

TUMORDIAGNOSZTIKA VÉRBŐL – A FOLYADÉKBIOPSZIA

TUMOUR DIAGNOSTICS FROM BLOOD—THE LIQUID BIOPSY

Kósa János^{1, a, b}, Balla Bernadett^{2, a, b}, Kocsis-Deák Barbara^{3, a, b}, Árvai Kristóf^{4, a, b}
Tobiás Bálint^{5, b}, Takács István^{6, a}, Lakatos Péter^{7, a, b}

¹PhD, tudományos főmunkatárs, laboratóriumvezető • kosa.janos@med.semmelweis-univ.hu

²PhD, tudományos főmunkatárs

³MSc, tudományos munkatárs

⁴MSc, tudományos főmunkatárs

⁵PhD, PharmD, tudományos főmunkatárs

⁶PhD, DSc, MD, igazgató

⁷PhD, DSc, MD, egyetemi tanár

^aSemmelweis Egyetem Általános Orvostudományi Kar I. sz. Belgyógyászati Klinika, Budapest

^bPentaCore Laboratóriumok, Budapest

ÖSSZEFOGLALÁS

Cikkünkben röviden bemutatjuk a folyadékbiopsziát, annak módszertanát és eszköztárát. Megbeszéljük a folyadékbiopszia fő alkalmazási területeit, kiemelten tárgyaljuk a prenatális (magzati) tesztelésben és a tumordiagnosztikában elfoglalt jelenlegi, illetve esetleges későbbi alkalmazási lehetőségeit.

ABSTRACT

In our paper we introduce liquid biopsy, its methodology and the equipment needed. We describe the main applications of liquid biopsy, in particular, we discuss prenatal (fetal) tests and its current and possible application options in tumour diagnostics.

Kulcsszavak: folyadékbiopszia, onkológia, tumorterápia, genetikai diagnosztika, prenatális tesztelés, NIPT

Keywords: liquid biopsy, oncology, tumour therapy, genetic diagnostics, prenatal testing, NIPT

BEVEZETÉS

A tumorok genetikai hátterű betegségek, a jelenlegi ismereteink szerint a dagamos megbetegedéseket a genomot érintő speciális, a tumorkialakulásban szerepet játszó eltérések (mutációk) okozzák. Ezen genetikai eltéréseket, köszönhetően a molekuláris genetika területén az elmúlt időszakban tapasztalható jelentős fej-

lődésnek, egyre kiterjedtebben ismerjük, ezen tudást az orvostudomány a napi klinikai gyakorlatban is felhasználja.

A legtöbb tumor esetében ismert, hogy legkülönbözőbb, a tumorról kapcsolatos biológiai anyagok kerülnek a véráramba mind korai, mind későbbi tumorstádium esetében. Ezek az anyagok lehetnek a véráramban keringő tumorsejtek, tumorból felszabadult DNS, exoszómák, microRNS-ek, illetve különböző szubcelluláris komponensek (mint például tumorról összefüggésbe hozott vírusok nukleinsavai), különböző fehérjék és glükoproteinek is. Ezek közül a keringő tumorsejtek vagy a keringő tumor-DNS véráramból történő vizsgálatát folyadékbiopsziának nevezzük (NIH, é. n.). A folyadékbiopszia tehát nem több, mint különböző molekuláris biológiai technológiák kombinálása a vérben vagy egyéb testfolyadékokban keringő biomarkerek azonosítására, azonban elmondhatjuk, hogy megvan benne a lehetőség, hogy gyökeresen megújítsa az egészségügyet. A vérből való vizsgálat előnye a sebészeti úton elérhető tumormintával szemben, hogy elvileg korlátlanul elérhető és naprakész mintából dolgozik, így a kapott genetikai eredmény az adott pillanatot mutatja, és nem hetekkel vagy hónapokkal korábbi állapotot, amikor a vizsgált tumor esetleg még eltérő genetikai profilt mutatott. Összefoglalónkban – elsősorban a keringő tumor-DNS-re fókuszálva – bemutatjuk azt az utat, amelyen a folyadékbiopsziához eljutottunk, megvizsgáljuk előnyeit és korlátait. Mindezek mellett foglalkozunk a legújabb molekuláris genetikai eszköztár (NGS és ddPCR) klinikai alkalmazhatóságával elsősorban az onkológia területén, kiemelve a folyadékbiopszia szerepét a korai felismerés, a prognózis, a terápiás döntés támogatása és a terápiára adódó válasz előrejelzése területén.

