



Molekularne uwarunkowania leczenia raka piersi

Zeszyty edukacyjne / część II

Raport pod patronatem:

Konsultanta krajowego w dziedzinie
onkologii prof. dr hab. n. med.
Macieja Krzakowskiego

Autorzy:

dr n.med. Andrzej Tysarowski
dr n.med. Agnieszka Jagiełło-Gruszfeld
dr hab. n.med. Lubomir Bodnar
dr n.med. Roman Dubiański
mgr inż. Magdalena Sakowicz
dr hab. n.med. Beata Jagielska



POLSKA KOALICJA
MEDYCYN Y PERSONALIZOWANEJ
STOWARZYSZENIE



INSTITUT INNOWACJI I ODPOWIEDZIALNEGO ROZWOJU

MOLEKULARNE UWARUNKOWANIA LECZENIA RAKA PIERSI



ISBN 978-83-959737-6-5



9 788395 973765

Spis treści

1. Wprowadzenie	4
2. Etiopatogeneza	6
3. Wprowadzenie do badań genetycznych wykonywanych w raku piersi	18
3.1. Znaczenie szlaku PI3K w HR+ raku piersi	20
3.2. Aspekty metodyczne w badaniu <i>PIK3CA</i> i zakres analizy	22
3.2.1. Przygotowanie materiału pochodzącego z blochków parafinowych do badań genetycznych	22
3.2.2. Zakres analizy molekularnej	24
3.2.3. Techniki biologii molekularnej stosowane do diagnostyki mutacji <i>PIK3CA</i>	26
3.2.4. Alternatywne techniki oceny mutacji <i>PIK3CA</i> (ct DNA)	28
3.3. Algorytm diagnostyczny	29
3.4. Raportowanie uzyskanych wyników	29
4. Możliwości terapeutyczne u pacjentek z hormonozależnym rakiem piersi z obecnością mutacji w genie <i>PIK3CA</i> – przykłady kliniczne	32
5. Finansowanie diagnostycznych badań genetycznych przez publicznego płatnika	42
5.1. Możliwości finansowania diagnostycznych badań genetycznych	42
5.2. Zasady rozliczania badań genetycznych w chorobach nowotworowych w ramach umowy leczenia szpitalne	46
5.2.1. Badania genetyczne w chorobach nowotworowych z materiału pobranego w trakcie hospitalizacji	46
5.2.2. Badania genetyczne w chorobach nowotworowych z materiału archiwalnego	49
5.2.3. Wykaz badań genetycznych w chorobach nowotworowych – załącznik nr 7	51
5.3. Analiza sprawozdanych i rozliczonych badań genetycznych w nowotworach piersi C50 w okresie 2017-2019	53
Spis rysunków	61
Spis tabel	61
Spis rysunków	62

1.

Wprowadzenie

Rak piersi jest najczęstszym nowotworem złośliwym występującym wśród kobiet. W ciągu ostatnich lat jest rozpoznawany na świecie u około 2,1 miliona kobiet, i stanowi około 25% wszystkich zdiagnozowanych nowotworów wśród kobiet. Ostatnie lata pokazują znamienne zahamowanie tempa wzrostu zachorowalności w krajach rozwiniętych w porównaniu z regionami o niższym indeksie rozwoju społecznego (*HDI – Human Development Index*). W tych regionach świata obserwuje się zjawisko odwrotne – wzrost zachorowalności ze względu na zmiany cywilizacyjne oraz stylu życia. Nowotwór ten występuje również, ale niezwykle rzadko, u mężczyzn. (1–3)

Na świecie z powodu raka piersi umiera ponad 500 tysięcy kobiet rocznie. Wskaźnik umieralności z powodu tego nowotworu w Unii Europejskiej uległ w ciągu dekady 2002-2012 zmniejszeniu z $17,9/10^5$ do $15,2/10^5$. Spośród krajów europejskich największe spadki wskaźników umieralności odnotowano w Wielkiej Brytanii oraz krajach północnej i zachodniej Europy. (3)

Dla porównania w Stanach Zjednoczonych szacuje się, że w 2021 roku u 281 550 kobiet zostanie zdiagnozowany inwazyjny rak piersi, a u 49 290 kobiet zostanie rozpoznana jego postać nieinwazyjna (*in situ*). Od 2008 do 2017 roku częstość zachorowania na inwazyjnego raka piersi u kobiet wzrastała o pół procent każdego roku. Dla porównania w USA u mężczyzn rocznie inwazyjny rak piersi diagnozuje się u 2 650 mężczyzn. (4)

Dane z Krajowego Rejestru Nowotworów (KRN) pokazały, że w 2017 roku w Polsce odnotowano 18 529 nowych zachorowań i 6 493 zgonów w przebiegu raka piersi. Standaryzowany współczynnik zachorowalności wyniósł $53,0/10^5$ zaś umieralności $15,0/10^5$. W Polsce obserwuje się wzrost zachorowalności na raka piersi, Ta dynamika należy do najwyższych spośród schorzeń onkologicznych w polskiej populacji (wyższą obserwuje się jedynie w dla raka płuca u kobiet). Polska na tle najbardziej rozwiniętych krajów Europy charakteryzuje się niską, jednak wzrastającą zachorowalnością na raka piersi. Na obserwowany wzrost ma wpływ wprowadzony w 2006 roku program populacyjnych badań skryningowych w kierunku wczesnego wy-

krycia raka piersi. U kobiet w przedziale wiekowym 50-69 lat przełożyło się to na znaczny wzrost rozpoznawanych przypadków raka piersi. Mniej zachorowań odnotowano u chorych pomiędzy 70 a 90 rokiem życia. Według danych KRN w Polsce odsetki przeżyć całkowitych jednorocznych- trzyletnich i pięcioletnich w 2016 roku wynosiły – odpowiednio – 94,4%, 84,8% i 78,5%. (5)

U kobiet w Polsce rak piersi jest drugą, po raku płuca, przyczyną zgonów z powodu nowotworów złośliwych. Analizując umieralność na raka piersi stwierdza się, że po okresie stałego wzrostu w połowie lat 90., (standaryzowany współczynnik umieralności) do $16/10^5$, w latach 1996-2010 zaobserwowano istotny spadek. Natomiast w kolejnej dekadzie (od 2010) stwierdza się ponowny wzrost umieralności z powodu raka piersi – w 2017 r. ten współczynnik wyniósł $15/10^5$. (6,7)

2.

Etiopatogeneza

Zdefiniowano wiele czynników ryzyka wpływających na powstawanie raka piersi jednak dokładnej etiopatogenezy nie udało się dotychczas ustalić. Wśród najistotniejszych postrzega się: rodzinny wywiad raka piersi, starszy wiek, nosicielstwo określonych zaburzeń genetycznych (w tym – mutacje genów wysokiego ryzyka zachorowania jak: *BRCA1*, *BRCA2*, *PALB2*, *CHEK2*) oraz ekspozycja na promieniowanie jonizujące. Wśród innych czynników ryzyka wymienia się zwykle te, które są związane z aspektami hormonalnymi kobiet tzn. z dłuższą ekspozycją na estrogeny jak: wczesna pierwsza miesiączka, późna menopauza, bezdzietność, późny wiek urodzenia pierwszego dziecka. Ocenia się, że urodzenie co najmniej jednego dziecka zmniejsza ryzyko zachorowania o około 25% w porównaniu do kobiet, które nie rodziły wcale. Wśród korzystnych aspektów macierzyństwa na zmniejszenie wystąpienia raka piersi ma wpływ długotrwałe karmienie piersią.(6)

W wielu badaniach populacyjnych stwierdzono, że długotrwałe stosowanie hormonalnej terapii zastępczej (HZZ) może wiązać się ze wzrostem ryzyka raka piersi.⁽⁸⁾ Jednak istnieją duże rozbieżności między uzyskiwanymi wynikami. Mogą one wynikać z różnic pomiędzy włączanymi populacjami kobiet, rodzaju i schematów HZZ. W przeprowadzonych dotychczas badaniach na dużych kohortach pacjentek zaobserwowano, że leczenie HZZ jedynie estrogenami wiązało się z efektem ochronnym dla zachorowania na raka piersi (w badaniu Womens' Health Initiative, WHI), jednak w innych badaniach obserwacyjnych, stwierdzano wręcz odwrotny efekt tzn. zwiększone ryzyko względne (RR) w zakresie 1,1-1,3^(9,10). Schematy HZZ estrogenowo-progestagenowe wykazują zwykle w badaniach populacyjnych wyższe ryzyko wystąpienia raka piersi (RR w zakresie 1,5-2)^(9,11). Niemniej jednak nie wszystkie schematy estrogenowo-progestagenowe HZZ wiążą się z takim samym ryzykiem raka piersi. Octan medroksyprogesteronu, lewonorgestrel i octan noretisteronu wiążą się z wyższym ryzykiem zachorowania na raka piersi (RR w zakresie 1,5-2) niż mikronizowany progesteron czy dydrogesteron (RR w zakresie 1,1-1,3)⁽¹¹⁾. W związku z powyższymi danymi wydaje się być uzasadnione informowanie kobiet stosujących przewlekłe HZZ o możliwym niekorzystnym wpływie na zwiększenie ryzyka zachorowania na raka piersi⁽¹²⁾.

Wiele prac wskazuje na związek otyłości z ryzykiem zachorowania na raka piersi. U otyłych pacjentów na raka piersi odnotowuje się także wyższy odsetek powikłań po leczeniu i zwiększone ryzyko wznowy. Złożoność pato-

genezy zarówno otyłości, jak i raka piersi stanowi wyzwanie w określeniu wpływu otyłości na ryzyko powstawania tego nowotworu. Mechanizmy zidentyfikowane w mikrośrodowisku guza, a także w mikrośrodowisku tkanki tłuszczowej, takie jak insulinooporność, nasilenie procesów zapalnych mogą istotnie przyczyniać się do rozwoju i progresji raka piersi.⁽¹³⁾ W badaniach doświadczalnych zaobserwowano istotne różnice w mikrośrodowisku immunologicznym guza w zależności od obecności otyłości u pacjentów. Stwierdzono, że wraz z wiekiem obserwuje się pogorszenie funkcji limfocytów T, które istotnie nasilała otyłość i związana z nią zwiększona ekspresja leptyny. Otyli pacjenci wykazywali zmniejszoną zdolność proliferacyjną i zwiększoną ekspresję receptorów programowanej śmierci komórki (PD-L1) w komórkach guza⁽¹⁴⁾. Dodatkowo należy zauważyć, że tkanka tłuszczowa wydziela szereg hormonów jak: insulinę, hormony płciowe, insulinopodobny czynnik wzrostu, a także czynnik martwicy nowotworów α , czynnik jądrowy $\kappa\beta$, interleukinę 6, adiponektyny, inhibitor aktywatora plazminogenu i angiotensyny. Nie można wykluczyć, że czynnikiem inicjującym jest interakcja między krążącym estrogenem a insulinoopodobnym czynnikiem wzrostu oraz wpływ hiperinsulinomii na promocję raka piersi⁽¹⁵⁾.

Istotne znaczenie w rozwoju raka piersi mają zaburzenia genetyczne, z których najsilniejszy wpływ ma przede wszystkim nosicielstwo mutacji genów *BRCA1* i *BRCA2*. Szacuje się, że mutacje tych genów w ogólnej populacji stwierdza się u około 1/1300-1/1800 kobiet, a w Polsce u 1/170. Kobiety z nosicielstwem

mutacji genu *BRCA1* mają zwiększone ryzyko zachorowania na raka piersi, które do osiemdziesiątego roku życia wynosi 45-90%. Z kolei, nosicielki mutacji genu *BRCA2* mają około 31-56% ryzyko zachorowania na raka piersi (16). Częstość występowania mutacji w genach *BRCA* w raku piersi wynosi około 5%. Obecność mutacji w genach *BRCA1* i 2 może predysponować do zwiększonego ryzyka raka piersi odpowiednio o 60 i 30%. Nowotwór ten u kobiet z mutacją germinálną genów *BRCA* jest rozpoznawany wcześniej (mediana – poniżej 50. roku życia) niż w przypadkach sporadycznych. Niektórych czynniki niezdrowego stylu życia mogą mieć istotny wpływ na zwiększanie ryzyka raka piersi u tych kobiet tj. palenie tytoniu, nadwaga, brak aktywności fizycznej, zwłaszcza w wieku pomenopauzalnym. Dodatkowo ryzyko zachorowania na raka piersi u nosicielek mutacji genów *BRCA* mogą modyfikować czynniki hormonalne i reprodukcyjne takie jak: ilość ciąż, laktacja i stosowanie doustnych środków antykoncepcyjnych. (17,18)

Rak piersi rozwijający się na podłożu zaburzeń w obrębie genów *BRCA* zwykle charakteryzuje się większym stopniem złośliwości oraz towarzyszącą mutacją w genie *TP53* a także brakiem ekspresji receptorów estrogenowych i progesteronowych. Rokowanie u chorych na raka piersi będących nosicielkami mutacji genów *BRCA* jest niekorzystne. (2)

W metaanalizie oceniającej 30 badań i dane ok. 36 tys chorych wykazano, że pacjenci z mutacją *BRCA1* mieli istotnie krótsze przeżycie całkowite OS (HR [95% CI] 1,2 [1,08, 1,33]; $P < 0,001$), zaś z mutacją *BRCA2* miała istot-

nie krótszy czas przeżycia wolny od wznowy choroby DFS (HR [95% CI] 1,35 [1,1, 1,67]; $P = 0,0049$) (19) W badaniu analizującym populację ponad 100 000 chorych na raka piersi, w której stwierdzono 3,4% nosicielek mutacji w genach *BRCA*, stwierdzono, że obecność mutacji *BRCA1* była niekorzystnym czynnikiem rokowniczym w porównaniu do chorych nie obciążonych tym zaburzeniem (20). Z kolei, w metaanalizie 16 badań na populacji 10 180 chorych zaobserwowano, że ekspresja receptorów estrogenowych może zmieniać odpowiedź na leczenie u pacjentów z mutacją *BRCA1*, natomiast w populacji z mutacją *BRCA2* pozostawała bez wpływu (21). Autorzy tego badania zauważyli, że mutacja w genach *BRCA* nie miała niezależnego wpływu prognostycznego natomiast inne jak stopień zaawansowania choroby oraz obecnością innych zmian molekularnych wykazywały takie znaczenie. Wśród zaburzeń genetycznych wystąpienia raka piersi wymienia się u 1% chorych nosicielstwo mutacji w genach o wysokiej penetracji takich jak *PTEN*, *TP53*, *LKB1*, *STK11* i *CDH1* oraz u 2% o niskiej (*ATM*, *BRIP1*, *CHEK2*, *PALB2*) (2).

Badanie patomorfologiczne guza jest podstawą rozpoznania raka piersi. Materiał tkankowy uzyskuje się drogą biopsji gruboigłowej, biopsji mammotomicznej, pobrania wycinków z guza lub podczas zabiegu operacyjnego. Rodzaj zastosowanej biopsji warunkuje możliwość postawienia kompleksowego rozpoznania. Nie rekomenduje się wykonywania biopsji cienkoigłowych (BAC) guza piersi, ponieważ ocena materiału pod względem statusu receptora HER2 (*human epidermal receptor 2*), a także różnicowa-

nie pomiędzy postaciami przedinwazyjnymi zrazikowymi (*lobular carcinoma in situ; LCIS*) i przewodowymi (*ductal carcinoma in situ; DCIS*) a inwazyjnymi nie są możliwe. W związku z tym rekomendowaną biopsją dla postawienia wiarygodnego rozpoznania histopatologicznego raka piersi są: gruboigłowa lub mammotomiczna, które umożliwiają właściwą ocenę patomorfologiczną podtypu histologicznego oraz ekspresji receptorów estrogenowych (ER) i progesteronowych (PR) oraz statusu *HER2*, indeksu proliferacyjnego Ki67 i stopnia zróżnicowania histologicznego guza. BAC może być użyteczne jedynie do weryfikacji statusu regionalnych węzłów chłonnych lub podejrzanych ognisk przerzutowych. (2,22)

Zmiany prekursorowe

Zmianami prekursorowymi raka piersi są: LCIS, DCIS. Postać LCIS oraz atypowa hiperplazja zrazikowa (*ALH, atypical lobular hyperplasia*) nie są uznawane za stany przedrakowe. Postać przewodowa przedinwazyjna jest rozrostem nieprawidłowych komórek nabłonkowych przewodów mlekowych wykazujących cechy złośliwości, ale z naciekiem nie przechodzącym przez błonę podstawną. W badaniu MMG zwykle postać DCIS przedstawia się jako skupiska mikro zwapnień lub zmiana guzkowa (2,22).

Raki naciekające

Wśród raków piersi naciekających najczęstszą postacią w około 70–80% jest rak bez specjalnego typu (NST), dawniej określany jako przewodowy. Kolejnym, pod względem częstości występowania, jest rak zrazikowy.

Pozostałe podtypy występują rzadziej i obejmują postacie: rdzeniastą, śluzowotwórczą, cewkową. Raki molekularnie klasyfikowane jako bazalno-podobne w obrazie mikroskopowym mają nierówne granice, często stwierdza się naciek limfoplazmatyczny, który jednak nie jest cechą specyficzną i może być widoczny w innych podtypach raka piersi. Często stwierdza się centralne bezkomórkowe obszary hialinizacji lub martwicy. Integralną częścią badania patomorfologicznego powinno być przeprowadzenie oceny immunohistochemicznej (IHC) zawierającej ocenę statusu receptorów *ER*, *PR*, *HER2* a także indeksu proliferacji Ki-67 (23,24).

Zgodnie ze światowymi rekomendacjami, w tym zaleceniami ASCO ocenę stanu *HER2* dokonuje w pierwszym etapie patomorfolog na podstawie badania IHC, a w przypadku wyniku wątpliwego (ekspresja 2+) konieczna jest ocena fluoroscencyjnej hybrydyzacji *in situ* (*fluorescence in situ hybridization, FISH*) amplifikacji genu *HER2/neu*. Ocena wyników FISH jest dokonywana w tych samych obszarach preparatu, w których stwierdzono ekspresję *HER2* w badaniach IHC. Ostatecznie na podstawie zastosowanego algorytmu patomorfolog dokonuje oceny statusu *HER2*. Za wynik dodatni uznawany jest odczyn określany jako 3+, ujemny 0-1. W przypadku stwierdzonej ekspresji 2+ w badaniu IHC należy ocenić wynik metodą FISH lub CISH (*chromogenic in situ hybridization*). Stwierdzenie co najmniej 6 kopii (amplifikacja) genu lub co najmniej 2,2 x wartości ilorazu liczby kopii genu *HER2* i liczby kopii chromosomu 17 w komórce nowotworowej daje podstawę aby uznać taki wynik za dodatni (2,22,24,25).

Tabela nr 1. Zmiany patomorfologiczne w piersiach*

Rodzaj zmiany	Nazwa jednostki chorobowej
Łagodne zmiany proliferacyjne	Gruczolistość stwardniająca (<i>sclerosing adenosis</i>)
	Gruczolistość apokrynowa (<i>apocrine adenosis</i>)
	Blizna promienista/złożona zmiana stwardniająca (<i>radial scar/ /complex sclerosing lesion</i>)
	Gruczolak cewkowy (<i>tubular adenoma</i>)
	Gruczolak przewodowy (<i>ductal adenoma</i>)
Wewnątrzprzewodowe zmiany proliferacyjne	Zwykła hiperplazja przewodowa (<i>usual ductal hyperplasia</i>)
	Zmiany walcowatokomórkowe (w tym płaska atypia nabłonkowa) (<i>columnar cell changes including flat epithelial atypia</i>)
	Atypowa hiperplazja przewodowa (<i>atypical ductal hyperplasia</i>)
Zmiany prekursorowe	Rak przewodowy <i>in situ</i> (DCIS, <i>ductal carcinoma in situ</i>)
	Neoplazja zrazikowa (rak zrazikowy <i>in situ</i> , atypowa hiperplazja zrazikowa) (<i>lobular neoplasia, lobular carcinoma in situ, LCIS, atypical lobular hyperplasia</i>)
Zmiany brodawkowe	Brodawczak wewnątrzprzewodowy (<i>intraductal papilloma</i>):
	- z atypową hiperplazją (<i>with atypical hyperplasia</i>)
	- z rakiem przewodowym <i>in situ</i> (z DCIS)
	- z rakiem zrazikowym <i>in situ</i> (z LCIS)
	Wewnątrzprzewodowy rak brodawkowy (<i>intraductal papillary carcinoma</i>)
Naciekający rak piersi	Lity rak brodawkowy <i>in situ</i> (<i>solid papillary carcinoma</i>)
	Rak mikroinwazyjny (<i>microinvasive carcinoma</i>)
	Rak naciekający bez specjalnego typu (<i>invasive carcinoma of no special type; NST</i>)
	Rak naciekający zrazikowy (<i>invasive lobular carcinoma</i>)
	Rak cewkowy (<i>tubular carcinoma</i>)
	Rak sitowaty (<i>cribriform carcinoma</i>)
	Rak śluzowy (<i>mucinous carcinoma</i>)
	Rak metaplastyczny (<i>metaplastic carcinoma</i>)
Nowotwory mezenchymalne	Rak rdzeniasty (medularny) (<i>medullary carcinoma</i>)
	Guzkowe zapalenie powięzi (<i>nodular fascitis</i>)
	Naczyniak (<i>angioma</i>)
Nowotwory włóknisto-nabłonkowe	Mięsak naczyniowy (<i>angiosarcoma</i>)
	Gruczolakowłókniak (<i>fibroadenoma</i>)
	Guz liściasty (<i>phyllodes tumor</i>)
	- łagodny (<i>benign</i>)
	- graniczny (<i>borderline</i>)
	- złośliwy (<i>malignant</i>)

* Na podstawie Jassem J, Krzakowski M, Bobek-Billewicz B et al. Breast cancer. *Oncol Clin Pract* 2018; 14. DOI: 10.5603/OCP.2018.0027 (2)

Kluczowe znaczenie ma określenie ekspresji receptorów hormonalnych w komórkach raka piersi. Wyniki randomizowanych badań klinicznych wskazują, że rokowanie chorych na hormono-zależnego raka piersi w zakresie całkowitego czasu przeżycia jest korzystniejsze. Chociaż odpowiedź komórkowa jest zależna od ekspresji izoform ER alfa i beta, kodowanych przez geny odpowiednio w 6q25.1 i 14q22-q24, to w praktyce klinicznej receptor jądrowy ER alfa o wielkości 65 kDa, którego podstawowym ligandem jest 17-p-estradiol, jest najbardziej poznanym. Wiązanie z ligandem stymuluje dimeryzację, a następnie aktywuje wiązanie ze specyficznymi sekwencjami DNA, co indukuje transkrypcję genu, a tym samym odpowiedź komórkową. To działanie można zahamować albo przez zablokowanie receptora, albo pozbawienie go krążącego ligandu. Jego nadmierna ekspresja jest ważnym czynnikiem prognostycznym w raku piersi. Obecność ekspresji ER alfa wiąże się powolną dynamiką wzrostu guza, wysokim stopniem dojrzałości histologicznej, obecnością diploidii (26).

