

FOLYÉKONY BIOPSZIA A KLINIKAI ONKOLÓGIÁBAN – A PRECÍZIÓS ORVOSLÁS VONALVEZETŐJE

Liquid biopsy in clinical oncology – fine-tuning precision medicine

Priskin Katalin^{1,4}, Pintér Lajos^{1,4}, Jaksa Gábor¹, Pólya Sára¹, Kahán Zsuzsa², Sükösd Farkas³, Haracska Lajos^{1,4}

¹Delta Bio 2000 Kft., Szeged

²Szegedi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar, Onkoterápiás Klinika, Szeged

³Szegedi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar, Patológiai Intézet, Szeged

⁴Magyar Tudományos Akadémia, Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Genetikai Intézet, Szeged

ÖSSZEFOGLALÓ – A tumorok genetikai jellemzésének klasszikus módja a szöveti biopszia, amelynek során kis mennyiségű minta kerül kivételre az érintett szervből. Ez képviseli a tumort a további vizsgálatok során. A mintavétel lokalizáltsága azonban korlátozza a reprezentatív jellemzést. Egyszerű mintavétellel a vérplazmából izolált, úgynevezett keringő tumor-DNS potenciálisan minden, markerként azonosítható genetikai eltérést hordozó daganatszövet onkológiai vizsgálatára alkalmas lehet. Ahhoz, hogy a benne rejlő lehetőségeket minél hatékonyabban kiaknázhassuk, sajátos tulajdonságaihoz kell igazítani a vizsgálati eszközöket. A minta preanalitikai feldolgozása és tárolása jelentősen befolyásolja a további felhasználhatóságot. Ahhoz, hogy a jelentős többségben lévő vad típusú háttér mellett az esetlegesen jelen lévő mutáció kimutatható legyen, új, specifikus módszerek kidolgozására van szükség, amelyek jelentős többsége az új generációs DNS-szekvenálási technikákra épül. Az elmúlt évtizedben ezen eljárások költségének határozott csökkenése lehetővé tette, hogy óriási mennyiségű genetikai információ halmozódjon fel a tumorigenezissel kapcsolatban. A szekvenálási technológiák fejlődése következtében a vizsgálatok átfutási ideje is csökkent, így lehetővé vált a kutatás mellett a rutinellátásba való átvétele. Kutatásainkból kiindulóan ez három megközelítésen keresztül valósulhat meg: technológiai fejlesztéssel, a már birtokunkban lévő diagnosztikai módszerek folyékony biopsziába való átültetésével, valamint jól tervezett, betegségspecifikus génpanelek létrehozásával. A nemzetközi trendek és eddigi, folyékony biopszián alapuló tapasztalataink alapján is úgy gondoljuk, hogy a közeljövőben ez a módszer az onkológiai szűrések és a precíziós onkológia egyik meghatározó pillérévé válhat.

Kulcsszavak: folyékony biopszia, ctDNS, tumorheterogenitás, NGS, célzott kezelés

SUMMARY – The classical method of genetically characterising a tumour requires tissue biopsy with which a small sample is removed from the affected organ. This sample represents the tumour in the further analyses. However, the localised nature of sample collection limits representative characterisation. The so-called circulating tumour DNA, isolated from blood plasma after a simple sample collection, potentially enables the oncological analysis of all tumour tissues carrying genetic alterations that can be identified as markers. In order to maximally exploit the potentials of circulating tumour DNA, we must adjust the analytical tools to its specific features. The preanalytical handling and storage of the sample significantly influences its further usability. In order to be able to detect a potential mutation in a mostly wild-type background, the development of new, specific methods is needed, most of which are based on next-generation sequencing techniques. In the past decades, the pronounced decrease in the costs of such techniques led to an accumulation of an immense amount of genetic information on tumorigenesis. Due to the development of sequencing technologies, the turnaround times of tests also decreased enabling their employment in routine care besides research. Starting from our research, this can be realised via three approaches: technological development, the implementation of our already existing diagnostic methods in liquid biopsy, and the construction of well-planned disease-specific gene panels. Based on international trends and our experience in serum diagnostics, we are certain that liquid biopsy will become a central pillar of oncological screening and precision oncology in the near future.

Keywords: liquid biopsy, ctDNA, tumor heterogeneity, NGS, targeted therapy

Levelezési cím:

Dr. Haracska Lajos,

Szegedi Biológiai Központ és Delta Bio 2000 Kft. 6726 Szeged, Temesvári krt. 62.

E-mail: haracska.lajos@szbk.mta.hu

A laboratóriumi diagnosztika fejlődésével a beteglátás kritikus döntéseit egyre nagyobb arányban befolyásolják az *in vitro* diagnosztikai eredmények. Mind a beteg, mind az ellátó szerv közös érdeke, hogy minél precízebb, minél célzottabb, ugyanakkor minél átfogóbb diagnosztikai vizsgálat határozza meg a kezelés menetét. Emellett az is elsődleges fontosságú, hogy a vizsgálat egészségügyi kockázata lehetővé tegye annak több alkalommal történő elvégzését a betegség monitorozása céljából.

Az utóbbi években a nemzetközi porondon egy jelentős új „játékos” jelent meg az *in vitro* diagnosztika körében, a folyékony biopszia, amelynek éves növekedési üteme kimagasló emelkedést mutat, és amely tovább fokozódik az elkövetkező négy évre vonatkozó becslések szerint. Az elnevezés a testfolyadékából, elsődlegesen a vérből történő mintavételi eljárásra utal, amely lehetővé teszi a szomatikus genetikai elváltozások detektálását perifériás vérből, vizeletből, nyálból és egyéb testfolyadékból. A testi sejtek örökítőanyagát érintő változások mellett – amelyek a tumorigenezis mozgatórugói – a fenti módszer a magzat genetikai rendellenességeinek kimutatására is alkalmas.

