



Jak włączyć diagnostykę molekularną do praktyki klinicznej na przykładzie Świętokrzyskiego Centrum Onkologii

Artur Kowalik

Zakład Diagnostyki Molekularnej

Świętokrzyskie Centrum Onkologii w Kielcach



National Comprehensive Cancer Institutes w USA





Świętokrzyskie Centrum Onkologii

Prof. Tadeusz Koszarowski (1915-2002)

- Nestor Polskiej Onkologii
- Twórca koncepcji polskiej sieci wielospecjalistycznych centrów onkologii– *pacjent leczony kompleksowo w swoim sąsiedztwie*



Prof. Stanisław Gózdź

- Prof. Stanisław Gózdź uczeń Profesora Tadeusza Koszarowskiego twórca oraz Dyrektor Świętokrzyskiego Centrum Onkologii
- Kompleksowa opieka nad pacjentem





Świętokrzyskie Centrum Onkologii



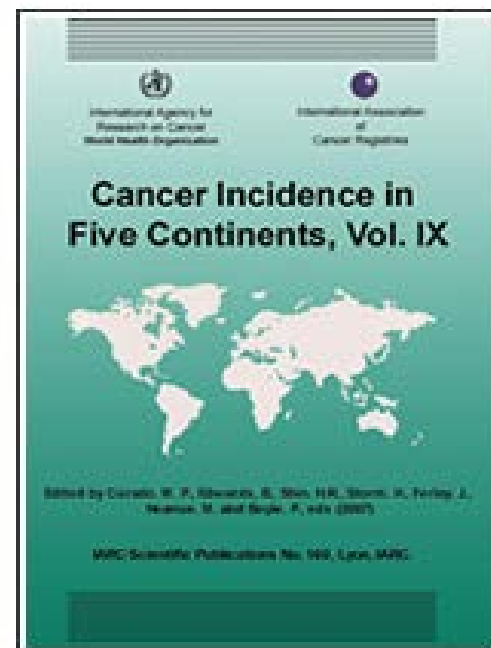


Świętokrzyskie Centrum Onkologii – wielospecjalistyczny szpital onkologiczny

- 30 Poradni (200 000 konsultacji/rok)
- 12 Klinik (22 000 hospitalizacji/rok)
- 10 Zakładów Diagnostycznych:

Jeden z nich to Zakład Diagnostyki Molekularnej

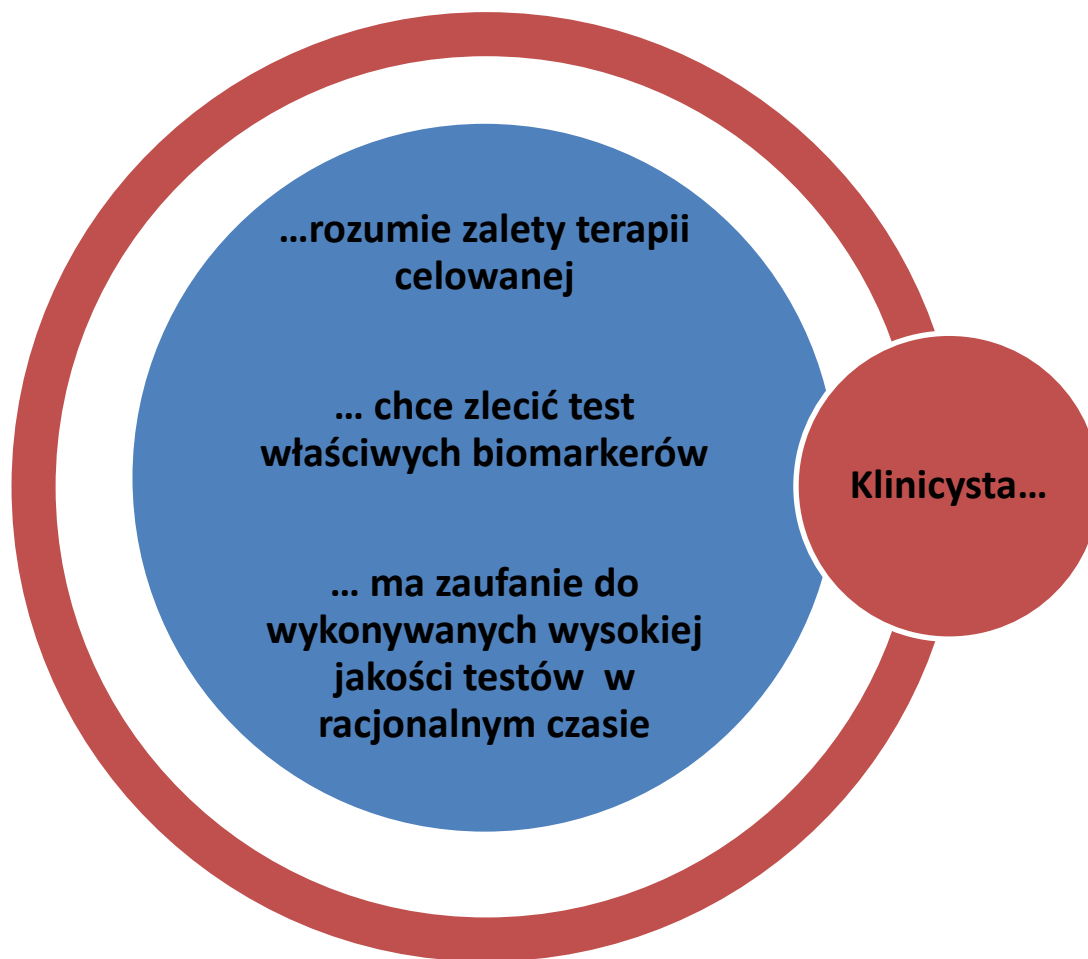
- Świętokrzyski Rejestr Nowotworów prowadzony od 1987 roku – daje podstawy do dalszego rozwoju ŚCO
- Dane z rejestru publikowane są od 1995 roku przez International Agency for Research on Cancer (IARC)- WHO



