

MOLEKULARNA DIAGNOSTIKA V ONKOLOGIJI

Znan. svet. dr. Srdjan Novaković, univ. dipl. biol.

Oddelek za molekularno diagnostiko, Onkološki inštitut Ljubljana

E: snovakovic@onko-i.si

Povzetek

Klasično klasificiranje in opredeljevanje raka temeljita na določanju izvora rakastih celic, njihovi morfologiji oziroma izražanju značilnih membranskih, citoplazemskih in jedrnih proteinov. Najosnovnejše metode tovrstne diagnostike so mikroskopsko morfološko pregledovanje celic ter imunohistokemično barvanje z različnimi protitelesi. Napredek pri razumevanju mehanizmov nastanka in biologije raka na molekularni ravni je prinesel nova dejstva, ki so narekovala spremembe na tem področju. Sam izvor rakastih celic je sicer še vedno pomemben dejavnik za klasifikacijo raka, ni pa povsem zadosten. Postalo je jasno, da maligni tumorji niso enostaven skupek povsem enako spremenjenih rakastih celic s povsem enakimi lastnostmi, temveč tkiva, sestavljena iz različnih tipov malignih in nemalignih celic, ki medsebojno komunicirajo in regulirajo celične procese. Vsi ti neposredni vplivi na rakavo celico, ki je v osnovi izrazito genetsko nestabilna in zaradi tega dobro prilagodljiva, so vzrok za kopičenje različnih sprememb na molekularnem nivoju v različnih rakastih celicah v istem tumorju. Torej ne glede na dejstvo, da maligni tumorji nastanejo iz ene same spremenjene celice, se njihova genetska zasnova zaradi selektivnih pritiskov in prilagajanja celic zelo hitro spreminja. Rezultat različnih sprememb pa je tudi povsem različno obnašanje navidezno istovrstnih tumorjev ter različen odgovor na enako zdravljenje. Zato molekularno diagnostiko raka čakajo številni izzivi. Od tehničnih - kako učinkovito in natančno zajemati reprezentativne vzorce tkiv, ki bodo verodostojno odražali trenutno stanje v tumorjih, kako zmanjšati agresivnost posegov, kako prilagoditi metode, da bi bile dovolj občutljive, natančne in ponovljive, do strogo strokovnih - natančna opredelitev genov ali panelov genov, ki jih bomo spremljali pri različnih vrstah raka z namenom natančnejše diagnostike, pravilno vrednotenje in določanje napovednih dejavnikov za zdravljenje ali pa ustrezna opredelitev prognostičnih dejavnikov, ki bo temeljila na funkcijah genov v celici.

Uvod

Boljše razumevanje biologije in molekularnobioloških procesov pri nastanku in napredovanju raka je odprlo nove pristope v diagnostiki in zdravljenju bolnikov z rakom. Na obeh področjih (diagnostike in zdravljenja) se pojavljajo konkretni izzivi, ki so z vsakim novim dognanjem številčnejši. To pomeni, da v diagnostiko raka uvajamo vse več molekularnobioloških označevalcev, ki omogočajo učinkovitejšo razdelitev (stratifikacijo) bolnikov, kar posledično vodi k bolniku bolj prilagojenemu zdravljenju. Po drugi strani pa je uvajanje novih bioloških zdravil odvisno od določanja napovednih bioloških označevalcev, kar pomeni, da je z razvojem vsakega zdravila (ali skupine zdravil) potrebna tudi uvedba novih bioloških označevalcev. Kakšna so pričakovanja po uvedbi novih molekularnobioloških diagnostičnih oz. novih bioloških označevalcev zaradi uvajanja bioloških zdravil, lahko ocenimo na osnovi razvojnih trendov na tem področju. Trenutno je več kot 20 % raziskav usmerjenih samo v osem kinaznih signalnih poti (VEGF/VEGFR, PI3K, HER2, mTOR, EGFR, MET, PDGF/PDGFR in KIT). Če pri tem upoštevamo, da je kinaz v humani celici več kot 500 (do danes opredeljenih 518), postane jasno, koliko je še možnih tarč za kinazne inhibitorje in kakšne bodo potrebe po uvedbi testov za številne nove molekularnobiološke označevalce (da ne omenjamo drugih onkogenov in tumor-supresorskih proteinov, ki so možne tarče za razvoj novih zdravil). Naslednje pomembno dejstvo v povezavi z uvajanjem novih zdravil je vezano na nastanek odpornosti proti zdravilom in potrebe po določanju specifičnih sprememb v tarčnih genih, na osnovi katerih bo internist onkolog lahko opredelil bolnike, ki bodo še ustrezni za zdravljenje z določenim zdravilom. Ne glede na to, kakšno bo število novih molekularnobioloških testov, ki jih bomo vpeljali v onkološko diagnostiko, je njihova uvedba upravičena tako z vidika bolnikove koristi kot tudi z vidika zmanjšanja stroškov zdravljenja z dragimi zdravili. Koristi, ki jih imajo bolniki od testiranja, so predvsem posameznemu bolniku prilagojeno učinkovito zdravljenje in manj neželenih stranskih učinkov. Stroški testiranja pa so nekaj desetkrat nižji od stroškov zdravljenja in že s ceno zdravil za enega bolnika, ki bi prejel zanj neustrezno (neučinkovito) zdravilo, lahko pokrijemo celoletne stroške testiranja za določene skupine bolnikov.

