

Ocena częstości występowania mutacji w genie EGFR i współwystępowania mutacji EGFR i KRAS metodą reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym u chorych na raka gruczołowego płuca – czy kliniczno-patologiczny model kwalifikacji pacjenta do leczenia celowanego może mieć wpływ na czas uzyskania wyniku genetycznego?



Analysis of EGFR mutation frequency and coexistence of KRAS and EGFR mutations using RT-PCR in lung adenocarcinoma: may a clinical and pathological model of a patient's qualification for targeted therapy have an impact on time to obtain genetic results?

Marzena Anna Lewandowska^{1,2}, Wojciech Józwicki^{1,3}, Jarosław Starzyński¹, Janusz Kowalewski^{2,4}

¹Zakład Patologii Nowotworów i Patomorfologii, Pracownia Genetyki i Onkologii Molekularnej

Centrum Onkologii im. prof. Franciszka Łukaszczyka w Bydgoszczy

²Katedra i Klinika Chirurgii Klatki Piersiowej i Nowotworów, *Collegium Medicum* im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu

³Zakład Patologii Nowotworów i Patomorfologii, *Collegium Medicum* im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu

⁴Oddział Kliniczny Chirurgii Klatki Piersiowej i Nowotworów Centrum Onkologii im. prof. Franciszka Łukaszczyka w Bydgoszczy

Kardiochirurgia i Torakochirurgia Polska 2012; 9 (4): 443–451

Streszczenie

W Polsce rak płuca jest najczęstszą przyczyną zgonów spowodowanych chorobą nowotworową wśród mężczyzn, a od 2009 r. także wśród kobiet. W niedrobnokomórkowym raku płuca (NDRP) może dojść do nieprawidłowości w metabolizmie genu EGFR, takich jak silna ekspresja białka EGFR, amplifikacje lub mutacje somatyczne w domenie kinazy tyrozynowej (TK). Leczenie chorych z mutacją aktywującą w genie EGFR inhibitorami TK EGFR jest skuteczniejsze niż standardowa chemioterapia, ale kluczem do sukcesu jest prawidłowa kwalifikacja pacjenta, realizowana dzięki współpracy interdyscyplinarnego zespołu torakochirurgów, patomorfologów, genetyków – biologów molekularnych i onkologów.

Kwalifikacja pacjentów do badania obejmowała ocenę kliniczną oraz patomorfologiczną. Badanie genetyczne wykonano przy użyciu metody *real-time* PCR. Do analizy najczęstszych 29 mutacji w genie EGFR i 7 najczęstszych mutacji w genie KRAS użyto odpowiednio sond hydrolizujących i hybrydujących. U dziesięciu z 77 pacjentów wykryto mutację aktywującą, w przeważającej większości w eksonach 19 i 21, co stanowi

Abstract

In Poland, lung cancer is the most common cause of cancer deaths among men, and since 2009 in women as well. Non-small cell lung carcinoma (NSCLC) can lead to abnormalities in the metabolism of EGFR, such as strong EGFR protein expression, amplification or presence of somatic mutations in the tyrosine kinase domain (TK). Targeted therapy (EGFR TK inhibitors) for patients diagnosed with activating EGFR mutations is more effective than standard chemotherapy, but the key to success is proper classification of the patient, carried out through the cooperation of an interdisciplinary team: thoracic surgeons, pathologists, geneticists/molecular biologists and oncologists. Eligibility for the study included clinical and pathological assessment. Genetic testing was performed using real-time PCR: we analysed 29 most common EGFR mutations (Entrogen) and 9 most common KRAS mutations (TibMolBiol). Activating mutations were identified in 10 of the 77 patients (13%) in exons 18,19, 20 or 21, but the vast majority in exons 19 and 21. In patients with EGFR mutation we detected wild-type KRAS, which suggests distinct tumor biology.

Adres do korespondencji: dr n. med. Marzena Anna Lewandowska, ul. Romanowskiej 2, 85-796 Bydgoszcz, tel. +48 52 374 33 38, e-mail: lewandowskam@co.bydgoszcz.pl

13% mutacji występujących w eksonach 18,19, 20 lub 21 genu EGFR. U tych pacjentów nie znaleziono mutacji w genie KRAS, co sugeruje biologiczną odrębność nowotworu.

Średni czas oczekiwania na wynik genetyczny z materiału tkankowego i cytologicznego wyniósł 9 dni.

Ocena molekularna tkanki nowotworowej pozwala na dostosowanie chemioterapeutyku do biologii guza, co jest zgodne z intencją medycyny personalizowanej. Dobra współpraca chirurga, patologa i diagnosty genetyka daje możliwość skrócenia czasu oczekiwania na terapię celowaną.

Słowa kluczowe: NDRP, terapia celowana, personalizowana onkologia, EGFR.

Wstęp

Niedrobnokomórkowy rak płuca (NDRP) jest najczęstszą nowotworową przyczyną zgonu na świecie, powodując ok. 1,0 mln zgonów rocznie [1]. Na raka płuca umiera więcej chorych niż na 4 następne w kolejności występowania nowotwory razem wzięte. Wyleczenie chorego z raka płuca zależy głównie od leczenia operacyjnego, ale do tej formy leczenia kwalifikuje się zaledwie 15% chorych. Mikroskopowo 3 typy histologiczne raka: płaskonabłonkowy, gruczolowy oraz wielkokomórkowy stanowią ponad 95% wszystkich NDRP.

Resekcja anatomiczna mięszu płucnego z guzem jest postępowaniem z wyboru we wczesnych stopniach klinicznego zaawansowania. Przeżycie 5-letnie po tym leczeniu w stopniu IA wynosi 66–84%, w stopniu IB 56–68%, zaś w II stopniu zaawansowania 37–45% [2, 3]. Radykalne leczenie operacyjne u chorych w III i IV stopniu zaawansowania jest stosowane rzadziej i dotyczy tylko wybranych pacjentów [3, 4]. W rezultacie ok. 80% pacjentów z NDRP nie zostaje zakwalifikowanych do leczenia chirurgicznego. U chorych w stopniu IIIA z udokumentowaną cechą N2, których potencjalnie można zakwalifikować do lobektomii, operacja powinna być poprzedzona neoadjuwantową chemioterapią, a leczenie operacyjne wdrożone w przypadku remisji histopatologicznej zmian węzłowych [3]. W IV stopniu zaawansowania leczenie operacyjne jest możliwe wyłącznie u chorych w dobrym stanie ogólnym w przypadku występowania pojedynczego przerzutu do mózgu, drugiego płuca lub nadnercza. W tych przypadkach przeżycie 5-letnie obserwowane jest u 1–13% pacjentów [4, 5].

U większości chorych z miejscowym zaawansowaniem raka stosowane jest leczenie skojarzone (chemioterapia i radioterapia), prowadzone w różnych schematach czasowych [6]. W leczeniu NDRP w stadium zaawansowanym (nowotworowy wysięk opłucnowy lub osierdziowy, cecha N3, przerzuty w odległych narządach) stosuje się chemioterapię, uzyskując przeżycie 5-letnie u 0–7% pacjentów [7]. Częste występowanie zaawansowanego NDRP i niezadowalające wyniki leczenia chorych w tym stadium skłaniają do poszukiwania nowych form leczenia, w tym terapii celowanych. Przykładem takiej terapii w nowotworach płuca jest leczenie erlotynibem lub gefitynibem – inhibitorami kinazy tyrozynowej dla receptora naskórkowego czynnika

Average waiting time for genetic results on DNA isolated from surgery material and cytology was 9 days. Molecular assessment of tumor tissue allows for adjustment of chemotherapy to the tumor biology, which is consistent with the intention of personalized medicine. Good cooperation between the surgeon, pathologist and genetic diagnostician makes it possible to shorten the optimal waiting time for targeted therapy.