Rak piersi z ekspresją ER alfa najlepiej odpowiada na hormonoterapię. Jednak w przypadku re-ekspresji ER alfa w komórce nowotworowej bez ekspresji receptorów ER nie jest możliwe przywrócenia fenotypu dodatniego na obecność ER alfa, szczególnie pod względem odpowiedzi na leczenie. Pomiar poziomu mRNA w pierwotnych guzach piersi w porównaniu do prawidłowych komórek nabłonkowych w materiale pooperacyjnym wskazuje na wysoki poziom ER alfa w subpopulacji raków piersi w podgrupie nowotworów *HER2-dodatnich* i wiąże się z agresywnym

przebiegiem nowotworu oraz utratą funkcjonalności ER alfa. Niektórzy autorzy uważają, na podstawie przeprowadzonych badań molekularnych, że można wiązać ekspresję ER alfa w raku piersi ze zwiększonym ryzykiem nawrotu i niekorzystnym przebiegiem klinicznym (26).

Podtypy molekularne

Ocena molekularna guzów piersi stała się możliwa dzięki pionierskim pracom grupy Stanforda, dotyczącego oceny ekspresji genów techniką mikromacierzy cDNA. Wyodróżniono pięć biologicznych podtypów raka piersi: luminalny A, luminalny B, z nadekspresją receptora *HER2*, bazalopodobny i seminormalny. Podział ten odzwierciedla zarówno różnice w przebiegu klinicznym choroby i rokowaniu jak też pokazuje biologiczne podłoże heterogenności klinicznej raka piersi. W roku 2011 podczas konferencji St. Gallen zaproponowano, aby w codziennej praktyce klinicznej zastąpić te podtypy wymagające trudno dostępnych badań genetycznych, ich surogatami, opartymi na rutynowo ocenianych kryteriach kliniczno-patologicznych, takich jak: ekspresja receptorów steroidowych, *HER2*, wskaźniku proliferacji Ki67.(27) Obecnie uważa się, że zastosowanie testów IHC z wykorzystaniem przeciwciał monoklonalnych przeciwko Ki67 z wartością odcięcia 13,25% wraz z przeciwciałami przeciwko ER i PgR oraz *HER2* pozwala na odróżnienie podtypu luminalnego A i luminalnego B (23,28).

W codziennej praktyce klinicznej podtypy luminalne, które stanowią około 60% raków piersi, charakteryzują się mniej dynamicznym charakterem wzrostu, obecnością ekspresji

Tabela nr 2. Podtypy molekularne*

Podtyp raka piersi	Rodzaj zmian molekularnych
Luminalny A	ER/PgR (+)
	HER (-)
	Ki-67 < 20%
Luminalny B	ER (+)
	PgR każdy
	HER (-)
Luminalny B	Ki-67 ≥20%
	ER (+)
	PgR <20%
Luminalny HER (+)	HER (-)
	Ki-67 każdy
	ER+
Nieluminalny HER (+)	PgR każdy
	Ki-67 każdy
	ER (-)
Trójujemny	PgR (-)
	Ki-67 każdy
	ER (-)
	PgR (-)

Skróty: ER – receptor estrogenowy (*estrogen receptor*); PgR – receptor progesteronowy (*progesteron receptor*);

HER – receptor naskórkowego czynnika wzrostu (*human epidermal receptor*)

* Na podstawie Jassem J, Krzakowski M, Bobek-Billewicz B et al. *Breast cancer. Oncol Clin Pract* 2018; 14. DOI: 10.5603/OCP.2018.0027 (2)

ER oraz wrażliwością na hormonoterapię. W przypadku podtypu B (*HER2-dodatni* lub *HER2-ujemny*) rokowanie jest gorsze (szczególnie w przypadku obecności cechy *HER2* i ujemnego stanu ER i PgR) (23)

U ok. 15% chorych na raka piersi rozpoznaje się tzw. potrójnie ujemnego raka piersi (*ang. triple negative breast cancer – TNBC*), tzn. nie wykazujących ekspresji receptorów hormo-

nalnych ER, PR oraz *HER2*, co dla populacji polskiej może stanowić ok. 3 000 zachorowań rocznie. Cechuje się dużą agresywnością i skłonnością do powstawania w krótkim czasie odległych przerzutów, zwłaszcza do narządów mięszsowych. Charakterystyka molekularna TNBC wskazuje głównie (ok. 81%) na profil bazalopodobny ekspresji genów. (29) Mają one cechy mioepitelialne i charakteryzują się wysoką aktywnością mitotyczną

i jądrową, koekspresją cytokeratyn o wysokiej masie cząsteczkowej i wimentyny. Bazalno-podobne raki piersi wykazują ekspresję genów uprzednio związanych z komórkami podstawnymi/mioepitelialnymi, w tym CK5 i CK17, integryną 4, lamininą, integryną CD117, 6, metalotioneiną IX, białkiem 7 wiążącym kwasy tłuszczowe, P-kadheryną, EGFR, jaskoliną 1 i 2, i czynnikiem jądrowym κB (30). Obecna jest też ekspresja wielu innych genów związanych z aktywacją szlaków sygnałowych, proliferacją mitotycznych genów kontrolnych oraz genów odpowiedzialnych za wzrost komórek i genów zaangażowanych w transdukcję sygnału i czynniki transkrypcyjne. Stwierdza się też mutacje genu *TP53* z ekspresją białka p53. Chore z mutacjami genu *BRCA1* często wykazują fenotyp raka bazalno-podobnego [60-66]. Komórki raków bazalno – podobnych nie wykazują ekspresji ER i PgR, czynników transkrypcyjnych, onkogenów (np. *HER2/neu*, *GATA3*) podstawowego czynnika transkrypcyjnego 3, białka 1 wiążącego X-box i innych (31,32).

W obrębie chorych na raka piersi nie można wykluczyć obecności zróżnicowanych profili ekspresji genów oraz wzorców molekularnych. Wskazuje to na odmienne, korzystne rokowanie u chorych, które uzyskały całkowitą odpowiedź patomorfologiczną na leczenie neoadjuwantowe w porównaniu do chorych, u których mamy do czynienia z odpowiedzią częściową.

Czynniki prognostyczne i predykcyjne

Stopień zaawansowania według klasyfikacji TNM uznaje się za najważniejszy czynnik prognostyczny w raku piersi. Znaczenie ma nie

tylko wielkość guza i stan węzłów chłonnych, ale również ważna jest obecność przerzutów odległych. Istotnymi elementami są stopień zróżnicowania nowotworu oraz typ histologiczny. Niekorzystne znaczenie ma obecność dużych guzów powyżej 3 cm, zajęcie węzłów chłonnych, obecność zatorów z komórek nowotworowych w naczyniach krwionośnych lub dodatni stan *HER2* lub większa ekspresja Ki67. Postać trójjemnego raka piersi ma bardzo niekorzystne rokowanie, co do czasu przeżycia i nawrotu (23,33).

Eksperti Amerykańskiego Połączonego Komitetu Nowotworów (AJCC, *American Joint Cancer Committee*) określili biologiczne czynniki prognostyczne, którymi są: wskaźnik proliferacji, ekspresja receptorów ER i PR, nadekspresja *HER2*, stopień zróżnicowania histopatologicznego, oraz charakterystyka paneli wielogenowych. Stwierdzono, że panele molekularne wykorzystywane dla szacowania ryzyka nawrotu i doboru rodzaju leczenia uzupełniającego mają klinicznie znamienne wartości i powinno się je włączać do oceny rokowania. Autorzy konsensusu podkreślili, że VIII edycja AJCC TNM pozwala na dokładną ocenę stopnia zaawansowania w oparciu o klasyczne czynniki anatomiczne, które mogą być modyfikowane o zastosowanie biomarkerów oraz analiz wieloczynnikowych pochodzących z paneli genetycznych (34).

Przykładem kompleksowej oceny prognostycznej w raku piersi są wyniki badania MIN-DACT wykazującego, że 5-letni OS u chorych z niskim ryzykiem określonym na podstawie statusu genów, które pomimo wysokiego ryzyka klinicznego nawrotu a nie otrzymały

uzupełniającej chemioterapii, były zbliżone do rokowania u kobiet, które były leczone uzupełniająco (35). W oparciu o tabelę rokowniczą opracowaną przez MD Anderson Cancer Center można stwierdzić, że 5-letni DFS u chorych z rakiem piersi w stopniu zaawansowania IIB, brakiem ekspresji ER, ujemnym stanem *HER2* oraz wysokim stopniem złośliwości (G3) wynosi 92%, podczas, gdy u chorych z obecną ekspresją ER, cechą *HER2* (-) oraz niskim stopniem złośliwości (G1) wspomniany wskaźnik osiąga 97% (36).

Rak piersi należy do nowotworów o relatywnie powolnej dynamice wzrostu guza. Dopiero po okresie od 8 do 20 lat osiąga wielkość możliwą do wykrycia w badaniu fizykalnym, 10 mm. Stwierdza się jednak przerzuty odległe również u chorych z niewielkim guzem pierwotnym lub nawet bez jego uwidocznienia. (33) Zdaniem niektórych autorów, rak piersi jest już w chwili rozpoznania chorobą systemową o charakterze przewlekłym i zróżnicowanym przebiegu. Ryzyko nawrotu istnieje nawet po 20-30 latach od zakończenia leczenia radykalnego (37).

Rak piersi może się szerzyć drogą naczyń krwionośnych i chłonnych. W niektórych przypadkach ognisko pierwotne może występować w piersi wieloogniskowo, szczególnie w podtypie zrazikowym. Pierwotnie obustronny rak piersi występuje rzadko. Miejscowo choroba rozprzestrzenia się drogą naczyń chłonnych dając przerzuty w pachowych węzłach chłonnych u około 30-40% chorych (w drugiej kolejności – węzły piersiowe wewnętrzne) (23). Analizując lokalizację narządową przerzutów stwierdza się zależność od

określonych podtypów molekularnych oraz od charakterystyki mikrośrodowiska guza. Przerzuty odległe rozpoznawane są najczęściej w kościach (60 to 85%), płucach (ok. 45%), mózgu (ok. 50%), wątrobie (ok. 32%), skórze, tkankach miękkich oraz wielonarządowo (15-20 %). Większość nawrotów choroby występuje między 2. a 3. rokiem obserwacji. Przerzuty odległe występują u blisko 60% chorych, a wznowy miejscowe u 30% (38).

Wdrożenie nowoczesnych metod diagnostycznych i terapeutycznych do codziennej praktyki klinicznej zmieniło współczesną onkologię. Pogłębiona ocena molekularna staje się koniecznością do poprawy wyników leczenia chorych na raka piersi oraz pozwala na wdrożenie innowacyjnych metod terapii obecnie definiowanych jako leczenie spersonalizowane. Obecnie trwają liczne badania I, II i III fazy klinicznej z zastosowaniem nowych leków ukierunkowanych molekularnie działających na różne punkty uchwytu w szlakach przesyłania sygnału w komórce. Personalizacja postępowania diagnostycznego – terapeutycznego staje się szansą na przełamanie impasu w jakim znalazła się onkologia z jej tradycyjnymi metodami leczenia. Niektóre z metod molekularnego leczenia celowanego znalazły już miejsce w praktyce klinicznej u chorych na raka piersi.

Piśmiennictwo:

1. Mammography screening — a recognised standard | Didkowska | Nowotwory. *Journal of Oncology* [Internet]. [cytowane 21 grudzień 2021]. Dostępne na: https://journals.viamedica.pl/nowotwory_journal_of_oncology/article/view/51171
2. Jassem J, Krzakowski M. Rak piersi. *Breast cancer. Oncol Clin Pr.* 2018;4(14):171–215.
3. Carioli G, Malvezzi M, Rodriguez T, Bertuccio P, Negri E, La Vecchia C. Trends and predictions to 2020 in breast cancer mortality in Europe. *Breast Edinb Scotl.* grudzień 2017;36:89–95.
4. DeSantis CE, Ma J, Gaudet MM, Newman LA, Miller KD, Goding Sauer A, i in. *Breast cancer statistics, 2019.* *CA Cancer J Clin.* 2019;69(6):438–51.
5. Raporty | KRN [Internet]. [cytowane 23 grudzień 2021]. Dostępne na: <http://onkologia.org.pl/raporty/>
6. Rak piersi | Jassem | *Onkologia w Praktyce Klinicznej - Edukacja* [Internet]. [cytowane 21 grudzień 2021]. Dostępne na: https://journals.viamedica.pl/onkologia_w_praktyce_klin_edu/article/view/71321
7. Wojciechowska U. *Cancer in Poland in 2018.* Warszawa 2020: Ministerstwo Zdrowia;
8. Rozenberg S, Di Pietrantonio V, Vandromme J, Gilles C. Menopausal hormone therapy and breast cancer risk. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* grudzień 2021;35(6):101577.
9. Chlebowski RT, Anderson GL, Aragaki AK, Manson JE, Stefanick ML, Pan K, i in. Association of Menopausal Hormone Therapy With Breast Cancer Incidence and Mortality During Long-term Follow-up of the Women's Health Initiative Randomized Clinical Trials. *JAMA.* 28 lipiec 2020;324(4):369–80.
10. Manson JE, Kaunitz AM. Menopause Management--Getting Clinical Care Back on Track. *N Engl J Med.* 3 marzec 2016;374(9):803–6.
11. Gompel A, Plu-Bureau G. Progesterone, progestins and the breast in menopause treatment. *Climacteric J Int Menopause Soc.* sierpień 2018;21(4):326–32.
12. Chlebowski RT, Anderson GL, Gass M, Lane DS, Aragaki AK, Kuller LH, i in. Estrogen plus progestin and breast cancer incidence and mortality in postmenopausal women. *JAMA.* 20 października 2010;304(15):1684–92.
13. Kaul K, Misri S, Ramaswamy B, Ganju RK. Contribution of the tumor and obese microenvironment to triple negative breast cancer. *Cancer Lett.* 30 marzec 2021;
14. Wang Z, Aguilar EG, Luna JJ, Dunai C, Khuat LT, Le CT, i in. Paradoxical effects of obesity on T cell function during tumor progression and PD-1 checkpoint blockade. *Nat Med.* styczeń 2019;25(1):141–51.
15. Gravena AAF, Romeiro Lopes TC, Demitto M de O, Borghesan DHP, Dell' Agnolo CM, Brischiliari SCR, i in. The Obesity and the Risk of Breast Cancer among Pre and Postmenopausal Women. *Asian Pac J Cancer Prev APJCP.* 26 wrzesień 2018;19(9):2429–36.
16. Tan DSP, Rothermundt C, Thomas K, Bancroft E, Eeles R, Shanley S, i in. „BRCAness” syndrome in ovarian cancer: a case-control study describing the clinical features and outcome of patients with epithelial ovarian cancer associated with BRCA1 and BRCA2 mutations. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 1 grudzień 2008;26(34):5530–6.

17. Daniele A, Divella R, Pilato B, Tommasi S, Pasanisi P, Patruno M, i in. Can harmful lifestyle, obesity and weight changes increase the risk of breast cancer in BRCA 1 and BRCA 2 mutation carriers? A Mini review. *Hered Cancer Clin Pract.* 27 październik 2021;19(1):45.
18. Huszno J, Kołosza Z, Grzybowska E. BRCA1 mutation in breast cancer patients: Analysis of prognostic factors and survival. *Oncol Lett.* luty 2019;17(2):1986–95.
19. Liu M, Xie F, Liu M, Zhang Y, Wang S. Association between BRCA mutational status and survival in patients with breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat.* kwiecień 2021;186(3):591–605.
20. Godet I, Gilkes DM. BRCA1 and BRCA2 mutations and treatment strategies for breast cancer. *Integr Cancer Sci Ther.* luty 2017;4(1).
21. Ethier J-L, Desautels D, Templeton A, Shah PS, Amir E. Prognostic role of neutrophil-to-lymphocyte ratio in breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *Breast Cancer Res BCR.* 5 styczeń 2017;19(1):2.
22. Cardoso F, Kyriakides S, Ohno S, Penault-Llorca F, Poortmans P, Rubio IT, i in. Early breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up†. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol.* 01 2019;30(8):1194–220.
23. Jassem RJ, Krzakowski M, Jassem Z autor ski: J, Krzakowski M, Bobek-Billewicz B, Duchnowska R, i in. Rak piersi. *Onkol W Prakt Klin - Eduk.* 2020;6(5):297–352.
24. Viale G. The current state of breast cancer classification. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol.* wrzesień 2012;23 Suppl 10:x207-210.
25. Wolff AC, Hammond MEH, Allison KH, Harvey BE, Mangu PB, Bartlett JMS, i in. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Focused Update. *Arch Pathol Lab Med.* listopad 2018;142(11):1364–82.
26. Debeb YG, Berihu BA. Review on the Role of Estrogen Receptors in Breast Cancer [Internet]. 2015 [cytowane 23 grudzień 2021]. Dostępne na: <https://www.semanticscholar.org/paper/Review-on-the-Role-of-Estrogen-Receptors-in-Breast-Debeb-Berihu/73450e0460c1cbddf-f8815ee6054e6eb5ad39edb>
27. Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS, Gelber RD, Thürlimann B, Senn H-J, i in. Strategies for subtypes--dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol.* sierpień 2011;22(8):1736–47.
28. Bagaria SP, Ray PS, Sim M-S, Ye X, Shamonki JM, Cui X, i in. Personalizing breast cancer staging by the inclusion of ER, PR, and HER2. *JAMA Surg.* luty 2014;149(2):125–9.
29. Mayer IA, Abramson VG, Lehmann BD, Pietersenpol JA. New strategies for triple-negative breast cancer--deciphering the heterogeneity. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 15 luty 2014;20(4):782–90.
30. Rakha EA, Putti TC, Abd El-Rehim DM, Paish C, Green AR, Powe DG, i in. Morphological and immunophenotypic analysis of breast carcinomas with basal and myoepithelial differentiation. *J Pathol.* marzec 2006;208(4):495–506.

31. Yehiely F, Moyano JV, Evans JR, Nielsen TO, Cryns VL. Deconstructing the molecular portrait of basal-like breast cancer. *Trends Mol Med.* listopad 2006;12(11):537–44.
32. Lehmann BD, Jovanović B, Chen X, Estrada MV, Johnson KN, Shyr Y, i in. Refinement of Triple-Negative Breast Cancer Molecular Subtypes: Implications for Neoadjuvant Chemotherapy Selection. *PLoS ONE* [Internet]. 2016 [cytowane 22 kwiecień 2019];11(6). Dostępne na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4911051/>
33. Xiao M, Yang Z, Tang X, Mu L, Cao X, Wang X. Clinicopathological characteristics and prognosis of metaplastic carcinoma of the breast. *Oncol Lett.* sierpień 2017;14(2):1971–8.
34. Amin MB, Greene FL, Edge SB, Compton CC, Gershengwald JE, Brookland RK, i in. The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual: Continuing to build a bridge from a population-based to a more „personalized” approach to cancer staging. *CA Cancer J Clin.* marzec 2017;67(2):93–9.
35. Lange S, Scheibler F, Fleer D, Windeler J. Interpretation of the Results of the MINDACT Study and Consequent Recommendations in the Updated ASCO Clinical Practice Guideline. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 1 luty 2018;36(4):429–30.
36. Giuliano AE, Connolly JL, Edge SB, Mittendorf EA, Rugo HS, Solin LJ, i in. Breast Cancer-Major changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual. *CA Cancer J Clin.* 8 lipiec 2017;67(4):290–303.
37. Pedersen RN, Esen BÖ, Mellekjær L, Christiansen P, Ejlersen B, Lash TL, i in. The Incidence of Breast Cancer Recurrence 10–32 Years after Primary Diagnosis. *J Natl Cancer Inst.* 8 listopad 2021;djab202.
38. Terceiro LEL, Edechi CA, Ikeogu NM, Nickel BE, Hombach-Klonisch S, Sharif T, i in. The Breast Tumor Microenvironment: A Key Player in Metastatic Spread. *Cancers.* 25 wrzesień 2021;13(19):4798.

3.

Wprowadzenie do badań genetycznych wykonywanych w raku piersi

Rak piersi jest przykładem nowotworu, w którym badania genetyczne odgrywają bardzo dużą rolę już od dłuższego czasu. Najbardziej powszechne badania genetyczne dotyczą zmian w genach *BRCA1* i *BRCA2* odpowiedzialnych za uwarunkowaną genetycznie postać tego nowotworu stanowiącą od 5 do 10% przypadków. Poza genami *BRCA* istotne w patogenezie raka piersi są również zmiany występujące w takich genach jak: *TP53*, *PTEN*, *STK11*, *CHEK2*, *ATM*, *RAD51C*, *RAD50*, *PALB2*, *BRIP1*, *MRE11A*, *ATM*, *NBS1*, *CDH1* i *BARD* [1, 2]. Zmiany w powyższych genach mają charakter germinalny, czyli są obecne we wszystkich komórkach organizmu. Dziedziczy się je po rodzicach, a następnie mogą zostać przekazane potomstwu. Najczęściej ocenia się je na poziomie DNA izolowanego z komórek jądrzastych krwi obwodowej. Badania te dotyczą tzw. genetyki zmian konstytutywnych i są zlecane przez genetyków klinicznych po konsultacji w poradni genetycznej. Ten rodzaj badań służy przede wszystkim weryfikacji rozpoznania klinicznego, znalezienia nosicieli mutacji np. *BRCA1* i *BRCA2*, co ma na celu określenie ryzyka wystąpienia nowotworu w rodzinie i wdrożenia odpowiednio szybko badań profilaktycznych.

