

Wyzwania diagnostyki patomorfologicznej i molekularnej oraz leczenia raka płuca



Warszawa, maj 2024 r.

Spis treści

1. Profilaktyka i wczesne wykrywanie raka płuca,	3
<i>dr n. med. Iwona Skrzekowska-Baran</i>	
2. Diagnostyka raka płuca w świetle obowiązujących standardów,	12
<i>dr hab. n. med. Maciej Głogowski</i>	
3. Rola pulmonologa interwencyjnego w diagnostyce raka płuca,	17
<i>prof. dr hab. n. med. Rafał Krenke</i>	
4. Nowoczesne leczenia okołoperacyjne raka płuca,	26
<i>dr hab. n. med. Maciej Głogowski</i>	
5. Zastosowanie bronchonawigacji jako skutecznego narzędzia we wczesnym diagnozowaniu raka płuca,	32
<i>dr n. med. Michał Poznański, prof. dr hab. n. med. Adam Antczak</i>	
6. Diagnostyka patomorfologiczna raka płuca,	40
<i>prof. dr hab. n. med. Łukasz Szyłberg</i>	
7. Badania genetyczne w raku płuca: dostępne technologie, kierunki rozwoju,	49
<i>dr n. med. Andrzej Tysarowski</i>	
8. Płynna biopsja w diagnostyce molekularnej niedrobnokomórkowego raka płuca - aktualne możliwości i perspektywy na przyszłość,	66
<i>dr hab. n. med. Adam Szpechciński, prof. dr hab. n. med. Joanna Chorostowska-Wynimko</i>	
9. Finansowanie diagnostyki patomorfologicznej w ramach świadczeń gwarantowanych,	92
<i>mgr inż. Magdalena Sakowicz, mgr Iwona Sosnowska</i>	
10. Finansowanie diagnostyki molekularnej w ramach świadczeń gwarantowanych,	119
<i>mgr inż. Magdalena Sakowicz, dr n. med. Andrzej Tysarowski</i>	
11. Dostępność nowoczesnych metod systemowego leczenia chorych na raka – nowotwory klatki piersiowej,	137
<i>prof. dr hab. n. med. Maciej Krzakowski</i>	

1.

Profilaktyka i wczesne wykrywanie raka płuca

dr n. med. Iwona Skrzekowska-Baran

Palenie tytoniu jest jedną z głównych przyczyn zachorowalności i umieralności z powodu raka płuca na całym świecie. Szacuje się, że ok. 90% zgonów związanych z rakiem płuca wynika z nikotynizmu. Dym tytoniowy zawiera różne substancje heterogeniczne, z których dziesiątki sklasyfikowano jako rakotwórcze dla człowieka, w tym między innymi nitrozoaminy specyficzne dla tytoniu (TSNA), metale i wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne. Szkodliwe skutki palenia tytoniu występują nie tylko u aktywnych palaczy, ale także u osób narażonych na bierne palenie, w tym także u dzieci [1]. Ryzyko względne zachorowania na raka płuca jest ok. 20-krotnie większe u palaczy w porównaniu do osób nigdy niepalących. Zaprzestanie palenia obniża to ryzyko, jednakże będzie ono nadal wyższe u byłych palaczy niż u osób nigdy niepalących [2].

Palenie tytoniu, a co za tym idzie rak płuca, był historycznie kojarzony z płcią męską. Obecnie w wielu krajach w wyniku zmian społeczno-kulturowych obserwuje się niepokojący wzrost zachorowalności i umieralności na raka płuca u kobiet. Zgodnie z opisowym modelem tej epidemii w krajach rozwiniętych krzywa rozpowszechnienia palenia tytoniu jest opóźniona u kobiet o około 2–3 dekady w stosunku do krzywej u mężczyzn. W związku z tym, co jest również związane z patogenezą raka płuc, występuje podobne opóźnienie na krzywej umieralności z powodu raka płuc przypisywanej paleniu tytoniu pomiędzy mężczyznami i kobietami [3]. W niektórych krajach, krzywe umieralności związanej z paleniem u kobiet i mężczyzn przecięły się lub znacznie się do siebie zbliżyły [4]. Dotyczy to tych państw, gdzie epidemia nikotynizmu była stosunkowo zaawansowana, tj. obserwowano tam wzrost odsetka umieralności wśród kobiet i jego spadek wśród mężczyzn [5]. Wzrost zachorowalności na raka płuc u kobiet jest tak duży, że w wielu krajach śmiertelność z powodu raka płuca w tej grupie przewyższy śmiertelność z powodu raka piersi, podczas gdy w innych zjawisko to już miało miejsce [6].

W polskim badaniu ankietowym przeprowadzonym przez Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego Państwowy Zakład Higieny – Państwowy Instytut Badawczy, w 2020 r. regularne palenie tytoniu zadeklarowało 23,1% mężczyzn i 14,9% kobiet. Codzienne stosowanie wyrobów elektronicznych z nikotyną zadeklarowało 10,8% mężczyzn i 7,1% kobiet.

Inicjacja nikotynowa, a w konsekwencji uzależnienie od nikotyny, często ma swój początek w okresie dojrzewania lub młodości. Badania przeprowadzone w 2009-2010 roku wykazywały, że 36% wszystkich palaczy w Polsce rozpoczęło swój nałóg poniżej 17 r.ż., a kolejne 55% między 18 a 24 r.ż [7].

Kolejną przyczyną zachorowalności na raka płuca jest narażenie zawodowe na kancerogeny, wśród których można wymienić arsen, chrom, azbest, nikiel, kadm, beryl, krzem, spaliny samochodowe oraz pochodzące z węgla kamiennego, a także sadza i radon. Ryzyko wzrasta, gdy obydwa czynniki ryzyka się nakładają [8].

Na zwiększone ryzyko rozwinięcia raka płuca narażeni się pacjenci z dodatnim wywiadem w kierunku zachorowania na chłoniaka, raka okolicy głowy i szyi, raka pęcherza moczowego czy po wcześniejszym leczeniu radioterapią okolicy klatki piersiowej oraz po stosowaniu leków alkilujących.

Istotnym czynnikiem ryzyka jest też obciążenie rodzinne, a zwłaszcza, gdy nałoży się ono na czynny nikotynizm [8]. Rozedma płuc oraz przewlekła obturacyjna choroba płuc (POCHP) rozpoznana u pacjentów obciążonych nikotynizmem są następnym istotnym czynnikiem zachorowania na raka płuca.

Palenie to nie tylko ogromny problem zdrowotny. Koszty społeczne i gospodarcze bezpośrednio związane ze spożyciem tytoniu w UE oszacowano na 363 mld euro 2012, co odpowiada 3,4% PKB UE-27. Nikotynizm kosztuje polską gospodarkę 57 mln zł w obydwu kategoriach: bezpośrednich wydatków na zdrowie i kosztów pośrednich głównie z powodu utraty produktywności spowodowanej chorobami i przedwczesną śmiertelnością [10].

Profilaktyka raka płuca opiera się na profilaktyce pierwotnej i wtórnej.

Profilaktyka pierwotna koncentruje się na kampaniach zaprzestania palenia i nieinicyjowania palenia tytoniu i opiera się na kontroli realizowanej przez Ramową Konwencję Światowej Organizacji Zdrowia o ograniczeniu użycia tytoniu, która weszła w życie w 2005 roku. Korzyści ze wsparcia pacjentów w leczeniu zespołu uzależnienia od tytoniu wykazano w analizach przeprowadzonych wśród uczestników badania NLST (*US-based National Lung Screening Trial*), według którego zastosowanie odpowiedniego poradnictwa przez lekarza podstawowej opieki zdrowotnej przyczyniło się do zwiększenia o 40% szansy na porzucenie nikotynizmu przez pacjenta, natomiast wdrożenie kompleksowej interwencji antynikotynowej podczas kolejnych wizyt zwiększało tę szansę do 46% [11, 12].

Bank Światowy zaliczył sześć sposobów kontroli tytoniu jako najbardziej efektywne kosztowo, w tym: podwyżki podatków na papierosy i inne wyroby tytoniowe; zakazy/ograniczenia palenia w miejscach publicznych i miejscach pracy; lepsze informowanie konsumentów, w tym publiczne kampanie informacyjne, akcje medialne i upublicznianie wyników badań; kompleksowe zakazy reklamy i promocji wszelkich wyrobów tytoniowych, logo i marek; duże, bezpośrednie etykiety ostrzegawcze dotyczące zdrowia na pudełkach papierosów i innych wyrobach tytoniowych; oraz leczenie pomagające uzależnionym palaczom rzucić palenie, w tym zwiększenie dostępu do leków. Chociaż najbardziej opłacalną polityką kontroli wyrobów tytoniowych jest opodatkowanie wyrobów tytoniowych, preferowane jest podejście kompleksowe i wdrażanie jednocześnie różnych metod kontroli wyrobów tytoniowych.

Realizowanie polityki kontroli wyrobów tytoniowych spowodowało, że branża przesunęła swoją produkcję w kierunku bardziej atrakcyjnych i nowoczesnych urządzeń, tj.: podgrzewane produkty tytoniowe (np. IQOS) oraz elektroniczne systemy dostarczania nikotyny i nie nikotyny (np. papierosy elektroniczne).

Na podstawie polskiego badania ankietowego z października 2023 r. zrealizowanego przez Ogólnopolski Panel Badawczy Ariadna dla Biura do Spraw Substancji Chemicznych (BSCh) obejmującego 550 osób, które miały jakiegokolwiek doświadczenie z e-papierosami wykazano, że zwiększyła się częstotliwość użytkowania e-papierosów. W 2022 roku 39% respondentów deklarowało codzienne użytkowanie ww. wyrobu, podczas gdy w 2023 r. – już 53%. Przemysł tytoniowy promuje strategię marketingową docierając do szerszego potencjalnego rynku, zwłaszcza do młodzieży podkreślając, że wpływ używania tych produktów na zdrowie będzie mniejszy niż w przypadku tradycyjnych papierosów. Dowody na skuteczność i długoterminowe skutki zdrowotne tych wyrobów, zarówno pozytywne, jak i negatywne, są nadal jednak nieliczne [13] a rozpowszechnienie podwójnego stosowania (tj. tytoń palny wraz z nowym wyrobem) jest wysokie. Zrozumienie stosunku korzyści do ryzyka stosowania tych produktów wymaga bezspornie dalszych badań.

W odnalezionych rekomendacjach zagranicznych i polskich towarzystw naukowych i wytycznych klinicznych [14] kluczowe miejsce zajmuje zapobieganie inicjacji palenia poprzez wprowadzenia zakazu palenia w szkołach i prowadzenie działań edukacyjnych będących integralną częścią programu nauczania.

Ważne miejsce zajmują masowe kampanie informacyjno-edukacyjne mające na celu zapobieganie inicjacji palenia wśród dzieci i młodzieży oraz podniesienie świadomości społeczeństwa na temat uzależniającego i szkodliwego charakteru wyrobów tytoniowych.

Towarzystwa naukowe podkreślają istotę przeprowadzania krótkiej porady oraz oferowania wsparcia i poradnictwa behawioralnego w połączeniu z farmakoterapią wspomagającą rzucanie palenia (nikotynowa terapia zastępcza – NTZ, bupropion, wardeniklina). W żadnym wypadku nie rekomenduje się alternatywnych metod przyjmowania nikotyny np. w formie e-papierosów, podgrzewaczy tytoniu czy nikotyny syntetycznej. W związku z powyższym podkreśla się potrzebę realizacji szkoleń dla personelu medycznego z zakresu wsparcia oraz leczenia uzależnienia od nikotyny.

Polska Agencja Oceny Technologii Medycznych (AOTMiT) w grudniu 2023 przygotowała rekomendacje w sprawie zalecanych technologii medycznych, działań przeprowadzanych w ramach programów polityki zdrowotnej (PPZ) oraz warunków realizacji tych programów, dotyczących profilaktyki uzależnień od tytoniu (nikotyny). Programy polityki zdrowotnej mogą być opracowywane, wdrażane, realizowane i finansowane przez ministrów oraz jednostki samorządu terytorialnego (JST). Rozpoczęcie wdrożenia, realizacji i finansowania PPZ może nastąpić wyłącznie po uzyskaniu **pozytywnej lub warunkowo pozytywnej rekomendacji Prezesa AOTMiT**.

Prezes Agencji rekomenduje prowadzenie:

- » antynikotynowych punktów konsultacyjnych, których działania powinny być dostępne dla wszystkich użytkowników wyrobów nikotynowych;
- » konsultacji antynikotynowych w warunkach szpitalnych wśród hospitalizowanych pacjentów uzależnionych od nikotyny;
- » działań profilaktycznych w szkołach z zakresu uzależnień od nikotyny skierowanych do uczniów, rodziców oraz wszystkich pracowników placówek oświatowych;
- » szkoleń dla personelu medycznego z zakresu minimalnej interwencji antynikotynowej i komunikacji z pacjentem uzależnionym od nikotyny;
- » działań informacyjno-edukacyjnych na temat ww. interwencji, a także zachowań prozdrowotnych, czynników ryzyka i działań profilaktycznych dotyczących uzależnienia od nikotyny skierowanych do populacji ogólnej.

W celu przeprowadzenia minimalnej interwencji antynikotynowej przez lekarzy zaleca się stosowanie zestawu pięciu pytań opisanych jako zasada „**5P**” tj.:

1. PYTAJ każdego pacjenta czy pali tytoń.

2. PORADŹ jak zaprzestać palenia.

3. POZNAJ postawę pacjenta wobec użytkowania i zaprzestania korzystania z wyrobów nikotynowych.

4. POMÓŻ użytkującemu wyroby nikotynowe pacjentowi w opracowaniu planu zaprzestania palenia.

5. PLANUJ następne wizyty z pacjentem.

Zgodnie z Mapami Potrzeb Zdrowotnych opracowanymi przez Ministerstwo Zdrowia nowotwór złośliwy płuca w 2029 roku będzie nadal dominującym nowotworem pod względem liczby zachorowań. Istotność problemu zdrowotnego, rozpowszechnienie czynników ryzyka jak również potwierdzenie zasadności oraz efektywności programów profilaktyki pierwotnej przez ciało opiniotwórcze i decyzyjne jakim jest AOTMiT powinno być sygnałem do niezwłocznego rozpoczęcia w praktyce działań programu zdrowotnego. Warto podkreślić, że w Polsce obecnie funkcjonuje zaledwie kilka Poradni Antynikotynowych finansowanych przez NFZ np.: w Warszawie, Gdańsku czy Krakowie.

Profilaktyka wtórna

W ramach profilaktyki wtórnej realizowane są programy badań przesiewowych w kierunku raka płuca, które wykorzystują niskodawkową tomografię komputerową (NDTK). Na podstawie analiz badań obserwacyjnych prowadzonych w Japonii, USA oraz Niemczech potwierdzono, że NDTK można wykryć około 85-93% nowotworów płuca w I stopniu zaawansowania klinicznego [15]. Inne wielośrodkowe badanie amerykańskie *National Lung Screening Trial (NLST)* potwierdziło 18% guzów łagodnych wykrywanych za pomocą NDKT [16]. W związku z ryzykiem nadwykrywalności *European Society of Radiology, European Respiratory Society i European Society of Thoracic Surgery* rekomendują wykonywanie badań przesiewowych w ramach długofalowych programów prowadzonych w kompleksowo wyposażonych, wielodyscyplinarnych i certyfikowanych ośrodkach prowadzonych przez zespoły wielodyscyplinarne (w Polsce: Centrum Badań Przesiewowych Raka Płuca). Celem redukcji liczby wyników fałszywie dodatnich rekomenduje się ocenę czynników ryzyka według standardów *National Comprehensive Cancer Network (NCCN)* tj: stosowanie modeli predykcyjnych z użyciem regresji liniowej, dzięki którym można oszacować indywidualne ryzyko zachorowania na raka płuca, oznaczanie biomarkerów genomowych lub białkowych uzyskanych z surowicy krwi oraz zaawansowaną analizę obrazu.

W opublikowanych w 2020 r. wynikach randomizowanego badania klinicznego o akronimie NELSON (*Nederlands-Leuvens Longkanker Screenings Onderzoek*) przeprowadzonego na populacji holendersko-belgijskiej potwierdzono użyteczność NDTK jako badania przesiewowego w warunkach europejskich. Naukowcy szacują, że dzięki przeprowadzeniu 4 rund badań screeningowych z użyciem NDTK wśród 7900 uczestników udało się zapobiec ok. 60 zgonom z powodu raka płuca [17]. Nadal jednak wyzwaniem pozostaje ocena opłacalności ekonomicznej screeningu, która nie ma zdefiniowanej wartości i zależy od danego kraju.

Kolejne badanie o akronimie UKLS (*The United Kingdom Lung Cancer Screening*) dotyczące wpływu screeningowej NDTK na zmniejszenie umieralności z powodu raka płuca nie doprowadziło do uzyskania wyników znamienne statystycznych. Strategia pojedynczego badania przesiewowego nie jest zalecana obecnie w Europie [18]. Wartość

dotaną mają wyniki międzynarodowej meta-analizy dziewięciu randomizowanych badań, do której włączono również badanie UKLS.

Powyższa metaanaliza potwierdziła, że stosowanie przesiewowej NDTK w porównaniu do grupy kontrolnej wiąże się ze zmniejszeniem względnego ryzyka zgonu z powodu raka płuca o 16% (RR: 0,84; 95% CI: 0,76-0,92) [19]. Stanowi to potwierdzenie potrzeby stosowania screeningowej NDTK w odpowiednio określonych grupach ryzyka.

Jeszcze przed opublikowaniem ostatecznych wyników badania NELSON Ministerstwo Zdrowia zdecydowało o wdrożeniu w 2018 r. pilotażu Ogólnopolskiego Programu Wczesnego Wykrywania Raka Płuca z wykorzystaniem NDTK, zatwierdzonego przez AOTMiT. Program wpisuje się w strategię aktualnej edycji Narodowego Programu Zwalczenia Chorób Nowotworowych na lata 2016- 2024 [20].

Celem tego programu jest stosowanie profilaktyki pierwotnej oraz wtórnej raka płuca, co w założeniu powinno przełożyć się na poprawę wskaźnika przeżywalności oraz redukcję wskaźnika umieralności pacjentów z rozpoznaniem raka płuca. Przed zastosowaniem badania przesiewowego każdy pacjent powinien wypełnić ankietę dotyczącą stopnia uzależnienia od nikotyny i motywacji do porzucenia nałogu. Minimalna interwencja antynikotynowa w ramach programu przesiewowego nie zwiększa kosztów programu a jednocześnie zwiększa efektywność w kosztach pozyskanych lat życia skorygowanych o jakość (QALY) 1,7-5,4 krotnie [21]. Profilaktyka pierwotna prowadzona w ramach programu jest komplementarna z celami Centrum Onkologii-Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie w Warszawie oraz Poradni Antynikotynowych.

Do badań przesiewowych kwalifikują się pacjenci:

- » w wieku 55-74 lat z nikotynizmem w wymiarze co najmniej 20 paczkolet w wywiadzie i okresem abstynencji tytoniowej nie dłuższym niż 15 lat;
- » w wieku 50-74 lat z nikotynizmem w wymiarze co najmniej 20 paczkolet w wywiadzie i okresem abstynencji tytoniowej nie dłuższym niż 15 lat oraz mających przynajmniej jeden z poniższych czynników ryzyka:
 - » ekspozycja zawodowa na krzemionkę, beryl, nikiel, chrom, kadm, azbest, związki arsenu, spaliny silników diesla, dym ze spalania węgla kamiennego lub sadzę;
 - » ekspozycja na radon;
 - » przebyty rak płuca, chłoniak, rak głowy i szyi lub raki zależne od palenia tytoniu, np. rak pęcherza moczowego;
 - » rak płuca w wywiadzie u krewnych pierwszego stopnia;
 - » dodatni wywiad w kierunku chorób płuc – POChP lub włóknienia płuc (IPF).

NDTK przy zastosowaniu 16-rzędowych spiralnych tomografów komputerowych z algorytmami rekonstrukcyjnymi powinna zostać wykonywana w myśl zasady ALARA (*as Low As Reasonably Achievable*), czyli z użyciem najmniejszej możliwej dawki promieniowania, która przy akceptowalnej jakości otrzymywanych obrazów pozwoli na postawienie rozpoznania. Celem jest wykrycie raka płuca (guzka), ale należy raportować dodatkowe zmiany tj: rozedma, miażdżyca naczyń, stopnia uwapnienia tętnic, tętniaki inne patologiczne zmiany w piersi, wątrobie, nerek czy nadnerczy. Guzki zaszeregowane są do czterech kategorii według stopnia ryzyka złośliwości. Postępowanie w każdej z podgrup uzależnione jest od wymiaru wykrytego guzka oraz jego cech morfologicznych.

Warto jednak przypomnieć, że w pierwszych latach pandemia Covid 19 uniemożliwiła realizację badań przesiewowych. Ograniczenie możliwości dostępu pacjentów do opieki zdrowotnej poprzez wprowadzenie teleporad często bez właściwej diagnostyki, zawieszenie funkcjonowania programów przesiewowych, a także obawa pacjentów przed zgłaszaniem się do lekarza z niepokojącymi objawami, spowodowany możliwością zakażenia się SARS-CoV-2, przyczyniły się do wzrostu zgonów z powodu raka płuca. Prognozowana śmiertelność po 5 latach z powodu tego nowotworu może nawet wzrosnąć o 5,3% [22].

Program był realizowany do końca 2023 r. Obecnie oczekuje na wyniki ewaluacji, po której możliwa będzie jego kontynuacja.

Nadal jednak zaprzestanie palenia powinno być podstawą minimalizacji dotkliwych konsekwencji tego zagrożenia dla zdrowia publicznego. Wyniki głównych badań przesiewowych w kierunku raka płuca mogą pokazać szansę na walkę z tą chorobą na poziomie wtórnym. Aby położyć kres tej tragicznej sytuacji, konieczne będą dalsze wysiłki różnych podmiotów, od decydentów po zainteresowane strony, a także pracowników systemu ochrony zdrowia i badaczy.

Bibliografia

1. Díez-Izquierdo A, Cassanello-Peñarroya P, Lidón-Moyano C, et al. Update on Thirdhand Smoke: A Comprehensive Systematic Review. *Environ Res* 2018;167:341-71 [Crossref] z tym linkiem <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0013935118303852?via%3Dihub>; [PubMed] <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30096604/>
 2. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Smoking-attributable mortality, years of potential life lost, and productivity losses--United States, 2000-2004. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2008;57(45):1226-1228.
 3. Martín-Sánchez JC, Bilal U, Clèries R, et al. Modelling Lung Cancer Mortality Rates From Smoking Prevalence: Fill in the Gap. *Cancer Epidemiol* 2017;49:19-23. [Crossref] <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1877782117300589?via%3Dihub>; [PubMed] <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28528290/>
 4. Thun M, Peto R, Boreham J, et al. Stages of the cigarette epidemic on entering its second century. *Tob Control* 2012;21:96-101. [Crossref] <https://tobaccocontrol.bmj.com/content/21/2/96>; [PubMed] <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22345230/>
 5. Lopez AD, Collishaw NE, Piha T. A descriptive model of the cigarette epidemic in developed countries. *Tob Control*. 1994 Sep;3(3):242-7. PMID: PMC1759359.
 6. Martín-Sánchez JC, Lunet N, González-Marrón A, et al. Projections in breast and lung cancer mortality among women: A Bayesian analysis of 52 countries worldwide. *Cancer Res* 2018;78:4436-42. [Crossref] <https://aacrjournals.org/cancerres/article/78/15/4436/545311/Projections-in-Breast-and-Lung-Cancer-Mortality>; [PubMed] <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30068667/>
-

7. NIZP PZH-PIB 2020
 8. Leuraud K, Schnelzer M, Tomasek L, et al. Radon, smoking and lung cancer risk: results of a joint analysis of three European case-control studies among uranium miners. *Radiat Res.* 2011;176(3):375-387. doi:10.1667/rr2377.1
 9. Li X, Hemminki K. Familial multiple primary lung cancers: a population-based analysis from Sweden. *Lung Cancer.* 2005;47(3):301-307. doi:10.1016/j.lungcan.2004.07.048
 10. Drope J, Schluger N, Cahn Z, et al. The Tobacco Atlas [Internet]. Atlanta: American Cancer Society and Vital Strategies; [cited 3 June 2019]. Available from: <https://tobaccoatlas.org/>.
 11. Pedersen JH, Rzyman W, Veronesi G, et al. Recommendations from the European Society of Thoracic Surgeons (ESTS) regarding compute tomography screening for lung cancer in Europe. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2017;51(3):411-420. doi:10.1093/ejcts/ezw418
 12. Kauczor HU, Bonomo L, Gaga M, et al. ESR/ERS white paper on lung cancer screening. *Eur Respir J.* 2015;46(1):28-39. doi:10.1183/09031936.00033015
 13. Worku D, Worku E. A narrative review evaluating the safety and efficacy of e-cigarettes as a newly marketed smoking cessation tool. *SAGE Open Med* 2019;7:2050312119871405. [Crossref] <https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/2050312119871405>; [PubMed] <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31452888/>
 14. Rekomendacje kliniczne Konsensusu Polskich Ekspertów – KPE; Multidyscyplinarnego Zespołu Polskich Ekspertów – MZPE; Niezależnego europejskiego zespołu ekspertów oraz następujących organizacji: Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego Państwowego Zakładu Higieny Państwowy Instytut Badawczy – NIZP PZH-PIB (Polska); National Institute for Health and Care Excellence – NICE (Wielka Brytania); Community Behavioral Health – CBH (Stany Zjednoczone); National Clinical Effectiveness Committee – NCEC (Irlandia); American Academy of Pediatrics – AAP (Stany Zjednoczone); Centers for Disease Control and Prevention – CDC (Stany Zjednoczone); New Zealand Ministry of Health – NZMH (Nowa Zelandia); The Royal Australian College of General Practitioners – RACGP (Australia); US Preventive Services Task Force – USPSTF (Stany Zjednoczone); American Academy of Pediatric Dentistry – AAPD (Stany Zjednoczone); American College of Obstetricians and Gynecologists – ACOG (Stany Zjednoczone); American Nurses Association – ANA (Stany Zjednoczone); American Thoracic Society – ATS (Stany Zjednoczone); The Community Preventive Services Task Force – CPSTF (Stany Zjednoczone); American College of Cardiology – ACC (Stany Zjednoczone); American College of Preventive Medicine – ACPM (Stany Zjednoczone); Canadian Task Force on Preventive Health Care – CTFPHC (Kanada); Association for the Treatment of Tobacco Use and Dependence/ Society for Research on Nicotine and Tobacco – ATTUD/SRNT (Stany Zjednoczone); European Society of Cardiology – ESC (Europa); National Comprehensive Cancer Network – NCCN (Stany Zjednoczone); Centers for Disease Control and Prevention/National Institute for Occupational Safety and Health – CDC/NIOSH (Stany Zjednoczone); World Health Organizationz
-

-
15. Marshall HM, Bowman R V., Yang IA, Fong KM, Berg CD. Screening for lung cancer with low-dose computed tomography: A review of current status. *J Thorac Dis.* 2013; 5: S524-39. doi:10.3978/j.issn.2072-1439.2013.09.06.
 16. Patz EF, Pinsky P, Gatsonis C, Sicks JD, Kramer BS, Tammemägi MC, et al. Overdiagnosis in low-dose computed tomography screening for lung cancer. *JAMA Intern Med.* 2014; 174: 269–74. doi:10.1001/jamainternmed.2013.12738.
 17. Duffy SW, Field JK. Mortality Reduction with Low-Dose CT Screening for Lung Cancer. *N Engl J Med.* 2020;382(6):572-573. doi:10.1056/NEJMe1916361
 18. Kauczor HU, Baird AM, Blum TG, et al. ESR/ERS statement paper on lung cancer screening. *Eur Respir J.* 2020;55(2):1900506. Published 2020 Feb 12. doi:10.1183/13993003.00506-2019
 19. Field JK, Vulkan D, Davies MPA, et al. Lung cancer mortality reduction by LDCT screening: UKLS randomised trial results and international meta-analysis. *Lancet Reg Health Eur.* 2021;10:100179. Published 2021 Sep 11. doi:10.1016/j.lanepe.2021.100179
 20. Ministerstwo Zdrowia. Program badań w kierunku wykrywania raka płuca. <https://www.gov.pl/web/zdrowie/program-badan-w-kierunku-wykrywania-raka-pluca> Załącznik nr 17
 21. Goffin JR, Flanagan WM, Miller AB, Fitzgerald NR, Memon S, Wolfson MC, et al. Biennial 57 lung cancer screening in Canada with smoking cessation outcomes and cost-effectiveness. *Lung Cancer* 2016;101:98–103
 22. Maringe C, Spicer J, Morris M, et al. The impact of the COVID-19 pandemic on cancer deaths due to delays in diagnosis in England, UK: a national, population-based, modelling study [published correction appears in *Lancet Oncol.* 2021 Jan;22(1):e5]. *Lancet Oncol.* 2020;21(8):1023-1034. doi:10.1016/S1470-2045(20)30388-0
-

2.

Diagnostyka raka płuca w świetle obowiązujących standardów

dr hab. n. med. Maciej Głogowski

Celem wykonywanych badań diagnostycznych u chorych z podejrzeniem raka płuca jest zarówno uzyskanie właściwego rozpoznania patomorfologicznego pozwalającego na określenie podtypu nowotworu płuca wraz z określeniem predykcyjnych czynników genetyczno-molekularnych jak również ocena zaawansowania nowotworu. Dopiero oba te elementy mają wpływ na wybór właściwej metody leczenia. Dlatego niezwykle ważne jest, aby diagnostyka była prowadzona według najnowszych obowiązujących zaleceń opracowanych przez towarzystwa naukowe i grupy ekspertów. Pozwala to na zapewnienie właściwej sprawności i efektywności, a zakres diagnostyki oraz optymalizacja zastosowanych metod powinny zawsze uwzględniać nadrzędny cel jakim jest leczenie. Właściwa diagnostyka raka płuca jest prowadzona zarówno z użyciem metod nieinwazyjnych (badania obrazowe) jak i inwazyjnych (z zastosowaniem technik biopsyjnych umożliwiających pobranie materiału do badań patomorfologicznych).

Podstawowym badaniem obrazowym w diagnostyce raka płuca jest badanie tomografii komputerowej (TK) klatki piersiowej z użyciem podanego dożylnie środka cieniującego (badanie powinno dodatkowo obejmować górną część jamy brzusznej z nadnerczami). Badanie powinno być wykonane u osób z potencjalnymi objawami przedmiotowymi i/lub podmiotowymi raka płuca zarówno w przypadku jakichkolwiek podejrzeń po wykonanym konwencjonalnym RTG klatki piersiowej jak i przy prawidłowym badaniu RTG. Ponieważ w dalszym procesie diagnostycznym raka płuca z uwagi na jego złożoność potrzebna jest współpraca wielospecjalistyczna wydaje się najbardziej optymalnym jest aby na tym etapie w warunkach polskich (do czasu stworzenia Ośrodków Kompleksowej Diagnostyki i Leczenia raka płuca, *Lung Cancer Units*, po potwierdzonym w TK klatki piersiowej podejrzeniu raka płuca pacjent trafiał jak najszybciej celem dalszej diagnostyki zarówno obrazowej jak inwazyjnej do placówki specjalistycznej pulmonologicznej lub torakochirurgicznej (zarówno na poziomie AOS jak i szpitalnym). Niezwykle istotne wydaje się również, aby do tego typu ośrodków diagnostyczno-terapeutycznych kierowani byli wyłącznie pacjenci, których stan sprawności pozwala na przeprowadzenie dalszych badań (szczególnie inwazyjnych) pozwalających w efekcie na wdrożenie odpowiedniego leczenia przyczynowego. Pozwoli to na optymalne wykorzystanie zarówno zasobów sprzętowych jak i kadrowych. Uzyskanie bowiem rozpoznania patomorfologicznego w wyniku wykonanego badania inwazyjnego u chorego w złym stanie ogólnym, u którego poza leczeniem objawowym nie może być zastosowane żadne leczenie przyczynowe, jest merytorycznie nieuzasadnione i nie niesie za sobą żadnych implikacji terapeutycznych.

Na tym etapie diagnostyki, już w ośrodku pulmonologicznym lub torakochirurgicznym, po wykonanym TK klatki piersiowej, najczęściej wykonywane są badania inwazyjne (endoskopowe lub biopsja przez ścianę klatki piersiowej), którym poświęcony będzie oddzielny rozdział. Równolegle u tych pacjentów mogą być wykonywane badania nieinwazyjne pozwalające na ocenę stopnia zaawansowania. Wśród metod nieinwazyjnych poza tomografią komputerową kluczowym badaniem pozwalającym na wstępną ocenę stopnia zaawansowania z wyodrębnieniem pacjentów kierowanych do pierwotnego leczenia chirurgicznego, leczenia skojarzonego o założeniu radykalnym i takich u których istnieje jedynie możliwość leczenia paliatywnego, jest badanie pozytonowej emisyjnej tomografii komputerowej (PET-TK).

Nie oznacza to oczywiście, że badanie takie powinno być wykonane u każdego pacjenta z rozpoznaniem raka płuca, ale na pewno u wszystkich, u których na podstawie wykonanej uprzednio diagnostyki planujemy radykalne leczenie raka płuca (zarówno chirurgiczne jak i chemioradioterapią). Oczywistym jest, że pacjentów w złym stopniu

sprawności, a także tych z potwierdzoną innymi badaniami obrazowymi i potwierdzoną histopatologicznie biopsją, ewidentną chorobą przerzutową nie należy kierować na badanie PET-TK. Według wytycznych BTS, ACCP i ESMO, każdy pacjent, który jest potencjalnym kandydatem do leczenia raka płuca o założeniu radykalnym (z intencją wyleczenia) powinien mieć wykonane badanie PET-TK. Pozwala to na stwierdzenie bezobjawowych ognisk przerzutowych (nawet do 20%), których ewentualne potwierdzenie badaniem patomorfologicznym wyklucza (poza niewielką grupą pacjentów z tzw. chorobą oligometastatyczną) z leczenia radykalnego, co pozwala na właściwą optymalizację i jakość leczenia. Mimo kosztochłonności pojedynczego badania postępowanie takie jest optymalne z punktu widzenia kosztowej efektywności, co potwierdzają wyniki badań klinicznych.

U chorych ze stwierdzonymi przerzutami, czyli w stadium uogólnienia choroby, u których możliwe jest leczenie przyczynowe (a nie tylko objawowe) wyśiłki należy skupić na właściwie i optymalnie przeprowadzonej diagnostyce inwazyjnej pozwalającej na pobranie materiału do badań patomorfologicznych i molekularnych, co również ma wpływ na uzyskiwane wyniki leczenia, czyli na jakość leczenia onkologicznego.

Wśród pacjentów kwalifikowanych do leczenia radykalnego raka płuca najbardziej istotne znaczenie ma ocena węzłów chłonnych śródpiersia. Właściwa ocena węzłów chłonnych śródpiersia stanowi niejako granicę pomiędzy pacjentami poddawanymi pierwotnemu leczeniu chirurgicznemu, a tymi kwalifikowanymi do leczenia skojarzonego (u większości chorych bez udziału chirurgii). Ocena ta powinna być zgodna z obowiązującymi standardami, w których praktycznie w większości pacjentów wymagana jest mikroskopowa ocena węzłów chłonnych śródpiersia jako najistotniejszego czynnika prognostycznego po wykluczeniu przerzutów odległych.

Ponieważ badanie PET-TK charakteryzuje się dość niską dodatnią wartością predykcyjną (PPV) w ocenie węzłów chłonnych śródpiersia, to w praktyce, każdy pacjent z dodatnim wynikiem badania PET-TK w odniesieniu do węzłów chłonnych śródpiersia powinien mieć wykonane badanie z pobraniem materiału z węzłów chłonnych śródpiersia celem oceny mikroskopowej. Pozwala to na uniknięcie pomyłki diagnostycznej i dyskwalifikacji od potencjalnego leczenia operacyjnego pacjenta z „fałszywie” dodatnim wynikiem badania PET-TK, u którego możliwa jest radykalna resekcja guza wraz z węzłami chłonnymi śródpiersia. W pierwszej kolejności badaniami dedykowanymi do weryfikacji mikroskopowej są badania małoinwazyjne EBUS i EUS-b. W dalszej kolejności przy wyniku negatywnym badania biopsyjnego i wysokim ryzyku przerzutów raka do węzłów chłonnych śródpiersia badaniami dedykowanymi są wideomediastinoskopia oraz wideotorakoskopia.

W praktyce klinicznej, u chorych ze znacznie powiększonymi węzłami chłonnymi śródpiersia (*bulky disease*) stwierdzonymi już w badaniu TK, badania małoinwazyjne wykorzystywane są już na tym etapie diagnostyki celem uzyskania wyniku patomorfologicznego. Badanie PET-TK jest w tej grupie chorych (bez ewidentnych radiologicznych lub klinicznych cech uogólnienia choroby, ale z nieresekcyjną chorobą w obrębie klatki piersiowej) wykorzystywane w celu identyfikacji ewentualnych „niemych” przerzutów odległych, celem ostatecznej kwalifikacji do chemioradioterapii (najczęściej w ramach procedury planowania leczenia). Takie postępowanie pozwala na optymalne wykorzystanie zasobów kadrowych i sprzętowych oraz pozwala na uniknięcie niepotrzebnych badań diagnostycznych z punktu widzenia kwalifikacji do odpowiedniego leczenia onkologicznego.

Z drugiej strony, ujemny wynik badania PET-TK w odniesieniu do węzłów chłonnych śródpiersia przy dość wysokiej ujemnej wartości predykcyjnej (NPV) przekraczającej 93% pozwala na kwalifikowanie pacjentów do leczenia operacyjnego z obwodowym guzem, nie przekraczającym średnicy 3cm i z rozpoznaniem raka płaskonabłonkowego bez wykonywania diagnostyki inwazyjnej śródpiersia. Nadal jednak, według proponowanych wytycznych ESTS, pacjenci z rozpoznaniem raka innego niż płaskonabłonkowy, każdego nowotworu o wymiarze większym niż 3cm, a także z powiększonymi w obrazie TK węzłami chłonnymi śródpiersia powyżej 10mm w najmniejszym wymiarze (definicja powiększonych węzłów chłonnych śródpiersia) mają wskazania do inwazyjnej diagnostyki węzłów chłonnych śródpiersia. Podobna sytuacja odnosi się do pacjentów z podejrzeniem zajęcia węzłów chłonnych wnęki płuca w badaniu PET-TK, mimo ujemnego wyniku w odniesieniu do węzłów chłonnych śródpiersia i braku ich powiększenia w TK powyżej 10mm. W niektórych ośrodkach diagnostyka inwazyjna węzłów chłonnych śródpiersia jako element oceny zaawansowania jest obligatoryjna u każdego pacjenta potencjalnie kwalifikowanego do leczenia chirurgicznego.

Wśród innych metod diagnostyki inwazyjnej pozwalającej na ustalenie właściwego rozpoznania i uzyskanie dobrego jakościowo materiału do badań patomorfologicznych najczęściej wykorzystywanymi poza metodami endoskopowymi są biopsja guza przez ścianę klatki piersiowej pod kontrolą TK (omówiona w osobnym rozdziale) oraz wideoskopia. Wideoskopia jest często wykorzystywaną metodą diagnostyczną inwazyjną u chorych z narastającym lub nawracającym płynem w jamie opłucnej, przy braku możliwości pobrania zadowalającego pod kątem badań patomorfologicznych materiału w mniej inwazyjny sposób. Ponieważ rozpoznanie tą metodą, na podstawie wykonanej biopsji opłucnej, oznacza poza rozpoznaniem patomorfologicznym nowotworu również IV stopień zaawansowania to wykorzystanie jej powinno być ograniczone do diagnostyki pacjentów z podejrzeniem nowotworu, u których potencjalnie jest możliwe włączenie (w następstwie uzyskania rozpoznania patomorfologicznego) leczenia systemowego.

Należy również podkreślić, że o ile u chorych kwalifikowanych do radykalnego leczenia chirurgicznego (po właściwym ustaleniu stopnia zaawansowania) istotą diagnostyki inwazyjnej przed operacją jest uzyskanie rozpoznania raka płuca to u pozostałych chorych kwalifikowanych do leczenia ogromne znaczenie będzie miała jakość i ilość pobranego materiału biopsyjnego pozwalająca na wielokierunkową diagnostykę patomorfologiczną (w tym ekspresji PD-L1) i molekularną. W przypadku możliwości pobrania jedynie materiału cytopatologicznego istotne znaczenie ma nie tylko wykonanie rozmazów, ale również cytobloku. Oczywiście, biorąc pod uwagę postęp w leczeniu okołoperacyjnym z nowymi możliwościami leczenia neoadjuwantowego (obecnie jedynie w ramach badań klinicznych) jest bardzo prawdopodobne, że u części chorych z resekcyjnym rakiem płuca w niedługim czasie będzie istniała konieczność ustalenia nie tylko rozpoznania patomorfologicznego wraz z podtypem nowotworu płuca, ale także ocena molekularno-genetycznych czynników predykcyjnych.

Z kolei u chorych z niewielkim, najczęściej położonym obwodowo, aktywnym metabolicznie guzem płuca w PET-TK w I stopniu zaawansowania (wg badania PET-TK), którzy są kandydatami do radykalnego leczenia operacyjnego należy niekiedy zrezygnować z diagnostyki inwazyjnej (endoskopia, biopsja przez ścianę klatki piersiowej) na rzecz badania śródoperacyjnego co pozwala zarówno na przyspieszenie procesu diagnostycznego jak i na szybsze optymalne leczenie. Warto bowiem pamiętać, że ujemny wynik biopsji w badaniu inwazyjnym endoskopowym czy w biopsji przezklatkowej nie

wyklucza rozpoznania nowotworu płuca i przy współistniejącym dużym prawdopodobieństwie nowotworu wynikającym z badań obrazowych jest wręcz wskazaniem do wykonania badania śródoperacyjnego.

U pacjentów poddawanych radykalnemu leczeniu chirurgicznemu raka płuca ze względu na ryzyko powikłań okołoperacyjnych, poza stopniem zaawansowania i stopniem sprawności, konieczna jest ocena wydolności oddechowej, stanu układu krążenia oraz ryzyka powikłań ze strony innych współistniejących chorób. Stopień sprawności jest oceniany w skali Karnofsky'ego lub skali Zubroda (ECOG, WHO). W oszacowaniu ryzyka powikłań ze strony układu sercowo-naczyniowego podstawową metodą jest badanie elektrokardiograficzne (EKG), uzupełniane w razie wskazań wynikających z badania EKG oraz wywiadów i badania przedmiotowego, o elektrokardiografię wysiłkową, echokardiografię i koronarografię. Podstawowymi badaniami w ocenie wydolności oddechowej są spirometria [z wartościami natężonej objętości wydechowej pierwszosekundowej (FEV₁), nasilonej pojemności życiowej (FVC), maksymalnej wentylacji (MVV)], badanie zdolności dyfuzyjnej tlenu węgla (DLCO) oraz badanie gazometryczne krwi tętniczej. W przypadku wątpliwości wynikających z niskich wartości FEV₁ i DLCO lub wątpliwości kardiologicznych konieczne jest przeprowadzenie oceny czynnościowej z wykorzystaniem płucno-sercowego testu wysiłkowego z pomiarem V_{O2}max. W przypadku leczenia chirurgicznego prawidłowy proces diagnostyczny zamyka zawsze pełne badanie patomorfologiczne (wraz z określeniem profilu molekularnego raka oraz oznaczeniem PD-L1) usuniętego nowotworu wraz z okolicznymi węzłami chłonnyymi śródpiersia. Obecnie jest to wymagane z uwagi na nowe możliwości leczenia uzupełniającego, poza chemioterapią, po radykalnej operacji u chorych w stopniach zaawansowania IB-III A i III B (tylko T3N2 wg 8 edycji klasyfikacji TNM raka płuca).

Z uwagi na złożoność całego procesu diagnostycznego, wymagającego współpracy wielospecjalistycznej, wydaje się, że przy dość dużym rozproszeniu i zróżnicowaniu szeroko rozumianych kompetencji i możliwości sprzętowo-kadrowych ośrodków diagnostyki i leczenia raka płuca w Polsce (zarówno pulmonologicznych, torakochirurgicznych jak i onkologicznych, z których każdy powinien dysponować odpowiednim zapleczem kadrowym, sprzętowym i diagnostyki badań patomorfologicznych i molekularnych) próba wybrania właściwej ścieżki organizacyjnej w tworzeniu optymalnej strategii diagnostyki i leczenia raka płuca nadal pozostaje nie lada wyzwaniem. Niewątpliwie należy wziąć te czynniki pod uwagę w projektach tworzenia Ośrodków Kompleksowej Diagnostyki i Leczenia raka płuca (Lung Cancer Units), które powinny spełniać nie tylko wymogi kompleksowego leczenia raka płuca, ale również (a może przede wszystkim) szybkiej i optymalnej diagnostyki pacjentów z podejrzeniem nowotworów płuca.

3.

Rola pulmonologa interwencyjnego w diagnostyce raka płuca

prof. dr hab. n. med. Rafał Krenke

Pulmonologia interwencyjna jest podspecjalnością, która w ostatnich 10-20 latach wyodrębniła się z szerszej specjalności – pneumonologii (określanej także jako pulmonologia). Podstawową przyczyną wyłonienia się tej podspecjalności był i jest dynamiczny rozwój technologii medycznych stwarzających nowe możliwości diagnostycznej i terapeutycznej interwencji w obrębie układu oddechowego. Duża część nowych technik jest ukierunkowana na diagnostykę i leczenie nowotworów klatki piersiowej, w tym przede wszystkim raka płuca. Powyższe zadania należą więc do podstawowych obszarów działania pulmonologii interwencyjnej. Szczególne zainteresowania i predyspozycje części pneumonologów zajmujących się zarówno diagnostyczną jak i terapeutyczną interwencją w układzie oddechowym skutkują szybkim poznawaniem nowych technik i ich wdrażaniem do praktyki klinicznej. Jednocześnie, ograniczenie liczby specjalistów przeprowadzających niektóre złożone i zaawansowane procedury pozwala na szybsze nabycie umiejętności, doświadczenia i odpowiednich kompetencji, co przekłada się na realną korzyść dla chorych poddawanych tym zabiegom. Jest oczywiste, że takie zabiegi nie są wyłączną domeną pulmonologii interwencyjnej, lecz mogą być skutecznie przeprowadzane także przez lekarzy innych specjalności posiadających odpowiednie umiejętności i doświadczenie, co w szczególności dotyczy specjalistów chirurgii klatki piersiowej. Mając na względzie fakt, że w przypadku chorych na raka płuca czas od pojawienia się objawów do rozpoczęcia leczenia ma absolutnie kluczowe znaczenie, inwazyjna diagnostyka tych chorych powinna charakteryzować się odpowiednim zakresem badań, przebiegać wyjątkowo sprawnie i dostarczać wysokiej jakości materiałów tkankowych do badań patomorfologicznych i molekularnych. O realizację powyższych zadań należy zadbać niezależnie od tego jaki ośrodek lub też lekarz jakiej specjalności jest zaangażowany w proces diagnostyczny.

Spektrum metod diagnostycznych stosowanych u chorych z podejrzeniem raka płuca jest bardzo szerokie. Wybór metody, która ma być zastosowana w indywidualnym przypadku zależy od wielu czynników, m.in. od jej dostępności i doświadczeń ośrodka, stanu pacjenta i anatomicznej lokalizacji zmian. W każdym przypadku, podstawą do planowania badań inwazyjnych powinny być wyniki wcześniej przeprowadzonych badań obrazowych, w tym badania tomografii komputerowej (TK) i pozytonowej tomografii emisyjnej w połączeniu z tomografią komputerową (PET-TK). Różne metody wykorzystywane do pozyskiwania materiałów biologicznych pozwalających na potwierdzenie nowotworu i ustalenie stopnia zaawansowania (*staging*) raka płuca zestawiono w Tabeli 1.

Tabela 1. Techniki pozyskiwania materiałów biologicznych wykorzystywane w diagnostyce raka płuca

Badanie cytologiczne plwociny
Bronchoskopia +/- dodatkowe techniki obrazowe (np. EBUS) i nawigacyjne + różne techniki biopsyjne
Ezofagogastroskopia +/- dodatkowe techniki obrazowe (np. EUS), + biopsja igłowa
Biopsja igłowa guza płuca przez ścianę klatki piersiowej pod kontrolą TK lub USG
Punkcja opłucnej
Biopsja opłucnej pod kontrolą TK lub USG
Wideotorakoskopia diagnostyczna
Biopsja aspiracyjna obwodowych węzłów chłonnych pod kontrolą USG
Biopsja aspiracyjna ognisk przerzutowych w narządach pod kontrolą technik obrazowych (TK, USG)

Dla zapewnienia maksymalnej sprawności diagnostyki raka płuca na poziomie krajowym i regionalnym ważne znaczenie mają zasady kwalifikacji i stosowania wymienionych w Tabeli 1. technik diagnostycznych. Ze względu na ograniczenia w dostępności należy dołożyć wszelkich starań, aby optymalnie wykorzystywać wyspecjalizowany personel medyczny i zasoby sprzętowe. Sprowadza się to m.in. do zaniechania diagnostyki inwazyjnej u chorych z podejrzeniem raka płuca będących w złym stanie ogólnym lub też z innych powodów nie kwalifikujących się do leczenia przyczynowego. Podejmowanie diagnostyki w tej grupie chorych nie znajduje merytorycznego uzasadnienia, gdyż potwierdzenie raka płuca i określenie jego charakterystyki, w tym molekularnej nie niesie za sobą dalszych konsekwencji terapeutycznych, a ogranicza dostępność do diagnostyki tym pacjentom, u których leczenie powinno zostać podjęte. Innym działaniem ukierunkowanym na zwiększenie dostępności technik diagnostycznych jest zwrócenie uwagi na zakres i jakość zabiegów podejmowanych jako pierwsza linia diagnostyki inwazyjnej, których zadaniem jest ustalenie rozpoznania histo/cytopatologicznego i staging. Nieskuteczne i nie wykorzystujące pełni możliwości diagnostycznych zabiegi skutkują koniecznością podejmowania dodatkowych procedur diagnostycznych u tych samych chorych, wydłużając okres oczekiwania na diagnostykę pozostałych pacjentów. Zdarza się również, że długi czas upływający od ustalenia stopnia zaawansowania do podjęcia leczenia stwarza konieczność powtarzania zabiegów diagnostycznych bezpośrednio przed zastosowaniem leczenia. Jest to kolejna przyczyna utrudniająca dostęp innych pacjentów do zabiegów diagnostycznych. Wreszcie, nie do przecenienia jest podejście wykorzystujące indywidualną strategię diagnostyczną dla poszczególnych pacjentów. Pozwala ono nie tylko na zwiększenie prawdopodobieństwa szybkiego ustalenia rozpoznania, ale także na zminimalizowanie liczby procedur diagnostycznych, co z jednej strony zaoszczędza pacjentom przykrych doznań, a z drugiej pozwala na przekierowanie tej interwencji na innych pacjentów oczekujących na diagnostykę. Taka strategia stanowi ważny element podejścia rekomendowanego przez *American College of Chest Physicians (ACCP)* [1]. Zgodnie z tą strategią, preferowanymi technikami diagnostycznymi u pacjentów z rakiem płuca są te ukierunkowane na najbardziej odległe ogniska przerzutowe stwierdzone w badaniach obrazowych. Dla przykładu, u chorych z podejrzeniem raka płuca i obecnością zmian przerzutowych w wątrobie, należy w pierwszym rzędzie rozważyć przezskórną igłową biopsję ognisk w wątrobie, a nie diagnostykę bronchoskopową. Uzyskanie wartościowego materiału diagnostycznego z ognisk odległych pozwala bowiem nie tylko na ustalenie rozpoznania histopatologicznego, ale także potwierdzenie histopatologiczne cechy M1b/M1c, co w znacznym stopniu warunkuje dalsze podejście diagnostyczne i terapeutyczne. Ma to szczególne znaczenie w Polsce, gdy odsetek pacjentów, u których rozpoznanie zostaje ustalone w IV stopniu zaawansowania klinicznego waha się w zależności od województwa od 45 do 62% [2, 3]. Podobne postępowanie powinno dotyczyć chorych z powiększeniem nadobojczykowych węzłów chłonnych, czy też płynem w jamie opłucnej. Potwierdzenie stopnia zaawansowania raka płuca na podstawie biopsji węzła chłonnego, badania płynu z opłucnej lub biopsji opłucnej dowodzi nie tylko typu nowotworu, ale także, odpowiednio, cechy N3 i M1a stopnia zaawansowania. Pozwala to ograniczyć konieczność wykonywania przynajmniej części innych procedur i wykorzystać sprzęt oraz wyszkolony personel do diagnostyki innych pacjentów. Uzupełnieniem powyżej przedstawionego poglądu jest konieczność wyeliminowania szablonowego podejścia diagnostycznego, wg którego bronchoskopia jest koniecznym do przeprowadzenia zabiegiem u chorych z podejrzeniem raka płuca. U dużej części chorych tak jest, ale należy też wyraźnie stwierdzić, że zgodnie z przykładami podanymi powyżej, nie wszyscy chorzy wymagają diagnostyki bronchoskopowej. Po drugie, bronchoskopia, która jeszcze przed 20-30 laty była zabiegiem stosunkowo jednolitym i wykorzystującym takie techniki diagnostyczne

jak obrazowanie w świetle białym, biopsję kleszczykową, BAL i rzadziej przezoskrzelową biopsję węzłów chłonnych śródpiersia, stała się w okresie ostatnich kilkunastu lat techniką o bardzo dużym zróżnicowaniu. Stąd bronchoskopia nie powinna być postrzegana dziś jako jednorodny zabieg, a raczej jako metoda wprowadzenia różnych narzędzi diagnostycznych do dolnych dróg oddechowych. Technologie obrazowania i instrumentacji w dolnych drogach oddechowych rozwinęły się tak bardzo, że dziś samo określenie bronchoskopia w odniesieniu do zabiegu diagnostycznego jest absolutnie niewystarczające i wymaga uzupełnienia o metody, które zostały zastosowane podczas zabiegu, np. bronchoskopia z biopsją kleszczykową i *stagingiem* węzłów chłonnych z zastosowaniem EBUS-TBNA, bronchoskopia z nawigacją za pomocą fluoroskopii i radialnej sondy EBUS oraz biopsją transbronchialną.

Ważnym i wymagającym pogłębionej dyskusji zagadnieniem wpływającym na jakość i terminowość diagnostyki inwazyjnej stanowi rodzaj zabiegów wykonywanych na pierwszym etapie postępowania. W ośrodkach o mniejszym stopniu wyspecjalizowania, spektrum stosowanych bronchoskopowych technik diagnostycznych jest stosunkowo wąskie. Prowadzi to niekiedy do podejmowania zabiegów bronchoskopowych przy minimalnym prawdopodobieństwie, iż mogą wnieść istotne informacje diagnostyczne. Należy unikać takich sytuacji, i to z co najmniej kilku powodów. Narażają one pacjenta na stres i dyskomfort, wiążą się z ryzykiem powikłań, mogą negatywnie nastawiać chorego do kolejnych zabiegów, ale także wydłużają czas do ustalenia rozpoznania, bo zwykle przed podjęciem kolejnego zabiegu oczekuje się na wyniki badań materiałów pobranych podczas poprzedniego zabiegu. Co równie ważne, te rutynowo wykonywane zabiegi angażują nie tylko lekarzy klinicystów, ale także specjalistów patomorfologów. Z uwagi na niedobory lekarzy tej specjalności skutkujące długim okresem oczekiwania na wyniki badań patomorfologicznych angażowanie ich do oceny często mało wartościowego materiału wydaje się absolutnie nieuzasadnione. Ich praca powinna zostać skoncentrowana na ocenie dobrego materiału tkankowego pobranego za pomocą odpowiednich technik diagnostycznych, co pozwoliłoby na przyspieszenie diagnostyki patomorfologicznej.

Problem opóźnień w diagnostyce raka płuca nie dotyczy tylko naszego kraju. Opóźnienia są obserwowane na różnych etapach postępowania i część z nich ma charakter obiektywny (np. brak objawów lub ich późne pojawienie się). Tym niemniej dużą część opóźnień wynika z niedostatku wyspecjalizowanych kadr medycznych i ograniczeń w dostępności do aparatury medycznej. Według analizy 128 badań przeprowadzonej przez Malalasekera et al. opóźnienia na etapie procedur diagnostycznych należą do najbardziej istotnych i dotyczą około 20-30% pacjentów [4]. Należy jednak zauważyć, że opóźnienia pojawiają się także na innych etapach, takich jak podstawowa opieka zdrowotna (od 10 do 25% chorych) i na etapie konsultacji specjalistów (od 10 do 15% chorych) [4]. W Polsce, pomimo tego iż karta DiLO narzuca konkretne wymagania, sytuacja pod tym względem wydaje się dość zróżnicowana. Trzeba pamiętać, że u dużej części chorych diagnostyka inwazyjna jest przeprowadzana poza kartą DiLO. Wg standardu *British Thoracic Society (BTS)* okres od podjęcia decyzji o konieczności wykonania bronchoskopii z powodu podejrzenia raka płuca do przeprowadzenia zabiegu nie powinien być dłuższy niż 7 dni. Wydaje się, że w Polsce dotrzymanie takiego terminu należy do sytuacji wyjątkowych.

Jeszcze jednym bardzo istotnym tematem z zakresu organizacji sieci placówek zajmujących się inwazyjną diagnostyką raka płuca jest ich wyposażenie w odpowiedniej jakości aparaturę. Istnieje pilna potrzeba zakupu i unowocześnienia bazy sprzętowej wielu

ośrodków diagnostycznych oraz wprowadzenia wewnętrznej kontroli jakości przeprowadzanych zabiegów. Zakupy nie powinny mieć charakteru doraźnego, ale zapewniać możliwość stałego odnawiania i unowocześniania bazy aparaturowej, a specjaliści powinni mieć możliwość stałego podnoszenia umiejętności, w tym dostęp do centrów symulacji medycznej dysponujących odpowiedniej klasy symulatorami bronchoskopowymi.

Praktyka kliniczna

O skuteczności pojedynczego zabiegu diagnostycznego u chorych z podejrzeniem raka płuca decyduje cały szereg czynników. Można wśród nich wyróżnić te, które zależą od zespołu diagnostycznego i jakości posiadanej aparatury oraz inne, na które personel medyczny nie ma wpływu. Powyższy podział nie ma charakteru bezwzględnego. Dla przykładu, skuteczność diagnostyczna metod inwazyjnych w odniesieniu do małych guzów, zlokalizowanych w trudno dostępnych obszarach płuc jest z natury rzeczy mniejsza niż w przypadku dużych guzów położonych w centralnych oskrzelach. Tym niemniej, zadaniem zespołu diagnostycznego jest wybór takiej metody, która zapewnia największe możliwe prawdopodobieństwo uzyskania dobrego jakościowo materiału tkankowego z guza. Czynniki zależne od zespołu diagnostycznego odgrywają kluczową rolę dla efektywności zabiegu i dotyczą wszystkich jego etapów: przygotowania, przeprowadzenia zabiegu, oraz zabezpieczenia i późniejszej oceny materiałów biologicznych.