A tumorigenezis hátterében minden esetben valamilyen, az örökítőanyagban bekövetkezett eltérés áll. A tumor molekuláris genetikai szintű jellemzése lehetőséget ad az objektív diagnózisra, a lehetséges terápiás célpontok azonosítására, valamint a viszonylagosan hosszabb távú prognózisra. Ehhez azonosítani kell a patológiás elváltozáshoz köthető genetikai markereket. Az elmúlt évtizedekben a nukleinsav-szekvenálási technológiák forradalmi fejlődése óriási léptékben kiszélesítette ismereteinket a tumorok genetikájáról. Az elsőként elterjedt, és máig gold standardként használt Sanger-szekvenálás még egyszerre csak egy leolvasásra képes, és a mintában előforduló nukleinsavak szekvenciájának konszenzusát mutatja meg, mára azonban az új generációs szekvenálás lehetővé tette, hogy akár egyedi moleku-

lák millióinak nukleinsavsorrendjét határozzuk meg egyidejűleg. Mivel a tumor kialakulása során újabb és újabb mutációk halmozódnak fel, amelyek térben és időben a tumorszövetben nem egyenletesen oszlanak el, rendkívül előnyös egy olyan technológia, amellyel ez a változatos DNS-mintázat egyidejűleg vizsgálható. A cél a különböző ráktípusok jellemzése, útát nyitva a precíz, korai diagnózis, a prevenció és a célzott kezelés felé.

A probléma felvetése

Egy tumor genetikai jellemzéséhez szükség van a belőle származó örökítőanyagra. Klasszikus módja a mintavételnek a szöveti biopszia, amely során lehetőség nyílik a tumormarkerek vizsgálatára, aminek azonban több tényező is határt szab:

- A mintavétel térben korlátozott, nem ad lehetőséget a teljes tumor, valamint esetleges áttéteinek vizsgálatára, vagyis mind az intratumor, mind az intertumor heterogenitásának vizsgálata és ezáltal a reprezentatív genetikai profilhoz való hozzáférés problematikus.
- Bár a szöveti mintavételi eljárások közt is vannak minimálisan invazív beavatkozások, ezek nem minden körülmény mellett használhatóak, például olyan helyeken, amelyek nem, vagy csak kockázatos beavatkozással érhetők el.
- A daganat egyes sejtjei heterogén neoplasztikus tumorklonokat hoznak létre, amelyek az idő előrehaladtával a változó környezethez folyamatosan adaptálódva újabb és újabb génhibákat halmoznak fel. Ezzel szemben a szöveti biopszia csak pillanatképet mutat a fenti folyamatról, az ismételt mintavétel azonban, amellyel ez monitorozható lenne, problematikus.
- A tumor műtéti eltávolítását követően fontos kérdés, hogy van-e a betegnek klinikai vizsgálati eszközökkel vagy képalkotó eljárással nem észlelhető tumorresiduuma, esetleg mikrometasztázisa.
- A műtét után a vérben kimutatható kellően specifikus tumormarker egyértelmű bizonyítéka a minimális reziduális betegség jelentétének, indokolja az adjuváns terápiát.

A megoldás: folyékony biopszia, cirkuláló tumor-DNS- [ctDNS-] analízis [1. táblázat].

Ezek a problémák egy olyan diagnosztikai eljárás szükségességét vetik fel, amely:

- átfogó képet ad a tumorról;
- nem jelent megterhelést sem a páciensnek, sem az ellátórendszernek;
- rövid perióduson belül többször ismételtető;
- kellően érzékeny ahhoz, hogy a jelen lévő minimális tumorresiduum kimutatására alkalmas legyen.

A tumorokból származó örökítőanyag a vérben többféle módon jelenhet meg: 1. vagy maga a tumorsejt jut be; 2. a tumorsejtek apoptózisa következtében azok RNS-e vagy DNS-e kerül be a membránnal körülvett

Legfontosabb megállapítások

- A cirkuláló tumor-DNS (ctDNS) potenciálisan minden, markerként azonosítható genetikai eltérést hordozó daganatszövet onkológiai vizsgálatára alkalmas lehet.
- Ahhoz, hogy a jelentős többségben lévő vad típusú háttér mellett az esetlegesen jelen lévő mutáció kimutatható legyen, új, specifikus módszerek kidolgozására van szükség, amelyek jelentős többsége az új generációs DNS-szekvenálási technikákra épül.
- A nemzetközi trendek és eddigi kutatási tapasztalataink alapján is úgy gondoljuk, hogy a közeljövőben a folyékony biopszia az onkológiai szűrések és a precíziós onkológia egyik meghatározó pillérévé válhat.

vesiculumokba, az úgynevezett exoszómákba; 3. a tumorsejtek apoptózisa, illetve nekrozisa következtében szabadon cirkuláló DNS formájában jelenik meg.

Maguk a tumorsejtek az érfalon átjutva már korai stádiumban bejutnak a véráramba. A cirkuláló tumorsejtek (circulating tumor cell – CTC) rutinszerű diagnosztikai alkalmazását azonban nem támogatja az a tény, hogy rendkívül csekély számban fordulnak elő, 10⁹ egészséges vérséjtre jut egy tumorsejt (1). További lehetőség az élő tumorsejtek által szekretált exoszómák vizsgálata, amelyek RNS-t és DNS-t, úgynevezett exoNA-t (exo nucleic acid) tartalmaznak. A rákos sejtek igen nagy számban termelik ezeket a membránnal körülvett partikulumokat (2). A tumorér edetű exoszómák, illetve a bennük lévő DNS-ek, mRNS-ek, mikro-RNS-ek és egyéb nem kódoló RNS-ek, fehérjék és lipidek befolyással vannak a velük kontaktusban lévő szövetekre, és bizonyítottan összefüggésben vannak a metasztatikus képességgel, valamint információt nyújtanak a relapsus esélyéről (3). E biztató adatok ellenére rengeteg metodikai és interpretációs kérdés van, és komoly kihívást jelent a tumorsejtekből származó exoszómák specifikus elkülönítése és diagnosztikus célra is megfelelő mennyiségű tisztítása. Kijelenthető tehát, hogy a CTC és az exoszómák diagnosztikai célú felhasználásának jelenleg számos, elsősorban érzékenységi akadály van.