Key words: NSCLC, targeted therapy, personalized oncology, EGFR.

wzrostu (ang. *epidermal growth factor receptor* – EGFR), które silnie hamują jego wewnątrzkomórkową fosforylację. Mutacje somatyczne w obrębie domeny kinazy EGFR są obecne u ok. 10–15% pacjentów z NDRP w Ameryce Północnej i Europie Zachodniej [8], szczególnie w rakach gruczołowych u niepalących kobiet rasy azjatyckiej [9].

Cel pracy

Badanie miało na celu ocenę częstości występowania mutacji aktywujących i inhibujących w eksonach 18, 19, 20 lub 21 genu EGFR oraz ocenę statusu genu KRAS u tych pacjentów, a także ocenę wpływu modelu kwalifikacji pacjenta do terapii celowanej na czas uzyskania wyniku badania genetycznego.

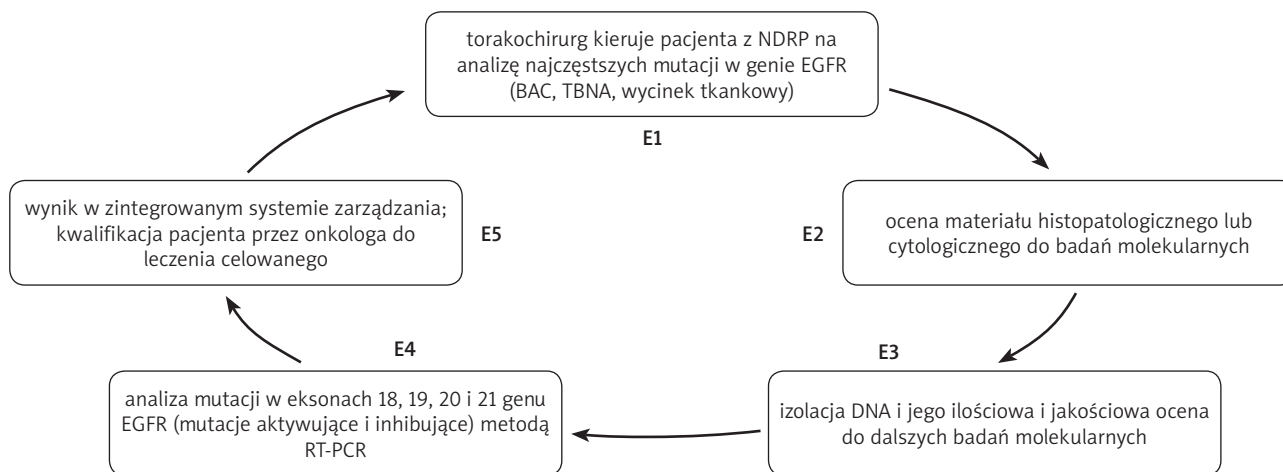
Materiał i metody

Schemat procesu kwalifikacji pacjenta do terapii celowanej

Badania przeprowadzono w Centrum Onkologii im prof. Franciszka Łukaszczyka w Bydgoszczy. W grupie z pozytywną kwalifikacją kliniczną znalazło się 81 pacjentów. Grupę badaną natomiast, po kwalifikacji patomorfologicznej i genetycznej, stanowiło 77 pacjentów z rakiem gruczolowym (33 kobiety i 44 mężczyzn w wieku 39–90 lat, średnio 60 lat), u których przeprowadzono analizę obecności mutacji aktywujących i inhibujących w eksonach 18, 19, 20 i 21 genu EGFR, w celu kwalifikacji do leczenia gefitynibem lub erlotynibem.

W 48 przypadkach (62,3%) materiał do badań pochodził od chorych diagnozowanych kompleksowo (z potwierdzeniem w badaniu immunohistochemicznym) w Centrum Onkologii w Bydgoszczy. Torakochirurdzy skierowali na badanie 25 chorych (32,5%), onkolodzy 21 (27,3%), po jednym zaś urolog i chirurg onkolog.

Pozostałych 29 badanych chorych (37,7%) pochodziło z innych ośrodków, w tym z: Centrum Leczenia Chorób Płuc i Rehabilitacji w Łodzi (9), Warmińsko-Mazurskiego Centrum Onkologii w Olsztynie (8), Szpitala Specjalistycznego w Pile (7), Kujawsko-Pomorskiego Centrum Pulmonologii (3) oraz ze Specjalistycznego Szpitala im prof. Sokołowskiego w Szczecinie (2). Siedemnaścioro (59%) z tych chorych skierowanych zostało z rozpoznaniem *adenocarcinoma* i 12 (41%)



Ryc. 1. Proces kwalifikacji pacjenta z niedrobnokomórkowym rakiem płuca (NDRP) do leczenia celowanego inhibitorami kinazy tyrozynowej. Etap 1 (E1): torakochirurg/pulmonolog kieruje pacjenta z NDRP na badania genetyczne (ocena najczęstszych mutacji aktywujących w genie EGFR). Etap 2 (E2): materiał histopatologiczny lub cytologiczny zostaje poddany kwalifikacji patomorfologicznej do badań genetycznych. Etap 3 (E3): badanie molekularne rozpoczyna się izolacją DNA, izolat podlega ocenie jakościowej i ilościowej w celu kwalifikacji molekularnej do analizy mutacji metodą reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym (ang. *real-time polymerase chain reaction* – RT-PCR). Etap 4 (E4): RT-PCR z sondami specyficznymi dla 29 mutacji aktywujących i inhibujących, w tym mutacji T790M. Etap 5 (E5): wynik obecności lub braku najczęstszych mutacji w eksonach 18, 19, 20 i 21 genu EGFR w badanym materiale nowotworowym zostaje udostępniony w zintegrowanym systemie zarządzania i pozwala na podjęcie decyzji przez onkologa o kwalifikacji pacjenta do leczenia celowanego

z rozpoznaniem innym niż *adenocarcinoma*: rak niedrobnokomórkowy – 9 przypadków, rak płaskonabłonkowy – 2 przypadki i rak olbrzymiokomórkowy – 1 przypadek. Wszystkie 29 przypadków zweryfikowano w badaniu kompleksowym patomorfologicznym i potwierdzono jako zróżnicowane gruczolowo (łac. *adenocarcinoma*). U wszystkich pacjentów oceniono czas wykonania badania genetycznego od chwili pozytywnej kwalifikacji klinicznej.

pozytywna kliniczna kwalifikacja skutkowałą skierowaniem pacjenta do badania genetycznego przez torakochirurga lub onkologa (E1; ryc. 1.). Etap kwalifikacji patomorfologicznej (E2) polegał na potwierdzeniu gruczolowego różnicowania raka i ocenie reprezentatywności diagnostycznej materiału biologicznego w pięciostopniowej skali. Ocenie podlegały preparaty cytologiczne i histologiczne badane mikroskopowo przez patologa. Tylko najbardziej reprezentatywne spośród nich uzyskiwały kwalifikację do badania genetycznego (E3).

