

Tekutá biopsia pri kolorektálnom karcinóme

MUDr. Marian Streško, PhD.

Onkologická klinika FN Trnava

Kolorektálny karcinóm (KRK) je druhá najčastejšia príčina úmrtia na onkologické ochorenie. Informácie získané z biopsie nádoru poskytujú iba obmedzené informácie o biologických vlastnostiach nádoru a jeho heterogenite. Tekutá biopsia môže kompenzovať nedostatky patologickej diagnostiky nádoru tým, že sleduje dynamiku a heterogenitu nádoru v reálnom čase, poskytuje prehľad genetických zmien v nádorových bunkách. Periférna krv je hlavným zdrojom tekutej biopsie a jej analýza zahŕňa detekciu cirkulujúcich nádorových buniek (CTC), cirkulujúcej nádorovej DNA (ctDNA), cirkulujúcej nádorovej mikroRNA (miRNA). Hlavné využite tekutej biopsie je včasná detekcia nádorového ochorenia, určenie štádia ochorenia, hodnotenie a monitorovanie účinnosti liekov a stanovenie minimálnej reziduálnej choroby (MRD). Tekutú biopsiu je možné použiť na skríning KRK. Prítomnosť CTC, nádorových klustrov alebo epigenetické zmeny v ctDNA môžu odlíšiť zdravých jedincov od pacientov s kolorektálnym karcinómom. Tekutá biopsia poskytuje aj prognostické a prediktívne údaje, ktoré je možné použiť pri detekcii MRD. Hladiny ctDNA vzhľadom na krátky biologický polčas presnejšie a rýchlejšie odhalia prítomnosť MRD. Detekcia CTC a ctDNA môže v budúcnosti rozšíriť štandardnú TNM klasifikáciu. CtDNA je možné použiť aj na monitorovanie RAS a BRAF mutácie v priebehu anti-EGFR liečby. Stanovenie RAS génu z ctDNA v porovnaní s tkanivovým vyšetrením má vyššiu senzitivitu a špecifitu. Napriek pokrokom vo vývoji tekutej biopsie pre širšie použitie v klinickej praxi sú nutné rozsiahlejšie multicentrické štúdie, ktoré definujú využitie tejto metódy. Očakáva sa, že v blízkej budúcnosti sa určia presné indikácie využitia tekutej biopsie, ktoré nám pomôžu v manažmente pacienta s KRK.

Kľúčové slová: tekutá biopsia, cirkulujúce nádorové bunky, cirkulujúca nádorová DNA

Liquid biopsy in colorectal carcinoma

Colorectal carcinoma (CRC) is the second most common cause of death within oncology indications. Information obtained from tissue biopsy provide only limited insights into biological properties of the tumor and its heterogeneity. Liquid biopsy methods can compensate for the shortcomings of diagnostic pathology by capturing heterogeneity of the tumor and its dynamics in real time, providing overview of genetic alterations in tumor cells. Peripheral blood is the main source of liquid biopsy and its analysis comprise detection of circulating tumor cells, circulating tumor DNA and RNA. The primary application of liquid biopsy is in early detection of cancer, determination of the stage of disease, evaluation and monitoring of the efficacy of the treatment and measuring minimal residual disease (MRD). Liquid biopsy can be used for CRC screening. It has been demonstrated that the presence of circulating tumor cells (CTC), tumor clusters or epigenetic alterations of ctDNA can differentiate samples of healthy individuals from patients with colorectal carcinoma. Liquid biopsy can also provide prognostic data and basis for predictions, that can be applied in determining MRD. Measurements of ctDNA can determine MRD measures faster and with higher precision, due to the short biological half-life of free ctDNA in blood. CTC detection and ctDNA could therefore serve as a complement to a standard TNM classification in the future. CtDNA can be also used for monitoring of RAS and BRAF mutations during anti-EGFR therapy. Measurement of RAS gene from ctDNA has higher sensitivity and specificity in comparison to the tissue biopsy. Despite all the advancements in developments of liquid biopsy techniques, extensive multi-centric studies that define the application of these methods are required to achieve broader clinical applications. It is estimated that specific indications, where the liquid biopsy methods can be applied will be determined in the near future, that will improve the management of CRC.

Key words: liquid biopsy, circulating tumor cells, circulating tumor DNA

Onkológia (Bratisl.), 2020;15(4):243-248

Úvod

Kolorektálny karcinóm patrí medzi najčastejšie nádorové ochorenie, ktoré sa vyskytuje najmä v rozvinutých krajinách. Medzi štyri najpostihnutejšie štáty patrí Južná Kórea, Slovensko, Maďarsko a Holandsko. Najčastejšie postihuje osoby nad 50 rokov.

Presné ohodnotenie ochorenia má veľký význam pre výber optimálnej stratégie liečby. Štandardným diagnostickým prostriedkom, ako sú rádiologické zobrazovacie metódy alebo histopatolo-

gická analýza nádorového tkaniva, však chýba citlivosť pri detekcii skorej recidívy ochorenia a detekcia genetických zmien v priebehu liečby KRK.