Laboratoria genetyczne stosują różne strategie diagnostyczne w poszukiwaniu mutacji. Zwykle badania rozpoczyna się od prostych technik przesiewowych identyfikujących zmiany typowe dla danej populacji. Przykładowo około 90% zmian identyfikowanych w genie *BRCA1* w populacji polskiej stanowią trzy mutacje c.5266dupC (inna nazwa

5382insC), c.181T>G p.(Cys61Gly), c.4034delA (inna nazwa 4153delA) [1]. Najczęściej stosowane techniki w badaniach przesiewowych to sekwencjonowanie bezpośrednie metodą Sanger, technika genotypowania oparta o metodę ilościowego PCR (qPCR). Do badań dużych rearanżacji genowych stosuje się zwykle metodę MLPA (rysunek nr 1).

Rysunek nr 1. Strategia testowania *BRCA1/BRCA2* – metody klasyczne



Do zaawansowanej diagnostyki genetycznej wykorzystuje się technikę sekwencjonowania następnej generacji (NGS), (rysunek nr 2). Umożliwia ona zbadanie całej sekwencji kodującej genów *BRCA1/2* i innych genów kluczowych dla raka piersi w jednym badaniu. Jest to szczególnie istotne ponieważ geny *BRCA1* i *BRCA2* są bardzo duże, a zmiany istot-

ne klinicznie mogą być zlokalizowane w obrębie całej sekwencji kodującej. Przykładowo gen *BRCA1* składa się z 23 eksonów, a liczba znanych mutacji to 1781 (wg Breast Cancer Information Core (BIC database)). Natomiast gen *BRCA2* składa się z 27 eksonów, a liczba znanych mutacji to 2000 (wg Breast Cancer Information Core (BIC database)).

Rysunek nr 2. Strategia testowania *BRCA1/BRCA2* – NGS



Należy zaznaczyć, że każda zmiana zidentyfikowana w badaniu NGS powinna być potwierdzona klasyczną techniką np. sekwencjonowaniem bezpośrednim metodą Sangera.

Drugą, bardzo ważną kategorię badań genetycznych wykonywanych w nowotworach piersi stanowią badania mutacji somatycznych, czyli zmian nabytych, obecnych jedynie w komórkach nowotworowych. Takich zmian nie dziedziczy się od rodziców, ani nie przekazuje potomstwu. Genetyka zmian somatycznych jest wykorzystywana do kwalifikacji pacjentów do terapii onkologicznych ukierunkowanych molekularnie, monitorowania procesu leczenia oraz różnicowania i klasyfikacji nowotworów. Są to bardzo złożone badania, w których kluczową rolę odgrywa wiele etapów przedanalitycznych takich jak: właściwe pobranie materiału nowotworowego od pacjenta, właściwe utrwalenie materiału w postaci bloczka parafinowego oraz właściwa kwalifikacja materiału do badania genetycznego przez patomorfologa. Do pracy z materiałem tkankowym zatopionym w bloczku parafinowym, wielu modyfikacji wymagają również techniki biologii molekularnej służące do ekstrakcji kwasów nukleinowych i identyfikacji zmian genetycznych. Metody muszą charakteryzować się odpowiednim stopniem czułości oraz powinny umożliwić identyfikację różnych klas mutacji, takich jak zmiany punktowe, małe delecje i insercje, amplifikacje genów oraz fuzje genowe.

Typowym przykładem badania zmian somatycznych w raku piersi jest ocena amplifikacji genu *HER2* z wykorzystaniem techniki FISH (*fluorescencyjnej hybrydyzacji in situ*) w celu

kwalifikacji pacjentów do leczenia celowanego herceptyną. Przez wiele lat było to jedyne badanie zmian somatycznych w raku piersi.

Obecnie trwają badania nad identyfikacją kolejnych potencjalnych genetycznych markerów nowotworowych, m.in. fuzji genowych. Duże nadzieje wiązano z badaniem *NTRK* w potrójnie ujemnych rakach piersi, ponieważ dla tych chorych nie ma żadnego efektywnego leczenia. Pojawiła się więc nadzieja, że obecność fuzji genu *NTRK* będzie wartościowym wskaźnikiem u tych chorych. Niestety, fuzja genu *NTRK* występuje u poniżej 1% pacjentek z rakiem piersi, choć jest ona charakterystyczna dla, bardzo rzadkich, wydzielniczych raków piersi. Dla chorych z takim rodzajem zaburzenia genetycznego są już dostępne w Europie bardzo efektywne leki.

Kolejnym obiecującym celem molekularnym w raku piersi jest białko PIK3CA (3-kinaza fosfatydyloinozytolu). U pacjentek, u których stwierdzimy mutację w genie *PIK3CA*, w komórkach nowotworowych, będzie można w przyszłości wprowadzić leczenie celowane.

3.1. Znaczenie szlaku PI3K w HR+ raku piersi

Kinazy 3-fosfatydyloinozytolu (PI3K) (*ang. Phosphatidil-inositol 3-kinases*) stanowią rodzinę lipidowych kinaz, które posiadają zdolność fosforylowania grupy hydroksylowej w pozycji 3 pierścienia fosfatydyloinozytolu. Białka te tworzą heterodimery złożone z jednostki katalitycznej i regulatorowej. Warianty podjednostek kodowane są przez różne geny i podlegają procesowi alternatywnego

go składania. Kinazy 3-fosfatydylinozytolu są ważnymi regulatorami wzrostu komórek, transformacji, adhezji, apoptozy, przeżycia i mobilności. Zaktywowana kinaza wytwarza przekaźnik sygnałów wewnątrzkomórkowych PIP3, w wyniku konwersji fosfatydylinozytolu-4,5-dwufosforanu (PIP2) do fosfatydylinozytolu-3,4,5-trifosforanu (PIP3), przenosząc grupę γ -fosforanową z ATP. Aktywność PI3K jest hamowana przez fosfatazę PTEN - homolog fosfatazy i tensyny, który defosforyluje PIP3 [3,4].

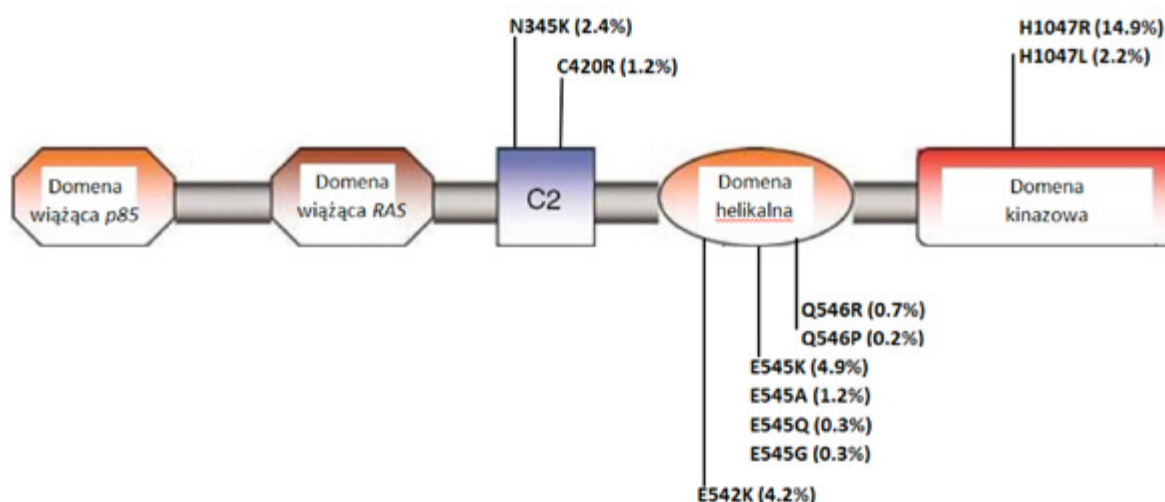
Ze względu na budowę, specyficzność wobec lipidowego substratu oraz rodzaj jednostek regulatorowych kinazy PI3K dzieli się na 3 klasy, I (A i B), II i III. W procesie tumorogenezy najistotniejszą rolę odgrywają kinazy zaliczane do klasy IA. Kinazy z tej grupy zawierają ka-

talityczną jednostkę p110 α oraz regulatorową jednostkę p85. Gen kodujący podjednostkę p110 α kinazy 3-fosfatydylinozytolu (PIK3CA) zlokalizowany jest na chromosomie 3q26.3 i zawiera 20 eksonów. Koduje on peptyd liczący 1068 aminokwasów o masie cząsteczkowej 124 kDa. Podjednostka ta składa się z pięciu domen, domeny wiążącej adapter (ABD) (ta domena wiąże się podjednostką p85), domeny wiążącej RAS (RBD), domeny C2, domeny helikalnej oraz domeny kinazowej (rysunek nr 3) [4,5].

W stanie nieaktywnym podjednostka p110 α związana jest podjednostką p85, hamującą aktywność kinazy.

Mutacje *PIK3CA* prowadzą do konstytutywnej aktywacji białka i występują w wielu nowo-

Rysunek nr 3. Rycina przedstawia schemat budowy PIK3CA (katalitycznej podjednostki p110 α kinazy PI3K), poszczególne domeny oraz lokalizacje najczęstszych mutacji somatycznych [3]



tworach. Najczęściej pojawiają się w późnych etapach tumorogenezy, tuż przed etapem przerzutowania [6]. Dotyczą one przede wszystkim nowotworów jelita grubego (32%), mózgu (27%), żołądka (25%) oraz tzw. hormonozależnych raków piersi (40%) [3,]. Zidentyfikowano wiele różnych mutacji punktowych, jednak większość z nich, ponad 85%, dotyczy kodonów 542, 545 i 1047 [7]. Mutacje p.Glu-542Lys i p.Glu545Lys występują w eksonie 9 kodującym domenę helikalną i prowadzą do zaburzenia interakcji z jednostką regulatorową p85, natomiast zmiana p.His1047Arg znajduje się w eksonie 20 kodującym domenę kinazową i prowadzi do znacznego zwiększenia jej aktywności. Wzmoczona aktywność kinazy może być także spowodowana amplifikacją genu [6].

PI3K podlega częstym zmianom w HR+ raku piersi i uważa się, że odpowiada on za oporność na terapię hormonalne [7,8]. W około 40% przypadków HR+ raka piersi występuje mutacja *PIK3CA*, prowadząca do nadmiernej aktywacji szlaku PI3K [9,10,11]. Wykazano, że szlak sygnałowy PI3K sprzyja niezależnemu od estrogenu wzrostowi komórek ER+ raka piersi [12,13], a wzrost ten ulega zahamowaniu w wyniku dodania inhibitorów PI3K do antyestrogenów [14]. Co istotne, jak wspomniano powyżej, heterodimer PI3K składa się z podjednostki katalitycznej i regulatorowej [15,16], przy czym istnieją 4 izoformy katalitycznej podjednostki PI3K (gen *PIK3CA* koduje izoformę alfa [15]). Powszechne Inhibitory anty-PI3K są ukierunkowane na wiele izoform PI3K, prowadząc do nadmiernej toksyczności i niewielkiej skuteczności [17,18,19]. Natomiast Alpelisyb (BYL719) jest swoistym

inhibitorem izoformy alfa PI3K wykazującym działanie przeciwnowotworowe w modelach przedklinicznych, w których oceniano przypadki ze zmutowanym *PIK3CA* [20].

3.2. Aspekty metodyczne w badaniu *PIK3CA* i zakres analizy

3.2.1. Przygotowanie materiału pochodzącego z blochków parafinowych do badań genetycznych

Jednym z głównych problemów związanych z oznaczaniem mutacji w tkance nowotworowej jest duża heterogenność guza. W przeważającej liczbie przypadków preparat zatopiony w bloku parafinowym zawiera znaczny odsetek komórek prawidłowych. Nie stanowi to dużego problemu w aspekcie postawienia rozpoznania histopatologicznego, natomiast ze względu na znacznie ograniczoną możliwość wyodrębnienia komórek nowotworowych do badania molekularnego, może prowadzić do błędnego wyniku badania. DNA izolowany jest bowiem z całego fragmentu tkanki, w którego skład wchodzi komórki guza, jego mikrośrodowiska, np. aktywowane fibroblasty, aktywowane makrofagi, limfocyty, komórki śródbłonna naczyń krwionośnych i limfatycznych oraz komórki prawidłowe. Dlatego kluczowym etapem przygotowania preparatu do analizy molekularnej jest weryfikacja materiału przez patologa i upewnienie się, że w materiale przeznaczonym do tego badania występuje odpowiednio wysoki odsetek komórek nowotworowych w stosunku do prawidłowych. Na tym etapie kluczowym elementem jest procentowa ocena utkania

nowotworowego w preparacie przeprowadzona po barwieniu HE. Patolog zaznacza na preparacie obszar utkania nowotworowego, a materiał do izolacji DNA powinien zostać pobrany jedynie z tego obszaru. Z blozków parafinowych skrawa są następnie kilka fragmentów tzw. skrawków. Ich liczba jest uzależniona od wielkości tkanki nowotworowej zatopionej w bločku.

Konieczny podkreślenia jest również fakt, iż preparat wybarwiony HE do oceny zawartości procentowej nowotworu musi być wykonany bezpośrednio przed preparatem do analizy molekularnej. W przeciwnym razie zawartość komórek guza w preparacie wybarwionym HE i w preparatach przygotowanych do badania molekularnego może się znacząco różnić, a to z kolei może spowodować fałszywy wynik badania molekularnego.

Przyjmuje się, że do uzyskania wiarygodnego wyniku, analizowany preparat powinien zawierać nie mniej niż 20% utkania nowotworowego. Zaleca się jednak, aby każdy preparat był tak przygotowany aby analizie poddawane były niemal wyłącznie komórki nowotworowe. Zapobiega to błędowi przedanalizy polegającemu na analizie sygnału pochodzącego z DNA komórek prawidłowych. W wyjątkowych przypadkach dopuszcza się stosowanie preparatów zawierających mniejsze utkanie nowotworowe, jednak w takich sytuacjach niezbędne jest użycie metody analitycznej o podwyższonej czułości. W celu uzyskania wysokiego odsetka komórek nowotworowych stosuje się tzw. makrodysekcję polegającą na manualnym odseparowaniu tkanki prawidłowej od nowotworowej.

Kolejnym etapem postępowania jest ekstrakcja kwasów nukleinowych. Obecnie zaleca się stosowanie zestawów komercyjnych przeznaczonych do izolacji materiału utrwalonego w parafinie, dzięki czemu mamy pewność, że izolaty będą prawidłowo oczyszczone z inhibitorów reakcji enzymatycznych stosowanych w metodach analitycznych. Mogą to być zestawy manualne lub przeznaczone na automatyczne stacje do izolacji kwasów nukleinowych.

Wyizolowany materiał genetyczny podaje się ocenie jakościowej i ilościowej. W tym celu powinno stosować się systemy fluorymetryczne wykorzystujące pomiar ilości substancji specyficznie wiążącej się z DNA lub RNA. Pomiary DNA/RNA otrzymanego z blozków parafinowych wykonywane na spektrofotometrach są zwykle obarczone dużym błędem z uwagi na obecność w izolacie wielu związków zakłócających odczyt. Ma to szczególne znaczenie gdy wybrana metoda analityczna oparta jest o technologię qPCR lub sekwencjonowanie następnej generacji, gdzie precyzyjny pomiar ma znaczenie dla powodzenia całej procedury. Można także zastosować ocenę ilości i jakości DNA opartą o ilościową reakcję qPCR. Taki test ocenia również stopień degradacji materiału i może wskazać na konieczność odstąpienia od dalszej analizy i wyboru innego preparatu.

W momencie kiedy dysponujemy już wyizolowanym DNA/RNA w wystarczającej do badań molekularnych ilości i stopniu czystości, można przystąpić do wyboru techniki oznaczania mutacji. Wybierając metodę należy zwrócić uwagę na następujące parametry:

dostępność technologii oraz wymaganego do niej sprzętu, czułość i specyficzność metody, czas niezbędny na przeprowadzenie kompletnej analizy, zakres informacyjności otrzymywanych wyników. Czas, w jakim uda się wykonać jest uzależniony od zastosowanej metody detekcji mutacji. Metody oparte o PCR charakteryzują się najkrótszym czasem, ponieważ wynik można uzyskać już na poziomie pierwszej reakcji, natomiast wielkoskalowe metody, takie jak sekwencjonowanie następnej generacji (NGS), wymagają znacznie więcej czasu ze względu na wieloetapowość procesu.

3.2.2. Zakres analizy molekularnej

Zidentyfikowano wiele różnych mutacji punktowych, jednak większość z nich, ponad 85%, dotyczy kodonów 542, 545 i 1047 [7]. Dlatego zakres analizy genu *PIK3CA* powinien obejmować przynajmniej wszystkie mutacje

w eksonach 9 i 20. Stosując metody oparte o sekwencjonowanie metodą Sanger (analiza fragmentów genu) lub następnej generacji (analiza fragmentów genu lub całej sekwencji kodującej genu) prawdopodobieństwo pominięcia znanej mutacji lub rzadkiej jest znikome, przy założeniu, że stopień utkania nowotworowego w próbce przekracza 20%. Z kolei techniki oparte o qPCR, identyfikują wyłącznie określone warianty genetyczne. Dlatego przy stosowaniu zestawów diagnostycznych opartych o technologię qPCR, istotne jest, aby identyfikowane były przynajmniej mutacje w kodonach 420, 542, 545, 546 i 1047. Jednym z rekomendowanych przez FDA zestawów komercyjnych CE-IVD qPCR jest test diagnostyczny theascreen® *PIK3CA* RGQ PCR Kit, (QIAGEN Manchester, Ltd.) wykrywający obecność mutacji *PIK3CA* w tkance guza i/lub krążącym DNA izolowanym z krwi obwodowej. Zakres identyfikowanych mutacji przedstawiono w Tabeli nr 3.

Tabela nr 3. Zakres zmian identyfikowanych przez zestaw theascreen® *PIK3CA* RGQ PCR Kit, (QIAGEN Manchester, Ltd.)

Numer eksonu kodującego genu <i>PIK3CA</i>	Mutacja w genie <i>PIK3CA</i>	Zmiana na poziomie białkowym	Zmiana na poziomie nukleotydowym	Numer w bazie COSMIC
7	C420R	NM_006218.2:p.(Cys420Arg)	NM_006218.2:c.1258T>C	757
9	E542K	NM_006218.2:p.(Glu542Lys)	NM_006218.2:c.1624G>A	760
9	E545A	NM_006218.2:p.(Glu545Ala)	NM_006218.2:c.1634A>C	12458
9	E545D	NM_006218.2:p.(Glu545Asp)	NM_006218.2:c.1635G>T	765
9	E545G	NM_006218.2:p.(Glu545Gly)	NM_006218.2:c.1634A>G	764
9	E545K	NM_006218.2:p.(Glu545Lys)	NM_006218.2:c.1633G>A	763
9	Q546E	NM_006218.2:p.(Gln546Glu)	NM_006218.2:c.1636C>G	6147
9	Q546R	NM_006218.2:p.(Gln546Arg)	NM_006218.2:c.1637A>G	12459
20	H1047L	NM_006218.2:p.(His1047Leu)	NM_006218.2:c.3140A>T	776

20	H1047R	NM_006218.2:p.(His1047Glu)	NM_006218.2:c.3140A>G	775
20	H1047Y	NM_006218.2:p.(His1047Tyr)	NM_006218.2:c.3139C>T	774

Kolejnym rekomendowanym zesatwem qPCR CE-IVD dedykowanym do oceny statusu genu *PIK3CA* jest zestaw The cobas® *PIK3CA* Mutation Test (CE-IVD) firmy Roche. Zestaw charakteryzuje szerokie spektrum identyfiko-

wanych zmian, jest on jednak dedykowany jedynie do tkanki guza. Nie umożliwia zatem detekcji mutacji na poziomie ctDNA (płynna biopsja). Zakres identyfikowanych mutacji przedstawiono w Tabeli nr 4.