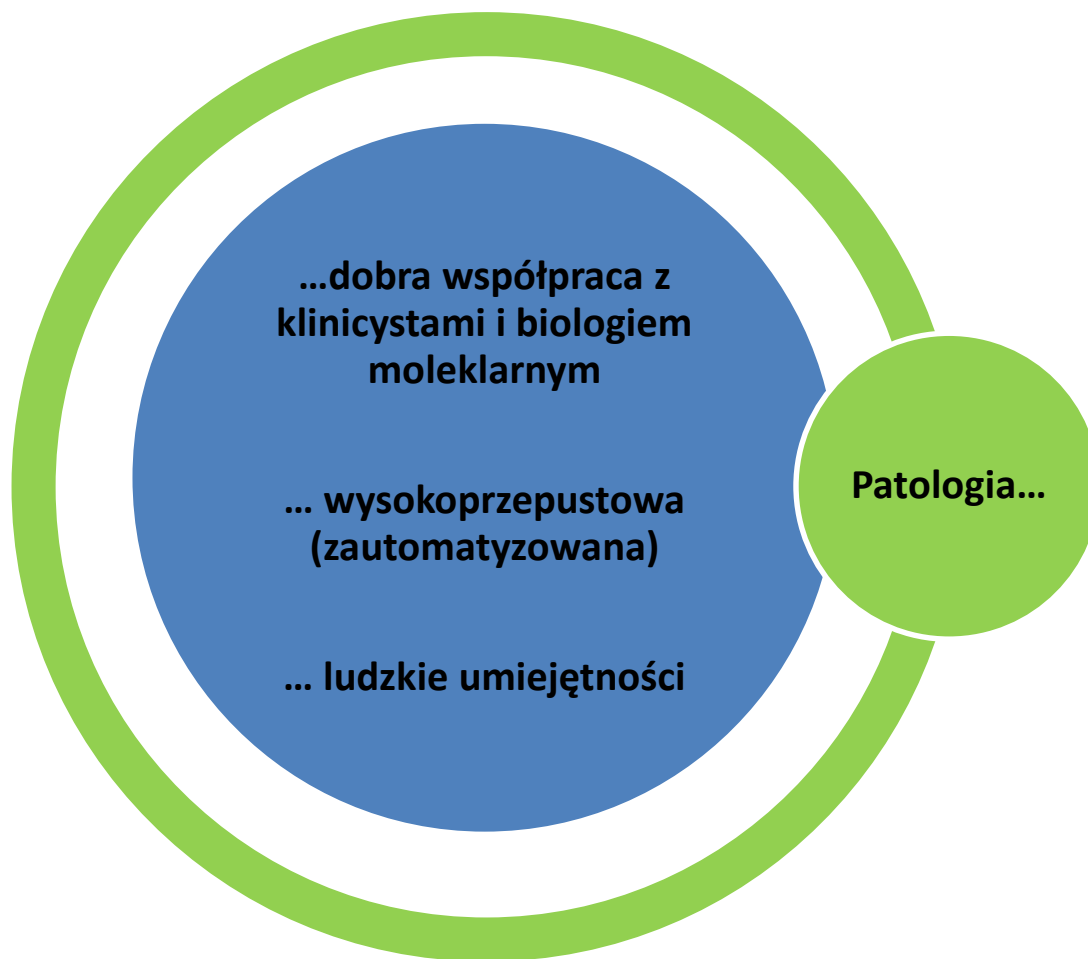
Medycyna Personalizowana w Świętokrzyskim Centrum Onkologii



Medycyna Personalizowana w Świętokrzyskim Centrum Onkologii



Medycyna Personalizowana w Świętokrzyskim Centrum Onkologii



Medycyna Personalizowana w Świętokrzyskim Centrum Onkologii





Zakład Diagnostyki Molekularnej Świętokrzyskiego Centrum Onkologii

MEDYCYNĄ PERSONALIZOWANĄ

Inwestycja w nowoczesne technologie dla ludzi, którzy wiedzą jak ich użyć!

Predyspozycje do rozwoju choroby nowotworowej . BRCA1/2, CHEK2, CDKN2A....

Stratyfikacja pacjentów do terapii celowanych

RJG - KRAS, NRAS

Rak Płuca - EGFR

Czerniak - BRAF

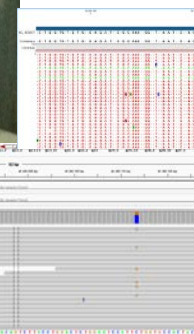
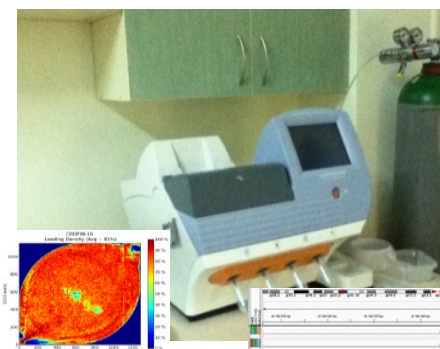
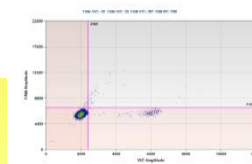
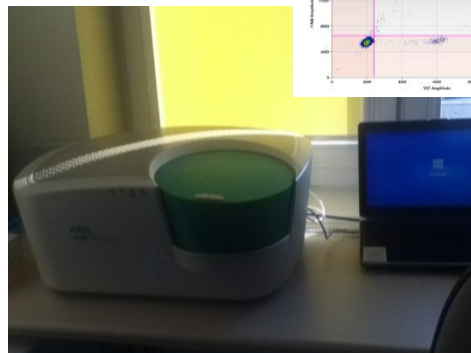
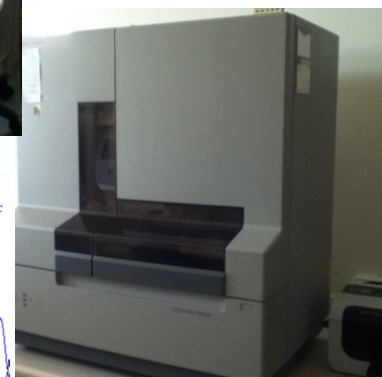
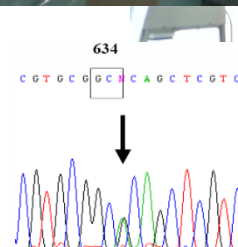
GIST- KIT i PDGFRA

• **Monitorowanie skuteczności leczenia TKI w**

CML:

SPRZĘT

- PGM Ion Torrent
- 4-capillary 3130 Genetic Analyzer ABI
- QX100 Droplet Digital PCR system
- RotorGene Real-Time PCR machine
- PCR machines

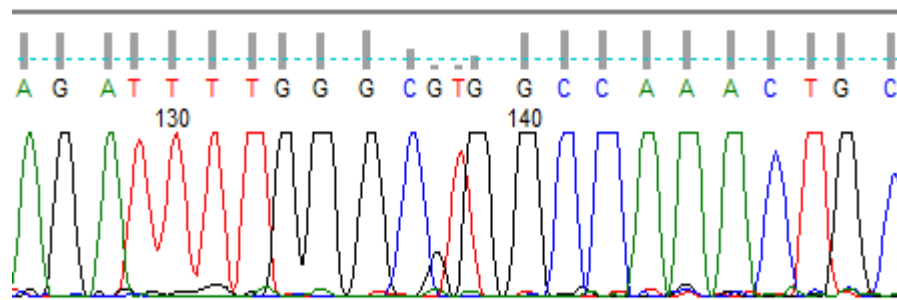




Przykłady wykrytych mutacji w raku płuca, jelita grubego, czerniaku

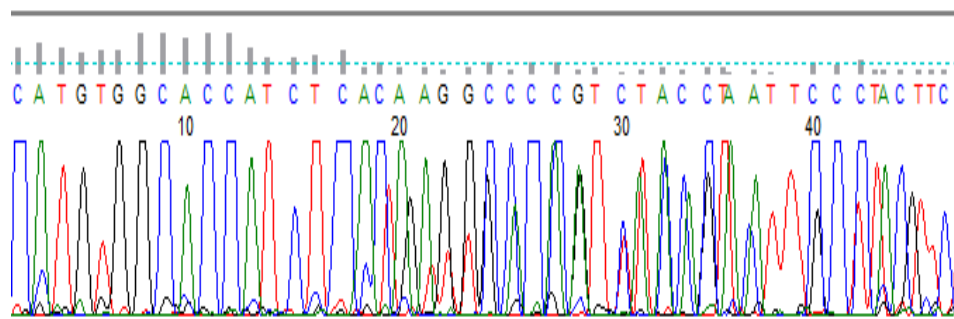
SEKWENCJONOWANIE

ekson 21

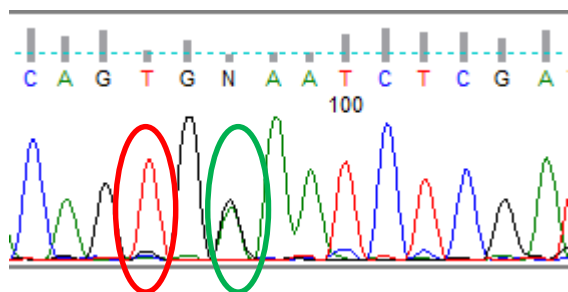


p.L858R (T2573G)