Odpowiednie przygotowanie pacjenta i zespołu odgrywa bardzo istotną rolę, w znacznym stopniu warunkującą komfort zabiegu i jego skuteczność. W odniesieniu do pacjenta dotyczy to odpowiedniego poinformowania o zabiegu, znieczulenia miejscowego i sedacji podczas zabiegu. Chociaż sama procedura miejscowego znieczulenia górnych i dolnych dróg oddechowych jest jednym z najważniejszych czynników wywołujących dyskomfort podczas zabiegu, to jednak staranne przeprowadzenie znieczulenia warunkuje lepszą tolerancję samego zabiegu. Skuteczne znieczulenie pozwala zminimalizować kaszel podczas zabiegu, który jest drugą z kolei najważniejszą przyczyną dyskomfortu odczuwanego przez pacjentów. Brak odpowiedniej informacji o zabiegu, dyskomfort podczas bronchoskopii i powikłania po zabiegu są niezależnymi czynnikami wpływającymi na opinię pacjentów o uciążliwości zabiegu [5]. Nie należy tego lekceważyć, ponieważ doświadczenia pacjenta z pierwszego zabiegu diagnostycznego w znacznym stopniu warunkują jego akceptację (lub jej brak) dla kolejnych zabiegów, nawet jeśli są konieczne z medycznego punktu widzenia [6, 7]. Nie ma przekonujących dowodów na to, aby premedykacja w istotny sposób poprawiała tolerancję zabiegu. Z tego powodu też nie zaleca się rutynowego jej stosowania [8]. W odróżnieniu, sedacja podczas zabiegu wiąże się z większym komfortem i lepszą tolerancją. Dlatego stosowanie sedacji podczas zabiegów jest zalecane u wszystkich chorych, u których nie ma przeciwwskazań [8].

Bardzo istotną rolę w przygotowaniu do bronchoskopii odgrywają wyniki wykonanych wcześniej badań obrazowych. U wszystkich chorych z podejrzeniem raka płuca należy przed zabiegiem diagnostycznym wykonać badanie tomografii komputerowej klatki piersiowej i nadbrzusza, a wynik tego badania w postaci możliwych do analizy obrazów powinien być dostępny przed i w trakcie badania [9]. Wyniki badań obrazowych należy wykorzystać do indywidualnego planowania rodzaju zabiegu i technik pobrania

materiału, które mają być zastosowane. Duże znaczenie w tym względzie ma post-processing z wykorzystaniem różnych narzędzi i technik rekonstrukcji obrazu. Sprawne i skuteczne przeprowadzenie zabiegu jest uwarunkowane doświadczeniem operatora i personelu uczestniczącego w zabiegu, dostępnością odpowiednich urządzeń i narzędzi, a także dobrą współpracą poszczególnych członków zespołu. Większe doświadczenie i umiejętności operatora pozwalają ograniczyć dyskomfort pacjenta związany z zabiegiem [10, 11].

Każdy typ rutynowo przeprowadzanych zabiegów charakteryzuje się określonymi zaletami i ograniczeniami. Ważne jest, aby dobrze znać możliwości i ograniczenia zabiegów i wykorzystywać tę wiedzę w praktyce klinicznej. Najbardziej rozpowszechniony i dostępny typ zabiegu diagnostycznego to wideobronchofiberoskopia. W przypadku guzów położonych w centralnych drogach oddechowych i widocznych w badaniu wideobronchofiberoskopowym zabieg obejmuje zwykle biopsję kleszczykową. Oczekiwana czułość diagnostyczna takiego zabiegu nie powinna być mniejsza niż 85% [9]. Zależy to w znacznym stopniu od liczby i jakości bioptatów. Badania sprzed prawie 40 lat dowiodły, że jeśli bioptaty pobierane są za pomocą kleszczyków, to optymalna ich liczba wynosi 5 [12]. Taka samą liczbę bioptatów kleszczykowych rekomendują autorzy nowych polskich standardów organizacyjnych oraz standardów postępowania w patomorfologii [13]. Należy jednak zauważyć, że w chwili obecnej, gdy materiał bronchoskopowy służy nie tylko ocenie histopatologicznej, ale również ocenie molekularnej, podana powyżej liczba może być zbyt mała. Wynika to z faktu, iż niewielka liczba komórek może być wystarczająca dla ustalenia rozpoznania raka płuca, ale zbyt mała dla przeprowadzenia dodatkowych badań immunohistochemicznych i molekularnych. Wykazano np., że średni odsetek komórek nowotworowych w bioptatach z dużych oskrzeli pobranych za pomocą kleszczyków wynosił 33% [14]. Nowa metoda pobierania biopsji – kriobiopsja – umożliwia pobranie większych bioptatów co może przekładać się na większą skuteczność diagnostyczną [15, 16]. Ośrodki dysponujące możliwością kriobiopsji powinny więc umiejętnie z niej korzystać. Należy zwrócić uwagę, iż pomimo tego, że najważniejsze znaczenie w uzyskaniu odpowiedniego materiału tkankowego z guzów o lokalizacji centralnej ma biopsja kleszczykowa, to jednoczesne pobranie materiału za pomocą innych narzędzi, np. szczotki cytologicznej, igły pozwala zwiększyć czułość diagnostyczną o kilka-kilkanaście procent [17].

Korzystanie z różnych metod obrazowania i nawigacji znacznie zwiększa skuteczność diagnostyki i *stagingu* raka płuca. Największe znaczenie w tym względzie ma endobronchosonografia z przezoskrzelową biopsją igłową (*endobronchial ultrasound guided transbronchial needle biopsy, EBUS-TBNA*). Wykazano m. in., że jeśli podczas pierwszego zabiegu diagnostycznego stosuje się EBUS-TBNA, to czułość diagnostyczna i *stagingu* węzłów chłonnych śródpiersia osiąga prawie 84%. W przypadkach, gdy EBUS nie był stosowany wynosiła ona tylko 71,6% [18]. Oznacza to, że zastosowanie EBUS podczas pierwszego zabiegu diagnostycznego wiąże się z istotną redukcją odsetka chorych, którzy wymagają kolejnych zabiegów diagnostycznych. Pozwala to z jednej strony na skrócenie okresu do podjęcia leczenia, a z drugiej na zmniejszenie obciążenia ośrodka bronchoskopowego powtórными zabiegami i zwiększenie dostępności dla nowych chorych. Wg standardów BTS, czułość diagnostyczna EBUS u chorych na raka powinna wynosić nie mniej niż 88% [9]. Jest to odsetek bardzo wysoki i wskazuje na konieczność dobrego przygotowania zespołu oraz wysokiego poziomu umiejętności. Przeprowadzona biopsja węzłów chłonnych śródpiersia z wykorzystaniem endosonografii pozwala zwiększyć czułość diagnostyczną zabiegów przezoskrzelowych o około 12% [19]. Zabieg nie wymaga dodatkowego endoskopu i może być przeprowadzony przy zastosowaniu

wideobronchoskopu ultrasonograficznego. W ostatnich latach można zauważyć wyraźną zmianę sposobu opracowania materiału z biopsji transbronchialnej. Patomorfologdy preferują jego przygotowanie w postaci cytobloków, a nie rozmazów cytologicznych. Liczba przygotowywanych rozmazów ogranicza się do 1-2, a niektóre ośrodki nawet zupełnie rezygnują z ich oceny. Wynika to m.in. z tego, że niemal wszystkie aspiraty cytologiczne pozyskane za pomocą EBUS-TBNA stanowią wartościowy materiał do badań molekularnych i immunohistochemicznych [20,21] a materiał zabezpieczony w postaci cytobloków może być wykorzystany w optymalny sposób. Dla pozyskania odpowiedniej ilości materiału zaleca się co najmniej 3-krotne pobranie materiału z poszczególnych stacji węzłowych [13].

Wobec dominującego typu raka płuca, którym jest obecnie gruczolakorak oraz stosowania skriningu raka płuca pozwalającego wykryć stosunkowo niewielkie guzy obwodowe szczególnego znaczenia nabierają te metody diagnostyczne, które mogą być zastosowane do diagnostyki guzów obwodowych. Należą do nich wideobronchoskopia z zastosowaniem technik nawigacyjnych oraz biopsja igłowa przez ścianę klatki piersiowej (TTNA). Obie te metody mają swoje zalety i ograniczenia. Ogólnie można stwierdzić, że metody bronchoskopowe cechują się mniejszą liczbą powikłań w postaci odmy, ale także nieco mniejszą skutecznością diagnostyczną. TTNA jest wysoce skuteczna, jednak wiąże się z większym odsetkiem powikłań w postaci odmy. Należy jednak zauważyć, że doskonalenie technik biopsji przezskórnej z zastosowaniem dodatkowych zabiegów (np. wypełnienie kanału biopsyjnego krwią chorego) pozwala dalej ograniczyć odsetek odm zwiększając bezpieczeństwo metody. Techniki nawigacji bronchoskopowej są albo technikami w czasie rzeczywistym, albo opierają się na wyznaczeniu oskrzelowego dostępu do guza na podstawie analizy wcześniej wykonanych badań TK. Do tych pierwszych należą fluoroskopia, sonda radialna EBUS i nawigacja elektromagnetyczna (EMN). Metoda opierająca się na analizie wcześniej wykonanej TK ma swoje ograniczenia, ale ma także zalety, zwłaszcza gdy jest stosowana w połączeniu z dodatkowymi technikami nawigacyjnymi w czasie rzeczywistym, np. fluoroskopią i sondą radialną EBUS [22]. Urządzenia do nawigacji wewnątrzoskrzelowej są stosunkowo drogie, zarówno jeśli chodzi o zakup urządzenia jak i ich późniejszą eksploatację. Ich dostępność w Polsce jest jeszcze ograniczona i doświadczenie w ich stosowaniu ma tylko kilka ośrodków.

Za istotny problem diagnostyki inwazyjnej raka płuca w Polsce należy uznać znaczne rozproszenie ośrodków i zróżnicowany poziom wyposażenia oraz kompetencji zespołów wykonujących procedury diagnostyczne. Ten etap diagnostyki jest w przeważającej części realizowany przez ośrodki pulmonologiczne i torakochirurgiczne przy znacznie mniejszym zaangażowaniu ośrodków onkologicznych. Wydaje się to zasadne, bo rak płuca wymaga różnicowania z wieloma innymi chorobami płuc. U części chorych wstępna diagnostyka jest także przeprowadzana w oddziałach chorób wewnętrznych dysponujących pracownikami bronchoskopowymi. Wydaje się, że poprawa jakości zabiegów bronchoskopowych powinna w szczególności dotyczyć tych ośrodków lub ich zadania powinny być przejęte przez większe, wyspecjalizowane ośrodki dysponujące lepszym wyposażeniem i kadrą medyczną. Pomimo możliwości przeprowadzania części diagnostycznych procedur bronchoskopowych w trybie ambulatoryjnym, w skali kraju odgrywają one ograniczoną rolę [3]. Jest to spowodowane różnymi czynnikami, m.in. nieadekwatnym finansowaniem świadczeń ambulatoryjnych, brakiem odrębnego finansowania dla procedur patomorfologicznych i niedostatkiem aparatury i sprzętu medycznego [3].

Przedstawione problemy inwazyjnej diagnostyki raka płuca wskazują na działania, które powinny zostać podjęte dla poprawy sytuacji. Należą do nich opracowanie i wdrożenie standardów postępowania w zakresie różnych zabiegów diagnostycznych w raku płuca, stworzenie finansowych zachęt do realizowania szybkiej i skutecznej diagnostyki, poprawa w zakresie koordynacji działań i współpracy między ośrodkami, a także opracowanie standardów jakościowych i mechanizmów monitorowania jakości.

Bibliografia

1. Ost DE, Jim Yeung SC, Tanoue LT, Gould MK. Clinical and organizational factors in the initial evaluation of patients with lung cancer: Diagnosis and management of lung cancer, 3rd ed: American College of Chest Physicians evidence-based clinical practice guidelines. *Chest* 2013; 143(5 Suppl): e121S-e141S
 2. Dylewska M, Mikułowska M, Nowak S, Falkiewicz B. Rak płuca w Polsce – perspektywa społeczna i medyczna ` 2016; www.pexps.pl/files/upload/files/Rak-pluca-w-Polsce.pdf.
 3. Chorostowska-Wynimko J, Krenke R, Antczak A, et al. Diagnostyka raka płuca: stan obecny i obszary poprawy. *Pneumonol Alergol Pol*; 2020; 1: 68-84
 4. Malalasekera A, Nahm S, Blinman PL, Kao SC, Dhillon HM, Vardy JL. How long is too long? A scoping review of health system delays in lung cancer. *Eur Respir Rev* 2018; 27(149): 180045
 5. Karewicz A, Faber K, Karon K, Januszewska K, Ryl J, Korczyński P, Gorska K, Dąbrowska M, Krenke R. Evaluation of patients' satisfaction with bronchoscopy procedure. *PLoS One*. 2022; 17(10): e0274377.
 6. Sun BC, Adams J, Orav EJ, Rucker DW, Brennan TA, Burstin HR. Determinants of patient satisfaction and willingness to return with emergency care. *Ann Emerg Med*. 2000; 35(5): 426-434.
 7. Mitsumune T, Senoh E, Adachi M. Prediction of patient discomfort during fibre-optic bronchoscopy. *Respirology*. 2005; 10(1): 92-6.
 8. Du Rand IA, Blaikley J, Booton R, Chaudhuri N, Gupta V, Khalid S, Mandal S, Martin J, Mills J, Navani N, Rahman NM, Wrightson JM, Munavwar M; British Thoracic Society Bronchoscopy Guideline Group. British Thoracic Society guideline for diagnostic flexible bronchoscopy in adults: accredited by NICE. *Thorax* 2013; 68 Suppl 1: i1-i44
 9. BTS quality standards for diagnostic flexible bronchoscopy in adults. *British Thoracic Society Reports*; 2014; 6 (5) www.brit-thoracic.org.uk/quality-improvement/quality-standards/flexible-bronchoscopy/
 10. Lechtzin N, Rubin HR, White P, Jenckes M, Diette GB. Patient satisfaction with bronchoscopy *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 166: 1326-1331.
-

-
11. Mitsumune T, Senoh E, Adachi M. Prediction of patient discomfort during fibre-optic bronchoscopy. *Respirology* 2005; 10(1): 92-96.
 12. Gellert AR, Rudd RM, Sinha G, Geddes DM. Fiberoptic bronchoscopy: effect of multiple biopsies on diagnostic yield in bronchial carcinoma. *Thorax* 1982; 37: 684-710.
 13. Standardy organizacyjne oraz standardy postępowania w patomorfologii. Wytyczne dla zakładów/pracowni patomorfologii https://pol-pat.pl/pliki/files/wytyczne_i_standardy/standardy/04_standardy_tresc_ksiazki.pdf
 14. Coghlin CL, Smith LJ, Bakar S, Stewart KN, Devereux GS, Nicolson MC, et al. Quantitative analysis of tumor in bronchial biopsy specimens. *J Thorac Oncol* 2010; 5: 448-452.
 15. Hetzel J, Eberhardt R, Herth FJ, Petermann C, Reichle G, Freitag L, et al. Cryobiopsy increases the diagnostic yield of endobronchial biopsy: a multicentre trial. *Eur Respir J* 2012; 39: 685-690.
 16. Schumann C, Hetzel J, Babiak AJ, Merk T, Wibmer T, Möller P, et al. Cryoprobe biopsy increases the diagnostic yield in endobronchial tumor lesions. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2010; 140: 417-421.
 17. Rivera MP, Mehta AC. Initial diagnosis of lung cancer: ACCP evidence-based clinical practice guidelines (2nd edition). *Chest* 2007; 132(3 Suppl): 131S-48S
 18. Leiro-Fernández V, Mouronte-Roibás C, García-Rodríguez E, Botana-Rial M, Ramos-Hernández C, Torres-Durán M, Ruano-Raviña A, Fernández-Villar A; Lung Cancer Group at the Álvaro Cunqueiro Hospital in Vigo. Predicting delays in lung cancer diagnosis and staging. *Thorac Cancer* 2019; 10(2): 296-303.
 19. Korevaar DA, Crombag LM, Cohen JF, Spijker R, Bossuyt PM, Annema JT. Added value of combined endobronchial and oesophageal endosonography for mediastinal nodal staging in lung cancer: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Respir Med* 2016; 4(12): 960-968.
 20. Korevaar DA, Crombag LM, Cohen JF, Spijker R, Bossuyt PM, Annema JT. Added value of combined endobronchial and oesophageal endosonography for mediastinal nodal staging in lung cancer: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Respir Med*. 2016; 4(12): 960-968.
 21. Muriana P, Rossetti F. The role of EBUS-TBNA in lung cancer restaging and mutation analysis. *Mediastinum* 2020; 4: 23
 22. Giri M, Dai H, Puri A, Liao J, Guo S. Advancements in navigational bronchoscopy for peripheral pulmonary lesions: A review with special focus on virtual bronchoscopic navigation. *Front Med (Lausanne)*. 2022; 9:989184.
-

4.

Nowoczesne leczenia okołooperacyjne raka płuca

dr hab. n. med. Maciej Głogowski

Leczenie chirurgiczne pacjentów z rozpoznaniem niedrobnokomórkowego raka płuca (NDRP) jest leczeniem z wyboru we wczesnych stopniach zaawansowania klinicznego, choć ryzyko nawrotu nowotworu na poziomie 40-60% w stopniach zaawansowania IIA-IIIa (wg 8 edycji klasyfikacji TNM) po leczeniu chirurgicznym należy uznać za bardzo wysokie. Uzupełniająca konwencjonalna chemioterapia może poprawić odsetki 5-letnich przeżyć po radykalnym leczeniu chirurgicznym NDRP o około 5% u pacjentów w stopniach zaawansowania IIA-IIIa.

Czas rozpoczęcia leczenia uzupełniającego chemioterapią w ramach kontrolowanych badań klinicznych określany był na 6-8 tydzień od operacji, choć zarówno w badaniach populacyjnych jak i analizach retrospektywnych oceniających wpływ odroczenia chemioterapii nawet do 16 tygodni od operacji, pokazuje brak zależności pomiędzy czasem podania leczenia uzupełniającego, a odsetkami przeżyć 5-letnich.

Odkrycia ostatniej dekady w zakresie biomarkerów predykcyjnych otwierają nowe możliwości w leczeniu NDRP. Niewątpliwym sukcesem związany z zastosowaniem inhibitorów punktów kontrolnych układu immunologicznego oraz terapii ukierunkowanych molekularnie w leczeniu miejscowo zaawansowanego i przerzutowego NDRP wymusił próbę zastosowania tych terapii przed lub po zabiegu chirurgicznym u pacjentów z rozpoznaniem NDRP w niższych stopniach zaawansowania w celu poprawy odsetków 5-letnich przeżyć w porównaniu z zastosowaniem chemioterapii w tej grupie chorych. Wynikiem tego są randomizowane badania kliniczne (wyniki części z nich opublikowane) o różnej wielkości i konstrukcji.

Immunoterapia we wczesnym raku płuca w skojarzeniu z leczeniem chirurgicznym

Znaczący wpływ na całkowity czas przeżycia pacjentów z rozsiałym NDRP związany z zastosowaniem leków immunologicznych punktów kontroli zarówno samodzielnie jak i w skojarzeniu z chemioterapią oraz wyniki zastosowania inhibitora PD-L1 po leczeniu pacjentów w III stopniu zaawansowania po zakończonej jednoczasowej chemioradioterapii NDRP stały się podstawą do wprowadzenia badań nad zastosowaniem immunoterapii po radykalnym leczeniu chirurgicznym. Badanie IMpower010 jest pierwszym opublikowanym badaniem III fazy z losowym doбором chorych, które wykazało znaczącą poprawę przeżycia wolnego od choroby (*disease free survival* - DFS) po zastosowaniu immunoterapii po uzupełniającej chemioterapii u chorych po radykalnym chirurgicznym leczeniu NDRP. Chorzy w stopniu zaawansowania II-IIIa (wg 7 edycji klasyfikacji TNM) po zastosowaniu uzupełniającej chemioterapii opartej na pochodnych platyny, a następnie otrzymujący 16 cykli atezolizumabu, mieli o 34% niższe ryzyko nawrotu choroby w porównaniu z pacjentami, u których zastosowano BSC (*best supportive care*) po chemioterapii w populacji chorych ze stwierdzoną ekspresją PD-L1 co najmniej 1%. W całej badanej populacji w stopniu zaawansowania II-IIIa odnotowano również redukcję ryzyka nawrotu choroby na poziomie 21% na korzyść pacjentów otrzymujących atezolizumab. W populacji pacjentów ITT (*intent-to-treat*) — stopień zaawansowania IB-IIIa — redukcja ryzyka nawrotu wynosiła 19%. Na podstawie wyników DFS oraz na podstawie pozytywnych wyników publikowanej w 2023 okresowej częściowej analizy przeżyć całkowitych (*overall survival* - OS), atezolizumab jest dostępny w Polsce w leczeniu uzupełniającym w ramach programu lekowego u chorych w stopniach zaawansowania II-IIIa i IIIB (tylko pT3N2M0) wg 8 edycji klasyfikacji TNM po wcześniejszej

radykalnej resekcji NDRP oraz uzupełniającej chemioterapii opartej na pochodnych platyny. Dodatkowym wymogiem jest odsetek komórek nowotworowych z ekspresją PD-L1 \geq 50% w materiale pooperacyjnym potwierdzony na podstawie zwalidowanego testu wykonywanego w laboratorium posiadającym aktualny certyfikat programu kontroli jakości dla danego testu.

Ponadto oczekiwane są wyniki kolejnych 3 badań III fazy z losowym doбором chorych z zastosowaniem immunoterapii po radykalnym leczeniu chirurgicznym NDRP w stopniach zaawansowania IB-IIIa (wg 7 edycji klasyfikacji TNM). We wszystkich trzech badaniach pacjenci są randomizowani po zakończeniu chemioterapii uzupełniającej, choć jej zastosowanie nie jest (w odróżnieniu do badania IMpower010) obligatoryjne. W dwóch: z zastosowaniem pembrolizumabu (badanie PEARLS/KEYNOTE-091) oraz z zastosowaniem durvalumabu (badanie BR31), w ramieniu kontrolnym pacjenci otrzymują placebo, a w badaniu z zastosowaniem nivolumabu (badanie ANVIL); chorzy w ramieniu kontrolnym poddawani są obserwacji. We wszystkich badaniach punktem końcowym jest czas wolny od choroby (*DFS - disease free survival*). Po uzyskaniu pełnych wyników wszystkich powyższych badań z zastosowaniem immunoterapii w leczeniu uzupełniającym po radykalnej resekcji NDRP, wydaje się, że jednak nadal pozostanie otwartym problemem potrzeba ustalenia optymalnego czasu rozpoczęcia immunoterapii po leczeniu operacyjnym i uzupełniającej chemioterapii oraz czasu trwania leczenia. Dodatkowym wyzwaniem będzie określenie prognostycznych i/lub predykcyjnych biomarkerów w celu personalizacji leczenia z zastosowaniem leków immunokompetentnych u pacjentów po radykalnym leczeniu NDRP.

Zastosowanie leków immunologicznych punktów kontroli jest również przedmiotem badań w zakresie leczenia neoadjuwantowego (przedoperacyjnego) u pacjentów rozpoznaniem NDRP, u których możliwa jest radykalna resekcja nowotworu. Teoretyczne zalety wynikające z zastosowania leczenia neoadjuwantowego przed zabiegiem operacyjnym w NDRP obejmują m.in.: zmniejszenie się guza i przerzutowych węzłów chłonnych śródpiersia (downstaging), zwiększenie prawdopodobieństwa radykalnej resekcji, wczesne działanie na populację mikroprzerzutów i komórek nowotworowych krążących, a także ocenę odpowiedzi komórkowej na zastosowane leczenie mogące stanowić czynnik predykcyjny całkowitego przeżycia. Wyniki historycznych badań nad chemioterapią neoadjuwantową były niewystarczające z uwagi na ich wcześniejsze zamknięcie w związku z coraz szybciej przybywającymi pozytywnymi wynikami badań z chemioterapią adjuwantową. Niemniej jednak wyniki metaanalizy 15 badań randomizowanych z zastosowaniem chemioterapii neoadjuwantowej wykazały 5% zysk w odsetkach 5-letnich przeżyć u chorych poddanych chemioterapii przedoperacyjnej w stopniach zaawansowania IB-IIIa wobec grupy kontrolnej poddanej leczeniu operacyjnemu, czyli porównywalny z zastosowaniem chemioterapii pooperacyjnej. Dodatkowo w systematycznej analizie retrospektywnej włączającej 10 000 pacjentów nie stwierdzono różnic znamiennej statystycznych w przeżyciach pomiędzy pacjentami poddanymi chemioterapii przedoperacyjnej i pooperacyjnej. Trzeba jednak dodać, że w badaniu NATCH, jedynym jak dotychczas, randomizowanym prospektywnym badaniu bezpośrednio porównującym chemioterapię przedoperacyjną z pooperacyjną nie odnotowano różnic w odsetkach przeżyć zarówno między oboma grupami, ale również pomiędzy nimi a trzecią grupą poddaną tylko leczeniu chirurgicznemu, choć ponad 75% pacjentów włączonych do badania było w I stopniu zaawansowania, co mogło według samych autorów mieć wpływ na wyniki końcowe. Jednocześnie zaobserwowano blisko 30% różnicę na korzyść chemioterapii przedoperacyjnej wobec pooperacyjnej w liczbie pacjentów otrzymujących wszystkie dawki zaplanowanej chemioterapii. Taka

obserwacja wspiera sugestię wielu badaczy twierdzących, że pacjenci mogą lepiej tolerować leczenie przedoperacyjne niż pooperacyjne jednak obecny stan wiedzy implikuje fakt, że chemioterapia przedoperacyjna nie jest standardem, a w praktyce klinicznej poza badaniami randomizowanymi ograniczona jest jedynie do chorych granicznie resekcyjnych, w wyższych stopniach zaawansowania (z kliniczną cechą N2). Zastosowanie immunoterapii przedoperacyjnej u pacjentów kwalifikowanych do radykalnej resekcji NDRP może teoretycznie zmienić obecne standardy leczenia, choć zaprojektowanie badań bezpośrednio porównujących immunoterapię adjuwantową z neoadjuwantową, wydaje się trudne do zaprojektowania. Poza przedstawionymi powyżej teoretycznymi czynnikami podobnymi jak dla chemioterapii neoajuwantowej przemawiającymi na korzyść leczenia przedoperacyjnego dochodzi jeszcze fakt, że z uwagi na dość dużą ilość endogennego antygeny nowotworowego, przy wyższej prezentacji dla limfocytów T specyficznych dla nowotworu, dochodzi do trwania specyficznej odpowiedzi immunologicznej również po resekcji guza. Dodatkowym czynnikiem przemawiającym za immunoterapią przedoperacyjną jest możliwość oceny odpowiedzi na leczenie w wyciętym materiale, co może być dodatkowym czynnikiem prognostycznym dla przeżycia i pomóc w dalszych strategiach leczenia. W badaniu Forde i wsp. u 21 pacjentów w stopniu zaawansowania I-IIIa zastosowano przedoperacyjnie nivolumab w dwóch cyklach z następową operacją. Leczenie było dobrze tolerowane, odnotowano jedynie 23% odsetek zdarzeń niepożądanych (większość w stopniu 1 i 2, tylko jeden w stopniu 3), które pozostały bez wpływu na czas zaplanowanego leczenia chirurgicznego. Resekcję radykalną wykonano u 20 chorych odnotowując 45% odsetek MPR (*major pathological response*) i 15% odsetek pCR (*pathological completely response*) oraz 40% odsetek downstagingu w badaniu histopatologicznym pooperacyjnym. Także w innych badaniach II fazy z innymi inhibitorami punktów kontrolnych prezentowanymi w streszczeniach konferencyjnych zarówno w monoterapii jak i w skojarzeniu z chemioterapią stwierdzono dobrą tolerancję leczenia przy bardzo dobrym odsetku odpowiedzi patologicznej. Według niektórych badaczy efekt radiologiczny zmniejszenia się masy nowotworu (guza i węzłów chłonnych) może być łatwiejszy do osiągnięcia przy zastosowaniu immunoterapii wobec chemioterapii przy mniejszym ryzyku toksyczności leczenia przedoperacyjnego oraz mniejszym ryzyku powikłań chirurgicznych związanych z operacją i większym prawdopodobieństwem wykonania radykalnej resekcji. Potwierdzają to, wraz z efektem zmniejszenia odsetka EFS (*event free survival*) w grupach chorych, u których zastosowano immunochemioterapię wobec chemioterapii przedoperacyjnej, wyniki zaplanowanych analiz pośrednich trzech badań III fazy z losowym doborem chorych – CheckMate 816, AEGEAN oraz KEYNOTE-671. W pierwszym w połączeniu z chemioterapią opartą na pochodnych platyny zastosowano nivolumab, w drugim durvalumab, a w trzecim pembrolizumab. W badaniu AEGEAN pacjenci otrzymujący przedoperacyjnie durvalumab otrzymywali go również pooperacyjnie przez 48 tygodni (12 cykli co 4 tygodnie), a w badaniu KEYNOTE, pembrolizumab przez 39 tygodni (13 cykli co 3 tygodnie). Ponadto w badaniach tych stwierdzono znacząco wyższe odsetki pCR w materiale pooperacyjnym przy zastosowaniu immunochemioterapii przedoperacyjnej w porównaniu z chemioterapią.

Część z badań II fazy z zastosowaniem immunoterapii w monoterapii jak i chemioimmunoterapii jest nadal prowadzonych, podobnie jak badania III fazy porównujące leczenie przedoperacyjnie chemioterapią z chemioimmunoterapią (w których punktami końcowymi są EFS lub/ó OS), część z nich z zastosowaniem leczenia immunoterapią jako terapii typu maintenance po leczeniu chirurgicznym. Podkreślenia wymaga fakt, że wszystkie prowadzone badania dotyczą, bez względu na stopień zaawansowania, resekcyjnego raka płuca, czyli są to pacjenci, u których przewidywany zakres resekcji

zakłada leczenie radykalne również bez zastosowania leczenia przedoperacyjnego. Ważną kwestią, po potencjalnym zakończeniu sukcesem prowadzonych badań III fazy pozostanie zastosowanie odpowiedniej techniki obrazowania zastosowanej do oceny odpowiedzi na leczenie, lepiej korelujące z uzyskaną patologiczną odpowiedzią niż klasyczne kryteria RECIST 1.1 dla tomografii komputerowej. Także określenie optymalnego czasu na leczenie operacyjne po zakończeniu przedoperacyjnej immunoterapii lub chemioimmunoterapii w związku z potencjalną toksycznością oraz maksymalny czas jaki może upłynąć od zastosowanego leczenia chirurgicznego w związku z planowaną immunoterapią pooperacyjną w przypadku terapii maintenance będzie ona kolejnym elementem wymagającym standaryzacji postępowania. Prawdopodobnie ważnym z punktu widzenia odpowiedzi na leczenie i toksyczności leczenia będzie identyfikacja i ocena czynników predykcyjnych i prognostycznych pozwalających na wybór odpowiedniej dla określonego pacjenta (personalizacja leczenia) metody leczenia neoadjuwantowego (chemioterapia wobec immunoterapii wobec immunoterapia).

Do potencjalnych zagrożeń związanych z zastosowaniem przedoperacyjnym immunoterapii należą podobnie jak przy neoadjuwantowej chemioterapii ryzyko progresji choroby oraz specyficznie dla immunoterapii wystąpienie zdarzeń niepożądanych pochodzenia immunologicznego (*irAEs* – *immune-related adverse events*) prowadzące do opóźnienia lub zaniechania leczenia operacyjnego. Immunoterapia przedoperacyjna może również prowadzić do wystąpienia ciężkich *irAEs* po wykonaniu resekcji, które należy różnicować z typowymi powikłaniami pooperacyjnymi.

W Polsce w chwili obecnej nie ma możliwości zastosowania przedoperacyjnej immunoterapii lub chemioimmunoterapii poza prowadzonymi badaniami klinicznymi, a wg zaleceń NCCN (*National Comprehensive Cancer Network*) może być ona rozważana przy zastosowaniu niwolumabu lub pembrolizumabu w połączeniu z chemioterapią dwulekową opartą na pochodnych platyny u chorych z resekcyjnym NDRP w stopniu zaawansowania IIA-IIIB (tylko T3N2M0) wg 8 edycji klasyfikacji TNM.

Leczenie ukierunkowane molekularnie w skojarzeniu z leczeniem chirurgicznym

Wprowadzenie terapii ukierunkowanych molekularnie do standardu leczenia chorych z rozpoznaniem NDRP, którzy są poza możliwościami leczenia radykalnego znacznie poprawiło czas przeżycia pacjentów z określonymi zaburzeniami molekularnymi. Fakt ten wraz z ograniczonymi możliwościami poprawy odsetków przeżyć wynikających z zastosowania okołooperacyjnej chemioterapii były przyczyną podjęcia badań z zastosowaniem terapii ukierunkowanych molekularnie w okresie okołooperacyjnym u pacjentów w niższych stopniach zaawansowania poddawanych radykalnemu leczeniu operacyjnemu. Po niejednoznacznych wynikach z zastosowaniem gefinitibu w zakresie różnic w DFS i OS w badaniach ADJUVANT i IMPACT niewątpliwym przełomem stały się wyniki badania ADAURA. W badaniu tym wykazano istotną poprawę zarówno w zakresie DFS jak i OS w grupie pacjentów po radykalnej resekcji NDRP w stopniach zaawansowania IB-IIIA z mutacją w genie EGFR otrzymujących pooperacyjnie osimertinib maksymalnie przez 3 lata lub do momentu nawrotu nowotworu. Osimertinib stał się pierwszym zarejestrowanym lekiem w ramach terapii ukierunkowanych molekularnie w leczeniu uzupełniającym pacjentów po radykalnej resekcji NDRP z obecnością mutacji aktywującej w genie EGFR z delecją w eksonie 19 lub substytucją w eksonie 21. Również w Polsce jest on dostępny w ramach programu lekowego dla pacjentów po ra-

dykalnej resekcji NDRP w stopniach zaawansowania IB-III wg 8 edycji klasyfikacji TNM z obecnością w/w zaburzeń w genie EGFR potwierdzoną zwalidowanym testem wykonywanym w laboratorium posiadającym aktualny certyfikat programu kontroli jakości dla danego testu. Lek może być stosowany niezależnie od zastosowania chemioterapii uzupełniającej.

W trakcie Kongresu ESMO 2023 przedstawiono wyniki pierwotnie planowanej tymczasowej analizy badania ALINA, w której stwierdzono istotną poprawę w zakresie DFS w grupie pacjentów po radykalnym leczeniu operacyjnym w stopniach zaawansowania IB-IIIa ze stwierdzoną rearanżacją w genie ALK otrzymujących pooperacyjnie alektinib w porównaniu z grupą kontrolną otrzymującą chemioterapię opartą na pochodnych platyny. Po akceptacji FDA (spodziewana w połowie 2024 roku) alektinib może stać się kolejną opcją leczenia uzupełniającego ukierunkowanego molekularnie (w tym przypadku chorych ALK+) we wczesnym NDRP po radykalnym leczeniu chirurgicznym.

Obecnie trwają również inne badania w zakresie zastosowania leczenia ukierunkowanego molekularnie w tych i innych znanych zaburzeniach molekularnych. Podobnie w trakcie rekrutacji są również badania z zastosowaniem przedoperacyjnym (neoadjuwantowym) leków ukierunkowanych molekularnie we wczesnym resekcyjnym NDRP, choć na ich wyniki będziemy musieli poczekać prawdopodobnie jeszcze kilka lat.

Podsumowując, w chwili obecnej otwarte są nowe możliwości leczenia uzupełniającego po radykalnym operacyjnym leczeniu NDRP, które istotnie mogą wpłynąć na poprawę wyników leczenia chirurgicznego. Należy je zgodnie z aktualizacjami obecnych standardów postępowania zawsze rozważać jako opcje terapeutyczne w określonych populacjach pacjentów po zakończonym radykalnym leczeniu operacyjnym. Stwarza to również konieczność rozszerzenia diagnostyki patomorfologicznej pooperacyjnej o badania określonych biomarkerów predykcyjnych, co stanowi dodatkowy element decydujący o optymalnym leczeniu. W zakresie leczenia neoadjuwantowego, do czasu uzyskania pozytywnych wyników trwających badań, chemioterapia pozostaje obecnie jedyną opcją leczenia przedoperacyjnego poza badaniami klinicznymi. Dodatkowo, kolejnymi wyzwaniami wydają się być: określenie optymalnego czasu trwania leczenia przed- i pooperacyjnego, określenie optymalnych biomarkerów predykcyjnych i prognostycznych, porównanie w zależności od stopnia zaawansowania leczenia przedoperacyjnego z pooperacyjnym, a w rezultacie porównanie zastosowania chirurgii wobec radykalnej radioterapii u pacjentów, u których istnieje możliwość resekcji radykalnej w skojarzeniu z immunoterapią lub chemoimmunoterapią.

5.

Zastosowanie bronchonawigacji jako skutecznego narzędzia we wczesnym diagnozowaniu raka płuca

dr n. med. Michał Poznański

prof. dr hab. n. med. Adam Antczak

Stale zwiększająca się liczba wykrywanych guzków płuc, zarówno dzięki dostępności badań przesiewowych w kierunku raka płuca oraz wykrytych przypadkowo w przebiegu innych badań radiologicznych (np. angio-CT naczyń wieńcowych) wymusiła poszukiwanie nowych narzędzi diagnostycznych, które pozwalają różnicować ich charakter. W populacji ogólnej zmiany o typie pojedynczego guzka płuca (SPN) są stwierdzane w przypadku 0,2% radiogramów i 13% tomografii klatki piersiowej. W populacji poddawanej screeningowi w kierunku raka płuca odsetek pozytywnych wyników niskodawkowej tomografii komputerowej klatki piersiowej (LDCT) sięga do 33% [1]. Jeżeli istnieją jednocześnie inne czynniki ryzyka niż nikotynizm, to odsetek badań, na podstawie których rozpoznaje się obecność SPN przekracza 50%. Znaczącym utrudnieniem w czasie przeprowadzania diagnostyki różnicowej jest fakt, że ponad 60% zmian o typie SPN lokalizuje się obwodowo, co wyraźnie ogranicza wykorzystanie technik wideobronchoskopowych, a ich skuteczność diagnostyczna nie przekracza 14% [1].

Najczęściej wykorzystywaną małoinwazyjną techniką w diagnostyce różnicowej zmian obwodowych płuca jest biopsja przezklatkowa pod kontrolą tomografii komputerowej (CT-TTNA; *Computed Tomography Guided Transthoracic Needle Aspiration*). Skuteczność diagnostyczna tej metody sięga nawet 92%. Podobną skutecznością charakteryzuje się badanie TTNA pod kontrolą USG – w przypadku zmian zlokalizowanych bezpośrednio pod opłucną. Pomimo tak imponujących wyników TTNA charakteryzuje się wysokim odsetkiem powikłań, z których najczęstszym jest odma opłucnowa (do 40% zabiegów). Ponadto zastosowanie TTNA jest ograniczone w przypadku zmian zlokalizowanych tuż nad przeponą (zmieniające się położenie celu wraz z przemieszczaniem się przepony w trakcie oddychania), w pobliżu struktur naczyniowych wnek lub zmian położonych za łopatką. Do czynników istotnie limitujących zastosowanie TTNA zaliczamy również przewlekłą obturacyjną chorobę płuc z nasiloną rozedmą oraz występowanie licznych lub obustronnych guzków płuc (zwiększające się ryzyko odmy wraz z każdym nakłuciem) [2].

Powyższe wprowadzenie stanowi dowód przemawiający za koniecznością poszukiwania nowych narzędzi, które pozwalają na równie efektywną, ale jednocześnie bardziej bezpieczną formę diagnostyki guzków płuc. Postęp w dziedzinie cyfrowej pozwala na dynamiczny rozwój medycyny. W ten sposób technologia, która pierwotnie miała za zadanie śledzenie rąk osób grających w gry komputerowe, stała się załącznikiem dla elektromagnetycznej nawigacji bronchoskopowej (ENB; *Electromagnetic Navigation Bronchoscopy*). Pierwsze badanie kliniczne na temat skuteczności ENB na człowieku zostało opublikowane w 2006 r. Procedurze zostało poddanych 13 pacjentów, a skuteczność diagnostyczna wyniosła 69% [3]. Wytyczne American College of Chest Physicians już w 2013 r. wskazywały na konieczność wykorzystywania możliwie najmniej inwazyjnej metody oceny podejrzanych guzków płuc – w przypadku zmian obwodowych zalecaną techniką jest ENB [4]. Dotyczy to przede wszystkim zmian o średnicy > 8 mm. Mniejsze zmiany zgodnie z różnymi algorytmami diagnostycznymi na początku mogą być poddawane wnikliwej obserwacji albo w ogóle jej nie wymagać.

Na przestrzeni 18 lat na rynek wprowadzono różne platformy do bronchonawigacji. Warto w tym miejscu wspomnieć o systemach do wirtualnej bronchonawigacji (VNB; *Virtual Navigation Bronchoscopy*), które wykorzystują ultracienkie bronchoskopy (średnica zewnętrzna < 3 mm) jako narzędzia służące dotarciu do zmiany. Dostępne są badania porównujące wydajność diagnostyczną obydwu platform. Wynika z nich, że niezależnie od tego, czy zmiana jest drenowana przez oskrzele czy nie, wyższą skutecznością diagnostyczną charakteryzują się systemy typu ENB w porównaniu do VNB

(odpowiednio 81,0% wobec 60,0% i 40,5% wobec 13,3%) [5]. Naszą dyskusję ograniczymy do systemu, który jest najlepiej opisaną przez niezależnych badaczy platformą do bronchonawigacji, jednocześnie platformą, w którą wyposażona jest nasza pracownia endoskopii układu oddechowego. Mowa tu o systemie do niedawna znanym pod nazwą SuperDimension, a od najnowszej generacji pod nazwą Illumisite (Medtronic, Minneapolis, MN, USA). Wraz ze zmianą nazwy dodano m.in. funkcję korekty zjawiska rozbieżności lokalizacji zmiany na tomografii i na żywym pacjencie (*CT-to-body divergence*) dzięki zastosowaniu tomosyntezy obrazów uzyskiwanych podczas fluoroskopii.

Podstawowym warunkiem umożliwiającym przeprowadzenie procedury ENB jest posiadanie plików DICOM z zapisem spiralnej tomografii komputerowej klatki piersiowej w fazie bez kontrastu, która spełnia odpowiednie standardy jakości: badanie powinno być pozbawione artefaktów oddechowych – optymalnie wykonane na tomografie co najmniej 64 rzędowym, co pozwala na skrócenie do minimum czasu akwizycji obrazów a grubość warstwy nie powinna przekraczać 1,25 mm, same warstwy powinny nakładać się o 20%. Umożliwi to stworzenie wirtualnego drzewa oskrzelowego, którego model będzie wykorzystany niczym mapa drogowa pozwalająca zaplanować ścieżkę dotarcia do miejsca docelowego. Jest to szczególnie ważne po wklinowaniu bronchoskopu i utracie możliwości kontynuacji eksploracji drzewa oskrzelowego pod kontrolą wzroku – wówczas oprogramowanie komputerowe i czujniki elektromagnetyczne pozwalają na kontynuację nawigacji w trybie rzeczywistości wirtualnej. Powyżej przedstawione wymagania odnośnie do tomografii klatki piersiowej nie oznaczają konieczności powtarzania badania przed procedurą ENB – jeżeli badanie nie jest starsze niż miesiąc, spełnia przedstawione wymagania jakościowe (standardowe w większości ośrodków wykonujących CT), a pacjent nie przechodził w tym czasie innych interwencji zabiegowych w zakresie klatki piersiowej to z powodzeniem możemy wykorzystać taki materiał źródłowy. Należy jednak pamiętać, że do 7% pacjentów doznaje spontanicznej rezolucji lub regresji zmian będących powodem skierowania na procedurę ENB, jeżeli badanie tomograficzne zostanie powtórzone bezpośrednio przed zabiegiem. Pozwala to w przypadku powtórzenia badania uniknąć u części pacjentów niepotrzebnego narażenia na procedurę [6].

Zabieg ENB wymaga odpowiedniego zaplecza lokalowego – sala zabiegowa musi spełniać standard bloku operacyjnego oraz być wyposażona ochronę radiologiczną pomieszczeń przyległych. Należy też pamiętać o zabezpieczeniu wolnego miejsca dla:

- » Personelu (operator, asysta, anestezjolog, pielęgniarka anestezjologiczna, pielęgniarka instrumentująca, technik RTG)
 - » Konsoli do nawigacji
 - » Wieży bronchoskopowej (wraz z rEBUS)
 - » Ramienia C z konsolą sterowniczą
 - » Aparatu do znieczuleń
 - » Stołu operacyjnego z karbonowym blatem (zupełna przezierność dla promieniowania X)
 - » Dodatkowej aparatury (np. do kriobiopsji)
-

Obecność aparatu do znieczuleń nie oznacza, że każdy zabieg ENB wymaga złożonego znieczulenia ogólnego. Zabiegi implantacji znaczników na przykład na potrzeby radio-terapii stereotaktycznej mogą być przeprowadzane w głębokiej sedacji. Aparat do znieczuleń stanowi tu jednak niezbędne zabezpieczenie na wypadek powikłań anestezyjologicznych. W przypadku pozostałych procedur wymagana precyzja oraz spodziewany czas trwania zabiegu wymagają nie tylko znieczulenia, ale i zwiótczenia pacjenta celem zniesienia odruchu kaszlowego.

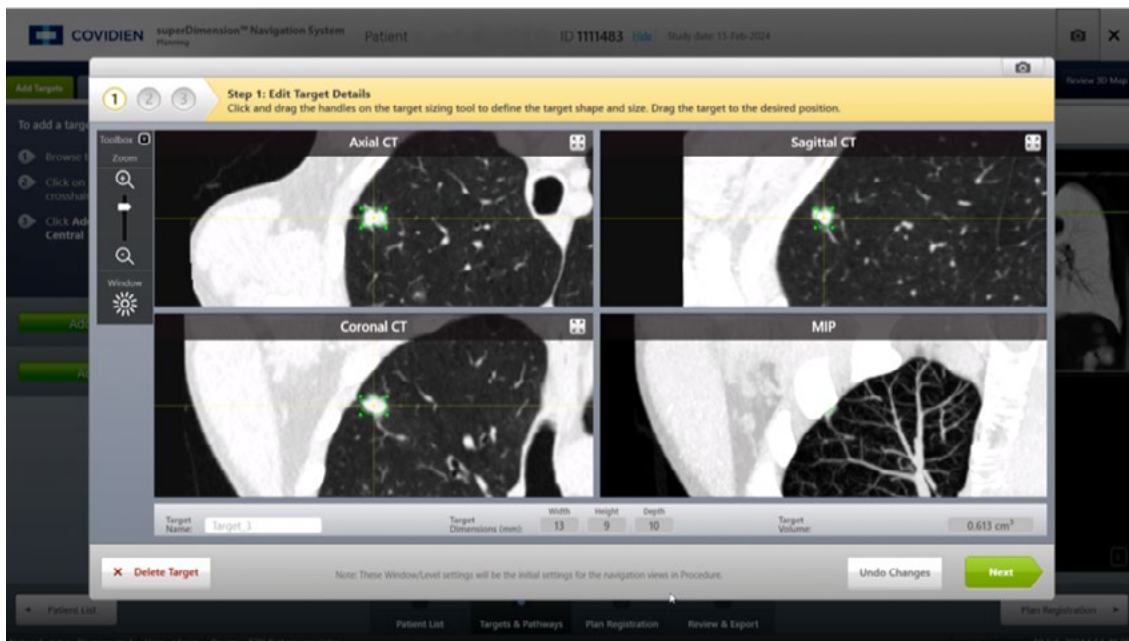
Rycina 1. Przykładowa konfiguracja sali zabiegowej (materiał własny).



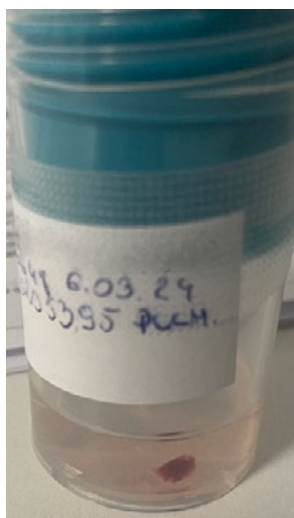
Do przeprowadzenia procedury ENB potrzeba przynajmniej standardowego wideobronchoskopu z kanałem roboczym o średnicy $\geq 2,8$ mm, generatora elektromagnetycznego (płyta umieszczana pod plecami pacjenta generująca stałe pole elektromagnetyczne o częstotliwości 30 kHz) wraz z czujnikami (elektrody naklejane na skórę pacjenta) oraz konsoli z oprogramowaniem komputerowym umożliwiającym syntezę w czasie rzeczywistym obrazów CT klatki piersiowej pacjenta z pozycją czujnika (*LG; locatable guide*) znajdującego się na końcu cewnika stanowiącego przedłużony kanał roboczy (*EWC; extended working channel*) bronchoskopu. LG jest prowadzony przez drzewo oskrzelowe do zmiany chorobowej. Dzięki temu, że średnica EWC jest bardzo mała możemy sięgać aż do zmian zlokalizowanych pod opłucną. Współczesne urządzenia pozwalają dodatkowo na fuzję obrazów uzyskiwanych z sondy radialnej (rEBUS) i wcześniej wspomnianej fluoroskopii. Pozwala to osiągać skuteczność diagnostyczną przekraczającą 80%. Zastosowanie fluoroskopii dodatkowo pomaga zwiększyć bezpieczeństwo zabiegu poprzez monitorowanie na żywo położenia narzędzi biopsyjnych. W zależności od lokalizacji zmiany, jej wielkości i tego czy jest ona drenowana przez oskrzele, poprzez EWC możemy wprowadzić igłę biopsyjną w rozmiarze 18 lub 21G, kleszczyki biopsyjne, szczoteczki cytologiczne, a także kriosondę. W naszej pracowni staramy się pobierać w czasie procedury ENB materiał różnymi dostępnymi narzędzia-

mi. Szczególne zalety wydaje się mieć kriosonda o średnicy 1,1 mm. Tak mały rozmiar powoduje, że EWC nie ulega odkształceniu w swoim dystalnym odcinku, co często ma miejsce przy stosowaniu narzędzi o większym kalibrze i jest doskonale znanym problemem każdego endoskopisty. Jednocześnie przedłużony do 12 sekund czas aplikacji pozwala uzyskiwać kriobiopaty porównywalne rozmiarem do tych uzyskiwanych przy pomocy sond o średnicy 2,4 mm. Przy krótszych czasach aplikacji możemy uzyskiwać kriobiopaty dające się ewakuować przez EWC, dzięki czemu nie ma potrzeby reawigowania się do zmiany oraz uzyskujemy potencjalnie lepszą możliwość kontroli ewentualnego krwawienia.

Rycina 2 i 3. Zmiana będąca celem diagnostycznym wraz z zaplanowaną drogą dojścia (materiał własny)



Rycina 4. Kriobiopiat pobrany przy użyciu sondy o średnicy 1,1 mm (materiał własny)



Diagnostyka onkologiczna to tylko jedno z wielu możliwych zastosowań ENB. Z powodzeniem możemy wykorzystywać ENB do prowadzenia diagnostyki mikrobiologicznej np. poprzez nakłucie igłą biopsyjną jamy, w której uwidoczniono wzrost struktury odpowiadającej aspergillomii. Uzyskujemy wówczas unikalną możliwość pobrania materiału bezpośrednio z miejsca, w którym toczy się proces chorobowy. Mam też możliwość przesłania elementów tkankowych przez które wprowadzana była igła do dalszej histopatologicznej diagnostyki różnicowej [7].

Wspomniana wcześniej implantacja znaczników również wpisuje się doskonale w spektrum możliwości procedury ENB. Należy dodać, że w grę wchodzi nie tylko implantacja markerów do radioterapii, ale również markerów nasączonych zielenią indocyjaninową, np. w celu zwiększenia precyzji torakochirurga w trakcie oszczędzających zabiegów nieanatomicznych resekcji fragmentów płuca – tzw. resekcji klinowych [8].

Ostatecznie ENB jest również formą diagnostyki zmian śródmiąższowych płuc, szczególnie na początkowym ich etapie. Możemy dzięki temu pobierać kriobiopiaty z miejsc zmienionych chorobowo w sposób celowany. Dzięki temu można uniknąć powikłań związanych z zaostrzeniem choroby śródmiąższowej u pacjentów z już rozwiniętą niewydolnością oddechową w jej przebiegu.

Finalnie ENB stanie się procedurą leczniczą, a nie tylko diagnostyczną. Już się to dzieje: przeprowadzane są między innymi zabiegi ablacji pęcherzy rozedmowych przy pomocy przegrzanej pary wodnej (*BTVA; Bronchoscopic Thermal Vapor Ablation*) oraz ablacji guzków płuc przy użyciu prądu o częstotliwości radiowej (*RFA; Radiofrequency Ablation*) lub mikrofalowej (*MWA; Microwave Ablation*) [9, 10]. Musimy pamiętać, że druga z tych procedur (ablacja) jest w fazie badań klinicznych i oferowana jest na razie pacjentom, u których istnieją przeciwwskazania do operacji lub radioterapii stereotaktycznej, albo pacjenci ci nie zgadzają się na wykonanie zabiegów przy pomocy wymienionych wyżej metod. Przeprowadzanie takich procedur jak ablacja mikrofalowa (*MWA; Microwave Ablation*) wymaga absolutnej pewności, że wykorzystywane narzędzie jest położone wewnątrz zmiany będącej celem. Jest to możliwe, ale wymaga dalszego doposażenia pracowni zabiegowej. W takich przypadkach wymagane jest wykorzystanie tomografu stożkowego (*CBCT; cone-beam CT*) – tylko takie narzędzie pozwala precyzyjnie lokalizować zmiany, w tym te o typie matowej szyby (*GGO*) i potwierdzać położenie

narzędzi w ich wnętrzu. W realiach nie tylko polskich, ale i światowych dużą barierą dla wykorzystywania CBCT w trakcie zabiegów z zakresu pulmonologii interwencyjnej pozostaje wysoka cena zakupu urządzenia, jego realna dostępność na rynku i stosunkowo wąskie w chwili obecnej okno zastosowań – to wszystko razem nie usprawiedliwia niezbędnych do podjęcia decyzji ekonomicznych wiążących się z zakupem CBCT na potrzeby pracowni pulmonologii interwencyjnej.

W chwili obecnej Płatnik nie refunduje zabiegów ENB. Zgodnie z wiedzą autorów trwałą w tym zakresie prace, ale nie jest znany termin wdrożenia tego produktu do koszyka świadczeń ani jego ostateczna wycena. Chcąc rozliczyć chociaż część kosztów związanych z wykonywaniem procedury ENB można kwalifikować zabieg jako bronchoskopię interwencyjną lub przezoskrzelową biopsję płuca pod kontrolą USG, jeżeli wykorzystujemy sondę rEBUS.

Podsumowując, technologia ENB jest atrakcyjną ścieżką rozwoju pulmonologii interwencyjnej. Pozwala ona nie tylko precyzyjnie diagnozować przypadkowo wykryte zmiany guzkowe płuc, ale w wybranych sytuacjach leczyć pacjentów, szczególnie tych, którym z uwagi na obciążenia chorobowe nie możemy zaproponować innych form terapii. Na uwagę zasługuje fakt, że diagnostyka najczęściej odbywa się jeszcze przed wystąpieniem pierwszych objawów, co w przypadku raka płuca oznacza diagnostykę w I lub II stopniu zaawansowania, zwiększając przez to szansę na leczenie radykalne pacjenta. Warto podkreślić, że procedury ENB mogą być wykonywane przez odpowiednio wykwalifikowanych pulmonologów, co pozwala odciążyć specjalistów chirurgii klatki piersiowej, którzy dzięki temu mogą pozostać skoncentrowani na wykonywaniu zabiegów leczniczych. Mając świadomość deficytu przedstawicieli tej dziedziny medycyny oraz dostrzegając możliwość skrócenia kolejek oczekujących na przyjęcie do oddziałów torakochirurgii, dalsze upowszechnianie dostępu do bronchonawigacji wydaje się pozostawać żywotnym interesem pacjentów, lekarzy i menedżerów opieki zdrowotnej.

Bibliografia

1. Khan T, Usman Y, Abdo T, Chaudry F, Keddissi JI, Youness HA. Diagnosis and management of peripheral lung nodule. *Ann Transl Med.* 2019 Aug;7(15):348.
 2. DiBardino DM, Yarmus LB, Semaan RW. Transthoracic needle biopsy of the lung. *J Thorac Dis.* 2015 Dec;7(Suppl 4):S304-16. doi: 10.3978/j.issn.2072-1439.2015.12.16. PMID: 26807279; PMCID: PMC4700361.
 3. Schwarz Y, Greif J, Becker HD, Ernst A, Mehta A. Real-time electromagnetic navigation bronchoscopy to peripheral lung lesions using overlaid CT images: the first human study. *Chest.* 2006 Apr;129(4):988-94. doi: 10.1378/chest.129.4.988. PMID: 16608948.
 4. Gould MK, Donington J, Lynch WR, Mazzone PJ, Midthun DE, Naidich DP, Wiener RS. Evaluation of individuals with pulmonary nodules: when is it lung cancer? *Diagnosis and management of lung cancer, 3rd ed: American College of Chest Physicians evidence-based clinical practice guidelines.* *Chest.* 2013 May;143(5 Suppl):e93S-e120S. doi: 10.1378/chest.12-2351. PMID: 23649456; PMCID: PMC3749714.
-

-
5. Yutaka Y, Sato T, Isowa M, Murata Y, Tanaka S, Yamada Y, Ohsumi A, Nakajima D, Hamaji M, Menju T, Chen-Yoshikawa TF, Date H. Electromagnetic navigation bronchoscopy versus virtual bronchoscopy navigation for improving the diagnosis of peripheral lung lesions: analysis of the predictors of successful diagnosis. *Surg Today*. 2022 Jun;52(6):923-930. doi: 10.1007/s00595-021-02398-z. Epub 2021 Oct 27. PMID: 34705111.
 6. Semaan RW, Lee HJ, Feller-Kopman D, Lerner AD, Mallow CM, Thiboutot J, Arias SA, Yarmus LB. Same-Day Computed Tomographic Chest Imaging for Pulmonary Nodule Targeting with Electromagnetic Navigation Bronchoscopy May Decrease Unnecessary Procedures. *Ann Am Thorac Soc*. 2016 Dec;13(12):2223-2228. doi: 10.1513/AnnalsATS.201607-522BC. PMID: 27925781; PMCID: PMC5946677.
 7. Ashraf SF, Lau KKW. Navigation bronchoscopy: A new tool for pulmonary infections. *Med Mycol*. 2019 Jun 1;57(Supplement_3):S287-S293. doi: 10.1093/mmy/myz058. PMID: 31292658; PMCID: PMC6620432.
 8. Sekine Y, Koh E, Hoshino H. The efficacy of transbronchial indocyanine green instillation for fluorescent-guided wedge resection. *Interact Cardiovasc Thorac Surg*. 2021 Jun 28;33(1):51-59. doi: 10.1093/icvts/ivab054. PMID: 33729468; PMCID: PMC8759506.
 9. Gompelmann D, Shah PL, Valipour A, Herth FJF. Bronchoscopic Thermal Vapor Ablation: Best Practice Recommendations from an Expert Panel on Endoscopic Lung Volume Reduction. *Respiration*. 2018;95(6):392-400. doi: 10.1159/000489815. Epub 2018 Jun 12. PMID: 29895029.
 10. Chan JWY, Lau RWH, Ngai JCL, Tsoi C, Chu CM, Mok TSK, Ng CSH. Transbronchial microwave ablation of lung nodules with electromagnetic navigation bronchoscopy guidance-a novel technique and initial experience with 30 cases. *Transl Lung Cancer Res*. 2021 Apr;10(4):1608-1622. doi: 10.21037/tlcr-20-1231. PMID: 34012778; PMCID: PMC8107744.
-

6.