KERINGŐ DNS A VÉRPLAZMÁBAN FIZIOLÓGIÁS ÉS PATOLÓGIÁS ÁLLAPOTOKBAN

Érdekes módon, a vérkeringésben leírt tumor-DNS leírása néhány évvel megelőzte a szakirodalomban a keringő DNS-ek várandósság alatti szűréssel kapcsolatos felhasználását (Stroun et al., 1989; Lo, 1997). Ennek ellenére mégis a különböző, elsősorban a 13-as, 18-as és 21-es kromoszómák számbeli eltéréseinek szűrésére használt, a várandós vérből elvégezhető, ún. nem invazív prenatális tesztek (NIPT) voltak az elsők, amelyek megbízható, nagy specificitású és szenzitivitású teszteké váltak. Elmondhatjuk, hogy NIPT-teszteket napjainkban a terhességek egyre növekvő arányában használnak fel rutinszerűen. Ezzel szemben a tumoros páciensek számára tervezett folyadékbiopszia eljárások fejlesztése eleinte komoly akadályokba ütközött. Nézzük, ez miért lehetett így!

Az első, sejtmentes, DNS-alapú tumorazonosítás várandósságban a véletlen műve volt, 2013-ban. C. Michael Osborne és munkatársai (2013) egy 37 éves hölgyet írtak le, akinek a NIPT eredménye a 13-as és a 18-as kromoszómák eltérő számát mutatta (amelyek megfelelnek az Edwards- és Patau-szindrómáknak együttesen),

ám a megszületett fiúcsesemő semmiféle ilyen kromoszóma-rendellenességet nem mutatott. A nő későbbi vizsgálatai viszont kissejtes tumort mutattak ki a hüvelyi szövetmintában, amelyekben érdekes módon a NIPT által kimutatott kromoszóma-rendellenességek voltak kimutathatóak – így ezt tekintjük az első, ctDNS-alapú tumorkimutatásnak.

A terhesség egy nagyon jól ismert, nagyon jól reprodukálható fiziológiás esemény, amely esetében az anya vérében a magzattól származó keringő DNS aránya a 9. terhességi héttől rendszeresen eléri vagy meghaladja a 10%-ot is. Valójában úgy néz ki, hogy a jelenlegi NIPT-technológiák 3-4%-os magzati DNS-koncentráció alatt jellemzően nem is adnak ki eredményt, mivel ebben az alacsony, keringő DNS-tartományban fals negatív eredményeket is eredményezhetnek. Ezzel szemben a tumoros állapot egy erősen heterogén, nagyon változatos patológiás esemény, amely mindamellett, hogy dinamikusan változó betegség, jelentős számú – és változó – genetikai eltéréssel és komplex betegséglefolyással bír. Maga a tumor is változik, és a keringésbe bocsátott DNS mennyisége és minősége is széles határokon belül ingadozhat. Ennek következtében a gyakran 4% alatti koncentrációjú tumormutáns DNS-fragmensek száma is jelentősen változhat még az azonos tumorstádiumú betegek körében is. Ezért a keringő tumor-DNS- (circulating tumour DNA, ctDNA) analízist sokkal nehezebb standardizálni, különösen a korai betegségi szakaszok kimutatására, amelyre a folyadékbiopsziát alkalmazni szeretnénk (Heitzer et al., 2017).