Na prekonanie tohto nedostatku sa ako nový, veľmi sľubný diagnostický nástroj objavil koncept tekutej biopsie z periférnej krvi pacientov. Tekutou biopsiou môžeme sledovať dynamiku a heterogenitu nádoru v reálnom čase. Periférna krv je hlavný zdroj tekutej biopsie a jej analýza zahŕňa detekciu cirkulujúcich nádorových buniek, cirkulujú-

cej nádorovej DNA, cirkulujúcej nádorovej RNA. Ďalším zdrojom tekutej biopsie môžu byť pleurálny výpotok, ascites alebo cerebrospinálna tekutina.

Cirkulujúce nádorové bunky

Cirkulujúce nádorové bunky sú bunky uvoľňované do krvného riečiska z primárneho nádoru počas jeho rastu alebo pri jeho metastázovaní. CTC sú schopné invázie do okolia cez extracelulárnu matrix a vrstvy stromálnych buniek. Po prieniku cez cievnu stenu nasleduje

ich transport krvným riečiskom, zachytenie v inej vzdialenej lokalite a následná extravazácia do parenchýmu vzdialeného tkaniva. Bunky, ktoré prežívajú v novom mikroprostredí, môžu vytvárať mikrometastázy. Pri ďalšej proliferácii dávajú vznik makroskopickým metastázam (1).

Diagnostika CTC

Počet CTC v periférnej krvi je extrémne malý a pohybuje sa približne 1 CTC na 10^7 leukocytov. Existujú dve základné metódy detekcie CTC, ktoré sú založené na biologických a fyzikálnych vlastnostiach nádorovej bunky.

Biotechnológie sú založené na imunomagnetickej separácii, ktorá kombinuje vlastnosti antigénov na povrchu epitelených buniek a špecifických protilátok, ktorých súčasťou sú magnetické častice. Naviazané špecifické antigény s magnetickými časticami sa pomocou magnetického poľa vychytávajú z krvného obehu. Vzhľadom na zložitosť a cenu metódy sa táto metóda v bežnej praxi nepoužíva (2).

Na základe fyzikálnych vlastností sú CTC separované z krvi podľa hustoty, veľkosti a deformovateľnosti. Takto získané nádorové bunky sú ďalej vyšetřované imunohistochemickými alebo imunofluorescenčnými metódami. Tieto metódy majú nízku špecificitu a senzitivitu, zlú stabilitu a bývajú často falošne pozitívne pre záchyt krvných buniek (3). Medzi viacerými používanými metódami jedinou FDA schválenou metódou je CellSearch.

Leukaferéza odstránila nevýhody obidvoch metód. Pomocou leukaferézy získavame CTC vysokej kvality a v dostatočnej kvantite. Takto získané CTC sú vhodné aj na ďalšie následné diagnostické analýzy. Hydro-seq technológiou je možné separovať CTC z krvného obehu s vysokou čistotou bez kontaminácie leukocytmi a erytrocytmi. Táto metóda je založená na jednobunkovom sekvenovaní RNA (single-cell RNA-sequencing) (4).

Klinické využitie

Skríning kolorektálneho karcinómu

Vysoký výskyt a úmrtnosť na KRK možno významne znížiť včasnou detekciou prekursorových adenomatózných

kolorektálnych lézií. V klinickej štúdiu, v ktorej bolo zahrnutých 2 602 jedincov s pokročilými a nepokročilými kolorektálnymi adenómami, sa dokázalo, že odstránenie polypov malo za následok 53 % zníženie úmrtnosti súvisiacej s KRK. Ďalšie štúdie zistili, že s 1 % zvýšením miery detekcie kolorektálnych adenómov je spojené až 3 % zníženie rizika vzniku KRK (5). Prvá prospektívna štúdia, ktorá potvrdila vysokú senzitivitu prítomnosti CTC aj prekancerózných lézií, bola štúdia Tsaia et al. (6), do ktorej bolo zahrnutých 620 pacientov. Do štúdie boli zaradení zdraví jedinci, pacienti s prekancerózou a pacienti s KRK. CTC boli dokázané až u 88 % pacientov s prekancerózou alebo u pacientov s KRK.

Ďalšou možnosťou neinvazívneho skríningu KRK sú nádorové klustre, respektíve nádorové zhľuky. Nádorové zhľuky pozostávajú z nádorových endotelových buniek. Tieto zhľuky exprimujú epitelené aj mezenchýmové markery. Izoláciou týchto zhľukov môžeme odlišiť zdravých jedincov od pacientov s kolorektálnym karcinómom s vysokou presnosťou. Výsledky naznačujú, že cirkulujúce endotelové zhľuky buniek by sa mohli použiť ako prostriedok na neinvazívny skríning kolorektálneho karcinómu (7). Na rozdiel od CTC môžu endotelové bunkové zhľuky poskytovať dôležité informácie o základnej vaskularite nádoru v čase diagnózy, počas liečby a priebehu choroby (8).