Przygotowanie materiału biologicznego

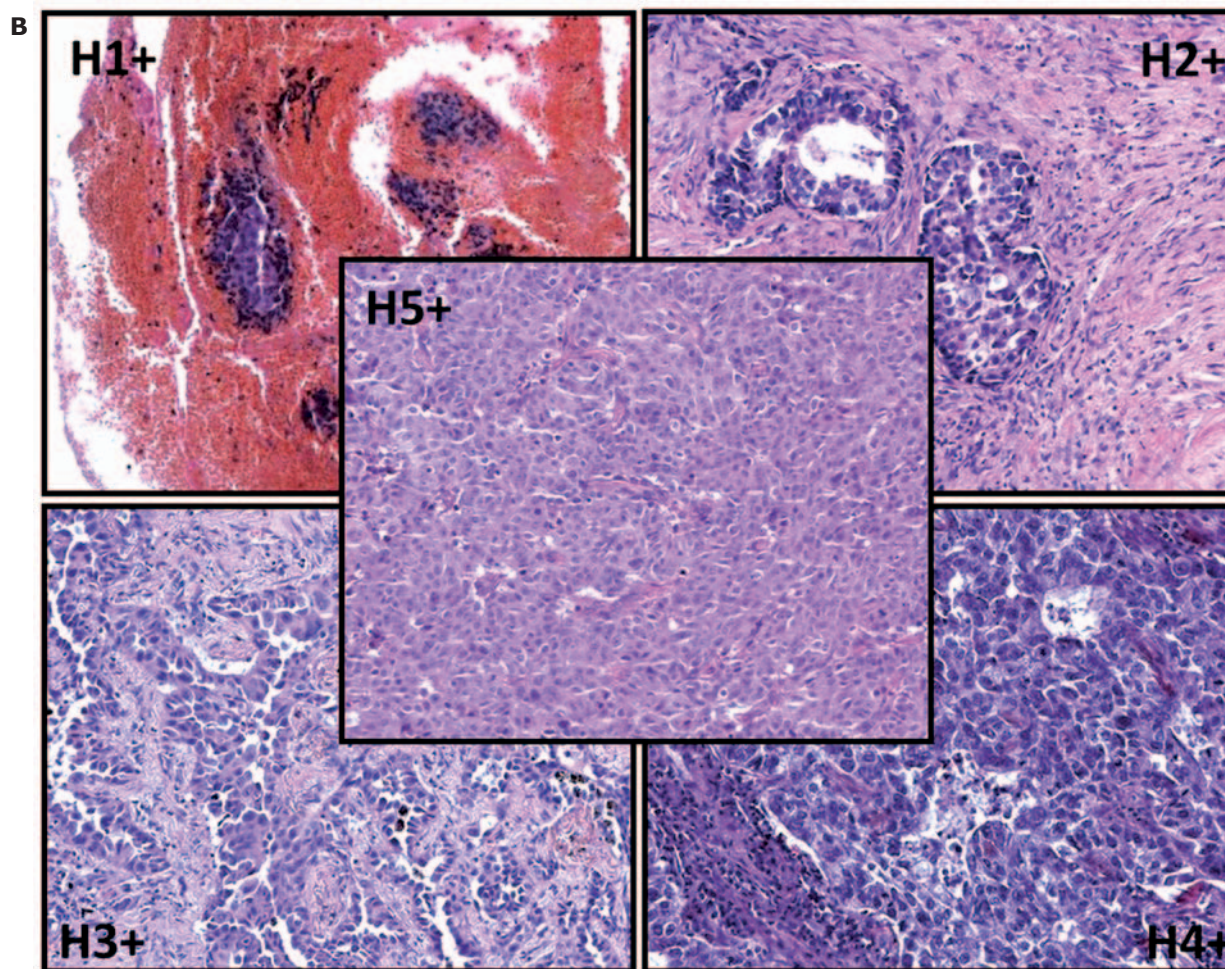
Materiał tkankowy (63/77) stanowiły utrwalone w formalinie buforowanej, opracowane biopsyjnie i zatopione w bloczki parafinowe wycinki tkankowe. Materiał cytologiczny ($n = 14$), pochodzący z biopsji aspiracyjnej przeprowadzonej przez patologa (BAC/CT: $n = 5$ oraz BAC/USG: $n = 6$) i biopsji przezoskrzelowej wykonanej przez torakochirurga (TBNA: $n = 3$), był rozprowadzony na szkiełku podstawowym, utrwalony w 99-procentowym alkoholu etylowym i barwiony hematoksyliną i eozyną (HE) jako przygotowanie do badania mikroskopowego.

Kryteria kwalifikacji patomorfologicznej

Materiał tkankowy (preparaty histologiczne) był oceniany przez patomorfologa w pięciostopniowej skali rozległościowej (skala H), uwzględniającej odsetek utkania nowotworowego w wycinku (tab. I). W celu zwiększenia

Tab. I. Wyniki analizy patomorfologicznej i genetycznej: procentowy udział poszczególnych mutacji w genie EGFR na tle wszystkich analiz reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym (77) oraz procentowy udział badań, które nie spełniały kryteriów dopuszczenia do dalszej analizy molekularnej

Mutacja	Ekson	Liczba pacjentów	Odsetek pacjentów	Mutacja vs brak mutacji
brak mutacji (WT)	–	67	67/77 (87%)	67/77 (87%)
Ex19del	19	4	4/77 (5,2%)	10/77 (13%)
L858R	21	4	4/77 (5,2%)	
L861Q	21	1	1/77 (1,3%)	
S768I i G719X	18 i 20	1	1/77 (1,3%)	
RAZEM		77	77/77 (100%)	77/77 (100%)
badania nie wykonano	–	4	4/81 (4,9%)	



symbol	materiał histologiczny		materiał cytologiczny	
	H		C	
skala	1+	do 20%	1+	maks. 100 kk
	2+	21–40%	2+	maks. 1000 kk
	3+	41–60%	3+	↑ 1000 kk
	4+	61–80%	4+	↑ 10 000 kk
	5+	81–100%	5+	niepoliczalne

Ryc. 2. Ocena patomorfologiczna. A. Skala histopatologiczna materiału histologicznego i cytologicznego. B. Przykładowa ocena histopatologiczna materiału biologicznego wg skali dla materiału histologicznego H1+ do H5+ (powiększenie 200 ×)

rozległości utkania nowotworowego materiał tkankowy o małej reprezentatywności raka poddawany był procedurze makrodysekcji, w której utkanie nienowotworowe, oznaczone przez patomorfologa, zostawało wycięte z bloków parafinowych, po czym kolejny skrawek, barwiony HE, poddawany był powtórnej ocenie mikroskopowej przed skrojeniem skrawków do badania genetycznego. W każdym zakwalifikowanym wycinku tkankowym oceniano dodatkowo odsetek jąder nowotworowych względem wszystkich innych jąder komórkowych wycinka (fibroblasty, komórki mięśniowe narządu, komórki odczynu zapalnego: limfocyty, granulocyty, makrofagi). Za reprezentatywny uznawano materiał tkankowy, w którym utkanie nowotworowe stanowiło powyżej 1% (ryc. 2).