GENETIKAI ELTÉRÉSEK TUMOROKBAN

A tumor egy komplex patológiás állapot, amelynek több mint száz különböző formáját ismerjük, mindegyikhez változatos kockázatokkal és epidemiológiai adatokkal. Tumoros elfajulás kialakulhat gyakorlatilag a szervezet bármely sejt- vagy szövettípusából. Viszonylag féktelen sejtosztódás jellemzi, amely során az osztódó tumorsejtek be tudnak hatolni a környező szövetekbe, és emellett távoli áttéteket is képezhetnek. Ami egyértelműen megkülönbözteti a tumorsejtet az egészséges sejtektől, az a genomjában létrejövő elváltozások, genetikai mutációk. Ezek az elváltozások többfélék lehetnek, úgy mint egypontos nukleotid variációk (SNV) az adott génen belül vagy a szabályzó régiókban, kromoszóma szerkezetbeli változások, DNS-metiláció-változások és kópiaszám-változások (CVN). Ezeket a sokféle genetikai eltéréseket nagy nemzetközi adatbázisok rendszerezik – mint például az International Cancer Genome Consortium (ICGC) és a The Genomic Atlas of Cancer (TCGA) – azért, hogy a különböző rákok hátterét, kialakulását, rizikófaktorait vagy kezelését minél jobban megismerhessük. Az újgenerációs szekvenálási (NGS) módszerek megjelenésével, amelyek lehetővé tették nagymennyiségű genetikai információ párhuzamos kinyerését a különböző tumor-

mintákból, lehetővé vált a legkülönbözőbb tumorok mintáinak karakterizálása. Így leírhattuk az egyes tumorokban gyakrabban (esetenként kizárólagosan) előforduló mutációkat, lehetővé téve nemcsak az adott tumorok diagnózisát, hanem a célzott daganatterápiát is. Ez utóbbinál, tehát a célzott vagy más néven személyre szabott tumorterápia esetében, minden egyes tumort az adott tumorban előforduló genetikai mutáció (mintázat) alapján kezelünk, így előfordulhat, hogy morfológiailag két azonos vastagbél tumort eltérően kell kezelnünk, mivel az elváltozások mögött eltérő DNS-mutációk, így eltérő biológiai mechanizmusok állhatnak.

FOLYADÉKBIOPSZIA TUMOROK ESETÉBEN

A már említett, kiragadott példák mellett sok esetben olyan helyen levő tumorok vizsgálata is lehetővé válik folyadékbiopsziával, amely tumorokból az elhelyezkedésükből kifolyólag nehéz szövettani mintához jutni (mint például az agyban lévő daganat vagy hasnyálmirigy-rák esetében). A sebészi minták továbbra is kiemelten fontosak lesznek a tumordiagnosztikában vagy a kezelés irányának és módjának eldöntésében, azonban beláthatjuk, hogy a sebészi mintáknak vannak limitációik is. Felismertük, hogy a tumorok nem statikusak, hanem dinamikusan változó genetikai képet mutató patológiás szövetek, amelyek egy adott pillanatbani vizsgálata eltérő képet mutat egy korábbi vagy későbbi időhöz képest (ezt nevezzük tumorevolúciónak). A tumorok genetikai mintázata időről időre változik spontán módon is, illetve például adott célzott daganatterápiára válaszul is. Ezeknek a változásoknak a követésére kimondottan alkalmas a folyadékbiopszia, mivel nem egy historikus adatot nyújt (például egy sebészileg eltávolított vagy szövetmintavétel során kivett tumordarabról), hanem további invazív mintavétel nélkül is mindig az adott pillanatban a keringésbe kerülő tumor-DNS-ek vizsgálatát teszi lehetővé.

Jelenleg három nagy területen várható eredmény a folyadékbiopszia technológiától (NIH, é. n.): a tumorok detektálása (Stroun et al., 1989), kimenetelének prognózisa, illetőleg a tumorelles kezelésekre való érzékenység megállapítása (Lo, 1997). És bár a sebészi minták genetikai vizsgálata nem szűnik meg, úgy gondoljuk, hogy a következő néhány éven belül a folyadékbiopsziás eljárások – kiegészítve a jelenlegi technológiákat – gyorsan fejlődnek, és el is terjednek a korai detektálás és terápia monitorozása érdekében. Tudományos bizonyítékok sora támasztja alá, hogy a hasnyálmirigy-, ovárium-, hólyag-, vastagbél-, melanoma és emlőrákok 75%-ában kimutathatóak keringő tumor-DNS-ek, míg a fej-nyaki- vagy pajzsmirigy-rákok esetében is ez az érték több mint 50%. Ezek a számok azt mutatják, hogy reális ennek a módszernek a közeljövőben történő rutinszerű elterjedése.