V tem kratkem pregledu se bom omejil na predstavitev vloge molekularnobioloških označevalcev ter na pričakovane metodološke razvojne trende v onkološki diagnostiki.

Molekularnobiološki označevalci in njihova vloga v onkološki diagnostiki

Rakaste celice se razlikujejo od normalnih na različnih nivojih in zato kot biološke označevalce za rakaste celice lahko uporabljamo spremembe v morfologiji celic, njihovih biokemičnih procesih ali genetske spremembe (mole-

kularnobiološki označevalci). Genetske spremembe, ki predstavljajo večjo verjetnost za razvoj raka, ali tiste, ki so značilne za rakave celice, določamo v različnih bioloških vzorcih. Dedne oblike raka opredeljujemo na osnovi prisotnosti mutacij ali epigenetskih sprememb v vseh celicah v organizmu in zato uporabljamo DNA, izolirano iz vzorcev krvi (iz levkocitov), medtem ko genetske spremembe pri sporadičnih oblikah raka trenutno ugotavljamo na DNA, izolirani iz tumorskega tkiva.

Področje molekularnobioloških označevalcev je obsežno in opredelitve in razdelitve molekularnobioloških označevalcev niso povsem usklajene, saj v literaturi redko najdemo dorečeno in s konsenzom sprejeto klasifikacijo označevalcev. Vzrokov za nedorečenost je več – vsekakor sodijo med pomembnejše prav velika heterogenost teh označevalcev ter »mladost vede«, ker nimamo na voljo dovolj podatkov za standardizacije metod. Prav tako je velikokrat težko opredeliti posamezen označevalec izključno na osnovi ene klasifikacije (npr. kot diagnostični), saj ima istočasno lahko tudi elemente prognostičnega ali napovednega označevalca. To so bili razlogi za dvojno klasifikacijo označevalcev v tem prispevku.

Če se omejimo na molekularnobiološke označevalce v najožjem smislu (in izpustimo citogenetiko), potem lahko razdelimo področje glede na vrsto spremembe:

- 1) označevalce, ki so produkt sprememb v strukturnih delih genoma - polimorfizmi, različne mutacije;
- 2) označevalce, ki odražajo nivo izražanja genov brez poseganja v samo strukturo produktov, ki jih ti geni kodirajo. Pri slednjih imam v mislih najprej epigenetske vplive na metilacijski status in znotrajcelične regulatorne mehanizme v sistemu delovanja mikro-RNA (miRNA). Gre za kratke nekodirajoče fragmente RNA (18–25 nukleotidov), ki so zmožni regulacije izražanja različnih pomembnih genov – od tistih, ki uravnavajo delitev celice, razvoj in diferenciacijo, pa do tistih, ki so nujni za apoptozo. Odvisno od tega, na katero mRNA se veže, lahko miRNA deluje kot klasičen tumor-supresor ali kot onkogen. Trenutno je v podatkovni bazi opisanih nekaj čez 1.000 humanih genov miRNA.

Naslednja razdelitev molekularnobioloških označevalcev temelji na klinični uporabni vrednosti označevalcev. Pri tem razlikujemo pet skupin molekularnobioloških označevalcev:

- germinalni z znanim patološkim vplivom

Gre za dokazovanje germinalnih mutacij v posameznih genih, ki so dokazano povezani z nastankom raka. Dober primer so BRCA1/2 (rak dojke in jajčnikov), APC (rak debelega črevesa in danke), CDK4 (melanom).