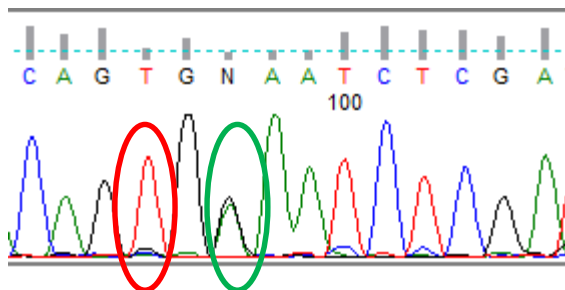
Ekson 19



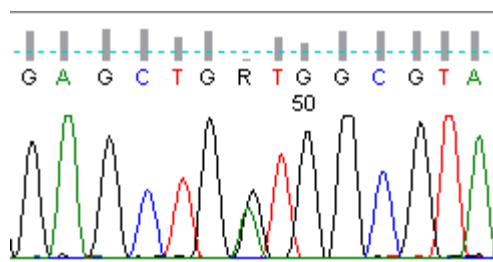
p.L747_T751delLREAT



p.V601E (c.1801A>G)



p.V601E (c.1801A>G)



KRAS exon 2 c.35G>A, p.G12D

Medycyna Personalizowana w Świętokrzyskim Centrum Onkologii

Inwestycja w nowoczesne technologie
Next generation Sequencing – siła analizy wielkoskalowej

NGS umożliwia analizę całych genów, genomów szybko i dokładnie.

Wiele próbek od wielu pacjentów zsekwencjonowanych w tym samym czasie.

Duża czułość i specyficzność.

Pozwala na testowanie mutacji germinalnych (dziedzicznych) i somatycznych (nie dziedzicznych).

Pozwala na konstrukcję paneli genowych np. PŁUCO gdzie bada się geny związane z tym nowotworem (jeden test, wielu pacjentów, wiele genów)

Wysoka przepustowość = niski koszt + krótki czas
Sekwencjonowanie kapilarne– BRCA1/2 (exons) = 5000PLN
NGS – BRCA1/2 (exons) = 700 - 1000PLN

Diagnostyka
Molekuarna

...





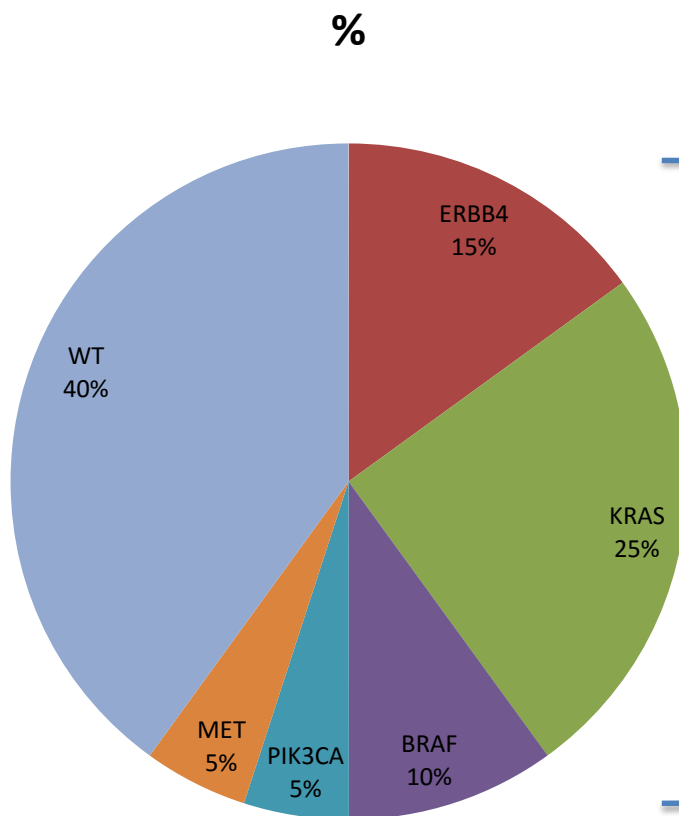
Poszukiwanie nowych możliwości terapeutycznych dla pacjentów z rakiem płuca

- Obecnie terapia rozsianego NSCLC opiera się na agresywnym leczeniu skojarzonym : chirurgia, chemioterapia i radioterapia
- Tylko około 13% pacjentów (10% mutacje w EGFR + 3% translokacja EML4-ALK) NSCLC może być leczonych terapiami celowanymi
- Reszta nie ma szans na leczenie terapią celowaną

Trzeba poszukiwać nowych celów dla terapii celowanych w raku płuca



Mutacje wykryte u pacjentów NSCLC (EGFR WT and EML4-ALK (-)) za pomocą NGS



potencjale
inhibitory
dostępne a
niektóre są
obecnie w
badaniach
klinicznych



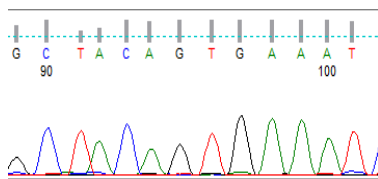
Przypadek raka tarczycy

Młoda dziewczyna 19 lat z rozpoznaniem podejrzenia raka tarczycy z BAC. *Problem czy potrzebny jest zabieg usunięcia tarczycy? Wykonaliśmy sekwencjonowanie kapilarne BRAF i KRAS, ale nie znaleźliśmy mutacji. Więc wykonaliśmy analizę 50 onkogenów oraz supresorów za pomocą NGS i znaleźliśmy:*

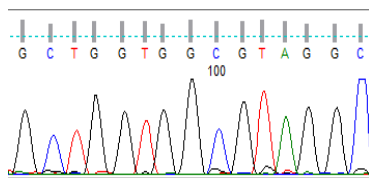
NRAS p.Q61R (CAA> CGA)

TP53 p.Leu265Arg (CTG>CGG, c.182A>G)

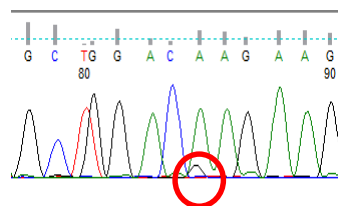
I zdecydowano o usunięciu tarczycy.