Materiał cytologiczny rozmazany na preparatach cytologicznych oceniany był przez patomorfologa w pię-

ciostopniowej skali ilościowej (skala C), uwzględniającej bezwzględną liczbę komórek nowotworowych rozmazanych w preparacie (ryc. 2.). W każdym zakwalifikowanym preparacie oceniano dodatkowo odsetek jąder nowotworowych względem wszystkich innych jąder komórkowych rozmazu (fibroblasty, komórki mięśniowe narządu, komórki odczynu zapalnego: limfocyty, granulocyty, makrofagi). Za reprezentatywny uznawany był materiał cytologiczny z bezwzględną liczbą komórek nowotworowych powyżej 100. Reprezentatywne próbki tkankowe (błoczki parafinowe lub preparaty cytologiczne) były natychmiast kierowane do badania genetycznego.

Izolacja kwasu deoksyrybonukleinowego

Izolację kwasu deoksyrybonukleinowego (DNA) z materiału histologicznego (63 kostki parafinowe) przeprowa-

dono po deparafinizacji skrawków w ksylenie, przemyciu w alkoholu bezwodnym i osuszeniu. Izolację DNA z rozmazu cytologicznego (14 rozmazów) przeprowadzono po odklejeniu szkiełka nakrywkowego w kąpeli ksylenowej, przepłukaniu w alkoholu bezwodnym i zeszkobaniu materiału biologicznego za pomocą sterylnego skalpela do probówki. Analiza genetyczna rozpoczęła się od całkowitego trawienia materiału biologicznego. W wyniku procedury walidacyjnej przyjęto metody izolacji DNA testem firmy Qiagen, zaprojektowanym dla oczyszczania DNA z osadzonych w parafinie skrawków tkankowych. Izolacja zestawem QIAamp DNA FFPE Tissue Kit była zgodna z procedurami producenta. Kwas deoksyrybonukleinowy został poddany ocenie jakościowej i ilościowej na NanoDropie (Thermo Scientific) i uznany za prawidłowy do dalszych badań, jeżeli współczynnik czystości A260/A280 otrzymanego DNA mieścił się między 1,8 a 2,0, a ilość DNA była nie mniejsza niż 200 ng. W przypadku unikatowego materiału (braku możliwości ponownej izolacji) z nieprawidłowym współczynnikiem czystości A260/A280 izolat był dodatkowo oczyszczany na kolumnkach (NucleoSpin gDNA Clean-Up) i ponownie oceniany na NanoDropie.

Analiza mutacji w genie EGFR

Analiza 29 mutacji w eksonach 18, 19, 20 i 21 genu EGFR została wykonana przy użyciu komercyjnego testu CE-IVD (EGFR Mutation Analysis Kit for Real-Time PCR, EntroGen) z użyciem termocyklera LightCycler 480 II (Roche). Do reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym (ang. *real-time polymerase chain reaction* – RT-PCR) użyto próbek o zawartości 200–600 ng DNA na 1 analizę. Analiza mutacji była zgodna z zaleceniami producenta i wykonana po walidacji na kontrolach pozytywnych, ocenionych z wykorzystaniem technologii bezpośredniego sekwencjonowania oraz po przejściu kontrolnej analizy oceny mutacji na próbkach ślepych przestanych przez producenta.

Analiza mutacji w genie KRAS

Analiza 9 najczęstszych mutacji w kodonie 12 i 13 genu KRAS była wykonana przy użyciu testu LightMix Kit k-ras Mutations Codons 12/13 (TibMolBiol) w grupie pacjentów z mutacją w genie EGFR. W teście tym wykorzystano sondy hybrydujące i kompetytor komplementarny do DNA „typu dzikiego” (ang. *wild type*). Do RT-PCR użyto próbki o zawartości 64–1600 ng DNA na 1 analizę. Analiza mutacji w genie KRAS, łącznie z analizą krzywej topnienia, była zgodna z zaleceniami producenta testu [25].

Wyniki

Analiza czasu uzyskania wyniku genetycznego

Z 81 przypadków skierowanych na badania genetyczne 77 zakwalifikowano do oznaczeń mutacji w genie EGFR (tab. I). W 4 przypadkach (5%) nie wykonano badania ze względu na negatywny wynik oceny patomorfologicznej (1 przypadek z materiałem niereprezentatywnym) lub negatywną ocenę

molekularną DNA (2 izolaty z cytologii i 1 izolat z bloczka parafinowego nie spełniały kryteriów czystości i/lub minimalnej ilości DNA). Średni czas oczekiwania na wynik genetyczny wyniósł 9 dni dla obu materiałów biologicznych, tkankowych (bloczki parafinowe) i cytologicznych (rozmazy cytologiczne). Obejmował on czas kwalifikacji klinicznej, patomorfologicznej, izolację DNA, analizę RT-PCR oraz sformułowanie i umieszczenie wyniku w szpitalnej bazie danych MedInf (ryc. 1.).

Wyniki oceny patomorfologicznej

Pośród materiału histologicznego stwierdzono obecność 15 (24%) próbek o niskiej (H1, H2) oraz 48 (76%) o wysokiej (H3–H5) rozległości utkania nowotworowego (ryc. 2.). Analogicznie materiał cytologiczny stanowiły 4 (29%) próbki o małej (C1, C2) oraz 10 (71%) o dużej (C3–C5) liczbie komórek nowotworowych w rozmazie (tab. I, ryc. 2.). Mutacje w genie EGFR zidentyfikowano w materiałach histologicznych i cytologicznych wyłącznie o wysokiej, odpowiednio, rozległości utkania i bezwzględnej liczbie komórek w rozmazie.