Diagnostyka patomorfologiczna raka płuca

prof. dr hab. n. med. Łukasz Szylberg

Diagnostyka patomorfologiczna odgrywa kluczową rolę w rozpoznaniu raka płuca. Precyzyjna ocena materiału tkankowego umożliwia nie tylko postawienie rozpoznania, określenie typu histologicznego i zaawansowania nowotworu, ale także prognozowanie odpowiedzi terapeutycznej i personalizację terapii opartą na identyfikacji celów terapeutycznych. Nieustanny rozwój i zwiększenie dostępności metod diagnostyki molekularnej umożliwiły ich zastosowanie w rutynowej praktyce klinicznej oraz dobór terapii w oparciu o jej przewidywaną skuteczność.

Algorytm diagnostyczny raka płuca uwzględnia pierwotną ocenę patomorfologiczną, która pozwala na prawidłowe sklasyfikowanie większości przypadków raka płuca. Barwienia immunohistochemiczne oraz badania z zakresu biologii molekularnej umożliwiają doprecyzowanie rozpoznania oraz kwalifikację pacjenta do terapii ukierunkowanej molekularnie. Jakość przygotowania materiału biologicznego, czas do postawienia rozpoznania oraz jego kompleksowość mają fundamentalne znaczenie dla modelu holistycznej opieki nad chorymi na raka płuca, realizowanego w ośrodkach typu Lung Cancer Center.

Przygotowanie materiału biologicznego

Prawidłowe pobranie, zabezpieczenie i utrwalenie materiału biologicznego mają fundamentalny wpływ na jakość rozpoznania oraz wyniki badań z zakresu biologii molekularnej. Materiał tkankowy powinien być utrwalony w 10% roztworze formaliny o pH 7,2-7,4, przy objętości utrwalacza minimum 10-krotnie większej od objętości materiału. Optymalny czas utrwalania małego materiału histopatologicznego wynosi 6-48 godzin, natomiast dużego materiału pooperacyjnego 24-72 godzin. Zbyt długie utrwalanie, zwłaszcza w temperaturze wyższej niż 20°C, powoduje degradację kwasów nukleinowych i obniża wiarygodność otrzymanych wyników.

Z powodu ograniczonej ilości materiału tkankowego lub cytologicznego, pobranego zazwyczaj drogą bronchofiberoskopii lub biopsji przezskórnej, rozpoznanie nowotworu powinno zostać postawione z jak najmniejszym zużyciem materiału. Pozostały materiał należy zabezpieczyć do kolejnych badań, przede wszystkim oceny czynników predykcyjnych. Materiał oligobiopsyjny pobrany w celu postawienia pierwotnego rozpoznania należy skrawać na mikrotomie oszczędnie (do 3 skrawków na jednym szkiełku), unikając tzw. skrawania seryjnego, które powoduje szybkie wyczerpanie materiału w bloku parafinowym. Ponadto, każdy z pobranych wycinków powinien zostać zatopiony w osobnym bloczku parafinowym.

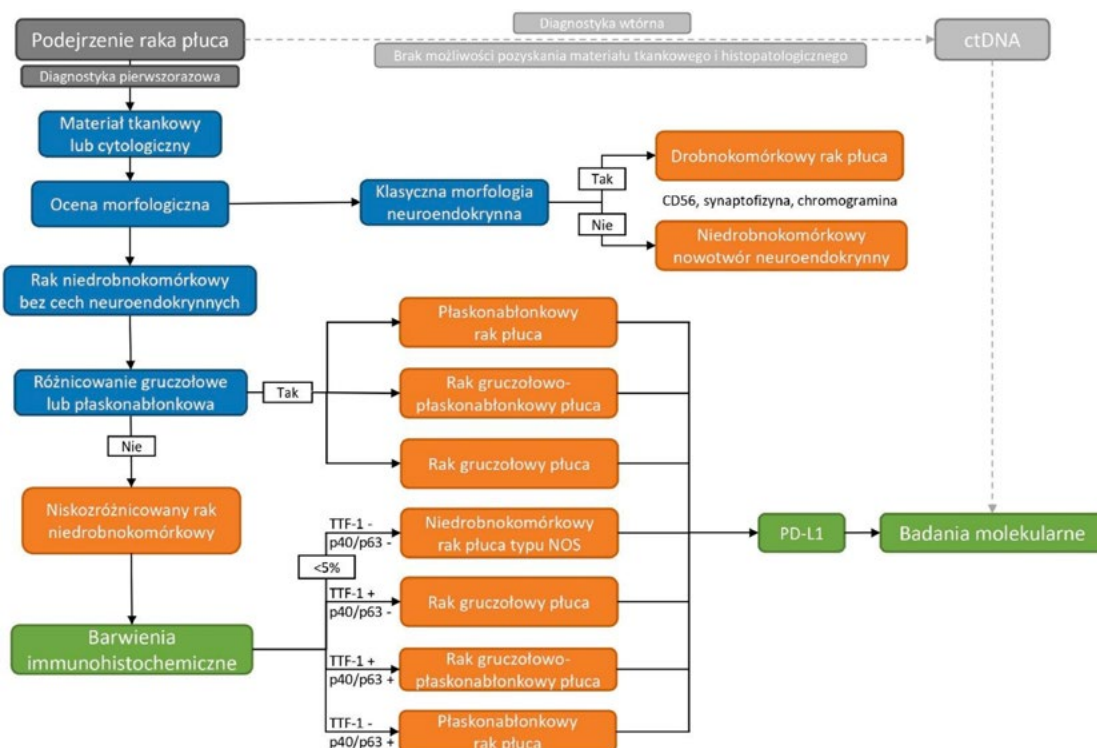
W celu efektywnego wykorzystania materiału cytologicznego należy unikać wykonywania dużej liczby rozmazów. Na szkiełku powinno znajdowało się minimum 3 000, a optymalnie powyżej 5 000 komórek. Zaleca się, aby większość pobranego materiału cytologicznego została opracowana w postaci cytobloku w celu wykonania pełnej diagnostyki histopatologicznej, w tym oznaczenia czynników predykcyjnych. W ośrodkach typu Lung Cancer Center rozmazy cytologiczne są wykorzystywane m.in. w celu szybkiego potwierdzenia obecności komórek nowotworowych, co pozwala na szybkie podjęcie decyzji o dalszym postępowaniu diagnostycznym. W przeciwieństwie do barwienia hematoksyliną i eozyną lub *Papanicolaou*, na których wynik trzeba poczekać kilka godzin, metoda ROSE (*rapid on site evaluation*) poprzez barwienie *Diff-Quick* pozwala na uzyskanie wstępnego rozpoznania w ciągu kilku minut.

Algorytm diagnostyczny raka płuca

Proces diagnostyczny w raku płuca zależy od zaawansowania klinicznego choroby, podtypu histologicznego nowotworu oraz dostępności terapii celowanych. Zgodnie z opublikowanym w 2022 roku *Podręcznikiem wdrażania standardów akredytacyjnych w jednostkach diagnostyki patomorfologicznej* maksymalny czas pierwszorazowego rozpoznania, uwzględniający wykonanie badań histologicznych i immunohistochemicznych, nie powinien przekraczać 5 dni roboczych dla materiału małego i 9 dni roboczych dla materiału pooperacyjnego [1].

Pierwszym i podstawowym elementem diagnostyki raka płuca jest ustalenie rozpoznania histopatologicznego oraz określenie zaawansowania klinicznego nowotworu. Większość nowotworów płuca może zostać sklasyfikowana na podstawie typowych cech morfologicznych widocznych w preparacie mikroskopowym wybarwionym hematoksyliną i eozyną. Jeśli jest to niemożliwe, patomorfolog zleca dodatkowe barwienia immunohistochemiczne (IHC), pozwalające na ustalenie podtypu histologicznego raka.

Rycina 1. Algorytm pierwszorazowej diagnostyki raka płuca. Badania molekularne w raku płaskonabłonkowym płuca wykonywane są jedynie w przypadku pacjentów młodych, którzy nigdy nie palili tytoniu lub byli tzw. "lekkimi palaczami".



Biorąc pod uwagę odmienny przebieg kliniczny, rokowanie oraz leczenie, sklasyfikowanie nowotworu jako rak drobnokomórkowy (DRP), rak niedrobnokomórkowy (NDRP) lub inny nowotwór płuca ma kluczowe znaczenie dla dalszych losów pacjenta.

Ponad 90% przypadków DRP można rozpoznać na podstawie typowych cech morfologicznych, takich jak obecność zwykle małych lub średniej wielkości, niebieskich komórek, z ziarnistą chromatyną i skąpą cytoplazmą. Diagnostyka różnicowa niskozróżnicowanych nowotworów neuroendokrynną na podstawie materiału cytologicznego może być trudna. Z tego powodu należy zwrócić szczególną uwagę na diagnostykę różnicową DRP z innymi nowotworami neuroendokrynną płuca.

Najważniejszym kryterium diagnostycznym DRP jest ilość figur podziału – więcej niż 10 mitoz w polu widzenia odpowiadającym 2mm² preparatu sugeruje DRP, 2-10 mitoz sugeruje atypowego rakowiaka, a 0-1 mitoz typowego rakowiaka. Jeśli wynik jest bliski wartościom granicznym, należy wyliczyć średnią z przynajmniej trzech reprezentatywnych pól widzenia. Indeks mitotyczny Ki-67 jest wysoki, zazwyczaj w zakresie 50-100%. Nie należy go jednak stosować jako markera diagnostycznego guzów neuroendokrynych płuca. W praktyce, zwłaszcza w przypadku małych wycinków lub materiału cytologicznego, marker ten ma zastosowanie jedynie w różnicowaniu rakowiaków płuc i raków neuroendokrynych. Wysoki indeks jądrowo-cytoplazmatyczny i brak jąderek pozwala odróżnić DRP od wielkokomórkowego raka płuca (WRP). Obecność jakichkolwiek komórek nowotworowych o morfologii typowej dla NDRP pozwala rozpoznać wariant złożony DRP, a obecność w obrębie guza przynajmniej 10% komórek nowotworowych o morfologii typowej dla WRP umożliwia rozpoznanie wariantu złożonego DRP i WRP.

Niemalże wszystkie komórki raka drobnokomórkowego wykazują ekspresję koktajlu cytokeratyn AE1/AE3 oraz markerów neuroendokrynych (INSM1 i CD56). Barwienie synaptofizyną i chromograniną A jest pozytywne w około 50% przypadków. CD56 jest najbardziej czułym i najmniej swoistym markerem DRP, podczas gdy TTF-1 jest pozytywny w 90% przypadków. Jedynie <5% DRP nie wykazuje reaktywności wobec żadnego markera neuroendokrynnego, a w 10-25% przypadków wybarwia się tylko jeden marker.

Postępowanie terapeutyczne w DRP zależy od stadium choroby oraz rozpoznania podtypów mieszanych DRP i uwzględnia radykalną resekcję guza, chemioterapię lub radiochemioterapię. Rutynowe badania immunohistochemiczne i molekularne w DRP nie są zalecane.

Z klinicznego punktu widzenia najistotniejszy jest podział NDRP na raka płaskonabłonkowego i niepłaskonabłonkowego. 50-70% nowotworów rozpoznawanych jest na podstawie oceny morfologii guza, natomiast w pozostałych przypadkach wystarcza zazwyczaj prosty panel barwień immunohistochemicznych, jakim jest TTF-1 i p40. Raki gruczolowe cechują się ekspresją TTF-1 (lub mniej czułego barwienia Napsin A), a raki płaskonabłonkowe ekspresją p40 (lub alternatywnie p63). Niemalże wszystkie nowotwory pozbawione morfologicznych cech raka płaskonabłonkowego, ale wykazujące koekspresję p40/p63 i TTF-1, są preferencyjnie klasyfikowane jako gruczolakoraki [2]. NDRP niewykazujące ekspresji p40/p63 oraz TTF-1 klasyfikowane są jako raki typu NOS (*ang. not otherwise specified*), jednakże odsetek takich rozpoznań nie powinien przekraczać 5%.

Pacjenci z wczesnym NDRP (stopnie I-IIIa) kwalifikowani są do leczenia operacyjnego. Na tym etapie rozpoznanie "NDRP" jest akceptowalne. Badanie materiału pooperacyjnego przeprowadza się celem kwalifikacji pacjentów do leczenia systemowego zgodnie z programem lekowym B.6. Pacjenci po radykalnej resekcji raka gruczolowego płuca lub NDRP z przewagą komponenty gruczolakoraka w stopniu IB-III, u których wykryto delecję eksonu 19 lub substytucję L858R eksonu 21 genu *EGFR*, mają możliwość leczenia uzupełniającego ozymertynibem. Pacjenci po radykalnej resekcji guza płuca z limfadenektomią węzłów chłonnych śródpiersia i po przebytej chemioterapii uzupełniającej mogą zostać zakwalifikowani do monoterapii atezolizumabem. W tym celu odsetek komórek nowotworowych z ekspresją PD-L1 w materiale pooperacyjnym powinien wynosić $\geq 50\%$. Wykładnikami radykalnej resekcji (R0) jest brak nacieku chirurgicznego w obrębie brzegów odcięcia chirurgicznego, regionalna limfadenek-

tomia obejmująca minimum 6 węzłów chłonnych (N1, N2), w tym węzły rozwidlenia tchawicy oraz nieobecność naciekania nowotworowego poza torebkę węzłów chłonnych. Brzeg odcięcia należy ocenić jako niepewny [R0(un)], jeżeli oceniono mniej niż 6 resekowanych węzłów chłonnych, stwierdzono przerzut raka w najwyższym resekowanym węzle chłonnym śródpiersia lub gdy ocena naciekania poza torebkę węzła jest niemożliwa ze względu na rozfragmentowanie materiału [3]. Europejskie Towarzystwo Onkologii Klinicznej (ESMO) zaleca również rozważenie badań w kierunku mutacji genu EGFR oraz ocenę ekspresji PD-L1 w nieresekcyjnym NDRP oraz ocenę rearanżacji genu ALK u wszystkich pacjentów z NDRP [4].

W zaawansowanym stadium choroby (stopień IV) wszyscy pacjenci z niepłaskonabłonkowym NDRP kwalifikowani są do badań molekularnych. Minimalny panel genowy, możliwy do oznaczenia w każdym akredytowanym laboratorium, musi umożliwiać oznaczenie genów EGFR, ALK i ROS1, a także NTRK1-3 oraz KRAS [5]. Badania w kierunku mutacji genu KRAS mogą zostać wykonane w celu identyfikacji pacjentów, którzy nie odniosą korzyści z dalszych badań molekularnych [6].

Ocena ekspresji PD-L1

Obecnie, ESMO rekomenduje rutynową ocenę ekspresji PD-L1 za pomocą zvalidowanego testu immunohistochemicznego (IHC) we wszystkich przypadkach rozpoznania zaawansowanego lub przerzutowego NDRP (stopień IV), niezależnie od jego podtypu histologicznego [I, A] [6,7]. Brak jest obecnie uzasadnienia dla rutynowej oceny PD-L1 w drobnokomórkowym raku płuca. Skuteczność żadnej z dostępnych terapii celowanej w DRP nie została jak dotychczas udowodniona.

Ekspresja PD-L1 może zostać oceniona na podstawie materiału tkankowego i cytologicznego, pod warunkiem, że preparat zawiera przynajmniej 100 reprezentatywnych komórek nowotworowych. Każde laboratorium powinno przeprowadzić wewnętrzną walidację stosowanych testów IHC, polegającą na porównaniu wyników barwienia preparatów cytologicznych z wynikami barwienia materiału tkankowego pochodzącego z tego samego guza.

Komercyjnie dostępne testy IHC nie zawsze są sobie równoważne. Klony 22C3, SP263 i 28-8 mogą być stosowane wymiennie, podczas gdy wyniki barwienia SP142 i 73-10 różnią się znamienne. Ekspresja PD-L1 powinna być raportowana w przynajmniej trzech przedziałach wartości (<1%, 1%-49%, ≥50%), ale zaleca się podawanie wartości w przedziałach 10%.

Ekspresja PD-L1 jest obliczana jako stosunek komórek nowotworowych wykazujących błonową ekspresję PD-L1 do wszystkich komórek nowotworowych w preparacie (tzw. "tumor score", TC). Zgodnie z programem lekowym B.6., stwierdzenie w materiale pooperacyjnym pacjentów po radykalnej resekcji NSCLC i pooperacyjnej radioterapii ekspresji PD-L1 wynoszącej ≥50% TC umożliwia kwalifikację do leczenia inhibitorami immunologicznych punktów kontrolnych w monoterapii, podczas gdy ekspresja PD-L1 <50% TC umożliwia zastosowanie inhibitorów immunologicznych punktów kontrolnych w skojarzeniu z chemioterapią [8]. Terapia niwolumabem z ipilimumabem, do której rozpoczęcia konieczna jest ekspresja PD-L1 ≥1%TC, nie została jak dotychczas zaprobowana przez Europejską Agencję Leków.

Kwalifikacja materiału do badań molekularnych

Stosując metody oparte na ekstrakcji kwasów nukleinowych należy zwrócić szczególną uwagę czy analizowany materiał biologicznego pozwala zachować minimalny próg analitycznej czułości i dolną granicę detekcji. Dla metod sekwencjonowania RNA i DNA procentowa zawartość jąder komórek nowotworowych w próbce ma większe znaczenie niż ilość komórek nowotworowych. Odsetek wymaganych komórek nowotworowych w analizowanym materiale tkankowym powinien wynosić przynajmniej 5% dla RT-PCT, natomiast testy bazujące na metodzie NGS wymagają zazwyczaj 1 000 – 5 000 komórek w próbce, z czego minimum 20% powinny stanowić komórki nowotworowe. W większości przypadków klinicznie istotne wyniki genotypowania można uzyskać, gdy odsetek komórek nowotworowych przekracza 5%, a zawartość tkanki nowotworowej w badanym materiale jest co najmniej dwukrotnie wyższa od czułości stosowanej metody (*Association for Molecular Pathology – Practice Guidelines*). Wysokość progu czułości zależy także od rodzaju analizowanej mutacji i wynosi 5-10% kwasów nukleinowych w próbce dla mutacji punktowych i małych insercji/delekcji oraz do 30% dla zmian liczby kopii genu.

Badania z zakresu diagnostyki molekularnej mogą zostać przeprowadzone na podstawie każdego materiału biologicznego pobranego od pacjenta, zawierającego komórki nowotworowe lub wolnokrążący DNA pochodzenia nowotworowego (*ang. circulating tumor DNA, ctDNA*). Zgodnie z obowiązującymi standardami preferowany jest zazwyczaj materiał komórkowy lub tkankowy utrwalony w formalinie i zatopiony w parafinie.

Jeżeli lokalizacja guza uniemożliwia pozyskanie materiału biopsyjnego lub cytologicznego, diagnostyka molekularna może zostać przeprowadzona na podstawie analizy ctDNA pobranego drogą tzw. "biopsji płynnej" z krwi obwodowej pacjenta [Rycina 1]. Potwierdzenie obecności zmian genetycznych w biopsji płynnej umożliwia kwalifikację pacjenta do badań molekularnych. Oba testy można zastosować jednocześnie w celu przyspieszenia diagnostyki i zwiększenia ilości potencjalnych celów terapeutycznych, jednak biopsja płynna nie stanowi alternatywy dla materiału tkankowego i nie jest zalecana u pacjentów bez zaawansowanej lub przerzutowej choroby nowotworowej. Ze względu na niską czułość, negatywny wynik ctDNA nie wyklucza braku mutacji w komórkach nowotworu i powinien zostać potwierdzony badaniem materiału tkankowego [II, A] [6]. Należy także pamiętać, że nie każdy wolnokrążący we krwi DNA jest pochodzenia nowotworowego, a krążący we krwi nowotworowy DNA może wywodzić się zarówno z guza pierwotnego, jak i z ognisk przerzutowych.

Diagnostyka molekularna

Podstawowym celem badań molekularnych jest identyfikacja zmian genetycznych, warunkujących wrażliwość na leczenie celowane. Z tego powodu spektrum paneli genowych analizowany w trakcie diagnostyki odzwierciedla epidemiologię nowotworu oraz dostępność terapii (Tabela 1). Diagnostyka molekularna jest niezbędna u wszystkich pacjentów z zaawansowanym niepłaskonabłonkowymi rakami płuca, natomiast nie powinna być rutynowo wykonywana u pacjentów z rakiem płaskonabłonkowym [IV, A] [6].

Ze względu na możliwość analizy szerokiego panelu genowego i wykrycia największej liczby mutacji, metody opartych na sekwencjonowaniu nowej generacji (NGS) na wczesnym etapie diagnostyki są obecnie silnie rekomendowane [III, A][6,9]. Zastosowanie NGS w diagnostyce wszystkich pacjentów z zaawansowanym NDRP w rzeczywistości

polskiego systemu ochrony zdrowia zmniejszyłoby koszty przypadających na każdego pacjenta oraz rozszerzyło możliwości terapeutyczne, wynikające ze zwiększenia wykrywalności rzadkich mutacji onkogennych [10]. Zważając jednak na ograniczoną dostępność tej metody w mniejszych ośrodkach oraz wyższy koszt całkowity, akceptowalna jest także równoczesna ocena wszystkich celów molekularnych dedykowanymi indywidualnymi testami diagnostycznymi.

Ocena mutacji *EGFR*, *KRAS* oraz ewentualnie *BRAF* musi zostać przeprowadzona metodą wysokiej czułości opartą na technice łańcuchowej reakcji polimerazy w czasie rzeczywistym (RT-PCR). Obecność rearanżacji *ALK* można potwierdzić metodą immunohistochemiczną lub FISH, natomiast rearanżacji *ROS1* metodą FISH. Mutacja G12C genu *KRAS* występuje u ok. 13% pacjentów z NDRP, a jej stwierdzenie umożliwia kwalifikację do leczenia sotorasibem [5]. Od listopada 2023 roku, zgodnie z założeniami programu lekowego B144, uzasadnione jest oznaczenie rearanżacji genów *NTRK1-3* celem kwalifikacji do leczenia entrekty nibem lub larotrekty nibem [8]. Stwierdzenie mutacji *BRAF* V600, występującej w 1-2% NDRP, umożliwia rozpoczęcie terapii dabrafenibem z tramety nibem. Mając jednak na uwadze, że rozpoczęcie tej terapii w Polsce możliwe jest jedynie w ramach ratunkowego dostępu do technologii lekowych, rutynowe oznaczanie mutacji *BRAF* nie jest obecnie uzasadnione.

Tabela 1. Zalecane badania molekularne w niedrobnokomórkowym raku płuca

Gen	Rekomendacje
EGFR	<ul style="list-style-type: none"> Należy przeprowadzić diagnostykę w kierunku mutacji <i>EGFR</i> u wszystkich pacjentów z rakiem niepłaskonabłonkowym płuca [I, A]. Badanie powinno umożliwić dokładną ocenę eksonów 18-21 genu <i>EGFR</i> [III, A]. Panel minimum powinien ocenić obecność delekcji eksonu 19 i punktowej mutacji L858R eksonu 21 [I, A]. W przypadku nawrotu choroby należy ocenić obecność mutacji T790M [I, A].
ALK	<ul style="list-style-type: none"> Należy przeprowadzić diagnostykę w kierunku rearanżacji <i>ALK</i> u wszystkich pacjentów z rakiem niepłaskonabłonkowym płuca [I, A]. Zwalidowane testy IHC stanowią samodzielną metodę diagnostyczną, równoważną FISH [I, A].
ROS1	<ul style="list-style-type: none"> Należy przeprowadzić diagnostykę w kierunku rearanżacji <i>ROS1</i> u wszystkich pacjentów z rakiem niepłaskonabłonkowym płuca [II, A]. W screeningu można zastosować testy IHC [II, A], ale wynik pozytywny należy potwierdzić badaniem FISH [IV, A].
NTRK1-3	<ul style="list-style-type: none"> Należy przeprowadzić diagnostykę w kierunku rearanżacji <i>NTRK</i> [II, A]. Obecność genu fuzyjnego należy potwierdzić zwalidowanym testem NGS.
KRAS	<ul style="list-style-type: none"> Należy przeprowadzić diagnostykę w kierunku mutacji <i>KRAS G12C</i> [II, A]. Pacjenci z mutacją <i>KRAS G12C</i> rzadko odnoszą korzyści z dalszych badań molekularnych.

Ze względu na brak refundacji oraz nieuwzględnienie leczenia celowanego w programach lekowych Ministerstwa Zdrowia, rutynowa analiza genów *BRAF*, *RET*, *MET* i *ERBB2* nie jest obecnie uzasadniona.

Podsumowanie

Ponad połowa raków płuca zostaje rozpoznanych w stadium zaawansowanym, niedającym pacjentom możliwości leczenia chirurgicznego. Z tego powodu czas i dokładność rozpoznania histopatologicznego mają kluczowe znaczenie dla pacjentów z niedrobnokomórkowym rakiem płuca. Diagnostyka oparta na cechach morfologicznych pozwala na ustalenie podtypu histologicznego większości guzów płuca. Mając na uwadze, że w zaawansowanym stadium choroby dostępny materiał genetyczny jest ograniczony, należy dążyć do minimalizacji zużycia materiału poprzez stosowanie jak najmniejszej ilości testów o najwyższej dostępnej czułości i swoistości. Kluczowe znaczenie ma współpraca pomiędzy klinicystą a patomorfologiem, pozwalająca na doprecyzowanie rozpoznania na podstawie charakterystycznych cech klinicznych nowotworu. Jeżeli dodatkowe barwienia są niezbędne, prosty panel zawierających tylko jeden marker płaskonabłonkowy (p40) i jeden marker gruczołowy (TTF-1) zazwyczaj wystarcza do postawienia rozpoznania.

Aktualnie, badania predykcyjne określające obecność konkretnych celów terapeutycznych wykonywane są rutynowo w diagnostyce zaawansowanego i przerzutowego niepłaskonabłonkowego NDRP. Badanie te znajdują uzasadnienie również w przypadku pacjentów po radykalnej resekcji guza pierwotnego i pooperacyjnej chemioterapii. Wykonanie testu IHC na ekspresję PD-L1 jest zalecane we wszystkich przypadkach zaawansowanego NDRP, niezależnie od podtypu histologicznego guza i cech klinicznych.

Metody oparte na sekwencjonowaniu nowej generacji (NGS) umożliwiają dokładną ocenę szerokiego panelu genów oraz identyfikację większej liczby potencjalnych celów terapeutycznych niż inne metody diagnostyczne. Z tego powodu badanie NGS powinno zostać zastosowane już na początkowych etapach diagnostyki. Laboratoria oferujące świadczenia z zakresu diagnostyki molekularnej powinny posiadać możliwości techniczne zastosowania przynajmniej dwóch różnych metod oceny zmian genetycznych, umożliwiających ocenę genów *EGFR*, *ALK* i *ROS1*, a także ekspresji PD-L1. Na skutek rozszerzenia zakresu refundacji w ramach programów lekowych, uzasadnienie zyskała także rutynowa ocena genów *KRAS* i *NTRK1-3*. Biorąc pod uwagę najnowsze doniesienia, w najbliższych latach możemy spodziewać się dalszego rozszerzenia listy refundacyjnej o terapię ukierunkowaną na zmiany w obrębie genów *BRAF*, *RET*, *MET* i *ERBB2*. Wraz z wprowadzaniem w życie najnowszych standardów akredytacji jednostek diagnostyki patomorfologicznej w najbliższych latach możemy oczekiwać dalszego przyspieszenia procesu diagnostycznego oraz wzrostu jakości oceny badanego materiału. Procedury przygotowania materiału i sposób interpretacji wyników badań molekularnych są ściśle określone, wszelkie odstępstwa mogą wpłynąć na precyzję badania i dalsze leczenie pacjentów. Z tego powodu laboratoria przeprowadzające testy molekularne powinny posiadać odpowiednie akredytacje oraz certyfikaty zewnętrznej i wewnętrznej kontroli jakości.

Bibliografia

1. Marszałek A., Grajkowska W., Szumiło J., Kaznowska E., Szyłberg Ł., Szpor J. Wdrażanie Standardów Akredytacyjnych W Jednostkach Diagnostyki Patomorfologicznej. Centrum Monitorowania Jakości w Ochronie Zdrowia 2022.
-

2. Ettinger, D.S.; Wood, D.E.; Aisner, D.L.; Akerley, W.; Bauman, J.R.; Bharat, A.; Bruno, D.S.; Chang, J.Y.; Chirieac, L.R.; D'Amico, T.A.; et al. Non-Small Cell Lung Cancer, Version 3.2022, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J. Natl. Compr. Canc. Netw.* 2022, 20, 497–530. <https://paperpile.com/b/1xqMwF/uEzVK>
 3. Langford, R.; Krzakowski, M.; Kowalski, D.; Krenke, R.; Orłowski, T.; Rzyman, W.; Wasąg, B. STANOWISKO EKSPERTÓW DOTYCZĄCE LECZENIA UZUPEŁNIAJĄCEGO OZYMERTYNIBEM CHORYCH NA NIEDROBNOKOMÓRKOWEGO RAKA PŁUCA PO RADYKALNEJ RESEKCJI NOWOTWORU. *Onkol. W Prakt. Klin.* 2023, doi:10.5603/ocp.2023.0018.
 4. Remon, J.; Soria, J.-C.; Peters, S.; ESMO Guidelines Committee. Electronic address: clinicalguidelines@esmo.org Early and Locally Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer: An Update of the ESMO Clinical Practice Guidelines Focusing on Diagnosis, Staging, Systemic and Local Therapy. *Ann. Oncol.* 2021, 32, 1637–1642. <https://paperpile.com/b/1xqMwF/OPGCg>
 5. Wasąg, B.; Langford, R.; Kowalik, A.; Chorostowska-Wynimko, J.; Tysarowski, A.; Dziadziuszko, R.; Krzakowski, M. Nowe cele molekularne w algorytmie diagnostycznym niedrobnokomórkowego raka płuca (NDRP). *Onkologia w Praktyce Klinicznej - Edukacja* 2023, 9, 385–389.
 6. Hendriks, L.E.; Kerr, K.M.; Menis, J.; Mok, T.S.; Nestle, U.; Passaro, A.; Peters, S.; Planchard, D.; Smit, E.F.; Solomon, B.J.; et al. Oncogene-Addicted Metastatic Non-Small-Cell Lung Cancer: ESMO Clinical Practice Guideline for Diagnosis, Treatment and Follow-Up. *Ann. Oncol.* 2023, 34, 339–357. <https://paperpile.com/b/1xqMwF/Uct0J>
 7. Hendriks, L.E.; Kerr, K.M.; Menis, J.; Mok, T.S.; Nestle, U.; Passaro, A.; Peters, S.; Planchard, D.; Smit, E.F.; Solomon, B.J.; et al. Non-Oncogene-Addicted Metastatic Non-Small-Cell Lung Cancer: ESMO Clinical Practice Guideline for Diagnosis, Treatment and Follow-Up. *Ann. Oncol.* 2023, 34, 358–376. <https://paperpile.com/b/1xqMwF/4SWvn>
 8. Obwieszczenie Ministra Zdrowia z dnia 20 października 2023 r. w sprawie wykazu refundowanych leków, środków spożywczych specjalnego przeznaczenia żywieniowego oraz wyrobów medycznych na 1 listopada 2023 r. - Ministerstwo Zdrowia - Portal Gov.pl Available online: <https://www.gov.pl/web/zdrowie/obwieszczenie-ministra-zdrowia-z-dnia-20-pazdziernika-2023-r-w-sprawie-wykazu-refundowanych-lekow-srodkow-spozywczych-specjalnego-przeznaczenia-zywieniowego-oraz-wyrobow-medycznych-na-1-listopada-2023-r> (accessed on 26 February 2024).
 9. Kang, D.-W.; Park, S.-K.; Yu, Y.L.; Lee, Y.; Lee, D.H.; Kang, S. Effectiveness of next-Generation Sequencing for Patients with Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer: A Population-Based Registry Study. *ESMO Open* 2024, 9, 102200. <https://paperpile.com/b/1xqMwF/vHI2i>
 10. Stencel, K.; Wasąg, B.; Pruszko, C.; Dąbrowska, K.; Książek, P.; Dziadek, K.; Bryl, M.; Krzakowski, M. Korzyści kliniczne i ekonomiczne z zastosowania sekwencjonowania następnej generacji w diagnostyce chorych na niedrobnokomórkowego raka płuca z rzadkimi mutacjami. *Onkologia w Praktyce Klinicznej - Edukacja* 2023, 0.
-

7.

Badania genetyczne w raku płuca: dostępne technologie, kierunki rozwoju

dr n. med. Andrzej Tysarowski

XXI wiek określany jest mianem ery genomowej i ery medycyny spersonalizowanej. Zaczętkował je ogromny postęp w genetyce i technikach biologii molekularnej jaki dokonał się na przestrzeni ostatnich kilku lat. Rozwój ten daje olbrzymie możliwości w zakresie zaawansowanej diagnostyki genetycznej, pozwala na poznanie podłoża wielu chorób uwarunkowanych genetycznie w tym także nowotworów. W najbliższych latach wiedza na temat biologii molekularnej organizmu człowieka będzie się prawdopodobnie pogłębiać bardzo szybko. W konsekwencji proces diagnostyczny, w szczególności na etapie interpretacji wyniku badania genetycznego, wymagać będzie coraz większej interdyscyplinarności, przede wszystkim w zakresie współpracy lekarzy różnych specjalności, diagnostów laboratoryjnych z dziedziny laboratoryjnej genetyki medycznej oraz bioinformatyków.

Diagnostyka genetyczna jest obecnie jedną z najbardziej dynamicznie rozwijającej się dziedzin diagnostyki laboratoryjnej szczególnie w onkologii. Stawia to bardzo duże wymagania przed współczesnymi jednostkami diagnostyki genetycznej, które muszą na bieżąco aktualizować wiedzę w zakresie nowych markerów genetycznych, nowych technik diagnostycznych, nowoczesnej aparatury. Diagnostyci laboratoryjni muszą posiadać wiedzę i doświadczenie w zakresie zarówno badań genetycznych w nowotworach uwarunkowanych genetycznie, gdzie oceniane są zmiany germinalne mające kluczowe znaczenia dla rozpoznania nowotworu, ocenie predyspozycji do zachorowania na dany typ nowotworu, a obecnie również kwalifikacji do terapii celowanych jak i badaniach zmian somatycznych występujących jedynie w komórkach nowotworowych nabywanych w trakcie życia np. w raku płuca. Zmiany somatyczne są obecnie podstawą do kwalifikacji do współczesnych onkologicznych terapii celowanych, monitorowania leczenia jak i w coraz większej liczbie przypadków są niezbędne do klasyfikacji i postawienia ostatecznego rozpoznania nowotworu.

Organizacja i funkcjonowanie współczesnego laboratorium wykonującego kompleksowe badania genetyczne na potrzeby pacjentów onkologicznych

Jednostki (Zakłady/Pracownie/Laboratoria) wykonujące kompleksową diagnostykę genetyczną na potrzeby pacjentów onkologicznych powinny ściśle współpracować z klinikami onkologicznymi, poradniami genetycznymi i jednostkami diagnostyki patomorfologicznej w ramach jednego podmiotu leczniczego. Umożliwia to prowadzenie zintegrowanej, interdyscyplinarnej diagnostyki we współpracy chirurgów, onkologów klinicznych, patomorfologów oraz diagnostów laboratoryjnych z zakresu laboratoryjnej genetyki medycznej, a także genetyków klinicznych. Ścisła współpraca oraz zapewnienie wysokiej jakości badań są szczególnie ważne w kontekście szybko rozwijającej się medycyny personalizowanej. Taka struktura i organizacja umożliwiają specjalistyczną i kompleksową diagnostykę w jednym miejscu bez konieczności wysyłania materiału do jednostek zewnętrznych. Dzięki temu czas badania jest zredukowany do minimum, zapewniona jest możliwość skonsultowania przypadku przez specjalistów z różnych dziedzin medycznych, a jednocześnie ryzyko związane z transportem próbki (np. utrata jakości materiału) jest zniwelowane, a także, co niezwykle istotne, materiał od pacjenta pozostaje dostępny w razie konieczności ponownej analizy molekularnej np. opartej na innej technologii.

Badania genetyczne muszą być wykonywane na aparaturze posiadającej pełną dokumentację techniczną obejmującą naprawy, prowadzone walidacje i potwierdzenia do-

konywanych corocznych przeglądów (rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 21 marca 2006 roku (Dz.U. 2006, nr 59, poz. 422 z późn. zm.). Laboratorium genetyczne powinno mieć wieloletnie doświadczenie (przynajmniej 5 lat) w pracy z materiałem z krwi obwodowej, tkankowym, cytologicznym, pozakomórkowymi kwasami nukleinowymi (ctDNA) oraz posiadać opracowane i wdrożone procedury, instrukcje laboratoryjne jak też wewnętrzne systemy kontroli jakości. Laboratorium musi być zarejestrowane w Krajowej Izbie Diagnostów Laboratoryjnych (KIDL), musi być kierowane przez specjalistę z dziedziny laboratoryjnej genetyki medycznej i bezwzględnie powinno posiadać udokumentowane doświadczenie (certyfikaty międzynarodowych kontroli jakości) w wykonywaniu badań zmian germinalnych i somatycznych. Personel w nim zatrudniony musi posiadać doświadczenie i biegłość w interpretowaniu zidentyfikowanych wariantów genetycznych na podstawie medycznych baz danych, literatury medycznej oraz bioinformatycznych programów analitycznych *in silico*. Całość wymogów stawianych przed pracowniami diagnostycznymi opisana została w Rozporządzeniu Ministra Zdrowia w sprawie standardów jakości dla laboratoriów diagnostycznych i mikrobiologicznych (Dz.U. 2019, poz. 1923). Raport z przeprowadzonego diagnostycznego badania genetycznego musi zawierać wynik, jego precyzyjną interpretację zrozumiałą dla onkologa klinicznego, genetyka klinicznego, patomorfologa oraz pacjenta, a także opis i zakres zastosowanej metodologii. Wynik badania genetycznego może być autoryzowany jedynie przez diagnostę laboratoryjnego, zaleca się, aby ostatecznej autoryzacji dokonywał specjalista z zakresu laboratoryjnej genetyki medycznej. Tylko tak przygotowany wynik stanowi dokument medyczny i może być wykorzystany do postępowania terapeutycznego pacjenta oraz rozliczony jako świadczenie refundowane przez NFZ.

Międzynarodowe organizacje kontroli jakości diagnostyki molekularnej raka płuca

Zaawansowana diagnostyka genetyczna ma sens tylko wtedy, gdy jest wykonywana w laboratorium, w którym pracują doświadczeni diagnosty i biolodzy molekularni, korzystający z najnowszych, certyfikowanych technologii. Dlaczego to tak ważne? Błąd na tym etapie może skutkować złą kwalifikacją pacjenta – podkreślali eksperci, którzy wzięli udział w VII konferencji „Polityka lekowa”, zorganizowanej przez „Puls Medycyny”

Źródło: Puls Medycyny

<https://pulsmedycyny.pl/jakosc-ma-kluczowe-znaczenie-w-diagnostyce-molekularnej-963487>

Jedną z istotnych aktywności każdego laboratorium wykonującego diagnostyczne badania genetyczne na potrzeby leczenia ukierunkowanego molekularnie (terapii celowanych) w niedrobnokomórkowym raku płuca (NDRP) jest coroczne uczestnictwo w zewnątrzlaboratoryjnej, międzynarodowej kontroli jakości wykonywanych badań. W naszym kraju obecnie obligatoryjne uczestnictwo w takiej kontroli nakłada zarządzenie prezesa NFZ, które stanowi, że badania genetyczne może wykonywać tylko i wyłącznie laboratorium corocznie uczestniczące w zewnątrzlaboratoryjnej kontroli jakości ((...) potwierdzona z wykorzystaniem zwalidowanego testu wykonywanego w laboratorium posiadającym aktualny certyfikat europejskiego programu kontroli jakości dla danego testu; (...) wg LECZENIE NIEDROBNOKOMÓRKOWEGO RAKA PŁUCA (ICD-10 C 34) <https://www.gov.pl/web/zdrowie/choroby-onkologiczne>). W praktyce oznacza to, że jedynie wynik wydany przez laboratorium posiadające taki certyfikat umożliwi kwalifikację pacjenta do programu lekowego. W Europie najbardziej popularne są dwie organizacje przeprowadzające kontrolę jakości dotyczącej oceny markerów molekularnych w diagnostyce raka płuca:

1. European Molecular Quality Network (EMQN) - <https://www.emqn.org/> z siedzibą w Manchesterze (UK) organizacja non - profit, wywodzącej się z Uniwersytetu w Manchesterze,

2. Genomic Quality Assessment (GenQA) - <https://genqa.org/> brytyjska instytucja organizująca międzynarodowe schematy kontroli jakości. Należy nadmienić, że obecnie jedynie ta kontrola jakości umożliwia uzyskanie certyfikatu kontroli jakości badań genetycznych w ocenie fuzji genowych techniką sekwencjonowania następnej generacji (NGS) tj. fuzji genów *ALK*, *ROS1*, a także *RET*, *NTRK1/2/3* oraz rearanżacji genu *MET*.

Oferowane schematy kontroli dotyczące raka płuca są bardzo zróżnicowane i dostosowane do różnych potrzeb uczestników oraz różnych regulacji obecnych w danym kraju. W związku z powyższym koszt uczestnictwa waha się od 500 EUR do nawet 900 EUR. Laboratorium przystępujące do kontroli jakości powinno wykonać badania według swojego rutynowego protokołu, jak również według stosowanej techniki biologii molekularnej. Ocena mutacji na poziomie DNA może być wykonana techniką sekwencjonowania bezpośredniego techniką Sanger, komercyjnymi zestawami qPCR lub techniką sekwencjonowania następnej generacji (NGS). Ocena ekspresji białek *ALK* lub *ROS1* może być wykonywana techniką immunohistochemiczną (IHC) (w Polsce dopuszcza się jedynie ocenę ekspresji białka *ALK* w kwalifikacji do terapii celowanych metodą IHC), albo ocenę rearanżacji genów *ALK* i *ROS1* metodą fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH), bądź ocenę rearanżacji ww. genów techniką NGS, obecnie uważaną jako złoty standard oceny fuzji genowych. Możliwe jest również badanie fuzji przy zastosowaniu zaawansowanych testów opartych o technologię qPCR.

Próbki jakie uczestniczące laboratorium otrzymuje do oceny to kliniczne preparaty nowotworów płuca, a obecnie coraz częściej preparaty pochodzące z hodowanych linii komórkowych raka płuca zawierające określone warianty genetyczne. Preparaty przygotowane na bazie linii komórkowych symulują przypadki kliniczne oraz umożliwiają przygotowanie preparatów o pożądanej częstości wariantów (częstości allelicznej, *ang. allele frequency*). Zwykle uczestnik otrzymuje od 5 do 10 próbek do oceny. Próbki mogą mieć postać zrolowanych skrawków parafinowych, skrawków umieszczonych na szkiełku lub gotowe izolaty DNA lub jak w przypadku cfDNA, próbkami są syntetyzowane fragmenty DNA zawieszane w ludzkim osoczu lub buforze imitującym ludzkie osocze. W przypadku raka płuca, ze względu na wymóg badania wielu markerów molekularnych kontrole jakości mogą składać się z kilku osobnych części. Zwykle jest to ocena obecności mutacji w genie *EGFR* oraz translokacji z udziałem genów *ALK* oraz *ROS1*. Kontrole proponowane przez organizatora obejmują zwykle większą liczbę markerów, ponieważ w różnych krajach dostępność do leków jest zróżnicowana. Zakres kontroli jest zróżnicowany.

Pomyślne uczestnictwo w kontroli jakości kończy się otrzymaniem certyfikatu, na którym widnieje informacja o zakresie kontroli oraz o uzyskanych wynikach. W przypadku uzyskania niesatysfakcjonującego rezultatu, powinny być wdrożone działania naprawcze.

Certyfikat jest przyznawany za dany rok. Zwykle certyfikat otrzymywany jest z końcem roku, w którym odbyła się kontrola jakości i obowiązuje przez okres kolejnego roku, co oznacza, że certyfikaty z datą np. 2022 są ważne przez cały rok 2023.

Sprzęt laboratoryjny

Sprawy dotyczące wyposażenia laboratorium w aparaturę medyczną reguluje rozporządzenie Ministra Zdrowia z dn. 21 marca 2006 (z późniejszymi zmianami) w sprawie wymagań, jakim powinno odpowiadać medyczne laboratorium diagnostyczne. Laboratorium wyposaża się w aparaturę pomiarowo-badawczą dostosowaną do rodzaju wykonywanych badań, umożliwiającą stosowanie metod badawczych zgodnych z aktualnym stanem wiedzy. Placówka prowadzi dokumentację dotyczącą aparatury pomiarowo-badawczej oraz sprzętu stanowiących wyposażenie laboratorium, zawierającą:

- » Karty gwarancyjne
- » Specyfikacje techniczne
- » Datę rozpoczęcia eksploatacji
- » Wykaz pracowników przeszkolonych i upoważnionych do obsługi oraz bezpośrednio odpowiedzialnych za daną aparaturę lub sprzęt
- » Instrukcje użytkownika
- » Zapisy kalibracji
- » Instrukcje postępowania przy działaniach naprawczych i korygujących
- » Oświadczenie o dopuszczeniu do użytkowania po usunięciu awarii
- » Dane o bieżącej obsłudze i kontroli
- » Dane o konserwacji bieżącej i okresowej prowadzonej zgodnie ze wskazaniami wytwórców przez użytkowników lub podmioty autoryzowane przez dystrybutorów lub wytwórców.

Materiał do badań genetycznych

Krew obwodowa, pobrana w kierunku oceny zmian somatycznych (tzw. płynna biopsja) na poziomie pozakomórkowych kwasów nukleinowych – ctDNA (*ang. circulating tumor DNA*), będąca materiałem do badań genetycznych, pobrana po uprzednim uzyskaniu pisemnej zgody pacjenta na diagnostyczne badanie genetyczne, powinna być kierowana bezpośrednio do jednostki genetycznej. Materiał do badań genetycznych wykonywanych na materiale histologicznym (materiał archiwalny utrwalony w postaci bloczków parafinowych lub preparatów cytologicznych), po uzyskaniu zgody pacjenta na diagnostyczne badanie genetyczne, musi podlegać ocenie patomorfologicznej, określającej przydatność materiału do badań molekularnych i dobór optymalnej próbki. Materiałem referencyjnym w tym badaniu jest tkanka zatopiona w bloczku parafinowym, ale dopuszcza się także wykorzystywanie preparatów cytologicznych (cytobloki lub rozmazy na szkiełkach). Kwalifikacji materiału do analizy molekularnej powinien zawsze dokonywać patomorfolog, uwzględniając jakość materiału i jego ilość, a także zawartość tkanki nowotworowej. Przed przystąpieniem do izolacji kwasów nukleinowych z bloczka parafinowego, musi zostać wykonany preparat HE, który umożliwi weryfikację morfologiczną pod kątem zawartości i lokalizacji tkanki nowotworowej w preparacie. Patomorfolog, który weryfikuje rozpoznanie, zaznacza obszar, z którego należy pobrać komórki do badań molekularnych, umożliwiając tym samym uzyskanie preparatu zawierającego komórki pochodzenia nowotworowego z ograniczoną do minimum zawartością komórek prawidłowych. Jest to niezwykle istotny etap, w sytuacji, gdy celem badania jest detekcja mutacji somatycznych, obecnych, z definicji, tylko w części utkania nowotworowego.

» Postępowanie z materiałem

Materiał tkankowy zakwalifikowany do badań genetycznych kierowany jest bezpośrednio do laboratorium gdzie jest rejestrowany w zintegrowanym, informatycznym systemie szpitalnym, a następnie podlega procesowi makro- lub mikrodysekcji w celu wyodrębnienia z preparatów tkankowych materiału nowotworowego zweryfikowanego uprzednio przez patomorfologa. Do badań genetycznych mutacji somatycznych procentowy udział komórek nowotworowych w całym analizowanym preparacie powinien zawierać nie mniej niż 20% badanego materiału. Parametr utkania 20% nowotworu jest wystarczający dla większości metod biologii molekularnej, ale są metody, które umożliwiają uzyskanie wiarygodnego wyniku nawet na utkaniu rzędu 5%. Są to wysokoczułe testy qPCR i ddPCR. Zawsze powinno się dążyć do uzyskania jak najwyższego procentu komórek nowotworowych w analizowanym preparacie.

Kolejne etapy badań to: 1. izolacja kwasów nukleinowych (RNA/DNA/ctDNA/ctRNA); 2. wykonanie badania genetycznego techniką molekularną dobraną zależnie od zakresu badania, rodzaju i jakości materiału; 3. Interpretacja wyników badania; 4. przygotowanie sprawozdania z laboratoryjnego badania genetycznego; 5. weryfikacja wyniku badania przez dwie niezależne osoby; 6. autoryzacja wyniku przez diagnostę laboratoryjnego.

» Analiza ctDNA

Analiza ctDNA jest metodą diagnostyczną wykorzystywaną w onkologii molekularnej od niedawna, jednak już teraz można stwierdzić, iż, wraz z postępem wiedzy i technologii jej przydatność kliniczna będzie coraz większa. Analiza ctDNA ma zastosowanie m.in. w wykrywaniu zmian genetycznych charakterystycznych dla nowotworu poprzez profilowanie genetyczne pozakomórkowych kwasów pochodzenia nowotworowego we krwi pacjentów, daje to możliwość kwalifikacji do leczenia celowanego, monitorowania procesu leczenia i wczesnego wykrywania nawrotu nowotworu (progresja molekularna stwierdzana przed progresją obrazową). Może stanowić również uzupełnienie informacji uzyskanych z klasycznej biopsji guza. W przypadku tradycyjnych biopsji tkanek tylko część potencjalnie złośliwego guza jest pobierana do celów diagnostycznych i charakterystyki molekularnej. Obserwowany profil mutacji w konsekwencji odzwierciedla tylko ograniczony fragment dostarczony w zebranych materiale. Natomiast profilowanie genetyczne z wykorzystaniem ctDNA może odzwierciedlać całkowity profil mutacji całej masy guza, w tym nowych subklonów odpowiedzialnych za przerzuty. Stąd też w płynnej biopsji możliwe jest wykrycie mutacji, która nie jest obecna w pierwotnej biopsji tkanki. Co więcej, płynne biopsje pozwalają na analizę profilu genomowego nowotworu, nawet jeśli guz znajduje się w niedostępnym dla tradycyjnej biopsji obszarze i są niezastąpione w przypadkach, gdy nie ma dostępnego materiału histologicznego od pacjenta (brak materiału, materiał niediagnostyczny, niewystraczająca ilość materiału histologicznego do przeprowadzenia badań genetycznych). Dodatkową zaletą płynnej biopsji jest również fakt, iż pozyskanie materiału do badań odbywa się w sposób małoinwazyjny, mniej traumatyczny dla pacjentów w porównaniu do klasycznej biopsji. Materiałem pobieranym jest krew obwodowa pacjenta w ilości 8 do 10 ml. Krew musi być pobrana na specjalne probówki dedykowane do izolacji ctDNA, które zawierają stabilizatory zapobiegające lizie komórek jądrazstych krwi i uwalniania z nich prawidłowego DNA. Zabezpiecza to frakcję ctDNA nowotworu przed „wygłuszeniem” przez prawidłowy DNA. Badanie wykonane na ctDNA może być przeprowadzone bezpośrednio po pobraniu, czas niezbędny na izolację i wykonanie testu to kilka godzin. Zaznaczyć należy, że materiał pobrany do dedykowanych probówek jest stabilny w temp. pokojowej

przez około 5 dni, dzięki czemu możliwe jest jego transportowanie między ośrodkami bez obawy o utratę jakości, jednak z doświadczenia laboratoryjnego wiemy, że najbardziej efektywne jest wykonanie oznaczenia zaraz po pobraniu materiału od pacjenta.

Analiza ctDNA wykonywana jest z wykorzystaniem najnowocześniejszych technologii biologii molekularnej: wysokoczułych testów opartych na PCR emulsyjnym (*ang. droplet digital PCR, ddPCR*) i sekwencjonowania następnej generacji (NGS). Z tego powodu jej zastosowanie jest bardzo ograniczone do zaledwie pojedynczych ośrodków w naszym kraju.

» **Techniki biologii molekularnej**

Dynamiczny rozwój biologii molekularnej umożliwił opracowanie wielu metod wykrywania zmian na poziomie DNA/ctDNA i RNA/ctRNA. Większość z nich wykorzystuje amplifikację metodą PCR wybranego fragmentu DNA/RNA. Dostępne metody, choć są powszechnie stosowane, różnią się zarówno pod względem podejścia technicznego, jak i poziomem czułości (zdefiniowanej jako minimalny odsetek zmutowanych komórek względem komórek bez mutacji jaki może zostać wykryty).

Wybór metody diagnostycznej jest uzależniony od jakości i ilości dostępnego materiału genetycznego. Należy podkreślić, że laboratorium musi dysponować przynajmniej dwiema alternatywnymi metodami wykrywania zmian genetycznych celem weryfikacji otrzymanych wyników w niezależnych procedurach badawczych. Niezależnie od technologii, niezbędna jest dokładna walidacja każdej stosowanej metody, która obejmuje:

- » określenie minimalnej ilości materiału niezbędnego do izolacji DNA/RNA/ctDNA,
- » określenie ilości, jakości i stężenia próbek DNA/RNA niezbędnych do celów analitycznych,
- » określenie wartości progowej dla rozróżniania wariantów zmutowanych od prawidłowych,
- » weryfikację czułości testu (np. przy użyciu serii rozcieńczeń),
- » zastosowanie metody referencyjnej w celu weryfikacji uzyskanych wyników,
- » weryfikację powtarzalności metody.

W przypadku badań dotyczących analizy zmian somatycznych pracownie powinny dysponować metodami umożliwiającymi wykrywanie co najmniej 5% DNA z mutacją w stosunku do DNA typu dzikiego, uwzględniać czułość metody (LOD – granica wykrywalności). Zawartość tkanki nowotworowej powinna być co najmniej dwukrotnie wyższa od czułości stosowanej metody.

Biorąc pod uwagę powyższe oraz w szczególności limitowaną ilość materiału do badań genetycznych, a także stale powiększającą się liczbę markerów molekularnych koniecznych do wykonania kompleksowej diagnostyki genetycznej w nowotworach płuca, laboratorium wykonujące takie badania musi dysponować metodami takimi jak: qPCR, FISH, sekwencjonowanie bezpośrednie metodą Sangera, sekwencjonowanie następnej generacji (NGS).

-
- » **Fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ* (ang. fluorescence *in situ* hybridization, FISH)** Powszechnie stosowaną techniką w diagnostyce nowotworów jest fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ* - FISH – umożliwia ona w sposób stosunkowo łatwy i szybki, przeprowadzenie oceny rearanżacji (np. fuzji genowych) oraz amplifikacji genów (analiza liczby kopii badanego genu). W metodzie wykorzystuje się sondy molekularne (unikalne sekwencje DNA) hybrydujące do konkretnych regionów na chromosomach. Metoda jest jeszcze dosyć popularna w wielu laboratoriach ze względu na dostępność sprzętu, odczynników oraz stosunkową łatwość wykonania, jednak z uwagi na jej wady metodyczne i aplikacyjne (m.in. wynikające z faktu, iż na jednym preparacie możliwe jest analizowanie tylko jednego typu rearanżacji, metoda nie pozwala o identyfikację partnera fuzyjnego oraz punktu złamania, ma również ograniczoną czułość i specyficzność), jest powoli wypierana przez nowoczesne techniki oparte o qPCR, a w szczególności przez sekwencjonowanie następnej generacji (NGS). Jednak w przypadku raka płuca jest jeszcze powszechnie stosowana do oceny rearanżacji genowych *ALK* i *ROS1* oraz amplifikacji genu *MET*.

 - » **qPCR** (modyfikacja metody PCR, tzw. ilościowy PCR w czasie rzeczywistym), metoda dedykowana do identyfikacji tylko znanych wariantów genetycznych, metoda szybka, charakteryzująca się wysoką czułością od 1% do 0,2%. Umożliwia identyfikacje zmian genetycznych na materiale ze skąpym utkaniem nowotworowym (około 5% utkania nowotworowego) i ctDNA. Testowanie wariantów genetycznych metodą qPCR odbywa się przeważnie za pomocą zestawów komercyjnych. Są to zestawy gotowych do użycia odczynników takich jak mieszaniny reakcyjne PCR z polimerazą, zestawy sond i starterów do konkretnych mutacji, a także kontrole dodatnie poszczególnych typów mutacji oraz kontrole endogenne umożliwiające wykrycie inhibitorów reakcji PCR. Niewątpliwą zaletą qPCR jest jednoetapowość reakcji i szybkość wykonania analizy. Stale opracowywane są nowe rozwiązania technologiczne umożliwiające szybkie, czułe i mniej pracochłonne wykrywanie mutacji somatycznych, pretendujące do stworzenia tzw. przyłóżkowej diagnostyki genetycznej. Takim rozwiązaniem jest w pełni zautomatyzowana platforma z certyfikatem CE IVD (Idylla, Biocartis). Urządzenie automatycznie izoluje DNA ze skrawków parafinowych, a następnie przeprowadza reakcje qPCR. Cały cykl trwa około 2–3 godzin. Pomimo automatyzacji wymagane jest jednak kwalifikowanie materiału przez patomorfologa przed analizą molekularną, a obróbce mogą być poddawane wyłącznie preparaty zawierające wysoki procent utkania nowotworowego i charakteryzujące się dobrą jakością materiału (właściwie utrwalone w bloczku parafinowym). Testy qPCR są powszechnie używane do diagnostyki zmian takich genach jak m.in. *EGFR*, *KRAS*, *BRAF*.

 - » **Sekwencjonowanie bezpośrednie metodą Sangera:** metoda stosowana do wykrywania zmian germinalnych i somatycznych – umożliwia badanie wybranych fragmentów DNA genów, w których są zlokalizowane poszukiwane warianty genetyczne; celowane badania wskazanych wariantów genetycznych; weryfikacja obecności wariantów genetycznych uzyskanych w metodach wielkoskalowych NGS. Sekwencjonowanie metodą Sangera umożliwia stosunkowo szybką i niedrogą analizę wybranego fragmentu DNA o długości od 100 do 1000 nukleotydów. Zaletą metody jest możliwość identyfikacji nie tylko znanych zmian (tj. substytucji nukleotydowych, insercji, delecji, zmian złożonych o długości od 1 do kilkuset nukleotydów), ale też nowych wariantów DNA. Zastosowanie tej metody w diagnostyce wariantów somatycznych jest ograniczone z uwagi na fakt, iż umożliwia ona wykrycie wariantu tylko wtedy, gdy występuje on w co najmniej 20% analizowanych cząsteczek DNA. Sekwencjonowanie metodą Sangera jest uznawane za „złoty standard” identyfikacji wariantów gene-
-

tycznych stąd stosowanie tej techniki jako metody alternatywnej identyfikacji zmian genetycznych jest zalecane jako tzw. dobra praktyka laboratoryjna. Nierzadko jest też jedynym sposobem zweryfikowania wyniku uzyskanego metodą NGS. Metoda ta znajduje również zastosowanie w precyzyjnym określeniu wariantów genetycznych znajdujących się np. w eksonie 20 genów *EGFR* i *HER2* na potrzeby diagnostyki raka płuca.