A tumorszövet genetikai jellemzésének technikailag viszonylag egyszerű megközelítése a vérplazmában szabadon cirkuláló DNS vizsgálata, amely a tumorsejtek apoptózisa, illetve nekrozisa során kerül a véráramba. Fiziológiás körülmények között a szabad DNS (cell-free DNA – cfDNA) mennyisége a vérplazmában igen alacsony szinten fordul elő (3,6–5,0 ng/ml), a folyamatos keletkezés mellett eltávolításáról a vérben a DNázI exonukleáz enzim, továbbá a máj és a vese gondoskodik. E folyamatok eredményeképp a szabad DNS-nek összességében nem több, mint 30 perc a fél életideje (4).

Abban az esetben, ha tumor jelenik meg a szervezetben, a plazmában található DNS mennyisége és összetétele megváltozik. A szabad DNS mennyisége önmagában nem bír diagnosztikus jelentőséggel, mivel a tumorokon kívül egyéb elváltozások során is emelkedett szintet mutat, mint például az elhízás vagy egyéb patológiás állapotok. A keringő tumor-DNS-mennyiséget tekintve, a daganatstádiumtól függően, koncentrációja az 5–1500 ng/ml tartományban mozog. Változatosságának oka lehet egyrészt a tumorszövetből származó DNS feleslegben való megjelenése, másrészt annak csökkent kiürülése a véráramból. A kibocsátott DNS a hozzá asszociált fehérjék és/vagy lipidek által bizonyos védettséget élvez (5). A cirkuláló tumor-DNS (ctDNS) további forrása lehet még a tumor méretéből adódóan a centrális szövetrészt hypoxiája miatti fokozott nekrozis, amely hosszabb fragmenteket is eredményez. A nekrozis során megjelenő ctDNS

1. táblázat. A szöveti és a folyékony biopszia összehasonlítása

	Szöveti biopszia	Folyékony biopszia
Kiindulási anyag	tumorszövet	vérplazma vagy egyéb testfolyadék
Invasivitás	jelentős	nem jelentős
Feldolgozás időtartama	2-4 hét	3 nap-2 hét
Ismételt mintavételi lehetőség	maximum kisszámú ismétlés	gyakori ismétlés lehetséges
Stádiumra vonatkozó információ	megadható	nem adható meg
Gold standard a tumorjellemzésben	igen	nem, nincsenek standard eljárások
Tumorheterogenitás kimutatása	kismértékben lehetséges	nagymértékben lehetséges

mérete > 10 000 bázispár, míg az apoptotikus méretű DNS-szakaszok mérete < 200 bázispár. Az eddigiek világossá teszik, hogy minél nagyobb a tumor, várhatóan annál több ctDNS jelenik meg a vérben.

Kimutatási módszerek

A folyékony biopsziás minta preanalitikai feldolgozása és tárolása jelentősen befolyásolja a további felhasználhatóságot, a nem megfelelő körülmények ugyanis rövid idő alatt a nukleinsavak degradációját eredményezik. Éppen ezért a vérvételt követően rövid időn belül szeparálni kell a plazmát, ellenkező esetben a fehérvérsejtek lízise következtében nagy mennyiségű vad típusú DNS keveredik a mintához, és „felhígítja” az alacsony arányban jelen lévő tumor-DNS-t. Ezért vált szükségessé a stabilizátort tartalmazó, szabad DNS vizsgálatára alkalmas vérvételi cső kifejlesztése, amely lehetővé teszi a minta átmeneti, szobahőmérsékleten történő tárolását, szállítását azáltal, hogy a csőben található specifikus puffer a vérsejtek membránját stabilizálva megelőzi a lízist.

A felhasználható technikákat jelentősen meghatározza, hogy a szabad DNS alacsony kópiaszámú, erősen fragmentált, valamint, hogy a plazmában található szabad DNS-nek korai stádiumban csupán 0,01%-a származik a tumorból. Ahhoz, hogy a jelentős többségben lévő vad típusú háttér mellett az esetlegesen jelen lévő mutáció kimutatható legyen, új, specifikus módszerek kidolgozására volt szükség, amelyek jelentős többsége az új generációs DNS-szekvenálási technikákra épül. Egy tumorban a DNS-módosulás történhet minőségi vagy mennyiségi szinten. A kisebb léptékű mutációk egyrészt lehetnek a DNS-szál hosszának csökkenésével járó deletiók, a szál növekedésével járó inszerciók, valamint a két esemény együttes jelenlétével járó indelek, másrészt lehetnek nukleotidcserét okozó

ügynevezett szubsztitúciók. Vannak továbbá olyan, akár egész kromoszómákat érintő átrendeződések, amelyek mennyiségi változást nem eredményeznek, de a strukturális változás komoly funkcionális hatást eredményezhet. Továbbá előfordulhat bizonyos genomikus régiók amplifikálódása, illetve deletiója is, amelyek eredményeként bekövetkező kópiaszám-változások érinthetnek egy vagy több exont, gént vagy akár még nagyobb régiót is.

A fenti DNS-elváltozások eltérő érzékenységgel és technikával mutathatók ki a ctDNS-ből. A kis kiterjedésű mutációk, mint a deletiók, inszerciók és szubsztitúciók esetén akár 0,01%-os kimutatási határ is elérhető. A kópiaszám-változásokat jóval nehezebb kimutatni, lévén, hogy a vad típusú és a tumor-DNS minőségileg, a töréspontokat kivéve, nem különbözik egymástól. A jelenleg elérhető eljárások – mivel a szabad DNS mennyisége nagyon alacsony – erős jelamplifikációval járnak, ami a kimutatás számtartóságát csökkenti, és ezért nem kifejezetten alkalmasak a kópiaszám-változások analizésére.

