of PARP inhibition in cancers lacking BRCA1 and BRCA2 mutations. *Cell Cycle* 2011; 10: 1192-1199.
 68. Sulzyc-Bielicka V, Domagala P, Hybiak J, et al. Colorectal cancers differ in respect of PARP-1 protein expression. *Pol J Pathol* 2012; 63: 87-92.
 69. Vilar E, Mukherjee B, Kuick R, et al. Gene expression patterns in mismatch repair-deficient colorectal cancers highlight the potential therapeutic role of inhibitors of the phosphatidylinositol 3-kinase-AKT-mammalian target of rapamycin pathway. *Clin Cancer Res* 2009; 15: 2829-2839.
 70. Shia J. Immunohistochemistry versus microsatellite instability testing for screening colorectal cancer patients at risk for hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome. Part I. The utility of immunohistochemistry. *J Mol Diagn* 2008; 10: 293-300.
 71. Roepman P, Schlicker A, Taberero J, et al. Colorectal cancer intrinsic subtypes predict chemotherapy benefit, deficient mismatch repair and epithelial-to-mesenchymal transition. *Int J Cancer* 2014; 134: 552-562.
 72. Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature* 2012; 487: 330-337.
 73. Perez-Villamil B, Romera-Lopez A, Hernandez-Prieto S, et al. Colon cancer molecular subtypes identified by expression profiling and associated to stroma, mucinous type and different clinical behavior. *BMC Cancer* 2012; 12: 260. doi: 10.1186/1471-2407-12-260.
 74. Sadanandam A, Lyssiotis CA, Homicsko K, et al. A colorectal cancer classification system that associates cellular phenotype and responses to therapy. *Nat Med* 2013; 19: 619-625.
 75. Sadanandam A, Wang X, de Sousa E Melo F, et al. Reconciliation of classification systems defining molecular subtypes of colorectal cancer: interrelationships and clinical implications. *Cell Cycle* 2014; 13: 353-357.
 76. Ogino S, Meyerhardt JA, Irahara N, et al. KRAS mutation in stage III colon cancer and clinical outcome following intergroup trial CALGB 89803. *Clin Cancer Res* 2009; 15: 7322-7329.
 77. Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2011; 61: 69-90.
 78. Pantel K, Alix-Panabieres C, Riethdorf S. Cancer micrometastases. *Nat Rev Clin Oncol* 2009; 6: 339-351.
 79. Ashworth, TR. A case of cancer in which cells similar to those in the tumours were seen in the blood after death. *Australian Med Journal* 1869; 14: 146-7.
 80. Valastyan S, Weinberg RA. Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. *Cell* 2011; 147: 275-292.
 81. Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, et al. Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *N Engl J Med* 2004; 351: 781-791.
 82. Cohen SJ, Punt CJ, Iannotti N, et al. Relationship of circulating tumor cells to tumor response, progression-free survival, and overall survival in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2008; 26: 3213-3221.
 83. Lu CY, Tsai HL, Uen YH, et al. Circulating tumor cells as a surrogate marker for determining clinical outcome to mFOLFOX chemotherapy in patients with stage III colon cancer. *Br J Cancer* 2013; 108: 791-797.
 84. Torino F, Bonmassar E, Bonmassar L, et al. Circulating tumor cells in colorectal cancer patients. *Cancer Treat Rev* 2013; 39: 759-772.
 85. Lim SH, Becker TM, Chua W, et al. Circulating tumour cells and circulating free nucleic acid as prognostic and predictive biomarkers in colorectal cancer. *Cancer Lett* 2014; 346: 24-33.
 86. Crowley E, Di Nicolantonio F, Loupakis F, et al. Liquid biopsy: monitoring cancer-genetics in the blood. *Nat Rev Clin Oncol* 2013; 10: 472-484.
 87. Schwarzenbach H, Hoon DS, Pantel K. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nat Rev Cancer* 2011; 11: 426-437.
 88. Leary RJ, Sausen M, Kinde I, et al. Detection of chromosomal alterations in the circulation of cancer patients with whole-genome sequencing. *Sci Transl Med* 2012; 4: 162ra154.