- diagnostični označevalci

Označevalci, ki kažejo na izvor celic in so največkrat nepogrešljivi pri diagnostiki. Ponavadi gre za izražanje genov, ki kodirajo za različne membranske proteine – npr. za imunoglobuline ali T-celične receptorje. Uporabljamo jih za določanje klonalnega izvora celic ali za sledenje minimalnega ostanka bolezni (MRD) pri hematoloških rakih. V zadnjih letih je bila na osnovi molekularnih označevalcev spremenjena tudi klasifikacija hematoloških rakov (levkemije in limfomi) ter nekaterih solidnih tumorjev (npr. rak dojke, jajčnikov, debelega črevesa in danke, melanoma, rak pljuč).

- prognostični

Vloga teh označevalcev je napoved poteka bolezni – prognoze (»dobra« - »slaba«) - ne glede na zdravljenje. Kot označevalce najpogosteje uporabljamo izražanje posameznega gena ali t. i. profilov genov. Primer je MammaPrint – na osnovi izražanja sedemdesetih genov opredelimo verjetnost razvoja metastaz raka dojke po operativni odstranitvi primarnega tumorja.

Nekoliko bolj zapletena je vloga genetskega profila pri difuznih velikoceličnih B-limfomih - DVCBL. Ta panel lahko označimo kot diagnostično-klasifikacijski panel, saj omogoča ločevanje DVCBL na dve glavni skupini - tip GCB (germinal center B-cell-like), tip ABC (activated B-cell-like). Prav tako lahko rečemo, da je prognostičen, ker dejansko napoveduje razliko v preživetju med GCB- in ABC-tipom DVCBL. Hkrati pa je ta panel tudi napovedni označevallec, saj napoveduje odgovor na zdravljenje s kemoterapijo (boljši odgovor na kemoterapijo pri tipu GCB).

Kot prognostične označevalce lahko uporabimo tudi določene strukturne spremembe, kot je mikrosatelitska nestabilnost – MSI. Močno izražena MSI (MSI-H) pomeni za bolnike z rakom debelega črevesa in danke boljšo prognozo, vendar tudi napoved slabšega odgovora na zdravljenje s 5-FU.

Za določene vrste tumorjev se je kot prognostični dejavnik izkazal tudi mutacijski status posameznih genov - npr. mutiran BRAF kot negativni prognostični dejavnik pri bolnikih z rakom debelega črevesa in danke, ki nimajo izrazite mikrosatelitske nestabilnosti v tumorju.

- napovedni

Označevalci, ki napovedujejo verjetnost, da bo bolnik imel korist od določenega zdravljenja oziroma da je zdravljenje z določenim zdravilom zanj sploh ustrezno. Te označevalce imenujemo tudi farmakogenomski označevalci. Primera takih označevalcev sta mutacijski status genov RAS pri zdravljenju bolnikov z metastatskim rakom debelega črevesa in danke z zaviralci receptorjev

za epidermalni rastni dejavnik in prisotnost mutacije v genu BRAF na kodonu V600, ki je predpogoj za zdravljenje bolnikov z metastatskim melanomom s specifičnimi zaviralci kinaz.

- farmakodinamični

Tudi tukaj kot označevalce najpogosteje uporabljamo izražanje panelov genov. Gre za gene, ki predvsem nakazujejo, kakšna je optimalna doza določenega zdravila za doseganje največjega terapevtskega učinka ob minimalnih neželenih učinkih. Prav tako so vse bolj zanimivi genski paneli, ki napovedujejo možnost nastanka odpornosti proti določenim zdravilom.

Kot je razvidno iz pregleda uporabe molekularnobioloških označevalcev, so trendi in pričakovanja v strokovnem delu molekularne diagnostike usmerjeni predvsem v smeri natančne opredelitve vloge sprememb v posameznih genih. Na osnovi tega znanja lahko pričakujemo prehod s posameznih genov na panele genov, saj je rak poligenska bolezen in so interakcije med produkti različnih genov pričakovane. Uvedba primernih panelov genov bo povečala uporabno vrednost molekularne diagnostike za klinične namene. Ker spremembe v enakih genih pri različnih vrstah raka nimajo vedno enakih posledic, bo treba panele genov preveriti in standardizirati na večjem številu vzorcev za različne vrste raka. Kaj to pomeni v klinični praksi, lahko predstavim na primeru raka debelega črevesa in danke. Leta 2008 so bile sprejete smernice za zdravljenje z zaviralci EGFR na osnovi predhodnega testiranja na prisotnost mutacij v genu KRAS. Takratno testiranje je zajemalo določanje mutacij v 12. in 13. kodonu 2. eksona KRAS. Pet let zatem smo testiranje razširili na 3. in 4. ekson gena KRAS ter 2., 3. in 4. ekson v genu NRAS.