A ctDNS-vizsgálati módszerek feloszthatók a vizsgálni kívánt régió szempontjából targetált és nem targetált metodikákra. A targetált módszerek meghatározott genetikai régiókra irányulnak, és elsősorban néhány klinikailag fontos driver mutáció nagy érzékenységgel vizsgálatával a klinikai döntést támogathatják. Ezzel szemben a nem targetált módszerek genomszintű analízis során a tumorspecifikus elváltozások felderítésére szolgálnak. Ez a jóval költségesebb és több templát DNS-t igénylő megközelítés érintheti a teljes genomot, de csak az exonra is korlátozódhat. Az alacsony gyakoriságú (< 10%) mutációk kimutatása ezekkel az átfogó módszerekkel egyelőre nem lehetséges, arra csak targetált módszerek lehetnek alkalmasak. A targetált módszerek alapvetően két további csoportra bonthatók: PCR- (polymerase chain reaction, polimeráz láncreakció) alapú és NGS- (next-generation sequencing, új generációs szekvenálás) alapú metodikákra. A PCR-alapú módszerek hátránya, hogy egy reakcióban csak egy vagy néhány mutáció kimutatására alkalmasak, ezért csak az előre definiált, ügynevezett mutációs forró pontok vizsgálatára adnak lehetőséget. Előnyük, hogy érzékenységük nukleotidcsere esetén az új generációs módszerekénél nagyobb lehet, és a vizsgálati idő is csak pár óra, szemben a szekvenáláshoz szükséges több nappal. Az ide sorolható módszerek, mint a digitális droplet PCR, az allélspecifikus PCR-alapú COBAS, az ARMS és BEAMing azért is kerültek előtérbe a ctDNS vizsgálatával kapcsolatban, mert kicsi a templátigényük, akár néhány pg (picogram) DNS is elegendő a sikeres reakcióhoz. A szabad DNS jellegzetességeit és vizsgálatának lehetőségeit az **1. ábra** foglalja össze.

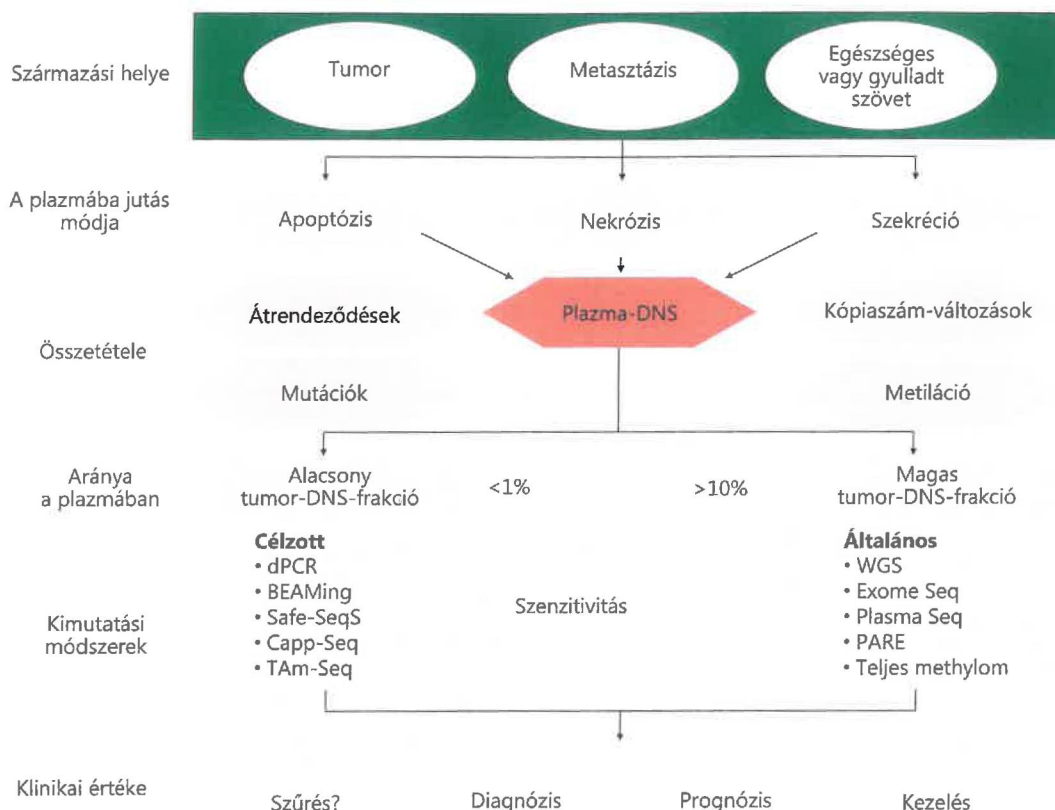
A fenti, PCR-alapú módszerekből adódó hátrányok kiküszöbölésére, vagyis a sok DNS-régió együttes vizsgálatára az új generációs szekvenálás (NGS)