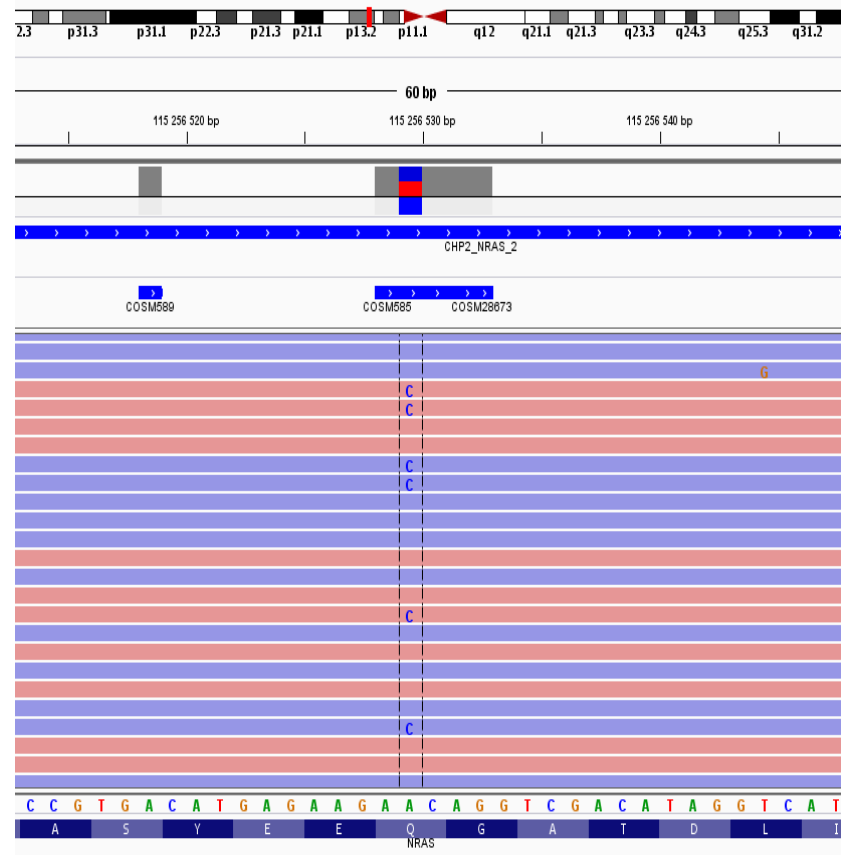
BRAF ek15 wt



KRAS ek 2 wt



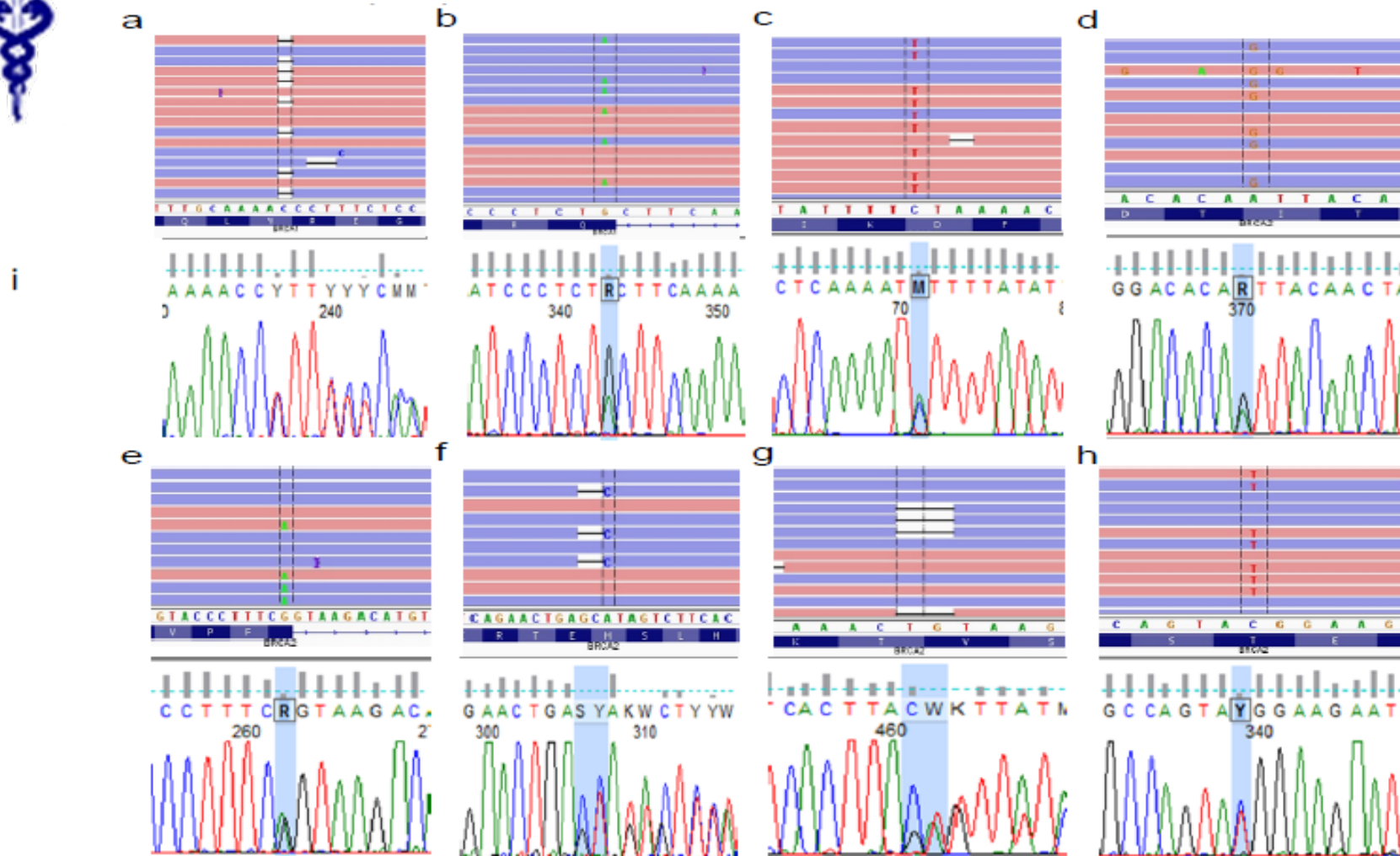
NRAS
p.Q61R





PREDYSPOZYCJE DO ROZWOJU CHOROÓB NOWOTWOROWYCH

Przykłady diagnostyki mutacji BRCA1&2 metoda NGS



Rycina 2. Przykłady wykrytych mutacji, polimorfizmów i VUS za pomocą NGS i potwierdzone sekwencjonowaniem kapilarnym: BRCA1: a) p.V757Rfs*8; b) p.Q1349*; BRCA2: c) p.D1420Y, d) p.I3412V, e) p.R2336H, f) p.N2089Hfs*2, g) p.V1283Kfs*2, h) p.T3401M.

Źródło: Zakład Diagnostyki Molekularnej ŚCO, Kielec



Wyniki NGS (BRCA1/2) z tkanki raka jajnika - przykłady

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
1	Sample	Gene ID	Position	AA Change	TS VCF	CLC	galaxy					
2	1											
3	290	BRCA2	c.G8489A	p.W2830X	+			3,50%				
4	2											
5	463	BRCA2	c.2830dupA	I943fs	+			2,90% w obrębie homopolimeru AAAAAA				
6		BRCA2	c.G4441A	A1481T	+			6.2% With Uncertain significance allele				
7	3											
8	511	BRCA2		E297K	+			3.1% a nie opisywana				
9	4											
10	521	BRCA2	c.C9443T	p.A3148V	+	+	+	36% With Uncertain significance allele				
11		BRCA2	c.C938T	p.S313F	+			3,2 With Uncertain significance allele				
12	5											
13	556											
14		BRCA1	1612_1616	p.Q538fs	+	+		60%				
15		BRCA2	c.A8655T	L2885F	+			15%				
16	12											
17	2005											
18		BRCA2	c.5946delT	p.S1982fs	+	+						
19	17											
20	2433											
21		BRCA1	41258504	p.C61G		+						
22	18											
23	2438											
24		BRCA2	6403_6407	p.N2135fs	+	+						

Medycyna Personalizowana w Świętokrzyskim Centrum Onkologii



Problemy

Nie ma obecnie prostego oraz jasnego systemu na adekwatny zwrot kosztów wykonania testów genetycznych.