A folyadékbiopszia korai diagnosztikára történő alkalmazhatóságát megelőzte a vezető laboratóriumok által már ma is elérhetővé tett vizsgálatcsoport a tumorterápia monitorozására (amely szorosan összefügg a terápia személyre szabha-

tóságával). Kimutatták, hogy tüdőrákok (elsősorban a nem kissejtes változat, az NSCLC) esetében a terápia során rendszeres időközönként elvégzett folyadékbiopsziás meghatározások pontos képet adnak az alkalmazott tirozin-kináz-gátló (TKI) típusú célzott gyógyszerekre való rezisztencia kialakulásáról. A jelenleg használt TKI-k esetében a páciensek akár felében is kialakulhat egy olyan mutáció az EGFR-génben (ún. T790M), amely hatására a tumor érzéketlen lesz az alkalmazott gyógyszerre. Ehhez az információhoz eddig csak sorozatos tüdőbiopsziákkal juthattunk hozzá, amely mindamellett, hogy invazív beavatkozás, sok esetben egyszerűen a tumor mérete, elhelyezkedése, illetve a páciens állapota miatt kivitelezhetetlen. Az ESMO (European Society for Medical Oncology) így hivatalosan az ajánlásába vette a folyadékbiopsziát az ismételt klasszikus biopszia alternatívájaként EGFR-mutációval rendelkező páciensek esetében. További vizsgálatok jelentős egyezést mutattak ki más tumorok esetében is. Vastagbél-tumorban a sebészi szövetminta és a folyadékbiopszia eredménye között szignifikáns korreláció mutatható ki, így várhatóan a vastagbél-tumorokban is hamarosan megjelennek a hivatalos ajánlások a keringő tumor-DNS vizsgálatára.

EGYÉB FOLYADÉKBIOPSZIÁS BIOMARKEREK

Írásunk elején megemlítettük, hogy a vérben vagy egyéb testfolyadékokban különböző fajtájú tumor-biomarkereknek is alkalmas vegyületek vagy formációk vannak. Ilyenek például maguk a keringő tumorsejtek, amelyek szintén megjelennek a vérben. Kimutatták, hogy alacsony számú, 1–10 darab tumorsejt található 1 ml vérben különféle, már áttéteket képzett tumorok esetében. De ilyen markerek lehetnek különböző kisebb sejtdarabok, mint az exoszómák, a kis gömb alakú vezikulák, amelyeknek különféle DNS-, RNS- vagy fehérjetartalma lehet specifikus az adott betegségre. Napjainkban jelentős és eredményes erőfeszítések történnek az exoszómák klinikai diagnosztikába való beemelésére. Nem mehetünk el a különféle RNS- (elsősorban miRNS) molekulák biomarkerként történő alkalmazása vagy a tumorból kiszabaduló, mutációt hordozó mitokondriális DNS felhasználása mellett sem, ám jelenleg úgy tűnik, hogy a legsűrűbben felhasznált vagy leginkább a rutinszerű napi felhasználást elérő, vérben keringő biomarker a keringő DNS.

PREANALITIKA ÉS VIZSGÁLATI ELJÁRÁSOK CTDNS-EK KIMUTATÁSÁRA

Mielőtt magukra a laboratóriumi diagnosztikai eljárásokra térnénk, meg kell említeni, hogy a folyadékbiopsziára történő mintavételezés meglehetősen speciális mintavételi eljárás. Mivel a vérben szabadon keringő DNS-eket szeretnénk kimutatni, meg kell akadályozni, hogy a mintavétel során az érintetlen sejtek – jel-

lemzően fehérvérsejtek – „kipukkadjanak”, így belekerüljön a plazmába a saját DNS-ük, elfedve az eredetileg ott levő szabad-DNS-mintázatot. A piacon még alig néhány gyártótól érhetőek el, és meglehetősen drágán olyan speciális vérvételi csövek, amelyekben ez a folyamat minimalizálható az alatt az idő alatt, ameddig a minta eljut a meghatározásig. Ügyelni kell a megfelelő és óvatos mintavételre is, illetve magának a már levett vérmintának a szállítására a sejtek összetöredeződésének minimalizálása érdekében.

A laboratóriumi vizsgálatokat a teljesség igénye nélkül csoportosíthatjuk aszerint, hogy milyen típusú eltéréseket szeretnénk kimutatni (Domínguez-Vigil, 2018) (1. táblázat).