megjelenésével nyílt lehetőség. Ez a technológia DNS-szekvenciák millióit képes egy időben leolvasni, ezáltal nagyságrendekkel szélesebb mutációs spektrum detektálására képes. Korábban felvetődött, hogy az NGS-alapú diagnosztika alkalmazásánál az analitikai érzékenység kényszerűen csökken azáltal, hogy az NGS-technológia belső pontatlansága 0,1-1%, amely esetenként túlszárnyalhatja a ctDNS-ben tapasztalható mutációs gyakoriságot (6). Ennek kiküszöbölésére és a pontatlanság csökkentésére különböző DNS-szekvenálási, -könyvtárkészítési technikák és bioinformatikai fejlesztések jelentek meg (7). A szekvenálási hibák okozta zaj csökkentésének hatékony módja az egyedi molekuláris azonosítók (unique molecular identifier – UMI) beépítése a DNS-könyvtárba. Az így létrehozott ügynevezett Safe-Seqs technológia alapja, hogy ezek a rövid, 8-12 nukleotid hosszúságú random szekvenciák minden egyes templát DNS-t egy egyedi kóddal látnak el a könyvtárkészítés első lépéseként. Ettől kezdve minden sokszorosítási lépés során együtt másolódnak az eredeti templáttal. A későbbi bioinformatikai analízis során, segítségükkel könnyen azonosíthatóak az egy „ősből” eredő másolatok, amelyek között *per definitionem* nem lehet különbség, ha mégis van, akkor az a másolások során keletkezett, és nem vehető valós eltérésnek. Az NGS érzékenységének növelésére irányuló további fejlesztés a Capp-Seq (cancer personalized profiling by deep sequencing, személyre szabott tumor-mélyszekvenálás), amely a szekvencia-adatbázisokat becsatolva már 0,01% érzékenységet mutat.

Hogyan válhat rutinszűréssé a folyékony biopszia?

Nincs két egyforma tumor; még ha a fenotípusuk nagyon hasonló is, a háttérben álló genotípus nem feltétlenül ugyanaz, és ezáltal a terápiás target is más lehet. Ennek megfelelően egy-egy újonnan kifejlesztett és bizonyos betegeknek nagyon hatásos célzott terápia nem minden hasonló tünetekkel rendelkező betegnél éri el a várt hatást. A folyékony biopszia jelenleg két területen kezd teret nyerni a klinikumban. Biztató lehetőségnek tűnik egyrészt ismert genetikai markerrel jellemezhető betegségek szűrésére és monitorozására, másrészt egyes előrehaladott tumorok célzott terápiájának meghatározására.

Milyen további területen képzelhető el gyakorlati alkalmazása? A fent leírt targetált genotipizáló módszerek nagy érzékenységgel mutathatók ki akár egy addig nem diagnosztizált daganatot, akár a daganat eltávolítását követően a relapsus kockázatát előre jelző „minimális reziduális tumort”, amely terápiás konzekvenciával is járhat. Az alkalmazást elősegíti, hogy az utóbbi években óriási genetikai adatmennyiség halmozódott fel, továbbá jelenleg is folynak olyan prospektív kutatások, amelyek egy adott folyékony bi-



1. ábra. A vérplazmában található szabad DNS eredete, a kijutás módja, valamint az általa vizsgálható genetikai változások és kimutatásuk érzékenysége

dPCR = digital PCR; BEAMing = beads, emulsions, amplification and magnetics; Safe-Seqs = safe sequencing system; Capp-Seq = CAncer Personalized Profiling by deep Sequencing; TAm-Seq = tagged-amplicon deep sequencing; PARE = parallel analysis of RNA ends

opsziás eljárás diagnosztikai teljesítményét tesztelik. Jelenleg számos tumor genom projekt fut világszerte, így egyre szűkül azon célpontok köre, amelyeket a leggyakoribb tumortípusok esetén a korai diagnózis felállításához vizsgálni kell. A genom projektek nemcsak olyan elváltozásokat azonosítottak, amelyek a daganat felismerését illetően meghatározóak, hanem a betegség dinamikájára, a lehetséges terápiás válaszra vagy a rezisztencia megjelenésére vonatkozóan is információt nyújtottak. A korai kiújulású tumorok szekvenálásával a nagy kiújulási kockázatra utaló markerek azonosíthatók. Összességében tehát az adatbázisok által feltárt összefüggések a ctDNS mind prediktív, mind prognosztikai markerként történő használatát alapozhatják meg.

Az egyre több és szelektivebb terápiás lehetőség széles palettája felveti a beteg számára legmegfelelőbb kezelés kiválasztásának igényét (8). Megelőzően sem a tumorok genetikáját illető ismereteink, sem módszereink nem tették lehetővé, hogy megfelelő érzékenységgel mutassunk ki genetikai hibákat. Az utóbbi évtizedben az amerikai Nemzeti Rákkutató

Intézet (NCI) és Nemzeti Humán Genom Kutatóintézet (NHGR) által létrehozott Cancer Genome Atlas a 33 leggyakoribb daganattípus kulcsfontosságú genetikai elváltozásait analizálva egy magasan koordinált genetikai térképet hozott létre, amelynek 2,5 petabyte szekvenálási adatmennyisége több mint 11 ezer beteg tumorszövetének és hozzá tartozó egészséges szövetének genetikai vizsgálatából épült fel. Ez és az ehhez hasonló további tanulmányok eredményeképp megjelent az első, olyan folyékony biopsziás szűrőteszt, az amerikai Nemzeti Egészségügyi Intézet (NIH) támogatásával kidolgozott CancerSeek, amely 16 gén 1933 különböző genetikai mutációjának, valamint 8 proteín marker-elváltozásának vizsgálatával a nyolc leggyakoribb tumortípusban szűrővizsgálatként használható. A teszt érzékenysége a különböző stádiumokban eltérő volt, az 1005 vizsgált személyből a legalacsonyabb az I. stádiumban (43%), míg a legmagasabb a II. stádiumban (78%) volt (9).