Rozwiązania, które powinno się wprowadzić na poziomie kraju:

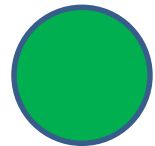
- poprawić finansowanie
- zwiększyć dostępność
- skrócić czas realizacji
- podwyższyć jakość oraz kontrolę wykonywanych testów



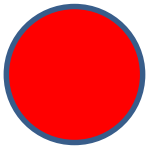


Problemy

Klonalność tkanki nowotworowej (mutacja nie jest obecna we wszystkich komórkach nowotworowych) – potrzeba czulszych metod



Komórka prawidłowa



Komórka czerniaka
bez mutacji w *BRAF*



Komórki czerniaka z
mutacją w *BRAF*

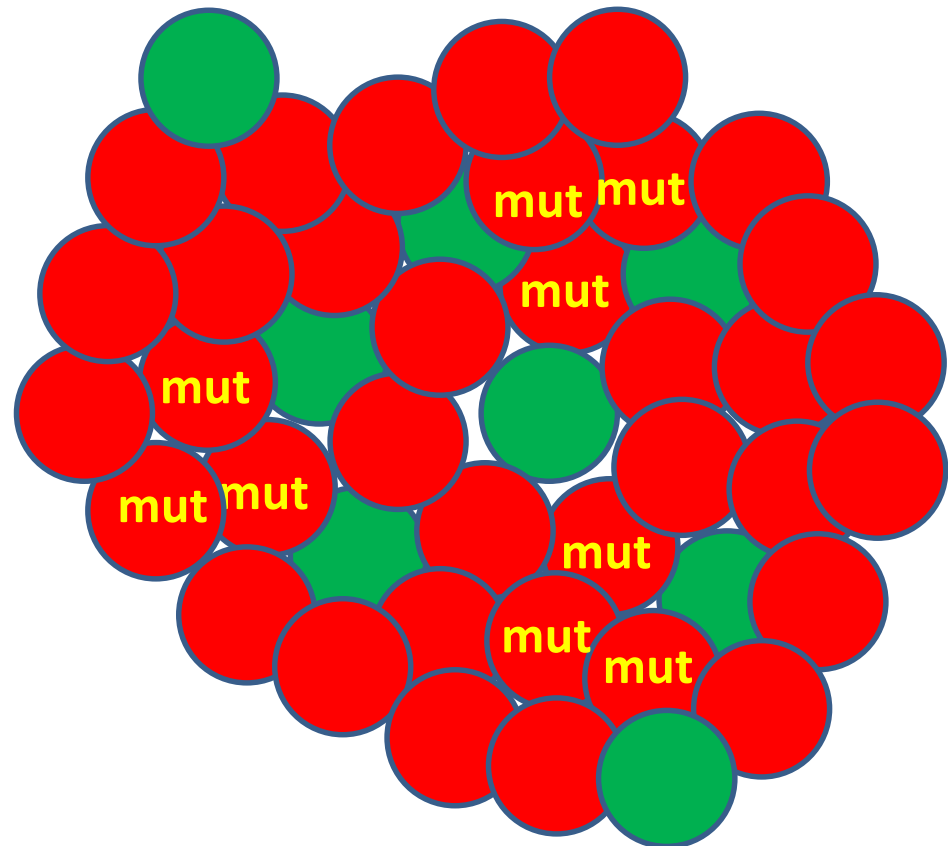




Fig 2. A 38-year-old man with *BRAF*-mutant melanoma and miliary, subcutaneous metastatic deposits. Photographs were taken (A) before initiation of PLX4032, (B) after 15 weeks of therapy with PLX4032, and (C) after relapse, after 23 weeks of therapy.

Wagle N1, et al. Dissecting therapeutic resistance to RAF inhibition in melanoma by tumor genomic profiling. *J Clin Oncol.* 2011 Aug 1;29(22):3085-96.



Mutation for validation using qPCR, dPCR, SangerSeq - example

Sample	Gene ID	Position	AA Change	Frequency %	TS VCF	CLC	GALAXY
761							
	KDR	55946123 G>T	S1352R	35.2	+	+	+
	APC	112175225 G>T	p.G1312*	62.7	+	+	+
	TP53*	7577509 C>T	p.E126K	39.1	+		+
2036							
	PIK3CA	178927410 A>G	p.I391M	35.3	+	+	+
	TP53**	7577058 C>A	p.E162*		+	+	+
					+	+	+
2362							
	PIK3CA	178936091 G>A	p.E545K	29.5	+	+	+
	MET	116340262 A>G	p.N375S	44.9	+	+	+
	BRAF	140453136 A>T	p.V600E	19.6	+	+	+
4066							
	KIT	55599323 A>G	p.I817V	17.7	+	+	+
	FBXW7*						
	**	153249384 C>T	p.R347H	17.0	+	+	+
	BRAF	140453136 A>T	p.V600E	31.7	+	+	+
	TP53	7577068 delCG			+	+	
4069							
	KIT	55593464 A>C	p.M541L	52.8	+	+	+
	TP53	7578455 C>T	A159T	32.8	+	+	