- » **Sekwencjonowanie następnej generacji (NGS):** technologia dedykowana do kompleksowej diagnostyki genetycznej umożliwiającej jednoczesną detekcję wielu markerów molekularnych oraz wielu klas zmian genetycznych (zmiany punktowe, małe delecje/insercje, duże delecje, amplifikacja, fuzje genowe) w tym tzw. sygnatur genomowych takich jak MSI (niestabilność mikrosatelitarna), TMB (ocena ładunku mutacyjnego guza), HRD (ocena deficytu rekombinacji homologicznej). W przypadku badań zmian germinalnych jak i somatycznych najczęściej zastosowanie ma tzw. panelowe (celowane) sekwencjonowanie następnej generacji polegające na ocenie wybranej puli genów. Do oceny materiału histopatologicznego zaleca się, aby utkanie nowotworowe badanych preparatów stanowiło nie mniej niż 20% materiału (w przypadku oceny statusu HRD nie mniej niż 30%). Zaleca się wykonywanie makro- lub mikrodysekcji w celu uzyskania jak najwyższego % utkania nowotworowego). Sekwencjonowanie następnej generacji jest obecnie coraz szerzej wykorzystywaną techniką w diagnostyce genetycznej. Analiza oparta na NGS jest procesem wieloetapowym. Część laboratoryjna składa się z izolacji kwasów nukleinowych DNA/RNA, przygotowania bibliotek (pofragmentowania DNA i wzbogacenia – czyli wyselekcjonowania fragmentów DNA zawierających interesujące nas regiony) oraz samego procesu sekwencjonowania – odczytu kolejnych nukleotydów na sekwenatorze genomowym. Uzyskane dane są następnie poddawane analizom bioinformatycznym (tzw. potok analizy danych). Technologicznie NGS różni się całkowicie od metody Sangera, a wydajność jest nieporównywalnie wyższa – możliwe jest sekwencjonowanie w tej samej reakcji nawet całego genomu. Zaawansowana diagnostyka niedrobnokomórkowego raka płuca (NDRP) jest jednym z lepszych przykładów możliwości zastosowania paneli genowych NGS do diagnostyki genetycznej. Na chwilę obecną jest to nowotwór wymagający oceny największej liczby markerów genetycznych w celu doboru właściwego leczenia. Standardem jest już ocena statusu genu *EGFR*, rearanżacji genów *ALK* i *ROS1*, a niebawem pula badań markerów zostanie rozszerzona do oceny statusu takich genów jak *BRAF*, *KRAS*, *HER2* oraz rearanżacji z udziałem genów *RET*, *NTRK1/2/3*, *MET*, *FGFR1/2/3*, *AKT* i innych. Biorąc pod uwagę liczbę badanych markerów, różne klasy mutacji do oceny (warianty genetyczne, fuzje genowe, warianty splicingowe zlokalizowane w intronach, amplifikacja), a także bardzo ograniczoną ilość materiału dostępną od pacjentów z NDRP, zastosowanie technologii NGS umożliwiającej ocenę wszystkich powyższych zmian w jednym badaniu staje się w tym przypadku nieoceniona.

Ważnym parametrem w kontekście NGS jest liczba odczytów (*inaczej pokrycie, ang. coverage*) danego nukleotydu. Parametr ten odnosi się do liczby odczytanych fragmentów DNA, w których pojawił się dany nukleotyd. Im większe pokrycie, tym większa czułość badania. W przypadku analiz wariantów germinalnych średnie pokrycie wynosi przeważnie kilkadziesiąt – kilkaset razy, natomiast w celu zidentyfikowania wariantów somatycznych (w tkance guza lub w ctDNA) – niezbędne jest uzyskanie znacznie wyższej liczby odczytów - sięgającej od 200 do 500 dla tkanki guza i nawet do 5000 dla ctDNA. Technologię NGS wykorzystuje się również do pomiaru metylacji oraz sekwencjonowania RNA i analizy transkryptomu, co obecnie pozostaje w zasa-

dzie domeną badań naukowych. Wyjątkiem jest analiza RNA na potrzeby detekcji fuzji genowych w diagnostyce onkologicznej, m.in. raka płuca i mięsaków. Technologia RNAseq staje się obecnie złotym standardem identyfikacji fuzji genowych na potrzeby kwalifikacji pacjentów do terapii ukierunkowanych molekularnie jak i różnicowania nowotworów.

- » **Inne techniki: ddPCR** (*ang. droplet digital PCR*) – jedna z najbardziej czułych technik biologii molekularnej znajdująca zastosowanie w badaniu wybranych wariantów genetycznych szczególnie na poziomie ctDNA.

Tabela 1. Zestawienie technik analizy DNA/RNA wykorzystywanych w diagnostyce nowotworów.

TEST	Granica wykrywalności*	Materiał badany	Zalety	Wady	ZASTOSOWANIE w diagnostyce nowotworów
qPCR	1–0,02%	DNA, ctDNA	łatwe do wykonania, niskie wymagania sprzętowe, stosunkowo niska cena, bardzo szybki czas oznaczenia (2-3 h).	umożliwia wykrywanie pojedynczych zmian.	Identyfikacja wariantów somatycznych: analiza genów np. <i>EGFR</i> , <i>BRAF</i> , <i>KRAS</i> .
ddPCR	1–0,001%	ctDNA, DNA, RNA	bardzo wysoka czułość, możliwość dokładnego określenia liczby kopii zmutowanych alleli (kopie/ml).	Wymagany jest specjalistyczny sprzęt, dość pracochłonne w zestawieniu z qPCR, umożliwia wykrywanie tylko pojedynczych zmian.	Identyfikacja wariantów somatycznych – przede wszystkim testy do identyfikacji wariantów opornościowych (np. p.The790Met w genie <i>EGFR</i>)
FISH	Wymaga nie mniej niż 100 komórek nowotworowych	DNA	Relatywnie tania, duża dostępność, powszechnie znana, możliwość oceny amplifikacji i fuzji genowych	Relatywnie niska czułość, subiektywna ocena, brak jasnych standardów oceny wyników	Ocena amplifikacji np. genu <i>MET</i> , czy genu <i>HER2</i> , ocena fuzji genowych m.in. <i>ALK</i> , <i>ROS1</i> , <i>RET</i> .
Sekwencjonowanie metodą Sangera	20%	DNA	Możliwość identyfikacji znanych i nowych wariantów genetycznych, powszechnie stosowana, relatywnie tania.	niska czułość, pracochłonna	Identyfikacja wariantów germinalnych: np. w genach <i>BRCA1/BRCA2</i> oraz somatycznych (wyłącznie w sytuacji, gdy wariant występuje w co najmniej 20% cząsteczek DNA w analizowanej próbce np. <i>EGFR</i> , <i>BRAF</i> , <i>KRAS</i>)
NGS	5–0,01%	DNA, ctDNA, RNA	wysoka czułość, możliwość identyfikacji wielu markerów i wielu zmian (znanych i nowych) w jednym doświadczeniu z jednej porcji materiału.	wymagają specjalistycznego i drogiego sprzętu, pracochłonne, wysoka cena za pojedyncze oznaczenie, w szczególności w przypadku analiz wymagających wysokiego pokrycia	Identyfikacja wariantów germinalnych i somatycznych, szerokie profilowanie genetyczne, identyfikacja fuzji genowych. Panele genowe wykorzystywane są w wielu typach nowotworów takich jak rak płuca, rak tarczycy, rak jajnika, rak piersi, mięsaki i inne.

* Granica wykrywalności (*ang. limit of detection, LOD*)

Perspektywy rozwoju diagnostyki genetycznej w raku płuca – Kompleksowe profilowanie genetyczne CGP (*ang. Comprehensive Genomic Profiling*)

Badania genetyczne stały się już nieodłączną częścią procesu diagnostyczno-terapeutycznego pacjenta onkologicznego. Liczba nowotworów, w których badania genetyczne odgrywają istotną rolę stale się zwiększa. W ślad za tym zwiększa się liczba terapii onkologicznych ukierunkowanych na określone cele molekularne. Coraz więcej z tych terapii ma charakter agnostyczny, czyli ukierunkowany nie na określony typ nowotworu tylko na dany typ zmiany genetycznej. Przykładem mogą tu być leki ukierunkowane na komórki nowotworowe z zaburzeniem (fuzją genową) genów z rodziny *NTRK*. Te rearanżacje są bardzo rzadkie, zwykle występują w nowotworach z częstością około 1%, ale w przypadku zidentyfikowania takiej zmiany u pacjenta onkologicznego terapia będzie bardzo efektywna. Stale powiększająca się liczba markerów genetycznych koniecznych do określenia w poszczególnych grupach pacjentów sprawia, że jeszcze dośyc powszechne w laboratoriach testy jednogenowe tracą rację bytu na korzyść technik wielkoskalowych takich jak sekwencjonowanie następnej generacji (NGS). Podyktowane jest to również dostępnością materiału tkankowego od pacjenta. Przy prostych testach genetycznych wykonanie każdej kolejnej analizy uwzględniającej następny marker genetyczny zwykle wymaga każdorazowego zużycia kolejnych porcji materiału tkankowego do analizy genetycznej (testowanie wieloetapowe), co w niektórych sytuacjach np. w raku płuca może doprowadzić do całkowitego wykorzystania materiału tkankowego pacjenta jeszcze przed zakończeniem wymaganego procesu diagnostycznego. Dlatego coraz więcej lekarzy decyduje się na zlecenie badań w technologii NGS. Wykorzystywane są również panele kilkunastogenowe dedykowane takim nowotworom jak rak płuca, tarczycy czy wybranym zespołom nowotworowym o charakterze dziedzicznym. Sfinansowanie, przez NFZ takich, niedużych paneli NGS jest możliwe w określonych sytuacjach i rozpoznaniach w tzw. lecznictwie szpitalnym jako zaawansowane badanie genetyczne o wartości 4 000 zł. Z drugiej jednak strony należy zwrócić uwagę, że badania NGS finansowane są na granicy opłacalności i wiele laboratoriów nie może pozwolić sobie na inwestycję w drogą aparaturę taką jak sekwenatory genomowe pozostając wciąż przy wykonywaniu testów genetycznych podstawowymi technikami biologii molekularnej. W przypadku badań genetycznych wykonywanych w technologii sekwencjonowania następnej generacji, poza drogim sprzętem i odczynnikami, niezbędny jest też doświadczony personel posiadający duże zdolności manualne w zakresie złożonych czynności laboratoryjnych wymaganych do obsługi sekwenatorów genomowych oraz wielu urządzeń peryferycznych wykorzystywanych w kolejnych etapach wykonywania badania NGS. Ponadto niezbędna jest duża wiedza z zakresu bioinformatyki pozwalająca na właściwe przetwarzanie dużych ilości danych genomowych uzyskiwanych w tego rodzaju badaniach wielkoskalowych oraz wiedza pozwalająca na właściwą interpretację i klasyfikację zidentyfikowanych wariantów genetycznych. Powyższe aspekty sprawiają, że dostęp do badań genetycznych NGS wciąż jest ograniczony.

Omawiając współczesne badania genetyczne należy wspomnieć o tzw. kompleksowym profilowaniu genetycznym (*CGP, ang. Comprehensive Genomic Profiling*). Jest to badanie wykonywane w technologii sekwencjonowania następnej generacji przeznaczone do kompleksowej diagnostyki genetycznej, pozwalające na przeprowadzenie jednoczesowej oceny wielu regionów genomu. NGS stanowi grupę technik zróżnicowaną pod względem czułości, specyficzności, rozmiaru analizowanych fragmentów oraz liczby sekwencjonowanych genów. Omawiane wcześniej, finansowane przez NFZ panele to tzw. małe panele genowe, w przypadku których zakres oceny jest zawężony do wybranych regionów genów, stanowiących przedmiot zainteresowania. Natomiast

technologii kompleksowego profilowania genomowego, umożliwiające jednoczesną analizę znacznie większej liczby genów pod względem każdego rodzaju aberracji to tzw. duże panele NGS - CGP (*ang. Comprehensive Genomic Profiling*). Badania kompleksowego profilowania genomowego, wykonywane metodą wysokoprzepustowego sekwencjonowania następnej generacji (NGS) to testy umożliwiające wykrywanie czterech głównych klas zmian genomowych, o znanym związku z rozwojem nowotworów złośliwych: substytucji, insercji i delecji i zmian liczby kopii genów, a także wybranych rearanżacji genowych i sygnatur genomowych w DNA lub DNA/RNA wyizolowanym z próbki guza, utrwalonej w parafinie i zatopionej w bloczku parafinowym lub w krążącym we krwi DNA pochodzenia nowotworowego (ctDNA). W tego typu badaniach zwykle analizie poddawane jest w zależności od producenta testu od 300 do 500 genów jednocześnie, analizowane są także sygnatury genomowe MSI, TMB i HRD. Dlatego wynik takiego szerokiego badania NGS jest nazywany kompleksowym profilowaniem genetycznym.

Należy zwrócić uwagę, że tego typu badania mają zasadność jedynie w określonych przypadkach klinicznych wybranych nowotworów. Wykonywanie ich w całej populacji chorych wymagających określonych badań genetycznych nie znajduje zastosowania i jest kosztowo nie uzasadnione.

Tabela 2. Zastosowanie sekwencjonowania następnej generacji (NGS) w raku płuca. W tabeli przedstawiono zakresy najczęściej wykonywanej analizy z wykorzystaniem NGS.

Typ nowotworu	Sekwencjonowanie NGS z wykorzystaniem małych paneli	Sekwencjonowanie NGS z wykorzystaniem paneli CGP	Uwagi
Nowotwory płuca	Ocena statusu genów <i>EGFR, ALK, ROS1</i> oraz <i>KRAS, BRAF, HER2, MET, RET, NTRK, FGFR, AKT, PIK3CA, STK11, KEAP1</i> .	Wskazane – w wybranych przypadkach. Konieczne w przypadku braku materiału tkankowego lub materiału niediagnostycznego – ocena na poziomie ctDNA	Ocena zmian somatycznych w celach diagnostyczno-leczniczych. Ocena 300 – 500 genów na poziomie DNA, w tym części z nich na poziomie RNA w celu poszukiwania fuzji genowych. Ocena sygnatur genomowych takich jak MSI, TMB i HRD.

Nowotworem, który bezwzględnie wymaga badania genetycznego z zakresu kompleksowego profilowania nowotworu jest niedrobnokomórkowy rak płuca (NDRP). Rak płuca to nowotwór, w którym jest dostępnych najwięcej terapii celowanych, a tym samym diagnostyka genetyczna jest najbardziej rozbudowana. Poza lekami dostępnymi w ramach programów lekowych istnieje duża grupa leków, która jest dostępna w ramach badań klinicznych. Ponadto poza koniecznością analizy podstawowych zmian genetycznych takich jak zmiany pojedynczych nukleotydów, czy analiza małych delecji insercji wymagane jest także ocenianie takich rearanżacji genetycznych jak fuzje genowe czy amplifikacje genów. W identyfikacji tego rodzaju zaburzeń genetycznych najlepiej sprawdzają się duże panele NGS – CGP ponieważ analizują one genom ze znacznie większą dokładnością i rozdzielczością niż małe panele NGS. Ponadto małe panele nie umożliwiają zwykle oceny wszystkich klas mutacji w jednym badaniu nawet w małej puli genów stąd zasadność zastosowania kompleksowego profilowania genetycznego. Szersza analiza genetyczna umożliwi również poznanie ewentualnych mechanizmów komórkowych, których działanie może wpływać na efektywność leczenia celowanego oraz immunoterapii, a także pozwoli zidentyfikować np. mechanizmy kardiotoksyczności.

W ramach kompleksowego profilowania genetycznego należy również wspomnieć o możliwości oceny profilu genetycznego na poziomie ctDNA. Ma to również kluczowe zastosowanie w nowotworach płuca w przypadkach gdy mamy do czynienia z materiałem niediagnostycznym lub sytuacją kiedy materiał tkankowy nie jest dostępny, a sytuacja kliniczna pacjenta wymaga wykonania profilowania genetycznego o możliwie najszerszym zakresie. Panele NGS wykonywane na ctDNA/ctRNA, zwykle o zakresie analizy mniejszym niż ma to miejsce w przypadku paneli wykonywanych na tkance, pozwalające ocenić kilka lub nawet kilkadziesiąt genów z uwzględnieniem analizy różnych klas zmian genetycznych, ze względu na koszty technologii dedykowanej do analizy płynnej biopsji również należy zaliczyć do grupy badań kompleksowego profilowania genetycznego. Koszt kilkudziesięciogenowego panelu wykonanego na ctDNA wyceniany jest w zależności od zakresu analizy od 6 000 do 12 000 zł.

Nowe świadczenie gwarantowane w postaci kompleksowego profilowania genetycznego wykonywane metodą NGS w raku płuca powinno spełniać następujące kryteria:

- » dopuszczenie obrotu (CE); jeżeli dotyczy;
- » co najmniej 300 genów w panelu w tkance nowotworowej; lub sygnatury genomowej HRD w tkance nowotworowej; lub paneli oceniających zmiany w co najmniej kilkunastu genach na poziomie pozakomórkowych kwasów nukleinowych (ctDNA);
- » wykrywanie najważniejszych klas zmian genomowych: substytucji, insercji i delecji, zmian liczby kopii genów i rearanżacji;
- » ocena wszystkich zmian molekularnych i sygnatur molekularnych, których oznaczenie jest wymagane jako warunek refundacji lub zastosowania (wg wskazań rejestracyjnych na terytorium Unii Europejskiej) wszystkich terapii ukierunkowanych molekularnie lub immunoterapii aktualnie objętych refundacją w Polsce lub zarejestrowanych w Unii Europejskiej u chorych z dowolnym nowotworem złośliwym;
- » możliwość oceny gęstości mutacji z próbki tkanki (*TMB, Tumor Mutational Burden*), stanowiącej ilościowy marker odpowiedzi na immunoterapię anty-PD-1/anty-PD-L1;
- » możliwość oceny niestabilności mikrosatelitarnej w tkance nowotworowej (*MSI, Microsatellite Instability*), stanowiącej ilościowy marker odpowiedzi na immunoterapię anty-PD-1/anty-PD-L1;
- » wyniki dostarczane w postaci raportu zawierającego wyszczególnienie zmian genomowych istotnych klinicznie (jednoznacznie odróżniony od wariantów o nieznanym znaczeniu) i sygnatur molekularnych;
- » wskazanie opcji terapii ukierunkowanych molekularnie (niezależnie od producenta) odpowiadających profilowi genomowym guza badanego pacjenta;
- » wskazanie terapii w fazie badań klinicznych, o ile badania są prowadzone

Natomiast kryteria dotyczące medycznych laboratoriów diagnostycznych wykonujących kompleksowe profilowanie genetyczne powinny być następujące:

1. Medyczne laboratorium diagnostyczne wpisane do ewidencji Krajowej Rady Diagnostów Laboratoryjnych
2. Wyposażenie w sprzęt i aparaturę medyczną:
 - » aparatura dedykowana do badań CGP NGS - sprzęt laboratoryjny umożliwiający wykonywanie badań genetycznych na materiale tkankowym w postaci bocz-

ków parafinowych, cytologii, krwi obwodowej oraz pozakomórkowych kwasów nukleinowych (badania z płynnej biopsji).

- » wysokoprzepustowy sekwenator genomowy NGS
 - » CGP tkanka: sekwenator zapewniający uzyskanie podczas jednej reakcji, nie mniej niż 130 milionów odczytów,
 - » CGP ctDNA: zapewniające uzyskanie podczas jednej reakcji, nie mniej niż 1,2 miliarda odczytów
- » Sekwenator kapilarny umożliwiający odczyt sekwencjonowania Sangera
- » niezbędny sprzęt peryferyjny w tym: termocyklery real-time, termocyklery klasyczne, komory laminarne, wirówki, pipety automatyczne, fluorymetry/spektrofotometri i inne.

3. Kryteria jakościowe

- » Medyczne laboratorium diagnostyczne z udokumentowanym co najmniej 3-letnim doświadczeniem pracy w zakresie badań NGS w onkologii, posiadające krajowe i międzynarodowe certyfikaty jakości badań genetycznych we wskazanych typach nowotworów:
 - » Certyfikat Polskiego Towarzystwa Genetyki Człowieka (PTGC) w zakresie stosowania technologii NGS w badaniu zmian somatycznych
 - » Certyfikat Polskiego Towarzystwa Genetyki Człowieka (PTGC) w zakresie stosowania technologii NGS w badaniu zmian germinalnych
 - » Certyfikat międzynarodowej kontroli jakości zakresie badania techniką NGS w zakresie wykrywania zmian somatycznych i germinalnych.

4. Personel:

- » kierownik medycznego laboratorium diagnostycznego wykonującego badania z zakresu genetyki ze specjalizacją z laboratoryjnej genetyki medycznej, z co najmniej 5-letnim doświadczeniem z zakresu onkogenetyki
- » diagnosta laboratoryjny ze specjalizacją w dziedzinie laboratoryjnej genetyki medycznej lub w trakcie specjalizacji, co najmniej dwóch diagnostów laboratoryjnych, i/lub biologów/biotechnologów. Wszyscy pracownicy posiadają udokumentowane (minimum 5-letnie) doświadczenie pracy z materiałem tkankowym w postaci bloczków parafinowych, cytologii, krwi obwodowej oraz pozakomórkowych kwasów nukleinowych (badania z płynnej biopsji)
- » udokumentowana współpraca laboratorium z lekarzem patomorfologiem (zatrudniony w jednostce lub umowa)
- » udokumentowana współpraca laboratorium z poradnią genetyczną dla zmian germinalnych (zatrudniony w jednostce lub umowa)

5. Wskazania do wykonania badania:

- » Pacjenci z rozpoznaniem:
 - » raka płuca (ICD-10 C 34);
 - » Pozostałe wymagania:
 - » Czas dostarczenia wyniku badania do 21 dni roboczych.
-

Propozycja kodów ICD9 dla **Kompleksowe profilowanie genetyczne – CGP**

Polska Koalicja Medycyny Personalizowanej zainicjowała prace nad wprowadzeniem do klasyfikacji ICD9 kodów badań genetycznych w kategorii AA – Badania Laboratoryjne i inne z kodem: Z – Badania genetyczne.

Tabela 3.

AA	badania laboratoryjne i inne	Z	Badania genetyczne	Z07	Badanie molekularne – Technika specjalna biologii molekularnej	Z07.1	Sekwencjonowanie NGS dla paneli genowych – panel oceniający sekwencje kodujące lub wybrane fragmenty genów w 300 i więcej genach (zmiany somatyczne i germinalne oceniane w tkance) Kompleksowe profilowanie genetyczne – CGP (ang. <i>Comprehensive Genome Profiling</i>)
AA	badania laboratoryjne i inne	Z	Badania genetyczne	Z07	Badanie molekularne – Technika specjalna biologii molekularnej	Z07.4	Sekwencjonowanie NGS dla paneli genowych – panel oceniający sekwencje kodujące lub wybrane fragmenty genów w 300 i więcej genach (zmiany oceniane w pozakomórkowych kwasach nukleinowych – płynna biopsja). Kompleksowe profilowanie genetyczne – CGP (ang. <i>Comprehensive Genome Profiling</i>)

Barriere techniczne i systemowe uniemożliwiające wprowadzenie powszechnego dostępu do zaawansowanej diagnostyki genetycznej.

- » Dotychczasowe zapisy regulujące zastosowanie i finansowanie badań genetycznych skonstruowano w oparciu o klasyczne metody biologii molekularnej i małe panele genowe NGS. Nie uwzględniają one możliwości wykorzystania i finansowania wyżej wymienionej technologii CGP do zaawansowanych diagnostycznych badań genetycznych rozliczanych w umowie lecznictwo szpitalne kompleksowej diagnostyki genetycznej w chorobach nowotworowych.
- » Wciąż mamy do czynienia ze znacznym odsetkiem preparatów w postaci bloczków parafinowych, których niska jakość, spowodowana zaniedbaniami w procesach utrwalania materiału tkankowego, uniemożliwi wykonanie tak zaawansowanego badania genetycznego jak kompleksowe profilowanie genetyczne wymagającego analizy rozległych regionów genomu. Odsetek badań niediagnostycznych dla tej zaawansowanej technologii sięga 20% wykonanych analiz.
- » Dużą barierą w rozwoju zaawansowanej diagnostyki genetycznej jest również brak możliwości korzystnego finansowania badań genetycznych zlecanych z poziomu ambulatorium. W ramach ambulatorium maksymalny koszt rozliczeniowy procedury genetycznej to 530 punktów co przekłada się na kwotę, w zależności od wyceny punktowej na 600 – 800 zł. Taka kwota nie umożliwia wykonywania nawet małych paneli NGS, przykładowo paneli, dedykowanych do oceny statusu genów niezbędnych do kwalifikacji pacjentów z rakiem płuca do licznych terapii celowanych. Jest to szczególnie ważne kiedy nie mamy dostępu do materiału tkankowego lub materiał tkankowy nie nadaje się do analizy, gdzie należy wykonać ocenę z materiału świeżego jakim jest krew obwodowa z której izoluje się ctDNA. Podobna sytuacja dotyczy rozliczania badań genetycznych ze świeżych materiałów biopsyjnych, których pobranie nie wymaga hospitalizacji. Ta sytuacja jest również problematyczna nie tylko dla diagnostyki guzów litych, ale również nowotworów hematologicznych.

Bibliografia

1. Tysarowski A., Szumera-Ciećkiewicz A., Marszałek A., Kowalik A., Seliga K., Bidziński M., Senkus-Konefka E., Wyrwicz L., Mądry R., Płużański A., Sakowicz M., Krzakowski M., Rutkowski P., Kubiawski T.: Molecular diagnostics of cancers – practical approach, *Nowotwory Journal of Oncology*, vol. 73, nr 3, 2023, s. 174-186, DOI:10.5603/NJO.2023.00282.
 2. Sąsiadek M, Łaczmajska I, Maciejczyk A, et al. Fundamentals of personalised medicine in genetic testing-based oncology. *Nowotwory. Journal of Oncology*. 2020; 70(4): 144–149.
 3. Viana RV, Wallis CL. Good Clinical Laboratory Practice (GCLP) for Molecular Based Tests Used in Diagnostic Laboratories. *Wide Spectra of Quality Control*. 2011, doi: 10.5772/23963.
 4. Pieńkowska-Grela B, Chorostowska-Wynimko J, Cybulski C, et al. Wytyczne dla laboratoriów genetyki nowotworów litych. *Biuletyn PTO NOWOTWORY*. 2016; 1(2): 184–189.
 5. Richards S, Aziz N, Bale S, et al. ACMG Laboratory Quality Assurance Committee. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med*. 2015; 17(5): 405–424, doi: 10.1038/gim.2015.30, indexed in Pubmed: 25741868.
 6. Walewski J, Dziurda D, Bidziński M, et al. Consensus on methods of development of clinical practice guidelines in oncology under the auspices of Maria Skłodowska-Curie National Research Institute of Oncology and the Agency for Health Technology Assessment and Tariff System. *Nowotwory. Journal of Oncology*. 2022; 72(1): 44–50, doi: 10.5603/njo.2022.0005.
 7. Wpływ zmiany finansowania diagnostycznych badań genetycznych na dostępność do terapii innowacyjnych; J.Chorostowska-Wynimko, J.A. Didkowska, B.Jagielska, M.Sakowicz, I.Skrzekowska-Baran, A.Tysarowski, Raport dostępny pod linkiem: medycynapersonalizowana.com
 8. Praktyczne aspekty zarządzania przychodami z NFZ i ich wpływ na kondycję finansową podmiotu leczniczego, Beata Jagielska, Joanna Chorostowska-Wynimko, Magdalena Sakowicz, Adam Twarowski, Andrzej Tysarowski
 9. Zarządzenie nr 167/2019/DSOZ Prezesa NFZ z dnia 29 listopada 2019 r. w sprawie określenia warunków zawierania i realizacji umów w rodzaju świadczenia zdrowotne kontraktowane odrębnie /tekst jednolity/
 10. Zarządzenie Nr 37/2024/DSOZ Prezesa Narodowego Funduszu Zdrowia z dnia 29 marca 2024 r. w sprawie określenia warunków zawierania i realizacji umów w rodzaju leczenie szpitalne oraz leczenie szpitalne - świadczenia wysokospecjalistyczne, ze zmianami.
-

-
11. Adam Płużański, Andrzej Tysarowski, Maciej Kawecki, Jakub Kucharz, Kinga Wi-niarczyk, Maciej Krzakowski. Zastosowanie sekwencjonowania następnej generacji w codziennej praktyce klinicznej *Onkol Prakt Klin Edu* 2023;9(6):418-426.
 12. Monika Dudzisz-Sledz, Andrzej Tysarowski. Podejście tumor-agnostyczne w leczeniu nowotworów dzięki szerokiej analizie genomów nowotworowych. Ahead of print Artykuł przeglądowny via MEDICA Opublikowany online: 2024-01-08
 13. Tysarowski A., Nasierowska-Guttmejer A.: Quality and practical aspects of pathological and molecular diagnostics in metastatic colorectal cancer (mCRC), *Współczesna Onkologia*, vol. 2, nr 22, 2018, s. 75-85, DOI:10.5114/wo.2018.77047.
 14. Rutkowski P., Prochorec-Sobieszek M., Wągorodzki M., Seliga K., Krzakowski M., Czarna-necka A., Świtaj T., Kawecki A., Raciborska A., Tysarowski A.: Diagnostyka z wykorzystaniem sekwencjonowania następnej generacji (NGS) w mięsakach — rekomendacje, *Onkologia w Praktyce Klinicznej - Edukacja*, vol. 6, nr 1, 2020, s. 1-9.
 15. Krzakowski M., Jassem J., Antczak A., Blasinska-Przerwa K., Chorostowska- Wynimko J., Dziadziuszko R., Głogowski M., Grodzki T., Kowalski D., Krenke R., Langfort R., Olszewski W., Orłowski T., Śliwiński P., Tysarowski A., Rzyman W., Woźniewski M.: Nowotwory klatki piersiowej, *Onkologia w Praktyce Klinicznej - Edukacja*, vol. 8, nr 1, 2022, s. 1-41.
-

8.

Płynna biopsja w diagnostyce molekularnej niedrobnokomórkowego raka płuca – aktualne możliwości i perspektywy na przyszłość

dr hab. n. med. Adam Szpechciński

prof. dr hab. n. med. Joanna Chorostowska-Wynimko

Wprowadzenie

Rak płuca pozostaje jednym z najczęstszych (obok raka piersi i gruczołu krokowego) nowotworów złośliwych w Polsce i na świecie oraz przyczyną największej liczby zgonów nowotworowych [1,2]. Głównym typem histologicznym raka płuca, dotyczącym około 85% wszystkich przypadków, jest niedrobnokomórkowy rak płuca (NDRP), który z kolei obejmuje podtyp gruczołowy (około 40% przypadków), płaskonabłonkowy (około 30%), wielkokomórkowy (około 10%) i inne postaci morfologiczne (około 5%) [3]. W ostatnich dekadach dokonał się znaczący postęp w dziedzinie badań molekularnych nad mechanizmami kancerogenezy w raku płuca, który doprowadził do lepszego zrozumienia różnic pomiędzy typami i podtypami tego nowotworu na poziomie genetycznym i opracowania nowych, personalizowanych form leczenia.

Medycyna personalizowana (*ang. personalised medicine lub precision medicine*) w raku płuca oparta jest na zintegrowanym podejściu klinicznym do chorego, łączącym precyzyjne diagnozowanie choroby na poziomie molekularnym i terapię z użyciem selektywnych leków, działających specyficznie na komórki nowotworowe prezentujące wspólny, charakterystyczny profil genetyczny, w którym dominuje onkogen, najczęściej błonowy receptor czynnika wzrostu, aktywujący szlaki sygnałowe, stymulujące (kierujące) transformację nowotworową (*ang. oncogenic driver*) [4]. Onkogen pełni zazwyczaj rolę biomarkera predykcyjnego, pozwalając zidentyfikować specyficzny profil molekularny guza oraz określić prawdopodobieństwo uzyskania odpowiedzi w przypadku zastosowania swoistej metody leczenia. Diagnostyka molekularna pozostaje tutaj nierozłącznym partnerem onkologii klinicznej jako kluczowy etap algorytmu postępowania z chorym (tzw. diagnostyka towarzysząca, *ang. companion diagnostics*), niezbędny do podjęcia decyzji o wyborze optymalnej, „spersonalizowanej” strategii leczenia [5].

Niedrobnokomórkowy rak płuca jest trudnym celem diagnostycznym zarówno ze względu na znaczące zróżnicowanie klonów komórek nowotworowych w samym guzie (heterogenność nowotworu), jak i utrudniony dostęp do dobrego jakościowo, informatywnego materiału diagnostycznego u chorych na zaawansowane postaci choroby. Złotym standardem w diagnostyce molekularnej NDRP nadal pozostaje badanie tkanki nowotworowej. Wykorzystywane są tu przede wszystkim materiały utrwalone w formalinie i zatopione w parafinie (*ang. formalin-fixed paraffin-embedded tissue, FFPE*) oraz różnego typu materiały cytologiczne, zwłaszcza utrwalone w postaci cytobloku, pochodzące z biopsji cienko- i gruboigłowych (przezoskrzelowe, przez ścianę klatki piersiowej), wymazy szczoteczkowe z oskrzela, osady komórek z płynu z opłucnej, popłuczyn oskrzelowo-pęcherzykowych czy płynu osierdziowego.

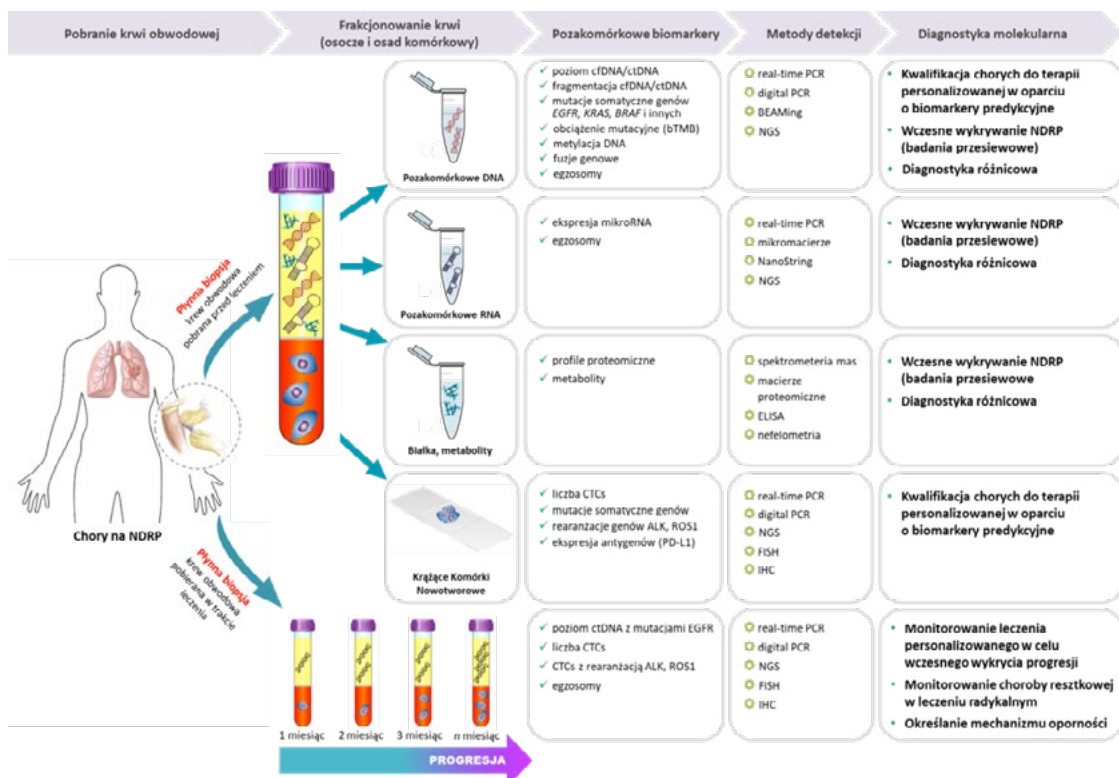
Diagnostyka NDRP wykorzystująca materiał tkankowy jest jednak obarczona szeregiem ograniczeń, które w istotny sposób wpływają na skuteczność stosowanych metod molekularnych. W wielu sytuacjach uzyskanie wycinków metodą biopsji jest inwazyjnym zabiegiem, który wiąże się z ryzykiem powikłań, a pobrany materiał zwykle reprezentuje tylko jedno umiejscowienie nowotworu, co nie pozwala ocenić statusu zaburzeń genetycznych w odległych przerzutach. Ponadto heterogenność komórkowa i molekularna tkanki nowotworowej znacząco obniża czułość badania molekularnego. W dobie rozwoju terapii spersonalizowanej konieczna jest nie tylko wiarygodna analiza zaburzeń genetycznych o znaczeniu predykcyjnym w pierwotnym materiale nowotworowym, uzyskanym od chorego przed wdrożeniem leczenia, ale również monitorowanie statusu szeregu zmian molekularnych warunkujących oporność na leczenie celowane. W praktyce klinicznej wykonanie powtórnej biopsji choremu z progresją choroby

celem pogłębionej analizy molekularnej jest rzadko stosowane. Obecnie prowadzone są badania nad oceną przydatności klinicznej różnego typu materiałów biologicznych innych niż tkanka guza, pozyskiwanych zabiegami o minimalnym stopniu inwazyjności, które mogłyby stanowić dodatkowe źródło nowotworowego materiału genetycznego na potrzeby diagnostyki molekularnej.

Biopsja płynna i pozakomórkowy materiał genetyczny nowotworu

W ostatnich latach duże zainteresowanie i nadzieje onkologów budzi tzw. płynna biopsja (*ang. liquid biopsy*), czyli metoda diagnostyczna, w której nowotworowy materiał genetyczny do badań molekularnych pozyskuje się z krwi obwodowej lub innego płynu z ciała chorego. W krwiobiegu każdego człowieka, niezależnie od stanu zdrowia, obecna jest frakcja wolnych, tj. występujących poza komórką, kwasów nukleinowych DNA i RNA (*ang. cell-free DNA/RNA, cfDNA/RNA*). U chorych na różne typy nowotworów, część frakcji cfDNA/RNA stanowi materiał genetyczny uwolniony bezpośrednio z komórek guza (*ang. circulating tumor DNA/RNA, ctDNA/RNA*) oraz krążących komórek nowotworowych (*ang. circulating tumor cells, CTCs*) [6,7]. Odkrycie zjawiska pozakomórkowych kwasów nukleinowych we krwi otworzyło perspektywę wykorzystania krwi (i innych płynów ciała) jako surogatowego (zastępczego) materiału biologicznego do analizy genetycznej wariantów somatycznych, w szczególności w diagnostyce molekularnej chorób nowotworowych, gdzie dotychczas jedynym źródłem DNA/RNA do badania była tkanka guza. Największe zalety takiego podejścia diagnostycznego to niska inwazyjność zabiegu pozyskania materiału oraz możliwość wykonania badania molekularnego na każdym etapie postępowania klinicznego z chorym, tj. zarówno przed, jak i w trakcie leczenia, niezależnie od dostępności tkanki guza (rycina 1).

Rycina 1. Możliwości wykorzystania krwi obwodowej jako płynnej biopsji w personalizowanej terapii niedrobnokomórkowego raka płuca (NDRP).



Krew obwodowa pobrana od chorego na zaawansowane postaci NDRP przed leczeniem mogłaby służyć do diagnostyki mutacji somatycznych (m.in. *EGFR*) i rearanżacji genowych (m.in. *ALK*, *ROS1*) pod kątem kwalifikacji do leczenia inhibitorami kinazy tyrozynowej lub do oceny ekspresji PD-L1 i wskaźnika obciążenia mutacyjnego (TMB) jako markerów predykcyjnych w immunoterapii, o ile pozyskanie i analiza molekularna tkanki nowotworowej nie byłaby możliwa. Płynna biopsja może być również wykorzystana do określania molekularnego mechanizmu oporności (np. wykrywania mutacji *EGFR* p.T790M u chorych z progresją po leczeniu inhibitorami kinazy tyrozynowej *EGFR*) pod kątem kwalifikacji chorego do kolejnej linii leczenia i/lub wczesnego wykrywania progresji choroby na poziomie molekularnym. Dodatkowo, osocze krwi jest źródłem białek i metabolitów do analiz multiomicznych, które mogą skutecznie konwencjonalne metody obrazowe stosowane w badaniach przesiewowych i diagnostyce różnicowej guzków.

Mechanizmy uwalniania kwasów nukleinowych do światła naczyń krwionośnych przez komórki guza są przedmiotem wielu badań. Główne procesy odpowiedzialne za uwalnianie materiału genetycznego do krwiobiegu to śmierć komórek na skutek apoptozy i martwicy, mechaniczne uszkodzenie tkanek na skutek intensywnego wzrostu guza oraz bardziej złożone procesy aktywnego uwalniania DNA i RNA przez komórki [8]. Efektem zachodzenia tych procesów jest pojawienie się we krwi chorego mieszaniny pozakomórkowych kwasów nukleinowych, pochodzących zarówno z komórek nowotworowych, jak i prawidłowych w zmiennych proporcjach, które zależą od indywidualnej charakterystyki i przebiegu choroby. Liczne badania wskazują, że nowotworowa frakcja pozakomórkowego DNA (ctDNA) zwykle stanowi od około 0,1% do ponad 10% całkowitej krążącej puli DNA, co implikuje konieczność stosowania metod analitycznych o bardzo wysokiej czułości detekcji [9]. Pośród czynników regulujących poziom ctDNA we krwi osób z chorobą nowotworową wskazuje się m.in. stadium choroby (proces zaawansowany miejscowo versus zmiany rozsiane), całkowitą masę nowotworu w organizmie chorego, stopień unaczynienia guza, wskaźnik mitotyczny i apoptotyczny komórek nowotworowych, inwazyjny potencjał nowotworu. Krążące komórki nowotworowe, czyli komórki guza, które nabyły inwazyjny potencjał w procesie przejścia epitelialno-mezenchymalnego (EMT), oddzieliły się od głównej masy nowotworu i wniknęły do światła naczynia krwionośnego również mogą stanowić jedno ze źródeł ctDNA, bowiem większość CTCs rozpada się na skutek mechanicznego stresu powodowanego ciśnieniem i przepływem krwi. Warto podkreślić, że ctDNA uwalnianie jest z różną intensywnością przez komórki nowotworowe w całym okresie przebiegu choroby nowotworowej, począwszy od wczesnych, przedinwazyjnych postaci raka. Ponadto, krew obwodowa niesie ctDNA pochodzące z różnych lokalizacji ognisk nowotworowych (z guza pierwotnego, z odległych przerzutów, z krążących we krwi mikroprzerzutów) oraz różnych populacji komórek rakowych obecnych w organizmie chorego.

Jednocześnie z procesami uwalniania kwasów nukleinowych do krwiobiegu stale funkcjonują mechanizmy ich eliminacji z krwi, wśród których ważną rolę przypisuje się aktywności enzymów nukleolitycznych osocza. Z tego powodu, frakcja cfRNA reprezentowana jest głównie przez krótkie (21-23 nukleotydy), jednoniciowe cząsteczki miRNA (mikroRNA) z powodu ich większej odporności na degradację nukleolityczną niż transkrypty matrycowego RNA (mRNA) czy długi, niekodujący RNA (lncRNA). U chorych na raka płuca, oprócz krwi obwodowej (osocze, surowica), pozakomórkowe kwasy nukleinowe wykrywa się również w innych płynach ciała, m.in. płynie mózgowo-rdzeniowym, ślinie, płynie opłucnowym i moczu, przy czym najlepiej rozwinięta jest obecnie metoda badania cfDNA we krwi.

Pozakomórkowe kwasy nukleinowe występują we krwi i innych płynach ciała w postaci różnych struktur biologicznych i form biochemicznych, których rodzaj i ilościowy udział w ogólnej frakcji cfDNA/RNA zależy w dużym stopniu od określonego mechanizmu uwalniania. Wśród dotychczas opisanych struktur i form cfDNA wyróżnia się m.in. nukleosomalny DNA (fragmenty odpowiadające długością mono-, di-, tri-, polinukleosomom, powstające najczęściej w wyniku apoptotycznego cięcia chromatyny), DNA o dużej masie cząsteczkowej (fragmenty długości >10 000 par zasad generowane głównie podczas nekrotycznej degradacji chromatyny jądrowej), pozachromosomalny kolisty DNA (*ang. extrachromosomal circular DNA, eccDNA*), kompleksy DNA-białko, DNA związane z pęcherzykami zewnątrzkomórkowymi (*ang. extracellular vesicles, EVs*), mitochondrialny DNA, zewnątrzkomórkowe sieci neutrofilowe (*ang. neutrophil extracellular traps, NETs*), fragmenty jednoniciowego DNA [10]. Pakowanie pozakomórkowego mRNA do wnętrza egzosomów, sferycznych pęcherzyków błonowych, wydzielanych przez większość komórek eukariotycznych, zwiększa jego stabilność we krwi, umożliwiając detekcję i analizę transkryptów na poziomie wybranych genów (metody RT-qPCR, ddPCR) lub całego transkryptomu (techniki NGS, RNA-Seq). Uważa się, że różne struktury i formy pozakomórkowych kwasów nukleinowych prezentują potencjalną przydatność diagnostyczną jako biomarkery m.in. toczącego się procesu nowotworowego, stanu zapalnego lub infekcji (bakteryjnej, wirusowej, pasożytniczej); na całym świecie prowadzone są badania w tym zakresie.

Aspekty fazy przedanalizycznej w badaniu płynnej biopsji

W celu wykonania badania molekularnego materiału genetycznego z płynnej biopsji, krew obwodową zwykle pobiera się od pacjenta w konwencjonalny sposób, poprzez wkłucie igły w żyłę w zgięciu łokciowym, choć można też wykorzystać wcześniej założony wenflon. Wskazane jest pobieranie krwi na czczo, przy wyrównanym ciśnieniu (nie bezpośrednio po wysiłku) przez wyszkolony personel szpitalny lub ambulatoryjny. Płynną biopsję pobiera się do próbek hematologicznych zawierających K3-EDTA jako antykoagulant i/lub inne środki konserwujące i stabilizujące, które zapobiegają kontaminacji pozakomórkowej frakcji DNA/RNA materiałem genetycznym z jądrzystych komórek krwi i zapewniają skuteczną inhibicję enzymów nukleolitycznych. Od pewnego czasu dostępne są komercyjnie specjalne próbki hematologiczne, przeznaczone wyłącznie do pobierania krwi w celu analizy pozakomórkowych kwasów nukleinowych (odpowiednio, próbki przeznaczone do analizy cfDNA, cfRNA i CTCs) w ramach badań naukowych (symbol *Research Use Only, RUO*) lub diagnostyki (symbol *In Vitro Diagnostics, IVD*). O ile tradycyjne próbki hematologiczne, zawierające K3-EDTA zabezpieczają cfDNA przez okres co najmniej kilku-kilkunastu godzin w warunkach chłodzenia (temperatura 4-8°C), to specjalne próbki do płynnej biopsji skutecznie chronią pozakomórkowy materiał genetyczny nawet przez okres kilku dni w temperaturze pokojowej (zależnie od specyfikacji producenta), dzięki czemu można je stosować do długotrwałego transportu krwi, np. pomiędzy odległymi ośrodkami klinicznymi i centralnym laboratorium diagnostycznym [11].

Przedanalizyczna obróbka krwi powinna zapewnić przede wszystkim szybką i bezpieczną separację osocza od frakcji komórkowej, aby nie dopuścić do kontaminacji cfDNA/RNA materiałem genetycznym pochodzącym z rozpadu komórek jądrzystych, co znacząco obniżyłoby skuteczność badania molekularnego. Z tego powodu nie zaleca się wykorzystywania surowicy krwi do badania ctDNA/RNA i CTCs, ponieważ w procesie

krzepnięcia krwi w próbówce komórki jądrzaste podlegają mechanicznemu zgnieceniu przez tworzący się skrzep.

Separowane osocze, bez oznak hemolizy, wolne od komórek krwi można natychmiast wykorzystać do izolacji pozakomórkowych kwasów nukleinowych, cfDNA i cfRNA lub przechowywać w temperaturze -80°C przez okres co najmniej kilkunastu miesięcy do późniejszych analiz. Z frakcji komórkowej można natomiast izolować nienaruszone krążące komórki nowotworowe. Dostępne są komercyjne zestawy odczynnikowe, przeznaczone wyłącznie do izolacji cfDNA, cfRNA lub CTCs z krwi, zarówno do celów naukowych, jak i diagnostycznych (symbol IVD). Na rynku produktów biotechnologicznych sukcesywnie przybywa rozwiązań dedykowanych do pobierania i stabilizacji próbek śliny i moczu oraz ekstrakcji zawartych w nich pozakomórkowych kwasów nukleinowych. Ponadto, dostępne są procedury i zestawy materiałowo-odczynnikowe do wzbogacania badanych próbek płynnej biopsji w interesujące nas frakcje cfDNA/RNA, w szczególności egzosomy.

W przypadku badania CTCs, kluczowym etapem, warunkującym skuteczność ich analiz ilościowych i jakościowych, jest wydajna izolacja tych komórek z krwi obwodowej, która stanowi duże wyzwanie z uwagi na drastycznie niski udział odsetkowy CTCs w populacji komórek jądrzastych krwi (zwykle 1-100 CTCs w 7,5 ml krwi). Dostępne techniki izolacji CTCs oparto na ich właściwościach fizycznych (wielkość, ciężar) i/lub, w większości przypadków, na ich właściwościach antygenowych. Komórki nowotworowe pochodzenia nabłonkowego wykazują obecność charakterystycznych antygenów, takich jak nabłonkowe cząsteczki adhezji komórkowej (*ang. Epithelial Cell Adhesion Molecule, EpCAM*), czy cytokeratyny (np. CK9, CK18, CK19) [12].

Metody badania pozakomórkowych kwasów nukleinowych

Skuteczna analiza molekularna pozakomórkowego nowotworowego DNA, szczególnie do celów diagnostycznych, wymaga skorzystania ze specjalnych protokołów analitycznych i metod, gwarantujących odpowiednio wysoką czułość detekcji specyficznych względem nowotworu zmian genetycznych pośród przeważającej frakcji „natywnego” DNA pochodzącego z komórek prawidłowych. Większość podstawowych, jednogennych testów diagnostycznych przeznaczonych do analizy onkogennych mutacji w ctDNA oparta jest na tej samej technice, co konwencjonalne testy do badania materiału genetycznego z preparatów tkanki nowotworowej, tj. ilościowym PCR w czasie rzeczywistym (*real-time PCR*, qPCR). Jednak ich unikalna konstrukcja (rodzaj i dobór sond molekularnych, polimeraza DNA, inhibitory hamujące amplifikację allelu natywnego) często pozwala na detekcję z czułością nawet poniżej 1% allelu zmutowanego w tle natywnego DNA, zależnie od typu wykrywanej zmiany molekularnej.

Techniki złożonej analizy wielogenowej, takie jak sekwencjonowanie nowej generacji (*ang. next-generation sequencing, NGS*), umożliwiają skuteczną analizę pozakomórkowego DNA z krwi chorych na raka płuca pod kątem szeregu zaburzeń genetycznych o potwierdzonym bądź potencjalnym znaczeniu klinicznym. Dostępne są komercyjne zestawy odczynnikowe o podwyższonej czułości detekcji (poniżej 1% zmutowanego allelu) przeznaczone do analizy ctDNA na konkretnych platformach NGS. Przewagą NGS nad testami opartymi na metodzie qPCR jest możliwość identyfikowania nie tylko wybranych, lecz wszystkich zmian w obrębie genu, w tym szczególnie rzadkich mutacji,

które nie są wykrywane technikami podstawowymi. Badania ostatnich lat wykazały bardzo wysoką zgodność (60–95%) profilów zaburzeń genetycznych oznaczanych metodą NGS w preparatach tkanki nowotworowej i próbach krwi od tych samych chorych.

Istnieją także techniki ultraczułe, BEAMing (*ang. beads, emulsion, amplification and magnetics*) i ddPCR (*ang. droplet digital PCR*), które umożliwiają efektywną analizę cfDNA w kontekście jakościowym (detekcja określonych mutacji) oraz ilościowym (pomiar liczby kopii zmutowanego DNA) z czułością poniżej 0,01% zmutowanego allelu. Niestety brak dobrego zaplecza komercyjnego w postaci zwalidowanych testów IVD lub bardzo skomplikowane protokoły analityczne nadal nie pozwalają na powszechne stosowanie tych technik w laboratoriach diagnostycznych [13].

Podstawowym parametrem określającym przydatność materiału tkankowego do analizy molekularnej jest utkanie nowotworowe oznaczające odsetek komórek nowotworowych w całkowitej puli komórek jądrzastych w badanej próbce. Dla technik NGS, zalecana wartość utkania nowotworowego nie powinna być niższa niż 10%, zakładając średnią liczbę 300-500 odczytów dla każdego badanego regionu genu. W przypadku materiału cytologicznego podstawowym parametrem jakościowym jest całkowita liczba komórek jądrzastych w materiale oraz liczba i odsetkowa zawartość komórek nowotworowych. W płynnej biopsji, na etapie przygotowywania materiału do analizy molekularnej brak jest możliwości oceny procentowej zawartości ctDNA w całkowitej puli cfDNA w objętości krwi. Taką informację uzyskuje się dopiero na etapie analizy bioinformatycznej danych surowych (wartości C_q w metodzie qPCR, liczba kopii genu w metodzie ddPCR, liczba odczytów danego fragmentu DNA w metodzie NGS). Praktyka laboratoryjna oraz dostępne dane piśmiennicze wskazują, że aby wykryć zmutowany wariant na poziomie VAF=0,1% (10 kopii zmutowanego DNA) potrzeba co najmniej 10 000 cząsteczek DNA genu, co przekłada się na ilość ~33 ng cfDNA w próbce. Wskaźnik VAF (*ang. Variant Allele Frequency*) w metodzie NGS informuje o liczbie odczytów sekwencji DNA, prezentujących konkretne zaburzenie genetyczne w stosunku do wszystkich odczytów danego locus, wyrażonego procentowo. U chorych na NDRP, taką ilość cfDNA zazwyczaj izoluje się z objętości osocza nie mniejszej niż 4 ml, na co z kolei potrzeba co najmniej 10 ml krwi pełnej. W praktyce diagnostycznej wiarygodna detekcja i identyfikacja wariantów w cfDNA na poziomie VAF ≤1% wymaga dużej liczby odczytów na próbkę (co najmniej 5-10 milionów odczytów) i jest bardzo trudna z uwagi na szereg czynników fazy przedanalitycznej (m.in. rodzaj próbkówki do pobierania krwi, warunki transportu krwi do laboratorium) i analitycznej (m.in. wydajność metody izolacji cfDNA), które dodatkowo ograniczają ilość i jakość materiału.

Analiza cfRNA stanowi większe wyzwanie metodologiczne, aniżeli badanie cfDNA z uwagi na zwykle niższą zawartość fragmentów kodującego i niekodującego RNA w danej objętości krwi oraz specyficzne wymagania technik molekularnych wobec ilości i jakości oczyszczonego RNA w próbce badanej. Po przepisaniu sekwencji cfRNA na komplementarny DNA (cDNA) w reakcji odwrotnej transkrypcji (*ang. reverse transcription, RT*), analizę ekspresji specyficznych sekwencji (np. transkryptów genów, mikroRNA, lncRNA) prowadzi się technikami jednogenowymi (qPCR, ddPCR) lub wysokoprzepustowymi (NGS, NanoString). Badania w zakresie potencjalnego wykorzystania ctRNA do celów diagnostyki molekularnej w raku płuca są jednak dalece mniej zaawansowane niż w przypadku ctDNA, głównie z uwagi na dynamiczny charakter ekspresji genów i epigenetycznych mechanizmów regulacyjnych, co wpływa na gorszą powtarzalność i odtwarzalność wyników [14].

W diagnostyce molekularnej opartej na materiale genetycznym z biopsji płynnej ryzyko uzyskania wyników fałszywych jest wyższe niż w przypadku materiału tkankowego. Z reguły stężenie ctDNA w osoczu koreluje ze stadiem choroby nowotworowej i objętością guza oraz wskaźnikiem proliferacji komórek i martwicy w tkance guza [15,16]. Jednak chorzy na NDRP, nawet w zaawansowanych stadiach choroby, mogą z przyczyn fizjologicznych i klinicznych prezentować bardzo zróżnicowane poziomy ctDNA w osoczu. Brak wykrycia onkogenego wariantu w badaniu ctDNA może zatem wynikać z faktycznego braku testowanego(-ych) wariantu(ów) w komórkach guza (wynik prawdziwie ujemny), ale może być także efektem bardzo niskiego poziomu ctDNA w osoczu, gdy badane warianty pozostają niewykrywalne dla konwencjonalnych metod analitycznych (wynik fałszywie ujemny). Z kolei ryzyko uzyskania wyniku fałszywie dodatniego w badaniu ctDNA związane jest ze zjawiskiem klonalnej hematopoezy, w którym podczas starzenia się prawidłowych komórek krwiotwórczych dochodzi do akumulacji mutacji somatycznych, prowadzących do klonalnej ekspansji komórek krwiotwórczych przy braku dysplazji [17]. Większość pozakomórkowego DNA w krwiobiegu (ponad 80% u osób zdrowych) pochodzi z komórek krwiotwórczych [18]. Choć warianty somatyczne pochodzenia hematopoetycznego zwykle wykrywane są w ctDNA z niższą częstością alleliczną niż znane warianty onkogenne pochodzenia nowotworowego, to w rzadkich przypadkach, szczególnie w diagnostyce wykorzystującej kompleksowe profilowanie genomowe (*comprehensive genomic profiling, CGP*) technikami NGS, zjawisko klonalnej hematopoezy może być powodem wyniku fałszywie dodatniego [19,20].

Izolowane CTCs można poddać ocenie ilościowej i morfologicznej po wybarwieniu związkami fluorescencyjnymi lub H+E, analizie cytogenetycznej (metodą FISH) i immunofenotypowej oraz badać zawarty w nich materiał genetyczny technikami biologii molekularnej. Zliczanie CTCs w jednostce krwi obwodowej zostało zatwierdzone przez amerykańską Agencję Żywności i Leków (FDA) jako badanie pomocnicze w ocenie rokowania oraz monitorowaniu w czasie rzeczywistym skuteczności terapii zaawansowanych postaci raka piersi, gruczołu krokowego i jelita grubego [21].

Należy podkreślić, że wprowadzenie analizy molekularnej płynnej biopsji do zakresu usług świadczonych przez laboratorium diagnostyczne wymaga szczegółowej walidacji całej procedury, począwszy od pobrania krwi, jej transportu, obróbki przedanalizyjnej a skończywszy na detekcji określonych zmian genetycznych oraz właściwym opisie wyniku, nawet pomimo stosowania urządzeń i odczynników dedykowanych do analizy cfDNA, oznaczonych symbolem IVD. Zaleca się również udział laboratorium w programach zewnętrznej kontroli jakości lub międzylaboratoryjną walidację procedur opartych na analizie płynnej biopsji.