A ctDNS potenciálisan minden, markerként azonosítható genetikai eltérést hordozó daganatszövet onkológiai vizsgálatára alkalmas lehet, de eddig a nem

kissejtes tüdőrákok (NSCLC) esetében gyűlt össze a legtöbb tapasztalat alkalmazásával kapcsolatban. A daganatok kezelésének kulcsa a hisztológiai diagnózis és a szövettani mintából kinyerhető genetikai információ, amit azonban behatárol a beteg állapota, az elégtelen mintamennyiség, a tumor kis részletének elemzése miatt a heterogenitásra vonatkozó információ elvesztése és a folyamatos követés lehetőségének hiánya. Eddig a COBAS® EGFR Mutation Testv2 kapott Food and Drug Administration (FDA) -befogadást az EGFR 19 és 21 exon szenzitizáló és a T790M-rezisztencia mutációjának VÉRPLAZMÁBÓL történő kimutatására, vagyis ezen eltérések azonosítására egyenértékűnek tekinthető a szöveti alapú meghatározással. A gyakorlatban EGFR-meghatározásra a folyékony biopszia progrediáló betegek esetében a T790M-rezisztencia-mutáció meghatározására terjedt el, illetve, ha nincs mód a hagyományos szöveti alapú meghatározásra igazolt NSCLC esetén és szóba jön a célzott EGFR-gátló kezelés.

Saját kutatásaink

A folyékony biopsziával történő diagnosztika érzékenységének fejlesztése és alkalmazása érdekében a Delta Bio 2000 Kft., a Szegedi Biológiai Kutatóközpont és a Szegedi Tudományegyetem együttműködésében már évek óta folytatunk kutatásokat, amelyhez legutóbb csatlakozott az Enterprise Communications Magyarország Kft. is. Kutatási és fejlesztési projekteinkben olyan megközelítés kidolgozására teszünk kísérletet, amellyel a leggyakoribb tumortípusokra jellemző elváltozások kimutatása költséghatékony módon elérhetővé válik és lehetőség nyílik bizonyos kulcsgének számbeli eltéréseinek kimutatására is. Célunk az is, hogy kidolgozott diagnosztikai technikáink szerves részévé váljanak a klinikai folyamatoknak és mielőbb hasznosuljanak a rutin tumorszűrésekben és célzott terápiában. Fejlesztéseink három irányban folynak: 1. technológiai fejlesztés a markerkimutatás érzékenységének növelésére; 2. a már alkalmazott NGS diagnosztikai módszerek folyékony biopsziára történő adaptálása; 3. jól tervezett, betegspecifikus génpanelek létrehozása. Eljárásunknak a következő lényeges tulajdonságoknak kell, hogy megfeleljen:

- kellően érzékeny legyen (<1%),
- több DNS-régió egyidejű analizálására is alkalmas legyen,
- kicsi legyen a templátigénye.

Mivel a ctDNS igen korlátozott mennyiségben áll rendelkezésre, az ideális eljárás erősen fókuszál a legrelevánsabb régiókra.

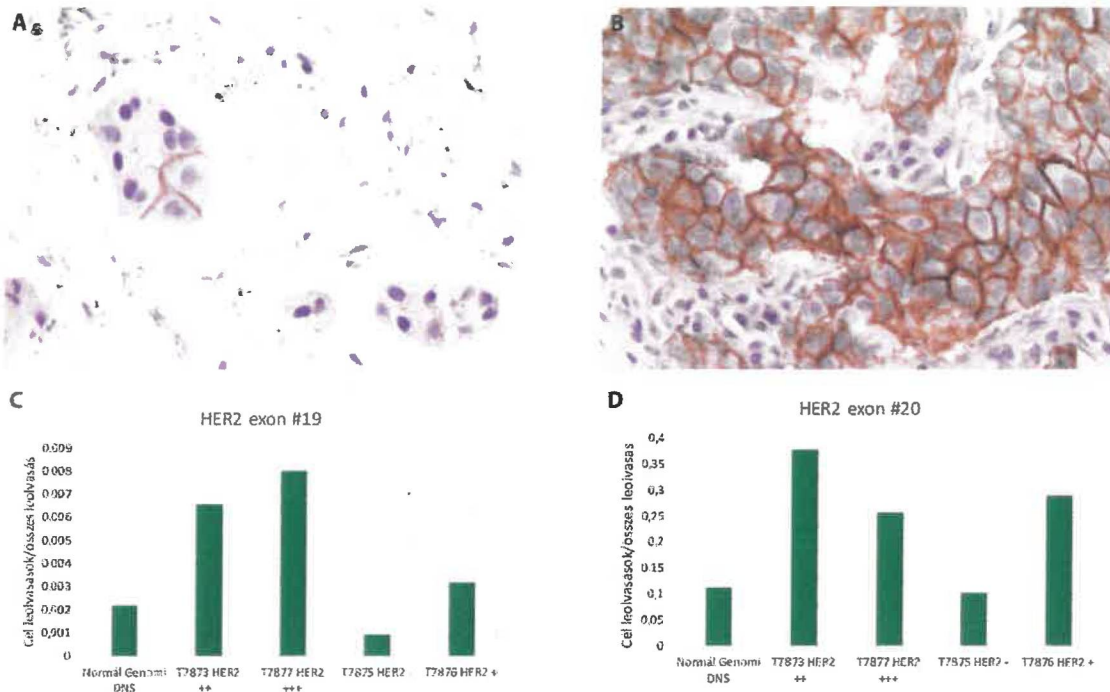
A szegedi centrumban az EGFR-TKI kezelés kapcsán felmerülő rezisztenciát mutató betegek plazma-T790M-diagnosztikája a tavalyi év óta egy saját fejlesztésű, költséghatékony NGS-alapú eljárással történik, amely eredményességét tekintve megegyezik a nemzetközi élvonalbeli laborokból publikált szakirodalmi adatok-

kal: az eddig feldolgozott esetek 60%-ában igazolódott a mutáció jelenléte (2. táblázat) (10).