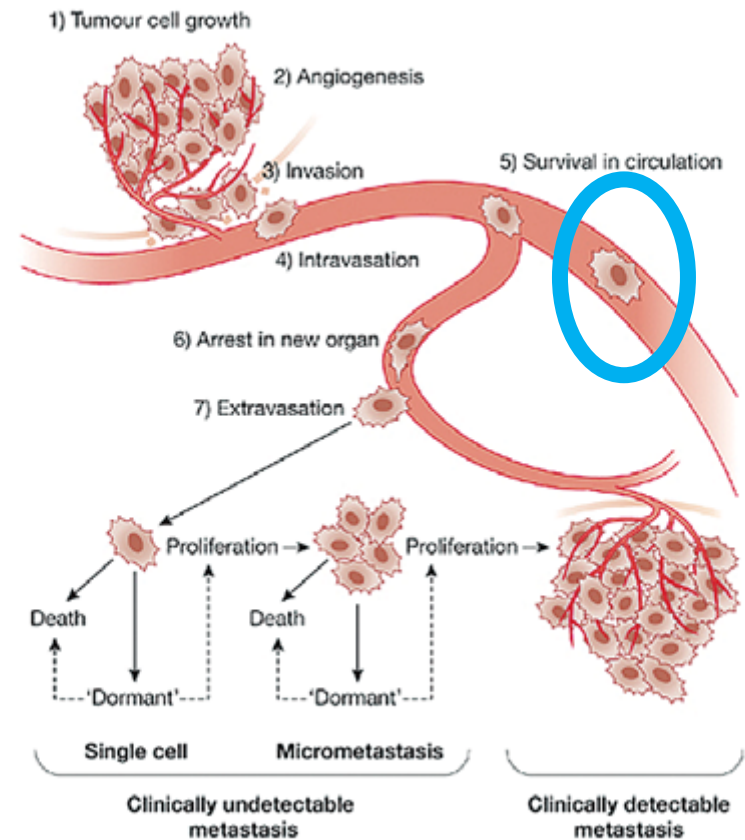
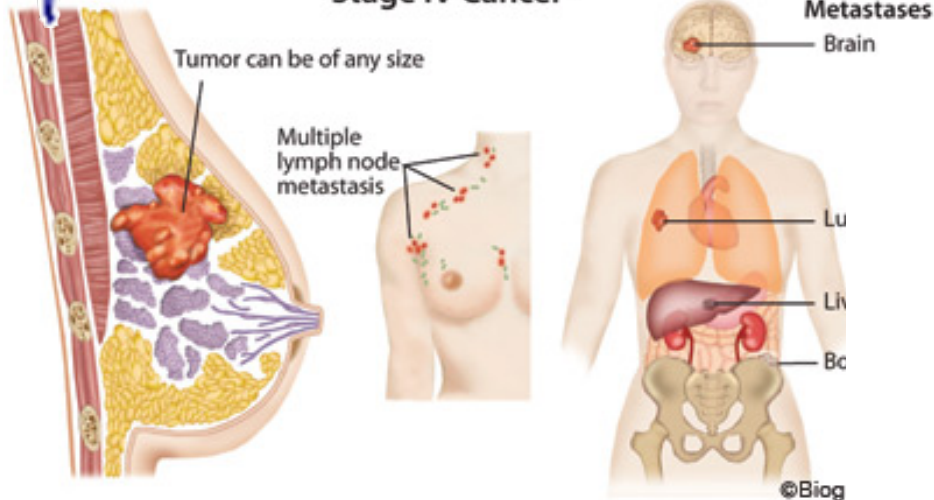
Problemy – ograniczenia obecnie stosowanych metod w diagnostyce nowotworów

- Obecnie diagnostykę nowotworu przeprowadza się za pomocą metod inwazyjnych
- Materiał diagnostyczny uzyskuje się za pomocą bolesnych biopsji oraz operacji
- Nierzadko zdarza się, że ilość materiału uzyskana za ww. metod nie wystarcza do wykonania pełnej diagnostyki. W tych sytuacjach konieczne jest powtórne wykonanie bolesnej procedury.
- Dodatkowo obecnie wykorzystywane radiologiczne metody są nie precyzyjne i drogie.
- **WNIOSEK: obecnie stosowane metody nie nadają się do regularnego i precyzyjnego monitorowania skuteczności leczenia.**



Przerzut nowotworu– znaczenie krążących komórek nowotworowych (CTC)

Stage IV Cancer



- Lokalna inwazja
- Intrawazacja
- CTC
- Extrawazacja
- Namanżanie w miejscu przerzutu



Po co oceniać CTC u pacjenta

- Wczesny nawrót choroby nowotworowej może być wykryty nawet 3-6 miesięcy przed możliwą oceną radiologiczną
 - Genotypować CTC dla przewidzenia odpowiedzi na leczenie
- = „biopsja płynów” → personalizacja leczenia



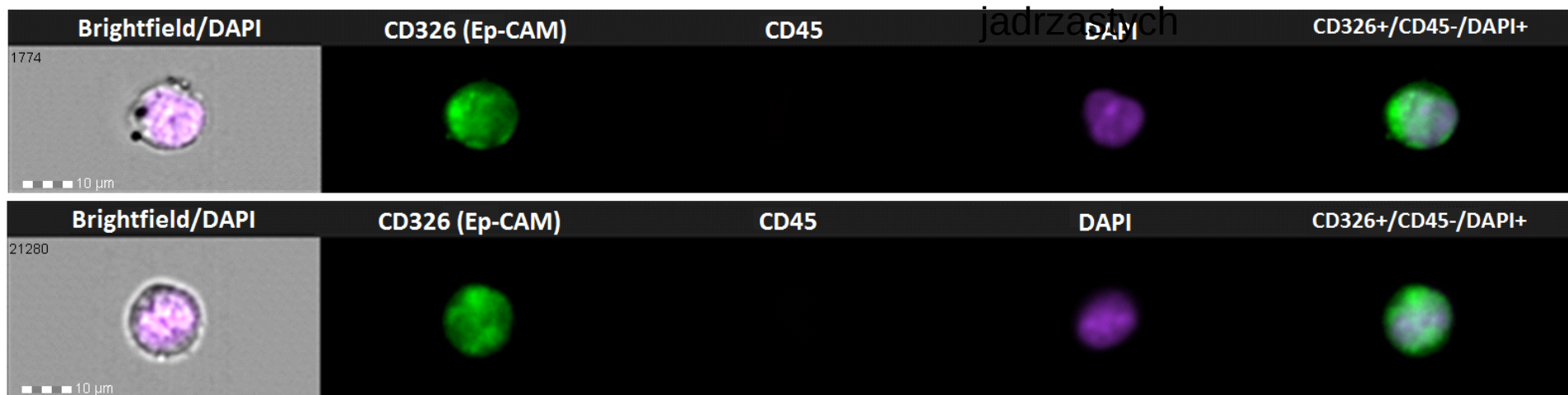
Doświadczenia ŚCO

Przykład zastosowania immunofluorescencji do badania CTC wykrytych za pomocą fotocytometru Image Stream Mark II we krwi pacjentek leczonych z powodu raka jajnika przed zabiegiem operacyjnym

CTC - 124 CTC/G

2 szt na 125 000 kom

jadrzastych



CTC - 125 CTC/G

1 szt na 125 000 kom

jadrzastych



CD45- marker leukocytów, DAPI- barwi jądro komórkowe, CD326 (Ep-CAM)- marker nabłonkowy



W poszukiwaniu rozwiązania problemu wzbogacania CTC nawiązaliśmy współpracę z WAT

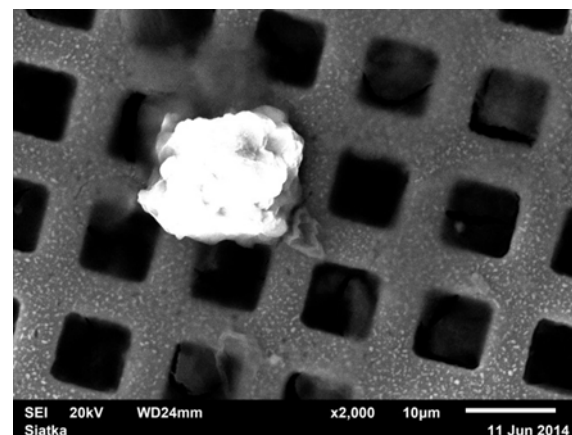
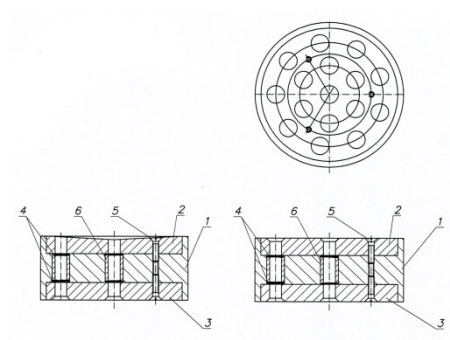
Sito zespolone