Molekularne markery raka płuca w płynnej biopsji

» Poziom cfDNA w osoczu

Wczesne badania weryfikujące diagnostyczną przydatność pozakomórkowego DNA we krwi skoncentrowane były przede wszystkim na istotnych różnicach w poziomach cfDNA w osoczu chorych na NDRP w stosunku do osób zdrowych. Próbowano wykrywać wysokie stężenie cfDNA w osoczu chorych na NDRP jako biomarker przydatny w badaniach przesiewowych i wczesnym wykrywaniu choroby w grupach podwyższonego ryzyka. Kolejne badania wykazywały, że chorzy na NDRP prezentują istotnie

wyższe wartości stężenia cfDNA w osoczu niż pacjenci z przewlekłymi chorobami płuc o podłożu zapalnym (m.in. POChP, astmą, sarkoidozą, włóknieniem płuc) oraz chorzy z łagodnymi nowotworami płuca (np. hamartoma). Przyjęte wartości odcięcia stężenia cfDNA pozwalały różnicować chorych na NDRP od grup kontrolnych z czułością i specyficznością, które zbliżone były do parametrów diagnostycznych prezentowanych przez konwencjonalne metody obrazowe [22].

Bardziej obiecujące są wyniki badań, w których wykorzystywano ilościowy pomiar cfDNA do monitorowania skuteczności leczenia radykalnego lub systemowego u chorych na NDRP. Obserwowano istotny spadek stężenia cfDNA po resekcji guza oraz u chorych, którzy odpowiedzieli na chemio- bądź radioterapię [23,24]. Nawrót lub progresja choroby zwykle wiązały się z ponownym wzrostem poziomu cfDNA w osoczu, co niekiedy można było obserwować przed potwierdzeniem metodami obrazowymi. Badania tego typu wykazują wyższą skuteczność, gdy seryjny pomiar ilościowy dotyczy bardziej swoistej względem typu nowotworu frakcji ctDNA i jest wykonywany w czasie rzeczywistym u chorych leczonych z wykorzystaniem terapii ukierunkowanych molekularnie. Należy jednak mieć na uwadze, że stan fizjologiczny ma istotny wpływ na stężenie cfDNA i takie czynniki, jak aktywność fizyczna, procesy starzenia, hemodializa, przeszczepy, stan zapalny, cukrzyca i inne zaburzenia metaboliczne, urazy, sepsa, udar niedokrwienno-mózgu i inne, mogą w różny sposób modyfikować poziomy cfDNA u poszczególnych chorych onkologicznych [25].

» **Integralność cfDNA**

Liczne badania poświęcono biologicznym aspektom fragmentacji cfDNA oraz poszukiwaniom ewentualnego związku pomiędzy rozkładem wielkości pozakomórkowych fragmentów DNA a procesem nowotworowym, co mogłoby być potencjalnie wykorzystane w diagnostyce onkologicznej opartej na płynnej biopsji. U chorych na NDRP pomiar integralności cfDNA wykazał lepszą moc diagnostyczną (czułość 91%, specyficzność 68,2%), niż analiza ilościowa (czułość 86,4%, specyficzność 61,4%) w różnicowaniu NDRP od łagodnych nowotworów płuc i osób zdrowych [26]. Badania z wykorzystaniem szczurzych modeli z ksenoprzeszczepem komórek ludzkiego glejaka wielopostaciowego lub raka wątrobowokomórkowego oraz osocza chorych na czerniaka lub raka płuc wykazały wyższy stopień fragmentacji frakcji cfDNA wzbogaconej w somatyczne zmiany punktowe (134–144 pz), definiującej de facto ctDNA, niż fragmentów zawierających warianty natywne (165 pz) [27]. Analiza molekularna somatycznych wariantów przeprowadzona selekcją krótkich fragmentów cfDNA z osocza chorych na raka płuca zwiększyła 2,5-9,1-krotnie udział zmutowanego allele *EGFR* p.T790M w badanej frakcji.

» **Metylacja ctDNA**

Metylacja DNA, czyli odwracalny proces przyłączania grup metylowych (-CH₃) do zasad azotowych nukleotydów, w szczególności do 5 atomu węgla w pierścieniu cytozyny (powstaje 5-metylocytozyna, 5mC) w łańcuchu DNA przez enzym metylotransferazę DNA, jest jednym z głównych epigenetycznych mechanizmów regulacji ekspresji genów. Reakcja metylacji zachodzi najczęściej, choć niewyłącznie, na dinukleotydzie cytozyno-fosforanowo-guaninowym (CpG). Około 80% dinukleotydów CpG w ludzkim genomie może ulegać metylacji. Regiony w genomie o podwyższonej zawartości dinukleotydów CpG w stosunku do przeciętnej dla całego genomu to tzw. wyspy CpG, zlokalizowane najczęściej w odcinkach promotorowych genów. Metylacja wysp CpG w regionach promotorowych genów zwykle powoduje wyciszenie ich transkrypcji, podczas gdy mety-

lacja zachodząca w części kodującej genu powoduje aktywację transkrypcji. Nieprawidłowa metylacja DNA jest charakterystyczną cechą procesu nowotworzenia i w rakach płuca jest opisywana jako globalna hypometylacja genomu z wybiórczą hipermetylacją regionów promotorowych genów supresji nowotworowej, zaangażowanych w mechanizmy regulacji cyklu komórkowego (m.in. geny *CDKN2A/p16*, *PTEN*, *RASSF1A*), proliferacji i różnicowania komórek (*APC*, *FHIT*, *RAR*, *SHOX2*), adhezji komórkowej (*CDH1*, *CDH13*, *SEMA3B*, *TSLC1*), apoptozy (*CASP8*, *DAPK*, *TNFRSF6/Fas*, *TRAIL-R1/DR4*), przekaznictwa sygnałowego (*RUNX3*, *TGFBR2*), naprawy DNA (*MGMT*, *MLH1*, *MSH2*), detoksyfikacji (*GSTP1*) oraz unieśmiertelniania komórek nowotworowych (*TERT*) [28].

Wzór metylacji w tkankach nowotworowych jest układem niezwykle złożonym i zmiennym w czasie oraz wykazuje duży stopień podobieństwa pomiędzy różnymi typami nowotworów, co utrudnia wytypowanie specyficznych biomarkerów diagnostycznych i wdrożenie ich do praktyki klinicznej. Z drugiej strony, metylacja DNA jest jednym z najpotężniejszych procesów epigenetycznych w komórce, zostawiającym możliwy do wykrycia i zmierzenia biochemiczny ślad w ludzkim genomie, który może przetrwać większość warunków utrwalania, przechowywania i obróbki materiałów biologicznych zawierających nowotworowe DNA. Ponadto, w ostatnich latach nastąpił intensywny rozwój metod analizy metylacji DNA, opartych na technikach NGS i mikromacierzach, wraz z nieodzownymi narzędziami bioinformatycznymi, umożliwiającymi badanie zjawiska na poziomie całego genomu w kontekście pojedynczych komórek z różnych tkanek [29]. W przeciwieństwie do wysoce zindywidualizowanej i heterogennej natury somatycznych mutacji genowych, komórki nowotworowe tego samego typu mają tendencję do wykazywania podobnego wzoru metylacji DNA, czyniąc rozwój nieinwazyjnego testu przesiewowego opartego na płynnej biopsji potencjalnie możliwym.

Oprócz prób opracowania nieinwazyjnych testów diagnostycznych przeznaczonych do wczesnego wykrywania określonych typów nowotworów, w szczególności raków jelita grubego, płuca, pęcherza moczowego, wątroby, trwają prace nad rozwojem testów pan-nowotworowych, w oparciu o obserwowane podobieństwa we wzorach metylacji wśród różnych typów nowotworów. Przykładowo, The IvyGeneCORE Test (Laboratory for Advanced Medicine, Pretoria, Afryka Południowa) określający ilościowo stan metylacji 46 markerów w pozakomórkowym DNA odróżnia chorych na jednego z czterech rodzajów nowotworów złośliwych (piersi, okrężnicy, wątroby i płuc) od osób zdrowych z czułością 84% i specyficznością 90% [30].

» **Onkogenne zaburzenia molekularne w ctDNA**

Choć pomiar ilościowy cfDNA w osoczu nie wykazał wystarczającej specyficzności pozwalającej na wykorzystanie metody do wczesnego diagnozowania NDRP to ukierunkował kolejne badania na pogłębioną analizę wyłącznie nowotworowej frakcji pozakomórkowego DNA, ctDNA. Dowiedziono, że ctDNA chorych na NDRP zawiera te same zmiany molekularne, co genomowe DNA izolowane bezpośrednio z tkanki nowotworowej tych samych pacjentów. Wśród zaburzeń genetycznych najczęściej identyfikowanych w ctDNA znajdują się mutacje genów zaangażowanych w proces kancerogenezy NDRP, m.in. *TP53*, *EGFR*, *ERBB2*, *ALK*, *ROS1*, *RET*, *NTRK*, *KRAS*, *NRAS*, *BRAF*, *MET*, *PIK3C*. Zaburzenia te mogą mieć charakter aktywujący, powodując wzmożoną, niekontrolowaną aktywację białek kodowanych przez onkogeny lub wyciszający aktywność genów supresji nowotworowej i genów mutatorowych, odpowiedzialnych za naprawę uszkodzeń DNA. Co ważne, częstość wariantów identyfikowanych w ctDNA wiernie odzwierciedla profile zmian genetycznych w tkance nowotworowej chorych na różne typy nowotworów, w tym raka płuca. Wykrywalność specyficznych zaburzeń onkogennych

w ctDNA praktycznie spada do zera już kilka dni po resekcji guza pierwotnego u chorych na wczesnej postaci niedrobnokomórkowego raka płuca, co w jasny sposób dowodzi, że bezpośrednim źródłem zmutowanych fragmentów DNA w osoczu są komórki nowotworu [31]. Możliwość wiarygodnej analizy onkogennych zaburzeń molekularnych, charakterystycznych dla danego typu nowotworu, w pozakomórkowym DNA stwarza ogromne szanse rozwoju nieinwazyjnych metod diagnozowania tych chorób, zwłaszcza w kontekście nowych terapii ukierunkowanych molekularnie.

Rearanżacje genów kodujących receptorowe kinazy tyrozynowe (RTK) stanowią ważne klinicznie markery predykcyjne i cele terapeutyczne w NDRP (*ALK*, *RET*, *ROS1*, *NTRK1/2/3*). Diagnostyka aktywujących fuzji genowych stanowi standard postępowania w przypadku tego nowotworu i ma kluczowe znaczenie dla podejmowania decyzji klinicznych dotyczących wyboru strategii terapeutycznej. W rozwoju przedklinicznym i klinicznym są obecnie nowe generacje małowązsteczkowych inhibitorów hamujących fuzyjne kinazy, które dotychczas stanowiły trudne cele terapeutyczne, m.in. białka fuzyjne BRAF. Diagnostyka somatycznych wariantów fuzyjnych w tkance nowotworowej obarczona jest takimi samymi problemami jak detekcja zmian punktowych i delecji/ insercji, wynikającymi z dostępności, ilości, jakości i heterogenności materiału tkankowego i cytologicznego. W szeroko zakrojonych badaniach oceniających przydatność płynnej biopsji do diagnostyki somatycznych wariantów fuzyjnych, w których metodą kompleksowego profilowania genetycznego przebadano ctDNA i FFPET od 53 842 chorych na 66 różnych typów złośliwych guzów litych, wykazano stosunkowo wysoką zgodność wykrywanych zaburzeń w obu typach materiałów, szczególnie gdy udział frakcji nowotworowej w cfDNA wynosił $\geq 1\%$ [32]. Największą częstość kinazowych wariantów fuzyjnych w ctDNA prezentowali chorzy na raka gruczołu krokowego (19%), nowotwory złośliwe dróg żółciowych (6,4%), raka pęcherza moczowego (5,5%) i niedrobnokomórkowego raka płuca (4,4%).

» **Profile ekspresji pozakomórkowych mikroRNA**

MikroRNA to klasa małych, niekodujących, endogennych i jednoniciowych RNA, które funkcjonują w komórkach jako negatywne regulatory ekspresji genów. U człowieka zidentyfikowano ponad 2 500 różnych sekwencji miRNA. Profile ekspresji miRNA są wysoce specyficzne dla poszczególnych typów komórek, tkanek i narządów. Unikalne sekwencje miRNA są wykrywane w tkankach prawidłowych i objętych procesem nowotworowym. Ponad 50% wszystkich miRNA u ludzi znajduje się we wrażliwych regionach chromosomów, które szczególnie często podlegają procesom amplifikacji, delecji i translokacji podczas karcynogenezy [33].

Badania naukowe potwierdziły występowanie miRNA w różnych płynach ustrojowych człowieka, m.in. w osoczu krwi, ślinie, moczu, jako tzw. pozakomórkowe miRNA. Mechanizmy uwalniania miRNA z komórek obejmują zarówno procesy śmierci komórkowej (martwica i apoptoza), jak i aktywne wydzielanie. W tym ostatnim, miRNA są wydzielane wewnątrz egzosomów i innych form pęcherzyków zewnątrzkomórkowych, jako kompleksy z białkami AGO lub lipoproteinami o dużej gęstości. Wykazano wysoką stabilność pozakomórkowych miRNA w osoczu i surowicy krwi. Obecność i profil miRNA w płynach ustrojowych może bezpośrednio odzwierciedlać stan fizjologiczny organizmu, a przede wszystkim różne procesy chorobowe. Istotnie zwiększone lub zmniejszone uwalnianie pewnych miRNA do krwiobiegu jest charakterystyczne dla wielu typów i stadiów zaawansowania nowotworów złośliwych, stwarzając możliwość określania specyficznych profili epigenetycznych i ich potencjalnego wykorzystania w skryningu i diagnostyce różnicującej.

W retrospektywnym badaniu MILD oceniano skuteczność diagnostyczną panelu pozakomórkowych mikroRNA jako biomarkerów uzupełniających metody obrazowe oparte na niskodawkowej tomografii komputerowej (LDCT) w kohorcie 939 obecnych lub byłych palaczy tytoniu w wieku powyżej 50. roku życia, w tym 69 pacjentów z rozpoznaniem rakiem płuca i 870 osób wolnych od choroby [34]. Skuteczność diagnostyczną miRNA w wykrywaniu raka płuc charakteryzowała 87% czułość i 81% specyficzność oraz 99% negatywna wartość predykcyjna (NPV), a włączenie miRNA do badania pozwoliło zmniejszyć odsetek wyników fałszywie dodatnich obserwowanych w LDCT aż pięciokrotnie. Następnie, w kontynuacyjnym prospektywnym badaniu przesiewowym BioMILD diagnostyczną wartość oceny ekspresji pozakomórkowych miRNA (miRNA signature classifier, MSC) połączonej z badaniem LDCT potwierdzono w grupie 4119 uczestników (aktywnych lub byłych palaczy tytoniu w wieku 50-75 lat), których obserwowano przez okres ponad 5 lat [35]. Najwyższą, 20,1% zachorowalność na raka płuca w okresie 4-letnim odnotowano w grupie uczestników z pozytywnym wynikiem badania LDCT i MSC (CT+/MSC+), podczas gdy zachorowalność w grupie z ujemnym wynikiem obu badań (CT-/MSC-) wynosiła 0,8%; 1,1% w grupie CT-/MSC+ oraz 10,8% w grupie CT+/MSC-.

W metaanalizie danych z 11 prac badawczych oceniających skuteczność pozakomórkowych miRNA w diagnostyce różnicującej guzki złośliwe od łagodnych w obrębie płuc wykazano zbiorczo 83% czułość i 81% specyficzność oraz 89% pole powierzchni pod krzywą ROC [36]. Ponadto, wyniki meta-analiz wskazują, że łączna ocena ekspresji wielu miRNA ma większą wartość diagnostyczną w przypadku raka płuca we wczesnym stadium (czułość, odsetek wyników fałszywie dodatnich i AUC wynoszące odpowiednio 83%, 25,2% i 0,858) niż analiza pojedynczych miRNA (czułość, odsetek fałszywie dodatnich i AUC odpowiednio 78,3%, 31,6% i 0,799), a pozakomórkowe miRNA z krwi obwodowej (czułość, odsetek fałszywie dodatnich i AUC odpowiednio 82,5%, 30,5% i 0,836, odpowiednio) stanowią potencjalnie lepsze biomarkery niż miRNA z innych materiałów biologicznych (czułość, odsetek wyników fałszywie dodatnich i AUC wynoszące odpowiednio 73,8%, 26,5% i 0,796) [37].

Prowadzone są również badania oceniające prognostyczną i predykcyjną wartość pozakomórkowych miRNA w leczeniu radykalnym, chemo-/radioterapii, terapiach ukierunkowanych molekularnie oraz immunoterapii chorych na raka płuca, przy czym istotne jest co raz lepsze poznanie i rozumienie roli różnych klas miRNAs w mechanizmach regulacji przekaźnictwa sygnałowego, odpowiedzi immunologicznej, apoptozy, naprawy DNA, autofagii, przejścia epithelialno-mezenchymalnego, czyli procesów de facto warunkujących skuteczność wspomnianych form leczenia [33,38].

» **Krążące komórki nowotworowe**

Kliniczna przydatność analizy krążących komórek nowotworowych we krwi to kolejny kierunek badań nad wykorzystaniem płynnej biopsji w diagnostyce NDRP. Zliczanie CTCs w jednostce krwi obwodowej zostało zatwierdzone przez Agencję Żywności i Leków (FDA) jako badanie pomocnicze w ocenie rokowania w zaawansowanych postaciach raka piersi, gruczołu krokowego i jelita grubego. Przydatność ilościowej oceny CTCs we wczesnym wykrywaniu i rokowaniu NDRP nie została dotąd jednoznacznie potwierdzona. O wiele większe nadzieje związane są z jakościową oceną CTCs, tj. analizą molekularną ich materiału genetycznego oraz badaniem ekspresji antygenów na ich powierzchni, szczególnie w kontekście rozwoju biomarkerów dla terapii personalizowanych NDRP.

W kilku niezależnych badaniach wykazano, że skuteczna analiza rearanżacji genów *ALK* i *ROS1* metodą fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH) oraz technikami PCR w czasie rzeczywistym (*real-time PCR*) jest możliwa, prezentując blisko 100% zgodność z wynikami badania tkanki nowotworowej [39,40]. W wieloośrodkowym, prospektywnym badaniu obserwacyjnym z udziałem 203 chorych na NDRP w stadium IIIB/IV, z których 81 miało wynik pozytywny pod względem rearanżacji genu *ALK* (badanie metodą immunohistochemii, IHC lub fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ*, FISH) w materiale tkankowym, obserwowano wysoką zgodność między detekcją rearanżacji *ALK* w tkance nowotworowej (IHC i FISH) a CTCs: czułość i swoistość IHC wyniosły odpowiednio 94,36% i 89,39% dla wszystkich próbek oraz 100% dla pacjentów z wykrywalnymi CTCs na początku badania [41]. Niższą zgodność zaobserwowano dla FISH z czułością 35,63% i swoistością 56,89% we wszystkich próbkach i odpowiednio 100% dla pacjentów z wykrywalnymi CTCs na początku badania. W materiale pobranym przed leczeniem, CTCs wykryto u 187 (92%) pacjentów (mediana 62 (2–621) CTCs na 4 ml). Istotnie większą liczbę CTCs wykryto u chorych na *ALK*-ujemnego NDRP niż u chorych z rearanżacją *ALK* (mediana CTCs = 71 vs 21; $p = 0,0098$).

Również porównawcza, immunohistochemiczna analiza ekspresji PD-L1 na powierzchni CTCs i komórek z preparatów tkanki nowotworowej od chorych na zaawansowanego NDRP wykazała wysoką, około 80-90% zgodność obu technik [42-44]. Co ważne, wykrywalność CTCs we krwi chorych na NDRP znacząco wzrasta w późnych stadiach zaawansowania choroby (około 25-75% chorych w stadium IV oraz mniej niż 5% chorych w stadium III prezentuje CTCs we krwi), co z kolei zwiększa szanse powodzenia diagnostyki wykorzystującej ten typ materiału nowotworowego u chorych kwalifikowanych do immunoterapii [45]. Wiarygodność diagnostyki wykorzystującej CTCs do analizy biomarkerów predykcyjnych dla terapii ukierunkowanych molekularnie i immunoterapii nadal wymaga weryfikacji w prospektywnych badaniach klinicznych.

Aktualne możliwości wykorzystania płynnej biopsji w diagnostyce NDRP

» Zastosowanie płynnej biopsji w kwalifikacji chorych do terapii ukierunkowanych molekularnie

Obecnie najpowszechniej stosowaną formą personalizowanej terapii chorych na NDRP jest leczenie ukierunkowane molekularnie (*ang. targeted therapy*, terapia celowana) z zastosowaniem inhibitorów kinazy tyrozynowej (IKT) receptora naskórkowego czynnika wzrostu (*ang. Epidermal Growth Factor Receptor, EGFR*), które specyficznie blokują białko receptorowe będące produktem zmutowanego genu. Obecność somatycznych, aktywujących mutacji w genie *EGFR* jest głównym czynnikiem predykcyjnym dla terapii lekami z grupy inhibitorów receptorowych kinaz tyrozynowych (IKT) *EGFR*. Do niedawna brak możliwości oceny statusu genu *EGFR* w materiale tkankowym lub cytologicznym wykluczał chorego z dalszego postępowania kwalifikującego do terapii IKT *EGFR*, nawet pomimo właściwego rozpoznania podtypu w badaniu histopatologicznym (niepłaskonabłonkowy lub NOS, *not otherwise specified*). Obecnie tacy pacjenci mogą skorzystać z alternatywnego badania mutacji genu *EGFR* w płynnej biopsji. Badania kliniczne (m.in. EURTAC, AURA) wykazały, że chorzy z mutacją *EGFR* potwierdzoną w ctDNA z osocza krwi odnoszą podobne korzyści kliniczne z leczenia IKT *EGFR*, w postaci wydłużonego czasu przeżycia wolnego od progresji (PFS), jak ci pacjenci, u których mutację aktywującą zidentyfikowano w materiale tkankowym lub cytologicznym. Należy przy tym podkreślić, że obydwie metody diagnostyki mutacji *EGFR*

u chorych na NDRP: konwencjonalna – w materiale tkankowym/cytologicznym i nieinwazyjna – w płynnej biopsji, nie mogą być stosowane zamiennie w dowolny sposób u wszystkich chorych. W kwalifikacji chorych do terapii IKT EGFR klinicysta i diagnosta powinni w pierwszej kolejności dążyć do uzyskania i zbadania fragmentu tkanki lub komórek pochodzących bezpośrednio z ogniska nowotworowego (pierwotnego lub wtórnego), a dopiero w przypadku niepowodzenia tych procedur, skorzystać z możliwości diagnostyki płynnej biopsji.

Badania ostatnich lat, szczególnie te wykorzystujące techniki NGS, wykazały wysoką, zwykle >80%, zgodność analiz molekularnych markerów predykcyjnych dla aktualnie zarejestrowanych terapii celowanych wykonywanych równolegle w płynnej biopsji i tkance nowotworowej od tych samych chorych na zaawansowane postaci NDRP [46,47]. Zespół amerykański, kierowany przez Dr Philip C. Macka, w analizie płynnej biopsji metodą celowanego NGS przebadał krew od 8388 chorych na zaawansowanego NDRP (głównie rak gruczołowy oraz NOS), pobraną w celu kwalifikacji do terapii celowanej i/lub w czasie progresji, z uwagi na brak dostępu odpowiedniego materiału tkankowego [48]. Panel NGS obejmował sekwencje 54-70 genów (zależnie od stosowanej wersji), umożliwiając detekcję istotnych klinicznie wariantów pojedynczego nukleotydu (mutacji punktowych), delecji, fuzji genowych, zaburzeń liczby kopii genu. Somaticzne zaburzenia genetyczne wykryto w 86% prób badanych, a mediana wartości VAF wyniosła 0,43% (zakres 0,03%-97,62%). Zaburzenia genetyczne o charakterze czynników predykcyjnych dla aktualnie dostępnych terapii ukierunkowanych molekularnie wykryto u 48% chorych, w tym mutacje *EGFR* (26,4%), *KRAS* (17,2%), amplifikację *MET* (5,7%), mutacje *BRAF* (2,8%), mutacje *ERBB2* (2,3%), fuzje *ALK* (1,3%), fuzje *RET* (0,9%), mutacje splicingowe z pominięciem eksonu 14 genu *MET* (0,4%), fuzje *ROS1* (0,2%). W kohorcie chorych z progresją choroby w trakcie leczenia IKT EGFR, u 64% pacjentów zidentyfikowano znany lub domniemany molekularny mechanizm nabytej oporności. Ogółem, analiza płynnej biopsji metodą NGS zwiększyła wykrywalność zaburzeń onkogennych o 65% w stosunku do standardowej diagnostyki molekularnej, opartej na materiale tkankowym/cytologicznym.

Aktualnie dostępne metody diagnostyki molekularnej, szczególnie techniki NGS, wykazują najwyższą skuteczność w detekcji zmian punktowych w sekwencjach genów w postaci wariantów pojedynczego nukleotydu (*single nucleotide variant, SNV*) oraz niewielkich delecji i insercji w ctDNA z osocza chorych na NDRP. Wykazano bardzo wysoką zgodność pomiędzy płynną biopsją i materiałem tkankowym w detekcji zmian punktowych w genach *EGFR* (eksony 18-21), *BRAF* (wariant V600E) i *KRAS* (wariant G12C) [49-51]. Tymczasem, czułość wykrywania rearanżacji (wariantów fuzyjnych) genów *ALK*, *ROS1*, *RET* w ctDNA jest mniej satysfakcjonująca [52]. Istotnym czynnikiem warunkującym skuteczność detekcji i identyfikacji wariantów fuzyjnych w płynnej biopsji metodą NGS jest udział frakcji ctDNA w całkowitej puli pozakomórkowego DNA. W badaniach porównujących wykrywalność fuzji genowych w płynnej biopsji i tkance nowotworowej w grupie 15 534 chorych na NDRP, z których 6 805 (44%) prezentowało wariant fuzyjny, częstości wykrywanych zmian w genach *ALK* i *RET* w obu typach materiałów prezentowały największą zgodność, gdy analizą objęto jedynie płynne biopsje z udziałem frakcji ctDNA $\geq 1\%$ [32]. Autorzy nie obserwowali w tym badaniu istotnego związku pomiędzy udziałem frakcji ctDNA w płynnej biopsji a wykrywalnością rearanżacji *ROS1*. Rozwijane są nowe metody badania fuzji genowych *ALK*, *ROS1*, *RET* oraz wariantów splicingowych z pominięciem eksonu 14 genu *MET* w ctRNA, oparte na technikach Nanostring, dPCR i NGS [53-55].

W niedawno opublikowanych rekomendacjach dotyczących wykorzystania ctDNA w diagnostyce molekularnej chorych na zaawansowanego NDRP, Europejskie Towarzystwo Onkologii Medycznej (*European Society for Medical Oncology, ESMO*) zaleca genotypowanie ctDNA u pacjentów wcześniej nieleczonych, szczególnie gdy spodziewane jest znaczne opóźnienie w pozyskaniu tkanki nowotworowej do badania, w przypadkach przeciwwskazań do wykonania biopsji oraz gdy przerzuty do kości są jednym miejscem do wykonania nakłucia [56]. Jednocześnie zwraca uwagę na ograniczenia związane z analizą zmienności liczby kopii DNA (amplifikacji) genu *MET* (jako mechanizmu oporności na terapie celowane) oraz fuzji genowych w ctDNA.

» **Identyfikacja mechanizmów oporności na leczenie ukierunkowane molekularnie**

Głównym czynnikiem ograniczającym skuteczność ukierunkowanych molekularnie terapii NDRP jest nabyta oporność na leczenie. Oporność nabyta dotyczy zjawisk pozytywnej selekcji klonów komórek prezentujących fenotyp i/lub genotyp warunkujący brak wrażliwości na lek spośród heterogennej populacji komórek guza oraz mechanizmów powstawania nowych zaburzeń genetycznych pod presją selekcyjną narzuconą przez terapię. Wszyscy chorzy na NDRP, którzy początkowo wykazują korzystną odpowiedź na terapie celowane, z czasem nabywają oporność na stosowane leki.

Płynna biopsja dowiodła swojej przydatności klinicznej, gdy do schematu leczenia IKT EGFR w NDRP wdrożono ozymertynib w 2. linii, co pociągało konieczność wykonywania badania molekularnego w kierunku potwierdzenia lub wykluczenia obecności wtórnej mutacji oporności p.T790M w genie *EGFR* u chorych z klinicznymi objawami progresji (potwierdzone wg kryteriów RECIST 1.1) podczas leczenia jednym z inhibitorów w 1. linii (erlotynib, gefitynib, afatynib). W celu pozyskania świeżego materiału nowotworowego do badania molekularnego wymagana była powtórna biopsja guza, przeprowadzona w trakcie progresji choroby. U około 30-50% chorych z progresją podczas leczenia IKT EGFR nie można było wykonać zabiegu biopsji z różnych przyczyn klinicznych lub pozyskany tą drogą materiał tkankowy nie nadawał się do badania molekularnego [57,58]. Dla tej grupy chorych jedyną szansą na kwalifikację do leczenia 2. linii IKT EGFR okazała się diagnostyka mutacji *EGFR* p.T790M w płynnej biopsji. Zakończone badanie kliniczne AURA wykazało, że chorzy leczeni ozymertynibem osiągnęli podobny odsetek obiektywnych odpowiedzi (ORR) i PFS, niezależnie od tego, czy mutację p.T790M wykryto w tkance nowotworu (ORR=62%; PFS=9,7 m-cy), czy w cfDNA izolowanym z osocza (ORR=63%; PFS=9,7 m-cy) [59].

Obecnie standardem klinicznym jest ozymertynib stosowany w 1. linii leczenia IKT EGFR i badanie na obecność mutacji p.T790M nie jest wykonywane. Jednak w przyszłości, możliwość stosowania inhibitorów w kolejnych liniach leczenia chorych na NDRP znów będzie wymagała pogłębionej diagnostyki molekularnej w celu zidentyfikowania mechanizmu oporności nabytej w toku leczenia 1. linii. Aktualnie płynna biopsja jest wykorzystywana w badaniach naukowych i klinicznych nad identyfikacją mechanizmów oporności na ozymertynib podawany w 1. linii. W badaniu klinicznym FLAURA, mechanizmy oporności nabytej zależne od EGFR obserwowano znacznie rzadziej (9%) niż w przypadku stosowania tego leku w drugiej linii (21%) [60]. U chorych leczonych ozymertynibem w pierwszej linii, u których doszło do progresji choroby, najczęściej obserwowanym zjawiskiem była amplifikacja *MET* (15%), następnie wtórna mutacja *EGFR* p.C797S (7%) oraz szereg innych zaburzeń, m.in. amplifikacja *HER2*, mutacje *PIK3CA*, mutacje *RAS*, mutacje *BRAF* (2-7%). Rzadko obserwowano inne wtórne mutacje w genie *EGFR* (1-2%), m.in. p.S768I (1%) oraz mutacje złożone: p.L718Q + p.C797S (1%), p.L718Q + EGFRex20ins

(insercja w eksonie 20). U 10% chorych obserwuje się również zaburzenia w genach związanych z regulacją cyklu komórkowego, m.in. amplifikację genów *CCND1/D2*, *CCNE1*, *CDK4*. Fuzje genowe, zwłaszcza *ALK*, *BRAF* i *RET* wykryto u 1-4% przypadków.

Oporność na leki z grupy IKT ALK nabywana jest przede wszystkim w mechanizmach zależnych od mutacji wtórnych w genie *ALK*, m.in. wariantów L1196M, G1269A, G1202R, F1174L/C, C1156Y, V1180L, S1206Y, E1210K [61,62]. Mutacje oporności w genie *ALK* identyfikuje się u ponad 20% chorych po leczeniu kryzotynibem oraz u około 56% chorych leczonych inhibitorami kolejnych generacji (certynib, alektynib, brygatynib, lorlatynib). Liczne prace potwierdziły przydatność ctDNA do wykrywania i identyfikacji mutacji oporności w genie *ALK* metodami ddPCR i NGS [63-65].

» **Monitorowanie skuteczności leczenia ukierunkowanego molekularnie**

Dostępność płynnej biopsji niemal na każdym etapie postępowania klinicznego z chorym na NDRP otwiera możliwości monitorowania rozwoju choroby i skuteczności terapii w czasie rzeczywistym (zamiast retrospektywnej oceny materiału biopsyjnego). Obecnie prowadzone są badania weryfikujące przydatność ilościowego pomiaru ctDNA z mutacją *EGFR* w płynnej biopsji pobieranej od chorych leczonych IKT *EGFR* w równych odstępach czasowych, przez cały okres leczenia. Zauważono, że dynamika zmian poziomu ctDNA z mutacją aktywującą w osoczu krwi koreluje z odpowiedzią chorego na leczenie IKT *EGFR*. W grupie 98 chorych na NDRP z mutacją aktywującą *EGFR* wykrytą w ctDNA przed leczeniem, spadek poziomu ctDNA z wariantem *EGFR* poniżej progu detekcji (*ang. clearing*) w ciągu 7 tygodni od rozpoczęcia leczenia IKT *EGFR* stanowił pozytywny predyktor ORR ($p=0,0008$), PFS ($p<0,0001$) i przeżycia całkowitego (*overall survival, OS*; $p<0,0001$) [66]. Ponadto, dynamika zmian poziomu ctDNA z mutacją *EGFR* w dobrym stopniu koreluje z wynikami badań radiologicznych wykonywanych okresowo według kryteriów RECIST1.1 w przebiegu leczenia IKT *EGFR* [67,68]. Jednak śledzenie dynamiki poziomów ctDNA z pierwotną mutacją aktywującą *EGFR* oraz mutacją oporności T790M w czasie terapii ukierunkowanej molekularnie w wielu przypadkach pozwala przewidzieć progresję choroby wcześniej, niż wykazują to konwencjonalne metody obrazowe, z wyprzedzeniem rzędu kilku-kilkudziesięciu tygodni [69]. Wyniki badania klinicznego APPLE (NCT02856893), pomimo stosunkowo niewielkich liczebności grup badanych, zdają się potwierdzać kliniczną wartość wczesnego wykrywania progresji choroby na poziomie molekularnym w płynnej biopsji [70]. Odsetek chorych osiągających 18-miesięczny PFS podczas leczenia IKT *EGFR* był wyższy (87,5%; 84% CI 38,7% - 98,1%) w podgrupie, w której leczenie drugiej linii (ozymertynib) wdrażano wcześniej, na podstawie obserwacji rosnącego poziomu ctDNA z mutacją T790M (8/32 chorych), aniżeli w podgrupie leczonej wyłącznie na podstawie wytycznych RECIST 1.1 (62,5%; 84% CI 40,5% to 78,4%).

» **Zastosowanie wielkoskalowej analizy genetycznej płynnej biopsji w immunoterapii NDRP**

W immunoterapii NDRP, kwalifikacja pacjentów i rokowanie odpowiedzi jedynie w oparciu o badanie ekspresji PD-L1 na komórkach nowotworu nie są wystarczająco skuteczne. Trwają poszukiwania nowych, efektywnych biomarkerów predykcyjnych; wśród badanych kandydatów jest obciążenie nowotworu mutacjami somatycznymi (*ang. total mutational load TML; total mutational burden TMB*), które wymaga rozległej analizy molekularnej DNA technikami sekwencjonowania nowej generacji.

Badania całogenomowe wykazały, że czerniak oraz niedrobnokomórkowy rak płuca należą do nowotworów o najwyższym wskaźniku TMB wśród wielu typów złośliwych guzów litych, co z w istotny sposób powiązано z wysokim odsetkiem odpowiedzi na immunoterapię wśród chorych [71]. W założeniu, im więcej somatycznych nieprawidłowości genetycznych w komórce nowotworowej, tym więcej powstaje nieprawidłowych białek, które są rozpoznawane przez układ immunologiczny jako tzw. neoantygeny, co z kolei przekłada się na wyższą skuteczność immunoterapii opartych na blokowaniu immunologicznych punktów kontrolnych na komórkach nowotworowych lub limfocytach (PD-L1 oraz PD-1 i CTLA4). Zwykle wskaźnik TMB oblicza się jako liczbę wykrytych niesynonimicznych zaburzeń genetycznych na 1 milion par zasad eksomu, czyli ogółu regionów kodujących białka i ulegających transkrypcji do mRNA w genomie (liczba mutacji/mega par zasad eksomu). Ludzki eksom składa się z około 180 000 eksonów długości około 30 milionów par zasad (30 Mb), co stanowi zaledwie 1% całkowitego genomowego DNA.

Badania kliniczne (m.in. badanie II fazy KEYNOTE-158) dowiodły, że u chorych z wysokim wskaźnikiem TMB (tzw. TMB-high ≥ 10 mutacji/Mb) immunoterapia w pierwszej linii leczenia jest zdecydowanie bardziej skuteczna niż chemioterapia, niezależnie od ekspresji PD-L1 [72]. Standardem w ocenie wskaźnika TMB metodą sekwencjonowania całego eksomu (*ang. whole exome sequencing, WES*) lub kompleksowego profilowania genomowego (*ang. comprehensive genomic profiling, CPG*) jest analiza materiału genetycznego izolowanego z tkanki nowotworowej (FFPET lub cytoblok) pochodzącej z biopsji. Jednak część chorych nie może być poddanych zabiegowi biopsji z uwagi na przeciwwskazania kliniczne. W NDRP, szacuje się, że 15-25% wykonanych biopsji i tak nie dostarcza materiału nowotworowego w wystarczającej ilości i/lub jakości, aby nadawał się do wiarygodnej analizy molekularnej technikami NGS. Z kolei archiwalny materiał tkankowy nie zawsze odzwierciedla aktualny status zaburzeń molekularnych w momencie rozpoczęcia leczenia. Dla tej grupy chorych badanie molekularne płynnej biopsji stanowi jedyną możliwość oceny wskaźnika TMB.

Obecnie prowadzone są badania nad optymalizacją procedury oznaczania TMB we krwi (*ang. blood-TMB, bTMB*) oraz oceną jego przydatności klinicznej jako czynnika predykcyjnego w immunoterapii niedrobnokomórkowego raka płuca. Amerykański zespół pod kierunkiem Prof. DR Gandara pokazał po raz pierwszy wyniki retrospektywnej oceny PFS i OS (całkowite przeżycie) chorych na NDRP leczonych atezolizumabem (inhibitor PD-L1) w 2. linii, u których oceniano TMB w płynnej biopsji [73]. Wykazano wysoką zgodność pomiędzy wynikami analizy TMB w płynnej biopsji i tkance nowotworowej (89% wyników dodatnich było prawdziwie dodatnie, 100% wyników ujemnych – prawdziwie ujemne). Zaledwie 30 spośród 229 chorych (13%) prezentowało jednocześnie wysoki TMB ≥ 16 i ekspresję PD-L1 na komórkach nowotworowych. Właśnie w tej grupie chorych leczenie atezolizumabem wykazywało najwyższą skuteczność w postaci dłuższych PFS i OS.

Trwają badania kliniczne mające na celu prospektywną ocenę wartości predykcyjnej bTMB w immunoterapii niedrobnokomórkowego raka płuca. B-FIRST (N=152) było pierwszym prospektywnym badaniem fazy 2 oceniającym bTMB jako biomarker monoterapii atezolizumabu w 1. linii leczenia miejscowo zaawansowanego lub przerzutowego NDRP [74]. Badanie wykazało diagnostyczną i kliniczną użyteczność bTMB jako biomarkera predykcyjnego w immunoterapii – mediana PFS 5,0 miesiący u chorych z bTMB ≥ 16 vs 3,5 miesiąca przy bTMB < 16 , natomiast mediana OS 23,9 vs 13,4 miesiąca, odpowiednio.

Perspektywy na przyszłość

Rak płuca, podobnie jak inne typy nowotworów złośliwych, jest chorobą o niezwykle złożonej patogenezie, obejmującej rozległe zmiany na poziomie genomu, epigenomu, transkryptomu, proteomu i metabolomu. W ostatniej dekadzie podejmowano liczne próby rozwikłania molekularnych mechanizmów karcynogenezy, wykorzystując głównie pojedyncze podejścia omiczne, takie jak skanowanie genomu pod kątem mutacji i rearanżacji specyficznych dla nowotworu, oznaczenie profilów unikatowych zmian epigenetycznych w komórkach nowotworowych lub badanie zróżnicowanej ekspresji mRNA i białka odpowiednio poprzez techniki transkryptomiczne i proteomiczne. Choć te jednopoziomowe podejścia typu „omics” przyczyniły się do identyfikacji mutacji specyficznych dla nowotworu, zmian epigenetycznych i podtypów molekularnych nowotworów w oparciu o ekspresję genu/białka, brakuje im zdolności rozdzielczej, aby ustalić przyczynowo-skutkowy związek między sygnaturami molekularnymi a fenotypową manifestacją charakterystycznych cech raka. Multiomika zapewnia holistyczne spojrzenie na biologię nowotworów, które może pomóc w badaniach podstawowych, translacyjnych i klinicznych nad opracowaniem skuteczniejszych strategii diagnozowania i leczenia tych chorób.

Przykładem podejścia multiomicznego w badaniu płynnej biopsji jest połączenie genomiki (mutacje w 2001 pozycjach genomowych) i proteomiki (poziomy ekspresji 8 białek) w teście zwanym CancerSEEK [75]. Skuteczność tego testu typu MCED (*multi-cancer early detection*) oceniano w kohorcie 1005 pacjentów z rozpoznanymi klinicznie nowotworami bez przerzutów (stadium I-III) reprezentującymi osiem różnych typów histopatologicznych (raki jajnika, wątroby, żołądka, trzustki, przełyku, jelita grubego, płuca lub piersi) oraz grupie kontrolnej 812 zdrowych ochotników, osiągając zbiorczo medianę czułości wynoszącą 70% i swoistości >99% (tylko 7 z 812 zdrowych osób kontrolnych uzyskało wynik pozytywny). Moc różnicująca testu molekularnego różniła się w zależności od typu nowotworu (wyższa w przypadku raka jelita grubego i niższa w przypadku raka wątrobowokomórkowego i raka płuca) oraz jego stadium (43% w przypadku nowotworów w stadium I w porównaniu z 73% w przypadku nowotworów w stadium II i 78% w przypadku stadium III). Przydatność kliniczna tego testu jest obecnie oceniana w badaniach prospektywnych (NCT04213326).

Kolejne podejście multiomiczne, integrujące genomikę, fragmentomikę, bioinformatykę oraz algorytmy sztucznej inteligencji, opiera się na opisanym wcześniej założeniu, że chorzy na różne typy nowotworów mają zmienione profile fragmentacji cfDNA w porównaniu z osobami zdrowymi. Opracowano model uczenia maszynowego (*machine learning, ML*) zwany 'DNA evaluation of fragments for early interception' (DELFI) w celu wykrycia dużej liczby zmian w cfDNA badanym za pomocą sekwencjonowania całego genomu (WGS) określającego różnice w profilach liczby kopii genów, powtarzalnych motywów sekwencji i fragmentacji pomiędzy chorymi na nowotwór a osobami zdrowymi [76]. Wstępne wyniki dotyczące skuteczności testu DELFI różnicującego 236 chorych na różne typy raka i 245 zdrowych osób wykazały czułość wykrywania nowotworu w zakresie od 57% do ponad 99% wśród siedmiu typów raka objętych badaniem przy 98% swoistości. Połączenie DELFI z wykrywaniem somatycznych mutacji w cfDNA zwiększyło czułość do 91% przy swoistości 98%. W efekcie, rozpoczęto prospektywne badanie z udziałem 365 osób z wysokim ryzykiem zachorowania na raka płuca (kohorta LUCAS), walidowane w niezależnej kohorcie 385 osób bez nowotworu i 46 pacjentów z rakiem płuc [77]. Połączenie analizy poziomu antygenu rakowo-embrionalnego (CEA), wieku, statusu palenia tytoniu i obecności przewlekłej obturacyjnej choroby płuc (PO-

ChP) w modelu multimodalnym (DELFI_{multi}), a następnie badania niskodawkową tomografią komputerową skutkowało czułością wynoszącą 94% (stadium I =87%, II=100%, III=97% i IV=96%) oraz redukcją niepotrzebnych procedur diagnostyczno-klinicznych towarzyszących badaniu opartym wyłącznie o LDCT o 52%. Obecnie trwają dwa duże prospektywne badania kliniczno-kontrolne (DELFI-L201/NCT05306288 i DELFI-L101/NCT04825834) oceniające przydatność DELFI do wczesnego wykrywania raka płuca.

Podsumowanie

Historia badań pozakomórkowych kwasów nukleinowych we krwi liczy sobie 70 lat. Jednak dopiero znaczący postęp w dziedzinie biologii molekularnej, jaki miał miejsce na przełomie XX i XXI wieku, umożliwił faktyczną weryfikację przydatności płynnej biopsji w diagnozowaniu i leczeniu chorób nowotworowych. Dziś nikt już nie podważa zasadności wdrożenia badania molekularnego krwi obwodowej w schemat postępowania klinicznego z chorymi na NDRP. Na przeszkodzie stoi jednak unikalna charakterystyka biologiczna cfDNA/RNA i CTCs, która wymaga opracowania nowatorskich rozwiązań metodologicznych, dedykowanych wyłącznie do analizy tego rodzaju materiału. Powyższe przykłady pionierskich badań nad klinicznym wykorzystaniem płynnej biopsji wskazują, że spodziewane korzyści są warte środków przeznaczanych obecnie na prowadzenie prac rozwojowych w tej dziedzinie.

Coraz lepsza optymalizacja i standaryzacja metod diagnostyki molekularnej NDRP, opartych na pozakomórkowym DNA z krwi obwodowej, znajduje odzwierciedlenie w rekomendacjach czołowych towarzystw onkologicznych, patologicznych, biologicznych o zasięgu międzynarodowym i lokalnym, m.in. International Association for the Study of Lung Cancer (IASLC) – opublikowanych w *Journal of Thoracic Oncology* w 2021 roku, czy towarzystw AIOM (*Associazione Italiana Oncologia Medica*); SIAPEC/IAP (*Società Italiana di Anatomia Patologica*); SIBioC (*Società Italiana Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica*); SIC (*Società Italiana Cancerologia*); SIF (*Società Italiana Farmacologia*) z Włoch – opublikowanych w ESMO Open w 2021 roku, a także licznych opiniach i wytycznych międzynarodowych zespołów eksperckich, publikowanych na przestrzeni ostatnich lat [78,79].

Bibliografia

1. Wojciechowska U, Barańska K, Miklewska M, Didkowska JA. Cancer incidence and mortality in Poland in 2020. *Nowotwory. Journal of Oncology* 2023;73(3):129-145.
 2. Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) Program (www.seer.cancer.gov) SEER*Stat Database: Incidence - SEER Research Data, 8 Registries, Nov 2021 Sub (1975-2020) - Linked To County Attributes - Time Dependent (1990-2020) Income/Rurality, 1969-2020 Counties, National Cancer Institute, DCCPS, Surveillance Research Program, released April 2023, based on the November 2022 submission.
 3. WHO Classification of Tumours Editorial Board. *Thoracic Tumours* [Internet], 5th ed.; International Agency for Research on Cancer: Lyon, France, 2021; Volume 5. Available online: <https://tumourclassification.iarc.who.int/chapters/35> (accessed on 9 March 2024).
-

-
4. Yang SR, Schultheis AM, Yu H, Mandelker D, Ladanyi M, Büttner R. Precision medicine in non-small cell lung cancer: Current applications and future directions. *Semin Cancer Biol.* 2022;84:184-198.
 5. Plönes T, Engel-Riedel W, Stoelben E, Limmroth C, Schildgen O, Schildgen V. Molecular Pathology and Personalized Medicine: The Dawn of a New Era in Companion Diagnostics-Practical Considerations about Companion Diagnostics for Non-Small-Cell-Lung-Cancer. *J Pers Med.* 2016;6(1):3.
 6. Anitha K, Posinasetty B, Naveen Kumari K, Chenchula S, Padmavathi R, Prakash S, Radhika C. Liquid biopsy for precision diagnostics and therapeutics. *Clin Chim Acta.* 2024;554:117746.
 7. Heitzer E, Haque IS, Roberts CES, Speicher MR. Current and future perspectives of liquid biopsies in genomics-driven oncology. *Nat Rev Genet.* 2019;20(2):71-88.
 8. Stejskal P, Goodarzi H, Srovnal J, Hajdúch M, van 't Veer LJ, Magbanua MJM. Circulating tumor nucleic acids: biology, release mechanisms, and clinical relevance. *Mol Cancer.* 2023;22(1):15.
 9. Heitzer E, Ulz P, Geigl JB. Circulating tumor DNA as a liquid biopsy for cancer. *Clin Chem.* 2015;61(1):112-23.
 10. Bronkhorst AJ, Ungerer V, Oberhofer A, Gabriel S, Polatoglou E, Randeu H, Uhlig C, Pfister H, Mayer Z, Holdenrieder S. New Perspectives on the Importance of Cell-Free DNA Biology. *Diagnostics (Basel).* 2022;12(9):2147.
 11. van der Leest P, Schuurin E. Critical Factors in the Analytical Work Flow of Circulating Tumor DNA-Based Molecular Profiling. *Clin Chem.* 2024;70(1):220-233.
 12. Vidlarova M, Rehulkova A, Stejskal P, Prokopova A, Slavik H, Hajduch M, Srovnal J. Recent Advances in Methods for Circulating Tumor Cell Detection. *Int J Mol Sci.* 2023;24(4):3902.
 13. Wang YH, Song Z, Hu XY, Wang HS. Circulating tumor DNA analysis for tumor diagnosis. *Talanta.* 2021;228:122220.
 14. Van Der Schueren C, Decruyenaere P, Avila Cobos F, Bult J, Deleu J, Dipalo LL, Helsmoortel HH, Hulstaert E, Morlion A, Ramos Varas E, Schoofs K, Trypsteen W, Vanden Eynde E, Van Droogenbroeck H, Verniers K, Vandesomepele J, Decock A. Subpar reporting of pre-analytical variables in RNA-focused blood plasma studies. *Mol Oncol.* 2024 Apr 2.
 15. Bettgowda C, Sausen M, Leary RJ, et al. Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Sci Transl Med.* 2014;6:224ra224.
 16. Abbosh C, Birkbak NJ, Wilson GA, et al. Phylogenetic ctDNA analysis depicts early-stage lung cancer evolution. *Nature.* 2017;545:446-451.
 17. Steensma DP, Bejar R, Jaiswal S. et al. Clonal hematopoiesis of indeterminate potential and its distinction from myelodysplastic syndromes. *Blood* 2015; 126(1): 9–16.
-

18. Abbosh C, Swanton C, Birkbak NJ. Clonal haematopoiesis: a source of biological noise in cell-free DNA analyses. *Ann Oncol*. 2019;30(3):358-359.
 19. Young SJ, Fuhlbrück F, Peterson M, Zou W, Palma JF, Patil NS, Jiang Y. Clonal Hematopoiesis in Late-Stage Non-Small-Cell Lung Cancer and Its Impact on Targeted Panel Next-Generation Sequencing. *JCO Precis Oncol*. 2020;4:1271-1279.
 20. Hu Y, Ulrich BC, Supplee J, Kuang Y, Lizotte PH, Feeney NB, Guibert NM, Awad MM, Wong KK, Jänne PA, Paweletz CP, Oxnard GR. False-Positive Plasma Genotyping Due to Clonal Hematopoiesis. *Clin Cancer Res*. 2018;24(18):4437-4443.
 21. Grzybowska EA, Fabisiwicz A. Circulating tumor cells and their clinical significance. *NOWOTWORY Journal of Oncology* 2017;67(4):243–250.
 22. Szpechcinski A, Chorostowska-Wynimko J, Struniawski R, Kupis W, Rudzinski P, Langfort R, Puscinska E, Bielen P, Sliwinski P, Orłowski T. Cell-free DNA levels in plasma of patients with non-small-cell lung cancer and inflammatory lung disease. *Br J Cancer*. 2015;113(3):476-83.
 23. Szpechcinski A, Chorostowska-Wynimko J, Kupis W, Maszkowska-Kopij K, Dancewicz M, Kowalewski J, Orłowski T. Quantitative analysis of free-circulating DNA in plasma of patients with resectable NSCLC. *Expert Opin Biol Ther*. 2012;12 Suppl 1:S3-9.
 24. Nygård L, Ahlborn LB, Persson GF, Chandrananda D, Langer JW, Fischer BM, Langer SW, Gabrielaite M, Kjær A, Rosenfeld N, Mouliere F, Østrup O, Vogelius IR, Bentzen SM. Circulating cell free DNA during definitive chemo-radiotherapy in non-small cell lung cancer patients - initial observations. *PLoS One*. 2020;15(4):e0231884.
 25. Bronkhorst AJ, Ungerer V, Oberhofer A, et al. New Perspectives on the Importance of Cell-Free DNA Biology. *Diagnostics (Basel, Switzerland)*. 2022;12(9):2147.
 26. Szpechcinski A, Rudzinski P, Kupis W, Langfort R, Orłowski T, Chorostowska-Wynimko J. Plasma cell-free DNA levels and integrity in patients with chest radiological findings: NSCLC versus benign lung nodules. *Cancer Lett*. 2016;374(2):202-7.
 27. Underhill HR, Kitzman JO, Hellwig S, Welker NC, Daza R, Baker DN, Gligorich KM, Rostomily RC, Bronner MP, Shendure J. Fragment Length of Circulating Tumor DNA. *PLoS Genet*. 2016;12(7):e1006162.
 28. Hoang PH, Landi MT. DNA Methylation in Lung Cancer: Mechanisms and Associations with Histological Subtypes, Molecular Alterations, and Major Epidemiological Factors. *Cancers (Basel)*. 2022;14(4):961.
 29. Brockley LJ, Souza VGP, Forder A, Pewarchuk ME, Erkan M, Telkar N, Benard K, Trejo J, Stewart MD, Stewart GL, Reis PP, Lam WL, Martinez VD. Sequence-Based Platforms for Discovering Biomarkers in Liquid Biopsy of Non-Small-Cell Lung Cancer. *Cancers (Basel)*. 2023;15(8):2275.
 30. The IvyGeneCORE test|IvyGene, non-invasive early cancer detection test, n.d. <https://www.ivygenelabs.co.za/the-ivygenecore-test/> [accessed 29.02.2024].
-

-
31. Zhao X, Dai F, Mei L, Huang D, Shen X, Zhang H, She X, Ma Z. The Potential Use of Dynamics Changes of ctDNA and cfDNA in the Perioperative Period to Predict the Recurrence Risk in Early NSCLC. *Front Oncol.* 2021;11:671963.
 32. Kasi PM, Lee JK, Pasquina LW, Decker B, Vanden Borre P, Pavlick DC, Allen JM, Parachoniak C, Quintanilha JCF, Graf RP, Schrock AB, Oxnard GR, Lovly CM, Tuskachinsky H, Subbiah V. Circulating Tumor DNA Enables Sensitive Detection of Actionable Gene Fusions and Rearrangements Across Cancer Types. *Clin Cancer Res.* 2024;30(4):836-848.
 33. Florczuk M, Szpechcinski A, Chorostowska-Wynimko J. miRNAs as Biomarkers and Therapeutic Targets in Non-Small Cell Lung Cancer: Current Perspectives. *Target Oncol.* 2017;12(2):179-200.
 34. Sozzi G, Boeri M, Rossi M, et al. Clinical utility of a plasma-based miRNA signature classifier within computed tomography lung cancer screening: a correlative MILD Trial Study. *J Clin Oncol.* 2014;32(8):768-73.
 35. Pastorino U, Boeri M, Sestini S, Sabia F, Milanese G, Silva M, Suatoni P, Verri C, Cantarutti A, Sverzellati N, Corrao G, Marchianò A, Sozzi G. Baseline computed tomography screening and blood microRNA predict lung cancer risk and define adequate intervals in the BioMILD trial. *Ann Oncol.* 2022;33(4):395-405.
 36. Liu L, Wang F, Nan Y, Zou X, Jiang D, Wang Z. Diagnostic value of circulating miRNA in the benign and malignant lung nodules: A systematic review and meta-analysis. *Medicine (Baltimore).* 2023;102(46):e35857.
 37. He WJ, Li WH, Jiang B, Wang YF, Xia YX, Wang L. MicroRNAs level as an initial screening method for early-stage lung cancer: a bivariate diagnostic random-effects meta-analysis. *Int J Clin Exp Med.* 2015;8(8):12317-26.
 38. Zhong S, Golpon H, Zardo P, Borlak J. miRNAs in lung cancer. A systematic review identifies predictive and prognostic miRNA candidates for precision medicine in lung cancer. *Transl Res.* 2021;230:164-196.
 39. Pailler E, Faugoux V, Oulhen M, Catelain C, Farace F. Routine clinical use of circulating tumor cells for diagnosis of mutations and chromosomal rearrangements in non-small cell lung cancer-ready for prime-time? *Transl Lung Cancer Res.* 2017;6(4):444-453.
 40. Catelain C, Pailler E, Oulhen M, Faugoux V, Pommier AL, Farace F. Detection of Gene Rearrangements in Circulating Tumor Cells: Examples of ALK-, ROS1-, RET-Rearrangements in Non-Small-Cell Lung Cancer and ERG-Rearrangements in Prostate Cancer. *Adv Exp Med Biol.* 2017;994:169-179.
 41. Ilié M, Mazières J, Chamorey E, Heeke S, Benzaquen J, Thamphya B, Boutros J, Tiotiu A, Fayada J, Cadranet J, Poudenx M, Moro-Sibilot D, Barlesi F, Thariat J, Clément-Duchêne C, Tomasini P, Hofman V, Marquette CH, Hofman P; STALKLUNG01 Study Consortium Investigators. Prospective Multicenter Validation of the Detection of ALK Rearrangements of Circulating Tumor Cells for Noninvasive Longitudinal Management of Patients With Advanced NSCLC. *J Thorac Oncol.* 2021;16(5):807-816.
-

42. Cheng Y, Wang T, Lv X, Li R, Yuan L, Shen J, Li Y, Yan T, Liu B, Wang L. Detection of PD-L1 Expression and Its Clinical Significance in Circulating Tumor Cells from Patients with Non-Small-Cell Lung Cancer. *Cancer Manag Res.* 2020;12:2069-2078.
 43. Ilié M, Szafer-Glusman E, Hofman V, Chamorey E, Lalvée S, Selva E, Leroy S, Marquette CH, Kowanetz M, Hedge P, Punnoose E, Hofman P. Detection of PD-L1 in circulating tumor cells and white blood cells from patients with advanced non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol.* 2018;29(1):193-199.
 44. Chen YL, Huang WC, Lin FM, Hsieh HB, Hsieh CH, Hsieh RK, Chen KW, Yen MH, Lee J, Su S, Marfatia T, Chang SE, Sundar P, Patterson B, Watson D, Mei R, Javey M. Novel circulating tumor cell-based blood test for the assessment of PD-L1 protein expression in treatment-naïve, newly diagnosed patients with non-small cell lung cancer. *Cancer Immunol Immunother.* 2019;68(7):1087-1094.
 45. Andrikou K, Rossi T, Verlicchi A, Priano I, Cravero P, Burgio MA, Crinò L, Bandini S, Ulivi P, Delmonte A. Circulating Tumour Cells: Detection and Application in Advanced Non-Small Cell Lung Cancer. *Int J Mol Sci.* 2023;24(22):16085.
 46. Chen K, Zhang J, Guan T, Yang F, Lou F, Chen W, Zhao M, Zhang J, Chen S, Wang J. Comparison of plasma to tissue DNA mutations in surgical patients with non-small cell lung cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2017;154(3):1123-1131.e2.
 47. Zheng Y, Vioix H, Liu FX, Singh B, Sharma S, Sharda D. Diagnostic and economic value of biomarker testing for targetable mutations in non-small-cell lung cancer: a literature review. *Future Oncol.* 2022;18(4):505-518.
 48. Mack PC, Banks KC, Espenschied CR, Burich RA, Zill OA, Lee CE, Riess JW, Mortimer SA, Talasaz A, Lanman RB, Gandara DR. Spectrum of driver mutations and clinical impact of circulating tumor DNA analysis in non-small cell lung cancer: Analysis of over 8000 cases. *Cancer.* 2020;126(14):3219-3228.
 49. Reck M, Hagiwara K, Han B, Tjulandin S, Grohé C, Yokoi T, Morabito A, Novello S, Arriola E, Molinier O, McCormack R, Ratcliffe M, Normanno N. ctDNA Determination of EGFR Mutation Status in European and Japanese Patients with Advanced NSCLC: The ASSESS Study. *J Thorac Oncol.* 2016;11(10):1682-9.
 50. Yang CY, Shih JY, Liao WY, Ho CC, Hsu CL, Tsai TH, Wu SG, Lin YT, Hsu WH, Jain S, Olsen S, Yang JC, Yu CJ, Yang PC. Upfront liquid next-generation sequencing in treatment-naïve advanced non-small cell lung cancer patients: A prospective randomised study in the Taiwanese health system. *Eur J Cancer.* 2023;193:113310.
 51. Thein KZ, Biter AB, Banks KC, Duda AW, Saam J, Roszik J, Janku F, Skoulidis F, Heymach JV, Kopetz S, Meric-Bernstam F, Hong DS. Identification of KRASG12C Mutations in Circulating Tumor DNA in Patients With Cancer. *JCO Precis Oncol.* 2022;6:e2100547.
 52. Lin Z, Li Y, Tang S, Deng Q, Jiang J, Zhou C. Comparative analysis of genomic profiles between tissue-based and plasma-based next-generation sequencing in patients with non-small cell lung cancer. *Lung Cancer.* 2023;182:107282.
-