Staging kolorektálneho karcinómu

Viaceré klinické štúdie potvrdili, že počet CTC v organizme priamo koreluje so štádiom ochorenia a s predpokladaným celkovým preživaním. V klinickej štúdiu, ktorej cieľom bolo vyhodnotenie prognostického významu počtu CTC pri lokalizovanom a metastatickom kolorektálnom karcinóme, bolo zaradených 75 pacientov. Stanovenie počtu CTC bolo realizované pomocou kvantitatívnej imunofluorescenčnej metódy na začiatku a jeden mesiac po začatí chemoterapie. Pozitívny počet CTC malo 28 % pacientov, títo pacienti mali horšiu prognózu v porovnaní s pacientmi s negatívnym počtom CTC (celkové prežívania – OS: 36,2 mesiaca oproti 61,6 mesiaca;

$p = 0,002$). Po chemoterapii počet CTC zostal pozitívny u 22,4 % pacientov. Títo pacienti mali skrátené OS. Prítomnosť CTC po chemoterapii bol nezávislý negatívny prognostický faktor celkového prežívania ($p = 0,03$; pomer rizika: 3,55; 95 % CI: 1,1 – 11,5). Počet CTC pozitívne koreluje aj s veľkosťou nádoru, hĺbkou invázie, postihnutím lymfatických uzlín a aj s prítomnosťou vzdialených metastáz (9).

Prognostický význam CTC

Nedávno publikované klinické štúdie potvrdili, že CTC patria medzi nezávislé prognostické faktory pri KRK. V metaanalýze 36 klinických štúdií, do ktorej bolo zaradených celkovo 3 094 pacientov, sa analyzovalo OS a prežívania bez recidívy (RFS) podľa prítomnosti CTC. CTC boli analyzované z periférnej krvi, kostnej drene a mezenterálnej krvi. Stratifikácia podľa miesta odberu dokázala, že detekcia nádorových buniek v periférnej krvi bola štatisticky významný negatívny prognostický faktor (RFS: 3,06 [1,74 – 5,38]; OS: 2,70 [1,74 – 4,20]). Prognostický význam CTC v kostnej dreni alebo v mezenterálnej krvi nebol v tejto štúdiu potvrdený (10).

Pacienti so včasným KRK, ktorí majú perioperačne detegované CTC, majú zhoršené OS. V klinickej štúdiu, ktorej hlavným cieľom bolo dokázať, že prítomnosť CTC pred operáciou KRK zvyšuje riziko recidívy ochorenia, sa u 24 % pacientov detegovala prítomnosť CTC ≥ 1 CTC/30 ml krvi. Títo pacienti mali signifikantne znížené RFS ($p = 0,014$) a OS ($p = 0,002$). Päťročný RFS klesol zo 75 % na 61 % a 5-ročný OS z 83 % na 69 % u pacientov s pozitívnymi CTC. Pri analýze podľa jednotlivých štádií ochorenia prítomnosť CTC vo všetkých štádiách KRK (štádium I-III) znamenala významné zhoršenie OS a RFS. Detekcie CTC pomáha pri hodnotení rizikovosti ochorenia a pri identifikácii pacientov, ktorí potrebujú ďalšiu adjuvantnú liečbu (11). Niektoré publikované klinické štúdie nedokázali vzťah medzi detegovanými CTC a nepriaznivou prognózou. V prospektívnej štúdiu, do ktorej bolo zaradených 519 pacientov po operácii KRK v štádiu III, nebol zistený žiadny vzťah medzi CTC a celkovým preživaním (12). Rozdielne výsledky v tejto štúdiu sa dajú

vysvetliť malým množstvom detegovaných CTC. Nahradenie periférnej krvi krvou s mezenterálnych žíl môže zvýšiť počet detegovaných CTC. Deneve et al. (13) vo svojej štúdií dokázali zvýšený počet CTC v mezenterálnej krvi v porovnaní s periférnou krvou. Pacienti, ktorí mali zvýšený počet CTC v mezenterálnej krvi, mali horšiu prognózu.

Monitorovanie liekovej rezistencie

Vo viacerých klinických štúdiách bolo dokázané, že pri CTC dochádza k zmene KRAS mutačného stavu v priebehu liečby. Tieto zmeny sa môžu využiť pri monitorovaní účinnosti anti-EGFR liečby. Pri analýze 1 022 vzoriek u pacientov, ktorí boli liečení cetuximabom, bola prítomná KRAS mutácia u 40 % pacientov. Títo pacienti s KRAS mutáciou nemali žiadny benefit z pokračujúcej liečby cetuximabom (počet objektívnych odpovedí 6,7 % verzus 35,8 %). Liečba nebola účinná ani pri KRAS wild type pacientov s PIK3CA mutáciou. Títo pacienti nedosiahli žiadnu objektívnu odpoveď (14).

Detekcia návratu ochorenia

Prítomnosť CTC je spojená s horším prežívaním a so zvýšeným rizikom recidívy pri metastatickom KRK. V retrospektívnej štúdií, v ktorej bolo zaradených 44 pacientov s resekovanými pečenejovými metastázami, sa u všetkých pacientov s pozitívnymi CTC vyskytla recidíva ochorenia. U pacientov s negatívnymi CTC sa recidíva vyskytla len v 65 % (15).

