

# Tekuća biopsija i njezin značaj u hematologiji

---

**Hadžisejdić, Ita; Katunarić, Miljenko; Valković, Toni; Jonjić, Nives**

*Source / Izvornik:* **Bilten Krohema, 2018, 10, 23 - 25**

**Journal article, Published version**

**Rad u časopisu, Objavljena verzija rada (izdavačev PDF)**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:184:191159>

*Rights / Prava:* [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-05-20**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Medicine - FMRI Repository](#)



## Tekuća biopsija i njezin značaj u hematologiji

Ita Hadžisejdić<sup>1</sup>, Miljenko Katunarić<sup>2</sup>, Toni Valković<sup>3</sup>, Nives Jonjić<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Zavod za patologiju, KBC Rijeka

<sup>2</sup> Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet

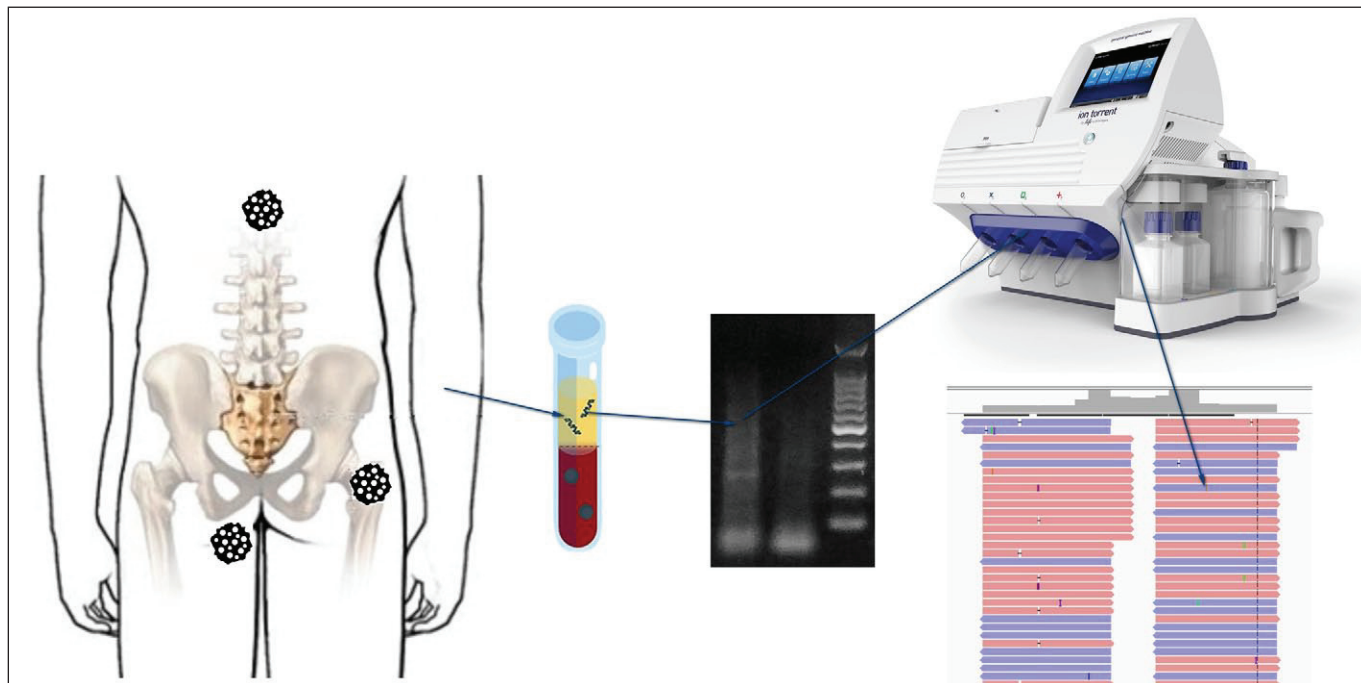
<sup>3</sup> Zavod za hematologiju, Klinika za internu medicinu, KBC Rijeka

E-pošta: ita.hadzisejdic@medri.uniri.hr

Slobodne, cirkulirajuće molekule DNK, izvan stanica, u ljudskoj plazmi opisane su još 1948. godine no njihova klinička primjena po prvi puta je započela pola stoljeća kasnije, upotrebom u prenatalnom probiru (1,2). Udio slobodne cirkulirajuće DNK, kod pacijenata s hematološkim i solidnim tumorima, je znatno veći nego kod zdravih osoba upravo zbog većeg umnažanja i propadanja stanica. Udio slobodne cirkulirajuće DNK koji nosi tumor specifične promjene naziva se „cirkulirajućom tumorskom“ DNK (ctDNK), a ona se otpušta u cirkulaciju upravo zbog nekroze i apoptoze tumorskih stanica, a manjim dijelom putem aktivne sekrecije (3).