Metodologija in tehnologija

Glede na opisane uporabne vrednosti molekularnobioloških označevalcev je posebnega pomena, da so metode, ki jih uporabljamo za določanje genomskih sprememb v tumorjih, robustne, visoko analitsko občutljive, hitre in relativno poceni. To pomeni, da od metod pričakujemo, da so rezultati ponovljivi tako znotraj istega laboratorija kot tudi med različnimi laboratoriji in da omogočajo določanje sprememb tudi, če je delež mutiranih celic v vzorcih nizek. Da bi bile metode klinično uporabne, je k temu treba dodati še sprejemljive časovne okvirje za njihovo izvedbo ter sprejemljivo ceno za zanesljivo opredelitev sprememb, ki jih bomo zapisali kot končen izvid.

Večina metod, ki so bile do pred kratkim edine na voljo (sekvenciranje po Sangerju, pirosekvenciranje, alelno-specifična polimerazna verižna reakcija, fragmentne analize), je dragih in zamudnih in so zato manj ustrezne za dnevno rutinsko uporabo v klinični praksi. Revolucionarno spremembo na tem podro-

čju predstavlja uvedba sekvenatorjev druge ali naslednje generacije (NGS), ki omogočajo obsežno paralelno sekvenciranje. To pomeni, da omogočajo istočasno določanje sprememb v številnih genih v večjem številu vzorcev v sprejemljivem časovnem obdobju. Kot prednosti pred konvencionalnimi metodami je treba še dodati, da tehnologija NGS omogoča obsežno paralelno sekvenciranje iz relativno majhnih vzorcev (majhnih koncentracij DNA ali RNA), da je občutljivost metode večja in da poleg nukleotidnih sprememb tipa SNV in MNV (single and multiple nucleotide variants) omogoča tudi določanje krajših in daljših delecij in insercij ter razlik v številu kopij genov v posameznih vzorcih. Logično je zato NGS na količino pridobljenih informacij mnogo cenejša in hitrejša metoda. Ne glede na prednosti NGS je uvedba te metode v rutinsko molekularno diagnostiko zahtevna naloga, predvsem zaradi kompleksnosti izvedbe in interpretacije rezultatov. Zato je pred uporabo v rutinski diagnostiki potrebna skrbna validacija metode ter preverjanje rezultatov v medlaboratorijskih kontrolnih shemah. Na tržišču so tudi sintetski standardi ali standardizirane celične linije, ki omogočajo validacijo NGS za diagnostiko.

Ko govorimo o možnostih uporabe NGS, pravzaprav govorimo o različnih pristopih k določanju sprememb. Te vključujejo določanje sprememb na znanih, dobro opredeljenih fragmentih (tarčno sekvenciranje), sekvenciranje celotnega eksoma (vseh kodirajočih regij v genomu) ali sekvenciranje celotnega genoma. Za potrebe onkološke molekularne diagnostike, je tarčno sekvenciranje trenutno najbolj uporabno. Razlogov za to je kar nekaj: velika večina informacij, ki jih pridobimo s sekvenciranjem celotnega eksoma ali genoma, je v tem trenutku neuporabnih za interniste onkologe, izvedba sekvenciranja celotnega eksoma ali genoma je v tem trenutku nemogoča iz DNA, izolirane iz vzorcev tumorjev, vključenih v parafin, čas, potreben za izvedbo sekvenciranja celotnega eksoma ali genoma, je predolg, izvedba teh sekvenciranj za rutinske namene je predraga. Na osnovi zapisanega gredo pričakovanja na tem področju v dve smeri: poenostavitve same tehnologije sekvenciranja ter standardizacije postopkov in poenotenja programov za analizo pridobljenih podatkov. Pričakovati je, da bodo nove tehnološke rešitve, kot npr. tehnologija Nanopore, dodatno pocenile sam postopek sekvenciranja in istočasno zagotovile večjo analitsko občutljivost ter ponovljivost metod.