Počet CTC môže odrážať aj aktivitu ochorenia. V klinickej štúdií s 84 pacientmi s metastatickým KRK bolo sledované, či zmena počtu CTC odpovedá aktivite ochorenia. Hlavným cieľom štúdie bolo stanoviť prediktívny a prognostický význam včasnej odpovede na chemoterapiu. Včasná odpoveď bola definovaná pomocou dvoch parametrov. Pomocou PET/CT vyšetrenia (30 % pokles SUV max. v cieľových léziách) a z poklesu CTC (CTC < 3 bunky/ 7,5 ml krvi) po 4 – 6 týždňoch od začatia chemoterapie. Medián prežívania bez progresie bol u včasných respondentov 7,41 mesiaca (95 % CI, 6,05 – 9,11) v porovnaní s 5,37 mesiaca (95 % CI, 4,68 – 6,24) u pacien-

tov bez odpovede ($p = 0,0167$). Pokles hladiny CTC vzhľadom na následnú odpoveď na PET/CT mal 64 % senzitivitu, 70 % špecificitu a 74 % prediktívnu hodnotu. Včasná odpoveď založená na analýze PET/CT a CTC má prognostický a pravdepodobne aj prediktívny význam u pacientov v prvej línii metastatického kolorektálneho karcinómu (16).

Cirkulujúca nádorová DNA

Zdrojom ctDNA v cirkulácii onkologických pacientov sú malígne bunky primárneho nádoru alebo nádorových metastáz. Cirkulujúca nádorová DNA je fragment dvojvláknovej DNA, ktorá v porovnaní s genomickou DNA má výrazne nižšiu molekulovú hmotnosť. Veľkosť fragmentov ctDNA sa pohybuje len medzi 0,18 do 21 kb a nachádzame ich hlavne v periférnej krvi, synoviálnej tekutine, cerebrospinálnom moku a slinách. V extrémne malom množstve sa nachádza aj v stolici a moči. CtDNA obsahuje rovnaké mutácie, protoonkogény, mikrosatelitné alterácie a metylácie DNA ako pôvodná nádorová bunka (7).

CtDNA sa do obehu môže dostať pasívnym alebo aktívnym spôsobom. Pasívny spôsob uvoľňovania ctDNA sa spája s apoptózou a nekrozou nádorových buniek, ktoré boli fagocytované makrofágmi a inými čističami buniek. V prípade aktívneho uvoľňovania boli publikované viaceré štúdie s cieľom objasniť, prečo životaschopné nádorové bunky aktívne uvoľňujú DNA do cirkulácie. Dôvodom je pravdepodobne schopnosť nádorových buniek ovplyvniť transformáciu vnímavých buniek na vzdialených miestach v procese genomických metastáz (1).

Diagnostika ctDNA

Na detekciu ctDNA sa používajú dve základné metódy:

PCR technológia: qPCR (real time PCR) technológia sa používajú hlavne na detekciu génových mutácií v ctDNA. Hlavný problém qPCR metódy je nízka senzitivita vyšetrenia, ktorá je približne 0,1 %. Problém so senzitivitou sa podarilo prekonať pomocou alelovo-špecifickej qPCR analýzy, ktorá je založená na detekcii hot-spot mutácie v sére a plazme onkologického pacienta. Senzitivita tej-

to metódy sa pohybuje medzi 0,014 % až 0,004 %. Ďalšou možnosťou detekcie mutácií v DNA je dPCR (digital polymerase chain reaction). V porovnaní s PCR je pri dPCR vzorka rozdelená na veľký počet oddielov, ktoré sú analyzované jednotlivo. Táto separácia umožňuje presnejšiu analýzu nukleových kyselín.

Sekvenovanie novej generácie (NGS – next generation sequencing):

NGS je známe aj ako masívne paralelné sekvenovanie a umožňuje analýzu veľkého objemu dát v jednom teste. V porovnaní s dPCR je možné analyzovať väčšie časti genómu a detekciu viacnásobných mutácií s väčšou senzitivitou. Na analýzu je potrebné len malé množstvo DNA. Nevýhodou tohto testu v porovnaní s PCR je nižšia senzitivita pri detekcii vzácných mutácií (7).

Klinické využitie

Skríning kolorektálneho karcinómu

Priemerná koncentrácia sérovej ctDNA plazme je 25- až 50-krát vyššia u pacientov s KRK ako v plazme zdravých kontrolných osôb. Tieto rozdiely v koncentracii sa dajú využiť aj pri skríningu KRK. Niekoľko autorov analyzovalo rozdiely v koncentracii ctDNA v plazme medzi pacientmi s rakovinou konečníka a hrubého čreva. Výsledky týchto štúdií nie sú jednoznačné. Vo Frattiniho štúdií pacienti s rakovinou hrubého čreva vykazovali vyššiu koncentráciu ctDNA ako pacienti s rakovinou konečníka. (hrubé črevo: 500 ng/ml, konečník: 250 ng/ml v plazme) (17). V štúdií Cassinotti et al. (18), naopak, pozorovali vyššiu koncentráciu ctDNA u pacientov s rektálnym karcinómom.