 89. Bettgowda C, Sausen M, Leary RJ, et al. Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Sci Transl Med* 2014; 6: 224ra24.
 90. Thierry AR, Mouliere F, El Messaoudi S, et al. Clinical validation of the detection of KRAS and BRAF mutations from circulating tumor DNA. *Nat Med* 2014; 20: 430-435.
 91. Mouliere F, Robert B, Arnau Peyrotte E, et al. High fragmentation characterizes tumour-derived circulating DNA. *PLoS One* 2011; 6: e23418.

92. Hao TB, Shi W, Shen XJ, et al. Circulating cell-free DNA in serum as a biomarker for diagnosis and prognostic prediction of colorectal cancer. *Br J Cancer* 2014; 111: 1482-1489.
93. Diehl F, Li M, Dressman D, et al. Detection and quantification of mutations in the plasma of patients with colorectal tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 16368-16373.
94. Diaz LA, Jr, Williams RT, Wu J, et al. The molecular evolution of acquired resistance to targeted EGFR blockade in colorectal cancers. *Nature* 2012; 486: 537-540.
95. Perrone F, Lampis A, Bertan C, et al. Circulating free DNA in a screening program for early colorectal cancer detection. *Tumori* 2014; 100:115-121.
96. Newman AM, Bratman SV, To J, et al. An ultrasensitive method for quantitating circulating tumor DNA with broad patient coverage. *Nat Med* 2014; 20: 548-554.
97. National Comprehensive Cancer Network. NCCN clinical practice guidelines in oncology: colon cancer V2.2015. Dostępne na: www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/colon.pdf (dostęp 5.12.2014).
98. Spano JP, Lagorce C, Atlan D, et al. Impact of EGFR expression on colorectal cancer patient prognosis and survival. *Ann Oncol* 2005; 16: 102-108.
99. McKay JA, Murray LJ, Curran S, et al. Evaluation of the epidermal growth factor receptor (EGFR) in colorectal tumours and lymph node metastases. *Eur J Cancer* 2002; 38: 2258-2264.
100. Ensinger C, Sterlacci W. Implications of EGFR PharmDx kit for cetuximab eligibility. *Expert Rev Mol Diagn* 2008; 8: 141-148.
101. Chung KY, Shia J, Kemeny NE, et al. Cetuximab shows activity in colorectal cancer patients with tumors that do not express the epidermal growth factor receptor by immunohistochemistry. *J Clin Oncol* 2005; 23: 1803-1810.
102. Saltz LB, Meropol NJ, Loehrer PJ S, et al. Phase II trial of cetuximab in patients with refractory colorectal cancer that expresses the epidermal growth factor receptor. *J Clin Oncol* 2004; 22: 1201-1208.
103. Kang MJ, Hong YS, Kim KP, et al. Biweekly cetuximab plus irinotecan as second-line chemotherapy for patients with irinotecan-refractory and KRAS wild-type metastatic colorectal cancer according to epidermal growth factor receptor expression status. *Invest New Drugs* 2012; 30: 1607-1613.
104. Hecht JR, Mitchell E, Neubauer MA, et al. Lack of correlation between epidermal growth factor receptor status and response to Panitumumab monotherapy in metastatic colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2010; 16: 2205-2213.
105. Atkins D, Reiffen KA, Tegtmeier CL, et al. Immunohistochemical detection of EGFR in paraffin-embedded tumor tissues: variation in staining intensity due to choice of fixative and storage time of tissue sections. *J Histochem Cytochem* 2004; 52: 893-901.
106. Younes M. Is immunohistochemistry for epidermal growth factor receptor expression a poor predictor of response to epidermal growth factor receptor-targeted therapy? *J Clin Oncol* 2005; 23: 923; author reply 923-924.
107. Lax I, Bellot F, Howk R, et al. Functional analysis of the ligand binding site of EGF-receptor utilizing chimeric chicken/human receptor molecules. *EMBO J* 1989; 8: 421-427.