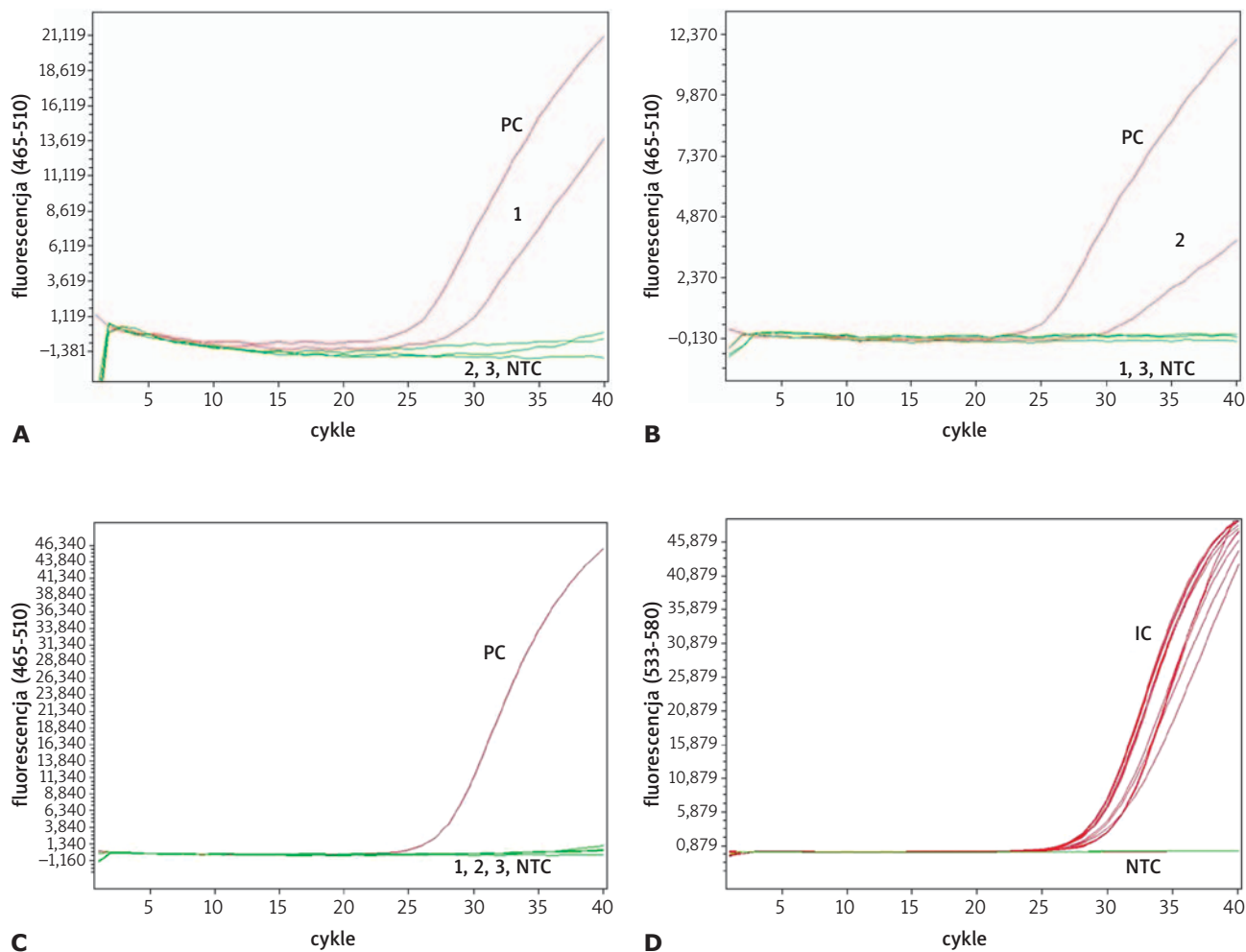
Wyniki oceny molekularno-genetycznej

Końcowej analizie genetycznej poddano preparaty DNA wyizolowane z 63 bloczków parafinowych i 14 preparatów (rozmazów) cytologicznych chorych na raka gruczołowego płuca. W 67 przypadkach nie stwierdzono obecności mutacji w domenie kinazy tyrozynowej. Najczęstsze mutacje w eksonie 19 (delecje) i eksonie 21 (L858R) wykryto w 8 (10,4%) przypadkach (ryc. 3A, ryc. 4A–B.). Pozostałe, rzadziej spotykane, mutacje w eksonach 18, 20 i 21 obecne były w 2 (2,6%) przypadkach (tab. I). W żadnej z 77 próbek DNA nie wykryto mutacji inhibującej T790M (ryc. 3C.). Jedną próbką zawierała zarówno rzadziej spotykaną mutację S768I, jak i G719X (tab. I).

Analiza mutacji w genie KRAS została wykonana u 9 z 10 chorych z rakiem gruczołowym, u których stwierdzono występowanie mutacji w genie EGFR. W żadnej próbce nie stwierdzono współwystępowania mutacji w kodonie 12 i 13 genu KRAS (ryc. 4A–B.). Najkrótszy czas oczekiwania na wynik genetyczny wyniósł 2 dni, a najdłuższy 30 dni (ryc. 1.).

Dyskusja

Niedrobnokomórkowy rak płuca wiąże się ze złym rokowaniem i wysoką umieralnością. Nawet w resekcyjnym NDRP u 30–50% pacjentów dochodzi do nawrotu choroby w ciągu 5 lat. W leczeniu NDRP stosowanych jest wiele chemioterapeutyków, a kombinacje cysplatyny z taksanami, winorelbina i gemcytabiną zostały zaproponowane jako nowe standardy postępowania [11]. W przypadku przerzutów leczenie związkami platyny i taksanami wydłużyły medianę czasu przeżycia do 8–11 miesięcy, a jednoroczne przeżycie zwiększyły o 30–40% [10, 11]. Ze względu na, zwykle, zaawansowane stadium choroby w chwili rozpoznania, czas oczekiwania na wynik genetyczny powinien być skrócony do minimum. W badaniach klinicznych wyniki leczenia gefitynibem u chorych na zaawansowanego NDRP z aktywującymi mutacjami w genie EGFR potwierdziły większą