Epigenetické zmeny sú jednou z prvých zmien v karcinogéze KRK. Epigenetické mechanizmy rozhodujú o tom, či sa daný gén prejaví alebo bude jeho prejav potlačený. Epigenetické zmeny zahŕňajú metyláciu DNA a modifikácie histónov. Detekciou epigenetických zmien môžeme diagnostikovať včasné štádiá KRK. Pri kolorektálnom karcinóme bolo pozorovaných veľa abnormálnych metylácií génov, ktoré úzko súvisia s patogenézou a prognózou KRK. Výskumy potvrdili, že hypermetylácia

v promótorovej časti génu septin-9, ktorá funguje ako tumor supresorový gén, inhibuje normálnu expresiu génu a následne stratu jeho tumor supresorovej funkcie, čím podporuje vývoj KRK. SEPT9 DNA je marker metylácie DNA. Senzitivita tohto cirkulujúceho markera je až 87 % v prvom štádiu KRK, 84 % v druhom štádiu KRK a 90 % vo všetkých štádiách KRK. Zmeny metylácie ctDNA môžu byť využité aj ako zdroj tkaniva na diagnostiku KRK (19).

Viacere klinické štúdie potvrdili, že nádorom vyvolané zmeny metylácie DNA môžu byť zistené v plazme dva roky pred klinickým diagnostikovaním zhubného nádoru (7).

Staging kolorektálneho karcinómu

Analýzou ctDNA v rôznych štádiách KRK sa dokázalo, že koncentrácia ctDNA sa zvyšuje so štádiom ochorenia. V štúdií Yang et al. (20) sa analyzovali mutácie a koncentrácie ctDNA u 47 pacientov vo včasnom a v pokročilom štádiu KRK. Analýza sa realizovala pomocou cieľného sekvenovania, ktorá pokrývala 50 nádorových génov. Pacienti v štádiu IV mali signifikantne vyššiu koncentráciu ctDNA ako pacienti v I. štádiu. V štádiu I bol priemerný počet mutácií 5 a v štádiu IV až 8 mutácií na jedného pacienta. Výsledky ukázali, že TP53, PIK3CA, APC, KRAS boli najčastejšie mutovanými génmi. Alterácia týchto génov, ktoré sú zapojené do aktivácie EGFR, vedie k rezistencii na anti-EGFR liečbu. Preto sledovanie týchto mutácií môže ovplyvniť manažment liečby KRK ešte pred vznikom rádiologickej progresie ochorenia. Zvýšená koncentrácia ctDNA pozitívne korelovala aj s veľkosťou nádoru. Okrem toho sa potvrdilo, že detekcia ctDNA je lepším prediktorom rozsahu ochorenia v porovnaní s piatimi bežne používanými nádorovými onkomarkermi (CEA, AFP, Ca19-9, Ca72-4, Ca 125). Detekcia CTC a ctDNA v budúcnosti môže rozšíriť štandardnú TNM klasifikáciu. Bol navrhnutý koncept „TNMB“ klasifikácie, kde by bola tekutá biopsia pridaná ku konvenčnej klasifikácii KRK.

Prognostický význam ctDNA

Viacere štúdie preukázali štatisticky významnú koreláciu medzi

štádiom ochorenia a prítomnosťou nádorovo asociovaných genetických zmien v krvi pacientov s kolorektálnym karcinómom. Pri metaanalýze 10 klinických štúdií, ktorá analyzovala 1 076 pacientov s metastatickým KRK, sa potvrdilo, že pacienti s nižšími hladinami ctDNA majú dlhšie celkové prežívanie (HR = 2,39, 95 % interval spoľahlivosti 2,03 – 2,82, p) (21). V retrospektívnej štúdií s 97 pacientmi bola zvýšená hladina ctDNA spojená s horším OS a s vyššou mutačnou záťažou, (OS: 18,07 mesiaca vs 28,5 mesiaca, p = 0,0087). Hladina ctDNA pozitívne korelovala so skráteným celkovým prežívaním u pacientov s KRAS/BRAF mutáciou (p = 0,0052), zatiaľ čo u pacientov s KRAS / BRAF WT (p = 0,67) sa tento prognostický význam nepotvrdil (22).

ctDNA ako diagnostický biomarker

Jednými z najviac študovaných genetických zmien vo vzťahu k nádorovým ochoreniam sú mutácie RAS génu. RAS je protoonkogén a mutácie v tomto géne vedú ku konštitutívnej aktivácii EGFR signalizačnej dráhy, ktorá vedie k nekontrolovateľnej bunkovej proliferácii. RAS gén sa vyšetruje z nádorového tkaniva alebo z ctDNA. Stanovenie RAS génu z ctDNA v porovnaní s tkanivovým vyšetrením má vyššiu senzitivitu aj špecificitu. Táto vysoká senzitivita a špecificita bola potvrdená v Bettogowdovej štúdií (23), v ktorej bolo vyšetrených 206 vzoriek periférnej krvi na prítomnosť mutácií KRAS génu pacientov s KRK. Špecificita ctDNA bola 99,2 % a senzitivita 87,2 %. U pacientov s metastatickým ochorením, u ktorých je vyššia miera detekcie ctDNA, bola senzitivita stanovenia až 100 %.