2. táblázat. A táblázat tartalmazza a plazma-EGFR-vizsgálatba bevont betegek plazmájában mért primer mutáció gyakoriságát, amely a TKI-kezelést megelőző szöveti biopsziában már azonosításra került, valamint a T790M-mutáció esetleges jelenlétét

Minta	Primer EGFR-mutáció pozíciója	Primer mutáció gyakorisága	T790M gyakorisága
L001	p.Leu747_Pro753 delinsSer + J759L	72%	7%
L002	p.Glu746_Ala750del	48,20%	19,40%
L003	p.Glu746_Ala750del	23,40%	7,20%
L004	nem ismert	0%	nem detektálható
L005	p.Glu709_Thr710 delinsAsp	5,80%	nem detektálható
L006	p.Leu747_Ala750 delinsPro	23,90%	7%
L007	L858R	2,10%	1%
L008	p.Glu746_Ala750del	38,92%	18,12%
L009	p.Glu746_Ser752 delinsVal	6,30%	nem detektálható
L010	L858R	26%	nem detektálható

Ahhoz, hogy a ctDNS-re irányuló diagnosztikai eljárásunk a világ élvonalába kerüljön, több technológiai fejlesztésre is szükség volt. Elsőként a publikus adatbázisok segítségével kiválasztottuk azokat a géneket és elváltozásait, amelyek az emlő-, a vastag-, a végbél-, a tüdő-, valamint a hólyagdaganatok esetében a legjellemzőbbek, és gyakoriság vagy jelentőség szempontjából kiemelkedőek. Ezt követően kifejlesztettünk egy olyan számítógépes algoritmust, amely a célszekvenciák összetétele és egyéb paraméterek alapján automatikusan képes multiplexálható primerek keresésére. Technológiai újításként kidolgoztunk egy olyan NGS-technológiát, amely ötvözi az UMI-k nyújtotta előnyöket a PCR-technológiák érzékenységével és költséghatékonyságával, valamint képes lehet a számbeli eltérések megfelelő érzékenységgű kimutatására is, ami jelenleg nem megbízhatóan megoldott a folyékony biopsziás eljárások terén. A fejlesztés megvalósításában komoly támogatást jelent a szegedi centrumban a „MoMedEx TUMORDNS” projekt, amelynek keretein belül, továbbá a Szegedi Tudományegyetem Onkoterápiás Klinika együttműködésével elsőként az emlőrák plazma-panelből 44 célszekvencia detekciója és a kapott eredmények klinikai validációja indult el. Az emlőspecifikus génpanel 15 gént tartalmaz, génenként gyakran több mutációs forró pontra fókuszálva. A kifejlesztett emlőtumor szérumbiopsziás



2. ábra. a) T7876-os minta HER2 IHC-festése. b) Erős HER2-pozitivitást mutató kontrollminta. c) HER2 19-es exonjára illeszthető NGS-leolvasások aránya az összleolvasáshoz képest a vizsgált tumor és vérből izolált normálkontroll DNS-en. d) HER2 20-as exonjára illeszthető NGS-leolvasások aránya az összleolvasáshoz képest a vizsgált tumor és vérből izolált normálkontroll DNS-en

génpanelünkben nyolc gén esetén kópiaszám-eltérés is detektálható. A kiválasztott emlőtumoros betegekből a vérminták az első diagnózisakor, valamint jól szervezett követés során több időpontban kerülnek levételre, emellett a betegből tumorminta is feldolgozásra kerül. Az NGS-alapú analízis során párhuzamosan hasonlítjuk össze a szolid tumor- és a vérplazma mintákban a génpanel mutációs spektrumát és adott gének kópiaszám-változásait. A számbeli eltérések követésére irányuló NGS-technikák validálásához jó modell az emlőrákban gyakori HER2 (ERBB2) gén amplifikációja, amelyet jelenleg is rutinszerűen monitoroznak antitestalapú IHC-technikával. Eddigi eredményeink azt mutatják, hogy az általunk fejlesztett, NGS- és UMI-alapú módszer képes nemcsak az immunhisztokémiai eljárással erősen festődő, nagyfokú HER2-pozitív mintákban a számbeli eltérés kimutatására, hanem akár a bizonytalan, gyenge festődést mutató minták esetén is egyértelmű eredményt adni (**2. ábra**). A kifejlesztett NGS-alapú kópiaszámot vizsgáló módszerünkkel FFPE-mintákból izolált DNS-en végzett HER2 diagnosztikai eredményeket a **3. táblázatban** foglaltuk össze.

Az FFPE és a tumorminták egyéb mutációinak jellemzése jelenleg is folyamatban van. Az emlődagana- tokhoz hasonlóan a Csongrád Megyei Önkormányzat Mellkasi Betegségek Szakkórházában, valamint a Szege- di Tudományegyetem Urológiai Klinikáján is elindult

a szervezett mintagyűjtés, amely további lépést jelent a közeljövőben beállítani tervezett és céljaink szerint a klinikai gyakorlatba is bekerülő emlő-, tüdő-, proszta- ta- és vastagbélrák plazmagén panelek validációja felé.

Mit hoz a jövő a tumor folyékony biopsziában?

Az elmúlt évtizedben az új generációs szekvenálás költségének határozott csökkenése lehetővé tette, hogy óriási mennyiségű genetikai információ halmozódjon fel a tumorigenezissel kapcsolatban. A szekvenálási technológiák fejlődése következtében a vizsgálatok átfutási ideje is csökkent, így lehetővé vált a kutatás mellett azok rutinellátásba való átvétele. Napjainkban a

3. táblázat. NGS- és IHC-diagnosztikai megközelítéssel végzett HER2-kópiaszám-elemzések összehasonlítása FFPE-mintákban

Minta azonosítója	NGS- diagnosztika	IHC-diagnosztika
7873	pozitív	2+
7875	negatív	negatív
7876	pozitív	1-2 daganatsejtben 1-2+ intenzitású inkomplett membránpozitivitás
7877	pozitív	3+

folyékony biopszia-módszerek robbanásszerű fejlődését tapasztaljuk mind az érzékenység, mind a költséghatékonyság terén, amik már mai fejlettségi szintjükön is indokolttá tennék általános tumordiagnosztikai alkalmazásukat. Jelen cikk szerzőivel több éve fejlesztünk ilyen diagnosztikai technikákat és végzünk ezen alapuló tumordiagnosztikát. Mindennapos munkánk során nyert tapasztalataink alátámasztják a vérplazma szabad DNS-én alapuló diagnosztika fentiekben részletezett előnyeit és megbízhatóságát. Tapasztalataink és a nemzetközi trendek alapján is biztosak vagyunk abban, hogy a közeljövőben a folyékony biopszia az onkológiai szűrések és a precíziós onkológia egyik meghatározó pillérévé fog válni.