Tabela nr 4. Zakres zmian identyfikowanych przez zestaw The cobas® *PIK3CA* Mutation Test (CE-IVD) firmy Roche

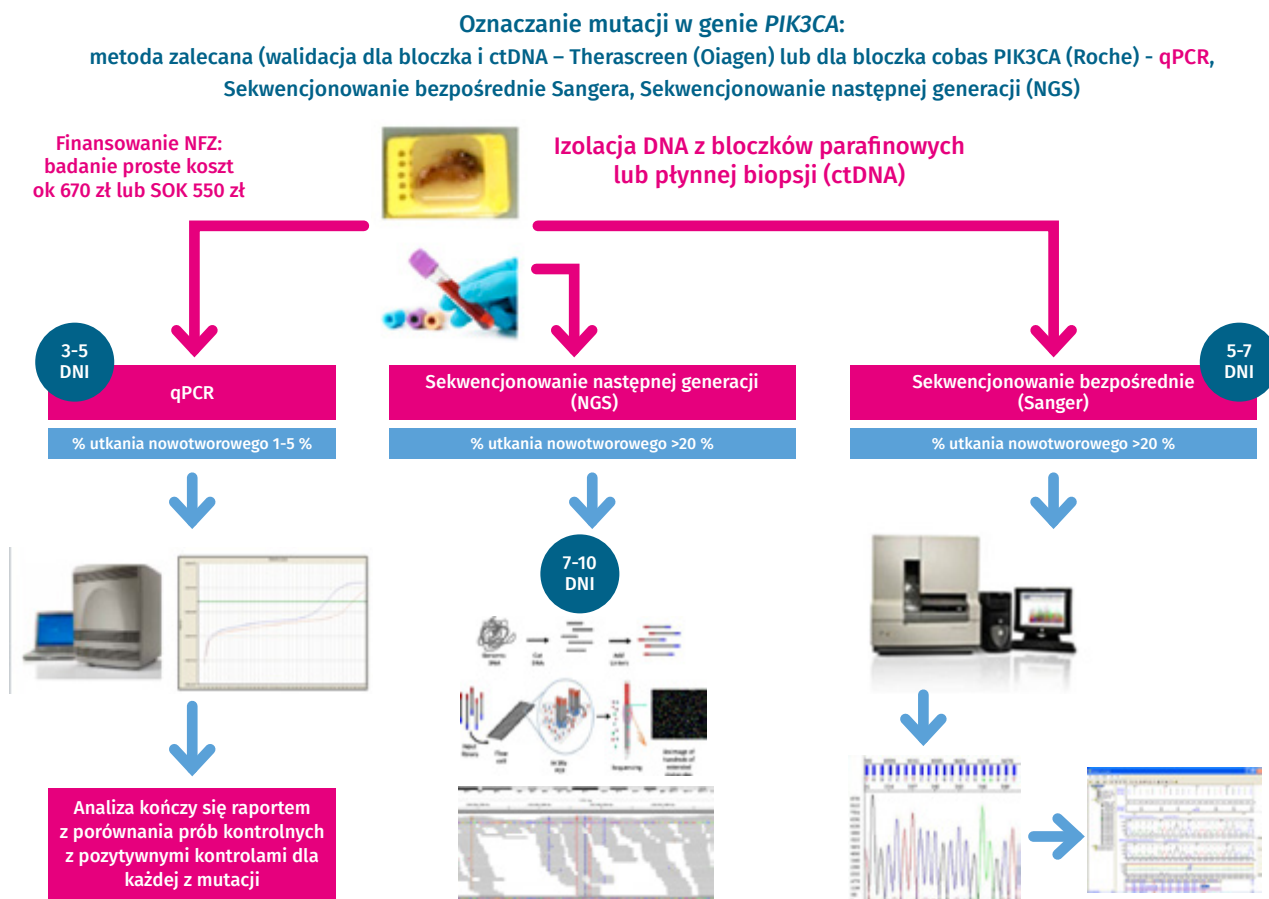
Numer eksonu kodującego genu <i>PIK3CA</i>	Mutacja w genie <i>PIK3CA</i>	Zmiana na poziomie białkowym	Zmiana na poziomie nukleotydowym	Numer w bazie COSMIC
1	R88Q	NM_006218.2:p.(Arg88Gln)	NM_006218.2:c.263G>A	746
4	N345K	NM_006218.2:p.(Asn345Lys)	NM_006218.2:c.1035T>A	754
7	C420R	NM_006218.2:p.(Cys420Arg)	NM_006218.2:c.1258T>C	757
9	E542K	NM_006218.2:p.(Glu542Lys)	NM_006218.2:c.1624G>A	760
9	E545A	NM_006218.2:p.(Glu545Ala)	NM_006218.2:c.1634A>C	12458
9	E545D	NM_006218.2:p.(Glu545Asp)	NM_006218.2:c.1635G>T	765
9	E545G	NM_006218.2:p.(Glu545Gly)	NM_006218.2:c.1634A>G	764
9	E545K	NM_006218.2:p.(Glu545Lys)	NM_006218.2:c.1633G>A	763
9	Q546E	NM_006218.2:p.(Gln546Glu)	NM_006218.2:c.1636C>G	6147
9	Q546K	NM_006218.2:p.(Gln546Lys)	NM_006218.2:c.1636C>A	766
9	Q546L	NM_006218.2:p.(Glu546Leu)	NM_006218.2:c.1637A>T	25041
9	Q546R	NM_006218.2:p.(Gln546Arg)	NM_006218.2:c.1637A>G	12459
20	H1047L	NM_006218.2:p.(His1047Leu)	NM_006218.2:c.3140A>T	776
20	H1047R	NM_006218.2:p.(His1047Glu)	NM_006218.2:c.3140A>G	775
20	H1047Y	NM_006218.2:p.(His1047Tyr)	NM_006218.2:c.3139C>T	774
20	G1049R	NM_006218.2:p.(Gly1049Glu)	NM_006218.2:c.3145G>C	12597
20	M1043I	NM_006218.2:p.(Met1043Ile)	NM_006218.2:c.3129G>A	773

3.2.3. Techniki biologii molekularnej stosowane do diagnostyki mutacji *PIK3CA*

Istnieje wiele metod biologii molekularnej stosowanych do identyfikacji mutacji punktowych (zmiany pojedynczych nukleotydów), czyli właśnie takich zmian jakie identyfikujemy w genie *PIK3CA* (rysunek nr 4). Najbardziej praktyczną metodą jest genotypowanie z wykorzystaniem techniki ilościowego PCR (qPCR), a właściwie jego jakościowego wariantu. Metoda bazuje na sondach molekularnych, które identyfikują konkretne zmiany lub grupy zmian w badanym DNA. Wadą metody jest identyfikacja tylko tych wariantów genetycznych na jakie został zaprojektowany

zestaw odczynników. Dlatego, jeśli w badanym materiale obecne są inne warianty (np. mniej powszechne mutacje) zestaw qPCR ich nie wykryje. Niewątpliwą zaletą tej metody jest natomiast bardzo wysoka czułość (zestawy mogą identyfikować mutację na poziomie 1% zmutowanego DNA w stosunku 99% prawidłowego DNA), są również łatwe w przygotowaniu, czas analizy jest krótki, a sprzęt do wykonywania oznaczeń szeroko powszechny w laboratoriach. Wysoka czułość pozwala również na ocenę mutacji na poziomie ctDNA (płynna biopsja) jeśli zestaw ma walidację na taki rodzaj materiału.

Rysunek nr 4. Techniki biologii molekularnej powszechnie stosowane do oznaczania mutacji w genie *PIK3CA*



Techniki oparte o sekwencjonowanie całych fragmentów genów pozwalają natomiast zidentyfikować wszystkie warianty genetyczne występujące w badanych fragmentach genów. Odznaczają się jednak mniejszą czułością, wymagają więcej czasu, doświadczenia i bardziej kosztownego sprzętu i odczynników. Badanie statusu genu *PIK3CA* z wykorzystaniem techniki wielkoskalowej jaką jest sekwencjonowanie następnej generacji nie jest zbyt powszechne. W metodzie tej badanie się całe duże panele genowe gdzie *PIK3CA* jest jednym z wielu analizowanych genów. Koszt analizy jest bardzo wysoki, a stosowanie dużych paneli genetycznych do oznaczania mutacji somatycznych w raku piersi nie jest powszechne. Sekwencjonowanie bezpośrednie metodą Sanger'a jest natomiast szeroko stosowaną techniką do oznaczania mutacji *PIK3CA* zwłaszcza przez bardziej doświadczone laboratoria. Jest to technika stosowana jako metoda bazowa do oznaczania mutacji lub druga, alternatywna metoda służąca do weryfikacji wyników wątpliwych otrzymanych np. metodą qPCR. Stosując tą technikę należy jednak posiadać duże doświadczenie gdyż, w przypadku oceny mutacji somatycznych, wymaga ona bardzo złożonej walidacji ze względu na stosunkowo niską czułość (preparaty wymagają często makrodysekcji, aby otrzymać minimum 20% utkania nowotworowego) oraz zaprojektowania reakcji PCR tak, aby efektywnie amplifikować materiał genetyczny wyizolowany z blozków parafinowych (jest to zwykle materiał w pewnym stopniu zdegradowany oraz zawierający inhibitory reakcji PCR). Ponadto, w przypadku oceny statusu genu *PIK3CA* należy zwrócić uwagę, iż

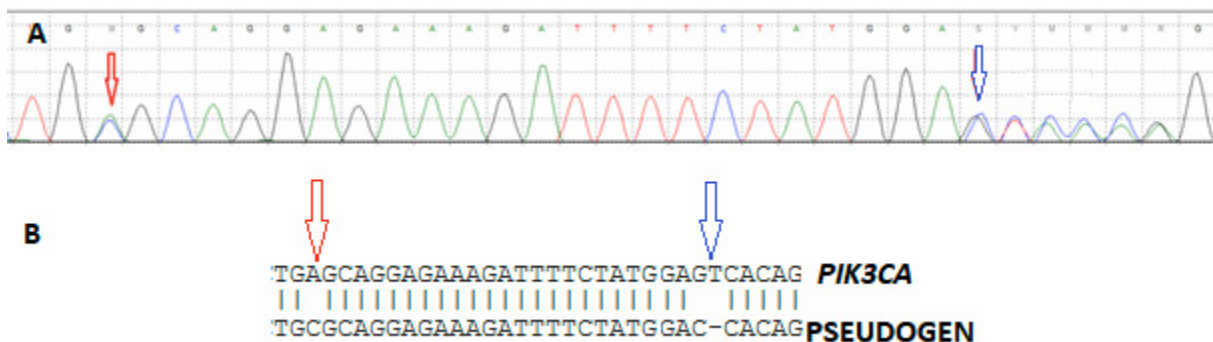
w genomie znajduje się pseudogen zawierający sekwencję o wysokiej homologii z sekwencją eksonów 9, 11–13 i części eksonu 10 genu *PIK3CA*. Co istotne, w regionie pseudogenu homologicznym do eksonu 9 znajduje się zmiana pojedynczego nukleotydu odpowiadająca wariantowi patogennemu c.1634A>C (p.Glu545Ala). Jest to kluczowa informacja z punktu widzenia procesu diagnostycznego i uniknięcia ryzyka wyniku fałszywie dodatniego. (rysunek nr 5).

Przy interpretacji wyników NGS również należy zwrócić uwagę czy zastosowane oprogramowanie nie zgłasza zmian w pseudogenie.

Podsumowując, Każda metoda winna być zwalidowana pod względem następujących parametrów: ilości i jakości oraz stężenia DNA branego do analizy; ustalenia wartości progowej dla odróżnienia wariantu zmutowanego od prawidłowego; czułości testu (np. seria rozcieńczeń); zastosowania metody referencyjnej do weryfikacji uzyskanych wyników; powtarzalności stosowanych metod. Czułość metody powinna oscylować wokół 1% komórek nowotworowych dla metod opartych o allelospecyficzny PCR lub 20-30% dla sekwencjonowania bezpośredniego, czy NGS. Testy powinny wykrywać przynajmniej typowe zmiany występujące w eksonach 9 i 20. Akceptowalny czas przeprowadzenia całej procedury powinien trwać od 5 do 10 dni roboczych.

Rysunek nr 5.

A. Fluorogram reakcji sekwencjonowania bezpośredniego metodą Sanger. Na ilustracji widać nałożone sekwencje genu *PIK3CA* i wysoce homologicznego fragmentu eksonu 9 pseudogenu powstałe na skutek jednoczesnej amplifikacji genu i pseudogenu w reakcji PCR; **B.** Przyrównanie fragmentu sekwencji genu *PIK3CA* i wysoce homologicznego fragmentu eksonu 9 pseudogenu. Strzałki oznaczają miejsca występowania różnic pomiędzy sekwencjami: czerwona w miejscu występowania mutacji c.1634A>C (p.Glu545Ala) genu *PIK3CA* (w prawidłowej sekwencji genu w pozycji c.1634 występuje nukleotyd A, a w pseudogenie znajduje się C); niebieska w regionie nukleotydów G i T w pozycjach c.1658 i c.1659 sekwencji genu *PIK3CA* (w sekwencji pseudogenu w tym miejscu znajduje się pojedynczy nukleotyd C). Występowanie zmian w pozycji c.1658 i c.1659 genu względem pseudogenu umożliwia łatwą weryfikację analizowanej sekwencji i określenie, czy produktem amplifikacji jest sekwencja genu, czy pseudogenu. Ma to kluczowe znaczenie dla procesu diagnostycznego, ponieważ zmiana c.1634A>C (p.Glu545Ala) w genie *PIK3CA* ma charakter patogeny.



3.2.4. Alternatywne techniki oceny mutacji *PIK3CA* (ctDNA)

Biopsja płynna (ctDNA) pozwala na analizę profilu genomowego nowotworu, nawet jeśli guz znajduje się w obszarze niedostępnym do wykonania tradycyjnej biopsji oraz w przypadkach, gdy materiał histologiczny od pacjenta nie jest dostępny z innych powodów (materiał niediagnostyczny, brak materiału tkankowego np. błočka – niedostępny lub wykorzystany całkowicie do innych badań, niewystarczająca ilość materiału histologicznego do przeprowadzenia badań genetycznych). Niewątpliwą zaletą płynnej biopsji jest również fakt, iż materiał do badań pozyskuje się w sposób małoinwazyjny.

Do oznaczenia ctDNA wykorzystuje się krew obwodową pacjenta. Krew musi być pobrana

w sposób minimalizujący możliwość rozpadu komórek krwi, a więc systemem (np. motylkowym) pozwalającym na swobodny i powolny wypływ krwi z żyły. Istotne jest aby krew była pobierana do probówek dedykowanych do przechowywania i izolacji ctDNA, które zawierają stabilizatory (K3-EDTA) zapobiegające lizie komórek jądrzastych krwi i uwalnianiu z nich DNA. Pojawienie się, wskutek lizy komórek jądrzastych krwi, DNA nienowotworowego spowodowałoby zmniejszenie odsetka ctDNA w próbce i w rezultacie mogłoby uniemożliwić oznaczenie materiału pochodzącego z nowotworu. Należy również zwrócić szczególną uwagę na warunki przechowywania samych probówek – jeszcze przed pobraniem materiału: nie można ich zbyt długo wychłodzić ani trzymać w temperaturze powyżej 25°C, gdyż parametry jakościowe ctDNA

uzyskane z krwi pobranej do źle przechowywanych próbek dramatycznie maleją.

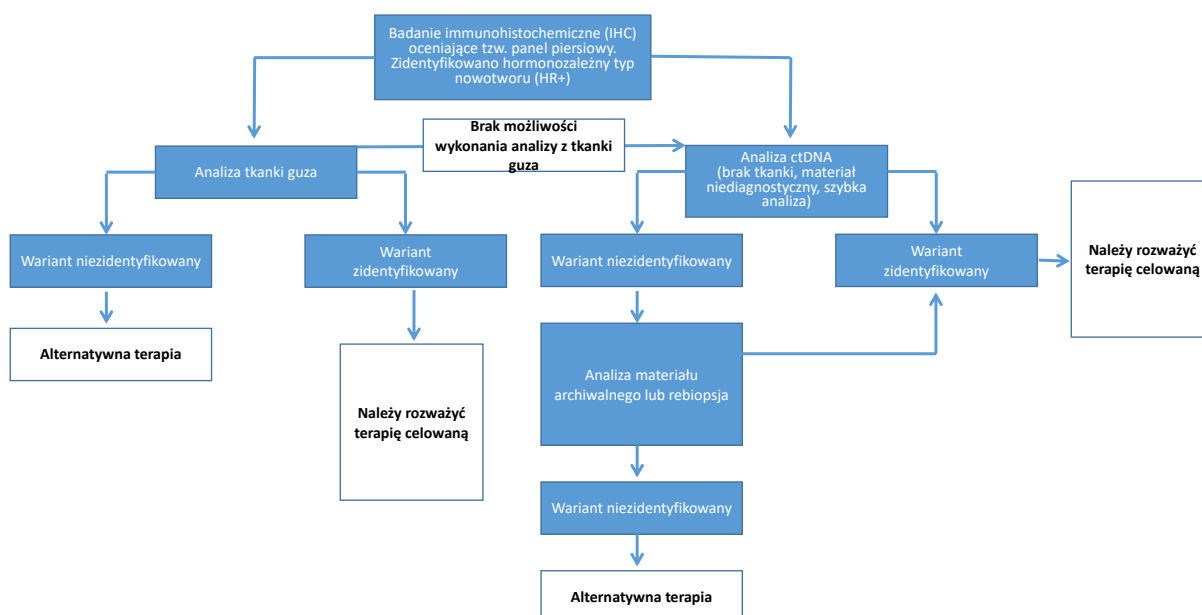
Kolejnym aspektem jest czas w jakim należy wyizolować ctDNA. Najlepsze efekty uzyskuje się po przeprowadzeniu izolacji w możliwie najkrótszym czasie po pobraniu. Optymalne jest zatem korzystanie z przylaboratoryjnych punktów pobrań, co niweluje konieczność transportu próbki. Tym niemniej możliwe jest także dłuższe przechowywanie krwi (nawet do 5 dni) oraz transport, ze szczególną ostrożnością, w dedykowanych do tego celu opakowaniach transportowych z wkładem utrzymującym temperaturę 15 do 25°C.

Analizy ctDNA dokonuje się przy użyciu najnowocześniejszych technologii genetyki molekularnej: wysokoczułych testów opartych na qPCR, PCR emulsyjnym (*droplet digital PCR* – *ddPCR*) i sekwencjonowaniu następnej generacji (*next generation sequencing* – *NGS*). Należy zwrócić uwagę, iż stosowane testy muszą być dedykowane do pracy na ctDNA i charakteryzować się czułością <1%.

3.3. Algorytm diagnostyczny

Lekarz klinicysta dokonuje zlecenia na wykonanie badania statusu genu *PIK3CA* w przypadku gdy wynik badania oceny receptorów jest dodatni i mamy do czynienia z rakiem hormonozależnym (HR+). W przypadku raka potrójnie ujemnego lub HER2+ nie ma podstaw do wykonania badania *PIK3CA*. Materiałem referencyjnym do badania jest materiał tkankowy zatopiona w bloczku parafinowym (może być to zmiana pierwotna lub przerzutowa). W przypadku zidentyfikowania wariantu patogenicznego w *PIK3CA* należy rozważyć zastosowanie terapii celowanej. Natomiast przy braku mutacji należy zastosować alternatywne terapie. W sytuacji gdy nie ma możliwości wykonania badania z tkanki guza (brak materiału lub materiał niediagnostyczny) badanie można wykonać z tzw. płynnej biopsji ctDNA. W przypadku gdy na poziomie ctDNA mutacja nie zostanie wykryta należy zastanowić się na rebiopsją. Schemat diagnostyczny *PIK3CA* w raku piersi przedstawia rysunek nr 6.

Rysunek nr 6. Schemat diagnostyczny *PIK3CA* w raku piersi



3.4. Raportowanie uzyskanych wyników

Kolejną niezwykle istotną kwestią jest raportowanie otrzymanego wyniku w postaci właściwego formularza sprawozdania z badania genetycznego. Zgodnie z Rozporządzeniem Ministra Zdrowia w Sprawie Standardów Jakości dla Laboratoriów Diagnostycznych i Mikrobiologicznych (Dz.U. 2019 poz. 1923) formularz sprawozdania z analizy molekularnej powinien zawierać dokładne dane pacjenta, jednostki i osoby zlecającej badanie, jednostki i osób upoważnionych do wykona-

nia badania, informacje dotyczące rodzaju materiału przeznaczonego do analizy (w tym: informacje zweryfikowane przez patologa, takie jak rozpoznanie oraz procent utkania nowotworowego w preparacie skierowanym na badanie molekularne), zastosowane metody badawcze (wraz z opisem jej czułości i specyficzności), nazwy badanego genu/*locus*, opis wykrytej zmiany zgodny z międzynarodowymi standardami (HGVS) oraz interpretację końcową zrozumiałą dla klinicysty, patomorfologa i pacjenta.

Piśmiennictwo:

1. Jassem J, Krzakowski M. Rak piersi. *Breast cancer. Oncol Clin Pr.* 2018;4(14):171–215
2. Gronwald J., Byrski T., Huzarski T. i wsp. *Genetyka kliniczna raka piersi i jajnika. W: Lubiński J. (red.). Genetyka kliniczna nowotworów 2012. Pomorski Uniwersytet Medyczny, Szczecin 2012; 69–92*
3. Karakas B, Bachman KE, Park BH. (2006) Mutation of the PIK3CA oncogene in human cancers. *Br J Cancer*, 94, 4, 455–459
4. Ligresti G, Militello L, Steelman LS, i wsp. (2009) PIK3CA mutations in human solid tumors: role in sensitivity to various therapeutic approaches. *Cell Cycle*, 8, 9, 1352–1358
5. Gustin JP, Cosgrove DP, Park BH. (2008) The PIK3CA gene as a mutated target for cancer therapy. *Curr Cancer Drug Targets*, 8, 8, 733–740
6. Samuels Y, Wang Z, Bardelli A, i wsp. (2004) High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. *Science*, 304, 5670, 554
7. Miller TW, et al. *J Clin Oncol.* 2011;29(33):4452–4461;
8. Bosch A, et al. *Sci Transl Med.* 2015;7(283):283ra51;
9. Mayer IA, et al. *Clin Cancer Res.* 2017;23(1):26–34;
10. Loi S, et al. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(22):10208–10213;
11. Stemke-Hale K, et al. *Cancer Res.* 2008;68(15):6084–6091;
12. Miller TW, et al. *J Clin Invest.* 2010;120(7):2406–2413;
13. Crowder RJ, et al. *Cancer Res.* 2009;69(9):3955–3962;

14. Miller TW, et al. *Cancer Discov.* 2011;1(4):338-351;
15. Engelman JA. *Nat Rev Cancer* 2009;9:550-562;
16. Janku F. *Cancer Treat Rev* 2017;59:93-101;
17. Baselga J, et al. *J Clin Oncol* 2018;36 (Suppl): LBA 1006;
18. Di Leo A, et al. *Lancet Oncol* 2018 19(1):87-100;
19. Baselga J, et al. *Lancet Oncol* 2017;18(7):904-916;
20. Fritsch C, et al. *Mol Cancer Ther* 2014;13:1117-1129.

4.

Możliwości terapeutyczne u pacjentek z hormonozależnym rakiem piersi z obecnością mutacji w genie *PIK3CA* – przykłady kliniczne

Szlak sygnałowy kinazy 3-fosfatydyloinozytolu (PI3K) - kinazy białkowej B (AKT) - tzw. ssaczego celu rapamycyny (mammalian target of rapamycin, kinaza mTOR) jest odpowiedzialny za regulację kluczowych funkcji fizjologicznych i procesów molekularnych, w tym za proliferację komórek, ich wzrost oraz metabolizm [1]. Kinazy 3-fosfatydyloinozytolu to grupa kinaz lipidowych podzielonych w zależności od budowy i specyfiki substratu na trzy klasy, a u ssaków klasa I kinaz PI3K jest dodatkowo podzielona ze względu na metodę regulacji na podklasy IA i IB. Kinazy PI3K podklasy IA to heterodimery składające się z podjednostki katalitycznej p110 oraz podjednostki regulatorowej p85. Trzy wysoce homologiczne izoformy katalityczne kinaz klasy IA: p110 α , p110 β i p110 δ są kodowane przez 3 geny (odpowiednio: *PIK3CA*, *PIK3CB* and *PIK3CD*). Ich występowanie jest bardzo powszechne, poza izoformą p110 δ , której występowanie jest ograniczone prawie wyłącznie do leukocytów [2-3].