Ďalšie využitie ctDNA je v monitorovaní RAS a BRAF mutácií v priebehu anti-EGFR liečby. *In vitro* a *in vivo* analýzy ctDNA dokázali, že blokovanie EGFR dráhy vedie k rýchlej tvorbe KRAS a NRAS mutácií. Tieto mutácie sú prítomné skôr, než sa dokáže progresia ochorenia štandardnými metódami. Produkcia RAS mutácií výrazne klesá po ukončení anti-EGFR liečby. Po určitom čase nádorové bunky môžu obnoviť svoju senzitivitu na liečbu. ctDNA sa môže použiť na dynamické monitorovanie RAS

mutácií a poskytnúť podklad na opakované začatie anti-EGFR liečby. V štúdií CORRECT pri analýze mutácií KRAS, PIK3CA a BRAF v DNA plazme získanej od 503 pacientov s metastatickým kolorektálnym karcinómom sa KRAS mutácia vyskytla až v 48 %. Všetci títo pacienti boli liečení anti-EGFR liečbou (24).

CTC sa tiež môžu použiť na určenie genotypu nádoru. Zhoda mutačného stavu KRAS medzi nádorovým tkanivom a CTC je približne 84 %. Pri BRAF mutácii je táto zhoda až 90 % (7).

Detekcia návratu ochorenia

V súčasnosti sa na sledovanie pacienta po ukončení onkologickej liečby používajú rádiologické zobrazovacie metódy a hladiny onkomarkerov. Senzitivita týchto vyšetrení na detekciu MRD je však nízka. CtDNA má krátky biologický polčas, ktorý sa pohybuje okolo dvoch hodín. Preto hladiny ctDNA môžu aktuálne v čase hodnotiť prítomnosť nádoru v organizme a rýchlo odhaliť prítomnosť MRD (7). Prítomnosť ctDNA u pacientov v II. štádiu KRK, po chirurgickej liečbe, je spojená s výrazne horšou prognózou. Rádiologická recidíva bola potvrdená len u 9,8 % pacientov, ak mali peroperačne negatívne hladiny ctDNA. U pacientov s pozitívnou hladinou ctDNA sa recidíva ochorenia potvrdila až u 78 % pacientov (25).

Pre pacientov po resekcii KRK v súčasnosti neexistuje optimálny „surveillance“ protokol. V klinickej štúdií, ktorá zahŕňala 58 pacientov s KRK v štádiu ochorenia I až III, sa porovnávala ctDNA s konvenčným spôsobom sledovania ochorenia (CT vyšetrenie a hladiny CEA). Počet recidív u pacientov s pozitívnymi hladinami ctDNA bol 77 %. Pozitívna ctDNA predchádzala rádiologickej a klinickej recidíve v mediáne troch mesiacov. U žiadneho pacienta s negatívnou hladinou ctDNA sa relaps ochorenia nepotvrdil (26).

Cirkulujúca nádorová mikroRNA

MikroRNA (miRNA) sú jednovláknové reťazce nekódujúcej RNA s dĺžkou 21-23 nukleotidov, ktoré sa podieľajú na regulácii génovej expresie. Výskumy naznačujú, že miRNA je významný me-

Tabuľka. Perspektívne klinické využitie miRNA (upravené podľa 7)

Typ miRNA	Klinické využitie
miR-200b	Amplifikuje rastové faktory na susedné alebo vzdialené nádorové bunky, čím dochádza k zvýšenej proliferácii nádorových buniek KRK.
miR-25-3p	Má významnú úlohu pri tvorbe metastáz tým, že zvyšuje vaskulárnu permeabilitu a angiogenézu. Hladiny miR25-3p sú výrazne nižšie u pacientov s KRK, ktorí nemajú prítomné metastázy.
miR150-5p	Je nezávislý prognostický faktor pri KRK. Pacienti so zvýšenými hladinami miR150-5p majú menej diferencovaný nádor a častejšie nádor s pozitívnymi lymfatickými uzlinami. Pacienti s nízkymi hladinami majú signifikantne dlhšie prežívanie ako pacienti s vysokými hladinami.
miR-21, miR-1246, miR-1229-5p, miR-96-5p	Môžu mať využitie na identifikáciu pacientov s chemorezistentným KRK. U pacientov s chemorezistentnou chorobou boli hladiny týchto miRNA výrazne vyššie ako u pacientov s chemosenzitívnou chorobou. Dá sa predpokladať, že v budúcnosti sa stanú novými cieľmi liečby liekovej rezistencie.

diátor bunkovej komunikácie, ktorá podporuje progresiu a metastázovanie KRK. Dokázalo sa, že existuje veľký počet exozomálnych miRNA, ktoré majú dôležitú úlohu pri diagnostike a liečbe KRK.