Köszönetnyilvánítás

A cikkben feltüntetett kutatás a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal [GINOP-2.3.2-15-2016-00020, GINOP-2.2.1-15-2017-00052] támogatásával valósult meg.

Irodalom

1. Pantel K, Brakenhoff RH, Brandt B. Detection, clinical relevance and specific biological properties of disseminating tumour cells. *Nat Rev Cancer* 2008;8:329-40. <https://doi.org/10.1038/nrc2375>
2. Whiteside TL. The emerging role of plasma exosomes in diagnosis, prognosis and therapies with cancer. *Contemp Oncol [Poznan, Poland]* 2018;22:38-40. <https://doi.org/10.5114/wo.2018.73882>
3. Becker A, Thakur BK, Weiss JM, Kim HS, Peinado H, Lyden D. Extracellular vesicles in cancer: Cell-to-cell mediators of metastasis. *Cancer Cell* 2016;30:836-48. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2016.10.009>
4. Gahan PB. Circulating cell-free DNA and cancer therapy monitoring: methods and potential. *Methods Mol Biol* 2019;1909:31-46. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8973-7_3
5. Thierry AR, El Messaoudi S, Gahan PB, Anker P, Stroun M. Origins, structures, and functions of circulating DNA in oncology. *Cancer Metastasis Rev* 2016;35:347-76. <https://doi.org/10.1007/s10555-016-9629-x>
6. Christensen E, Nordentoft I, Vang S, Birkenkamp-Demtröder K, Jensen JB, Agerbæk M, et al. Optimized targeted sequencing of cell-free plasma DNA from bladder cancer patients. *Sci Rep* 2018;8:1917. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20282-8>
7. Kinde I, Wu J, Papadopoulos N, Kinzler KW, Vogelstein B. Detection and quantification of rare mutations with massively parallel sequencing. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011;108:9530-5. <https://doi.org/10.1073/pnas.1105422108>
8. Mohan S, Heitzer E, Ulz P, Lafer I, Lax S, Auer M, et al. Changes in colorectal carcinoma genomes under anti-EGFR therapy identified by whole-genome plasma DNA sequencing. *PLoS Genet* 2014;10:e1004271. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004271>
9. Cohen JD, Li L, Wang Y, Thoburn C, Afsari B, Danilova L, et al. Detection and localization of surgically resectable cancers with a multi-analyte blood test. *Science* 2018;359(80):926-30. <https://doi.org/10.1126/science.aar3247>
10. Arcila ME, Oxnard GR, Nafa K, Riely GJ, Solomon SB, Zakowski MF, et al. Rebiopsy of lung cancer patients with acquired resistance to EGFR inhibitors and enhanced detection of the T790M mutation using a locked nucleic acid-based assay. *Clin Cancer Res* 2011;17:1169-80. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-2277>

KIMAGASLÓAN HATÉKONY

MediDrink Plus



Magasabb energia*



Magasabb fehérje*



Magasabb Omega-3*



Alacsonyabb szénhidrát*



Speciális gyógyászati célra szánt élelmiszer, betegség kapcsán kialakult alultápláltság diétás ellátására.

Fő jellemzők: Növényi olajokat, tejfehérjét, szacharózt, izomaltulózt, maltodextrint, aromát (kivéve az ízesítés nélküli változatot), színezéket (kivéve az ízesítés nélküli változatot), vitaminokat, ásványi sókat tartalmaz. **Egyéb sajátosságok:** glutén- és laktózmentes. Javallatok: betegség kapcsán kialakult alultápláltság esetén (malnutrició). Alkalmazási meghatározások: alkalmas kizárólagos tápanyagforrásként felnőttek részére (a napi tápanyagszükségletet 4-6 doboz fedezi), enterális táplálásra. **Összetevők:** Viz, növényi olajok (repceolaj, napraforgóolaj), szacharóz, izomaltulóz, maltodextrin, tejfehérje (80% kazein, 20% savófehérje), kalcium-karbonát, trikálium-citrát monohidrát, nátrium-klorid, foszfor, magnézium-karbonát, nátrium-L-aszorbát, nicotinamid, cink-glükonát, vas-II-szulfát, DL-alfa-tokoferil-acetát, D-kalcium-pantoténát, mangán-szulfát, piridoxin-hidroklorid, riboflavin-5-nátrium-foszfát, alfa-linolénsav, tiamin-hidroklorid, réz-glükonát, nátrium-fluorid, retinil-acetát, folsav, inozitolinon, kálium-jodid, nátrium-molibdát, krómium-triklorid, nátrium-szelenit, D-biotin, kolekalciferol, cianokobalamin. **Kiszárlás:** 30x200 ml. **Támogatott indikációk:** Táplálékfelvétel és utilizáció súlyos károsodásával járó körképek esetén orális táplálásra – beleértve a rosszindulatú betegségeket is. Emelt támogatás Eu 13. (70%)

* Az általában betegség kapcsán kialakult alultápláltság kezelésére használt, általános tápszerekhez képest.

Medifood Hungarian Trading Kft.
2045 Törökbálint, Tópark. u. 3.

www.medifoodinternational.com

MEDIFOOD