-
53. Mellert HS, Alexander KE, Jackson LP, Pestano GA. A Blood-based Test for the Detection of ROS1 and RET Fusion Transcripts from Circulating Ribonucleic Acid Using Digital Polymerase Chain Reaction. *J Vis Exp*. 2018;(134):57079.
 54. Giménez-Capitán A, Sánchez-Herrero E, Robado de Lope L, Aguilar-Hernández A, Sullivan I, Calvo V, Moya-Horno I, Viteri S, Cabrera C, Aguado C, Armiger N, Valarezo J, Mayo-de-Las-Casas C, Reguart N, Rosell R, Provencio M, Romero A, Molina-Vila MA. Detecting ALK, ROS1, and RET fusions and the MET Δ ex14 splicing variant in liquid biopsies of non-small-cell lung cancer patients using RNA-based techniques. *Mol Oncol*. 2023;17(9):1884-1897.
 55. Hasegawa N, Kohsaka S, Kurokawa K, Shinno Y, Takeda Nakamura I, Ueno T, Kojima S, Kawazu M, Suehara Y, Ishijima M, Goto Y, Kojima Y, Yonemori K, Hayashi T, Saito T, Shukuya T, Takahashi F, Takahashi K, Mano H. Highly sensitive fusion detection using plasma cell-free RNA in non-small-cell lung cancers. *Cancer Sci*. 2021;112(10):4393-4403.
 56. Pascual J, Attard G, Bidard FC, Curigliano G, De Mattos-Arruda L, Diehn M, Italiano A, Lindberg J, Merker JD, Montagut C, Normanno N, Pantel K, Pentheroudakis G, Popat S, Reis-Filho JS, Tie J, Seoane J, Tarazona N, Yoshino T, Turner NC. ESMO recommendations on the use of circulating tumour DNA assays for patients with cancer: a report from the ESMO Precision Medicine Working Group. *Ann Oncol*. 2022;33(8):750-768.
 57. Zhou J, Zhao C, Zhao J, Wang Q, Chu X, Li J, Zhou F, Ren S, Li X, Su C, Zhou C. Re-biopsy and liquid biopsy for patients with non-small cell lung cancer after EGFR-tyrosine kinase inhibitor failure. *Thorac Cancer*. 2019;10(4):957-965.
 58. Lin YT, Ho CC, Hsu WH, Liao WY, Yang CY, Yu CJ, Tsai TH, Yang JC, Wu SG, Hsu CL, Hsieh MS, Huang YL, Wu CL, Shih JY. Tissue or liquid rebiopsy? A prospective study for simultaneous tissue and liquid NGS after first-line EGFR inhibitor resistance in lung cancer. *Cancer Med*. 2023;13(1):e6870.
 59. Mok TS, Wu Y-L, Ahn M-J, Garassino MC, Kim HR, Ramalingam SS, Shepherd FA, He Y, Akamatsu H, Theelen WS, Lee CK, Sebastian M, Templeton A, Mann H, Marotti M, Ghiorghiu S, Papadimitrakopoulou VA; AURA3 Investigators. Osimertinib or Platinum-Pemetrexed in EGFR T790M-Positive Lung Cancer. *N Engl J Med*. 2017;376(7):629-640.
 60. Ramalingam, S.S.; Chen, Y.; Zhou, C.; Ohe, Y.; Imamura, F.; Cho, B.C.; Lin, M.-C.; Majem, M.; Shah, R.; Rukazenzov, Y.; et al. LBA50 Mechanisms of acquired resistance to first-line osimertinib: Preliminary data from the phase III FLAURA study. *Ann. Oncol*. 2018, 29, viii740.
 61. Tabbò F, Reale ML, Bironzo P, Scagliotti GV. Resistance to anaplastic lymphoma kinase inhibitors: knowing the enemy is half the battle won. *Transl Lung Cancer Res*. 2020;9(6):2545-2556.
 62. Smolle E, Taucher V, Lindenmann J, Jost PJ, Pichler M. Current Knowledge about Mechanisms of Drug Resistance against ALK Inhibitors in Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancers (Basel)*. 2021;13(4):699.
-

63. Sasaki T, Yoshida R, Nitanai K, Watanabe T, Tenma T, Kida R, Mori C, Umekage Y, Hirai N, Minami Y, Okumura S. Detection of resistance mutations in patients with anaplastic lymphoma kinase-rearranged lung cancer through liquid biopsy. *Transl Lung Cancer Res.* 2023;12(7):1445-1453.
 64. Kwon M, Ku BM, Olsen S, Park S, Lefterova M, Odegaard J, Jung HA, Sun JM, Lee SH, Ahn JS, Park K, Ahn MJ. Longitudinal monitoring by next-generation sequencing of plasma cell-free DNA in ALK rearranged NSCLC patients treated with ALK tyrosine kinase inhibitors. *Cancer Med.* 2022;11(15):2944-2956.
 65. Sánchez-Herrero E, Serna-Blasco R, Ivanchuk V, García-Campelo R, Dómine Gómez M, Sánchez JM, Massutí B, Reguart N, Camps C, Sanz-Moreno S, Calabuig-Fariñas S, Jantus-Lewintre E, Arnal M, Fernández-Orth D, Calvo V, González-Rumayor V, Provencio M, Romero A. NGS-based liquid biopsy profiling identifies mechanisms of resistance to ALK inhibitors: a step toward personalized NSCLC treatment. *Mol Oncol.* 2021;15(9):2363-2376.
 66. Ebert EBF, McCulloch T, Hansen KH, Linnet H, Sorensen B, Meldgaard P. Clearing of circulating tumour DNA predicts clinical response to first line tyrosine kinase inhibitors in advanced epidermal growth factor receptor mutated non-small cell lung cancer. *Lung Cancer.* 2020;141:37-43.
 67. Fernandes MGO, Sousa C, Pereira Reis J, Cruz-Martins N, Souto Moura C, Guimarães S, Justino A, Pina MJ, Magalhães A, Queiroga H, Marques JA, Machado JC, Costa JL, Hespanhol V. Liquid Biopsy for Disease Monitoring in Non-Small Cell Lung Cancer: The Link between Biology and the Clinic. *Cells.* 2021 Jul 28;10(8):1912.
 68. Szpechcinski A, Bryl M, Wojda E, Czyzewicz G, Swiniuch D, Szwiec M, Ramlau R, Sliwinski P, Barinow-Wojewodzki A, Chorostowska-Wynimko J. The clinical utility of longitudinal measurement of mutated EGFR in plasma of advanced NSCLC patients during EGFR-TKI treatment. *Eur Respir J* 2022;60(Suppl.66):2285.
 69. Szpechcinski A, Bryl M, Czyzewicz G, Wojda E, Swiniuch D, Szwiec M, Rudzinski S, Duk K, Ramlau R, Sliwinski P, Barinow-Wojewodzki A, Chorostowska-Wynimko J. Dynamic monitoring of EGFR mutations in circulating tumor DNA for early detection of drug resistance in NSCLC patients on EGFR-TKI therapy. *European Respiratory Journal* 2019;54(Suppl.63):OA1909.
 70. Remon J, Besse B, Aix SP, Callejo A, Al-Rabi K, Bernabe R, Greillier L, Majem M, Reguart N, Monnet I, Cousin S, Garrido P, Robinet G, Garcia Campelo R, Madroszyk A, Mazières J, Curcio H, Wasąg B, Pretzenbacher Y, Fournier B, Dingemans AC, Dziadziuszko R. Osimertinib treatment based on plasma T790M monitoring in patients with EGFR-mutant non-small-cell lung cancer (NSCLC): EORTC Lung Cancer Group 1613 APPLE phase II randomized clinical trial. *Ann Oncol.* 2023;34(5):468-476.
 71. Chalmers ZR, Connelly CF, Fabrizio D, Gay L, Ali SM, Ennis R, Schrock A, Campbell B, Shlien A, Chmielecki J, Huang F, He Y, Sun J, Tabori U, Kennedy M, Lieber DS, Roels S, White J, Otto GA, Ross JS, Garraway L, Miller VA, Stephens PJ, Frampton GM. Analysis of 100,000 human cancer genomes reveals the landscape of tumor mutational burden. *Genome Med.* 2017;9(1):34.
-

-
72. Marabelle A, Fakih M, Lopez J, Shah M, Shapira-Frommer R, Nakagawa K, Chung HC, Kindler HL, Lopez-Martin JA, Miller WH Jr, Italiano A, Kao S, Piha-Paul SA, Delord JP, McWilliams RR, Fabrizio DA, Aurora-Garg D, Xu L, Jin F, Norwood K, Bang YJ. Association of tumour mutational burden with outcomes in patients with advanced solid tumours treated with pembrolizumab: prospective biomarker analysis of the multicohort, open-label, phase 2 KEYNOTE-158 study. *Lancet Oncol.* 2020;21(10):1353-1365.
 73. Gandara DR, Paul SM, Kowanetz M, Schleifman E, Zou W, Li Y, Rittmeyer A, Fehrenbacher L, Otto G, Malboeuf C, Lieber DS, Lipson D, Silterra J, Amler L, Riehl T, Cummings CA, Hegde PS, Sandler A, Ballinger M, Fabrizio D, Mok T, Shames DS. Blood-based tumor mutational burden as a predictor of clinical benefit in non-small-cell lung cancer patients treated with atezolizumab. *Nat Med.* 2018;24(9):1441-1448.
 74. Socinski M, et al. Final efficacy results from B-FIRST, a prospective phase II trial evaluating blood-based tumour mutational burden (bTMB) as a predictive biomarker for atezolizumab (atezo) in 1L non-small cell lung cancer (NSCLC) *Ann. Oncol.* 2019;30:LBA83.
 75. Cohen JD, Li L, Wang Y, et al.. Detection and localization of surgically resectable cancers with a multi-analyte blood test. *Science* 2018;359:926–30.
 76. Cristiano S, Leal A, Phallen J, et al.. Genome-wide cell-free DNA fragmentation in patients with cancer. *Nature* 2019;570:385–9.
 77. Mathios D, Johansen JS, Cristiano S, Medina JE, Phallen J, Larsen KR, Bruhm DC, Niknafs N, Ferreira L, Adleff V, Chiao JY, Leal A, Noe M, White JR, Arun AS, Hruban C, Annapragada AV, Jensen SØ, Ørntoft MW, Madsen AH, Carvalho B, de Wit M, Carey J, Dracopoli NC, Maddala T, Fang KC, Hartman AR, Forde PM, Anagnostou V, Brahmer JR, Fijneman RJA, Nielsen HJ, Meijer GA, Andersen CL, Mellempgaard A, Bojesen SE, Scharpf RB, Velculescu VE. Detection and characterization of lung cancer using cell-free DNA fragmentomes. *Nat Commun.* 2021;12(1):5060.
 78. Rolfo C, Mack P, Scagliotti GV, Aggarwal C, Arcila ME, Barlesi F, Bivona T, Diehn M, Dive C, Dziadziszko R, Leighl N, Malapelle U, Mok T, Peled N, Raez LE, Sequist L, Sholl L, Swanton C, Abbosh C, Tan D, Wakelee H, Wistuba I, Bunn R, Freeman-Daily J, Wynes M, Belani C, Mitsudomi T, Gandara D. Liquid Biopsy for Advanced NSCLC: A Consensus Statement From the International Association for the Study of Lung Cancer. *J Thorac Oncol.* 2021;16(10):1647-1662.
 79. Russo A, Incorvaia L, Del Re M, Malapelle U, Capoluongo E, Gristina V, Castiglia M, Danesi R, Fassan M, Giuffrè G, Gori S, Marchetti A, Normanno N, Pinto C, Rossi G, Santini D, Sartore-Bianchi A, Silvestris N, Tagliaferri P, Troncone G, Cinieri S, Beretta GD. The molecular profiling of solid tumors by liquid biopsy: a position paper of the AIOM-SIAPEC-IAP-SIBioC-SIC-SIF Italian Scientific Societies. *ESMO Open.* 2021;6(3):100164.
-

9.

Finansowanie diagnostyki patomorfologicznej w ramach świadczeń gwarantowanych

mgr inż. Magdalena Sakowicz

mgr Iwona Sosnowska

W ostatnich latach stan diagnostyki patomorfologicznej, jej sposób organizacji i finansowanie badań patomorfologicznych nie gwarantował odpowiedniej jakości ich wykonania ani nie pozwalał na pełną ich dostępność. Należy podkreślić, że rola diagnostyki patomorfologicznej jest kluczowa i stanowi niezbędny element w procesie podejmowania decyzji terapeutycznych. Wynik badania, jego jakość oraz czas do jego otrzymania decyduje o czynnikach prognostycznych i wyborze dalszego sposobu leczenia pacjenta, zwłaszcza onkologicznego.

Diagnostyka patomorfologiczna od wielu lat jest niedofinansowana i wręcz w wielu podmiotach medycznych traktowana jako źródło wyłącznie kosztów, co wpływa bezpośrednio na jakość wykonywanych badań. Wprowadzenie w 2023 roku nowego modelu finansowania procedur patomorfologicznych zapewne będzie istotnym elementem poprawy efektywności diagnostyki i leczenia nowotworów, w tym raka płuca.

Po wielu latach działań Polskiego Towarzystwa Patologów oraz krajowego konsultanta w dziedzinie patomorfologii w 2017 ukazało się *Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dn. 27 grudnia 2017 r. w sprawie standardów organizacyjnych opieki zdrowotnej w dziedzinie patomorfologii [DZ.U.2017,poz.2435]*. Był to początek, który doprowadził do tego, że w tej chwili jesteśmy na etapie finansowania badań patomorfologicznych w onkologii.

W lutym 2020 Minister Zdrowia zainaugurował projekt poprawy jakości w diagnostyce patomorfologicznej „*Wsparcie procesu poprawy jakości w patomorfologii poprzez wdrożenie standardów akredytacyjnych oraz wzmocnienie kompetencji kadry zarządzającej podmiotami leczniczymi*”.

Projekt ruszył trzyetapowo. W pierwszej kolejności rozpoczęto wspólną pracę na wypracowaniem standardów organizacyjnych oraz standardów postępowania w patomorfologii - wytyczne dla zakładów/pracowni patomorfologicznych. Powstał dokument, który jest efektem pracy bardzo licznego grona patomorfologów i osób współpracujących oraz przedstawicieli Ministerstwa Zdrowia, Agencji Oceny Technologii Medycznej i Taryfikacji, Centrum Monitorowania Jakości w Ochronie Zdrowia. W opracowaniu uwzględniono również komentarze oraz spostrzeżenia przekazane przez podmioty lecznicze biorące udział w pilotażu, a także uwagi przekazane w trakcie publicznych konsultacji. Po szerokiej dyskusji w gronie eksperckim oraz wnikliwej analizie zgłoszonych uwag zaakceptowano standardy oraz przyjęto zasady postępowania w zakładach/pracowniach patomorfologicznych.

Aktualna wersja dokumentów: Standardy i wytyczne dla zakładów/pracowni patomorfologicznych



Źródło: <http://pol-pat.pl/index.php/standardy-i-wytyczne-w-patomorfologii/>

Źródło: https://www.cmj.org.pl/patomorfologia/04_zestaw-standardow-akredytacyjnych-dla-jdp.pdf

W ramach projektu oprócz opracowania standardów akredytacyjnych w zakresie patomorfologii w kolejnym etapie zaplanowano pilotaż (jakościowy) standardów akredytacyjnych realizowany przez Centrum Monitorowania Jakości w Ochronie Zdrowia.

Ostatecznie we wrześniu 2020 Ministerstwo Zdrowia zaakceptowało standardy oraz wytyczne organizacji zakładów patomorfologii, jak również jednoznaczne opisy zakresu wykonywanych czynności w trakcie całego procesu badania patomorfologicznego, tj. od chwili pobrania materiału do badania, poprzez etapy „techniczne” oraz niezbędne badania dodatkowe, a kończąc na formułowaniu i autoryzacji rozpoznania patomorfologicznego. Zarówno w przyjętych przez Ministerstwo standardach, jak i w projekcie finansowania badań patomorfologicznych (JGPato) precyzyjnie zdefiniowano czym jest rozpoznanie patomorfologiczne (histologiczne i cytologiczne), tj. wskazano, że jest to wynik badania patomorfologicznego ustalony na podstawie badań morfologicznych, danych klinicznych oraz wymaganych innych elementów, np. oceny czynników predykcyjnych i prognostycznych, i podpisany przez lekarza specjalistę patomorfologa. Nie ma wątpliwości, że jakość przekłada się na zwiększenie użyteczności wykonanych badań, a to wpływa na wybór odpowiedniej strategii leczenia.

Kolejnym, ostatnim etapem, który miał doprowadzić do wyceny i finansowania badań patomorfologicznych było opublikowanie *Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dn. 16 grudnia 2020 w sprawie programu pilotażowego dotyczącego kompleksowych badań patomorfologicznych JGPato (Dz. U. poz.2360)*. Głównym celem pilotażu (finansowego) było wypracowanie efektywnych kosztowo mechanizmów finansowania nowego modelu diagnostyki patomorfologicznej, weryfikacja modelu sprawozdawania badań patomorfologicznych oraz ocena wpływu elementów jakościowych na skuteczność diagnostyki patomorfologicznej, podniesienie jakości procesu diagnostyczno-leczniczego, optymalizacja postępowania diagnostyczno-terapeutycznego, w tym skrócenie czasu od postawienia rozpoznania do podjęcia optymalnego leczenia.

Ostatni etap, który doprowadził do finansowania badań patomorfologicznych był niezwykle trudny. W rozporządzeniu wytypowano 39 podmiotów leczniczych, jednak do udziału w projekcie zakwalifikowała się mniejsza ilość jednostek. Podmioty, które zadeklarowały udział mogły realizować kompleksową diagnostykę patomorfologiczną na zasadach określonych w programie pilotażowym do końca 2021. Pozyskane i zgromadzone informacje przez program pilotażowy posłużyły poza tym przy wdrażaniu standardów akredytacyjnych w zakresie patomorfologii w podmiotach leczniczych.

W połowie roku 2023 pojawiły się dwa zarządzenia Prezesa NFZ, które wprowadziły nowy model finansowania:

- » Zarządzenie NR 90/2023/DSOZ Prezesa Narodowego Funduszu Zdrowia z dnia 15 czerwca 2023 r. w sprawie określenia warunków zawierania i realizacji umów w rodzaju **leczenie szpitalne oraz leczenie szpitalne – świadczenia wysokospecjalistyczne**
- » Zarządzenie Nr 103/2023/DSOZ Prezesa Narodowego Funduszu Zdrowia z dnia 4 lipca 2023 r. zmieniające zarządzenie w sprawie określenia warunków zawierania i realizacji umów o udzielanie świadczeń opieki zdrowotnej w rodzaju **ambulatoryjna opieka specjalistyczna**

w katalogach, których wprowadzono nowe produkty rozliczeniowe umożliwiające w określonych przypadkach dodatkowe finansowanie kosztów badań patomorfologicznych.

Produkty rozliczeniowe: dodatkowe koszty diagnostyki patomorfologicznej możemy rozliczać pod warunkiem posiadania certyfikatów akredytacyjnych przez JDP w wielu zakresach m.in.:

1. *chirurgia dziecięca,*
2. *chirurgia klatki piersiowej; chirurgia klatki piersiowej dla dzieci; chirurgia klatki piersiowej specjalistyczna*
3. *chirurgia ogólna*
4. *chirurgia onkologiczna; chirurgia onkologiczna specjalistyczna; chirurgia onkologiczna dla dzieci*
5. *chirurgia plastyczna; chirurgia plastyczna specjalistyczna; chirurgia plastyczna dla dzieci*
6. *chirurgia szczękowo-twarzowa; chirurgia szczękowo-twarzowa specjalistyczna; chirurgia szczękowo-twarzowa dla dzieci*
7. *choroby płuc; choroby płuc dla dzieci; choroby płuc specjalistyczna; choroby płuc dla dzieci specjalistyczna*
8. *dermatologia i wenerologia; dermatologia i wenerologia dla dzieci;*
9. *dermatologia i wenerologia specjalistyczna; dermatologia i wenerologia dla dzieci specjalistyczna*
10. *endokrynologia; endokrynologia specjalistyczna; endokrynologia dla dzieci*
11. *gastroenterologia; gastroenterologia specjalistyczna; gastroenterologia dla dzieci*
12. *ginekologia onkologiczna*
13. *hematologia*
14. *neurochirurgia; neurochirurgia dla dzieci;*
15. *onkologia i hematologia dziecięca; onkologia kliniczna; onkologia kliniczna specjalistyczna*
16. *ortopedia i traumatologii narządu ruchu; ortopedia i traumatologii narządu ruchu dla dzieci;*
17. *otorynolaryngologia; otorynolaryngologia dla dzieci;*
18. *położnictwo i ginekologia; poł. i gin. - drugi p. ref.; poł. i gin. - trzeci p. ref.*
19. *urologia; urologia specjalistyczna; urologia dla dzieci.*

W uwagach przy produktach rozliczeniowych doprecyzowano, że produkty rozliczeniowe:

- » obejmują zakres badań określonych w załączniku nr 7a do zarządzenia;
- » produkty dedykowane są dla świadczeniodawców, posiadających certyfikat akredytacyjny lub certyfikat uczestnictwa w projekcie POWER;
- » produkty do sumowania ze świadczeniami udzielanymi na podstawie karty DiLO;
- » produkty są do rozliczenia w dacie hospitalizacji podczas, której pobrano materiał do badania, nie wcześniej niż po otrzymaniu jego wyniku;
- » nie można łącznie sprawozdawać wskazanych produktów;
- » zgodnie z zasadami określonymi w obwieszczeniu Ministra Zdrowia z dnia 24 września 2021 r. w sprawie standardów akredytacyjnych w zakresie udzielania świadczeń zdrowotnych oraz funkcjonowania jednostek diagnostyki patomorfologicznej.

W załączniku 7a zarządzenia NR 90/2023/DSOZ określono zakres badań przyporządkowanych do określonych produktów rozliczeniowych.

**Dodatkowy koszt diagnostyki patomorfologicznej
– materiał onkologiczny mały, 5.53.01.000165 wartość 161 pkt.**

- » obejmuje zakres badań określonych w lp. 1 załącznika nr 7a do zarządzenia;
- » produkt dedykowany dla świadczeniodawców, spełniających warunek określony w § 21 ust. 9-11 zarządzenia;
- » do sumowania ze świadczeniami udzielanymi na podstawie karty DiLO;
- » nie można wykazywać łącznie z produktami o kodach: 5.53.01.0001654 *Dodatkowy koszt diagnostyki patomorfologicznej - materiał onkologiczny duży*, oraz 53.01.0001655 *Dodatkowy koszt diagnostyki patomorfologicznej - materiał onkologiczny specjalny*;
- » zgodnie z zasadami określonymi w obwieszczeniu Ministra Zdrowia z dnia 24 września 2021 r. w sprawie standardów akredytacyjnych w zakresie udzielania świadczeń zdrowotnych oraz funkcjonowania jednostek diagnostyki patomorfologicznej.

Wykaz badań patomorfologicznych w chorobach nowotworowych					
Lp.	Typ badania	Rodzaj materiału	Sposób pobrania (kierunkowy, determinowany świadczeniem podstawowym JGP)	Topografia	Rozpoznanie (kierunkowe) zgodnie z ICD-10
1.	Materiał onkologiczny mały	Fragment narządu	Biopsja; Biopsja gruboigłowa Biopsja kleszczykowa Wycinki z oskrzela Wycinki z błony śluzowej Biopsja otwarta (VATS) Biopsja typu TRUCUT	<ul style="list-style-type: none"> • węzeł chłonny (przerzuty) • guzy mózgu (przerzuty) • gałka oczna z okolicznymi tkankami • małżowina uszna • ślinianka • materiał z jamy ustnej • materiał z jamy nosowej i/ lub zatok • materiał z przewodu pokarmowego • trzustka bez/lub z drogami żółciowymi • wątroba bez/lub z drogami żółciowymi • nerka • pęcherz moczowy • prostata • płuco • serce • zmiany skórne • materiały kostne • ściana klatki piersiowej • guzy tkanek miękkich 	Dotyczy rozpoznania nowotworu złośliwego na podstawie przeprowadzonego badania
		Trepanobiopsja	Trepanobiopsja	<ul style="list-style-type: none"> • przerzuty do kości (nie dotyczy rozrostów hematologicznych i mięsaków) 	

Lp.	Typ badania	Rodzaj materiału	Sposób pobrania (kierunkowy, determinowany świadczeniem podstawowym JGP)	Topografia	Rozpoznanie (kierunkowe) zgodnie z ICD-10
	Materiał onkologiczny mały	<p>Wycięcie narządu</p> <p>Wycięcie fragmentu narządu (* dotyczy materiału o śr. do 5,0 cm lub objętości do 250 ml)</p>	Wycięcie zmiany	<ul style="list-style-type: none"> *węzeł chłonny (przerzuty) *guzy mózgu (przerzuty) laryngektomia częściowa *małżowina uszna *migdałek/ migdałki *ślinianka *materiał z jamy ustnej *materiał z jamy nosowej i/ lub zatok *materiał z przewodu pokarmowego *trzustka bez/lub z drogami żółciowymi *wątroba bez/lub z drogami żółciowymi *pęcherzyk żółciowy *macica *jednostronnie lub obustronnie: jajnik lub jajowód; jajnik z jajowodem *nadnercze *przysadka *nerka *pęcherz moczowy *prącie *jądro *skóra (w tym blizna czerniak),zmiany skórne *materiały kostne *płuco *serce *guzy tkanek miękkich 	Dotyczy rozpoznania nowotworu złośliwego na podstawie przeprowadzonego badania
		Materiał do wykonania w technice cell-block	BAC/BCI (w tym pod kontrolą TK lub EUS/EBUS, EDUS-FNA lub USC); popłuczyny, wydzieliny, płwocina, biopsja szczoteczkowa z pobraniem materiału do opracowania w technice cell-block	<ul style="list-style-type: none"> · węzeł chłonny (przerzuty) · guzy mózgu · tkanki oczodołu · ślinianka, krtań, tchawica, tarczyca · materiał z przewodu pokarmowego · trzustka bez/lub z drogami żółciowymi · wątroba bez/lub z drogami żółciowymi · nerka, płuco, opłucna · zmiany skórne · materiały kostne, materiały guzów kości 	

Dodatkowy koszt diagnostyki patomorfologicznej
– materiał onkologiczny duży 5.53.01.0001654 wartość 918 pkt

- » obejmuje zakres badań określonych w lp. 2 załącznika nr 7a do zarządzenia;
- » produkt dedykowany dla świadczeniodawców, spełniających warunek określony w § 21 ust. 9-11 zarządzenia;
- » do sumowania ze świadczeniami udzielanymi na podstawie karty DiLO;
- » nie można wykazywać łącznie z produktami o kodach: 5.53.01.0001653, 53.01.0001655;
- » zgodnie z zasadami określonymi w obwieszczeniu Ministra Zdrowia z dnia 24 września 2021 r. w sprawie standardów akredytacyjnych w zakresie udzielania świadczeń zdrowotnych oraz funkcjonowania jednostek diagnostyki patomorfologicznej.

Wykaz badań patomorfologicznych w chorobach nowotworowych					
Lp.	Typ badania	Rodzaj materiału	Sposób pobrania (kierunkowy, determinowany świadczeniem podstawowym JGP)	Topografia	Rozpoznanie (kierunkowe) zgodnie z ICD-10
2.	Materiał onkologiczny duży	Resekowany narząd albo część narządu; resekcja narządu rozszerzona, resekcja zespołu narządów	Resekcja części narządu Resekcja całego narządu Resekcja rozszerzona Resekcja zespołu narządów	<ul style="list-style-type: none"> • guzy mózgu (przerzuty) • gałka oczna z okolicznymi tkankami bez/z węzłami chłonnymi • materiał z jamy ustnej bez/z węzłami chłonnymi • język bez/z węzłami chłonnymi • gardło środkowe, nosogardło, gardło dolne (operacje radykalne) bez/z węzłami chłonnymi • kości twarzoczaszki bez/z węzłami chłonnymi • skóra twarzy bez/z węzłami chłonnymi • tkanki miękkie (mięsaki inne niż w grupie badań specjalnych) bez/z węzłami chłonnymi • krtień (laryngektomia całkowita) bez/z węzłami chłonnymi • przewód pokarmowy (przełyk, żołądek, jelito cienkie; jelito grube; odbyt; odbytnica) bez/z węzłami chłonnymi • trzustka (op. Whippla) bez/z węzłami chłonnymi • wątroba z lub bez dróg żółciowych oraz bez/z węzłami chłonnymi • śledziona (rozpoznanie onkologiczne inne niż w „materiale onkologicznym specjalnym”) • nerka bez/z węzłami chłonnymi • jądro bez/z węzłami chłonnymi • jednostronnie lub obustronnie: jajnik lub jajowód; jajnik z jajowodem (operacja bez usunięcia macicy) 	Dotyczy rozpoznania nowotworu złośliwego na podstawie przeprowadzonego badania

Lp.	Typ badania	Rodzaj materiału	Sposób pobrania (kierunkowy, determinowany świadczeniem podstawowym JGP)	Topografia	Rozpoznanie (kierunkowe) zgodnie z ICD-10
	Materiał onkologiczny duży	Resekowany narząd albo część narządu; resekcja narządu rozszerzona, resekcja zespołu narządów	Resekcja części narządu Resekcja całego narządu Resekcja rozszerzona Resekcja zespołu narządów	<ul style="list-style-type: none"> Nadnercze prostate bez/z węzłami chłonnymi materiały kostne płuco bez/z węzłami chłonnymi piersi bez/z węzłami chłonnymi serce macica (resekcja prosta lub rozszerzona) z jednostronnym lub obustronnym usunięciem jajowodów/jajnika lub jajników; bez/z węzłami chłonnymi tarczycza bez/z węzłami chłonnymi pęcherz moczowy bez/z węzłami chłonnymi 	Dotyczy rozpoznania nowotworu złośliwego na podstawie przeprowadzonego badania

**Dodatkowy koszt diagnostyki patomorfologicznej
– materiał onkologiczny specjalny 5.53.01.0001655 wartość 776 pkt.**

- » obejmuje zakres badań określonych w lp. 3 załącznika nr 7a do zarządzenia;
- » produkt dedykowany dla świadczeniodawców, spełniających warunek określony w § 21 ust. 9-11 zarządzenia;
- » do sumowania ze świadczeniami udzielanymi na podstawie karty DiLO;
- » nie można wykazywać łącznie z produktami o kodach: 5.53.01.0001653, 53.01.0001654;
- » zgodnie z zasadami określonymi w obwieszczeniu Ministra Zdrowia z dnia 24 września 2021 r. w sprawie standardów akredytacyjnych w zakresie udzielania świadczeń zdrowotnych oraz funkcjonowania jednostek diagnostyki patomorfologicznej.

Wykaz badań patomorfologicznych w chorobach nowotworowych					
Lp.	Typ badania	Rodzaj materiału	Sposób pobrania (kierunkowy, determinowany świadczeniem podstawowym JGP)	Topografia	Rozpoznanie (kierunkowe) zgodnie z ICD-10
3.	Materiał onkologiczny specjalny	Biopsja gruboigłowa (oligobiopsja) (z wyłączeniem diagnostyki nowotworów piersi)	Biopsja gruboigłowa EUS – Biopsja pod kontrolą EUS TRU-CUT Biopsja gruboigłowa Biopsja stereotaktyczna Biopsja neuroendoskopowa Wycięcie zmiany Resekcja części narządu Resekcja całego narządu rozszerzona Resekcja narządu BTK - biopsja aspiracyjna cienkoigłowa pod kontrolą TK BUS – biopsja aspiracyjna cienkoigłowa pod kontrolą USG	węzeł chłonny, śródpiersie, guz, ośrodkowy układ nerwowy (diagnostyka chłoniaków) biopsje mięśnia i nerwu, pierwotny guz tkanek miękkich; śledziona	Dotyczy pełnej diagnostyki mięsaków i chłoniaków: nowotworów układu chłonnego i krwiotwórczego (np. chłoniaki, szpiczaki, białaczki, ostre i przewlekłe mieloproliferacje, mastocytoza, histiocytozy, choroba Castlemana)

Lp.	Typ badania	Rodzaj materiału	Sposób pobrania (kierunkowy, determinowany świadczeniem podstawowym JGP)	Topografia	Rozpoznanie (kierunkowe) zgodnie z ICD-10
Materiał onkologiczny specjalny		Trepanobiopsja	Trepanobiopsja	szpik	
		Fragment narządu	Biopsja chirurgiczna Biopsja gruboigłowa	węzeł chłonny, guz, zmiany skórne, materiały kostne, guzy tkanek miękkich (mięśnie; nerwy; tkanka tłuszczowa)	oraz diagnostyki nowotworów ośrodkowego układu nerwowego, diagnostyki chorób nerwowo-mięśniowych, czerniaków i nowotworów przydatkowych oraz łącznotkankowych i pęcherzowych skóry, genodermatozy itp.
		Wycięcie narządu	Resekcja narządu	śledziona	Nowotwory powiązane z łożyskiem i płytką paznokcia. w przypadku rozpoznania kończącego się podejrzeniem choroby nowotworowej – rozliczenie jak materiał onkologiczny mały
		Biopsja	Biopsja gruboigłowa Biopsja mammotomowa	piersź węzeł chłonny	Dotyczy pełnej pierwotnej diagnostyki raka piersi z czynnikami predykcyjnymi (w tym FISH jeśli wymagane)
		Wycięcie zmiany, Biopsja ze zmiany Resekowana część narządu		guzy ośrodkowego układu nerwowego	Dotyczy pełnej diagnostyki pierwotnych nowotworów układu nerwowego (w tym badania molekularne jeśli wymagane)
		Biopsja gruboigłowa; Biopsje fragmentów tkankowych Materiał do wykonania w technice cell-block	Biopsja gruboigłowa EUS/EBUS Biopsja transtorakalna TRU-CUT Materiał z bronchofiberoskopii Pobranie płynu z jam ciała Płwocina Popłuczyny	płuco śródpierście opłucna	Dotyczy pełnej diagnostyki raka płuca, nowotworów śródpierścia oraz opłucnej

Dodatkowy koszt diagnostyki patomorfologicznej
– materiał śródoperacyjny, 5.53.01.0001656 wartość 402 pkt.

- » obejmuje zakres badań określonych w lp.4 załącznika nr 7a do zarządzenia;
- » produkt dedykowany dla świadczeniodawców, spełniających warunek określony w § 21 ust. 9 -11 zarządzenia;
- » do sumowania ze świadczeniami udzielanymi na podstawie karty DiLO;
- » można sumować z produktami o kodach 5.53.01.0001653 - 53.01.0001655;
- » zgodnie z zasadami określonymi w obwieszczeniu Ministra Zdrowia z dnia 24 września 2021 r. w sprawie standardów akredytacyjnych w zakresie udzielania świadczeń zdrowotnych oraz funkcjonowania jednostek diagnostyki patomorfologicznej.

Wykaz badań patomorfologicznych w chorobach nowotworowych					
Lp.	Typ badania	Rodzaj materiału	Sposób pobrania (kierunkowy, determinowany świadczeniem podstawowym JGP)	Topografia	Rozpoznanie (kierunkowe) zgodnie z ICD-10
4.	Materiał śródoperacyjny	Badanie śródoperacyjne (jeden pacjent)	Pobranie materiału do badania doraźnego (intra) Wycięcie zmiany lub fragmentu zmiany		

Dodatkowo podmioty, które posiadają certyfikaty akredytacyjne mają szansę rozliczenie badań histopatologicznych w poradniach specjalistycznych. Zgodnie z Zarządzeniem Nr 103/2023/DSOZ Prezesa Narodowego Funduszu Zdrowia z dnia 4 lipca 2023 r. zmieniające zarządzenie w sprawie określenia warunków zawierania i realizacji umów o udzielanie świadczeń opieki zdrowotnej w rodzaju **ambulatoryjna opieka specjalistyczna** umożliwiono finansowanie dodatkowych kosztów diagnostyki patomorfologicznej.

Dodatkowy koszt diagnostyki patomorfologicznej w AOS
– materiał onkologiczny mały, kod produktu 5.05.00.0000108 wartość 217 pkt.

W załączniku nr 5c do zarządzenia dodano produkty rozliczeniowe:

- » do wykazania wyłącznie z odpowiednim pakietem diagnostyki wstępnej albo pogłębianej;
- » obejmuje zakres badań wskazanych w wykazie badań patomorfologicznych w chorobach nowotworowych określonych w obowiązującym zarządzeniu Prezesa NFZ w sprawie określenia warunków zawierania i realizacji umów w rodzaju leczenie szpitalne oraz leczenie szpitalne – świadczenia wysokospecjalistyczne, w części obejmującej zakres ambulatoryjnej opieki specjalistycznej;
- » produkt dedykowany dla świadczeniodawców posiadających certyfikat, o którym mowa w § 12 zarządzenia;
- » zgodnie z zasadami określonymi w obwieszczeniu Ministra Zdrowia z dnia 24 września 2021 r. w sprawie standardów akredytacyjnych w zakresie udzielania świadczeń zdrowotnych oraz funkcjonowania jednostek diagnostyki patomorfologicznej;
- » nie można wykazywać łącznie z produktem o kodzie: 5.05.00.0000109.

Dodatkowy koszt diagnostyki patomorfologicznej w AOS
– materiał onkologiczny specjalny, kod produktu 5.05.00.0000109 wartość 796 pkt.

- » do wykazania wyłącznie z odpowiednim pakietem diagnostyki wstępnej albo pogłębionej;
- » obejmuje zakres badań wskazanych w wykazie badań patomorfologicznych w chorobach nowotworowych określonych w obowiązującym zarządzeniu Prezesa NFZ w sprawie określenia warunków zawierania i realizacji umów w rodzaju leczenie szpitalne oraz leczenie szpitalne – świadczenia wysokospecjalistyczne, w części obejmującej zakres ambulatoryjnej opieki specjalistycznej;
- » produkt dedykowany dla świadczeniodawców posiadających certyfikat, o którym mowa w § 12 zarządzenia;
- » zgodnie z zasadami określonymi w obwieszczeniu Ministra Zdrowia z dnia 24 września 2021 r. w sprawie standardów akredytacyjnych w zakresie udzielania świadczeń zdrowotnych oraz funkcjonowania jednostek diagnostyki patomorfologicznej;
- » nie można wykazywać łącznie z produktem o kodzie: 5.05.00.0000108.

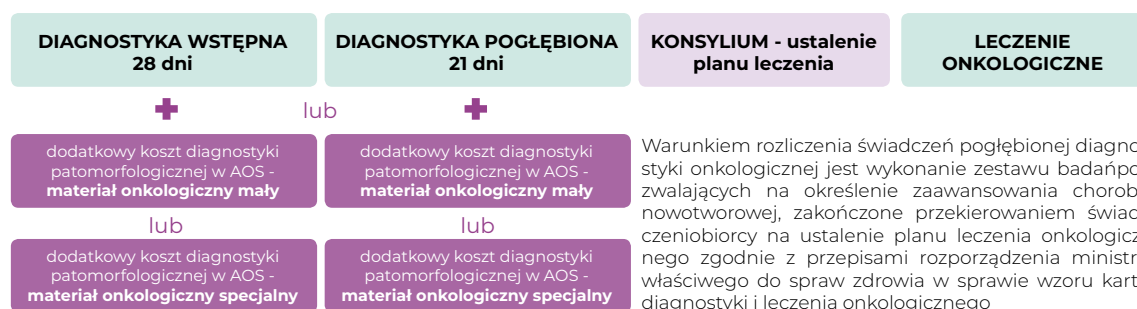
Warunkiem rozliczenia dodatkowych kosztów diagnostyki patomorfologicznej w AOS jest realizowanie świadczeń w ramach diagnostyki onkologicznej.

Produkty rozliczeniowe: dodatkowe koszty diagnostyki patomorfologicznej w AOS można wykazać wyłącznie z odpowiednim pakietem diagnostyki wstępnej albo pogłębionej.

Warunkiem rozliczenia dodatkowych kosztów diagnostyki patomorfologicznej w AOS jest realizowanie świadczeń w ramach diagnostyki onkologicznej

Produkty rozliczeniowe: dodatkowe koszty diagnostyki patomorfologicznej w AOS

Można wykazać wyłącznie z odpowiednim pakietem diagnostyki wstępnej albo pogłębionej



Badania patomorfologiczne w raku płuca

W Polsce otrzymujemy około 20 000 rozpoznań raka płuca rocznie, przy czym niedrobnokomórkowy rak płuca (NDRP) stanowi 80% rozpoznanych nowotworów płuca.

Zgodnie ze standardami postępowania i przykładami dobrej praktyki dla Jednostek Diagnostyki Patomorfologicznej diagnostykę nowotworów płuca wykonujemy z materiału cytologicznego, małego materiału tkankowego (oligobiopsja, biopsja) oraz dużego materiału tkankowego (operacyjnego). W przypadku badań konsultacyjnych, czy też oznaczenia czynników prognostycznych i predykcyjnych mamy również do dyspozy-

cji tzw. materiał archiwalny. Jedną z najczęściej stosowanych procedur zabiegowych w diagnostyce nowotworów płuca, a przede wszystkim w ocenie stopnia zaawansowania raka płuca, jest przezoskrzelowa biopsja śródpiersia lub płuca pod kontrolą ultrasonograficzną (EBUS-FNA) oraz przezoskrzelowa biopsja węzłów chłonnych (EUS-FNA).

W procedurze zabiegowej, jaką jest bronchoskopia, wykorzystuje się kilka metod pozwalających na pobranie materiału cytologicznego (rozmaży, cytobloki i histologicznego).

Tabela 2. Procedury bronchoskopowe stosowane w diagnostyce nowotworów płuca

Procedury bronchoskopowe, rodzaje wykonywanych zabiegów i rodzaje pozyskanego materiału do oceny patomorfologicznej		
Procedura	Nazwa zabiegu	Rodzaj materiału
Bronchoskopia	biopsja oskrzela, zmiany śródoskrzelowej	wycinki
	wymazy szczoteczkowe	cytologia
	popłuczyny/wydzielina oskrzelowa	cytologia
	płukanie oskrzelowo-pęcherzykowe (BAL)	cytologia
	przezoskrzelowa biopsja płuca (TBLB)	wycinki
	przezoskrzelowa aspiracyjna biopsja igłowa (TBNA)	cytologia
przezoskrzelowa biopsja śródpiersia lub płuca pod kontrolą ultrasonograficzną (EBUS-FNA)		cytologia
przezprzełykowa biopsja węzłów chłonnych (EUS-FNA) ¹		cytologia
1 – procedura nie wymieniona w grupie procedur zabiegowych ICD-9		

Źródło: <https://pol-pat.pl/index.php/standardy-i-wytyczne-w-patomorfologii/>

Do procedur diagnostycznych i zabiegowych wykorzystywanych w chorobach płuc zaliczamy:

1. Badania cytologiczne (cytologia złuszczeniowa, cytologia aspiracyjna),
2. Biopsja gruboigłowa – przezoskrzelowa, przez ścianę klatki piersiowej,
3. Biopsja endoskopowa – bronchofibroskopia, przezoskrzelowa,
4. Biopsja otwarta,
5. Brzeżne wycięcie (otwarta biopsja płuca, klinowa resekcja płuca, segmentektomia),
6. Radykalne wycięcie (torakotomia, torakotomia-VATS), lobektomia, bilobektomia, pneumonektomia),
7. Radykalne wycięcie połączone z usunięciem węzłów chłonnych, innych elementów tkankowych lub narządów.

Skierowania na badania patomorfologiczne

Podstawą wykonania badania patomorfologicznego jest skierowanie na badanie histopatologiczne, badanie cytologiczne, badanie konsultacyjne, czy badanie kwalifikacji do badań dodatkowych.

Właściwie wypełnienie skierowania jest obowiązkiem lekarzy, którzy przekazują materiał tkankowy i cytologiczny do badania patomorfologicznego.

W przypadku chorób płuc w skierowaniu należy obowiązkowo umieścić następujące informacje:

- » określenie rodzaju pobranego materiału,
- » określenie anatomicznej lokalizacji zmian,
- » określenie liczby pobranych wycinków, zwłaszcza w przypadku wykonania bronchofiberoskopii,
- » opis badania bronchofiberoskopowego, jeśli było wykonane,
- » informacje dotyczące długotrwanie stosowanych leków, przebytych terapii (zwłaszcza chemioterapii, radioterapii, leczenia immunosupresyjnego),
- » u chorych z podejrzeniem raka płuca wskazane jest umieszczenie informacji dotyczącej klinicznego stopnia zaawansowania nowotworu (cTNM), planowanego leczenia z adnotacją o konieczności wykonania badań predykcyjnych zależnie od rozpoznania patomorfologicznego (skierowanie warunkowe → na badanie kwalifikacji do badań dodatkowych),
- » w przypadku nacięcia guza poza zakładem/pracownią patomorfologii lub pobrania fragmentu zmiany do innych badań (np. molekularnych) należy ten fakt odnotować na skierowaniu.

Poniżej przedstawiono przykłady dobrej praktyki w zakresie skierowań na poszczególne rodzaje badania patomorfologicznego.

1. Skierowanie na badanie histopatologiczne

PR15.4-PE.W3.F1.W2					
Oznaczenie jednostki zlecającej			miejsce na naklepkę NIO-PIB		
SKIEROWANIE NA BADANIE HISTOPATOLOGICZNE					
Tryb wykonania:			Oczekiwana data wyniku (dla DLO, BCU, CCU)		
<input type="checkbox"/> RUTYNOWY <input type="checkbox"/> PILNY (oko) <input type="checkbox"/> BARDZO PILNY <input type="checkbox"/> Breast Cancer Unit (BCU) <input type="checkbox"/> Colorectal Cancer Unit (CCU) <input type="checkbox"/> DLO <input type="checkbox"/> Badanie kliniczne, nr protokołu			<input type="checkbox"/> DLO <input type="checkbox"/> BCU <input type="checkbox"/> CCU		
DANE PACJENTA (wypełnia lekarz zlecający)					
Imię (imiona) i nazwisko pacjenta			Płeć: <input type="checkbox"/> Kobieta <input type="checkbox"/> Męczyzna <input type="checkbox"/> Nieokreślona <input type="checkbox"/> Nieznana		
Numer PESEL		Numer PEI (z rozpisu szpitala NIO-PIB)		Data urodzenia (jeżeli brak PESEL)	
Dokument stwierdzający tożsamość:					
Adres miejsca zamieszkania:					
Imię (imiona) i nazwisko przedsiębiorcy usługowego?			Adres miejsca zamieszkania przedsiębiorcy usługowego?		
Rozpoznanie wstępne kliniczne:					
Czy pacjent ma wcześniejsze rozpoznanie cyto- lub histopatologiczne? <input type="checkbox"/> Tak (wskazać jakie?) <input type="checkbox"/> Nie					
Wcześniejsze rozpoznanie:					
Czy pacjent był poddany wcześniejszej chemo- lub radioterapii? <input type="checkbox"/> Tak <input type="checkbox"/> Nie					
Istotne dane kliniczne, wyniki dodatkowych badań diagnostycznych, działanie czynników zewnętrznych, aktualnie stosowane leczenie:					
Uwagi dotyczące wykonania badania:					
INFORMACJE DOTYCZĄCE POBRANEGO MATERIAŁU (wypełnia lekarz zlecający)					
Nr	Metoda obróbki	Rodzaj materiału	Lokalizacja anatomiczna zmiany	Typ zabiegu	Dotyczyłość zabiegu
1.	<input type="checkbox"/> Neuformalny <input type="checkbox"/> 10% formalina <input type="checkbox"/> Chłód <input type="checkbox"/> Inny: _____				<input type="checkbox"/> Cała zmiana <input type="checkbox"/> Fragment zmiany
2.	<input type="checkbox"/> Neuformalny <input type="checkbox"/> 10% formalina <input type="checkbox"/> Chłód <input type="checkbox"/> Inny: _____				<input type="checkbox"/> Cała zmiana <input type="checkbox"/> Fragment zmiany
Data i godzina pobrania materiału:			Data wykonania skierowania:		Liczba pojemników:
Data i godzina otrzymania materiału:			Przyjęty		Oznaczenie lekarza zlecającego:

2. Skierowanie na badanie cytologiczne

Oznaczenie jednostki zlecającej		PR15.4_P18.W3_F2_W0		miejsce na nalepkę NIO-PiB	
SKIEROWANIE NA BADANIE CYTOLOGICZNE					
Tryb wykonania:		<input type="checkbox"/> RUTYNYWY <input type="checkbox"/> PILNY (otło) <input type="checkbox"/> BARDZO PILNY <input type="checkbox"/> Breast Cancer Unit (BCU) <input type="checkbox"/> Colorectal Cancer Unit (CCU) <input type="checkbox"/> DŁO <input type="checkbox"/> Badanie kliniczne, nr protokołu:		Oczekiwana data wyniku (do DŁO, BCU, CCU):	
DANE PACJENTA (wypełnia lekarz zlecający)		Płeć: <input type="checkbox"/> Kobieta <input type="checkbox"/> Męczyzna <input type="checkbox"/> Nieokreślona <input type="checkbox"/> Nieznana			
Imię (inaczej) i nazwisko pacjenta		Numer PESEL		Numer PIO (w przypadku pacjenta NIO-PiB)	
Data urodzenia (jeżeli brak PESEL)		Data urodzenia (jeżeli brak PESEL)			
Dokument stwierdzający tożsamość ¹ :					
Adres miejsca zamieszkania ² :					
Imię (inaczej) i nazwisko przedstawiciela ustawowego ³		Adres miejsca zamieszkania przedstawiciela ustawowego ³			
Rozpoznanie wspłgne kliniczne: <input type="checkbox"/> Tak (wskazać jakie?) <input type="checkbox"/> Nie					
Czy pacjent ma wcześniejsze rozpoznanie cyto- lub histopatologiczne? <input type="checkbox"/> Tak (wskazać jakie?) <input type="checkbox"/> Nie					
Wcześniejsze rozpoznanie:					
Czy pacjent był poddany wcześniejszej chemo- lub radioterapii? <input type="checkbox"/> Tak <input type="checkbox"/> Nie					
Istotne dane kliniczne, wyniki dodatkowych badań diagnostycznych, stosowane leczenie:					
Uwagi dotyczące wykonania badania:					
INFORMACJE DOTYCZĄCE POBRANEGO MATERIAŁU³ (wypełnia lekarz zlecający)					
Nr	Metoda ubrwienia	Rodzaj materiału	Lokalizacja anatomiczna zmiany	Typ zabiegu	Dane dodatkowe
1.	<input type="checkbox"/> Neutrwalony <input type="checkbox"/> alk. etyl. 96% <input type="checkbox"/> Inny: _____				<input type="checkbox"/> rozmary na szkiełkach _____ szt.
2.	<input type="checkbox"/> Neutrwalony <input type="checkbox"/> alk. etyl. 96% <input type="checkbox"/> Inny: _____				<input type="checkbox"/> rozmary na szkiełkach _____ szt.
Data i godzina pobrania materiału:		Data wyznaczenia skierowania:		Liczba pojemników	
Data i godzina ubrwienia materiału:		Proje		Oznaczenie lekarza zlecającego:	
Data i godzina otrzymania materiału do badania (wypełnia laboratorysta):					

Formularz zawiera zastrzeżenia dotyczące odpowiedzialności lekarza i technika wykonania badania. Informacje o odpowiedzialności lekarza znajdują się na odwrocie. © zaszczepienie

3. Skierowanie na badanie konsultacyjne

Oznaczenie jednostki zlecającej		PR15.4_P18.W3_F3_W0		miejsce na nalepkę NIO-PiB	
SKIEROWANIE NA BADANIE KONSULTACYJNE					
Tryb wykonania:		<input type="checkbox"/> RUTYNYWY <input type="checkbox"/> PILNY (otło) <input type="checkbox"/> BARDZO PILNY <input type="checkbox"/> BREAST CANCER UNIT (pilny) <input type="checkbox"/> DŁO (pilny) <input type="checkbox"/> Badanie kliniczne, nr protokołu:		Oczekiwana data wyniku (do DŁO):	
DANE PACJENTA (wypełnia lekarz zlecający)		Płeć: <input type="checkbox"/> Kobieta <input type="checkbox"/> Męczyzna <input type="checkbox"/> Nieokreślona <input type="checkbox"/> Nieznana			
Imię (inaczej) i nazwisko pacjenta		Numer PESEL		Numer PIO (w przypadku pacjenta NIO-PiB)	
Data urodzenia (jeżeli brak PESEL)		Data urodzenia (jeżeli brak PESEL)			
Dokument stwierdzający tożsamość ¹ :					
Adres miejsca zamieszkania ² :					
Imię (inaczej) i nazwisko przedstawiciela ustawowego ³		Adres miejsca zamieszkania przedstawiciela ustawowego ³			
Rozpoznanie wspłgne kliniczne: <input type="checkbox"/> Tak (wskazać jakie?) <input type="checkbox"/> Nie					
Czy pacjent ma wcześniejsze rozpoznanie cyto- lub histopatologiczne? <input type="checkbox"/> Tak (wskazać jakie?) <input type="checkbox"/> Nie					
Wcześniejsze rozpoznanie:					
Czy pacjent był poddany wcześniejszej chemo- lub radioterapii? <input type="checkbox"/> Tak <input type="checkbox"/> Nie					
Istotne dane kliniczne, wyniki dodatkowych badań diagnostycznych, działanie czynników zewnętrznych, aktualnie stosowane leczenie:					
Uwagi dotyczące wykonania badania:					
MATERIAŁ DOSTARCZONY DO KONSULTACJI (wypełnia lekarz zlecający)					
Preparaty histopatologiczne/cytologiczne/bločki parafinowe – oryginalne numery oraz ilość:					
<input type="checkbox"/> preparaty histopatologiczne nr _____		<input type="checkbox"/> ilość _____			
<input type="checkbox"/> preparaty cytologiczne nr _____		<input type="checkbox"/> ilość _____			
<input type="checkbox"/> bločki parafinowe nr _____		<input type="checkbox"/> ilość _____			
<input type="checkbox"/> oryginalne rozpoznanie patomorfologiczne					
Typ zabiegu:		Metoda ubrwienia:			
Adres do wysyłki ² :					
Data i godzina pobrania materiału:		UWAGA! NALEŻY DOLĄCZYĆ ORYGINALNE ROZPOZNIANIE PATOMORFOLOGICZNE! BADANIA ZLECONE BEZ ORYGINALNEGO ROZPOZNIANIA NIE ZOSTAJĄ PODJĘTE			
Data i godzina ubrwienia materiału:					
Data wyznaczenia skierowania:					
Data i godzina otrzymania materiału (wypełnia laboratorysta):		Proje		Oznaczenie lekarza zlecającego:	

Formularz zawiera zastrzeżenia dotyczące odpowiedzialności lekarza i technika wykonania badania. Informacje o odpowiedzialności lekarza znajdują się na odwrocie. © zaszczepienie

4. Skierowanie na badanie kwalifikacji do badań dodatkowych

Główny adresat skierowania		PR15.4_P5.W3_P5.W3	
		miejsce na naklepkę NIC-PIB	
SKIEROWANIE NA BADANIE KWALIFIKACJI DO BADAŃ DODATKOWYCH			
Tryb wykonania: <input type="checkbox"/> SŁUTYNOWY <input type="checkbox"/> PŁYNY (otła) <input type="checkbox"/> BARDZO PŁYNY <input type="checkbox"/> Szersza data wyniku (sta. DLO, BCU, COU)			
<input type="checkbox"/> Breast Cancer Unit (BCU) <input type="checkbox"/> Colorectal Cancer Unit (COU) <input type="checkbox"/> DLO			
<input type="checkbox"/> Badanie kliniczne, nr protokołu:			
DANE PACJENTA (wypełnia lekarz skierujący)			
Imię (imię) i nazwisko pacjenta		Płeć: <input type="checkbox"/> Kobieta <input type="checkbox"/> Męczyzna	
Numer PESEL		Numer PE (w przypadku pacjenta NIC-PIB)	
		Data urodzenia (jeżeli brak PESEL)	
Dokument stwierdzający tożsamość ¹ :			
Adres miejsca zamieszkania ² :			
Imię (imię) i nazwisko przedstawiciela ustawowego ³		Adres miejsca zamieszkania przedstawiciela ustawowego ⁴	
Rozpoznanie wstępne kliniczne:			
Czy pacjent ma wcześniejsze rozpoznanie cyto- lub histopatologiczne? <input type="checkbox"/> Tak (wskazać jakie?) <input type="checkbox"/> Nie			
Wcześniejsze rozpoznanie:			
Czy pacjent był poddany wcześniejszej chemo- lub radioterapii? <input type="checkbox"/> Tak <input type="checkbox"/> Nie			
Istotne dane kliniczne, wyniki dodatkowych badań diagnostycznych, działanie czynników zewnętrznych, aktualnie stosowane leczenie:			
Uwagi dotyczące wykonania badania:			
INFORMACJE DOTYCZĄCE RODZAJU KWALIFIKACJI (wypełnia lekarz skierujący)			
1.	<input type="checkbox"/> Molekularne <input type="checkbox"/> FISH <input type="checkbox"/> NGS	Wpisać nazwę badanego genu	
2.	<input type="checkbox"/> Immunohistochemiczne	Wpisać nazwę oznaczenia IHC	
MATERIAŁ DOSTARCZONY DO KWALIFIKACJI (wypełnia lekarz skierujący)			
<input type="checkbox"/> Badanie histopatologiczne nr.		<input type="checkbox"/> oryginalne rozpoznanie histopatologiczne	
<input type="checkbox"/> Badanie cytologiczne nr.		<input type="checkbox"/> oryginalne rozpoznanie cytologiczne	
Typ zabiegu:		Metoda utrwalenia:	
Adres do wysyłki ⁵ :			
Data i godzina pobrania materiału:		Data wyznaczenia skrawka:	
Data i godzina utrwalenia materiału:			
Data i godzina otrzymania materiału do badania (wypełnia laboratorium):		Pojazd	
		Oznaczenie lekarza skierującego:	

Formularz dostępny wyłącznie w systemie elektronicznym. Informacja o sposobie wypełnienia formularza znajduje się na stronie.