Diagnostika miRNA (27)

Microarray analýza: táto analýza je založená na princípe alela špecifickej hybridizácie (párovanie komplementárnych báz nukleotidov). Hlavnou výhodou tejto metódy je možnosť jej využitia v skríningu. Touto metódou nie je možné stanovenie kvantitatívnych hodnôt miRNA.

Sekvenovanie novej generácie: umožňuje skríning všetkých miRNA z jednej vzorky bez ohľadu na to, či je ich sekvencia známa alebo nie.

qPCR (real time PCR): je najčastejšie používanou metódou na validáciu expresie miRNA. Hlavnou výhodou tejto metódy je v tom, že je možné kvantitatívne stanovenie miRNA s vysokou citlivosťou. Nevýhoda tejto metódy spočíva v kvantifikácii iba niekoľkých miRNA súčasne.

Klinické využitie

Celkovo sú exozomálne miRNA len komplementárnym nástrojom tekutej biopsie KRK. Ich širšiemu použitiu stále bráni množstvo technických problémov. Hlavným problémom je nízka čistota exozomálnej miRNA, ktorá je spôsobená zlým odberom vzoriek, skladovaním, transportom a technickými problémami pri detekcii exozomálnych vezikúl. Očakávajú sa ďalšie štúdie, ktoré určia presnú úlohu exozomálnych miRNA pri KRK. Budúce perspektívne využitie miRNA zobrazuje tabuľka.

Záver

Tekutá biopsia je dynamicky sa rozvíjajúca neinvazívna metóda. Tekutá biopsia je pojem určený na analýzu cirkulujúcich nádorových buniek, CtDNA, miRNA a iných biomarkerov, ktoré sú získané z periférnej krvi, moču, pleurálneho výpotku, ascitu alebo z cerebrospinálnej tekutiny. Tekutá biopsia má potenciál na široké klinické využitie pri KRK.

Tekutú biopsiu je možné použiť na skríning KRK. Prítomnosť CTC, nádorových klustrov alebo epigenetické zmeny v CtDNA môžu odlišiť zdravých jedincov od pacientov s kolorektálnym karcinómom.

Detekcia CTC a CtDNA môže v budúcnosti rozšíriť štandardnú TNM klasifikáciu.

Tekutá biopsia poskytuje aj prognostické a prediktívne údaje, ktoré je možné použiť pri detekcii MRD. Napriek presvedčivým výsledkom klinických štúdií nie všetky klinické štúdie prognostický význam CTC potvrdili. Počet CTC v periférnej krvi je extrémne malý. Proces získavania CTC je zložitý a je ťažké zväčšiť počet buniek analyzovaných buniek. V mezenterálnej krvi je možné stanoviť vyšší počet CTC, ale prognostický význam CTC v mezenterálnej krvi nebol vo všetkých štúdiách potvrdený.

Pri sledovaní liekovej rezistencie pri KRK má rozhodujúcu úlohu stanovenie RAS génu. Stanovenie RAS génu z ctDNA v porovnaní s tkanivovým vyšetrením má vyššiu senzitivitu aj špecificitu. CtDNA je možné použiť aj na monitorovanie RAS a BRAF mutácií v priebehu anti-EGFR liečby. V súčasnosti sa na sledovanie pacienta po ukončení onkologickej liečby používajú rádiologické

zobrazovacie metódy a hladiny onkomarkerov. Hladiny ctDNA vzhľadom na krátky biologický polčas môžu presnejšie a rýchlejšie odhaliť prítomnosť MRD.

Problémom zostáva biologický podklad ctDNA. CtDNA vzniká pri apoptóze a nekróze nádoru a do krvného obehu sa dostáva autofágiou. K falošne pozitívnym výsledkom dochádza pri zbere cirkulujúcich epitelových a krvných buniek. Je nutné stanoviť štandardizované metódy zberu vzoriek a ich spracovania.

Existuje veľký počet exozomálnych miRNA, ktoré majú dôležitú úlohu pri diagnostike a liečbe KRK, ale ich klinický význam je nutné ešte potvrdiť v ďalších štúdiách.

Napriek pokrokom vo vývoji tekutej biopsie pre širšie použitie v klinickej praxi sú nutné rozsiahlejšie multicentrické štúdie, ktoré definujú využitie tejto metódy. Očakáva sa, že v blízkej budúcnosti sa určia presné indikácie využitia tekutej biopsie, ktoré nám pomôžu v manažmente pacienta s KRK.