Zaburzenia w przewodnictwie sygnałów w szlaku PI3K-AKT-mTOR to jedno z częściej obserwowanych zaburzeń molekularnych występujących w raku piersi. Jedną z przyczyn tych zaburzeń jest obecność mutacji aktywującej w genie *PIK3CA*. Występowanie tej mutacji jest stosunkowo częste, obserwowane u około 45% wczesnych raków o podtypie luminalnym A, ale występujące także w innych podtypach wczesnego raka piersi (39% raków *HER2-dodatnich*, 9% raków trójujemnych) [4-6]. Podobne odsetki występowania mutacji *PIK3CA* zaobserwowano w uogólnionym raku piersi [7]. Co do efektu występowania tej mutacji, to jest on różny w zależności od podtypu raka piersi i czasu jej pojawienia się. We wczesnym raku piersi z ekspresją receptora estrogenowego (ER – estrogen receptor) obecność mutacji w genie *PIK3CA* jest związana z dłuższym czasem przeżycia wolnego od nawrotu (*recurrence-free survival*) i dłuższym czasem przeżycia wolnego od choroby (DFS – *disease-free survival*) [8-9]. Natomiast w zaawansowanym ER-dodatnim raku piersi występowanie mutacji w genie *PIK3CA* związane jest z gorszym rokowaniem i opornością na chemioterapię [10]. Z kolei w raku piersi *HER2-dodatnim* obecność mutacji jest związana z gorszym rokowaniem, zarówno we wczesnym, jak i w uogólnionym raku piersi [11-12].

W związku z ogromnym znaczeniem przekazywania sygnału w szlaku PI3K-AKT-mTOR oraz występowaniem mutacji *PIK3CA* w rozwoju oraz przebiegu raka piersi od dawna trwały badania nad wprowadzeniem leków oddziałujących na ten szlak sygnałowy, które doprowadziły do zsyntetyzowania inhibitorów

kinazy 3-fosfatydyloinozytolu. Początkowo prowadzono badania nad pan-inhibitorami PI3K, czyli lekami, które hamowały wszystkie 4 izoformy katalityczne kinaz PI3K klasy I.

Jak należało się jednak spodziewać, hamowanie tak szerokiego spektrum celów molekularnych związane było z występowaniem licznych działań niepożądanych, spowodowanych powszechnością występowania kinaz PI3K w wielu, także zdrowych, komórkach. Do pan-inhibitorów PI3K zaliczamy buparlisib i piktisib. Pierwszy z nich to doustny pan-inhibitor PI3K, który w warunkach *in-vivo* wykazywał działanie antyproliferacyjne i apoptotyczne w liniach komórkowych z zaburzeniami szlaku sygnałowego, w którym brała udział kinaza PI3K [13]. Działanie buparlisibu zostało sprawdzone w 2 randomizowanych badaniach klinicznych III fazy: BELLE-2 i BELLE-3. Badanie BELLE-2 było badaniem, w którym wzięło udział 1147 pacjentek z miejscowo zaawansowanym lub przerzutowym ER-dodatnim/HER2-ujemnym rakiem piersi, wcześniej leczonych inhibitorem aromatazy. Chore otrzymywały buparlisib z fulwestrantem lub placebo z fulwestrantem. Wykazano statystycznie istotne wydłużenie mediany czasu przeżycia wolnego od progresji (PFS – *progression-free survival*): 5 miesięcy w ramieniu kontrolnym wobec 6,9 miesiąca w ramieniu z buparlisibem (HR 0.78; 95% CI 0.67–0.89; $P < 0.001$) [14]. Zaobserwowano jednak stosunkowo liczne przypadki konieczności przerwania leczenia z powodu działań niepożądanych, głównie z powodu hiperglikemii, ale także wzrostu poziomu transaminaz oraz zaburzeń nastroju.

W badaniu BELLE-3 z kolei, brały udział chore otrzymujące wcześniej z powodu zaawansowanego raka piersi hormonoterapię oraz inhibitor mTOR. W tym trialu także wykazano zysk w postaci wydłużenia mediany PFS: 3,9 miesiąca w ramieniu z buparlisibem wobec 1,8 miesiąca w ramieniu z placebo (HR 0.67; 95% CI 0.53–0.84; $P < 0.001$) [15]. Wykazano także znacząco wyższą skuteczność buparlisibu u chorych z mutacją *PIK3CA*. Lek nie znalazł jednak zastosowania w codziennej praktyce ze względu na częste działania niepożądane, wśród których największy niepokój wzbudziły powikłania psychiatryczne, w tym zaburzenia lękowe, depresyjne oraz próby samobójcze.

Skuteczność drugiego z pan-inhibitorów, piktilisibu, nie została ostatecznie potwierdzona w dwóch przeprowadzonych badaniach II fazy: PEGGY i FERGI. W pierwszym z nich chore otrzymywały paklitaksel z piktilisibem lub paklitaksel z placebo. Nie zaobserwowano różnic w medianach PFS, i to zarówno w populacji ogólnej, jak i w populacji chorych z mutacją *PIK3CA* [16].

Badanie FERGI przeprowadzone zostało u pacjentek z ER-dodatnim/HER2-ujemnym rakiem piersi leczonych wcześniej inhibitorem aromatazy. Chore otrzymywały piktilisib z fulwestrantem lub fulwestrant z placebo. W tym badaniu także nie zaobserwowano statystycznie znamiennej różnicy w medianie PFS [17]. W związku z licznymi i często występującymi działaniami niepożądanymi piktilisibu (wysypka, biegunka, zmęczenie, wzrost transaminaz) zaniechano prowadzenia dalszych badań nad tym preparatem.

Negatywne doświadczenia z badaniami nad pan-inhibitorami kinazy PI3K doprowadziły wkrótce do opracowania izospecyficznych inhibitorów tej kinazy, hamujących poszczególne jej izoformy. Na szczególną uwagę zasługuje tu alpelisib, który dzięki pozytywnym wynikom badania III fazy stał się jednym z leków zaakceptowanych do stosowanych w codziennej praktyce klinicznej. Alpelisib to pierwszy doustny inhibitor PI3K selektywnie hamujący izoformę p110 α klasy I [18]. Już w badaniach przedklinicznych na ksenograftach wykazano synergizm działania alpelisibu z fulwestrantem [19].

W badaniu fazy 1b stosowano alpelisib w skojarzeniu z fulwestrantem u przeleczonych chorych na zaawansowanego raka piersi z obecnością mutacji *PIK3CA*, uzyskując całkowitą lub częściową odpowiedź u 29% pacjentek [20].

W kolejnym etapie badań nad alpelisibem było badanie SOLAR-1. Było to badanie randomizowane, III fazy, przeprowadzone u chorych z ER-dodatnim/HER2-ujemnym rakiem piersi, które otrzymywały wcześniej hormonoterapię [21]. Co istotne, w badaniu mogły brać udział pacjentki wcześniej leczone inhibitorami kinaz zależnych od cyklin 4 i 6 (CDK4/6), jednak stanowiły one niewielki odsetek włączonych pacjentek z uwagi na to, że CDKi nie były jeszcze wówczas powszechnie dostępne. W badaniu uczestniczyły zarówno chore z rakiem piersi z mutacją *PIK3CA*, jak i grupa pacjentek z rakiem bez mutacji (*PIK3CA*wt - *wild type*). Chore otrzymywały fulwestrant z alpelisibem lub fulwestrant z placebo. Pierwszorzędowym punktem koń-

cowym badaniu był czas do progresji choroby (PFS) w kohorcie z mutacją *PIK3CA*. Drugorzędowymi punktami końcowymi były: czas przeżycia całkowitego (OS - overall survival) w kohorcie z mutacją *PIK3CA*, PFS w kohorcie bez mutacji *PIK3CA*, PFS oznaczone w krążącym DNA guza (ctDNA - circulating tumour DNA) w kohorcie z mutacją *PIK3CA*, OS w kohorcie bez mutacji *PIK3CA*, odsetek obiektywnych odpowiedzi (ORR - objective response rate) oraz bezpieczeństwo leczenia.

Łącznie w badaniu wzięły udział 572 chore, z czego u 341 potwierdzono obecność mutacji *PIK3CA*. W tej kohorcie zaobserwowano statystycznie istotne wydłużenie mediany PFS: 11 miesięcy w ramieniu z alpelisibem wobec 5,7 miesiąca w ramieniu z placebo (HR, 0.65; 95% CI, 0.50–0.85; $P < 0.0001$) [21]. Podobnego efektu nie zaobserwowano w kohorcie *PIK3CA*wt (mediana PFS w grupie badanej 7,4 miesiąca, a w grupie kontrolnej 5,6 miesiąca; HR 0.85; 95% CI, 0.58–1.25). ORR w ogólnej populacji był wyższy w ramieniu z alpelisibem (26,6%, wobec 12,8% w ramieniu z placebo).

Badanie SOLAR-1 wykazało statystycznie istotną różnicę między grupami alpelisib plus fulwestrant i fulwestrant plus placebo także pod względem korzyści klinicznej, definiowanej jako trwająca przez co najmniej 24 tygodnie całkowita lub częściowa regresja lub stabilizacja choroby. Korzyść kliniczną zaobserwowano u 61,5% pacjentów w grupie alpelisibu i 45,3% pacjentów w grupie placebo.

Najczęściej obserwowanymi działaniami niepożądanymi były hiperglikemia (we wszystkich stopniach wg. CTCAE wystąpiła aż u 63,7% chorych otrzymujących alpelisib, wobec 9,8%

chorych w ramieniu z placebo), biegunka (odpowiednio u 57,7% i 15,7%) oraz wysypka (odpowiednio 35,6% i 5,9%). Hiperglikemia i wysypka były najczęstszymi powodami przerwania leczenia – nastąpiło to u 25% chorych otrzymujących lek badany i u 4,2% pacjentów z grupy przyjmującej placebo.

Ciekawa obserwacja dotyczy samego sposobu oznaczania mutacji, wykazano bowiem, że u chorych u których mutacja *PIK3CA* oznaczana była za pomocą biopsji płynnej (ctDNA) mediana PFS była dłuższa, niż u chorych u których mutację oznaczano w tkance guza nowotworowego (10,9 wobec 3,7 miesiąca) [22].

Niestety w badaniu SOLAR-1 nie wykazano statystycznie istotnego wydłużenia czasu przeżycia całkowitego: mOS wyniosła w ramieniu z alpelisibem 39,3 miesiąca, natomiast w ramieniu z placebo 31,4 miesiąca (HR 0.86 (95% CI, 0.64-1.15; $P=0.15$) [23]. Mediana OS u pacjentów z przerzutami do płuc i/lub wątroby wyniosła 37,2 miesiąca i 22,8 miesiąca odpowiednio w grupach alpelisibu i placebo (HR = 0,68 (0,46 -1,00) 95% CI) [23].

Na podstawie wyników badania SOLAR-1 alpelisib został w maju 2019 roku zatwierdzony przez amerykańską agencję Food and Drug Administration (FDA) w leczeniu kobiet po menopauzie oraz mężczyzn z miejscowo zaawansowanym lub uogólnionym rakiem piersi wykazującym ekspresję receptora hormonalnego i niewykazującym nadekspresji ludzkiego naskórkowego czynnika wzrostu typu 2 (HER2-ujemnym) oraz z mutacją *PIK3CA*, w przypadku stwierdzenia progresji choroby w trakcie lub po leczeniu opartym

o leki hormonalne. W lipcu 2020 został też zatwierdzony przez European Medicines Agency (EMA) do leczenia kobiet po menopauzie oraz mężczyzn z miejscowo zaawansowanym lub uogólnionym rakiem piersi wykazującym ekspresję receptora hormonalnego i niewykazującym nadekspresji ludzkiego naskórkowego czynnika wzrostu typu 2 (HER2-ujemnym) oraz z mutacją *PIK3CA*, w przypadku stwierdzenia progresji choroby w trakcie lub po leczeniu hormonalnym.

W badaniu SOLAR-1 zastosowanie alpelisybu w skojarzeniu z fulwestrantem wiązało się ze statystycznie istotnym obniżeniem jakości życia (według EORTC QLQ-C30) w stosunku do wartości wyjściowych, zwłaszcza z powodu utraty apetytu i biegunki w porównaniu z grupą otrzymującą placebo z fulwestrantem. Zdarzenia niepożądane stopnia 3. i 4. związane z leczeniem zgłaszano sześć razy częściej w grupie leczonej alpelisybem i fulwestrantem w porównaniu z grupą placebo i fulwestrant (66,9% vs. 11,8%) [24].

Kolejnym opublikowanym badaniem, które przeprowadzono z zastosowaniem alpelisybu było badanie BYLieve (badanie kliniczne bez grupy kontrolnej). W kohorcie pacjentów leczonych inhibitorem CDK4/6 w skojarzeniu z inhibitorem aromatazy mediana PFS wyniosła 7,3 miesiąca, mediana OS wyniosła 17,3 miesiąca, a całkowity odsetek odpowiedzi wyniósł 17% [25].

Publikacja Turnera z 2021 r. porównująca wyniki badania BYLive z wynikami uzyskanymi z danych klinicznych wykazała istotnie statystycznie wyższą medianę PFS w populacji pa-

cientów otrzymujących alepelisib (pacjenci z badania BYLieve) w porównaniu z populacją otrzymujących leczenie w ramach rutynowej praktyki klinicznej [26].

W wielu publikacjach dotyczących alpelisybu podkreśla się rolę edukacji pacjenta oraz personelu medycznego opiekującego się chorym w zakresie zarządzania działaniami niepożądanymi leku, które odbiegają od profilu działań niepożądanych najczęściej obserwowanego w przypadku terapii onkologicznych.

W większości przypadków powikłań o nieznacznym lub umiarkowanym nasileniu nie ma powodu do modyfikacji planu leczenia, jednak w razie potrzeby przewiduje się czasową przerwę w podawaniu alpelisybu i ewentualne zmniejszenie dawki preparatu. Pierwsze zmniejszenie dawki przewiduje zmniejszenie dawki leku do 250 mg/dobę (1 tabletka 200 mg + 1 tabletka 50 mg), kolejne zmniejszenie dawki przewiduje zastosowanie alpelisybu w dawce 200 mg / dzień (1 tabletka 200 mg). Zaleca się maksymalnie dwukrotne zmniejszenie dawki, a następnie, o ile istnieje taka konieczność, trwałe odstawienie leczenia.

Chorzy na raka piersi z cukrzycą typu II (cukrzyca typu I jest przeciwwskazaniem do włączenia alpelisybu), stanem przedcukrzycowym, wyjściowym BMI ≥ 30 i pacjenci w wieku 75 lat i więcej mają istotnie wyższe ryzyko wystąpienia hiperglikemii w trakcie leczenia alpelisybem [27].

Poniżej przedstawiono dwa przypadki kliniczne pacjentów leczonych alpelisybem

w Narodowym Instytucie Onkologii. Państwowym Instytucie Badawczym w Warszawie, które doskonale ilustrują problemy i korzyści wynikające z zastosowania alpelisybu (Piqrey) w leczeniu chorych na uogólnionego, hormonozależnego, *HER2-ujemnego* rak piersi:

A. Pacjentka J-O, lat 53:

- » 09.08.2016 pacjentka zgłosiła się powodu zaawansowanego miejscowo guza piersi prawej, który został zweryfikowany jako rak inwazyjny, NOS, ER 90%, PgR 80%, HER2 0 -brak ekspresji, Ki67 15%, cT4a cN0 M0. Pacjentka była negatywnie nastawiona do propozycji chemioterapii, zdecydowała się na hormonoterapię o założeniu paliatywnym. Chora nie miesiączkowała od 12.2014.
- » W dniu 14.09.2016 rozpoczęto hormonoterapię letrozolem, które kontynuowała do 05.03.2021. W dniu 23.02.2021 wykonała TK, w którym uwidoczono przerzuty do wątroby. Wykonano biopsję zmiany w piersi, która potwierdziła wcześniejszy profil receptorowy oraz pozwoliła wykonać badanie genetyczne stwierdzające obecność mutacji w genie *PiK3CA* (p.E545K) w tkance nowotworowej, co umożliwiło włącznie chorej do leczenia alpelisybem.
- » Pacjentka nie zgłaszała żadnych dolegliwości. Nie chorowała na żadne schorzenia internistyczne. Bez otyłości, ani nadwagi.
- » Od 19.03.2021 rozpoczęto leczenie fulwestrantem w typowych dawkach w połączeniu z alpelisybem 2 x 300 mg p.o.. Obecnie pacjentka kontynuuje terapię.

W kolejnych ocenach TK utrzymuje się stabilizacja choroby. W pierwszym cyklu terapii odnotowano przejściowy wzrost poziomu transaminaz w stopniu 2, zmiany skórne (rush) głównie na twarzy, szyi i tułowie w stopniu 2 oraz hyperglikemię w stopniu 1 w drugim tygodniu leczenia. Opisane dolegliwości nie wymagały modyfikacji dawek alpelisybu. Zastosowano jedynie krem ze sterydem na zmiany skórne, które ustąpiły w 4 tygodniu terapii i nie nawracały w kolejnych miesiącach.

B. Pacjentka B-B, lat 37:

- » W listopadzie 2016 pacjentka zauważyła guzek w piersi lewej.
- » W dniu 20.12.2016 - wykonano mastektomię lewostronną z jednoczasową rekonstrukcją. W badaniu histopatologicznym stwierdzono raka inwazyjnego, pT1c, N0, M0, ER - reakcja dodatnia w 100, PGR - reakcja dodatnia w 20%, HER2 – ujemny, pT1c pN0 M0, CS - IB
- » Zakwalifikowano chorą do hormonoterapii uzupełniającej tamoksyfen + goserelina (od stycznia 2017 do lutego 2019).
- » W lutym 2019 stwierdzono przerzuty do wątroby oraz do śródpiersia.
- » W dniu 25.02.2019 odbyła się biopsja wątroby - potwierdzono przerzut z raka piersi: ER - pos, PGR - neg, HER2 - neg (metodą FISH).
- » Od marca 2019 rozpoczęła leczenie letrozolem z palbocyclibem 1 x 125 mg p.o., kontynuowała także goserelinę 1 x 3.6 mg sc

- » W dniu 22.04.2019 przeprowadzono obustronną owariectomię. Odstawiono goserelinę. Kontynuowała leczenie inhibitorem CDK4/6 oraz letrozol.
- » W dniu 10.03.2021 wykonano kontrolne TK - progresja choroby. Chora czuła się bardzo dobrze, nie zgłaszała dolegliwości poza osłabieniem w stopniu 1.
- » Wykonano badanie genetyczne z materiału pobranego wcześniej z wątroby, stwierdzające obecność mutacji w genie *PiK3CA* (p.H1047R, p.E545K) w tkance nowotworowej, co pozwoliło na włącznie chorej do leczenia alpelisybem.
- » W wywiadzie bez chorób współistniejących, nie przyjmowała żadnych leków na stałe. Bez otyłości, ani nadwagi.
- » Od 06.04.2021 rozpoczęto leczenie fulwestranem w typowych dawkach w połączeniu z alpelisybem 2 x 300 mg p.o..
- » W kolejnych ocenach TK utrzymuje się częściowa regresja zmian przerzutowych.

- » W pierwszym cyklu terapii obserwowano zmiany skórne głównie na twarzy i szyi w stopniu 1 oraz hyperglikemię w stopniu 2 (poziom glikemii w granicach 160-250 mg%). Włączono leczenie preparatem metforminy. Poziom glikemii znormalizował się w ciągu 7 dni. Chora regularnie monitoruje poziomy glikemii zgodnie z otrzymanymi instrukcjami oraz przestrzega diety z ograniczeniem spożycia cukrów prostych. Obecnie poziom glikemii nie przekracza 150 mg%. Opisane toksyczności nie wymagały modyfikacji dawek alpelisybu. Pacjentka kontynuuje terapię.

Obie pacjentki są przykładem bardzo dobrej odpowiedzi na leczenie alpelisybem. Tolerancja terapii jest bardzo dobra. Jak dotychczas udało się uniknąć konieczności zastosowania chemioterapii w obu przypadkach, co niewątpliwie pozwoliło zachować chorym bardzo dobrą jakość życia pomimo zaawansowanej choroby nowotworowej. Należy podkreślić, że obie pracują zawodowo

Piśmiennictwo:

1. Engelman JA, Luo J, Cantley LC. The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nat Rev Genet* 2006; 7(8): 606–619.
2. Vanhaesebroeck B, Guillermet-Guibert J, Graupera M, Bilanges B. The emerging mechanisms of isoform-specific PI3K signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010; 11(5): 329–341.
3. Okkenhaug K, Vanhaesebroeck B. PI3K in lymphocyte development, differentiation and activation. *Nat Rev Immunol* 2003; 3(4): 317–330.
4. The Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2012; 490(7418): 61–70.
5. Saal LH, Holm K, Maurer M et al. PIK3CA mutations correlate with hormone receptors, node metastasis, and ERBB2, and are mutually exclusive with PTEN loss in human breast carcinoma. *Cancer Res* 2005; 65(7): 2554–2559.
6. Kalinsky K, Jacks LM, Heguy A et al. PIK3CA mutation associates with improved outcome in breast cancer. *Clin Cancer Res off J Am Assoc Cancer Res* 2009; 15(16): 5049–5059.
7. Bertucci F, Ng CKY, Patsouris A et al. Genomic characterization of metastatic breast cancers. *Nature* 2019; 569(7757): 560–564.
8. Pang B, Cheng S, Sun S-P et al. Prognostic role of PIK3CA mutations and their association with hormone receptor expression in breast cancer: a meta-analysis. *Sci Rep* 2015; 4(1): 6255.
9. Liu Y-R, Jiang Y-Z, Zuo W-J et al. PIK3CA mutations define favorable prognostic biomarkers in operable breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *OncoTargets Ther* 2014; 7: 543–552.
10. Mosele MF, Lusque A, Tran Dien A et al. Outcome and mutational landscape of patients with PIK3CA-mutated metastatic breast cancer (mBC). *Ann Oncol* 2020 Mar;31(3):377-386.
11. Jensen JD, Knoop A, Laenkholm AV et al. PIK3CA mutations, PTEN, and pHER2 expression and impact on outcome in HER2-positive early stage breast cancer patients treated with adjuvant chemotherapy and trastuzumab. *Ann Oncol* 2012; 23(8): 2034–2042.
12. Baselga J, Cortés J, Im S-A et al. Biomarker analyses in CLEOPATRA: a phase III, placebo-controlled study of pertuzumab in human epidermal growth factor receptor 2-positive, first-line metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 2014; 32(33): 3753–3761.
13. Maira S-M, Pecchi S, Huang A et al. Identification and characterization of NVP-BKM120, an orally available pan-class I PI3-kinase inhibitor. *Mol Cancer Ther* 2012; 11(2): 317–328.
14. Baselga J, Im S-A, Iwata H et al. Buparlisib plus fulvestrant versus placebo plus fulvestrant in postmenopausal, hormone receptor-positive, HER2-negative, advanced breast cancer (BELLE-2): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2017; 18(7): 904–916.
15. Di Leo A, Johnston S, Lee KS et al. Buparlisib plus fulvestrant in postmenopausal women with hormone-receptor-positive, HER2-negative, advanced breast cancer progressing on or after mTOR inhibition (BELLE-3): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2018; 19(1): 87–100.