W zakresie prawidłowego opracowania materiału cytologicznego pobrany materiał należy zabezpieczyć w postaci rozmazów cytologicznych (nie więcej niż dwa szkiełka), a pozostały należy utrwalić 10% roztworem buforowanej formaliny (pH 7,2-7,4) w celu wykonania cytobloku, które obecnie w diagnostyce raka płuca są preferowanym materiałem cytologicznym. Rozmazы utrwalamy 96% alkoholem etylowym.

W małym materiale tkankowym (oligobiopsja) należy określić liczbę nadesłanych wycinków, w przypadku materiału biopsyjnego, wycinków z płuca, fragmentów tkankowych materiał należy umieścić w pojemniku z 10% roztworem buforowanej formaliny (pH 7,2-7,4). Czas utrwalania małego materiału nie powinien przekroczyć 48 godzin.

Materiał duży operacyjny: płuco, segment, fragment płuca należy rozprężyć poprzez nastryknięcie mięszu 10% roztworem buforowanej formaliny (pH 7,2-7,4) i utrwalać zgodnie ze standardem dla dużych materiałów tkankowych w czasie od 6 do 72 godzin.

Materiał zabezpieczony w postaci cytobloków, jak również mały materiał tkankowy (oligobiopsja, biopsja), zwłaszcza w przypadku diagnostyki raka płuca, wymaga bardzo oszczędnego i przemyślanego skrawania bloczków parafinowych. Wskazane jest wykonanie 2-3 skrawków zabarwionych metodą HE. Dalsze postępowanie w przypadku pacjentów z zaawansowanym niedrobnokomórkowym rakiem płuca (NRDP), innym niż płaskonabłonkowy wymaga wykonania kolejno:

- » mutacji EGFR, jeżeli brak mutacji to:
- » ekspresji ALK (badanie immunohistochemiczne)/rearanżacja ALK, jeżeli wynik negatywny, to:
- » rearanżacja ROS1, jeżeli brak, to u pacjentów w IV stopniu zaawansowania:
- » PD-L1 badaniem immunohistochemicznym.

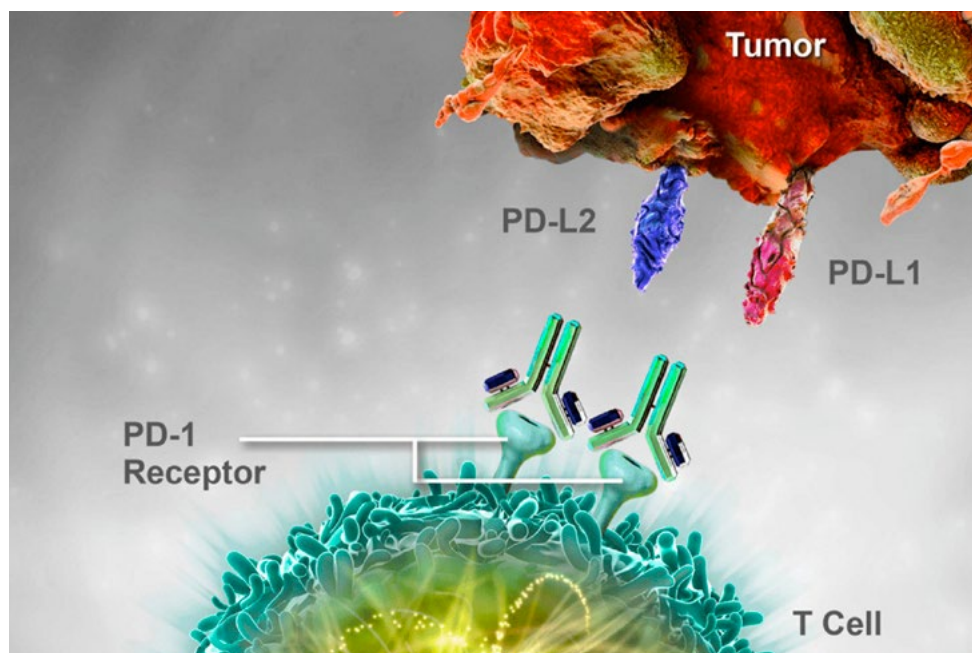
W Ośrodkach dysponujących technikami sekwencjonowania następnej generacji (NGS) dopuszcza się, w celu minimalizacji czasu oczekiwania na wynik, wykonanie badań molekularnych techniką NGS.

W przypadku dużych materiałów tkankowych (operacyjnych) do badania należy pobrać reprezentatywne wycinki z każdej stwierdzonej zmiany lub zmienionego obszaru, dodatkowo należy pobrać co najmniej 1-3 wycinków niezmienionego mięszu. Należy również pobrać wszystkie znalezione węzły chłonne z określeniem ich lokalizacji. Dal-sze postępowanie w przypadku pacjentów z zaawansowanym niedrobnokomórkowym rakiem płuca (NDRP), jak w przypadku materiałów opracowanych techniką cytoblok i małych materiałów tkankowych.

Oznaczenie PD-L1

Oznaczenie PD-L1 wykonujemy na materiale tkankowym, materiale cytologicznym opracowanym techniką cytoblok; ze względu na brak walidacji, do badania nie nadają się rozmazy cytologiczne. Badanie immunohistochemiczne PD-L1 służy do wykrycia obecności białka PD-L1 w tkance nowotworowej, a jego obecność na komórkach umożliwia dostosowanie leczenia do indywidualnego pacjenta (terapia personalizowana) z zastosowaniem określonej immunoterapii lekami biologicznymi o charakterze przeciwciał. Immunoterapia jest zatem metodą leczenia polegającą na wzmacnieniu aktywności układu odpornościowego pacjenta do skutecznej walki z nowotworem. Immunoterapia obejmuje inhibitory immunologicznego punktu kontrolnego, hamujące szlaki przekazywania sygnałów związane z receptorami, które w fizjologicznych warunkach przywracają i utrzymują aktywność układu odpornościowego gospodarza przeciw komórkom nowotworowym, w tym receptora zaprogramowanej śmierci komórki 1 (*ang. programmed death 1, PD-1*) i ligandu dla receptora zaprogramowanej śmierci komórki 1 (*ang. programmed death ligand 1, PD-L1*).

Rycina 1. Szlak sygnałowy PD1/PD-L1



Źródło: <https://www.termedia.pl/onkologia/Immunoterapia-jak-wyniki-badan-klinicznych-zmieniaja-algorytmy-leczenia-chorych-na-NDRP>

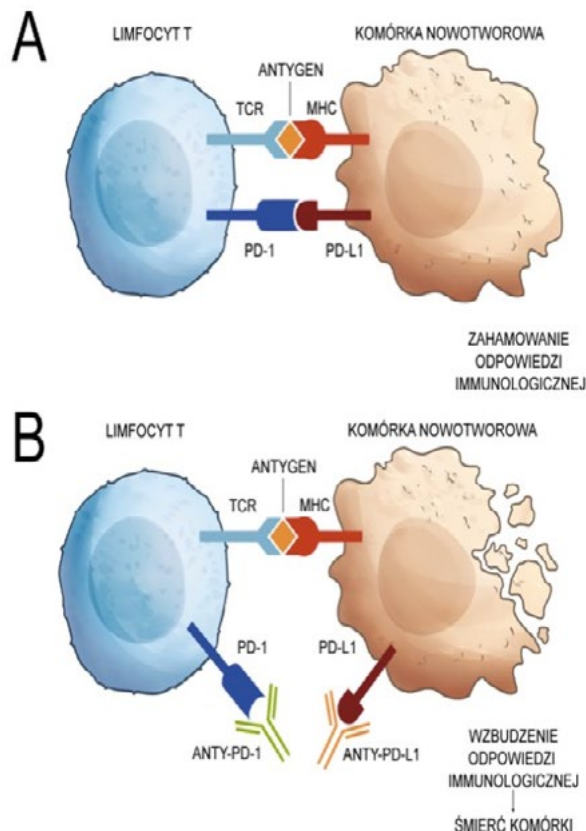
W szlaku sygnałowym PD1/PD-L1 główną rolę odgrywają limfocyty T, komórki odpowiadające za przebieg odpowiedzi immunologicznej. Na powierzchni limfocytów T znajdują się receptory immunologicznych punktów kontroli. Wyróżniamy 2 typy immunologicznych punktów kontroli:

- » cząsteczki aktywujące limfocyt, w efekcie powodujące pozytywną stymulację odpowiedzi immunologicznej,
- » cząsteczki hamujące limfocyt T, w efekcie powodujące wyhamowanie odpowiedzi immunologicznej (*PD-1- programmed death 1*).

Cząsteczka PD-1 wytwarza wiązanie z jednym z ligandów. Ligandy PD-L1 i PD-L2 współzawodniczą o wiązanie z PD-1, jednak to PD-1 pełni główną rolę w regulacji szlaku PD-1/PD-L1. Wiązanie PD-1 z PD-L1 wywołuje zmianę konformacji przestrzennej ligandu i prowadzi do wyczerpania efektorowych limfocytów T.

W immunoterapii stosuje się przeciwciała monoklonalne, które są skierowane przeciwko cząsteczkom hamującym aktywność limfocytów (są to inhibitory „ujemnych” immunologicznych punktów kontroli), co w efekcie powoduje zablokowanie przekazywania sygnałów hamujących limfocyt, a tym samym przywrócenie jego funkcji. Przeciwciała te są skierowane przeciwko cząsteczce PD-1 bądź jednego z jej ligandów, mianowicie cząsteczki PD-L1.

Rycina 2. Mechanizm działania inhibitorów PD-1 oraz PD-L1 na odpowiedź immunologiczną



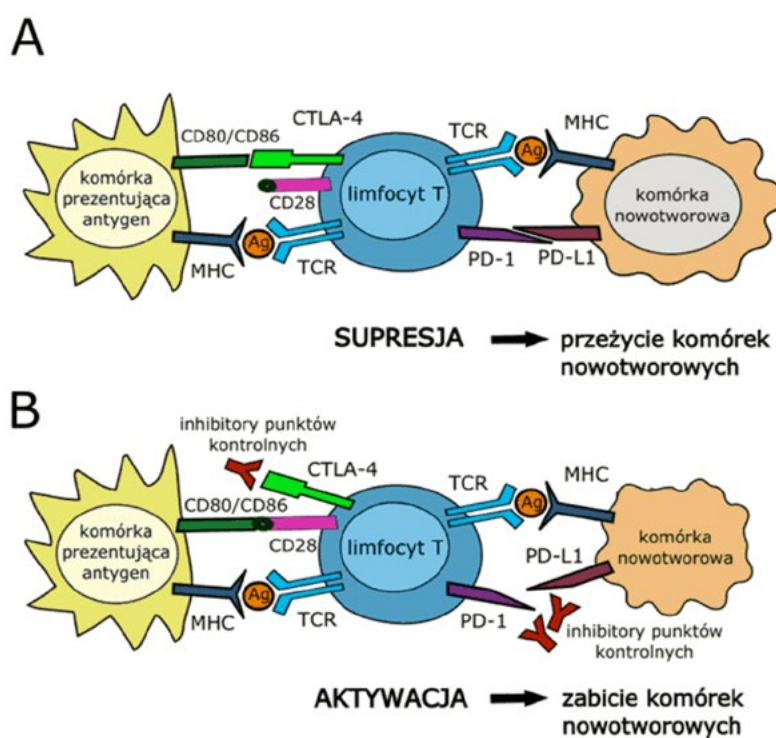
Źródło: Acta Haematologica Polonica 49(4) · December 2018 · 207-227 · DOI: 10.2478/ahp-2018-0025 Immunoterapia z użyciem przeciwciał monoklonalnych ukierunkowanych na szlak PD-1/PD-L1 w chorobach nowotworowych

(A) Do pobudzenia odpowiedzi immunologicznej wymagana jest interakcja TCR z cząsteczką MHC prezentującą antygen komórki. Prawidłowa odpowiedź ukierunkowana

na komórkę nowotworową nie jest jednak możliwa na skutek interakcji cząsteczek PD-1 oraz PD-L1.

(B) Zablokowanie cząsteczek PD-1 i PD-L1 przy pomocy przeciwciał monoklonalnych skutkuje wzbudzeniem odpowiedzi immunologicznej, prowadząc do zniszczenia komórki nowotworowej. TCR (T-cell receptor) – receptor limfocytu T; MHC (major histocompatibility complex) – główny układ zgodności tkankowej; PD-1 (programmed death receptor 1) – receptor programowanej śmierci 1; PD-L1 (programmed death ligand 1) – ligand programowanej śmierci 1.

Rycina 3. Mechanizmy immunosupresji, w których pośredniczą negatywne receptory CTLA-4- i PD-1 oraz stymulacja przeciwnowotworowych limfocytów T za pośrednictwem hamujących przeciwciał monoklonalnych



Źródło: <https://immuno-onkologia.pl/blokada-punktow-kontrolnych-ukladu-odpornosciowego/>

(A) Mechanizm działania punktów kontrolnych hamujących odpowiedź immunologiczną.

CTLA-4 z dużym powinowactwem wiąże się z cząsteczkami CD80 i CD86 na komórce prezentującej antygen, uniemożliwiając ich wiązanie z cząsteczką kostymulującą CD28, co prowadzi do wytłumienia aktywacji limfocytu T. Związanie PD-1 na limfocycie T z jego ligandem PD-L1 na komórce nowotworowej hamuje aktywację odpowiedzi immunologicznej.

(B) Zastosowanie inhibitorów punktów kontrolnych umożliwia oddziaływanie CD80/86 z cząsteczką kostymulującą CD28 oraz blokuje oddziaływanie PD-1 z PD-L1, co w konsekwencji prowadzi do aktywacji limfocytu T i zabicia komórek nowotworowych.

Procedura wykonania oznaczenia PD-L1 metodą immunohistochemiczną

Procedura wykonywania oznaczenia PD-L1 zakłada wykonanie oznaczenia na preparatach mikroskopowych naładowanych dodatkowo z naniesionym skrawkiem parafinowym grubości 4-5µm, zawierającym badaną tkankę. Tak przygotowane preparaty należy wygrzać w temperaturze 58°C ± 2°C przez okres 60 minut. Dopuszcza się przechowywanie preparatów w ciemności w temperaturze 2-8°C (warunki preferowane) lub w temperaturze pokojowej nieprzekraczającej 25°C do momentu barwienia IHC nie dłużej niż 6 miesięcy (PD-L1 klon 22C3) i nie dłużej niż 2 miesiące (PD-L1 klon SP142 i SP263). Archiwizacja bloczków parafinowych z zatopionym materiałem tkankowym dla prawidłowego wykonania oznaczenia PD-L1 wynosi nie dłużej niż 5 lat.

Obecnie dostępne są następujące warianty wykonywania testów PD-L1:

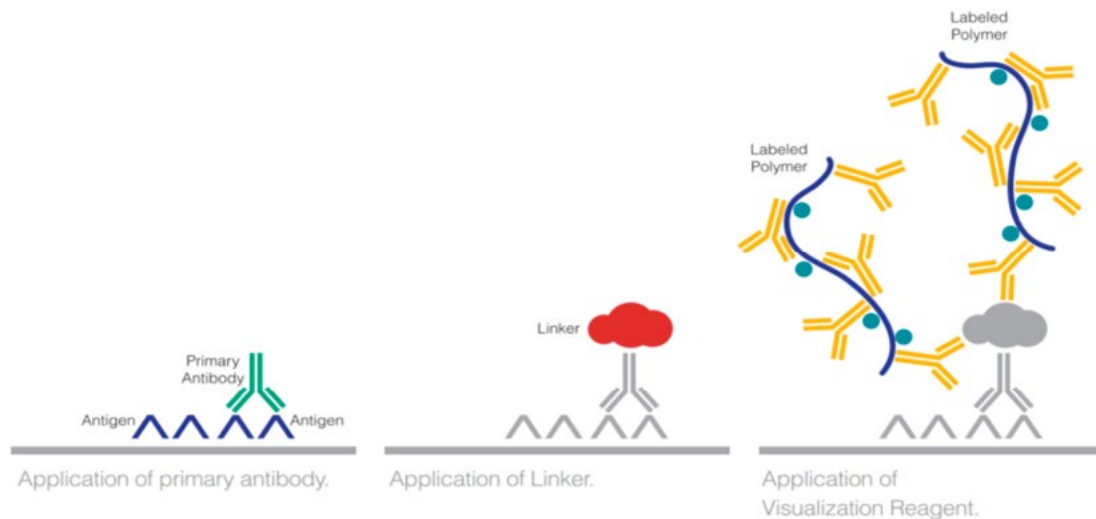
- » monoklonalne mysie przeciwciało anti-PD-L1 firmy DAKO (PD-L1 IHC 22C3 pharmDx), system wizualizacji EnVision FLEX, automat barwiący Autostainer Link 48 lub Omnis;
- » monoklonalne mysie przeciwciało anti-PD-L1 firmy DAKO (PD-L1 IHC 22C3) system wizualizacji EnVision Flex, metoda manualna;
- » monoklonalne królicze przeciwciało anti-PD-L1 firmy DAKO (PD-L1 28-8 pharmDx), system wizualizacji EnVision FLEX, automat barwiący Autostainer Link 48;
- » monoklonalne królicze przeciwciało anti-PD-L1 firmy VENTANA (VENTANA PD-L1 SP142), system wizualizacji VENTANA OptiView DAB IHC Detection Kit i OptiView Amplification Kit, automat barwiący VENTANA Benchmark Ultra;
- » monoklonalne królicze przeciwciało anti-PD-L1 firmy VENTANA (VENTANA PD-L1 SP263), system wizualizacji OptiView Amplification Kit, aparat barwiący VENTANA Benchmark Ultra.

Wybór wariantu testu PD-L1 dostosowuje się do typu nowotworu oraz określonej immunoterapii.

Procedura wykonania oznaczenia PD-L1 metodą immunohistochemiczną składa się następujących po sobie etapów:

- » Odparafinowanie, nawodnienie i odmaskowanie antygenu,
- » Inkubacja z pierwotnym przeciwciałem skierowanym przeciwko PD-L1,
- » Inkubacja z przeciwciałem (Linker) swoistym dla gatunku gospodarza przeciwciała pierwotnego,
- » Inkubacja z odczynnikami do wizualizacji składającym się z cząsteczek przeciwciała drugorzędowego i cząsteczek peroksydazy chrzanowej z polimerowym szkieletem dekstranu,
- » Wytrącanie się osadu będącego widocznym produktem reakcji w miejscu występowania antygenu,
- » Wizualizacja barwna reakcji chromogennej w zależności od odczynnika wzmacniającego działanie chromogenu,
- » Barwienie kontrastowe badanej próbki Hematoksyliną.

Schemat 1. Procedura wykonania oznaczenia PD-L1 metodą immunohistochemiczną



Źródło: https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/29158_pd-1l-ihc-22c3-pharmdx-nslc-interpretation-manual.pdf

Ocena testu wymaga skrojenia trzech kolejnych preparatów bloczka parafinowego:

- » w celu wykonania barwienia HE,
- » w celu wykonania barwienia z kontrolą negatywną (monoklonalne przeciwciało mysie Ig) - ujemna kontrola odczynnika stosowana jest w celu oceny wybarwienia tła,
- » w celu wykonania zasadniczej reakcji z przeciwciałem PD-L1, klon 22C3 lub SP142 lub SP263.

Do każdego testu immunohistochemicznego konieczne jest wykonanie pozytywnej i negatywnej kontroli jakości reakcji. Kontrola pozytywna wykonywana jest dla potwierdzenia prawidłowego działania odczynników. Jeżeli występuje brak odczynu wynik badanego preparatu należy uznać za nieważny. Kontrola negatywna wykonywana jest w celu wykrycia ewentualnego odczynu nieswoistego. Jeżeli nie jest możliwe jednoznaczne odróżnienie odczynu nieswoistego od swoistego należy uznać wynik preparatu za nieważny.

Przykładem dodatniej i ujemnej kontroli tkankowej dla testu PD-L1 jest wycinek z prawidłowego migdałka ludzkiego, który zawiera zarówno nabłonek jak i komórki immunologiczne:

- » Barwienie PD-L1 dodatnie w obrębie krypt oraz w grudkach chłonnych,
- » Barwienie PD-L1 ujemne w nabłonku płaskim powierzchniowym i komórkach przestrzeni między grudkowych.

Interpretacja odczynu z przeciwciałem PD-L1, klon 22C3

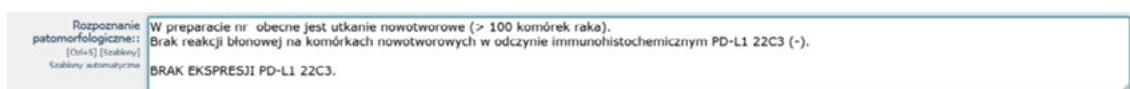
- » Oceny można dokonać, jeżeli badany materiał zawiera co najmniej 100 żywych komórek nowotworowych,
- » Ocenie należy poddać częściowe lub całkowite wybarwienie błon komórkowych, o dowolnym stopniu nasilenia (intensywności),
- » Jeżeli był widoczny odczyn ziarnisty, aby go uwzględnić komórka musiałaby

- wykazywać charakter błonowy,
- » W ocenie nie uwzględniamy odczynu cytoplazmatycznego (traktujemy jako odczyn nieswoisty),
 - » Ekspresję białka PD-L1 na komórkach nowotworowych oceniamy poprzez ustalenie **TPS (Tumor Proportion Score, Skala stopnia wybarwienia guza)**, czyli odsetka żywych komórek nowotworowych, wykazujących częściowy lub ciągły odczyn błonowy,
 - » Komórki prawidłowe i komórki immunologiczne związane z guzem, takie jak limfocyty naciekające i makrofagi nie powinny być uwzględniane w ocenie służącej do określenia ekspresji PD-L1,
 - » Próbkę jest uznawana za wykazującą ekspresję PD-L1 jeśli w skali PD-L1 $\geq 1\%$ żywotnych komórek wykazuje wybarwienie błony komórkowej o dowolnej intensywności (np. $\geq 1+$).

Poniżej przedstawiono przykłady formułowania wyników oceny ekspresji PD-L1:

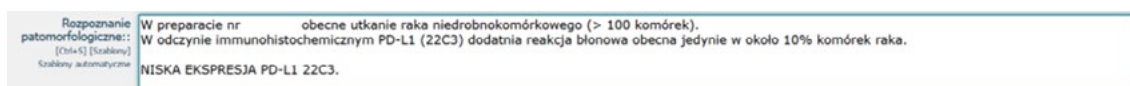
Wynik: BRAK EKSPRESJI

- » Brak reakcji błonowej na komórkach raka, lub częściowa lub całkowita błonowa ekspresja w $<1\%$ żywych komórek nowotworowych



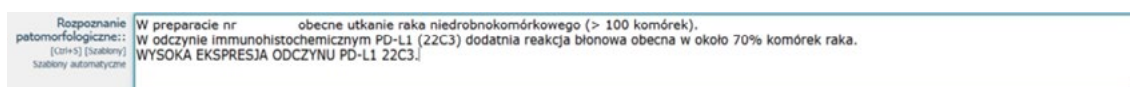
Wynik: NISKA EKSPRESJA

- » Częściowa lub całkowita błonowa ekspresja ($^{31+}$) w 1-49% żywych komórek nowotworowych



Wynik: WYSOKA EKSPRESJA

- » Częściowa lub całkowita błonowa ekspresja ($^{31+}$) w $>50\%$ żywych komórek nowotworowych

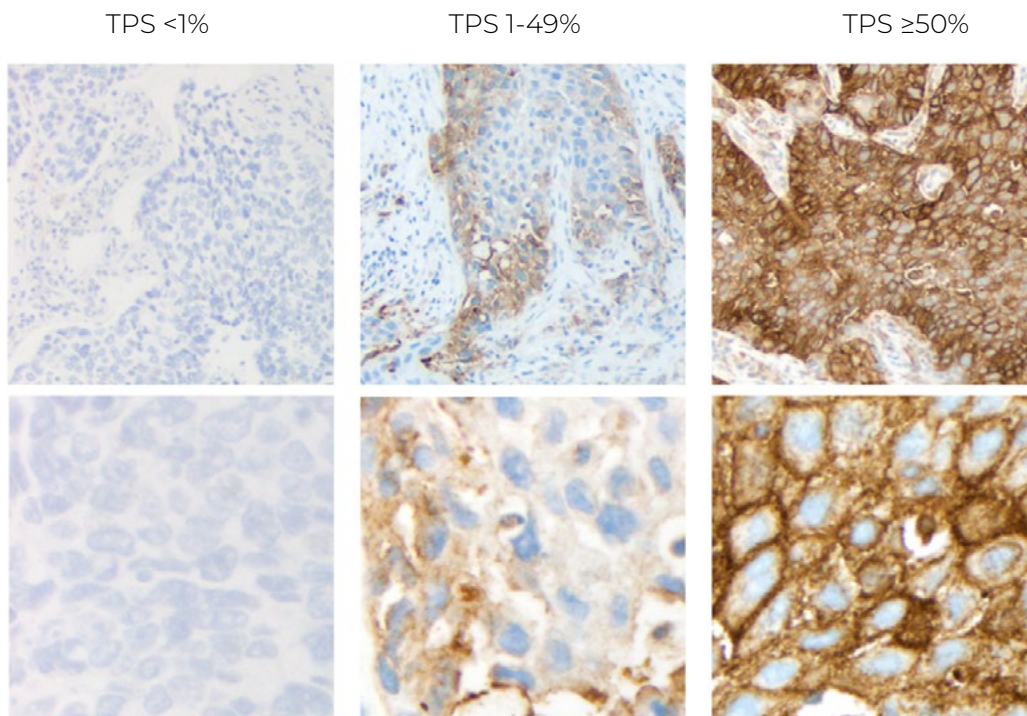


Źródło: Materiały własne Zakładu Patomorfologii Nowotworów Narodowego Instytutu Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie –Państwowego Instytutu Badawczego w Warszawie

Obecnie w programie lekowym B.6. pacjenci mają dostęp, w przypadku wykluczenia mutacji, do następujących opcji terapeutycznych:

- » rak płaskonabłonkowy lub niepłaskonabłonkowy z ekspresją PD-L1 $\geq 50\%$ – pembrolizumab albo atezolizumab albo cemiplimab w monoterapii,
- » rak niepłaskonabłonkowy z ekspresją PD-L1 $< 50\%$ – pembrolizumab w skojarzeniu z pemetreksedem i pochodną platyny,
- » rak płaskonabłonkowy lub NOS z ekspresją PD-L1 $< 50\%$ – pembrolizumab w skojarzeniu z paklitakselem i karboplatiną,
- » rak płaskonabłonkowy lub niepłaskonabłonkowy lub NOS z ekspresją PD-L1 $< 50\%$ – niwolumab w skojarzeniu z ipilimumabem i chemioterapią (2 cykle) opartą o pochodne platyny.

Przykłady odczynów PD-L1, klon 22C3

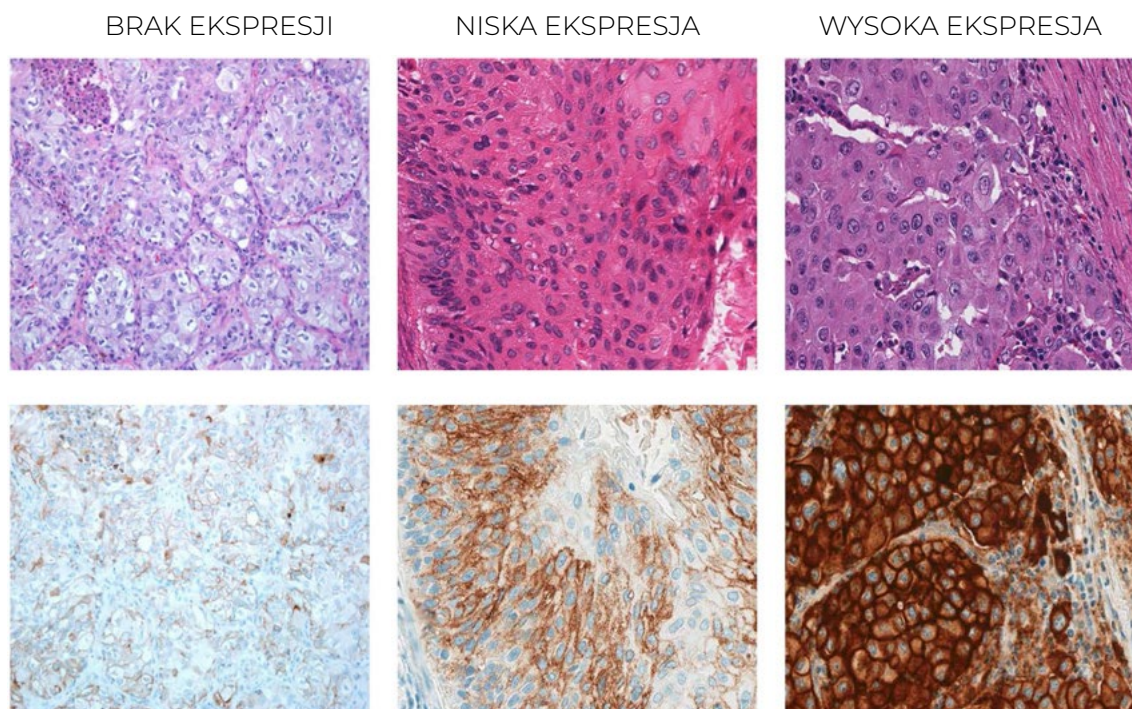


Źródło: Materiały własne Zakładu Patomorfologii Nowotworów Narodowego Instytutu Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie –Państwowego Instytutu Badawczego w Warszawie

Interpretacja odczynu z przeciwciałem PD-L1, klon SP263

- » Oceny można dokonać, jeżeli badany materiał zawiera co najmniej 50 żywych komórek nowotworowych,
- » Ocenie należy poddać komórki nowotworowe, nie ma konieczności oceny komórek immunologicznych (NSCLC) **lub**
- » Ocenie należy poddać komórki nowotworowe, a w następnej kolejności komórki immunologiczne (makrofagi, limfocyty, komórki dendrytyczne, granulocyty obojętnochłonne) (Urothelial Carcinoma),
- » Oceniając komórki nowotworowe, określamy odsetek komórek nowotworowych **(TC – Tumor Cells)**, które wykazują dodatnią reakcję błonową niezależnie od jej intensywności, w stosunku do wszystkich komórek nowotworowych powierzchni guza,
- » Ocena komórek immunologicznych **(IC – Immune Cells)** polega na określeniu proporcji powierzchni guza z obecnością komórek immunologicznych wykazujących jakąkolwiek dodatnią reakcję z przeciwciałem anti-PD-L1, w stosunku do całej powierzchni utkania nowotworowego,
- » Za dodatni uznawany jest każdy widoczny odczyn, niezależnie od tego, na jakiego typu komórkach odpowiedzi immunologicznej wystąpił i jakiego jest rodzaju (nie jest wymagany odczyn błonowy).

Przykłady odczynów PD-L1, klon SP263



Źródło: Materiały własne Zakładu Patomorfologii Nowotworów Narodowego Instytutu Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie –Państwowego Instytutu Badawczego w Warszawie

Porównanie testów PD-L1

Czynnik	Pembrolizumab Merck^{1,2}	Atezolizumab Roche^{3,4}	Nivolumab BMS^{5,6}	Durvalumab AstraZeneca⁷
Cel terapeutyczny	PD-1	PD-L1	PD-1	PD-L1
mAb PD-L1 (IHC)	Dako 22C3 Ventana SP263	Ventana SP142	Dako 28-8 Ventana SP263	Ventana SP263
Platforma do IHC	Autostainer Link 48 Benchmark	Benchmark	Autostainer Link 48 Benchmark	Benchmark
Oceniany typ komórek	TC	TC/IC	TC	TC
Punkty odcięcia NSCLC	TC=1%-49% TC≥50%	TC > 50% Lub IC > 10%	TC ≥1% TC ≥5% TC ≥10%	TC ≥25%
Wskazania do oceny	Konieczna	Uzupełniająca	Uzupełniająca	Uzupełniająca

Źródło: 1 Herbst et al. Lancet 2016, 2 Plimack et al. ASCO 2016, 3 Fehrenbacher et al. Lancet 2016, 4 Rosenberg et al. Lancet 2016, 5 Borghaei et al. N Engl J Med. 2015, 6 Brahmer et al. N Engl J Med 2015, 7 Rebelatto et al. ASCO 2015;

TC – tumor cells, IC-immune cells

Ocena PD-L1 22C3 w Narodowym Instytucie Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie –Państwowym Instytucie Badawczym w Warszawie, w latach 2017-2022

W latach 2017-2022 w dużym ośrodku referencyjnym wykonano 1 866 oznaczeń ekspresji oceny PD-L1 22C3 w niedrobnokomórkowym raku płuca (NDRP) - rozkład wyników:

- » 709 badań z wynikiem: brak ekspresji, co stanowiło **38% ogółu**,
- » 391 badań z wynikiem: niska ekspresja (1-49%), co stanowiło **21% ogółu**,
- » 541 badań z wynikiem: wysoka ekspresja (>50%), co stanowiło **29% ogółu**,
- » 226 badań z wynikiem: nie diagnostyczny, co stanowiło **12% ogółu**.

Natomiast w okresie lipiec 2023 – czerwiec 2024 wykonano 271 oznaczeń ekspresji w niedrobnokomórkowym raku płuca (NDRP) z następującym rozkładem wyników:

- » 109 badań z wynikiem: brak ekspresji, co stanowiło **40% ogółu**,
- » 54 badań z wynikiem: niska ekspresja (1-49%), co stanowiło **20% ogółu**,
- » 81 badań z wynikiem: wysoka ekspresja (>50%), co stanowiło **30% ogółu**,
- » 27 badań z wynikiem: nie diagnostyczny, co stanowiło **10% ogółu**.

Finansowanie stopnia ekspresji PD-L1 przez publicznego płatnika

Badanie PD-L1 finansowane jest przez publicznego płatnika:

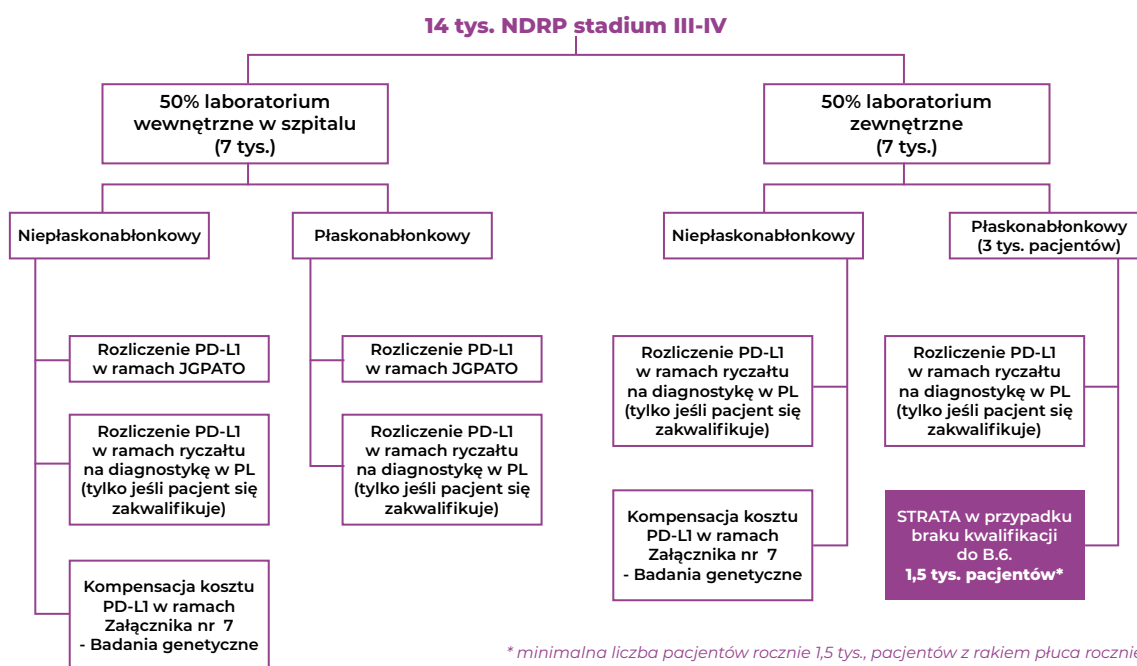
1. W przypadku podmiotów leczniczych mających akredytację Zakładów Patomorfologii dla grupy pacjentów w ramach szybkiej ścieżki onkologicznej istnieje możliwość sfinansowania PD-L1 w ramach produktu rozliczeniowego o kodzie: 5.53.01.0001655 dodatkowy koszt diagnostyki patomorfologicznej - **materiał onkologiczny specjalny** w ramach leczenia szpitalnego oraz w ramach produktu rozliczeniowego o kodzie: 5.05.00.0000109 dodatkowy koszt diagnostyki patomorfologicznej – **materiał onkologiczny specjalny** w ambulatoryjnej opiece specjalistycznej.
2. W przypadku, gdy wykonanie badania jest obligatoryjne w ramach kwalifikacji a pacjent zostanie zakwalifikowany do Programu lekowego B6. Leczenie chorych na raka płuca (ICD-10: C34) oraz międzybłoniaka opłucnej (ICD-10: C45) wówczas finansujemy koszt badania PD-L1 poprzez sprawozdanie produktu rozliczeniowego o kodzie **5.08.08.0000011 diagnostyka w programie leczenia chorych na raka płuca oraz międzybłoniaka opłucnej**, o wartości 3 927 pkt. rocznie. Zgodnie z definicją **ryczałt za diagnostykę** jest to produkt rozliczeniowy, w ramach którego finansowany jest uśredniony koszt badań diagnostycznych wymaganych przy kwalifikacji i w trakcie realizacji programu lekowego, wykonywanych u świadczeniobiorcy objętego tym programem w danym roku kalendarzowym, z wyłączeniem badań genetycznych wykonywanych w trakcie kwalifikacji do programu lekowego, z zastrzeżeniem § 24 ust. 4 (programów hematologicznych).
3. Natomiast w przypadku gdy pacjent nie zakwalifikuje się do programu lekowego B.6. to koszt badania ekspresji PD-L1 leżą po stronie podmiotów medycznych prowadzących leczenie raka płuca w programie lekowym. Część podmiotów posiadających akredytację ma szansę sfinansowania badania w ramach dostępnych produktów rozliczeniowych (patrz pkt.1), natomiast przypadku gdy podmiot

lecniczy nie posiada akredytacji JDP lub ma zawartą umowę na podwykonawstwo na realizacji badań patomorfologicznych wówczas wykonanie badań PD-L1 nie jest finansowane.

W przypadku podmiotów leczniczych prowadzących kompleksową diagnostykę chorób płuc, które nie posiadają programu lekowego B.6., problem jest jeszcze bardziej złożony. Ośrodki te nie mogą skorzystać z ryczałtu na diagnostykę w programie (nie mają programu lekowego B.6.), oraz często nie są na liście akredytowanych Zakładów Patomorfologii. Dla takich ośrodków kompleksowa diagnostyka jest pokrywana z całkowicie z budżetu szpitala.

Schemat 2. Finansowanie badań ekspresji PD-L1

12-14 tys. testów PD-L1 w 2023 w raku płuca / 7-8 tys. pacjentów leczonych w programie B.6. w roku 2023 / 50% diagnozowanych leczona



Ze schematu 2. wynika że problem finansowania badania ekspresji PD-L1 dotyczy co najmniej 1,5 tys. pacjentów z NDRP rocznie (szczególnie z podtypem płaskonabłonkowym, gdzie wymagany jest tylko test PD-L1, bez mutacji genetycznych). Ponadto jeśli wartość ryczałtu za diagnostykę jest zbyt niska w ramach programu lekowego, lub ośrodek nie jest objęty akredytacją Zakładu Patomorfologii stanowi to niewątpliwie koszt obciążający budżet szpitala. Wydaje się, że może to powodować pewną barierę do szerokiej diagnostyki pacjentów z rakiem płuca w Polsce.

Podsumowanie

Rozpoznanie patomorfologiczne jest kluczowe dla następujących po etapie diagnostycznym kolejnych zdarzeń dotyczących terapii pacjenta. Wprowadzenie bezpośredniego finansowania badań patomorfologicznych jest sposobem na zapewnienie odpowiednich środków na wykonanie, czasem kosztowego panelu badań dodatkowych, niezbędnych dla sformułowania rozpoznania zawierającego niezbędne elementy dla planowania leczenia. Wprowadzenie odrębnego finansowania zostało poprzedzone wprowadzeniem jednolitych, standaryzowanych zasad przeprowadzania badania, tak pod względem organizacyjnym jak i ścieżki „technicznej”.

Problem finansowania czynnika predykcyjnego PD-L1 dotyczy kilku tys. pacjentów z rakiem płuca w Polsce. Należałoby wprowadzić nowe rozwiązanie, które umożliwiłoby finansowanie tego badania poza 39 akredytowanymi ośrodkami (co stanowi zaledwie 34% ośrodków leczących raka płuca w Polsce). W roku 2023 NFZ wydał ponad 800 mln PLN na pokrycie kosztów terapii w ramach programu lekowego leczenia raka płuca. Kompleksowa i dobrze finansowana diagnostyka jest kluczem do personalizacji leczenia i optymalnego doboru terapii.

10.

Finansowanie diagnostyki molekularnej w ramach świadczeń gwarantowanych

mgr inż. Magdalena Sakowicz

dr n. med. Andrzej Tysarowski

Podstawowym warunkiem rozwoju medycyny personalizowanej w polskim systemie opieki zdrowotnej jest dostępność do wysokiej jakości diagnostyki genetycznej, która obecnie jest refundowana przez publicznego płatnika. Zarządzenie Prezesa Narodowego Funduszu Zdrowia z dnia 30 grudnia 2016 otworzyło nowe możliwości finansowania diagnostyki genetycznej nowotworów i stanowiło niezwykle ważny krok dla zwiększenia dostępności zwłaszcza chorym z rozpoznaniami onkologicznymi.

Finansowane przez publicznego płatnika diagnostyczne badania genetyczne u chorych na raka płuca wykonane w Polsce w okresie od 1 stycznia 2017 r. do 31 grudnia 2022 r. odbywało się głównie w ramach umów (Schemat 1) zawieranych ze świadczeniodawcami, których przedmiot postępowania i warunki postępowania określa:

1. Zarządzenie Nr 37/2024/DSOZ Prezesa Narodowego Funduszu Zdrowia w sprawie określenia warunków zawierania i realizacji umów w rodzaju leczenie szpitalne oraz leczenie – świadczenia wysokospecjalistyczne, ze zmianami
2. Zarządzenie Nr 116/2019/DSOZ Prezesa Narodowego Funduszu Zdrowia w sprawie określenia warunków zawierania i realizacji umów w rodzaju świadczenia zdrowotne kontraktowane odrębnie, ze zmianami

Schemat 1. Finansowanie diagnostycznych badań genetycznych u chorych na raka płuca w ramach umów zawieranych z Narodowym Funduszem Zdrowia

Finansowanie diagnostycznych badań genetycznych w raku płuca (C34)



Publiczny płatnik mając na uwadze zróżnicowane koszty badań genetycznych u pacjentów onkologicznych wprowadził od 2017 roku możliwość ich finansowania w umowie leczenie szpitalne, w zależności od rozpoznania ICD10, użytej technologii diagnostycznej, liczby i rodzaju wykonanych oznaczeń oraz momentu pobrania materiału do badania [1] tj.:

- » **materiału świeżego** - pobranego w trakcie uzasadnionej hospitalizacji (krew obwodowa lub materiał tkankowy/cytologiczny, biopsyjny pobrany w ramach grupy JGP) lub
- » **materiału archiwalnego** - dostarczonego z innego ośrodka lub pobranego w danym podmiocie leczniczym podczas procedury diagnostycznej w trakcie wcześniejszej hospitalizacji (błoczki i preparaty cytologiczne), w sytuacji

konieczności wykonania badania genetycznego w trybie ambulatoryjnym celem modyfikacji leczenia (ustalenia planu leczenia).

Produkty rozliczeniowe z katalogu 1 c (do sumowania), w ramach umowy leczenie szpitalne, które są dedykowane do sprawozdawczości badań genetycznych w chorobach nowotworowych i które pozwalają sfinansować wykonane diagnostyczne badania genetyczne z materiału pobranego w trakcie hospitalizacji lub w trybie ambulatoryjnym na podstawie załącznika nr 7 *Wykazu badań genetycznych w chorobach nowotworowych* [2] to:

» **Podstawowe badania genetyczne w chorobach nowotworowych**

(kod 5.53.01.0005001) - wartość punktowa **649 pkt.**

» **Złożone badania genetyczne w chorobach nowotworowych**

(kod 5.53.01.0005002) - wartość punktowa **1 298 pkt.**

» **Zaawansowane badania genetyczne w chorobach nowotworowych**

(kod 5.53.01.0005003) - wartość punktowa **2 434 pkt.**

Refundacja badań genetycznych w chorobach nowotworowych została dedykowana dla wybranych rozpoznań ICD10 [3], zgodnie z załącznikiem nr 7 do zarządzenia Prezesa NFZ w sprawie określenia warunków zawierania i realizacji umów w rodzaju leczenie szpitalne:

C15–C20, C25, **C34**, C38, C40, C41, C43, C47, C48, C49, C50, C54, C56, C57, C61, C64, C67, C69, C70, C71, C72, C73, C74, C78.6, C82, C83, C85, C88, C90.0, C90.1, C90.2, C91.0, C91.1, C92.0, C92.1, C93.1, D33, D45, D46, D47, D76 – z rozszerzeniami do pięciu znaków). Oznacza to, że badania zlecone pacjentom z rozpoznaniami spoza powyższej listy obecnie nie mogą być finansowane w ramach wskazanych produktów rozliczeniowych z umowy lecznictwo szpitalne.

Należy pamiętać, że badania genetyczne w chorobach nowotworowych możemy również rozliczyć w pakiecie onkologicznym jako świadczenia nielimitowane.

Obecnie jest to najkorzystniejszy wariant rozliczenia badań genetycznych w chorobach nowotworowych. Zgodnie z zapisami Zarządzenia Prezesa NFZ w sprawie określenia warunków zawierania i realizacji umów w rodzaju leczenie szpitalne [4] (z późn. zm.) możliwość rozliczania badań diagnostycznych genetycznych w chorobach nowotworowych została przypisana zakresom zarówno zachowawczym jak i zabiegowym (zgodnie z załącznikiem 1c do sumowania): chirurgii dziecięcej, chirurgii klatki piersiowej, chirurgii onkologicznej, chorobach płuc/chorobach płuc dla dzieci, endokrynologii, gastroenterologii, ginekologii onkologicznej, hematologii, neonatologii, neurochirurgii, onkologii i hematologii dziecięcej, onkologii klinicznej, otorynolaryngologii, położnictwa i ginekologii, urologii. Nie ma możliwości rozliczenia badań genetycznych w zakresie chirurgii ogólnej.

Podstawowym warunkiem rozliczenia badań genetycznych w zakresie umowy w rodzaju leczenie szpitalne w chorobach nowotworowych jest pobranie materiału do badania

genetycznego w trakcie hospitalizacji lub dostarczenie materiału archiwalnego w trybie ambulatoryjnym. Po otrzymaniu wyniku badania genetycznego należy wskazać odpowiedni produkt rozliczeniowy: podstawowe lub złożone lub zaawansowane badanie genetyczne w chorobach nowotworowych, który należy dosumować do grupy JGP z katalogu 1a lub wykazać z dedykowanym dla trybu ambulatoryjnego produktem rozliczeniowym: 5.52.01.0001511 *badanie genetyczne materiału archiwalnego, schemat nr 2*. Nie można łącznie wykazywać produktów o kodach: 5.53.01.0005001, 5.53.01.0005002, 5.53.01.0005003, w ramach jednej hospitalizacji oraz nie można łączyć ww. świadczeń z produktem o kodzie: 5.10.00.0000041 *"kompleksowa diagnostyka genetyczna w chorobach nowotworowych"* z zakresu badania genetyczne z katalogu świadczeń zdrowotnych kontraktowanych odrębnie.

Określenie rodzaju badania (badanie podstawowe, złożone czy zaawansowane badanie genetyczne) jest faktycznie możliwe dopiero po całkowitym zakończeniu procedury diagnostycznej i uzyskaniu ostatecznego wyniku w pracowni genetycznej. Dopiero w tym momencie jest możliwa również pełna ocena poniesionych nakładów i wskazanie procedury do rozliczenia. Prawidłowe opisanie technologii wykonania procedury badania genetycznego pozostaje w gestii pracowni genetycznej, wykonującej badanie (lub następujące po sobie badania) u danego pacjenta.

Schemat 2. Warunki rozliczenia badań genetycznych

Zarządzenie Prezesa NFZ w rodzaju leczenie szpitalne, załącznik 1c

- » produkty rozliczeniowe obejmując **zakres badań określonych w zał. nr 7** - co najmniej jedno z badań wskazanych w kategorii szczegółowej,
- » produkty do rozliczenia w **dacie hospitalizacji** podczas której pobrano materiał do badania, nie wcześniej niż po otrzymaniu jego wyniku
- » lub **w trybie ambulatoryjnym** rozliczane z produktem o kodzie: 5.52.01.0001511 - *badanie archiwalne*,
- » **nie można łączyć z produktem o kodzie: 5.10.00.0000041** - *kompleksowa diagnostyka genetyczna w chorobach nowotworowych* z zakresu badania genetycznego z katalogu świadczeń zdrowotnych kontraktowanych odrębnie,
- » nie można wykazywać łącznie z produktami o kodach: 5.53.01.0005001, 5.53.01.0005002, 5.53.01.0005003

Umowa w rodzaju leczenie szpitalne

- » podstawowe badania genetyczne w chorobach nowotworowych (kod 5.53.01.0005001) , **649 pkt.**
- » złożone badania genetyczne w chorobach nowotworowych (kod 5.53.01.0005002) , **1 298 pkt.**
- » zaawansowane badania genetyczne w chorobach nowotworowych (kod 5.53.01.0005003) , **2 434 pkt.**

MOŻLIWOŚĆ ROZLICZENIA W PAKIECIE ONKOLOGICZNYM

Produkty rozliczeniowe (badania genetyczne w chorobach nowotworowych) możliwe do sumowania z grupami JGP z katalogu 1a lub z produktem rozliczeniowym: badania genetyczne z materiału archiwalnego

Podstawowe badanie genetyczne lub
Złożone badanie genetyczne lub
Zaawansowane badanie genetyczne
katalog 1c

Grupa JGP
katalog 1a

*tryb hospitalizacji
(materiał pobrany w trakcie hospitalizacji)*

Badanie genetyczne z materiału
archiwalnego 5.52.01.0001511

katalog 1b

*tryb ambulatoryjny
(materiał archiwalny, błoczki, preparaty)*

Źródło: ZARZĄDZENIE NR 37/2024/DSOZ PREZESA NARODOWEGO FUNDUSZU ZDROWIA z dnia 29 marca 2024 r. w sprawie określenia warunków zawierania i realizacji umów w rodzaju leczenie szpitalne oraz leczenie szpitalne - świadczenia wysokospecjalistyczne

W załączniku 7 *Wykaz badań genetycznych w chorobach nowotworowych* umieszczono zalecenia postępowania diagnostycznego w nowotworach złośliwych rekomendowane przez polskie towarzystwa naukowe oraz wytyczne ekspertów w dziedzinie genetyki onkologicznej. Przedstawione zakresy metodyczne wykonywanych badań genetycznych podzielono na trzy kategorie w zależności od złożoności użytych technik molekularnych. Zakresy badań genetycznych podzielono na badania proste, złożone i zaawansowane.

Załącznik 7. Wykaz badań genetycznych w chorobach nowotworowych

Wykaz badań genetycznych w chorobach nowotworowych

(ICD-10: C15-C20, C25, C34, C38, C40, C41, C43, C47, C48, C49, C50, C54, C56, C57, C61, C64, C67, C69, C70, C71, C72, C73, C74, C78.6, C82, C83, C85, C88, C90.0, C90.1, C90.2, C91.0, C91.1, C92.0, C92.1, C93.1, D33, D45, D46, D47, D76 – z rozszerzeniami do pięciu znaków)

Lp.	Zakres badań genetycznych	Kategoria szczegółowa
1.	Proste badanie genetyczne	1.1. Analiza kariotypu w komórkach nowotworowych przy użyciu jednej metody prążkowej 1.2. FISH ² /ISH ³) (fluorescencyjna hybrydyzacja <i>in situ</i>) do komórek nowotworowych z zastosowaniem jednej sondy DNA lub sondy z zestawem kontrolnym 1.3. Prosty test – badanie molekularne Analiza jednej lub kilku mutacji wykrywanych w od jednego do 6 ampliconów przy użyciu reakcji PCR ¹⁾ / sekwencjonowania Sangera / prostych zestawów diagnostycznych lub analiza ekspresji / obecności genu lub kilku genów (w tym genów fuzyjnych) przy użyciu metody real-time PCR (RQ-PCR).
		2.1. Analiza kariotypu w komórkach nowotworowych przy użyciu dwu lub kilku metod prążkowych 2.2. Analiza kariotypu w komórkach nowotworowych przy użyciu jednej metody prążkowej z równoległą analizą FISH²) z użyciem 1-2 zestawów sond lub z prostym badaniem molekularnym 2.3. FISH ² /ISH ³) do komórek nowotworowych z zastosowaniem kilku sond (od 2 do 3 zestawów sond) 2.4. FISH ²) do komórek nowotworowych z zastosowaniem zestawu sond (od 1 do 2 sond) z równoległą analizą kariotypu lub z prostym badaniem molekularnym 2.5. C-Ig-FISH ²) (Cytoplasmic Immunoglobulin FISH) ocena statusu kilku genów w wyodrębnionej populacji plazmacytów (zestaw sond zgodnie z zaleceniami klinicznymi) 2.6. Złożony test – badanie molekularne Analiza 6-40 ampliconów metodą sekwencjonowania Sangera lub NGS lub analiza kilkudziesięciu mutacji przy użyciu prostej reakcji PCR ¹⁾ z wykorzystaniem 2-3 prostych zestawów diagnostycznych lub jednego zestawu diagnostycznego do oceny statusu co najmniej 2-3 genów lub badanie mutacji dynamicznych lub analiza duplikacji/delekcji lub analiza metylacji
2.	Złożone badanie genetyczne	
3.	Zaawansowane badanie genetyczne	3.1. Analiza kariotypu w komórkach nowotworowych przy użyciu jednej metody prążkowej z równoległymi badaniami analizą FISH z użyciem >2 zestawów sond lub z badaniem molekularnym (2 proste lub 1 złożone badanie molekularne) 3.2. FISH/ISH ^{2,3}) do komórek nowotworowych z zastosowaniem zestawu co najmniej 4 zestawów sond lub z zastosowaniem co najmniej 3⁴) zestawów sond z równoległym badaniem molekularnym 3.3. Test zaawansowany – badanie molekularne Profil ekspresji genów GEP (Gene Expression Profiling) – różne zestawy diagnostyczne dedykowane poszczególnym nowotworom lub sekwencjonowanie NGS (powyżej 40 ampliconów)

1) - badanie metodą PCR lub modyfikacjami tej metody (RT-PCR, RQ-PCR, nested-PCR, real time PCR i inne)

2) - oznaczenie FISH użyte w tabeli oznacza fluorescencyjną hybrydyzację *in situ*

3) - oznaczenie ISH użyte w tabeli oznacza niefluorescencyjną hybrydyzację *in situ* (np. CISH, SISH i metody pokrewne)

4) trzech zestawów diagnostycznych identyfikujących niezależne molekularne markery predykcyjne, o ile w równoległym badaniu nie stwierdzono klinicznie istotnych wariantów genetycznych.

Niezależnie od omawianych produktów rozliczeniowych istnieje możliwość również rozliczania badań genetycznych jako produkt rozliczeniowy 5.10.00.000041 kompleksowa diagnostyka genetyczna chorób nowotworowych o wartości punktowej 534 pkt. [5], który został umieszczony w Katalogu zakresów świadczeń w rodzaju świadczenia zdrowotne kontraktowane odrębnie w zarządzeniu Prezesa Narodowego Funduszu Zdrowia w sprawie określenia warunków zawierania i realizacji umów w rodzaju świadczenia zdrowotne kontraktowane odrębnie.

Świadczenie umożliwia rozliczanie badań genetycznych wykonanych na materiale tkankowym i cytologicznym pobranym w trakcie bieżącej hospitalizacji, badania wykonane na materiale archiwalnym, wcześniej pobranym, pochodzącym z poprzedniej hospitalizacji lub dostarczonym przez chorego/rodzinę. Natomiast należy pamiętać, że świadczenie rozliczone może być w trybie ambulatoryjnym. Wartość punktowa świadczenia wynosi obecnie 532,51 pkt.

Dodatkowo od 2023 roku w związku z nowelizacją ustawy o Funduszu Medycznym z dn. 01.12.2022 możliwe jest finansowanie świadczeń opieki zdrowotnej związanych z diagnostyką genetyczną udzielanych osobom do ukończenia 18. roku życia [6].

Tabela 1. Katalog zakresów świadczeń w rodzaju świadczenia kontraktowane odrębnie

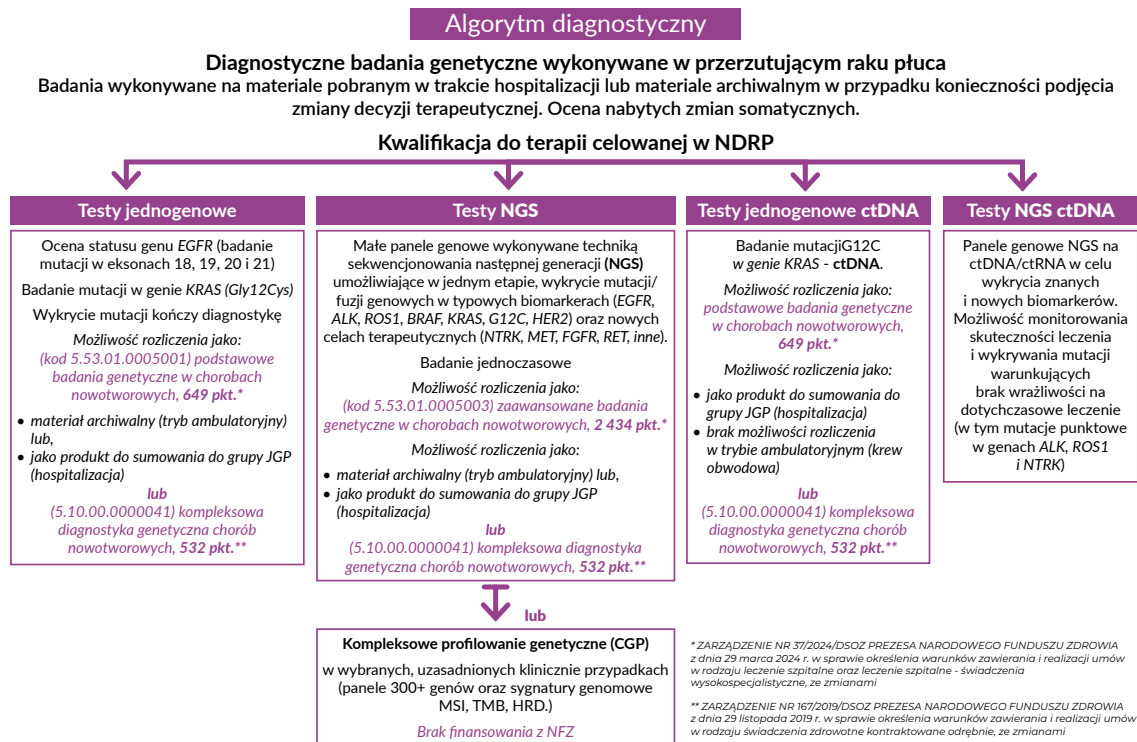
kod zakresu	nazwa zakresu	kod produktu	nazwa produktu	jednostka rozliczeniowa	Wartość punktowa produktu rozliczeniowego	świadczenie wykonywane w trybie ambulatoryjnym
2	3	4	5	6	7	9
11.1210.053.02	BADANIA GENETYCZNE	5.10.00.0000041	kompleksowa diagnostyka genetyczna chorób nowotworowych	punkt	532,51	x
11.1210.160.02	BADANIA GENETYCZNE świadczenia diagnostyki genetycznej udzielane osobom do ukończenia 18 roku życia	5.10.00.0000041	kompleksowa diagnostyka genetyczna chorób nowotworowych	punkt	532,51	x

Źródło: Zarządzenie nr 167/2019/DSOZ Prezesa NFZ z dnia 29 listopada 2019 r. w sprawie określenia warunków zawierania i realizacji umów w rodzaju świadczenia zdrowotne kontraktowane odrębnie

Warunki wymagane dla świadczenia kompleksowa diagnostyka genetyczna określono w załączniku nr 2 rozporządzenia Ministra Zdrowia w sprawie świadczeń gwarantowanych z zakresu ambulatoryjnej opieki specjalistycznej cz. I lit. M lp. 913-916.