108. Mattoon D, Klein P, Lemmon MA, et al. The tethered configuration of the EGF receptor extracellular domain exerts only a limited control of receptor function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 923-928.
109. Obwieszczenie Ministra Zdrowia z dnia 1 stycznia 2015 r. w sprawie wykazu refundowanych leków, środków spożywczych specjalnego przeznaczenia żywieniowego oraz wyrobów medycznych. Dostępne na: http://www.bip.mz.gov.pl/_data/assets/pdf_file/0004/26842/Zalacznik-dobwieszczenia.pdf (dostęp 8.01.2015 r.).
110. Marchetti A, Milella M, Felicioni L, et al. Clinical implications of KRAS mutations in lung cancer patients treated with tyrosine kinase inhibitors: an important role for mutations in minor clones. *Neoplasia* 2009; 11: 1084-1092.
111. Turner NC, Reis-Filho JS. Genetic heterogeneity and cancer drug resistance. *Lancet Oncol* 2012; 13: e178-85.
112. Palmirotta R, Ludovici G, De Marchis ML, et al. A comprehensive procedural approach to genotyping KRAS and BRAF from paraffin embedded tissues for diagnostic purposes. *In Vivo* 2012; 26: 537-547.
113. Giaretti W, Monaco R, Pujic N, et al. Intratumor heterogeneity of K-ras2 mutations in colorectal adenocarcinomas: association with degree of DNA aneuploidy. *Am J Pathol* 1996; 149: 237-245.
114. Losi L, Baisse B, Bouzourene H, et al. Evolution of intratumoral genetic heterogeneity during colorectal cancer progression. *Carcinogenesis* 2005; 26: 916-922.
115. Baldus SE, Schaefer KL, Engers R, et al. Prevalence and heterogeneity of KRAS, BRAF, and PIK3CA mutations in primary colorectal adenocarcinomas and their corresponding metastases. *Clin Cancer Res* 2010; 16: 790-799.
116. Goranova TE, Ohue M, Shimoharu Y, et al. Dynamics of cancer cell subpopulations in primary and metastatic colorectal tumors. *Clin Exp Metastasis* 2011; 28: 427-435.
117. Richman SD, Chambers P, Seymour MT, et al. Intra-tumoral heterogeneity of KRAS and BRAF mutation status in patients with advanced colorectal cancer (aCRC) and cost-effectiveness of multiple sample testing. *Anal Cell Pathol (Amst)* 2011; 34: 61-66.
118. Fadhil W, Ibrahim S, Seth R, et al. The utility of diagnostic biopsy specimens for predictive molecular testing in colorectal cancer. *Histopathology* 2012; 61: 1117-1124.
119. Hammond ME, Hayes DE, Dowsett M, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer (unabridged version). *Arch Pathol Lab Med* 2010; 134: e48-72.
120. Han CB, Li F, Ma JT, et al. Concordant KRAS mutations in primary and metastatic colorectal cancer tissue specimens: a meta-analysis and systematic review. *Cancer Invest* 2012; 30: 741-747.
121. Brannon AR, Vakiiani E, Sylvester BE, et al. Comparative sequencing analysis reveals high genomic concordance between matched primary and metastatic colorectal cancer lesions. *Genome Biol* 2014; 15: 454, doi: 10.1186/s13059-014-0454-7.
122. Kim MJ, Lee HS, Kim JH, et al. Different metastatic pattern according to the KRAS mutational status and site-specific discordance of KRAS status in patients with colorectal cancer. *BMC Cancer* 2012; 12: 347, doi: 10.1186/1471-2407-12-347.
123. Srinivasan M, Sedmak D, Jewell S. Effect of fixatives and tissue processing on the content and integrity of nucleic acids. *Am J Pathol* 2002; 161: 1961-1971.
124. Williams C, Ponten F, Moberg C, et al. A high frequency of sequence alterations is due to formalin fixation of archival specimens. *Am J Pathol* 1999; 155: 1467-1471.
125. Do H, Dobrovic A. Dramatic reduction of sequence artefacts from DNA isolated from formalin-fixed cancer biopsies by treatment with uracil-DNA glycosylase. *Oncotarget* 2012; 3: 546-558.