+



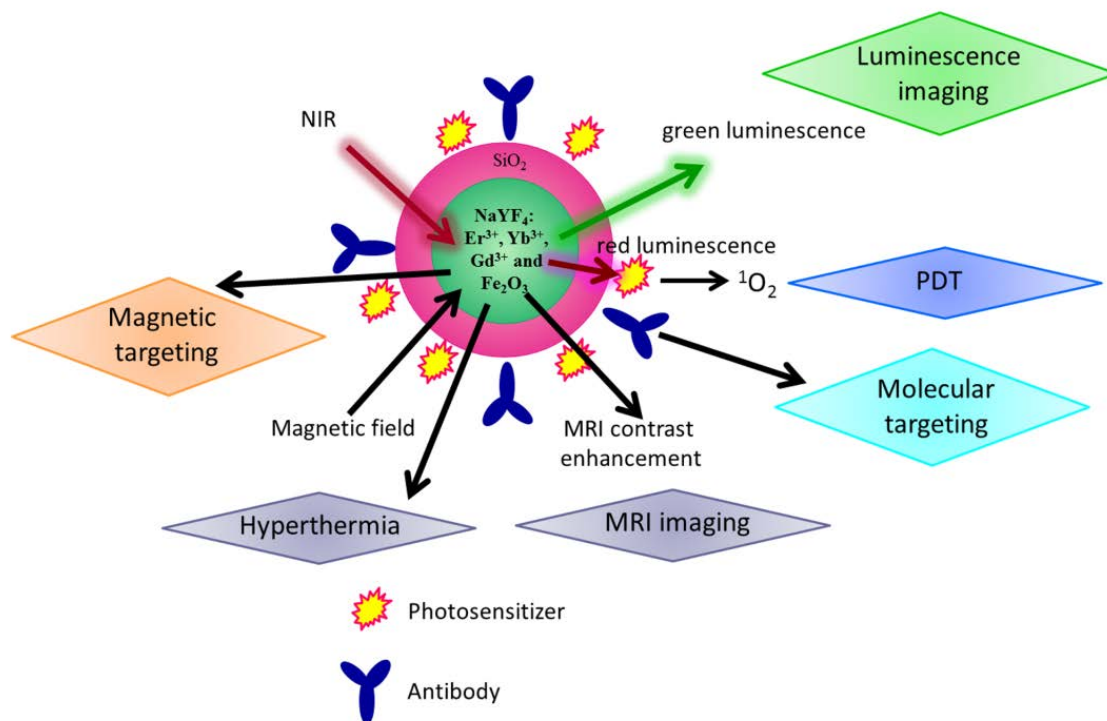
=





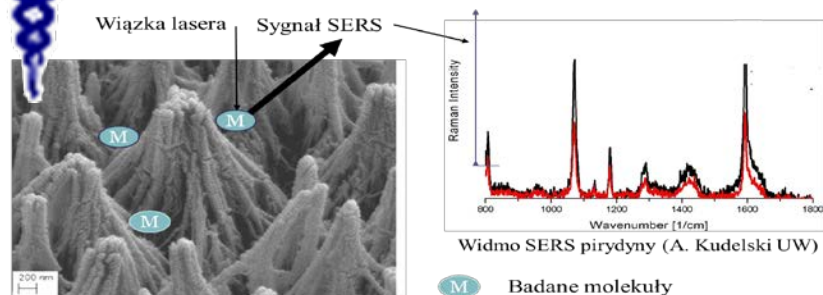
Nanocząstki- współpraca z zespołem Prof. Elbauma z Instytutu Fizyki PAS

- Nanocząstki mają właściwości fluorescencyjne i fotouczulacza tlenu singletowego (1O_2) w bliskiej podczerwieni (NIR) oraz para i superparamagnetyczne właściwości.
- Zastosowanie nanocząstek: za pomocą zewnętrznego źródła pola magnetycznego można je kumulować w danym miejscu, wzmocniony kontrast w magnetycznym rezonansie, niszczenie tkanki nowotworowej za pomocą miejscowego nagrzewania wywołanego zmiennym polem magnetycznym (hypertermia).



Źródło Dr Bożenia Sikora IP PAS Warsaw

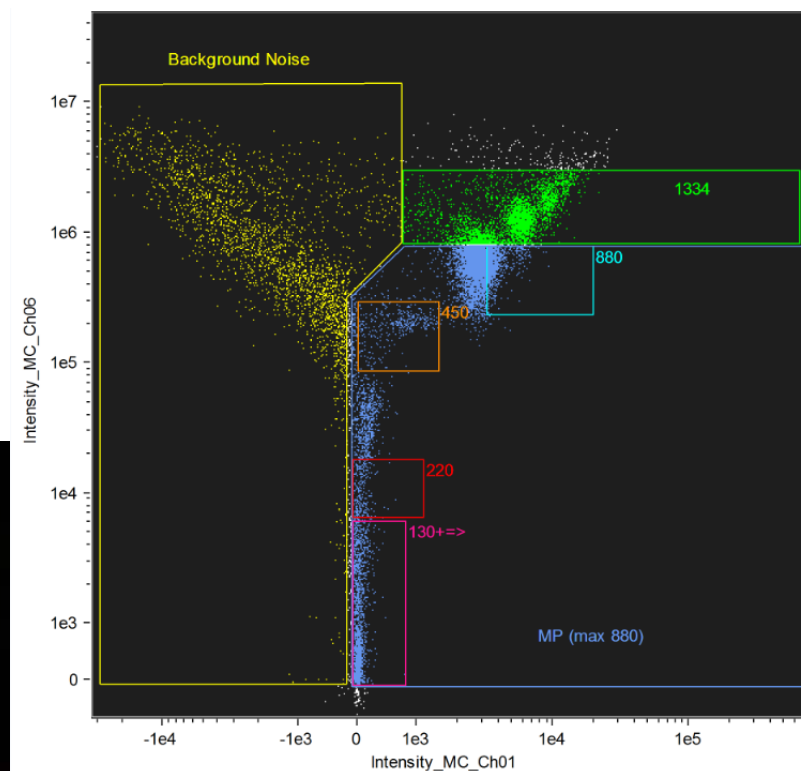
Instytut Wysokich Ciśnień PAN (*UNIPRESS*) w Warszawie



Obraz SEM foto-trawionej powierzchni GaN:
platforma SERS wykonana w IWC-PAN

Ryc. Schemat budowy i działania platform SERS Powierzchniowo wzmocniona spektroskopia ramanowska do wykrywania mutacji w DNA (dzięki uprzejmości Prof. dr hab. Jan Weyher IWC-PAN).