1. táblázat. A folyadékbiopsziában használt leggyakoribb módszerek

| Módszer | Technológia | Érzékenység | Vizsgálni kívánt eltérés |
|------------------------------|---------------------------------|-------------|-------------------------------------|
| qPCR (mennyiségi PCR) | ARMS-Scorpions PCR | 0,05–0,1% | Ismert egy vagy néhány mutáció |
| | Clamping PCR | 0,1–1% | |
| | TaqMan | 0,1–1% | |
| Digitális PCR | Beaming | 0,01% | Ismert egy vagy néhány mutáció |
| | ddPCR | 0,001% | |
| Célzott szekvenálás | Amplikon NGS | >1% | Mutációk a vizsgált génszakaszokban |
| | SAFE-SeqS | 0,1% | |
| | CAPP-Seq | 0,01% | |
| Teljes genom vizsgálat (WGA) | Digitális kariotipizálás (aCGH) | 0,001% | Genombeli kópiaszám-változás |
| | PARE | 0,001% | Genom-átrendeződés |

ÖSSZEFOGLALÁS

A folyadékbiopszia folyamatosan bővülő elérhetővé válása várhatóan jelentős mértékben kiegészítheti, megváltoztathatja a jelenlegi tumordiagnosztikai és kezelési stratégiákat, a sebészi mintavételezés alternatívájaként. A folyadékbiopsziával közel valós idejű tumorgenetikai információhoz juthatunk, amelynek segítségével megvalósítható a korai észlelés és pontosabbá tehető a betegség prognózisa. A terápiára való reagálás felmérése és az esetleges rezisztencia kialakulása is gyorsabban és kevésbé invazívan válhat vizsgálhatóvá. További vizsgálatokra van szükség, hogy megfelelően alátámasztott tudományos és klinikai adatok birtoká-

ban mielőbb széleskörűen bevezethessük ezt a forradalmian új módszert a napi klinikumba.

A cikkben előforduló néhány, a szaknyelvben sűrűbben előforduló kifejezés fordítása és magyarázata

| Magyar megnevezés | Angol megnevezés |
|--|--------------------------------------|
| keringő tumorsejtek | circulating tumour cells – CTC |
| tumorból felszabadult DNS (ctDNA), keringő tumor-DNS | circulating tumour DNA – ctDNA |
| exozómák | exosomes |
| microRNS (miRNS) | microRNA (miRNA) |
| újgenerációs szekvenálás (NGS) | next-generation sequencing (NGS) |
| digitális droplet PCR (ddPCR) | digital droplet PCR (ddPCR) |
| nem invazív prenatális tesztelés (NIPT) | non-invasive prenatal testing (NIPT) |

IRODALOM

- Domínguez-Vigil, I. G. et al. (2018): The Dawn of the Liquid Biopsy in the Fight Against Cancer, *Oncotarget*, Jan 5; 9, 2;: 2912–2922. DOI: 10.18632/oncotarget, [http://www.oncotarget.com/index.php?journal=oncotarget&page=article&op=view&path\[\]=23131&pubmed-linkout=1](http://www.oncotarget.com/index.php?journal=oncotarget&page=article&op=view&path[]=23131&pubmed-linkout=1)
- Heitzer, E. – Perakis, S. – Geigl, Jochen B. – Speicher, M. R. (2017): The Potential of Liquid Biopsies for the Early Detection of Cancer. *Nature Partner Journals Precision Oncology*, Vol. 1, Article number: 36. DOI: 10.1038/s41698-017-0039-5, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5871864/>
- Lo, Y. M. et al. (1997): Presence of Fetal DNA in Maternal Plasma and Serum. *The Lancet*, 350, 485–487. DOI: 10.1016/S0140-6736(97)02174-0
- NIH – National Cancer Institute, US (é. n.): *Definition of Liquid Biopsy – NCI Dictionary of Cancer Terms*. National Cancer Institute, <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/liquid-biopsy>
- Osborne, C. M. – Hardisty, E. – Devers, P. (2013): Discordant Noninvasive Prenatal Testing Results in a Patient Subsequently Diagnosed with Metastatic Disease. *Prenat Diagn.*, 33, 609–611. DOI: 10.1002/pd.4100, <https://obgyn.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/pd.4100>
- Stroun, M. et al. (1989): Neoplastic Characteristics of the DNA Found in the Plasma of Cancer Patients. *Oncology*, 46, 318–322. DOI: 10.1159/000226740