16. Vuylsteke P, Huizing M, Petrakova K, Roylance R, Laing R, Chan S, et al. Pictilisib PI3Kinase inhibitor (a phosphatidylinositol 3-kinase [PI3K] inhibitor) plus paclitaxel for the treatment of hormone receptor-positive, HER2-negative, locally recurrent, or metastatic breast cancer: interim analysis of the multicentre, placebo-controlled, phase II randomized PEGGY study. *Ann Oncol.* 2016 Nov 1;27(11):2059–66.
17. Krop IE, Mayer IA, Ganju V et al. Pictilisib for oestrogen receptorpositive, aromatase inhibitor-resistant, advanced or metastatic breast cancer (FERGI): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial. *Lancet Oncol* 2016; 17(6): 811–821.
18. Fritsch C, Huang A, Chatenay-Rivauday C et al. Characterization of the novel and specific PI3Ka inhibitor NVP-BYL719 and development of the patient stratification strategy for clinical trials. *Mol Cancer Ther* 2014; 13(5): 1117–1129.
19. Miller TW, Hennessy BT, González-Angulo AM et al. Hyperactivation of phosphatidylinositol-3 kinase promotes escape from hormone dependence in estrogen receptor-positive human breast cancer. *J Clin Invest* 2010; 120(7): 2406–2413.
20. Juric D, Janku F, Rodón J et al. Alpelisib plus fulvestrant in PIK3CAaltered and PIK3CA-wild-type estrogen receptor-positive advanced breast cancer: a phase 1b clinical trial. *JAMA Oncol* 2018; e184475.
21. Andre F, Ciruelos E, Rubovszky G et al. Alpelisib for PIK3CA-mutated, hormone receptor-positive advanced breast cancer. *N Engl J Med* 2019; 380(20): 1929–1940.
22. Juric D, Ciruelos E, Rubovszky G et al. Abstract GS3-08: alpelisib + fulvestrant for advanced breast cancer: subgroup analyses from the phase III SOLAR-1 trial. *Cancer Res* 2019; 79: GS3–08.
23. Andre F, Ciruelos EM, Juric D et al. Alpelisib plus fulvestrant for PIK3CA-mutated, hormone receptor-positive, human epidermal growth factor receptor-2-negative advanced breast cancer: final overall survival results from SOLAR-1. *Ann Oncol* 2021 Feb;32(2):208-217.
24. Ciruelos EM, Rugo HS, Mayer IA, Levy C, Forget F, Delgado Mingorance JI, Safrá T, Masuda N, Park YH, Juric D, Conte P, Campone M, Loibl S, Iwata H, Zhou X, Park J, Ridolfi A, Lorenzo I, André F. Patient-Reported Outcomes in Patients with PIK3CA-Mutated Hormone Receptor-Positive, Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Negative Advanced Breast Cancer From SOLAR-1. *J Clin Oncol.* 2021 Jun 20;39(18):2005-2015. doi: 10.1200/JCO.20.01139. Epub 2021 Mar 29. PMID: 33780274; PMCID: PMC8210974.
25. Rugo HS, Lerebours F, Ciruelos E, Drullinsky P, Ruiz-Borrego M, Neven P, Park YH, Prat A, Bachelot T, Juric D, Turner N, Sophos N, Zarate JP, Arce C, Shen YM, Turner S, Kanakamedala H, Hsu WC, Chia S. Alpelisib plus fulvestrant in PIK3CA-mutated, hormone receptor-positive advanced breast cancer after a CDK4/6 inhibitor (BYLieve): one cohort of a phase 2, multicentre, open-label, non-comparative study. *Lancet Oncol.* 2021 Apr;22(4):489-498. doi: 10.1016/S1470-2045(21)00034-6. Erratum in: *Lancet Oncol.* 2021 May;22(5):e184. PMID: 33794206
26. Turner S, Chia S, Kanakamedala H, Hsu WC, Park J, Chandiwana D, Ridolfi A, Yu CL, Zarate JP, Rugo HS. Effectiveness of Alpelisib + Fulvestrant Compared with Real-World Standard Treatment Among Patients with HR+, HER2-, PIK3CA-Mutated Breast Cancer. *Oncologist.* 2021 Jul;26(7):e1133-e1142. doi: 10.1002/onco.13804. Epub 2021 May 13. PMID: 33909934; PMCID: PMC8265362.

27. Bertho M, Patsouris A, Augereau P, Robert M, Frenel JS, Blonz C, Campone M. A pharmacokinetic evaluation of alpelisib for the treatment of HR+, HER2-negative, PIK3CA-mutated advanced or metastatic breast cancer. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2021 Feb;17(2):139-152. doi: 10.1080/17425255.2021.1844662. Epub 2020 Dec 8. PMID: 33213227

5.

Finansowanie diagnostycznych badań genetycznych przez publicznego płatnika

5.1 Możliwości finansowania diagnostycznych badań genetycznych

Prawidłowo przeprowadzona diagnostyka nowotworu z użyciem nowoczesnych metod badawczych przekłada się pozytywnie na osiągnięte efekty leczenia chorych, jednak wymaga dodatkowych nakładów finansowych. Koszty badań genetycznych u pacjentów onkologicznych są wysoce zróżnicowane, zależnie od użytej techniki badawczej i liczby/rodzaju wykonanych oznaczeń, niezbędnych dla uzyskania jednoznacznego, klinicznie użytecznego wyniku.

Obecne rozwiązania sposobu refundacji badań genetycznych w chorobach nowotworowych odbywa się w ramach czterech umów zawieranych przez świadczeniodawców z Narodowym Funduszem Zdrowia (rysunek nr 7):

1. Umowy ambulatoryjnej opieki specjalistycznej, w której jest możliwość rozliczenia badań genetycznych za pomocą produktu rozliczeniowego (5.03.00.0000021) wykrywanie RNA/DNA za pomocą badań molekularnych PCR/PFGE), który znajduje się w katalogu specjalistycznych świadczeń odrębnych. Wartość świadczenia w AOS wynosi obecnie ok. 300 zł
2. Do roku 2017 badania genetyczne były głównie rozliczane i finansowane przez NFZ w ramach umowy świadczeń zdrowotnych kontraktowanych odrębnie tzw. umowa SOK, za pomocą produktu rozlicze-
3. Od początku 2017 roku umożliwiono finansowanie diagnostycznych badań genetycznych w chorobach nowotworowych w umowie w rodzaju leczenie szpitalne oparty o zastosowane technologie diagnostyczne.
4. Ponadto dopuszczalne jest rozliczenia badań genetycznych w trakcie kwalifikacji do programów lekowych w ramach umowy programy lekowe, wyłącznie w przypadku programów hematoonkologicznych jako świadczenie tzw. ryczałt diagnostyczny.

Rysunek nr 7. Finansowanie diagnostycznych badań genetycznych w ramach umów zawieranych z NFZ przez świadczeniodawców



W obecnej sytuacji, wybór ścieżki rozliczeniowej badań genetycznych wykonywanych w ramach diagnostyki chorób nowotworowych, zależy od kilku zasadniczych elementów, między innymi od rodzaju i momentu pobrania materiału wykorzystanego do badania, tj.:

1. materiału archiwalnego – dostarczonego z innego ośrodka lub pobranego w danym podmiocie leczniczym podczas procedury diagnostycznej w trakcie wcześniejszej hospitalizacji (tzw. materiał archiwalny: bloczki i szkiełka),
2. materiału aktualnie pobranego w ramach procedury diagnostycznej w trakcie hospitalizacji lub porady ambulatoryjnej.

Biorąc pod uwagę rodzaj i moment pobrania materiału istnieją następujące możliwości finansowania badań genetycznych w chorobach nowotworowych w ramach umów zawartych z publicznym płatnikiem:

Lecznictwo Szpitalne:

- A. materiał pobrany podczas hospitalizacji – rozliczenie badań genetycznych w ramach dedykowanych produktów rozliczeniowych z katalogu do sumowania (zał. 1C¹),
- B. materiał archiwalny dostarczony z innego ośrodka lub pobrany w ośrodku podczas innej hospitalizacji (tzw. materiał archiwalny: bloczki i szkiełka) – rozliczenie w ramach umowy w rodzaju leczenie szpitalne, w ramach produktów rozliczeniowych z katalogu do sumowania oraz z katalogu 1B² (zał. 1 c+ zał. b).

Ambulatoryjna Opieka Specjalistyczna:

A. materiał pobrany w trakcie procedury diagnostycznej ambulatoryjnej – rozliczenie w ramach umowy w rodzaju świadczenia odrębnie kontraktowane (5.10.00.0000041) *kompleksowa diagnostyka genetyczna chorób nowotworowych*,

B. materiał pobrany podczas porady (5.03.00.0000021) - *Wykrywanie RNA/DNA za pomocą badań molekularnych (PCR/ PFGE)*.

C. materiał archiwalny- rozliczany w ramach umowy w rodzaju świadczenia odrębnie kontraktowane (5.10.00.0000041) *kompleksowa diagnostyka genetyczna chorób nowotworowych*,

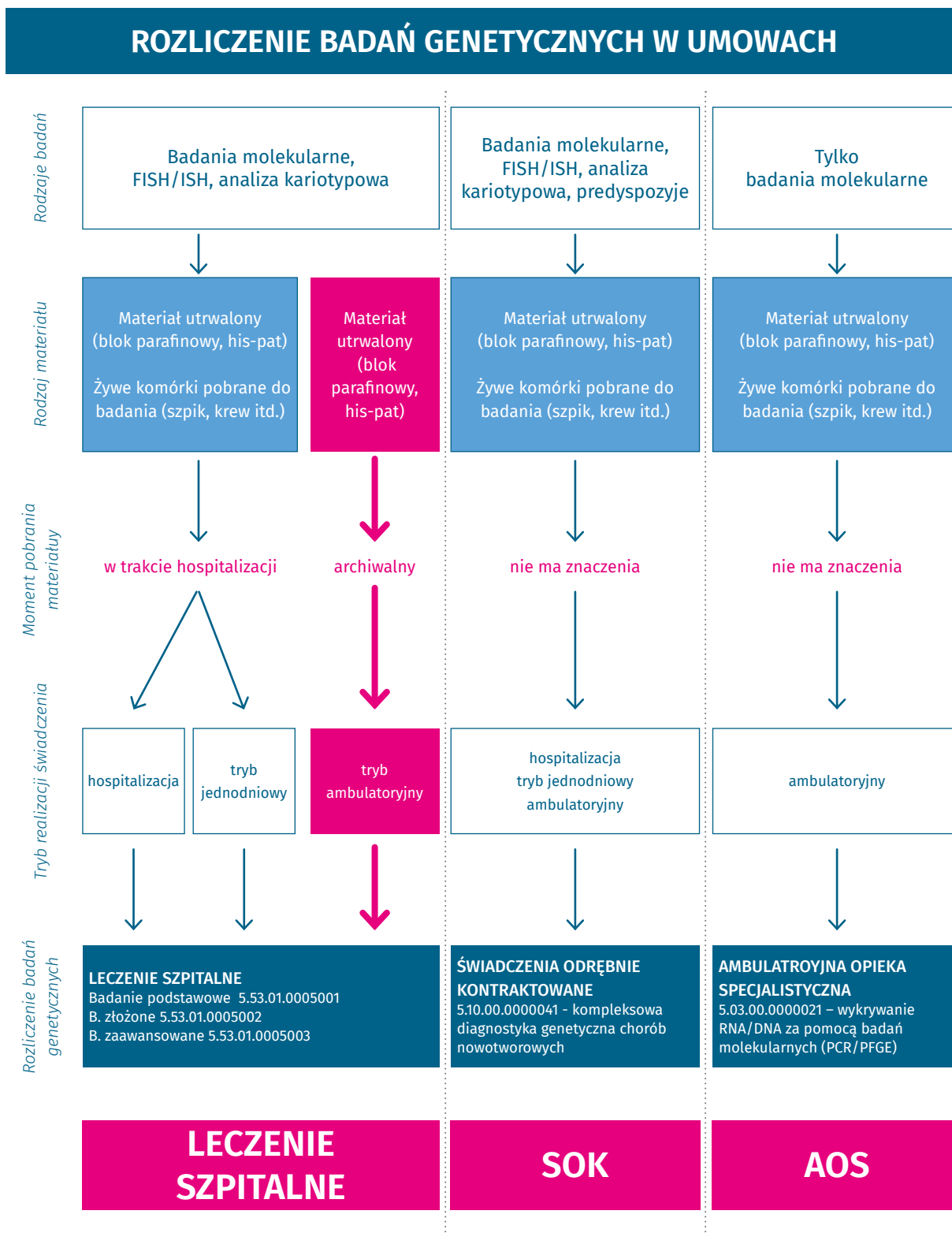
Programy lekowe:

A. materiał aktualnie pobrany – badania genetyczne wykonywane w trakcie kwalifikacji do programu lekowego dotyczących chorób hematologicznych finansowane w ramach odpowiedniego ryczałtu diagnostycznego

Istotna jest zatem umiejętność prawidłowego rozróżniania rodzajów świadczeń i okoliczności, w których możemy przedstawić do rozliczenia różne procedury czy produkty rozliczeniowe. Poniżej przedstawiono schemat rozliczenia diagnostycznych badań genetycznych w chorobach nowotworowych z zależności rodzaju i momentu pobrania materiału do badań.

5.2. Zasady rozliczania badań genetycznych w chorobach nowotworowych w ramach umowy

Rysunek nr 8. Schemat rozliczenia diagnostycznych badań genetycznych w chorobach nowotworowych z zależności rodzaju i momentu pobrania materiału do badań



leczenie szpitalne

5.2.1 Badania genetyczne w chorobach nowotworowych z materiału pobranego w trakcie hospitalizacji

Finansowanie diagnostycznych badań genetycznych w chorobach nowotworowych oparte o rozliczenie świadczeń w zależności od zastosowanej technologii diagnostycznej wprowadzono od stycznia 2017. Pierwotnie sprawozdanie badań genetycznych wiązało się z koniecznością hospitalizacji pacjenta, w trakcie której pobrany został materiał do wykonania badania diagnostycznego. Kolejna zmiana pojawiła się z początkiem 2018 roku. Wówczas wprowadzono możliwość rozliczania diagnostycznych badań genetycznych w trybie ambulatoryjnym wykonanych z materiału archiwalnego pobranego również u innych świadczeniodawców.

Zgodnie z zapisami Zarządzenia Prezesa Narodowego Funduszu Zdrowia w sprawie określenia warunków zawierania i realizacji umów w rodzaju leczenie szpitalne (z późn. zm.) możliwość rozliczania badań diagnostycznych genetycznych została przypisana na 15 zakresom zarówno zachowawczym jak i zabiegowym:

1. chirurgii dziecięcej: *hospitalizacja/hospitalizacja – pakiet onkologiczny*

2. chirurgii klatki piersiowej: *hospitalizacja/hospitalizacja – pakiet onkologiczny*

3. chirurgii onkologicznej: *hospitalizacja/hospitalizacja – pakiet onkologiczny*

4. chorobach płuc/chorobach płuc dla dzieci: *hospitalizacja pakiet onkologiczny*

5. endokrynologii: *hospitalizacja/hospitalizacja pakiet onkologiczny*

6. gastroenterologii: *hospitalizacja/hospitalizacja – pakiet onkologiczny*

7. ginekologii onkologicznej: *hospitalizacja/hospitalizacja – pakiet onkologiczny*

8. hematologii: *hospitalizacja/hospitalizacja – pakiet onkologiczny*

9. neonatologii / neonatologii - drugi p.ref. / neonatologii - trzeci p. ref.

10. neurochirurgii: *hospitalizacja/hospitalizacja – pakiet onkologiczny*

11. onkologii i hematologii dziecięcej: *hospitalizacja/hospitalizacja – pakiet onkologiczny*

12. onkologii klinicznej: *hospitalizacja/hospitalizacja – pakiet onkologiczny*

13. otorynolaryngologii: *hospitalizacja/hospitalizacja – pakiet onkologiczny*

14. położnictwie i ginekologii/położ. i gin. - drugi p. ref./położ. i gin. - trzeci p. ref./hospitalizacja-pakiet onkologiczny

15. urologii: *hospitalizacja/hospitalizacja – pakiet onkologiczny*

Nie ma możliwości rozliczenia badań genetycznych w zakresie chirurgia ogólna.

Rozliczeniu badań genetycznych w chorobach nowotworowych w ramach umowy leczenia szpitalne dedykowane są produkty rozliczeniowe z katalogu 1c (do sumowania), które pozwalają sfinansować wykonane diagnostyczne badania genetyczne z materiału pobranego w trakcie hospitalizacji oraz z materiału archiwalnego:

- Podstawowe badania genetyczne w chorobach nowotworowych (kod 5.53.01.0005001)
- **refundacja 649 zł**
- Złożone badania genetyczne w chorobach nowotworowych (kod 5.53.01.0005002)
- **refundacja 1 298 zł**
- Zaawansowane badania genetyczne w chorobach nowotworowych (kod 5.53.01.0005003)
- **refundacja 2 434 zł**

Rysunek nr 9. Produkty rozliczeniowe dedykowane sprawozdaniu i sfinansowaniu badań genetycznych w chorobach nowotworowych zgodnie z Zarządzeniem Prezesa NFZ w rodzaju leczenie szpitalne, załącznik 1c

**Zarządzenie Nr 118/2021/DSOZ
Prezesa
Narodowego Funduszu Zdrowia**

z dnia 28.06.2021 r.

zmieniające zarządzenie w sprawie określenia warunków zawierania i realizacji umów w rodzaju leczenie szpitalne oraz leczenie szpitalne – świadczenia wysokospecjalistyczne

- **Podstawowe badania genetyczne** w chorobach nowotworowych (kod 5.53.01.0005001) **649**
- **Złożone badania genetyczne** w chorobach nowotworowych (kod 5.53.01.0005002) **1 298**
- **Zaawansowane badania genetyczne** w chorobach nowotworowych (kod 5.53.01.0005003) **2 434**
- **MOŻLIWOŚĆ SUMOWANIA TYLKO Z KATALOGIEM 1a**
- **MOŻLIWOŚĆ ROZLICZENIA W PAKIECIE ONKOLOGICZNYM**



Podstawowym warunkiem rozliczenia badań genetycznych w zakresie umowy w rodzaju leczenie szpitalne w chorobach nowotworowych jest posiadanie kontraktu z NFZ na udzielanie świadczeń opieki zdrowotnej w rodzaju leczenie szpitalne, w co najmniej jednym z wymienionych zakresów z katalogu 1c zarządzenia. Hospitalizacja, w ramach której pobieramy materiał do badania genetycznego powinna być uzasadniona względami medycznymi i właściwie udokumentowana. Po otrzymaniu wyniku badania genetycznego należy dosumować do grupy JGP z katalogu 1a odpowiedni, wskazany przez pracownię genetyczną produkt rozliczeniowy: proste lub złożone lub zaawansowane badanie genetyczne.

Zgodnie z zapisami zarządzenia nie można sprawozdawać do NFZ łącznie wskazanych produktów, jak również wykazywać je razem z produktem **"kompleksowa diagnostyka genetyczna w chorobach nowotworowych"**. Należy pamiętać, że badania genetyczne w chorobach nowotworowych można również rozliczyć w pakiecie onkologicznym jako świadczenia nielimitowane.

Po wykonaniu badania genetycznego i przekazaniu wyniku niezbędne jest rozliczenie usługi. Ze względu na fakt, że są to świadczenia do sumowania z grupą JGP (katalog 1a) powyższe rozliczenie powinno nastąpić w miejscu, gdzie nastąpiło pobranie materiału tj. w oddziale szpitalnym i może być dokonane po zakończeniu hospitalizacji. Nie ma uzasadnienia dla przedłużania pobytu chorego w szpitalu do momentu otrzymania wyniku.

Warunki rozliczenia badań genetycznych w chorobach nowotworowych w zakresie umowy leczenia szpitalnego w ramach hospitalizacji to:

- » pobranie materiału do badania genetycznego w datach hospitalizacji,
- » uzasadnienie hospitalizacji oraz rozliczenie hospitalizacja zgodnie z grupami JGP
- » wskazanie rozpoznania ICD 10 z zakresu listy rozpoznań: 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, C 92.0, C92.1, C93.1, D33, D45, D46, D47, D76 – (z rozszerzeniami do pięciu znaków)
- » wystawienie skierowania na badanie genetyczne w ramach dat hospitalizacji oraz pozyskanie świadomej zgody pacjenta na badanie genetyczne oraz pozyskanie zgody chorego na badanie genetyczne
- » po otrzymaniu wyniku badania genetycznego - dosumowanie (prostego lub złożonego lub zaawansowanego badania genetycznego) do grupy JGP, następuje dokonanie korekty sprawozdania i rozliczenia kosztów badań genetycznych.
- » możliwość rozliczenia w pakiecie onkologicznym jako świadczenia nielimitowane.

5.2.2 Badania genetyczne w chorobach nowotworowych z materiału archiwalnego

Od 2018 roku umożliwiono finansowanie diagnostycznych badań genetycznych w umowie szpitalnej w trybie ambulatoryjnym z materiału archiwalnego. W takim przypadku wykorzystujemy produkt rozliczeniowy: kod 5.52.01.0001511 badanie genetyczne z materiału archiwalnego – o wartości 0,

który umożliwia sprawozdanie i rozliczenie badań genetycznych: prostych, złożonych i zaawansowanych w sytuacji konieczności modyfikacji planu leczenia. Świadczenie *badanie genetyczne z materiału archiwalnego* (kod 5.52.01.0001511) jest dedykowane procedurze ambulatoryjnej, ale rozliczane w umowie szpitalnej. Obowiązkowe jest sprawozdanie pierwotnej daty pobrania materiału do badań.