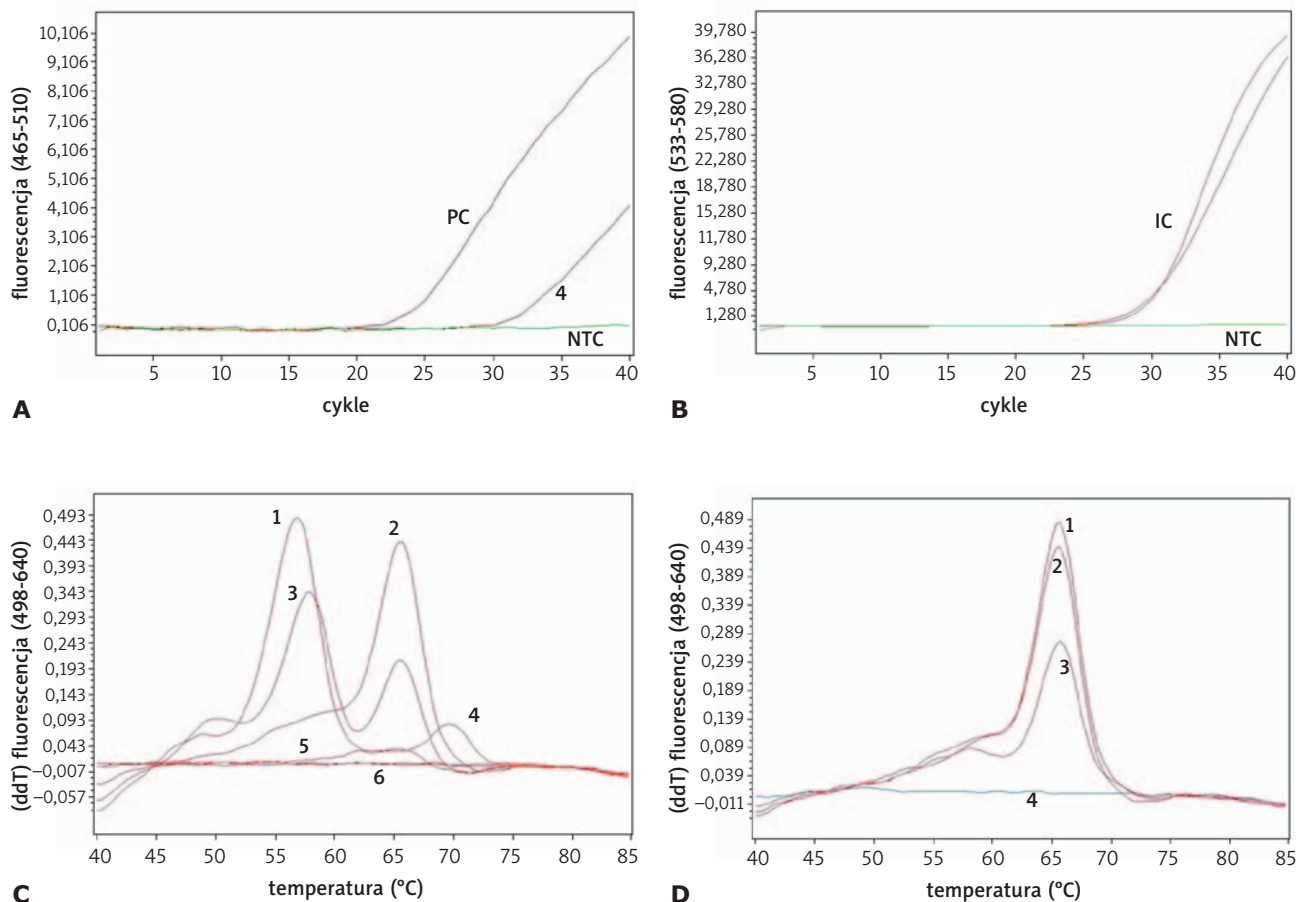


Ryc. 3A–D. Wykrywanie w genie EGFR mutacji aktywujących: delecji w eksonie 19 i mutacji punktowej w eksonie 21 oraz najczęstszej mutacji inhibującej T790M warunkującej oporność na lek u 3 różnych pacjentów (pacjent 1.: wykryta delecja w eksonie 19; pacjent 2.: wykryta mutacja punktowa w eksonie 21; pacjent 3.: EGFR bez mutacji). Krzywe amplifikacji dla reakcji wykrywania mutacji ex19del, L861Q, T790M w genie EGFR oraz krzywe amplifikacji kontroli wewnętrznych reakcji łańcuchowej polimerazy. A. Mutacja aktywująca w eksonie 19 warunkująca wrażliwość na lek (ex19del). Na czerwono oznaczono próbki: kontrolę pozytywną (ang. *positive control* – PC) i pacjenta 1. Kolorem zielonym oznaczono próbki (licząc od góry ryciny): 2, 3 i kontrolę negatywną (ang. *negative control* – NTC). B. Mutacja aktywująca w eksonie 21 warunkująca wrażliwość na lek (L861Q). Na czerwono oznaczono próbki: PC i pacjenta 2. Na zielono oznaczono próbki: 1, 3 i NTC. C. Ocena mutacji inhibujących w T790M w próbkach 1, 2, 3. Na czerwono oznaczono próbkę PC. Na zielono oznaczono próbki: 1, 2, 3 i NTC. D. Kontrole wewnętrzne ex19del, L861Q, T790M. Na czerwono oznaczono próbki: PC, 1, 2, 3. Na zielono oznaczono próbkę: NTC.

skuteczność terapii w porównaniu ze standardową chemioterapią, opartą na schemacie karboplatyny i paklitakselu [12]. Co więcej, celowane leki: erlotynib (Tarceva) i gefitynib (Iressa) mogą być używane zarówno w pierwszej [13], jak i drugiej i trzeciej linii chemioterapii [14], co dodatkowo motywuje do działań zmierzających do redukcji czasu oczekiwania pacjenta na wynik badania genetycznego.

Współpraca w ramach interdyscyplinarnego zespołu, złożonego z torakochirurga, patomorfologa, genetyka/biologa molekularnego i onkologa, przy kwalifikacji chorego na raka gruczołowego płuca do leczenia celowanego inhibitorami kinazy tyrozynowej, pozwala skrócić czas oczekiwania na leczenie (ryc. 1). Z doświadczeń własnych wynika,

że szczególnie ważnym czynnikiem redukującym ten czas jest możliwość przeprowadzenia wszystkich etapów kwalifikacji w jednym ośrodku (ryc. 1). Kwalifikacja do leczenia celowanego w Centrum Onkologii w Bydgoszczy wynosi średnio 9 dni, licząc od momentu skierowania pacjenta na oznaczenie mutacji w genie EGFR, a kończąc na wydaniu wyniku. Kluczowe znaczenie multidyscyplinarnego zespołu zostało już wcześniej opisane w piśmiennictwie [15–17]. Autorzy wskazują, że zastosowanie nowoczesnych technik przez torakochirurgów pozwala na uzyskanie bardziej reprezentatywnych fragmentów tkanki nowotworowej, która później będzie poddana badaniom patomorfologicznym i molekularno-genetycznym. Przykładem mogą być dwa



Ryc. 4A–D. Wykrywanie mutacji w eksonie 21 genu EGFR (mutacja L858R) oraz kodonach 12 i 13 genu KRAS u tego samego pacjenta z niedrobnokomórkowym rakiem płuca (pacjent 4.). **Panel górny:** krzywe amplifikacji dla reakcji wykrywania mutacji L858R w genie EGFR oraz krzywe amplifikacji kontroli wewnętrznych (ang. *internal control* – IC) PCR. A. L858R – mutacja aktywująca w eksonie 21 warunkująca wrażliwość na lek. Na czerwono oznaczono próbki: kontrolę pozytywną (ang. *positive control* – PC) i pacjenta 4. (4). Na zielono oznaczono kontrolę negatywną (ang. *negative control* – NTC). B. L858R – kontrole wewnętrzne PCR. Na czerwono oznaczono próbki IC, które są kontrolami wewnętrznymi dla próbki PC i pacjenta 4. Na zielono oznaczono NTC. **Panel dolny:** analiza krzywych topnienia produktów PCR w kodonach 12 i 13 genu KRAS w celu wykrycia następujących mutacji: 12D, 12C, 12V, 12A, 12R, 12S, 12T, 13D, 12D13D i 13C. C. Krzywe topnienia produktów PCR reakcji kontrolnych testu: 1 – kontrola 13C (Tm: 56,5°C), 2 – kontrola WT (Tm: 65,3°C), 3 – kontrola 13D (Tm: 57,6°C), 4 – kontrola 12C (Tm: 68,8°C), 5 – kontrola cWT (Tm: 63,6°C), 6 – NTC (*baseline*). D. Krzywe topnienia reakcji w próbce pochodzącej od pacjenta 4.; KRAS *wild type* – na tle reakcji kontrolnej WT (2). 1 – reakcja CTRL, 3 – reakcja LOW, 4 – reakcja HIGH

rozmary cytologiczne wykonane z materiału cytologicznego pobranego podczas biopsji przezoskrzelowej. W obu przypadkach materiał biologiczny przeszedł pozytywnie kwalifikację patomorfologiczną i genetyczną.

W niektórych przypadkach duża różnica w czasie oczekiwania na wynik (2 vs 30 dni) była spowodowana koniecznością patomorfologicznej weryfikacji rozpoznania materiałów z ośrodków zewnętrznych, przyczynami technicznymi, takimi jak czas odklejania szkiełka nakrywkowego w przypadku materiału cytologicznego, a także koniecznością jakościowej i/lub ilościowej poprawy wyizolowanego DNA (dodatkowym oczyszczaniem DNA lub ponowną izolacją, powtórzeniem badania, a nawet – ponownym pobraniem materiału biologicznego do badania). Skrócenie czasu oczekiwania na wynik genetyczny uzyskiwano w każdym przypadku, w którym na podstawie wyniku patomorfolo-

gicznego (*adenocarcinoma*) oznaczenie obecności mutacji w genie EGFR po kwalifikacji klinicznej zlecał torakochirurg.