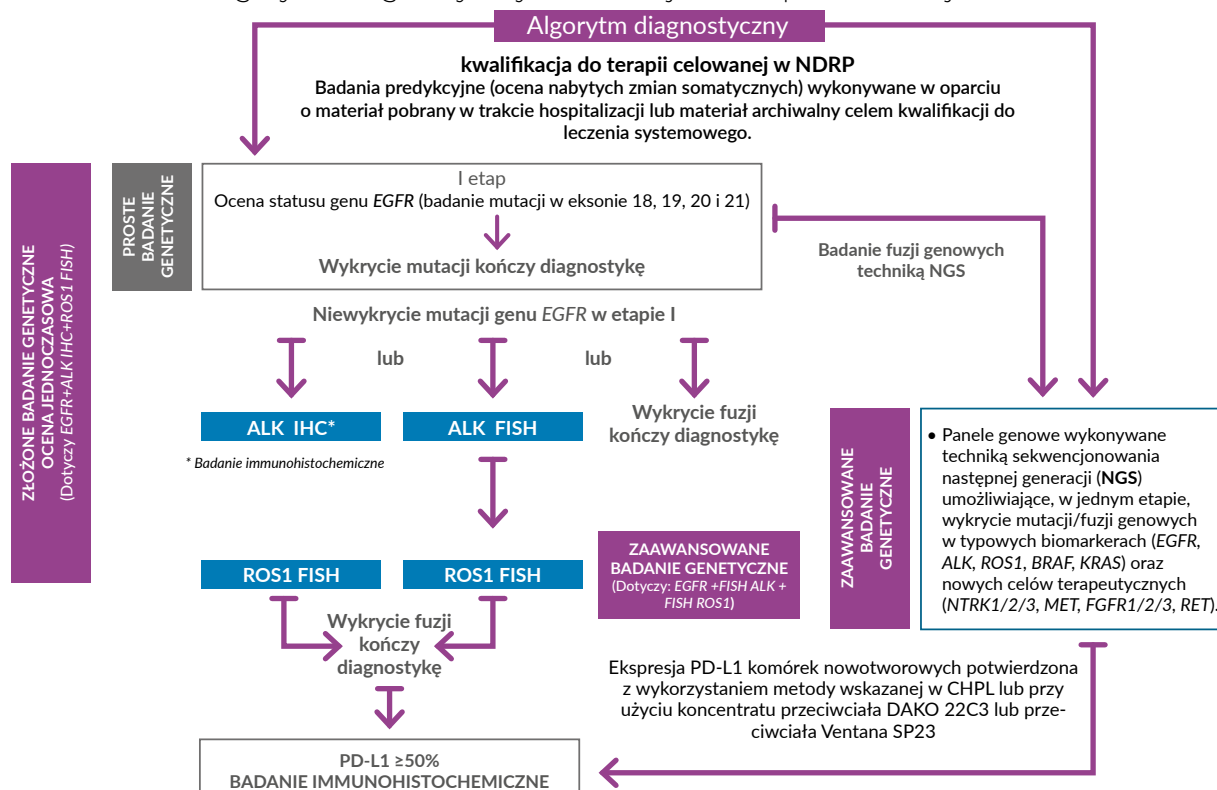
Diagnostyczne badania genetyczne w niedrobnokomórkowym raku płuca są obecnie najbardziej rozbudowaną diagnostyką w niehematologicznych nowotworach nabytych. Dostępnych jest tu wiele terapii ukierunkowanych na różne cele molekularne. Testowaniu genetycznemu należy poddać wiele markerów molekularnych (schemat 3 poniżej), a ocenie podlegają różne klasy zmian genetycznych, tj. mutacje punktowe, małe, delecja/insercja, fuzje genowe i amplifikacje genów. Dlatego rozliczanie diagnostyki molekularnej, w tym nowotworze, jest najbardziej złożone i uwzględnia wszystkie trzy produkty rozliczeniowe: badania proste, złożone, i zaawansowane. Należy również zwrócić uwagę na to, że często diagnostyka genetyczna jest połączona z badaniami immunohistochemicznymi, które na chwilę obecną, nie są odrębnie finansowane przez NFZ w każdym przypadku.

Schemat 3. Algorytm diagnostyczny kwalifikacji do terapii celowanej w NDRP



Przystępując do wyboru technologii badawczej oraz algorytmu diagnostycznego, należy również zwrócić uwagę na ilość materiału nowotworowego dostępnego do badań genetycznych. W ponad 30% przypadków materiał jest bardzo skąpy, co uniemożliwia wykonanie całego panelu badań stosując klasyczne techniki i wieloetapowe testowanie tzn. skrojenie materiału na badanie EGFR, skrojenie na badanie ALK i ROS1 itd. Dlatego najbardziej właściwe i rekomendowane jest zastosowanie sekwencjonowania następnej generacji (NGS), które umożliwi ocenę wielu markerów jednocześnie wraz z możliwością oceny różnych klas mutacji w jednym oznaczeniu [7].

Schemat 4. Algorytm diagnostyczny kwalifikacji do terapii celowanej w NDRP



Analiza sprawozdanych i sfinansowanych przez NFZ badań genetycznych w latach 2017-2022 z rozpoznaniem C34 nowotwór złośliwy oskrzela i płuca

W związku z wprowadzonym nowym modelem finansowania badań genetycznych w chorobach nowotworowych już w 2020 roku Polska Koalicja Medycyny Personalizowanej – Stowarzyszenie przeprowadziła pierwszą analizę danych dotyczących realizacji badań genetycznych w latach 2017-2019 [8], ze szczególnym uwzględnieniem analizy czasu oczekiwania na podanie leku w programie lekowym po sprawozdaniu i rozliczeniu badania genetycznego. Dane do analizy pozyskano w postaci zdepersonalizowanej z Centrali NFZ na podstawie zgody udzielonej przez Prezesa NFZ. W ostatnim okresie analizę poszerzono o informacje z kolejnych lat.

Poniżej przedstawiamy kolejną analizę sprawozdanych i rozliczonych badań genetycznych w latach 2017-2022. W zestawieniach uwzględniono wyłącznie badania genetyczne, które zrealizowano i sfinansowano w ramach zawartych przez świadczeniodawców umów z Narodowym Funduszem Zdrowia. Dodatkowo podjęto analizę dostępności pacjenta do leczenia innowacyjnego w ramach programów lekowych.

W zestawieniach uwzględniono wyłącznie produkty rozliczeniowe umożliwiające finansowanie badań genetycznych w chorobach nowotworowych tj.:

- » 5.53.01.0005001 Podstawowe badania genetyczne w chorobach nowotworowych
- » 5.53.01.0005002 Złożone badania genetyczne w chorobach nowotworowych
- » 5.53.01.0005003 Zaawansowane badania genetyczne w chorobach nowotworowych
- » 5.52.01.0001511 Badanie genetyczne materiału archiwalnego
- » 5.10.00.000041 Kompleksowa diagnostyka genetyczna chorób nowotworowych

Ogółem w latach 2016 - 2022 wykonano w Polsce 32 595 diagnostycznych badań genetycznych z rozpoznaniem C34 nowotwór złośliwy oskrzela i płuca (Tabela 1), które sprawozdano i sfinansowano głównie w dwóch umowach, przy czym aż 94% jako świadczeń w ramach umowy leczenia szpitalne, które są znacznie lepiej finansowane.

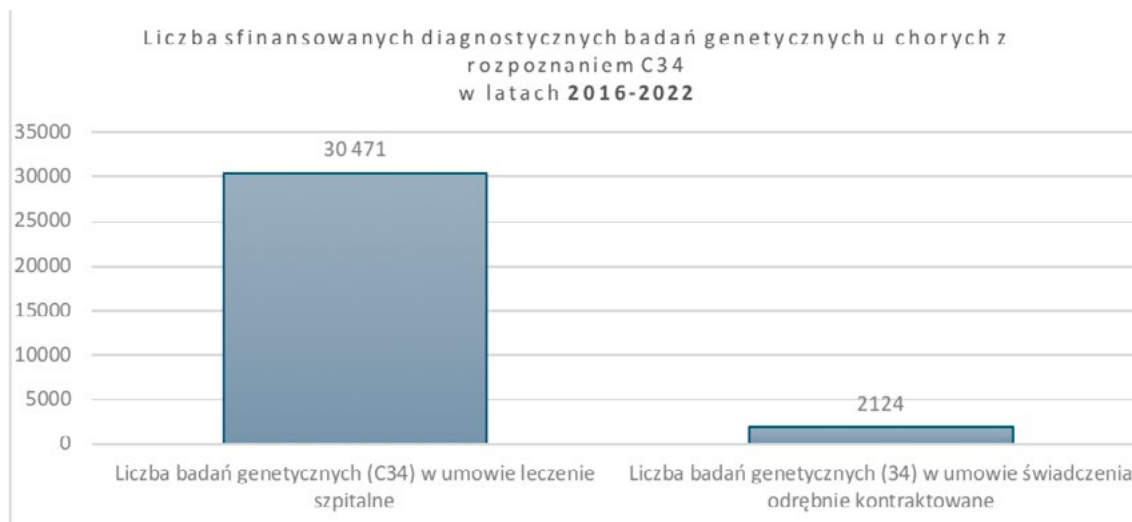
Tabela 2. Liczba sprawozdanych i sfinansowanych badań genetycznych z rozpoznaniem C34 w latach 2016-2022

Finansowanie badań genetycznych w ramach:	2016	2017	2018	2019	2020	2021	2022	RAZEM
umowa leczenie szpitalne		1 828	4 334	5 997	5 290	6 230	6 792	30 471
umowa świadczenia odrębnie kontraktowane	169	304	411	369	324	306	241	2 124
RAZEM	169	2 132	4 745	6 366	5 614	6 536	7 033	32 595

U chorych na raka płuca wykonano ponad 30 tys. badań genetycznych, które sfinansowano w ramach produktów rozliczeniowych: *podstawowe, złożone, zaawansowane badania genetyczne*, natomiast w analizowanym okresie sprawozdano tylko 1940 badań w ramach produktu rozliczeniowego 5.10.00.000041 Kompleksowa diagnostyka genetyczna chorób nowotworowych.

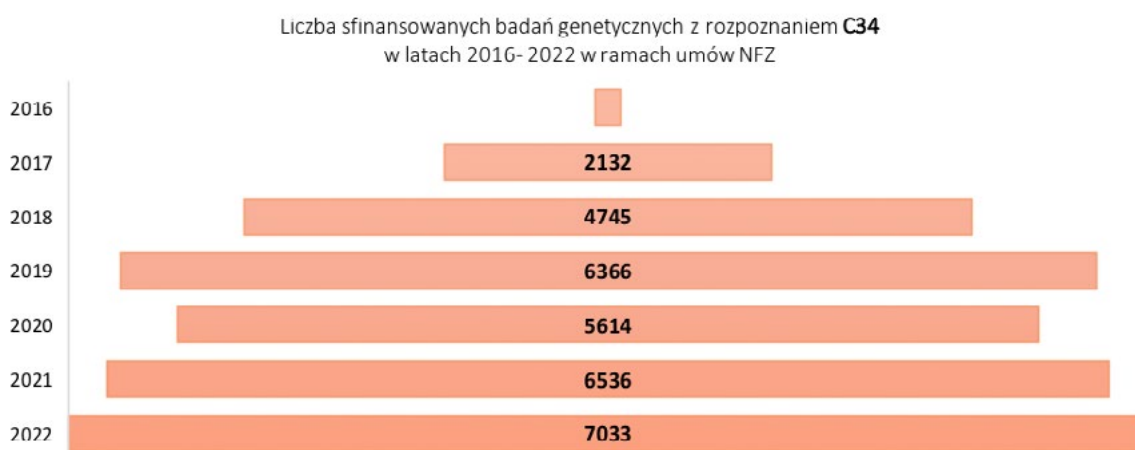
Wykres 1. Liczba sfinansowanych diagnostycznych badań genetycznych u chorych z rozpoznaniem C34 w latach 2016-2022 przez publicznego płatnika wg umów

W latach 2016-2022 u chorych na raka płuca wykonano w Polsce ok. 32 tys. badań genetycznych, głównie w ramach dwóch umów: leczenie szpitalne aż 94% i umowie świadczenia kontraktowane odrębnie tylko 6%.



Wprowadzenie w 2017 nowego modelu finansowania badań genetycznych zdecydowanie wpłynęło na liczbę sfinansowanych badań genetycznych z rozpoznaniem C34, która w kolejnych latach stale wzrasta. Początkowo w 2016 sfinansowano w ramach umowy SOK tylko 169 badań u chorych na raka płuca.

Wykres 2. Liczba sprawozdanych i sfinansowanych przez NFZ badań genetycznych z rozpoznaniem C34 w poszczególnych latach 2016-2022

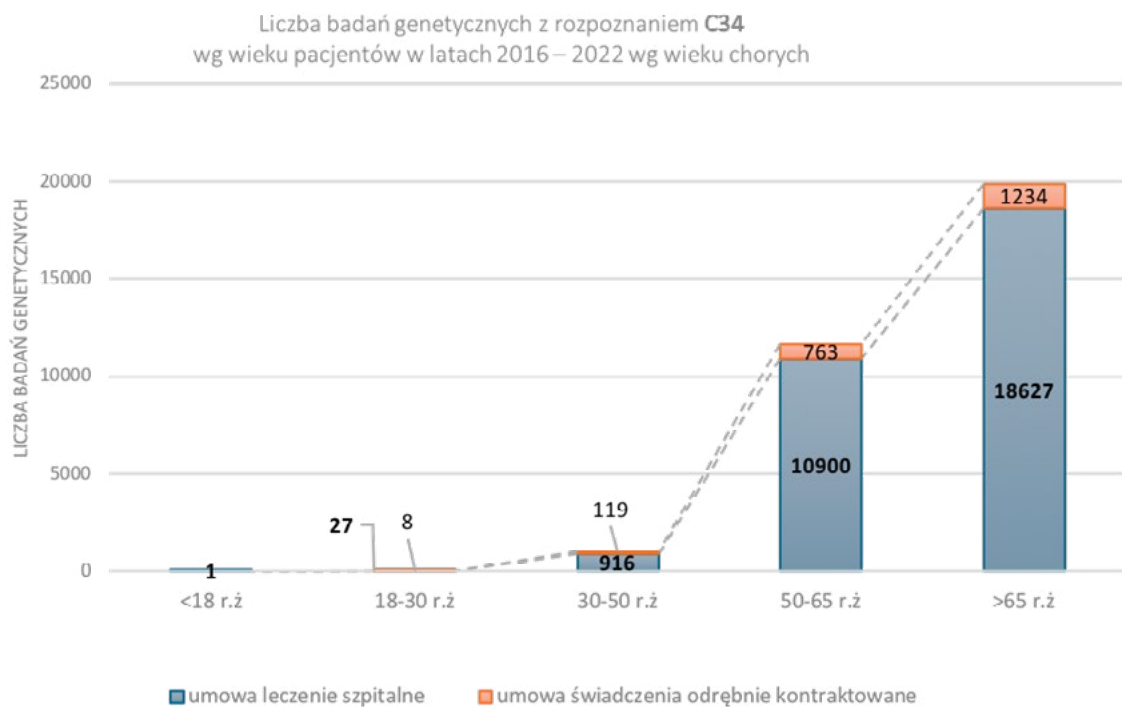


Większość pacjentów stanowiły kobiety, 58%. Natomiast ponad połowa badań została wykonana u osób powyżej 50. roku życia (93%), a mniej więcej co drugie badanie przeprowadzono u pacjenta powyżej 65 r.ż.

Wykres 3. Procentowy udział liczby badań genetycznych z rozpoznaniem C34 sprawozdanych w latach 2016 -2022 wg płci



Wykres 4. Liczba badań genetycznych z rozpoznaniem C34 wg wieku pacjentów w latach 2016 – 2022 wg wieku chorych



Wprowadzony w Polsce od 2017 nowy model finansowania diagnostycznych badań genetycznych w chorobach nowotworowych oparty o rozliczenie świadczeń w zależności od zastosowanej technologii diagnostycznej w poszczególnych nowotworach umożliwił sprawozdanie badań wykonanych metodą sekwencjonowania następnej generacji (NGS) jako zaawansowane badania genetyczne w chorobach nowotworowych o wartości 2 434 pkt.

W diagnostyce genetycznej raka płuca obserwujemy znaczące różnice pomiędzy poszczególnymi województwami, zarówno w liczbie wykonanych i sfinansowanych badań

genetycznych z rozpoznaniem C34, jak również pod względem liczby podmiotów leczniczych, które sprawozdają powyższe badania.

W analizowanym okresie zdecydowanie największą liczbę badań genetycznych wykonano w województwie mazowieckim 6 329, które sprawozdało 17 podmiotów leczniczych oraz w województwie wielkopolskim 4 310 przez 10 świadczeniodawców. Najmniej wykonano i rozliczono badań genetycznych w województwie opolskim. Natomiast największa liczba podmiotów leczniczych, które rozliczyły i sfinansowały badania genetyczne z C34 znajduje się w województwie śląskim.

Wykres 5. Liczba sprawozdanych i sfinansowanych przez publicznego płatnika diagnostycznych badań genetycznych u chorych z rozpoznaniem C34 w latach 2016-2022 w Polsce wg województw

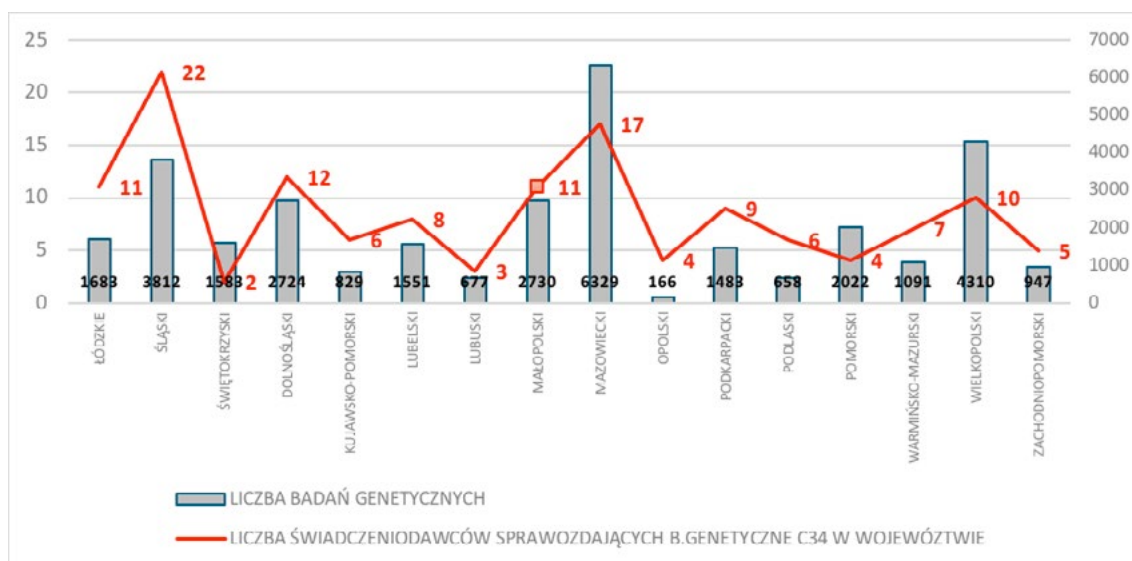


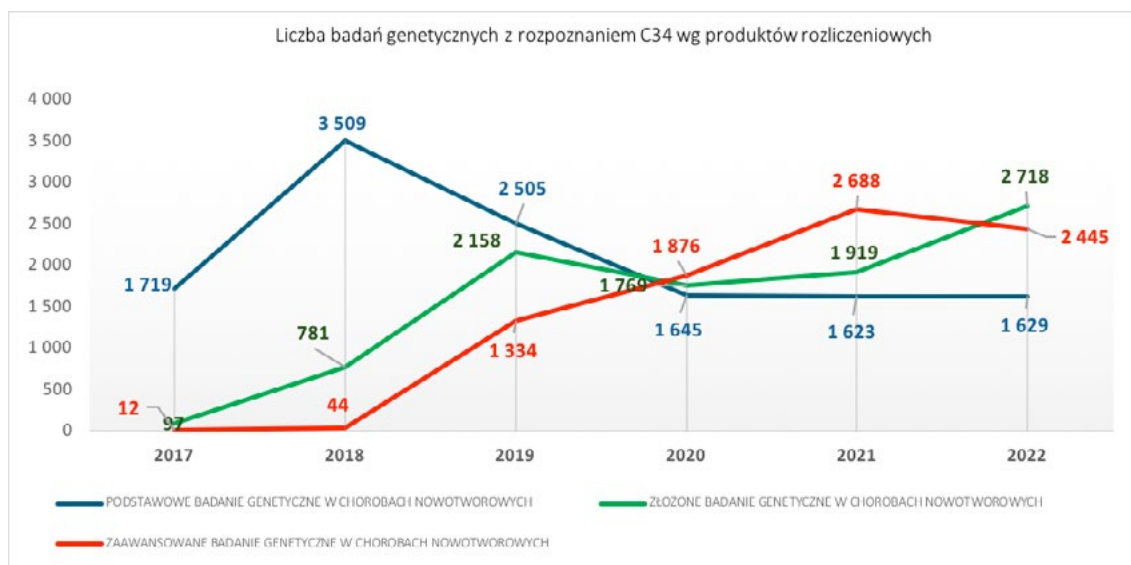
Tabela 3. Liczba sprawozdanych i sfinansowanych przez publicznego płatnika diagnostycznych badań genetycznych u chorych z rozpoznaniem C34 w latach 2016-2022 w Polsce wg produktów rozliczeniowych

	2016	2017	2018	2019	2020	2021	2022
Umowa leczenie szpitalne							
Podstawowe badanie genetyczne w chorobach nowotworowych	x	1 719	3 509	2 505	1 645	1 623	1 629
Złożone badanie genetyczne w chorobach nowotworowych	x	97	781	2 158	1 769	1 919	2 718
Zaawansowane badanie genetyczne w chorobach nowotworowych	x	12	44	1 334	1 876	2 688	2 445
Umowa świadczenia odrębnie kontraktowane							
Kompleksowa diagnostyka genetyczna chorób nowotworowych	169	304	411	369	324	306	241
Razem	169	2 132	4 745	6 366	5 614	6 536	7 033

Pod względem liczby ogólnej obserwujemy stały wzrost liczby wykonywanych badań genetycznych z rozpoznaniem raka płuca (Tabela 3).

W latach 2017-2022 początkowo przeważały badania podstawowe, natomiast stale wra-
stała liczba badań złożonych i zaawansowanych. Związane jest to najprawdopodobniej
z wprowadzonymi zmianami do programu lekowego B6. Leczenie chorych na raka
płuca (ICD-10: C34) oraz międzybłoniaka opłucnej (ICD-10: C45). Od 2019 wzrosła liczba
zaawansowanych badań genetycznych, zapewne dzięki coraz większej dostępności no-
wych technologii diagnostycznych opartych o NGS.

Wykres 6. Liczba sprawozdanych i sfinansowanych przez publicznego płatnika dia-
gnostycznych badań genetycznych u chorych z rozpoznaniem C34 w latach 2017-2022
w Polsce wg produktów rozliczeniowych z umowy leczenia szpitalne



Problem braku kodów ICD 9 dotyczących badań genetycznych w aktualnej wersji słownika ICD-9 PL 5.75

Aktualnie w klasyfikacji procedur medycznych ICD9 [9], brak jest kodów określających badania genetyczne, co powoduje praktycznie brak możliwości wprowadzenia do systemu rozliczeń procedur z zakresu wykonywanych badań. W związku z tym, do celów raportowania badań genetycznych, wykorzystuje się kod: 99.999 Pozostałe procedury – inne.

Polska Koalicja Medycyny Personalizowanej zainicjowała prace nad wprowadzeniem do klasyfikacji ICD9 kodów badań genetycznych w kategorii AA – Badania Laboratoryjne i inne z kodem: Z – Badania genetyczne.

Propozycja kodów została sformułowana i przedstawiona przez zespół ekspertów diagnostyki genetycznej w ramach wspólnych prac w ramach Polskiej Koalicji Medycyny Personalizowanej i wiodących ośrodków onkologicznych. Po uzupełnieniu kodów ICD9 o wskazane poniżej w tabeli nr 4 pozycje konieczne jest również podjęcie prac nad odpowiednią nowelizacją Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 6 listopada 2013 r. w sprawie świadczeń gwarantowanych z zakresu ambulatoryjnej opieki specjalistycznej, w załączniku nr 2, w części M badania genetyczne. W obecnej bowiem sytuacji brak kodów powoduje praktyczną niemożliwość wprowadzenia do systemu rozliczeń procedur z zakresu badań genetycznych, pomimo że badania cytogenetyczne, badania metodami biologii molekularnej oraz badania biochemiczne i enzymatyczne są świadczeniami gwarantowanymi, w rozumieniu przepisów ustawy o świadczeniach opieki zdrowotnej finansowanych ze środków publicznych.

Tabela 4. Propozycja rozwinięcia słownika ICD9 wersji PL 5.75

Rozdział		Podrozdział		Kategoria główna		Kategoria szczegółowa	
nr	tytuł	nr	tytuł	nr	tytuł	nr	tytuł
AA	badania laboratoryjne i inne	Z	Badania genetyczne	Z01	Analiza zaburzeń genetycznych – metody cytogenetyki klasycznej	Z01.1	Hodowla komórek nowotworowych uzyskanych z krwi obwodowej, szpiku kostnego, węzłów chłonnych, wysięku, guza nowotworowego
AA	badania laboratoryjne i inne	Z	Badania genetyczne	Z02	Analiza zaburzeń genetycznych – metody cytogenetyki klasycznej	Z02.1	Analiza kariotypu w komórkach nowotworowych uzyskanych z hodowli <i>in vitro</i> przy użyciu metod prążkowych (cytogenetyka klasyczna)
AA	badania laboratoryjne i inne	Z	Badania genetyczne	Z03	Analiza zaburzeń genetycznych - metody cytogenetyki molekularnej	Z03.1	FISH (<i>fluorescent in situ hybridization- fluorescencyjna hybridyzacja in situ</i>) do metafaz lub jąder komórkowych komórek szpiku, krwi, węzła chłonnego, wysięku, guza, etc. uzyskanych z hodowli <i>in vitro</i> lub zabezpieczonych bezpośrednio lub do jąder komórkowych na skrawkach histologicznych - jedna sonda lub jedna sonda z regionem kontrolnym – ocena statusu jednego genu (rearanżacja, amplifikacja, delecja, fuzja genowa)
AA	badania laboratoryjne i inne	Z	Badania genetyczne	Z03	Analiza zaburzeń genetycznych - metody cytogenetyki molekularnej	Z03.2	FISH do metafaz lub jąder komórkowych komórek szpiku, krwi, węzła chłonnego, wysięku, guza, etc. uzyskanych z hodowli <i>in vitro</i> lub zabezpieczonych bezpośrednio lub do jąder komórkowych na skrawkach histologicznych - 2 lub 3 sondy lub 2 lub 3 sondy z sondami kontrolnymi - równoczesna ocena statusu 2 lub 3 genów (rearanżacja, fuzja genowa, amplifikacja, delecja)
AA	badania laboratoryjne i inne	Z	Badania genetyczne	Z03	Analiza zaburzeń genetycznych - metody cytogenetyki molekularnej	Z03.3	FISH do metafaz lub jąder komórkowych komórek szpiku, krwi, węzła chłonnego, wysięku, guza, etc. uzyskanych z hodowli <i>in vitro</i> lub zabezpieczonych bezpośrednio lub do jąder komórkowych na skrawkach histologicznych - 3 do 5 sond lub 3 do 5 sond z sondami kontrolnymi - równoczesna ocena statusu od 3 do 5 genów (rearanżacja, fuzja genowa, amplifikacja, delecja)
AA	badania laboratoryjne i inne	Z	Badania genetyczne	Z03	Analiza zaburzeń genetycznych - metody cytogenetyki molekularnej	Z03.4	FISH do metafaz lub jąder komórkowych komórek szpiku, krwi, węzła chłonnego, wysięku, guza, etc. uzyskanych z hodowli <i>in vitro</i> lub zabezpieczonych bezpośrednio lub do jąder komórkowych na skrawkach histologicznych > 5 sond lub > 5 sond z sondami kontrolnymi - równoczesna ocena statusu > 5 genów (rearanżacja, fuzja genowa, amplifikacja, delecja)
AA	badania laboratoryjne i inne	Z	Badania genetyczne	Z03	Analiza zaburzeń genetycznych - metody cytogenetyki molekularnej	Z03.5	FISH, C-Ig-FISH (<i>Cytoplasmic Immunoglobulin FISH</i>), T-FISH (<i>target-FISH</i>) w wyodrębnionej populacji plazmocytołów - zestaw sond z sondami kontrolnymi ocena statusu kilku genów (panel sond zgodnie z zaleceniami klinicznymi od 2 do >3 sond)

AA	badania laboratoryjne i inne	Z	Badania genetyczne	Z03	Analiza zaburzeń genetycznych -metody cytogenetyki molekularnej	Z03.6	Kariotypowanie molekularne – aCGH (<i>array Comparative Genomic Hybridization</i> , CGH do mikromacierzy) do oceny zmian liczby kopii (CNV) lub aCGH+SNP (<i>array Comparative Genomic Hybridisation and Single Nucleotide Polymorphism</i> , CGH do mikromacierzy z polimorfizmami pojedynczych nukleotydów) do badania zmian liczby kopii (CNV) oraz utraty heterozygotyczności (LOH) i disomii jednorodzielskiej (UPD)
AA	badania laboratoryjne i inne	Z	Badania genetyczne	Z03	Analiza zaburzeń genetycznych -metody cytogenetyki molekularnej	Z03.7	Optyczne mapowanie genomowe (<i>optical genome mapping</i> , OGM) – ocena strukturalnych zmiany genomowych w tym fuzji genowych (SV), zmiany liczby kopii (CNV) oraz zmian zrównoważonych (np. translokacji zrównoważonych, inwersji) w jednym teście o wysokiej rozdzielczości
AA	badania laboratoryjne i inne	Z	Badania genetyczne	Z04	Badanie molekularne - analiza mutacji –test przy użyciu prostych zestawów diagnostycznych	Z04.1	Analiza jednej lub kilku mutacji wykrywanych w od jednej do trzech reakcji PCR* (1-3 amplikony)
AA	badania laboratoryjne i inne	Z	Badania genetyczne	Z04	Badanie molekularne - Analiza mutacji –test przy użyciu prostych zestawów diagnostycznych	Z04.2	Analiza jednej lub kilku mutacji wykrywanych przy użyciu sekwencjonowania metodą Sangera (1-3 amplikony)
AA	badania laboratoryjne i inne	Z	Badania genetyczne	Z04	Badanie molekularne - Analiza mutacji – test przy użyciu prostych zestawów diagnostycznych	Z04.3	Analiza ekspresji genu lub kilku genów lub mutacji genu lub kilku genów (w tym genów fuzyjnych) przy użyciu metody real-time PCR (RQ-PCR) lub qPCR (quantitative PCR) 1-2 geny.
AA	badania laboratoryjne i inne	Z	Badania genetyczne	Z05	Badanie molekularne - Analiza mutacji –test przy użyciu złożonych zestawów diagnostycznych	Z05.1	Analiza 4-10 amplikonów, metoda MLPA sekwencjonowanie metodą Sangera
AA	badania laboratoryjne i inne	Z	Badania genetyczne	Z05	Badanie molekularne - Analiza mutacji –test przy użyciu złożonych zestawów diagnostycznych	Z05.2	Analiza przy użyciu prostej reakcji PCR*, identyfikująca kilkadziesiąt mutacji w 3 i więcej liczbie genów
AA	badania laboratoryjne i inne	Z	Badania genetyczne	Z05	Badanie molekularne - Analiza mutacji –test przy użyciu złożonych zestawów diagnostycznych	Z05.3	Badanie mutacji metodą LR-PCR (long range – PCR) lub TP-PCR (tripled – primed PCR) analiza 1 genu
AA	badania laboratoryjne i inne	Z	Badania genetyczne	Z05	Badanie molekularne - Analiza mutacji –test przy użyciu złożonych zestawów diagnostycznych	Z05.4	Analiza metylacji metodą MS-PCR, MS-qPCR, MS-MLPA, HRM, sekwencjonowania Sangera; analiza 1 lub panelu genów do 10 amplikonów

AA	badania laboratoryjne i inne	Z	Badania genetyczne	Z05	Badanie molekularne - Analiza mutacji -test przy użyciu złożonych zestawów diagnostycznych	Z05.5	Analiza 11-45 ampliconów metodą MLPA, sekwencjonowaniem Sangera
AA	badania laboratoryjne i inne	Z	Badania genetyczne	Z06	Badanie molekularne - Analiza mutacji -test przy użyciu zaawansowanych zestawów diagnostycznych	Z06.1	Analiza 1-5 genów (całe sekwencje kodujące i/lub wybrane fragmenty genów - zmiany germinalne) metodą NGS
AA	badania laboratoryjne i inne	Z	Badania genetyczne	Z06	Badanie molekularne - Analiza mutacji -test przy użyciu zaawansowanych zestawów diagnostycznych	Z06.2	Analiza 1-5 genów (całe sekwencje kodujące i/lub wybrane fragmenty genów - zmiany somatyczne) metodą NGS
AA	badania laboratoryjne i inne	Z	Badania genetyczne	Z06	Badanie molekularne - Analiza mutacji -test przy użyciu zaawansowanych zestawów diagnostycznych	Z06.3	Analiza 1-5 genów (całe sekwencje kodujące i/lub wybrane fragmenty genów - zmiany oceniane w pozakomórkowych kwasach nukleinowych - płynna biopsja) metodą NGS
	badania laboratoryjne i inne	Z	Badania genetyczne	Z06	Badanie molekularne - Analiza mutacji -test przy użyciu zaawansowanych zestawów diagnostycznych	Z06.4	Sekwencjonowanie NGS dla paneli genowych - mały panel oceniający sekwencje kodujące lub wybrane fragmenty genów w 6-50 genach (zmiany germinalne)
AA	badania laboratoryjne i inne	Z	Badania genetyczne	Z06	Badanie molekularne - Analiza mutacji -test przy użyciu zaawansowanych zestawów diagnostycznych	Z06.5	Sekwencjonowanie NGS dla paneli genowych - mały panel oceniający sekwencje kodujące lub wybrane fragmenty genów w 6-50 genach (zmiany somatyczne)
AA	badania laboratoryjne i inne	Z	Badania genetyczne	Z06	Badanie molekularne - Analiza mutacji -test przy użyciu zaawansowanych zestawów diagnostycznych	Z06.6	Sekwencjonowanie NGS dla paneli genowych - mały panel oceniający sekwencje kodujące lub wybrane fragmenty genów w 6-50 genach (zmiany oceniane w pozakomórkowych kwasach nukleinowych - płynna biopsja)
AA	badania laboratoryjne i inne	Z	Badania genetyczne	Z06	Badanie molekularne - Analiza mutacji -test przy użyciu zaawansowanych zestawów diagnostycznych	Z06.7	Sekwencjonowanie NGS dla paneli genowych -panel oceniający sekwencje kodujące lub wybrane fragmenty genów w 51-150 genach (zmiany germinalne)
AA	badania laboratoryjne i inne	Z	Badania genetyczne	Z06	Badanie molekularne - Analiza mutacji -test przy użyciu zaawansowanych zestawów diagnostycznych	Z06.8	Sekwencjonowanie NGS dla paneli genowych - panel oceniający sekwencje kodujące lub wybrane fragmenty genów w 51-150 genach (zmiany somatyczne)

AA	badania laboratoryjne i inne	Z	Badania genetyczne	Z06	Badanie molekularne - Analiza mutacji -test przy użyciu zaawansowanych zestawów diagnostycznych	Z06.9	Sekwencjonowanie NGS dla paneli genowych – panel oceniający sekwencje kodujące lub wybrane fragmenty genów w 51-150 genach (zmiany oceniane w pozakomórkowych kwasach nukleinowych – płynna biopsja)
	badania laboratoryjne i inne	Z	Badania genetyczne	Z06	Badanie molekularne - Analiza mutacji -test przy użyciu zaawansowanych zestawów diagnostycznych	Z06.10	Sekwencjonowanie NGS dla paneli genowych – panel oceniający sekwencje kodujące lub wybrane fragmenty genów w 151-299 genach (zmiany germinalne)
AA	badania laboratoryjne i inne	Z	Badania genetyczne	Z06	Badanie molekularne - Analiza mutacji -test przy użyciu zaawansowanych zestawów diagnostycznych	Z06.11	Sekwencjonowanie NGS dla paneli genowych – panel oceniający sekwencje kodujące lub wybrane fragmenty genów w 151-299 genach (zmiany somatyczne)
AA	badania laboratoryjne i inne	Z	Badania genetyczne	Z06	Badanie molekularne - Analiza mutacji -test przy użyciu zaawansowanych zestawów diagnostycznych	Z06.12	Sekwencjonowanie NGS dla paneli genowych – panel oceniający sekwencje kodujące lub wybrane fragmenty genów w 151-299 genach (zmiany oceniane w pozakomórkowych kwasach nukleinowych – płynna biopsja)
AA	badania laboratoryjne i inne	Z	Badania genetyczne	Z06	Badanie molekularne - Analiza mutacji -test przy użyciu złożonych zestawów diagnostycznych	Z06.13	Analiza z zastosowaniem mikro-macierzy (metylacyjne, ekspresyjne, chip-on-chip)
AA	badania laboratoryjne i inne	Z	Badania genetyczne	Z06	Badanie molekularne - Analiza mutacji -Test specjalny	Z06.14	Profil ekspresji genów GEP (Gene Expression Profiling) – różne zestawy diagnostyczne, dedykowane poszczególnym nowotworom
AA	badania laboratoryjne i inne	Z	Badania genetyczne	Z07	Badanie molekularne – Technika specjalna biologii molekularnej	Z07.1	Sekwencjonowanie NGS dla paneli genowych – panel oceniający sekwencje kodujące lub wybrane fragmenty genów w 300 i więcej genach (zmiany somatyczne i germinalne oceniane w tkance) Kompleksowe profilowanie genetyczne – CGP (Comprehensive Genome Profiling)
AA	badania laboratoryjne i inne	Z	Badania genetyczne	Z07	Badanie molekularne – Technika specjalna biologii molekularnej	Z07.2	Sekwencjonowanie NGS całego eksomu
AA	badania laboratoryjne i inne	Z	Badania genetyczne	Z07	Badanie molekularne – Technika specjalna biologii molekularnej	Z07.3	Sekwencjonowanie NGS całego genomu
AA	badania laboratoryjne i inne	Z	Badania genetyczne	Z07	Badanie molekularne – Technika specjalna biologii molekularnej	Z07.4	Sekwencjonowanie NGS dla paneli genowych –panel oceniający sekwencje kodujące lub wybrane fragmenty genów w 300 i więcej genach (zmiany oceniane w pozakomórkowych kwasach nukleinowych – płynna biopsja) Kompleksowe profilowanie genetyczne – CGP (Comprehensive Genome Profiling)

Podsumowanie

Prawidłowa diagnostyka genetyczna w chorobach nowotworowych z użyciem nowoczesnych metod badawczych pozwala wybrać najbardziej optymalną i korzystną dla pacjenta opcję terapeutyczną.

W latach 2017 - 2022 obserwowany jest większy dostęp do badań genetycznych w chorobach nowotworowych w ramach dwóch umów: leczenie szpitalne oraz świadczenia odrębnie kontraktowane.

Dzięki wprowadzonemu od 2017 nowemu modelowi finansowania badań genetycznych w chorobach nowotworowych dostępna jest refundacja uwzględniająca zróżnicowane koszty a także wykorzystane technologie do badań.

Istotnym parametrem charakteryzującym badania genetyczne w Polsce jest ich dostępność dla pacjenta. Pozyskane dane za okres 2017-2019 z NFZ wskazują na wzrost liczby ośrodków, w których prowadzone były badania genetyczne w analizowanym okresie. Średnia liczba ośrodków wzrosła z 2,8 ośrodka/1 mln ludności w 2017 r. do 4,59 ośrodka / 1 mln ludności w 2019 r. [10].

Zwiększenie finansowania diagnostyki genetycznej w chorobach nowotworowych, a tym samym szerszy dostęp do badań genetycznych przyczyni się do optymalizacji procesu leczenia i daje nie tylko szansę na dłuższe życie pacjentów, ale także zwiększa efektywność systemu ochrony zdrowia.

Prawidłowa diagnostyka molekularna w raku płuca z użyciem nowoczesnych metod i technologii wymaga nakładów finansowych, a ich rozważne rozdysponowanie może przełożyć się wprost na skutki leczenia. Dla chorego jest to możliwość zastosowania lepszych opcji terapeutycznych, a dla systemu finansowania ochrony zdrowia mniejsze straty na przypadkowym, nieskutecznym stosowaniu drogich terapii, w tym wymierne oszczędności w wydatkach na terapie lekowe ukierunkowane molekularnie (wyeliminowanie niewłaściwej kwalifikacji do leczenia). W rezultacie ułatwiony od 2017 roku dostęp do badania genetycznego powinien skutkować powrotem do zdrowia pacjentów z chorobą nowotworową [11].

Analiza dostępności do innowacyjnych terapii wskazuje, że niezbędna jest koordynacja procesu diagnostycznego w wyspecjalizowanych laboratoriach, które posiadają wysokiej klasy kadrę diagnostów molekularnych i genetycznych oraz wykorzystują najnowsze certyfikowane technologie diagnostyczne. Należy dążyć do wszelkich starań, aby czas oczekiwania na rozpoczęcie leczenia u chorych na raka płuca skrócić do niezbędnego minimum.

Bibliografia

1. Chorostowska Wynimko, B. Jagielska, B. Pieńkowska Grela, M. Sakowicz, E. Strzesak, A. Twarowski, B. Wasąg. Rozliczanie genetycznych badań diagnostycznych w chorobach nowotworowych
-

2. Załącznik nr 7. Wykaz badań genetycznych w chorobach nowotworowych, ZARZĄDZENIE NR 37/2024/DSOZ PREZESA NARODOWEGO FUNDUSZU ZDROWIA z dnia 29 marca 2024 r. w sprawie określenia warunków zawierania i realizacji umów w rodzaju leczenie szpitalne oraz leczenie szpitalne - świadczenia wysoko-specjalistyczne, ze zmianami.
 3. ICD10 Międzynarodowa Klasyfikacja Chorób i Problemów Zdrowotnych
 4. ZARZĄDZENIE NR 37/2024/DSOZ PREZESA NARODOWEGO FUNDUSZU ZDROWIA z dnia 29 marca 2024 r. w sprawie określenia warunków zawierania i realizacji umów w rodzaju leczenie szpitalne oraz leczenie szpitalne - świadczenia wysoko-specjalistyczne, ze zmianami, ze zm.
 5. Zarządzenie nr 167/2019/DSOZ Prezesa NFZ z dnia 29 listopada 2019 r. w sprawie określenia warunków zawierania i realizacji umów w rodzaju świadczenia zdrowotne kontraktowane odrębnie /tekst jednolity/
 6. Załącznik nr 1 do Zarządzenia
 7. Praktyczne aspekty zarządzania przychodami z NFZ i ich wpływ na kondycję finansową podmiotu leczniczego, Beata Jagielska, Joanna Chorostowska-Wynimko, Magdalena Sakowicz, Adam Twarowski, Andrzej Tysarowski
 8. Wpływ zmiany finansowania diagnostycznych badań genetycznych na dostępność do terapii innowacyjnych; J.Chorostowska-Wynimko, J.A. Didkowska, B.Jagielska, M.Sakowicz, I.Skrzekowska-Baran, A.Tysarowski, Raport dostępny pod linkiem: medycynapersonalizowana.com
 9. ICD-9 Międzynarodowa Klasyfikacja Procedur Medycznych, która pozwala przypisać odpowiednie kody do procedur związanych z korzystaniem ze świadczeń zdrowotnych
 10. Mela, A., Rdzanek, E., Tysarowski, A., Sakowicz, M., Jaroszyński, J., Niczporuk-Furtak, M., Żurek, G., Poniatowski, Ł., & Jagielska, B. (2023). The impact of changing the funding model for genetic diagnostics and improved access to personalized medicine in oncology. *Expert Review of Pharmacoeconomics & Outcomes Research*, 23, 43–54.
 11. Wyzwania diagnostyki patomorfologicznej i molekularnej oraz leczenia raka płuca, Innowo, Polskiej Koalicji Medycyny Personalizowanej- Stowarzyszenie
-

11.

Dostępność nowoczesnych metod systemowego leczenia chorych na raka – nowotwory klatki piersiowej

prof. dr hab. n. med. Maciej Krzakowski

Rak płuca jest w Polsce najczęściej rozpoznawanym nowotworem złośliwym i stanowi jedno z najważniejszych wyzwań w onkologii. Najważniejszą metodą przeciwdziałania zagrożeniom związanym z rakiem płuca jest wykorzystanie możliwości profilaktyki pierwotnej (wyeliminowanie narażenia na działanie szkodliwych składników dymu tytoniowego) oraz wtórnej (zwiększenie liczby osób uczestniczących w programie wykrywania raka płuca w stadium wczesnym za pomocą badań niskodawkowej tomografii komputerowej), przy czym oba działania powinny być ściśle powiązane i prowadzone bardziej intensywnie. Niezależnie od wspomnianych działań profilaktycznych nadal wyzwaniem jest leczenie chorych z rozpoznaniem zaawansowanego raka płuca, którzy stanowią przeważającą większość. Chorzy na raka płuca w stadium pierwotnego uogólnienia oraz osoby z nawrotem choroby po doszczętnym leczeniu chirurgicznym lub radiochemioterapii o założeniu radykalnym są kandydatami do chemioterapii, leczenia ukierunkowanego molekularnie i immunoterapii. Leki ukierunkowane molekularnie i inhibitory immunologicznych punktów kontrolnych są dostępne w ramach lekowego programu B.6. (*LECZENIE CHORYCH NA RAKA PŁUCA ORAZ MIĘDZYBŁONIAKA OPŁUCNEJ*). Nazwa programu wskazuje, że uwzględnieni są również od niedawna chorzy z rozpoznaniem międzybłoniaka opłucnej (nowotwór nieporównywalnie rzadszy od raka płuca, ale stanowiący ogromne wyzwanie z powodu zwykle niekorzystnego rokowania chorych).

Program lekowy B.6.

Najnowsza wersja programu B.6. zawiera 16 leków ukierunkowanych molekularnie i inhibitorów immunologicznych punktów kontrolnych, które mogą być wykorzystywane w różnych sytuacjach klinicznych oraz w skojarzeniu z innymi lekami lub metodami miejscowego leczenia. Najwięcej opcji terapeutycznych dotyczy chorych na niedrobnokomórkowego raka płuca. Należy pamiętać, że niektóre leki ukierunkowane zostały ostatnio przeniesione do katalogu substancji czynnych w związku z upłynięciem czasu ochrony patentowej i wprowadzeniem odpowiedników.

Szczególnie ważne jest wprowadzenie do programu B.6. możliwości stosowania leczenia ukierunkowanego na receptor naskórkowego czynnika wzrostu (*EGFR, epidermal growth factor receptor*) oraz immunoterapii skierowanej przeciw ligandowi programowanej śmierci typu 1 (*PD-L1, programmed death ligand type 1*) w uzupełnieniu radykalnego leczenia chirurgicznego i radiochemioterapii.

Lekiem anti-EGFR – stosowanym w pooperacyjnym leczeniu uzupełniającym - jest ozymertynib, który – zgodnie z zapisami programu B.6. – powinien być rozważany u każdego chorego po przebytej resekcji mięszu płucnego i potwierdzoną obecnością mutacji aktywującej w genie EGFR. Korzyści z zastosowania ozymertynibu – w skojarzeniu z lub bez pooperacyjnej chemioterapii – są bardzo znaczące, ponieważ w ogólnej populacji (zaawansowanie w stopniach IB-III A) ryzyko nawrotu jest mniejsze o 80%. Pooperacyjna immunoterapia uzupełniająca doszczętną resekcję mięszu płucnego z wykorzystaniem immunoterapii atezolizumabem jest również bardzo wartościowa, ponieważ u chorych z ekspresją PD-L1 równą lub większą niż 50% zmniejsza ryzyko nawrotu choroby o niemal 60% w porównaniu do obserwacji. Immunoterapia za pomocą innego

inhibitora PD-L1 – durwalumabu – jest już od dłuższego czasu dostępna w programie B.6. w ramach konsolidującego leczenia po jednoczesnej radiochemioterapii pod warunkiem wykluczenia progresji choroby po zakończeniu napromieniania i zapewnia zwiększenie odsetka 5-letnich przeżyć o około 10% w porównaniu do placebo. Należy oczekiwać dalszego powiększenia zakresu metod okołooperacyjnej immunochemioterapii, ponieważ wyniki kilku badań prospektywnych wskazują na znamienne korzyści z zastosowania immunochemioterapii przedoperacyjnej z kontynuowaniem immunochemioterapii po resekcji mięszu płucnego.

Program B.6. zawiera – od niedawna – bardzo szerokie możliwości stosowania leków anty-EGFR w pierwszej i kolejnych liniach leczenia chorych na zaawansowanego niedrobnokomórkowego raka płuca, przy czym najbardziej wartościowe jest stosowanie ozymertynibu w pierwszej linii z uwagi na najlepszą tolerancję oraz skuteczność (w tym – wartość u chorych z przerzutami w mózgu). Podobna sytuacja dotyczy inhibitorów ALK, których duża liczba zapewnia możliwość leczenia pierwszej i kolejnych linii (ostatnio program B.6. został wzbogacony o lorlatynib). Obecne zapisy programu B.6. zapewniają również potrzeby chorych z rearanżacją genu ROS1 i NTRK1-3 (możliwość stosowania kryzotynibu).

Osiągnięciem ostatnich miesięcy jest również wzbogacenie spektrum możliwości immunoterapii, która – przede wszystkim w zależności od ekspresji PD-L1 – może być stosowana samodzielnie lub łącznie z chemioterapią. Liczba inhibitorów immunologicznych punktów kontrolnych (pembrolizumab, atezolizumab, cemiplimab, niwolumab, ipilimumab) – stosowanych podczas monoterapii lub immunochemioterapii – zapewnia możliwości dobrania leku lub schematu do indywidualnej charakterystyki chorych z uwzględnieniem – przykładowo – typu histologicznego nowotworu, chorób współwystępujących i umiejscowienia zmian przerzutowych. Znacząca w praktyce klinicznej jest możliwość stosowania u wybranych chorych immunochemioterapii z podwójną blokadą immunologiczną (niwolumab z ipilimumabem) oraz mniej intensywną chemioterapią (2 cykle z udziałem pochodnej platyny i innego leku).

Program B.6. obejmuje również chorych z rozpoznaniem drobnokomórkowego raka i zawiera możliwość stosowania chemioimmunoterapii z wykorzystaniem atezolizumabu lub durwalumabu (inhibitory PD-L1) u chorych z tzw. rozległą postacią nowotworu (stopień zaawansowania IV według klasyfikacji TNM). Warte podkreślenia jest również stworzenie możliwości korzystania z immunoterapii (tzw. podwójna blokada niwolumabem i ipilimumabem) chorych na zaawansowanego międzybłoniaka opłucnej.

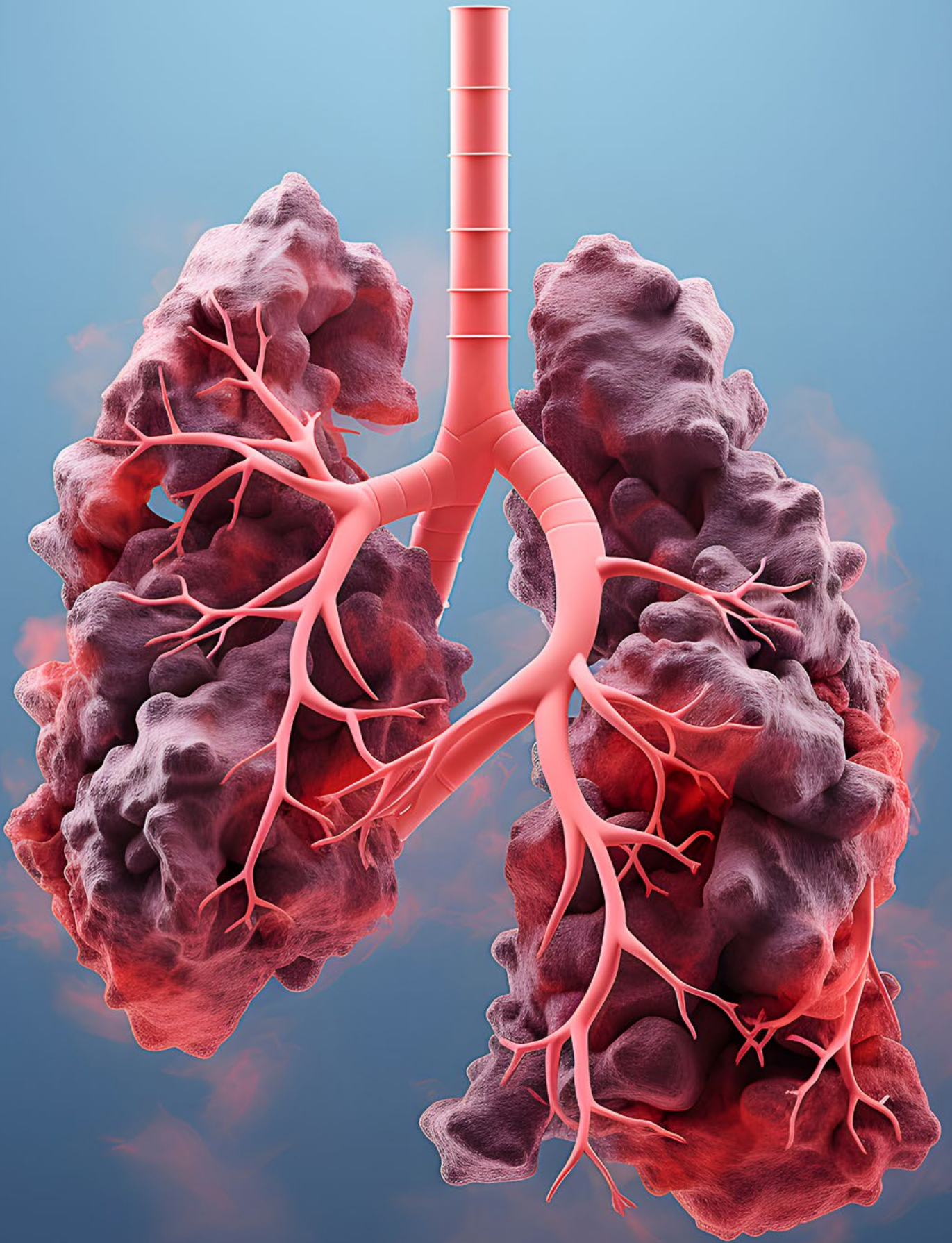
Niemniej ważne są zmiany wprowadzone podczas ostatnich miesięcy w programie B.6., których celem było urealnienie wskazań oraz dostosowanie zapisów od bieżącego stanu wiedzy. W przypadku leków ukierunkowanych molekularnie oraz immunoterapii została wprowadzona możliwość kontynuowania dotychczasowego leczenia u chorych z tzw. oligoprogresją (progresja jednej lub niewielu zmian przy jednoczesnej kontroli pozostałych) pod warunkiem wykorzystania jednej z metod miejscowego postępowania (resekcja lub radioterapia). Zmieniona została treść zapisu dotyczącego współwystępujących chorób – obecnie możliwe jest stosowanie leczenia u chorych z innymi nowotworami pod warunkiem obiektywnej kontroli (podobny zapis dotyczy współistniejących chorób nienowotworowych). Pod względem praktycznym istotne jest uproszczenie zasad monitorowania przebiegu leczenia (np. zmniejszenie częstości wykonywania badań obrazowych okresie leczenia podtrzymującego).

Dostępność innych metod leczenia

Ważnym elementem systemowego leczenia jest nadal chemioterapia (stosowanie konwencjonalnych leków cytotoksycznych), które są w pełni dostępne (katalog substancji czynnych). Wskazane jest zwiększenie częstości stosowania jednoczesnej radiochemioterapii, ponieważ nadal zbyt mało chorych korzysta z wymienionej metody postępowania. Należy mieć nadzieję, że w większym stopniu będzie wykorzystywana stereotaktyczna radioterapia. Oczekiwane są zmiany zasad finansowania metod ablacyjnych, które – u wybranych chorych – mogą być stosowane w praktyce klinicznej.

Rozwiązania organizacyjne

Rozpoznawanie nowotworów klatki piersiowej i leczenie chorych prowadzą w Polsce ośrodki chirurgii klatki piersiowej, chorób płuc i onkologii. Kompleksowe postępowanie z udziałem pełnego zakresu metod diagnostycznych i terapeutycznych jest możliwe w nielicznych ośrodkach, które posiadają dostępność wszystkich wykorzystywanych metod w jednej lokalizacji. Niedostateczne możliwości w zakresie kompleksowego postępowania oraz – będąca konsekwencją wymienionej sytuacji – konieczność prowadzenia postępowania diagnostycznego i terapeutycznego w różnych ośrodkach jest jedną z głównych przyczyn opóźnień i nieprawidłowości w określaniu dokładnego rozpoznania oraz zaawansowania, a także powoduje niedostateczne wykorzystywanie skojarzonego leczenia. Konieczne jest również wprowadzenie systemu obiektywnego określania jakości postępowania przez wykorzystanie mierników (np. częstość wykonywania doszczętnych resekcji mięszu płucnego wobec ogólnej liczby chorych z rozpoznaniem raka płuca, częstość stosowania skojarzonej radiochemioterapii wobec liczby chorych na miejscowo zaawansowanego raka płuca lub częstość stosowania leczenia ukierunkowanego molekularnie i immunoterapii wobec ogólnej liczby z wskazaniami ustalonymi na podstawie analizy biomarkerów predykcyjnych oraz czasu przeżycia).



ISBN 978-83-969207-1-3



9 788396 920713