126. Do H, Wong SQ, Li J, et al. Reducing sequence artifacts in amplicon-based massively parallel sequencing of formalin-fixed paraffin-embedded DNA by enzymatic depletion of uracil-containing templates. *Clin Chem* 2013; 59: 1376-1383.
127. Do H, Dobrovic A. Sequence Artifacts in DNA from Formalin-Fixed Tissues: Causes and Strategies for Minimization. *Clin Chem* 2015; 61: 64-71.

128. Ross JS. Clinical implementation of KRAS testing in metastatic colorectal carcinoma: the pathologist's perspective. *Arch Pathol Lab Med* 2012; 136: 1298-1307.
129. Kristiansen G. Manual microdissection. *Methods Mol Biol* 2010; 576: 31-38.
130. Burgemeister R. Nucleic acids extraction from laser microdissected FFPE tissue sections. *Methods Mol Biol* 2011; 724: 117-129.
131. Ludyga N, Grunwald B, Azimzadeh O, et al. Nucleic acids from long-term preserved FFPE tissues are suitable for downstream analyses. *Virchows Arch* 2012; 460: 131-140.
132. Morikawa T, Shima K, Kuchiba A, et al. No evidence for interference of h&e staining in DNA testing: usefulness of DNA extraction from H&E-stained archival tissue sections. *Am J Clin Pathol* 2012; 138: 122-129.
133. Bellon E, Ligtenberg MJ, Tejpar S, et al. External quality assessment for KRAS testing is needed: setup of a European program and report of the first joined regional quality assessment rounds. *Oncologist* 2011; 16: 467-478.
134. Dequeker E, Ligtenberg MJ, Vander Borghet S, et al. Mutation analysis of KRAS prior to targeted therapy in colorectal cancer: development and evaluation of quality by a European external quality assessment scheme. *Virchows Arch* 2011; 459: 155-160.
135. Kapp JR, Diss T, Spicer J, et al. Variation in pre-PCR processing of FFPE samples leads to discrepancies in BRAF and EGFR mutation detection: a diagnostic RING trial. *J Clin Pathol* 2014; pii: jclinpath-2014-202644, doi: 10.1136/jclinpath-2014-202644.
136. Gonzalez de Castro D, Angulo B, Gomez B, et al. A comparison of three methods for detecting KRAS mutations in formalin-fixed colorectal cancer specimens. *Br J Cancer* 2012; 107: 345-351.
137. Weichert W, Schewe C, Lehmann A, et al. KRAS genotyping of paraffin-embedded colorectal cancer tissue in routine diagnostics: comparison of methods and impact of histology. *J Mol Diagn* 2010; 12: 35-42.
138. Dufort S, Richard MJ, de Fraipont F. Pyrosequencing method to detect KRAS mutation in formalin-fixed and paraffin-embedded tumor tissues. *Anal Biochem* 2009; 391: 166-168.
139. Sundström M, Edlund K, Lindell M, et al. KRAS analysis in colorectal carcinoma: analytical aspects of Pyrosequencing and allele-specific PCR in clinical practice. *BMC Cancer* 2010; 10: 660, doi: 10.1186/1471-2407-10-660.
140. Carbonell P, Turpin MC, Torres-Moreno D, et al. Comparison of allelic discrimination by dHPLC, HRM, and TaqMan in the detection of BRAF mutation V600E. *J Mol Diagn* 2011; 13: 467-473.
141. Wittwer CT. High-resolution DNA melting analysis: advancements and limitations. *Hum Mutat* 2009; 30: 857-859.
142. Do H, Krypuy M, Mitchell PL, et al. High resolution melting analysis for rapid and sensitive EGFR and KRAS mutation detection in formalin fixed paraffin embedded biopsies. *BMC Cancer* 2008; 8: 142, doi: 10.1186/1471-2407-8-142.
143. Negru S, Papadopoulou E, Apeessos A, et al. KRAS, NRAS and BRAF mutations in Greek and Romanian patients with colorectal cancer: a cohort study. *BMJ Open* 2014; 4: e004652.