Wytyczne dla laboratoriów diagnostycznych, które stosują metody sekwencjonowania jako złoty standard oceny mutacji w genie EGFR, zalecają izolację i analizę mutacji z materiałów biologicznych z co najmniej 50-procentowym odsetkiem utkania nowotworowego (Tysarowski 2011). Jest to w dużym stopniu związane z limitem detekcji klasycznych metod, takich jak sekwencjonowanie, a tym samym niekorzystną dla tych metod biologią nowotworów, w których tylko mały odsetek komórek zawiera mutacje w genie EGFR. Metoda RT-PCR jest w stanie wykryć 1% mutacji na tle DNA genomowego, a obecne na rynku nowe testy pozwalają nawet na limit detekcji rzędu 0,1–0,5%, dla określonych mutacji. Diagnostyka PCR z 1-procentowym limitem detekcji zakłada pozyskanie co najmniej 20 ng DNA do PCR.

Biorąc pod uwagę taką czułość metody, zdecydowano się na stworzenie autorskiej skali oceny reprezentatywności utkania nowotworowego w materiale biologicznym (histologicznym: H1–H5; cytologicznym: C1–C5), za pomocą której analizę mutacji prowadzono z powodzeniem w materiale ze znacznie niższą reprezentacją utkania nowotworowego niż 50%, przy założeniu pozyskania w tych przypadkach od 60 ng do 75 ng DNA na reakcję (ryc. 2.). W badanych próbkach wykryto mutacje w materiale z co najmniej 41-procentową reprezentacją utkania nowotworowego (H3–H5) w materiałach tkankowych i z co najmniej 1000 komórek nowotworowych (C3–C5) w materiałach cytologicznych. Podczas badania statusu mutacji u pacjentów z rakiem gruczołowym płuca niezwykle ważne jest, aby stosowane metody były dobrze zwalidowane i wiarygodne, aby uniknąć fałszywie negatywnego i fałszywie pozytywnego wyniku. Pierwsze selekcje grupy pacjentów, którzy mogliby odnieść korzyść z terapii celowanej, opierały się na badaniu ekspresji EGFR metodą immunohistochemiczną. Milowym krokiem była identyfikacja mutacji w domenie kodującej aktywność kinazy tyrozynowej EGFR [18, 19]. Metoda immunohistochemiczna, pomimo późniejszych prób z 2 monoklonalnymi przeciwciałami specyficznymi do mutacji w eksonie 21 (L858R) oraz 15 nukleotydowej delecji w eksonie 19 (E746_A750del) [20], ustąpiła miejsca technikom biologii molekularnej: sekwencjonowaniu i metodzie RT-PCR. Wyniki przeprowadzonych badań własnych metodą PCR w czasie rzeczywistym (EntroGen), wskazują na 13-procentowy udział mutacji w genie EGFR w badanej grupie pacjentów z rakiem gruczołowym płuca (tab. I), co jest zgodne ze światowymi trendami [21]. Również sklasyfikowane w badaniu własnym mutacje w eksonie 19 (delecje) i 21 (L858R) występują w najwyższym odsetku w raku gruczołowym płuca (po 40% każda) na tle wszystkich mutacji (tab. I). Obydwa wyniki potwierdzają obserwacje Sharma i Bell, którzy w swojej pracy przeglądowej, dotyczącej wyników badań genetycznych, biochemicznych i klinicznych, skoncentrowali się na mutacjach somatycznych EGFR i zauważyli, że mutacje w eksonie 19 i 21 są najczęściej występującymi mutacjami (odpowiednio 45% i 40–45% na tle wszystkich mutacji w domenie kinazy tyrozynowej) [21].

W materiale własnym wykonano dodatkowo analizę najczęstszych 7 mutacji w kodonie 12 i 13 genu KRAS (ryc. 4C i 4D). U pacjentów z rakiem jelita grubego, wartość predykcyjna mutacji genu KRAS jest niezbędna do kwalifikacji pacjenta do leczenia celowanego przeciwciałem monoklonalnym anty-EGFR. U chorych na NDRP ocena mutacji w genie KRAS nie ma jeszcze jasno sprecyzowanej wartości klinicznej [22]. Jakkolwiek coraz częściej można się spotkać z opinią, że obecność mutacji w genie KRAS u pacjentów z NDRP może mieć wartość diagnostyczną, ponieważ mutacje w tych 2 genach często nawzajem się wykluczają [23]. Uzyskane w badaniu własnym dane są zgodne z publikowanymi w dostępnym piśmiennictwie (ryc. 5.) i sugerują, że informacja o mutacyjnym statusie genów EGFR i KRAS w raku gruczołowym płuca może być krokiem w kierunku

kwalifikacji do badania występowania fuzyjnego onkogenu EML4-ALK. Równie interesujące dane zaprezentowali Choi i wsp., którzy badali obecność mutacji nie tylko w genie EGFR i KRAS, ale także TP53, BRAF i β -catenin. Ich wyniki wskazują na obecność 21–24% mutacji w genach EGFR, KRAS i TP53, a ponad połowa badanych pacjentów (58%) miała mutacje co najmniej w 1 z tych genów [24]. Niemniej jednak, rutynowe wykonywanie badania w kierunku somatycznych mutacji genu KRAS, jak również BRAF, ERBB2 i PIK3CA, przy wyborze sposobu terapii – poza badaniami klinicznymi nie jest aktualnie zalecane [17].

Podsumowanie

Sprawną procedurą kwalifikacji do identyfikacji mutacji w genie EGFR, ze względu na możliwość zastosowania leczenia celowanego, w przypadku obecności mutacji w eksonach 18, 19, 20 lub 21, może wpłynąć korzystnie na wynik zastosowanej terapii. Ponieważ terapia personalizowana jest skuteczna także w zaawansowanym raku płuca, czas uzyskania wyniku badania genetycznego może okazać się ważnym elementem poprawy rokowania w tych przypadkach. Poprawa technik diagnostycznego pobierania materiału biologicznego oraz kwalifikacja kliniczna z decyzją o badaniu genetycznym podjęta przez torakochirurga w chwili uzyskania pierwszego wyniku badania patomorfologicznego stanowią ważny element skrócenia czasu oczekiwania pacjenta na skuteczną terapię.

Odsetek mutacji w genie EGFR w omawianym badaniu wyniósł 13%, co potwierdza wartość techniki RT-PCR w diagnostyce mutacji punktowych w raku gruczołowym płuca. Regularne oznaczenia statusu mutacji w genach EGFR i KRAS w rakach gruczołowych płuca mogą pomóc w identyfikacji guzów z fuzyjnym onkogenem EML4-ALK i w rezultacie okazać się kolejnym krokiem w kierunku lepszej molekularnej charakterystyki tych guzów.