Nanocząstki (ZrO₂) do wykrywania, znakowania i niszczenia komórek nowotworowych (Profesor Łojkowski oraz Dr Świderska Środa)



Applications of liquid biopsy

Early detection and monitoring

Brain tumor DNA blocked by blood-brain barrier

cancer

Pancreatic cancer

Colon cancer

Many tumors release DNA fragments that circulate in the bloodstream

Analysis of ctDNA

Detection of resistance mutations

Targeted therapy

Response to therapy

Selective pressure

Resistance mutation #1

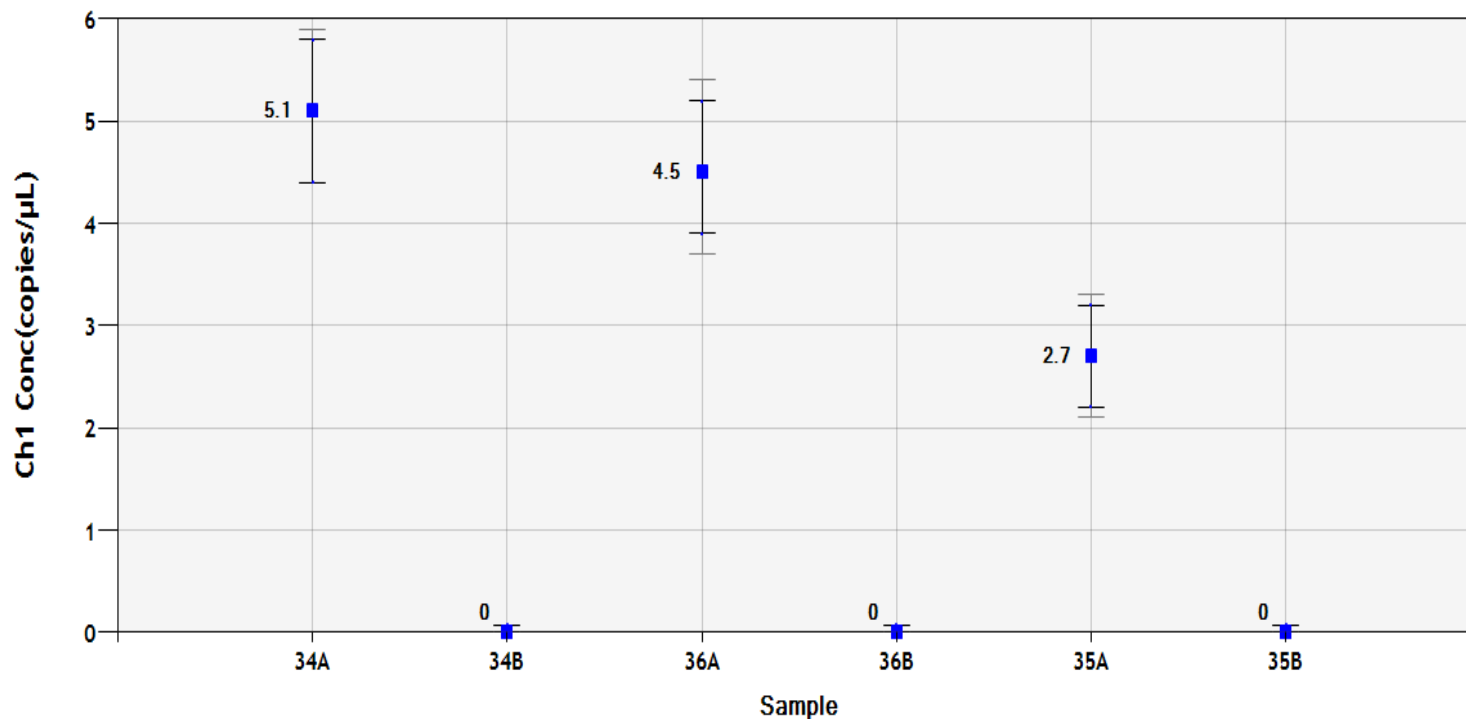
Resistance mutation #2

ctDNA of resistance mutations collected in blood sample





Biopsja płynów – przykład dPCR oceniający ilość kopii zmutowanego ctDNA *BRAF* V600E w osoczu pacjentów z czerniakiem.



Próbki osocza pobrano od trzech pacjentów (34, 35 i 36) chorych na rozsianego czerniaka przed rozpoczęciem leczenia (A) i po 6 tygodniach leczenia Vemurafenibem (drobnochąsteczkowy inhibitor zmutowanego białka *BRAF* V600E). Wykres przedstawia liczbę kopii ctDNA z mutacją *BRAF* V600E w jednym μ l osocza pobranego od pacjenta (mgr Małgorzata Chłopek, Zakład Diagnostyki Molekularnej ŚCO Kielce).



Biobank Świętokrzyski

jako inwestycja w zdrowie i podstawa przyszłych profilaktycznych i naukowych programów

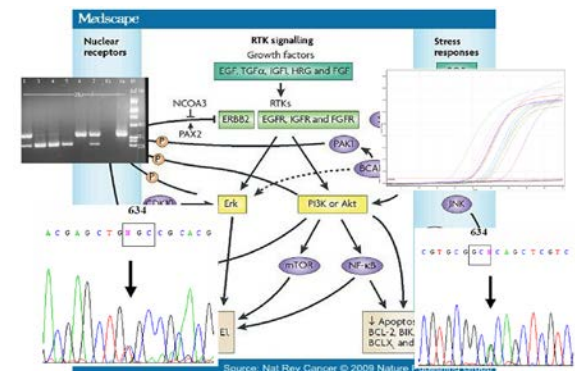
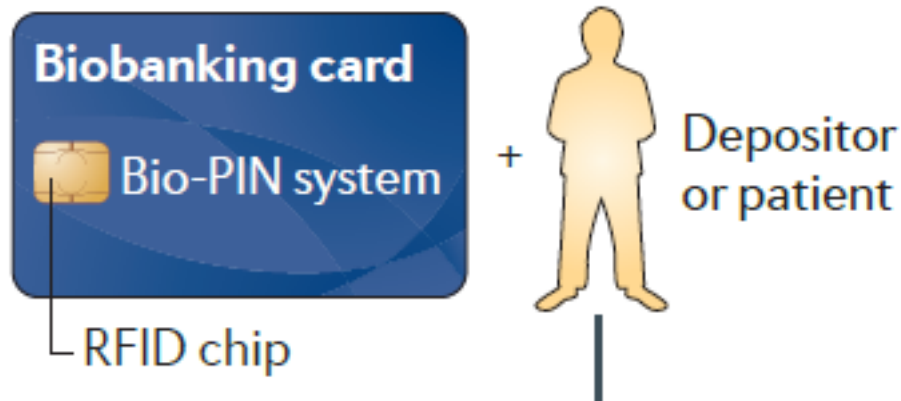
- Pojemność: 1 mln fiolek w -80C
- 155,000 próbek nowotworowych (tkanka, krew, DNA).



Przyszłość Biobanku ŚCO: elektroniczny osobisty rekord – koncept Bio-PINu

Biobankowanie jako inwestycja społeczeństwa w zdrowie

Biobank



Cykl wzbogacania rekordu
pacjenta w dane kliniczne

SCIENCE AND SOCIETY

The Bio-PIN: a concept to
improve biobanking

J. J. Nietfeld, Jeremy Sugarman and Jan-Eric Litton

Badania diagnostyczne i naukowe

Przyszłe kierunki na rozwój ŚCO

**Świętokrzyskie Centrum Zaawansowanych
Technologii Molekularnych i Immunoterapii
Adoptywnej jako część Świętokrzyskiego
Centrum Onkologii.**

Miejsce gdzie badania podstawowe łączy się z
praktyką kliniczną dla poprawy skuteczności
leczenia pacjentów.



Mierzalne efekty działalności ŚCO na polu prewencji i leczenia nowotworów.

- Prowadzone systematycznie badania epidemiologiczne jasno wskazują, że przed rozpoczęciem pełnoprofilowej działalności przez Świętokrzyskie Centrum Onkologii, częstość przeżycia była **34% (przed 1995), podczas gdy obecnie jest na poziomie 60%.**



Dziękuję za uwagę

Comp_1

8092



7 μm