Rysunek nr 10. Produkt rozliczeniowy umożliwiający rozliczenie badań genetycznych w chorobach nowotworowych z materiału archiwalnego w trybie ambulatoryjnym

Kod produktu	Nazwa produktu rozliczeniowego	Wartość punktowa	Zakresy																				Tryb realizacji świadczeń	Uwagi	
			chirurgia dziecięca	chirurgia klatki piersiowej / chirurgia klatki piersiowej dla dzieci	chirurgia klatki piersiowej specjalistyczna	chirurgia onkologiczna / chirurgia onkologiczna dla dzieci	chirurgia onkologiczna specjalistyczna	choroby płuc / choroby płuc dla dzieci	choroby plus specjalistyczna	endokrynologia / endokrynologia dla dzieci	endokrynologia dla dzieci specjalistyczna	gastroenterologia / gastroenterologia dla dzieci	gastroenterologia specjalistyczna	ginekologia onkologiczna	hematologia	neurochirurgia/ neurochirurgia dla dzieci	onkologia i hematologia dziecięca	onkologia kliniczna	onkologia kliniczna specjalistyczna	otorynolaryngologia/ otorynolaryngologia dla dzieci	położnictwo i ginekologia / pol. i gin. - drugi p. ref. / pol. i gin. - trzeci p. ref.	urologia/ urologia dla dzieci	urologia specjalistyczna		
5.52.01.0001511	Badanie genetyczne materiału archiwalnego	0	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	➤ do rozliczenia wyłącznie z produktem: 5.53.01.0005001 lub 5.53.01.0005002 lub 5.53.01.0005003, w sytuacji konieczności modyfikacji ustalonego plan leczenia, ➤ konieczność sprawozdania pierwotnej daty pobrania materiału do badań ➤ realizowane w trybie ambulatoryjnym ➤ zgodnie z § 26 pkt 21 zarządzenia

§ 26 pkt 21 dopuszcza się rozliczenie produktu: 5.52.01.0001511 Badanie genetyczne materiału archiwalnego z katalogu produktów odrębnych określonego w **załączniku nr 1b** do zarządzenia – w sytuacji wykonania badania materiału archiwalnego, pobranego również u innego świadczeniodawcy, w sytuacji konieczności modyfikacji przez świadczeniodawcę ustalonego planu leczenia;

Podstawowym warunkiem realizacji omawianego świadczenia jest wskazanie do rozliczenia produktu rozliczeniowego: 5.52.01.0001511 *Badanie genetyczne materiału archiwalnego* o wartości punktowej „0” i dosumowanie odpowiedniej procedury diagnostycznej z katalogu 1c.

Należy mieć na uwadze, że **materiał archiwalny** może być pobrany również u innego świadczeniodawcy w trakcie świadczeń w trybie szpitalnym czy ambulatoryjnym, który będzie poddany ponownej ocenie molekularnej. Nie obowiązuje warunek czasowy tj. procedura pobrania materiału mogła zaistnieć wiele miesięcy lub lat przed obecnym wykonaniem badania diagnostycznego genetycznego.

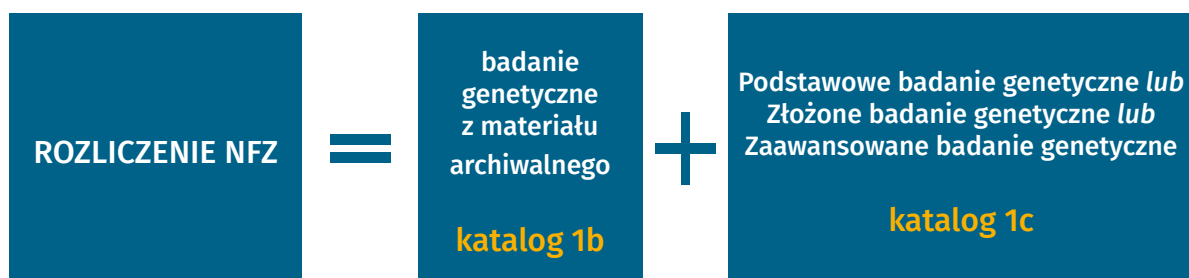
Rysunek nr 11. Warunki finansowania badań genetycznych z materiału archiwalnego w trybie ambulatoryjnym

**Zarządzenie Nr 118/2021/DSOZ
Prezesa
Narodowego Funduszu Zdrowia**

z dnia 28.06.2021 r.

zmieniające zarządzenie w sprawie określenia warunków zawierania i realizacji umów w rodzaju leczenie szpitalne oraz leczenie szpitalne – świadczenia wysokospecjalistyczne

- **Podstawowe badania genetyczne** w chorobach nowotworowych (kod 5.53.01.0005001) **649**
- **Złożone badania genetyczne** w chorobach nowotworowych (kod 5.53.01.0005002) **1 298**
- **Zaawansowane badania genetyczne** w chorobach nowotworowych (kod 5.53.01.0005003) **2 434**
- **MOŻLIWOŚĆ SUMOWANIA TYLKO Z KATALOGIEM 1a**
- **MOŻLIWOŚĆ ROZLICZENIA W PAKIECIE ONKOLOGICZNYM**



- » w sytuacji wykonania badania materiału archiwalnego, pobranego również u innego świadczeniodawcy,
- » w sytuacji konieczności modyfikacji przez świadczeniodawcę ustalonego planu leczenia;
- » możliwość rozliczenia w pakiecie onkologicznym
- » tryb ambulatoryjny

Obecny stan prawny uniemożliwia rozliczenie w trybie ambulatoryjnym badań gene-

tycznych pobranych z materiału świeżego, np. krwi.

5.2.3 Wykaz badań genetycznych w chorobach nowotworowych – załącznik nr 7.

Finansowanie diagnostyki molekularnej w umowie w rodzaju leczenie szpitalne uzależnione jest od zastosowanych technik, ich złożoności i poniesionych kosztów. W załączniku nr 7³ tj. Wykazie 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 biologii molekularnej. Zakresy badań genetycznych podzielono na badania proste, złożone i zaawansowane.

Nieustanny rozwój wiedzy dotyczącej podłoża molekularnego nowotworów oraz stale rosnąca liczba dostępnych nowoczesnych terapii celowanych powoduje, że techniki biologii molekularnej nie tylko umożliwiają precyzyjne różnicowanie nowotworów i postawienie właściwego rozpoznania klinicznego, ale są doskonałym narzędziem pozwalającym na skuteczną kwalifikację pacjentów do odpowiednich terapii. Dlatego też, wskazane jest uwzględnienie kolejnych rozpoznań do załącznika nr 7 co umożliwi wykonanie badań genetycznych u chorych z kolejnymi nowotworami. W 2021

zmodyfikowano załącznik nr 7 do zarządzenia⁴, stanowiący wykaz badań genetycznych w chorobach nowotworowych. Dlatego też, w załączniku m. in. dodano kolejne rozpoznania, które umożliwią wykonanie badań genetycznych u chorych z następującymi rozpoznaniem:

- A. nowotwór gruczołu krokowego – C61,
- B. nowotwór trzonu macicy – C54,
- C. nowotwór złośliwy pęcherza moczowego – C67,
- D. nowotwór złośliwy trzustki – C25;

oraz zaktualizowano zapisy w załączniku nr 7 dotyczące rozliczania badań genetycznych w poszczególnych kategoriach, tj. badanie proste, złożone i zaawansowane, co pozwoli na ich dostosowanie do obecnie wykorzystywanych technik biologii molekularnej oraz umożliwi prawidłowe rozliczanie wykonywanych badań.

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

³ Zarządzenie nr 118/2021/DSOZ Prezesa Narodowego Funduszu Zdrowia

⁴ ZARZĄDZENIE Nr 118/2021/DSOZ PREZESA NFZ z dnia 28.06.2021 r. zmieniające zarządzenie w sprawie określenia warunków zawierania i realizacji umów w rodzaju leczenie szpitalne oraz leczenie szpitalne – świadczenia wyspecjalistyczne

Rysunek nr 12. Wykaz badań genetycznych w chorobach nowotworowych – załącznik nr 7

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, C 92.0, 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
2.	Złożone badanie genetyczne	1.3. Prostý test – badanie molekularne
		Analiza jednej lub kilku mutacji wykrywanych w od jednego do 6 amplikonów 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 sond lub z prostym badaniem molekularnym
		2.3 FISH ²⁾ /ISH ³⁾ do komórek nowotworowych z zastosowaniem zestawu sond (od 2 do 3 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 plazmocytów (zestaw sond zgodnie z zaleceniami klinicznymi)
		2.6. Złożony test – badanie molekularne
		Analiza 6-40 amplikonów metodą sekwencjonowania Sangera lub NGS
3.	Zaawansowane badanie genetyczne	lub analiza przy użyciu prostej reakcji PCR ¹⁾ z dodatkowym zastosowaniem Southern Blot
		lub badanie mutacji dynamicznych
		lub analiza duplikacji/delecji
		lub analiza metylacji
		3.1. Analiza kariotypu w komórkach nowotworowych przy użyciu jednej metody prążkowej z równoległymi badaniami analizą FISH z użyciem >2 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 sond lub z zastosowaniem co najmniej 3⁴⁾ 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 amplikonów)

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.

5.3. Analiza sprawozdanych i rozliczonych badań genetycznych w nowotworach piersi C50 w okresie 2017-2019

W związku z nowymi możliwościami finansowania badań genetycznych chorobach nowotworowych Polska Koalicja Medycyny Personalizowanej przeprowadziła analizę danych dotyczących realizacji tych badań w umowie w rodzaju leczenie szpitalne jak również w umowie w rodzaju świadczenia odrębnie kontraktowane w latach 2017-2019. Dane do analizy pozyskano z Centrali NFZ na podstawie zgody udzielonej przez Prezesa NFZ, w formie plików Excel wygenerowanych z centralnego systemu informatycznego, elektronicznego systemu sprawozdawania i rozliczania świadczeń opieki zdrowotnej finansowanych ze środków publicznych przekazywanych przez świadczeniodawców do bazy NFZ.

Udostępnione informacje odnoszą się do zestawów świadczeń obejmujących następujące badania genetyczne:

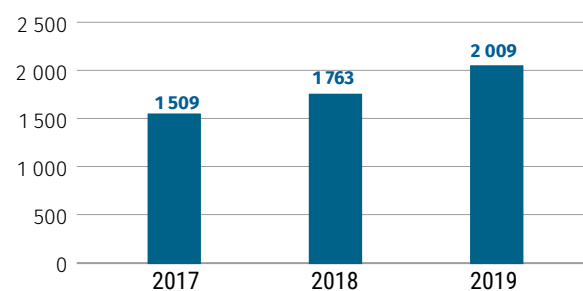
- » Podstawowe badania genetyczne w chorobach nowotworowych
- » Złożone badania genetyczne w chorobach nowotworowych
- » Zaawansowane badania genetyczne w chorobach nowotworowych
- » Badania genetyczne z materiału archiwalnego
- » Kompleksowa diagnostyka genetyczna chorób nowotworowych

Poniżej przedstawiono analizę oceny wpływu zmiany modelu finansowania na dostępność diagnostycznych badań genetycznych dla

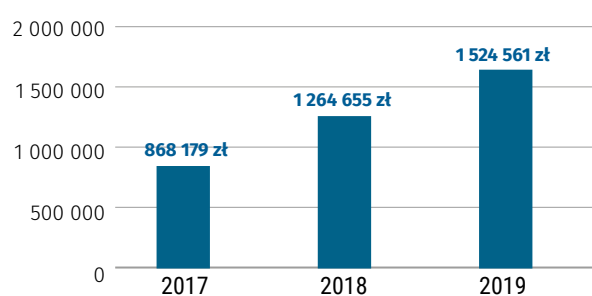
rozpoznania C50 – nowotwór złośliwy piersi, w której uwzględniono wyłącznie badania genetyczne zrealizowane i sfinansowane w ramach umów zawartych przez świadczeniodawców z Narodowym Funduszem Zdrowia.

Szóste miejsce pod względem liczby sfinansowanych przez NFZ badań genetycznych w chorobach nowotworowych zajmuje rozpoznanie C50 – nowotwór złośliwy piersi. W analizowanym okresie sprawozdano i rozliczono łączną liczbę 5 281 zł diagnostycznych badań genetycznych dla rozpoznania C50, a kwota jaka została sfinansowana przez publicznego płatnika wyniosła 3 657 396 zł (wykres nr 1, wykres nr 2).

Wykres nr. 1. Liczba sprawozdawanych badań genetycznych w nowotworach piersi C50 w 2017-2019



Wykres nr. 2. Wartość genetycznych sfinansowanych przez płatnika badań dla rozpoznania C50



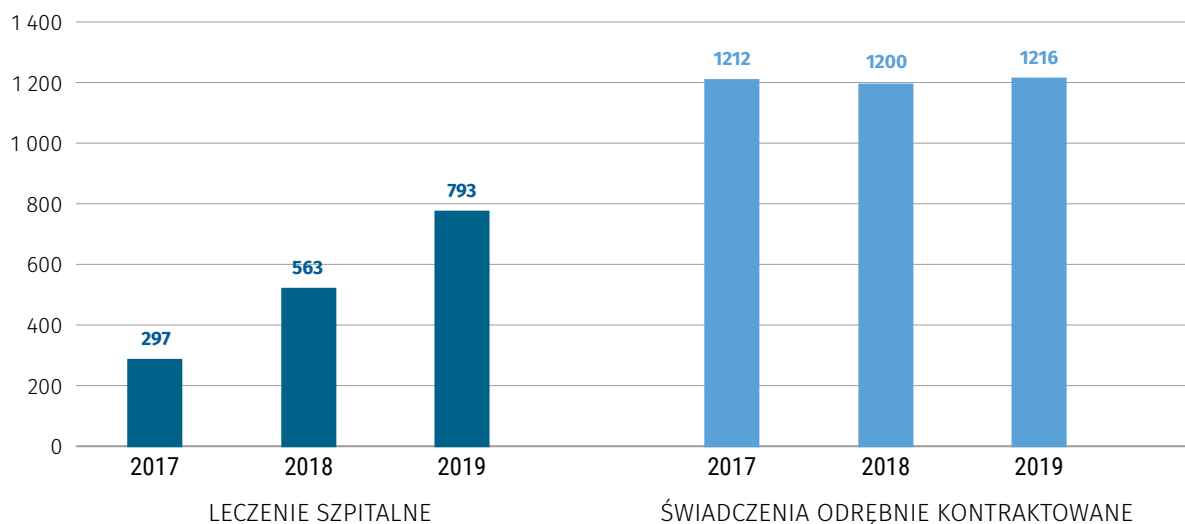
Podstawowym badaniem genetycznym, które może być rozliczone z materiału świeżego lub archiwalnego jest badanie amplifikacji genu *HER2* metodą FISH. W zakresie zmian germinalnych (poradnictwo genetyczne) mamy możliwość analizy, poza genami *BRCA1/2* również kilku innych genów, których mutacje mogą powodować raka piersi np. *CHEK2*, czy *PALB2*. Obecnie najczęściej ocenia się jedynie pięć najczęstszych mutacji genów *BRCA1* i *BRCA2* występujących w polskiej populacji. Geny *BRCA1*, *BRCA2* są duże, o bardzo długiej sekwencji DNA. Na świecie standardem jest już ocena całych sekwencji kodujących tych genów co powinno być już rutynowo wykonywane w przypadku, gdy diagnostyka genetyczna jest niezbędna. Kompleksowa ocena mutacji w obu genach *BRCA1/BRCA2* wymaga zastosowania technologii sekwencjonowania następnej generacji (NGS). Takie badanie może być korzystnie rozliczone jako zaawansowane w przypadku wykorzystania materiału z bloczka parafinowego, a także w niektórych sytuacjach z krwi obwodowej.

Aktualnie prowadzane są badanie dotyczące genu *PIK3CA* (3-kinaza fosfatydyloinozytolu). U pacjentek, u których zidentyfikuje się mutację w *PIK3CA* będzie można w przyszłości zastosować leczenie celowane. Innym potencjalnym markerem genetycznym są zmiany zwane fuzjami genowymi. W raku piersi występuje bardzo rzadka fuzja genu *NTRK*. Duże nadzieje wiązano z badaniem *NTRK* w potrójnie ujemnych rakach piersi, ponieważ dla tych chorych nie ma obecnie żadnego efektywnego leczenia. Jednak fuzja genu *NTRK* występuje u poniżej 1% pacjentek z rakiem piersi.

W Polsce w okresie 2017-2019 liczba rozliczonych badań genetycznych w nowotworze piersi zdecydowanie była większa w ramach umowy świadczenia odrębnie kontraktowane jako *kompleksowa diagnostyka nowotworowa* i łącznie wynosiła 3 628 o wartości 1 875 676 zł (wykres nr 3).

Najwięcej badań diagnostycznych genetycznych rozliczono w umowie rodzaju lecznic-

Wykres nr 3. Liczba rozliczonych badań genetycznych dla rozpoznania C50 z podziałem na umowy



two szpitalne – zakres pakiet onkologiczny. W pozostałych limitowanych zakresach (świadczenia poza pakietem i ryczałt) sprawozdano 1 070 badań o wartości 2 224 148 zł. W tym zdecydowany największy udział procentowy w nowotworach piersi w ramach umowy leczenie szpitalne mają podstawowe badania genetyczne w chorobach nowotworowych: 65%. (wykres nr 4)

Analiza odsetka wykonanych badań dla poszczególnych rodzajów pośrednio wskazuje, że tylko u około 35% wykonano oznaczenie mutacji *BRCA1* i *BRCA2* zakładając poprawność rozliczenia.

Dominującym zakresem w którym rozliczano badania genetyczne wykonane z materiału świeżego była chirurgia onkologiczna, a dla materiału archiwalnego – onkologia kliniczna. Przy czym 999 badań z materiału „świeżego” rozliczono w zakresie chirurgia onkologiczna, a 445 z materiału archiwalnego w onkologii klinicznej (tabela nr 5, 6).

Wykres nr. 4. Procentowy udział rodzajów badań genetycznych w chorobach nowotworowych dla rozpoznania C50

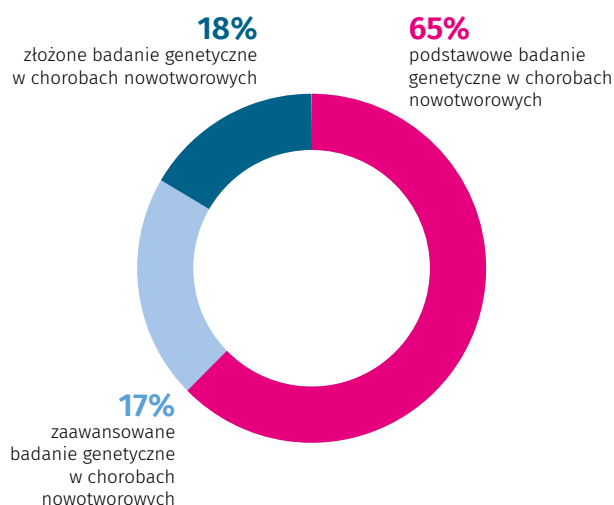


Tabela nr 5. Liczba rozliczonych diagnostycznych badań genetycznych dla rozpoznania C50 w ramach nielimitowanych i limitowanych środków finansowych w umowach NFZ

RODZAJE UMÓW NFZ	2017		2018		2019		razem	
	liczba	wartość	liczba	wartość	liczba	wartość	liczba	wartość
UMOWA RODZAJU - LECZENIE SZPITALNE	297	241 575 zł	563	644 255 zł	793	895 889 zł	1 653	1 781 720 zł
ryczałt	24	16 873 zł	12	18 495 zł	71	88 583 zł	107	123 951 zł
pakiet onkologiczny	266	219 511 zł	400	478 608 zł	463	517 221 zł	1 129	1 215 340 zł
świadczenia poza pakietem onkologicznym	7	5 192 zł	151	147 152 zł	259	290 085 zł	417	442 428 zł
UMOWA RODZAJU - ŚWIADCZENIA ODRĘBNIIE KONTRAKTOWANE (RYCZAŁT)	1 212	626 604 zł	1 200	620 400 zł	1 216	628 672 zł	3 628	1 875 676 zł
Razem liczba badań genetycznych rozliczonych dla rozpoznania icd10: C50 w umowach NFZ	214	110 638 zł	189	97 713 zł	173	89 441 zł	576	297 792 zł

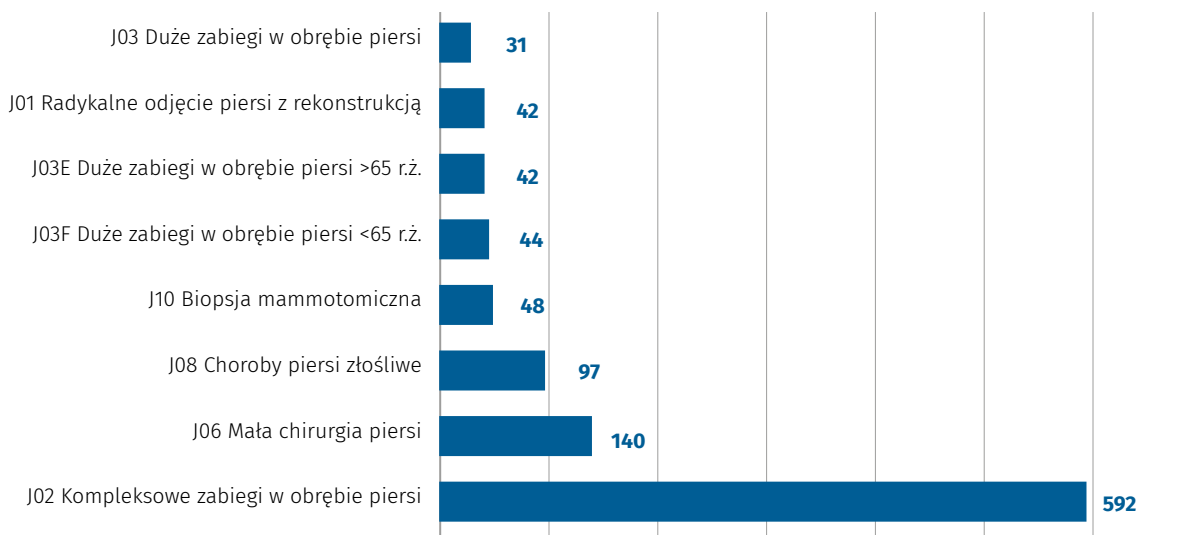
Tabela nr 6. Liczba sprawozdanych i rozliczonych diagnostycznych badań genetycznych dla rozpoznania C50 w umowie rodzaju leczenie szpitalne w zakresach w latach 2017-2019

ZAKRESY W UMOWIE RODZAJU LECZENIE SZPITALNE	2017		2018		2019		razem	
	liczba	wartość	liczba	wartość	liczba	wartość	liczba	wartość
BADANIA GENETYCZNE Z MATERIAŁU ARCHIWALNEGO								
Onkologia kliniczna			74	72 521 zł	371	421 662 zł	445	494 183 zł
Chirurgia onkologiczna			13	9 085 zł	94	71 710 zł	107	80 796 zł
Choroby płuc					2	2 596 zł	2	2 596 zł
BADANIA GENETYCZNE SZPITALNE (materiał „świeży” pobrany w trakcie hospitalizacji)								
Chirurgia onkologiczna	290	235 735 zł	444	525 658 zł	265	332 754 zł	999	1 094 147 zł
Onkologia kliniczna	6	5 192 zł	27	33 746 zł	55	59 704 zł	88	98 642 zł
Inne zakresy	1	649 zł	5	3 245 zł	6	7 463 zł	12	11 357 zł
RAZEM	297	241 575 zł	563	644 255 zł	793	895 889 zł	1 653	1 781 720 zł

Najczęściej rozliczaną grupą dla hospitalizacji podczas, której pobrano materiał dla wykonania badania diagnostycznego była

grupa J02 – kompleksowe zabiegi w obrębie piersi (wykres nr 5).