Piśmiennictwo

1. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics, 2009. *CA Cancer J Clin* 2009; 59: 225-249.
2. Asamura H, Goya T, Koshiishi Y, Sohara Y, Eguchi K, Mori M, Nakanishi Y, Tsuchiya R, Shimokata K, Inoue H, Nukiwa T, Miyaoka E. A Japanese Lung Cancer Registry study: prognosis of 13,010 resected lung cancers. *Journal of Thoracic Oncology: official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* 2008; 3: 46-52.
3. Naruke T, Tsuchiya R, Kondo H, Asamura H. Prognosis and survival after resection for bronchogenic carcinoma based on the 1997 TNM-staging classification: the Japanese experience. *Ann Thorac Surg* 2001; 71: 1759-1764.
4. Billing PS, Miller DL, Allen MS, Deschamps C, Trastek VF, Pailorero PC. Surgical treatment of primary lung cancer with synchronous brain metastases. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2001; 122: 548-553.
5. Tanvetyanon T, Robinson LA, Schell MJ, Strong VE, Kapoor R, Coit DG, Bepko G. Outcomes of adrenalectomy for isolated synchronous versus metachronous adrenal metastases in non-small-cell lung cancer: a systematic review and pooled analysis. *Journal of Clinical Oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2008; 26: 1142-1147.
6. Cakir S, Egehan I. A randomised clinical trial of radiotherapy plus cisplatin versus radiotherapy alone in stage III non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2004; 43: 309-316.
7. Ardizzoni A, Boni L, Tiseo M, Fossella FV, Schiller JH, Paesmans M, Radosavljevic D, Paccagnella A, Zatloukal P, Mazzanti P, Bisset D, Rosell R. Cisplatin-versus carboplatin-based chemotherapy in first-line treatment of advanced

- non-small-cell lung cancer: an individual patient data meta-analysis. *Journal of the National Cancer Institute* 2007; 99: 847-857.
8. Marchetti A, Martella C, Felicioni L, Barassi F, Salvatore S, Chella A, Campese PP, Iarussi T, Mucilli F, Mezzetti A, Cuccurullo F, Sacco R, Buttitta F. EGFR mutations in non-small-cell lung cancer: analysis of a large series of cases and development of a rapid and sensitive method for diagnostic screening with potential implications on pharmacologic treatment. *Journal of Clinical Oncology*: official journal of the American Society of Clinical Oncology 2005; 23: 857-865.
 9. Haber DA, Bell DW, Sordella R, Kwak EL, Godin-Heymann N, Sharma SV, Lynch TJ, Settleman J. Molecular targeted therapy of lung cancer: EGFR mutations and response to EGFR inhibitors. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 2005; 70: 419-426.
 10. Papadakis C, Tsaroucha E, Kaklamanis L, Lagoudaki E, Trypaki M, Tryfonidis K, Mavroudis D, Stathopoulos E, Georgoulas V, Souglakos J. Correlation of BRCA1, TXR1 and TSP1 mRNA expression with treatment outcome to docetaxel-based first-line chemotherapy in patients with advanced/metastatic non-small-cell lung cancer. *Br J Cancer* 2011; 104: 316-323.
 11. Georgoulas V, Papadakis E, Alexopoulos A, Tsiafaki X, Rapti A, Veslemes M, Palamidas P, Vlachonikolis I. Platinum-based and non-platinum-based chemotherapy in advanced non-small-cell lung cancer: a randomised multicentre trial. *Lancet* 2001; 357: 1478-1484.
 12. Maemondo M, Inoue A, Kobayashi K, Sugawara S, Oizumi S, Isobe H, Gemma A, Harada M, Yoshizawa H, Kinoshita I, Fujita Y, Okinaga S, Hirano H, Yoshimori K, Harada T, et al. Gefitinib or chemotherapy for non-small-cell lung cancer with mutated EGFR. *The New England journal of medicine* 2010; 362: 2380-2388.
 13. Barlesi F, Nanni-Metellus I, Breen D, Fina F, Astoul P, Martin PM. Non-small cell lung cancer-smokers or non-smokers, does it matter? *Lung Cancer* 2009; 63: 430-432.
 14. Wu JY, Shih JY, Yang CH, Chen KY, Ho CC, Yu CJ, Yang PC. Second-line treatments after first-line gefitinib therapy in advanced nonsmall cell lung cancer. *International Journal of Cancer Journal International du Cancer* 2010; 126: 247-255.
 15. Travis WD, Rehkman N, Riley GJ, Geisinger KR, Asamura H, Brambilla E, Garg K, Hirsch FR, Noguchi M, Powell CA, Rusch VW, Scagliotti G, Yatabe Y. Pathologic diagnosis of advanced lung cancer based on small biopsies and cytology: a paradigm shift. *Journal of thoracic oncology: official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* 2010; 5: 411-414.
 16. Garcia-Olive I, Monso E, Andreo F, Sanz-Santos J, Taron M, Molina-Vila MA, Llatjos M, Castella E, Moran T, Bertran-Alamillo J, Mayo-de-Las-Casas C, Queralto C, Rosell R. Endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration for identifying EGFR mutations. *Eur Respir J* 2010; 35: 391-395.
 17. Felip E, Gridelli C, Baas P, Rosell R, Stahel R. Metastatic non-small-cell lung cancer: consensus on pathology and molecular tests, first-line, second-line, and third-line therapy: 1st ESMO Consensus Conference in Lung Cancer; Lugano 2010. *Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology/ESMO* 2011; 22: 1507-1519.
 18. Paez JG, Janne PA, Lee JC, Tracy S, Greulich H, Gabriel S, Herman P, Kaye FJ, Lindeman N, Boggon TJ, Naoki K, Sasaki H, Fujii Y, Eck MJ, Sellers WR, et al. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science* 2004; 304: 1497-1500.
 19. Sordella R, Bell DW, Haber DA, Settleman J. Gefitinib-sensitizing EGFR mutations in lung cancer activate anti-apoptotic pathways. *Science* 2004; 305: 1163-1167.
 20. Brevet M, Arcila M, Ladanyi M. Assessment of EGFR mutation status in lung adenocarcinoma by immunohistochemistry using antibodies specific to the two major forms of mutant EGFR. *The Journal of molecular diagnostics: JMD* 2010; 12: 169-176.
 21. Sharma SV, Bell DW, Settleman J, Haber DA. Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *Nat Rev Cancer* 2007; 7: 169-181.
 22. Roberts PJ, Stinchcombe TE, Der CJ, Socinski MA. Personalized medicine in non-small-cell lung cancer: is KRAS a useful marker in selecting patients for epidermal growth factor receptor-targeted therapy? *J Clin Oncol* 2010; 28: 4769-4777.
 23. Mounawar M, Mukeria A, Le Calvez F, Hung RJ, Renard H, Cortot A, Bollart C, Zaridze D, Brennan P, Boffetta P, Brambilla E, Hainaut P. Patterns of EGFR, HER2, TP53, and KRAS mutations of p14arf expression in non-small cell lung cancers in relation to smoking history. *Cancer research* 2007; 67: 5667-5672.
 24. Choi H, Kratz J, Pham P, Lee S, Ray R, Kwon YW, Mao JH, Kang HC, Jablons D, Kim IJ. Development of a rapid and practical mutation screening assay for human lung adenocarcinoma. *International journal of oncology* 2012; 40: 1900-1906.
 25. Lewandowska MA, Jóźwicki W, Żurawski B, Starzyński J, Rhone P. Can we believe in CE-IVD tests for KRAS mutation analysis? *Oncology as a challenge for modern medicine*. Piaszczyk D (ed.). PSW, Biała Podlaska 2012, pp. 87-99.