144. Morlan J, Baker J, Sinicropi D. Mutation detection by real-time PCR: a simple, robust and highly selective method. *PLoS One* 2009; 4: e4584.
145. Koroula V, Charalambous E, Biesmans B, et al. Targeted KRAS mutation assessment on patient tumor histologic material in real time diagnostics. *PLoS One* 2009; 4: e7746.
146. Metzker ML. Sequencing technologies – the next generation. *Nat Rev Genet* 2010; 11: 31-46.
147. Bahassi el M, Stambrook PJ. Next-generation sequencing technologies: breaking the sound barrier of human genetics. *Mutagenesis* 2014; 29: 303-310.
148. Malapelle U, Vigliar E, Sgariglia R, et al. Ion Torrent next-generation sequencing for routine identification of clinically relevant mutations in colorectal cancer patients. *J Clin Pathol* 2015; 68: 64-68.
149. Mafficini A, Amato E, Fassin M, et al. Reporting tumor molecular heterogeneity in histopathological diagnosis. *PLoS One* 2014; 9: e104979.
150. Singh RR, Patel KP, Routbort MJ, et al. Clinical massively parallel next-generation sequencing analysis of 409 cancer-related genes for mutations and copy number variations in solid tumours. *Br J Cancer* 2014; 111: 2014-2023.
151. Mattocks CJ, Morris MA, Matthijs G, et al. A standardized framework for the validation and verification of clinical molecular genetic tests. *Eur J Hum Genet* 2010; 18: 1276-1288.
152. Tembuyser L, Ligtenberg MJ, Normanno N, et al. Higher quality of molecular testing, an unfulfilled priority: Results from external quality assessment for KRAS mutation testing in colorectal cancer. *J Mol Diagn* 2014; 16: 371-377.
153. van Krieken JH, Jung A, Kirchner T, et al. KRAS mutation testing for predicting response to anti-EGFR therapy for colorectal carcinoma: proposal for an European quality assurance program. *Virchows Arch* 2008; 453: 417-431.
154. Aubin F, Gill S, Burkes R, et al. Canadian Expert Group consensus recommendations: KRAS testing in colorectal cancer. *Curr Oncol* 2011; 18: e180-e184.
155. Gulley ML, Brazier RM, Halling KC, et al. Clinical laboratory reports in molecular pathology. *Arch Pathol Lab Med* 2007; 131: 852-863.
156. Scheuner MT, Hilborne L, Brown J, et al. A report template for molecular genetic tests designed to improve communication between the clinician and laboratory. *Genet Test Mol Biomarkers* 2012; 16: 761-769.
157. Plessec TP, Hunt JL. KRAS mutation testing in colorectal cancer. *Adv Anat Pathol* 2009; 16: 196-203.
158. ISO 15189:2012. Medical laboratories – Particular requirements for quality and competence. Geneva: International Organization for Standardization.
159. Organisation for Economic Co-operation and Development. OECD guidelines for quality assurance in molecular genetic testing. Dostępne na: www.oecd.org/science/bio-tech/38839788.pdf. Published 2007 (dostęp 5.12.2014).
160. European Molecular Genetics Quality Network. Final Report 2011 (Round 2) Pilot EQA scheme for EGFR mutation testing in non-small cell lung cancer. Dostępne na: <http://www.amoydx.com/down/EGFR%20NEW%20Final%20Report%202011%20R2%20v3.pdf>. Published May 17, 2012 (dostęp 20.12.2014).
161. Cree IA, Deans Z, Ligtenberg MJ, et al. Guidance for laboratories performing molecular pathology for cancer patients. *J Clin Pathol* 2014; 67: 923-931.
162. European Society of Pathology. General raport. ESP colon external quality assessment scheme 2013. Dostępne na: <http://kras.eqascheme.org>. Published 12.08.2014 (dostęp 20.12.2014).
163. Taschner PE, den Dunnen JT. Describing structural changes by extending HGVS sequence variation nomenclature. *Hum Mutat* 2011; 32: 507-511.