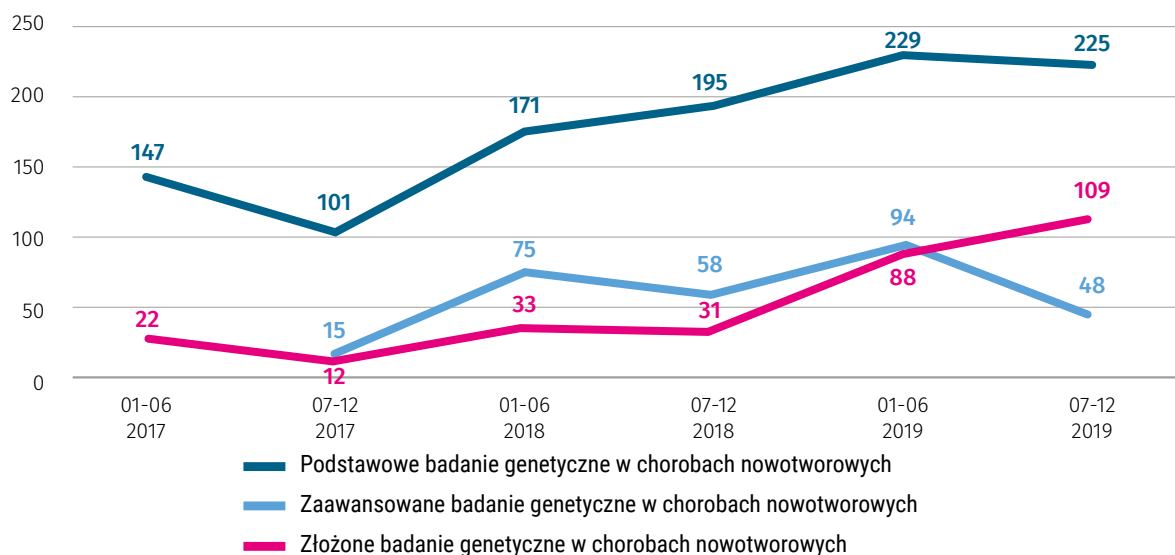
Wykres nr 5. Liczba rozliczonych badań genetycznych w trakcie hospitalizacji z wykazanymi najczęściej grupami zabiegowymi JGP



Od 2018 roku istotnie zwiększyła się liczba rozliczanych badań złożonych w chorobach nowotworowych. Nie można wykluczyć, że przyczyną jest oznaczanie mutacji w genach

BRCA1 i *BRCA2* w tym rozpoznaniu ponieważ oznaczenie amplifikacji genu *HER2* powinno być rozliczone jako badanie proste.

Wykres nr 6. Liczba sfinansowanych badań genetycznych w chorobach nowotworowych dla rozpoznania C50 w ramach umowy leczenie szpitalne z podziałem na produkty rozliczeniowe w latach 2017-2019



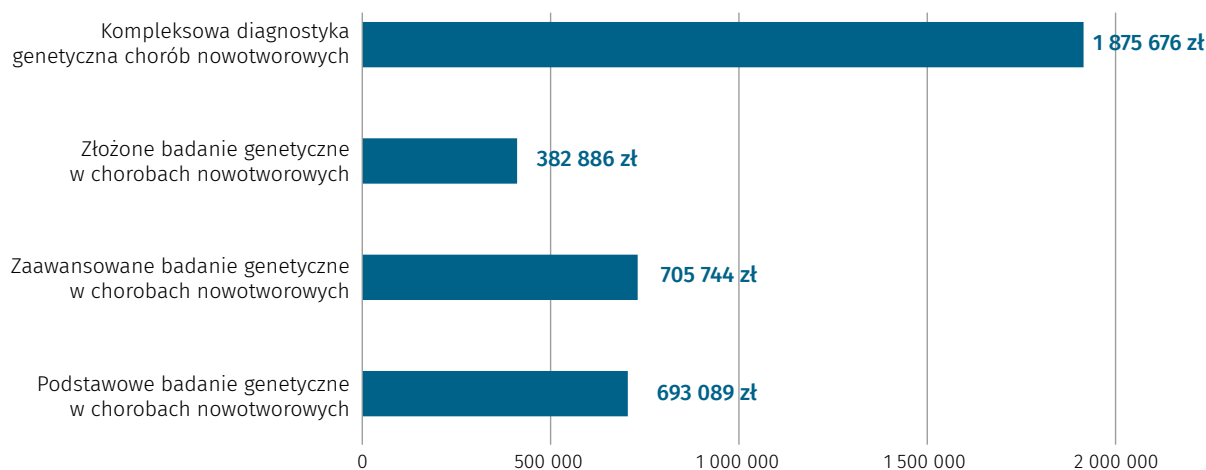
W tabeli nr 7 i na wykresie nr 7 przedstawiono liczbę oraz wartość poszczególnych produktów rozliczeniowych dzięki, którym możemy sfinansować zrealizowane badania genetyczne w nowotworach piersi. I tak zdecydowanie najwięcej wykonano kompleksowej diagno-

styki genetycznej chorób nowotworowych: 3 628 badań o wartości 1 875 676 zł. Kolejnym pod względem ilościowym produktem rozliczeniowy jest podstawowe badanie genetyczne: 1 068 o wartości 693 089 zł.

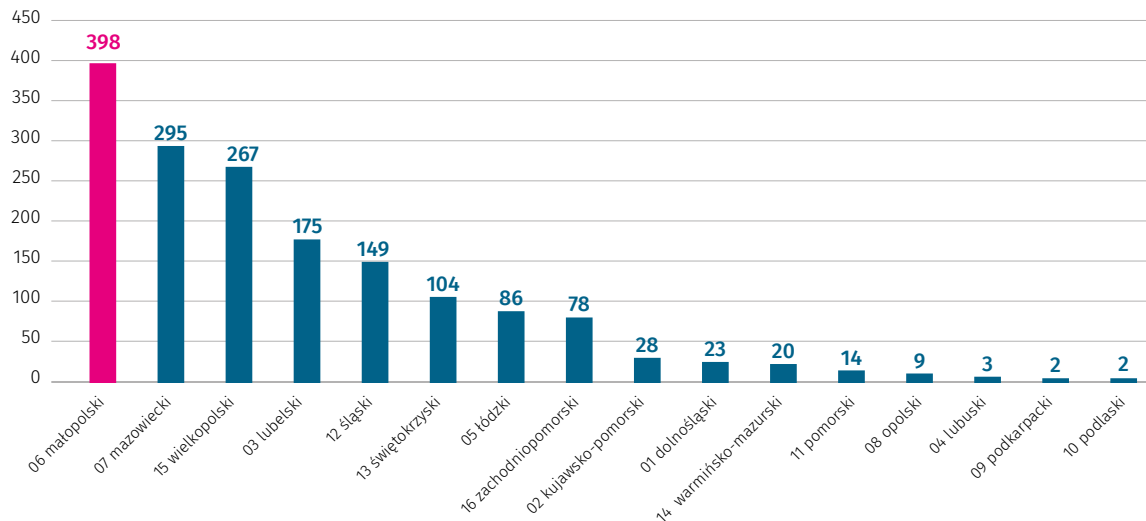
Tabela nr 7. Produkty rozliczeniowe w umowach NFZ dot. badań genetycznych w chorobach nowotworowych dla rozpoznania C50 sfinansowane w pakiecie onkologicznym i zakresach limitowanych

	2017	2018	2019	Suma końcowa
UMOWA RODZAJU LECZENIE SZPITALNE	297	563	793	1 653
Złożone badanie genetyczne w chorobach nowotworowych	34	64	197	295
Świadczenia rozliczone w ryczałcie	2	0	16	18
Świadczenia rozliczone w pakiecie onkologicznym	31	46	59	136
Świadczenia rozliczone poza pakietem onkologicznym	1	18	122	141
Podstawowe badanie genetyczne w chorobach nowotworowych	248	366	454	1 068
Świadczenia rozliczone w ryczałcie	22	6	37	65
Świadczenia rozliczone w pakiecie onkologicznym	220	248	304	772
Świadczenia rozliczone poza pakietem onkologicznym	6	112	113	231
Zaawansowane badanie genetyczne w chorobach nowotworowych	15	133	142	290
Świadczenia rozliczone w ryczałcie		6	18	24
Świadczenia rozliczone w pakiecie onkologicznym	15	106	100	221
Świadczenia rozliczone poza pakietem onkologicznym		21	24	45
UMOWA W RODZAJU ŚWIADCZENIA ODRĘBNI KONTRAKTOWANE				
Kompleksowa diagnostyka genetyczna chorób nowotworowych	1 212	1 200	1 216	3 628

Wykres nr 7. Wartość badań genetycznych w rozpoznaniu C50 sfinansowanych przez NFZ w latach 2017-2019



Wykres nr 8. Liczba badań genetycznych dla rozpoznania C50 w oddziałach wojewódzkich w latach 2017-2019 sfinansowanych w umowie leczenia szpitalne



Największy odsetek badań genetycznych sfinansowanych w lecnictwie szpitalnym był

sprawozdany w województwie małopolskim i mazowieckim odpowiednio 398 i 295.

Wykres nr 9. Liczba sfinansowanych badań genetycznych dla rozpoznania C50 w oddziałach wojewódzkich w latach 2017-2019 w umowie rodzaju świadczenia odrębnie kontraktowane

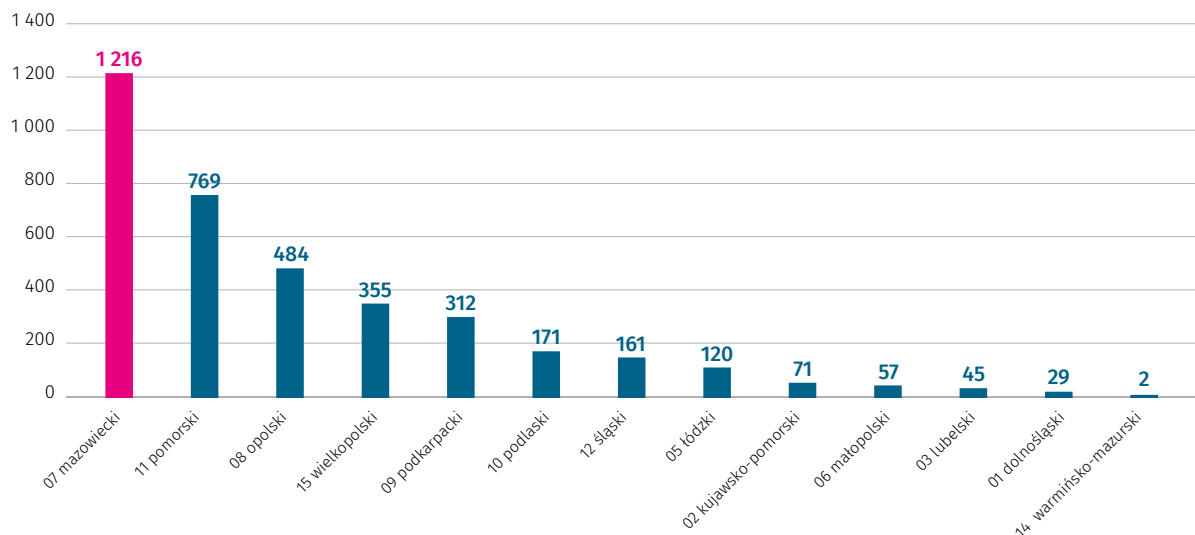


Tabela nr 8. Liczba i wartość sfinansowanych archiwalnych badań genetycznych w chorobach nowotworowych dla rozpoznania ICD10 C50 w latach 2017-2019

	2017		2018		2019		Razem	
	liczba	wartość	liczba	wartość	liczba	wartość	liczba	wartość
UMOWA RODZAJU LECZENIE SZPITALNE								
BADANIA GENETYCZNE – ARCHIWALNE			87	81 607	467	495 968 zł	554	577 574 zł
Podstawowe badanie genetyczne w chorobach nowotworowych			57	36 991	252	163 538 zł	309	200 529 zł
Złożone badanie genetyczne w chorobach nowotworowych			25	32 448	47	114 379 zł	52	126 547 zł
Zaawansowane badanie genetyczne w chorobach nowotworowych			5	12 168	168	218 051 zł	193	250 499 zł
BADANIA GENETYCZNE – SZPITALNE	297	241 575	476	562 648	326	399 922 zł	1099	1 204 145 zł
Podstawowe badanie genetyczne w chorobach nowotworowych	248	160 942	309	200 529	202	131 090 zł	759	492 561 zł
Złożone badanie genetyczne w chorobach nowotworowych	15	36 504	128	311 501	95	231 192 zł	238	579 197 zł
Zaawansowane badanie genetyczne w chorobach nowotworowych	34	44 129	39	50 619	29	37 640 zł	102	132 388 zł

Umożliwienie od 2018 finansowania badań genetycznych w ramach umowy leczenia szpitalne z materiału archiwalnego przyczyniło się do stopniowego wykorzystania przez

świadczeniodawców sprawozdania i rozliczania badań w trybie ambulatoryjnym. Łączna liczba zrealizowanych w tym trybie badań to 554 o wartości 577 574 zł (tabela nr 8).

Czas oczekiwani po sprawozdaniu i rozliczeniu badania genetycznego do podania leku w programie lekowym

U chorych, dla których rozliczono diagnostyczne badania genetyczne z rozpoznaniem C50 w latach 2017-2019, a następnie podano lek z programu lekowego Leczenie raka piersi obliczono średni czas oczekiwania dla całej Polski oraz dla poszczególnych grup podmiotów leczniczych (rysunek nr 13). Zdecy-

dowanie i najszybszy śr. czas podania leku w programie lekowym jest w szpitalach ogólnopolskich (tabela nr 9).

Łącznie w latach 2017-2019 wykonano 5 281 diagnostycznych badań genetycznych u chorych z nowotworem piersi. Z tego 781 chorym podano lek z programu lekowego Leczenie raka piersi, w tym 508 chorych badanie genetyczne miało wykonane przed włączeniem do programu. Średni czas oczekiwania na podanie leku w tym programie po sprawozdaniu wyniku badania genetycznego dla całej Polski wynosi 16 dni.

Rysunek nr 13. Średni czas oczekiwania na podanie leku w programie lekowych u chorych, u których sprawozdano diagnostyczne badanie genetyczne z rozpoznaniem C50

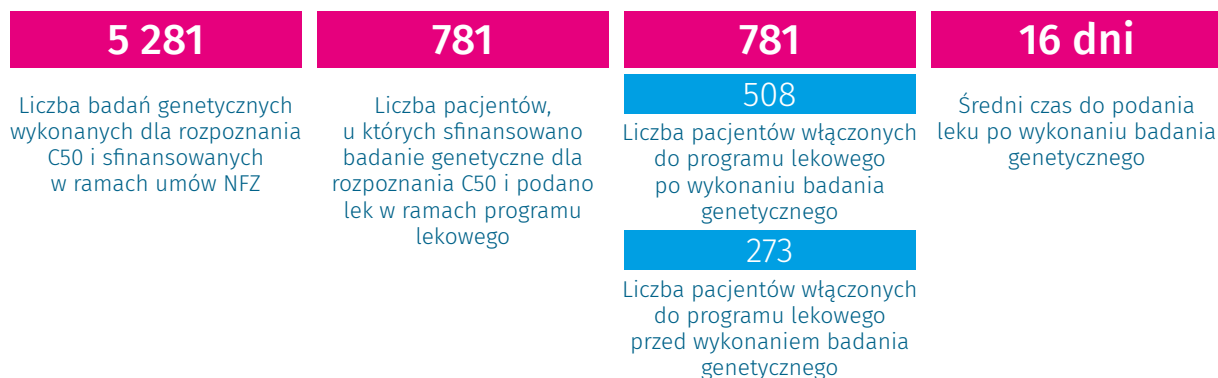


Tabela nr 9. Średni czas oczekiwania na podanie leku w programie lekowych u chorych, u których sprawozdano diagnostyczne badanie genetyczne z rozpoznaniem raka piersi C50 z podziałem na grupy podmiotów leczniczych

Leczenie zaawansowanego raka jelita grubego	Liczba badań genetycznych*	Średni czas oczekiwania**
Szpitale onkologiczne lub pulmologiczne	186	41
Szpitale II stopnia	4	16
Szpitale ogólnopolskie (Instytuty i Centra Onkologii)	446	4
Szpitale III stopnia	103	26

Spis rysunków

Rysunek nr 1. Strategia testowania BRCA1/BRCA2 - metody klasyczne	19
Rysunek nr 2. Strategia testowania BRCA1/BRCA2 - NGS.....	19
Rysunek nr 3. Rycina przedstawia schemat budowy PIK3CA (katalitycznej podjednostki p110 α kinazy PI3K), poszczególne domeny oraz lokalizacje najczęstszych mutacji somatycznych [3].....	21
Rysunek nr 4. Techniki biologii molekularnej powszechnie stosowane do oznaczania mutacji w genie PIK3CA.....	26
Rysunek nr 5. Fluorogram z reakcji sekwencjonowania bezpośredniego metodą Sanger.....	27
Rysunek nr 6. Schemat diagnostyczny PIK3CA w raku piersi	29
Rysunek nr 7. Finansowanie diagnostycznych badań genetycznych w ramach umów zawieranych z NFZ przez świadczeniodawców.....	43
Rysunek nr 8. Schemat rozliczenia diagnostycznych badań genetycznych w chorobach nowotworowych z zależności rodzaju i momentu pobrania materiału do badań.....	45
Rysunek nr 9. Produkty rozliczeniowe dedykowane sprawozdaniu i sfinansowaniu badań genetycznych w chorobach nowotworowych zgodnie z Zarządzeniem Prezesa NFZ w rodzaju leczenie szpitalne, załącznik 1 c	47
Rysunek nr 10. Produkt rozliczeniowy umożliwiający rozliczenie badań genetycznych w chorobach nowotworowych z materiału archiwalnego w trybie ambulatoryjnym	49
Rysunek nr 11. Warunki finansowania badań genetycznych z materiału archiwalnego w trybie ambulatoryjnym	50
Rysunek nr 12. Wykaz badań genetycznych w chorobach nowotworowych - załącznik nr 7.....	52
Rysunek nr 13. Średni czas oczekiwania na podanie leku w programie lekowym u chorych, u których sprawozdano diagnostyczne badanie genetyczne z rozpoznaniem C50.....	60

Spis tabel

Tabela nr 1. Zmiany patomorfologiczne w piersiach.....	10
Tabela nr 2. Podtypy molekularne	12
Tabela nr 3. Zakres zmian identyfikowanych przez zestaw theascreen® PIK3CA RGQ PCR Kit, (QIAGEN Manchester, Ltd.)	24
Tabela nr 4. Zakres zmian identyfikowanych przez zestaw The cobas® PIK3CA Mutation Test (CE-IVD) firmy Roche.....	25

Tabela nr 5. Liczba rozliczonych diagnostycznych badań genetycznych dla rozpoznania C50 w ramach nielimitowanych i limitowanych środków finansowych w umowach NFZ.....	55
Tabela nr 6. Liczba sprawozdanych i rozliczonych diagnostycznych badań genetycznych dla rozpoznania C50 w umowie rodzaju leczenie szpitalne w zakresach w latach 2017-2019.....	56
Tabela nr 7. Produkty rozliczeniowe w umowach NFZ dot. badań genetycznych w chorobach nowotworowych dla rozpoznania C50 sfinansowane w pakiecie onkologicznym i zakresach limitowanych.....	57
Tabela nr 8. Liczba i wartość sfinansowanych archiwalnych badań genetycznych w chorobach nowotworowych dla rozpoznania ICD10 C50 w latach 2017-2019.....	59
Tabela nr 9. Średni czas oczekiwania na podanie leku w programie lekowych u chorych, u których sprawozdano diagnostyczne badanie genetyczne z rozpoznaniem raka piersi C50 z podziałem na grupy podmiotów leczniczych.....	60

Spis wykresów

Wykres nr. 1. Liczba sprawozdawanych badań genetycznych w nowotworach piersi C50 w 2017-2019.....	53
Wykres nr. 2. Wartość genetycznych sfinansowanych przez płatnika badań dla rozpoznania C50.....	53
Wykres nr 3. Liczba rozliczonych badań genetycznych dla rozpoznania C50 z podziałem na umowy.....	54
Wykres nr 4. Procentowy udział rodzajów badań genetycznych w chorobach nowotworowych dla rozpoznania C50.....	55
Wykres nr 5. Liczba rozliczonych badań genetycznych w trakcie hospitalizacji z wykazanymi najczęściej grupami zabiegowymi JGP.....	56
Wykres nr 6. Liczba sfinansowanych badań genetycznych w chorobach nowotworowych dla rozpoznania C50 w ramach umowy leczenie szpitalne z podziałem na produkty rozliczeniowe w latach 2017-2019.....	57
Wykres nr 7. Wartość badań genetycznych w rozpoznaniu C50 sfinansowanych przez NFZ w latach 2017-2019.....	58
Wykres nr 8. Liczba badań genetycznych dla rozpoznania C50 w oddziałach wojewódzkich w latach 2017-2019 sfinansowanych w umowie leczenie szpitalne.....	59
Wykres nr 9. Liczba sfinansowanych badań genetycznych dla rozpoznania C50 w oddziałach wojewódzkich w latach 2017-2019 w umowie rodzaju świadczenia odrębnie kontraktowane.....	59