Za evaluaciju genetičkog materijala tumora potreban je biopsijski uzorak tkiva tj. koštana biopsija ili biopsija zahvaćenog limfnog čvora odnosno me-

kog tkiva. Uzimanje bioptata je invazivan postupak s mogućim razvojem komplikacija, ali isto tako i limitirajući, jer dobivamo genetski materijal iz samo jednog dijela tumorskog tkiva uzimajući u obzir intratumoralnu heterogenost. S druge pak strane, ctDNK predstavlja mješavinu nukleinskih kiselina iz sveukupnog tumorskog tkiva, kako primarnog tako i metastatskih sjela, a samim time i reprezentativniji „genomski“, tumorski materijal. Venepunkcija i dobivanje uzorka slobodne DNK je minimalno invazivan postupak koji se može češće ponavljati te tako možemo sigurnije monitorirati tumorsku masu kao i odgovor na terapiju (4). Također treba imati na umu da količina cirkulirajuće DNA u organizmu ovisi i o njenom odstranjivanju iz plazme, filtriranjem krvi u jetri, bubrezima i slezeni te o degradaci-



**Slika 1.** Cirkulirajuća tumorska DNK (ctDNK) otpušta se u krv iz svih tumorskih sjela. Odvajanjem plazme iz periferne krvi izolira se ctDNK koja se u krv otpušta usljed propadanja tumorskih stanica. ctDNK je vidljivo fragmentirana te je prisutna u malim količinama stoga su za analizu takvih uzoraka potrebne analitičke metode izrazito visoke osjetljivosti kao što je NGS (next generation sequencing). Sekvenciranje nove generacije vrši tisuće očitavanja svakog umnoženog nukleotida te ima osjetljivost detekcije mutacija manju od 0,1% što je potrebno da se detektira i manji udio ctDNK u ukupnoj slobodnoj staničnoj DNK.

ji DNK, tako da se vrijeme poluraspada nukleinskih kiselina u krvi kreće od 15 min do 2 sata (5). Stoga se takav uzorak krvi mora što prije dopremiti u laboratorij na izolaciju nukleinskih kiselina. Budući da su količine slobodne, cirkulirajuće DNK niske, za analizu takvih uzoraka, potrebne su i analitičke metode izrazito visoke osjetljivosti kao što su digital PCR (ddPCR, BEAMing) i NGS (next generation sequencing) (Slika 1).

Precizno monitoriranje ctDNK je značajno zbog ranog otkrivanja relapsa bolesti odnosno ciljnih mutacija što može značajno utjecati na ishod liječenja pacijenata oboljelih od hematoloških malignih bolesti. Prva studija koja je evaluirala mutacije na cirkulirajućoj slobodnoj DNK hematoloških pacijenata je bila provedena na oboljelima od akutne mijeloične leukemije (AML) i mijelodisplastičnog sindroma (MDS) (6). Istraživanje je pokazalo, između ostalog, mutacije u slobodnoj cirkulirajućoj DNK koje nisu bile pronađene u uparenim uzorcima DNK dobivenim iz blasta periferne krvi ili DNK dobivene iz bioptata koštane srži. Autori tog istraživanja su zaključili da plazma može poslužiti kao lako dostupan i koristan materijal za detekciju i praćenje mijeloidnih oboljenja. Također ctDNK može se koristiti i kod pacijenata oboljelih od limfoma pa tako i kod difuznog veliko staničnog B limfoma (DLBCL-a), a u svrhu otkivanja novih mutacija, klonalne evolucije te razvoja rezistencije na terapiju (7). Da bi se otkrile somatske intratumoralne mutacije, Rossi i sur su pokazali da genotipiziranje slobodne cirkulirajuće DNK oboljelih od DLBCL-a je jednako točno i precizno kao i genotipiziranje bioptata istog tumora (7). Mutacije je tako moguće otkriti u realnom vremenu javljanja što omogućava preciznije praćenje klonalne evolucije kao i otkrivanja liječenjem izazvanih rezistentnih mutacija. Značajna prednost takvog praćenja pacijenata, putem ctDNK, pred radiološkim metodama, je što se radiološkim metodama tumor može otkriti kada dosegne veličinu od  $1 \times 10^{12}$  stanica, a trenutačno dostupne metode detekcije ctDNK imaju prag osjetljivosti od  $1 \times 10^6$  stanica (8). Studije pokazuju da 15% pacijenata s DLBCL-om koji su PET (positron emission tomography) negativni, nakon standardne terapije, će razviti relaps bolesti što indirektno ukazuje na prisutnost „mikroskopske“ ostatne bolesti (9).