Literatúra

- Sedláčková T, Minárik G, et al. Cirkulujúce nádorové bunky ako markery využiteľné pri manažmente pacientov s nádorovými ochoreniami. *NewsLab*. 2018;9(2):108-112.
- Arya SK, Lim B, Rahman AR. Enrichment, detection and clinical significance of circulating tumor cells. *Lab on a Chip*. 2013;13(11):1995-2027.
- Li Y, Wu S, Bai F. Molecular characterization of circulating tumor cell from bench to bedside. *Seminars in Cell Developmental Biology*. 2017;75:88-97.
- Cheng YH, Chen YC, Lin E, et al. Hydro-Seq enables contamination-free high-throughput single-cell RNA sequencing for circulating tumor cells. *Nature Communications*. 2019;10(1):2163.
- Tsai WS, You JF, et al. Novel Circulating Tumor Cell Assay for Detection of Colorectal Adenomas and Cancer. *Clinical and Translational Gastroenterology*. 2019;10(10):e00088.
- Tsai WS, Nimgaonkar A, Segurado O, et al. Prospective clinical study of circulating tumor cells for colorectal cancer screening. *Journal of Clinical Oncology*. 2018;36(Suppl. 4):556.
- Ding Y, Li W, Wang K, et al. Perspectives of the Application of Liquid Biopsy in Colorectal Cancer. *Hindawi BioMed Research International*. 2020; Article ID 6843180.
- Cima I, Kong SL, Sengupta D, et al. Tumor-derived circulating endothelial cell clusters in colorectal cancer. *Science Translational Medicine*. 2016;345(8):345-389.
- Romiti A, Raffa S, Di Rocco R, et al. Circulating tumor cells count predicts survival in colorectal cancer patients. *Journal of Gastrointestinal and Liver Diseases*. 2014;23(3):279-284.
- Rahbari NN, Aigner M, Thorlund K, et al. Meta-analysis shows that detection of circulating tumor cells indicates poor prognosis in patients with colorectal cancer. *Gastroenterology*. 2010;138(5):1714-1726.
- van Dalum G, Stam GJ, Scholten LFA, et al. Importance of circulating tumor cells in newly diagnosed colorectal cancer. *International Journal of Oncology*. 2015;46(3):1361-1368.

12. Sotelo MJ, Sastre J, Maestro ML, et al. Role of circulating tumor cells as prognostic marker in resected stage III colorectal cancer. *Annals of Oncology*. 2015;26(3):535-541.
13. Denève E, Riethdorf S, Ramos J, et al. Capture of viable circulating tumor cells in the liver of colorectal cancer patients. *Clinical Chemistry*. 2013;59(9):1384-1392.
14. Jacobson RA, Munding E, Hayden DM, et al. Evolving Clinical Utility of Liquid Biopsy in Gastrointestinal Cancers. *Cancers*. 2019;11(8):1164.
15. Arrazubi V, Mata E, Antelo ML, et al. Circulating tumor cells in patients undergoing resection of colorectal cancer liver metastases. Clinical utility for long-term outcome: a prospective trial. *Annals of Surgical Oncology*. 2019;9(26):2805-2811.
16. Ma B, King AD, Leung L, et al. Identifying an early indicator of drug efficacy in patients with metastatic colorectal cancer—a prospective evaluation of circulating tumor cells, 18F-fluorodeoxyglucose positron-emission tomography and the RECIST criteria. *Annals of Oncology*. 2017;7(28):1576-1581.
17. Frattini M, Gallino G, Pilotti S, et al. Quantitative and qualitative characterization of plasma DNA identifies primary and recurrent colorectal cancer. *Cancer Lett*. 2008;263(2):170-181.
18. Cassinotti E, Boni L, Segato S, et al. Free circulating DNA as a biomarker of colorectal cancer. *Int. J. Surg*. 2013;11(Suppl 1):S54-S57.
19. Warren JD, Xiong W, Bunker AM, et al. Septin 9 methylated DNA is a sensitive and specific blood test for colorectal cancer. *BMC Medicine*. 2011;9(1):133.
20. Yang YC, Wang D, Jin L, et al. Circulating tumor DNA detectable in early- and late-stage colorectal cancer patients. *Bioscience Reports*. 2018;38(4):BSR20180322.
21. Spindler KG, Boysen AK, Pallisgård N, et al. Cell-free DNA in metastatic colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *The Oncologist*. 2017;22(9):1049-1055.
22. El MS, Moulriere F, Du Manoir S, et al. Circulating DNA as a strong multimarker prognostic tool for metastatic colorectal cancer patient management care. *Clinical Cancer Research*. 2016;22(12):3067-3077.
23. Bettgowda C, Sausen M, Leary RJ, et al. Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Science Translational Medicine*. 2016;224(6):224-224.
24. Tabernero J, Lenz HJ, Siena S, et al. Analysis of circulating DNA and protein biomarkers to predict the clinical activity of regorafenib and assess prognosis in patients with metastatic colorectal cancer: a retrospective, exploratory analysis of the CORRECT trial. *The Lancet Oncology*. 2015;16(8):937-948.
25. Tie J, Wang Y, Tomasetti C, et al. Circulating tumor DNA analysis detects minimal residual disease and predicts recurrence in patients with stage II colon cancer. *Science Translational Medicine*. 2016;346(8):346-392.
26. Wang Y, Li L, Cohen JD, et al. Prognostic potential of circulating tumor DNA measurement in postoperative surveillance of nonmetastatic colorectal cancer. *JAMA Oncology*. 2019;5(8):1118-1123.
27. De Planell-Saguer M, Rodicio MC. Detection methods for microRNAs in clinic practice. *Clinical Biochemistry*. 2013;46(10-11):869-878.

MUDr. Marian Streško, PhD.
Onkologická klinika FN Trnava
Žarnova 7, 917 01 Trnava
marian.stresko@fntr.sk