Studija Scherer i suradnika je pokazala da količina ctDNK kod DLBCL pacijenata prije same terapije ima prognostički značaj (10). Koncentracija ctDNK u plazmi je korelirala s kliničkim parametrima veličine tumorske mase npr serumskom razi-

nom laktat dehidrogenaze (LDH), stadijem bolesti i Internacionalnim Prognostičkim Indeksom (IPI). Najvažnija spoznaja proizašla iz ove studije je činjenica da ctDNK omogućava pouzdanu genotipizaciju tumorske DNK bez potrebe za dobivanjem bioptičkog materijala. Schere i sur su pokazali, da ako je udio frakcije nekog alela 20%, moguće je identificirati gotovo sve pojedinačne nukleotidne varijante u genima pokretačima iz uzoraka DNK dobivenih iz plazme. Autori su u ovoj studiji također pokazali da su pacijenati kod kojih je došlo do transformacije iz indolentnog u agresivni oblik limfoma imali veće koncentracije ctDNK i veći broj jedinstvenih mutacija u plazmi prije same kliničke pojave znakova za transformaciju što bi značilo da će „tekuća biopsija“ moći pomoći kod predikcije tj odabira pacijenata koji su u povećanom riziku od prelaska u agresivniji oblik limfoma.

U zaključku, ono što tekuća biopsija donosi je mogućnost procjene i praćenje maligne bolesti na molekularnom nivou, daje nam na uvid molekularne informacije iz sveukupnog tumorskog tkiva koje ne možemo dobiti iz samo jednog područja tkiva biopsijom. Biopsija jednog područja tumorskog tkiva donosi samo dio „molekularnih“ informacija tumora i ne obuhvaća „prostorno“ heterogenu populaciju stanica (sub-klonovi tumorskih stanica koji se nalaze na različitim područjima) odnosno njen genetski materijal. Tekuća biopsija je osjetljivija i preciznija metoda te daje znatno više informacija važnih za prognozu i liječenje pacijenata. Sve ovo ukazuje da su opravdani naponi da se uključi precizno ctDNK praćenje u liječenje oboljelih od malignih hematoloških oboljenja. Značaj tekuće biopsije u istraživanjima je davno prepoznat međutim da bi se ona upotrebljavala u kliničkoj praksi potrebno je još vremena. Da bi tekuća biopsija postala sastavni dio kliničke prakse potrebna je standardizacija pre-analitičkih (npr. prikupljanje krvi) i analitičkih metodologija (DNA izolacija i kvantifikacija, količina ctDNK), te osjetljive i klinički dostupne metode analize takvih uzoraka. Kod niskih koncentracija mutirane DNK mogući su lažno pozitivni rezultati, kada prisutna aberacija ne odražava tumorski klon ili lažno negativni kada je razina mutacije ispod razine osjetljivosti metoda. Stoga je kontinuirana analitička validacija ctDNK testiranja ključna za etabliranje ctDNK baziranih testova u standardnoj kliničkoj praksi pa tako i u hematologiji.

**Literatura**

1. Mandel P, Metais P. The nucleic acids in blood plasma in humans. *C R Seances Soc Biol Fil.* 1948;142:241-3.
2. Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF, Rai V, Sargent IL, Redman CW, Wainscoat JS. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet.* 1997;350:485-7.
3. Jahr S, Hentze H, Englisch S, Hardt D, Fackelmayer FO, Hesch RD, Knippers R. DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer Res.* 2001;61:1659-65.
4. Patel KM, Tsui DW. The translational potential of circulating tumour DNA in oncology. *Clin Biochem.* 2015;48:957-61.
5. Vogelstein B, Kinzler KW. Digital PCR. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96:9236-41.
6. Vasioukhin V, Anker P, Maurice P, Lyautey J, Lederrey C, Stroun M. Point mutations of the N-ras gene in the blood plasma DNA of patients with myelodysplastic syndrome or acute myelogenous leukaemia. *Br J Haematol.* 1994;86:774-9.
7. Rossi D, Diop F, Spaccarotella E, Monti S, Zanni M, Rasi S, Deambroggi C, Spina V, Brusca A, Favini C, Serra R, Ramponi A, Boldorini R, Foà R, Gaidano G. Diffuse large B-cell lymphoma genotyping on the liquid biopsy. *Blood.* 2017;129:1947-1957.
8. Faham M, Zheng J, Moorhead M, Carlton VE, Stow P, Coustan-Smith E, Pui CH, Campana D. Deep-sequencing approach for minimal residual disease detection in acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 2012;120:5173-80.
9. Adams HJ, Nievelstein RA, Kwee TC. Prognostic value of complete remission status at end-of-treatment FDG-PET in R-CHOP-treated diffuse large B-cell lymphoma: systematic review and meta-analysis. *Br J Haematol.* 2015;170:185-91.
10. Scherer F, Kurtz DM, Newman AM, Stehr H, Craig AF, Esfahani MS, Lovejoy AF, Chabon JJ, Klass DM, Liu CL, Zhou L, Glover C, Visser BC, Poultsides GA, Advani RH, Maeda LS, Gupta NK, Levy R, Ohgami RS, Kunder CA, Diehn M, Alizadeh AA. Distinct biological subtypes and patterns of genome evolution in lymphoma revealed by circulating tumor DNA. *Sci Transl Med.* 2016;8:364ra155