Tekočinske biopsije in njihova možna uporaba v onkološki molekularni diagnostiki

Drugo pomembno metodološko področje je pravilno vzorčenje oziroma zagotavljanje reprezentativnih vzorcev DNA in/ali RNA na najenostavnejši in za bolnika najmanj agresiven način. Skrb za pravilno vzorčenje izhaja iz novih spoznanj o biologiji tumorjev, s katerimi na dnevni ravni dopolnjujemo znanje o raku. Omejil se bom samo na nekatera dejstva, ki narekujejo razmislek pri vzorčenju tumorjev za določanje molekularnobioloških sprememb. Prvo po-

membno dejstvo je, da so rakaste celice v tumorjih v danem trenutku po svoji genetski sestavi zelo heterogene. Drugo, spremembe v genomu rakastih celic se dogajajo hitro, tako da je stanje sprememb ob vzorčenju tumorja in ob izvedbi zdravljenja lahko popolnoma različno. Tretje, spremembe v metastazah so lahko drugačne kot v primarnih tumorjih. Naslednje pomembno dejstvo je, da se, kot posledica prejšnjih navedb, pogosto razvija odpornost proti biološkim zdravilom. Že na osnovi teh podatkov je jasno, da je za ustrezno sliko o stanju sprememb v rakastih celicah treba pri posameznem bolniku zagotoviti večkratno vzorčenje in analizo genetskega materiala. Vprašanje pa je, kako zagotoviti večkratne biopsije tumorjev, ne da bi pri tem zmanjšali bolnikovo udobje in ga dodatno izpostavili tveganjem zaradi dodatnih posegov.

Kot možna rešitev se ponuja uporaba tekočinskih biopsij, ki vsebujejo različne materiale iz tumorjev: krožeče tumorske celice, prosto DNA in eksosome. Glede na pričakovano stalno izločanje »različnih materialov iz tumorja« v krvni obtok bi vzorci iz tekočinskih biopsij lahko odražali enakomerno porazdelitev večine sprememb, ki nastajajo v tumorju. Na ta način bi omogočili natančnejšo opredelitev tumorjev, opredelitev velikosti tumorske mase, prisotnost tarč za biološka zdravila, ponovno napredovanje bolezni ali zgodaj nakazale na spremembe, ki bodo povzročile odpornost proti zdravilom. Prav tako bi tekočinske biopsije hipotetično omogočile tudi izvedbo presejanj za raka pri osebah z večjim tveganjem za nastanek raka.

Če se na kratko ozremo po vseh materialih, ki bi jih lahko spremljali iz tekočinskih biopsij, ugotavljamo, da je ideja o izolaciji in opredelitvi krožečih tumorskih celic najstarejša in največkrat preizkušana. Krožeče tumorske celice so definirane kot žive celice, ki izražajo citokeratin, epitelijske in adhezijske proteine in so CD45-negativne. Žal epitelijski in adhezijski označevalci niso vedno prisotni na krožečih tumorskih celicah zaradi dediferenciacije celic (proces EMT). Drugo veliko težavo za ustrezno uporabo krožečih tumorskih celic predstavlja njihova maloštevilnost. Frekvenca pojavnosti krožečih tumorskih celic je 1-10 celic na ml krvi. In če pri tem upoštevamo, da 1 ml krvi vsebuje približno 7×10^6 belih krvničk in 5×10^9 rdečih, je jasno, kako težko je iz krvi izolirati krožeče tumorske celice.

Prosta DNA ima več možnosti za uporabo v klinični diagnostiki. To se je navsezadnje tudi pokazalo s prvo registracijo testa na osnovi DNA, izolirani iz krvi bolnikov z napredovalim nedrobnoceličnim rakom pljuč za spremljanje prisotnosti mutacije T790M v genu EGFR. Ne moremo pa mimo dejstva, da je to osamljen primer in da so tudi pri uporabi proste DNA v diagnostične namene težave povezane tako z izolacijo proste DNA kot tudi z njenim izvorom. Če upoštevamo, da so povprečne koncentracije izolirane proste DNA iz 1 ml plazme med 15-20 ng in da človeška celica vsebuje okrog 6 pg DNA, pomeni, da je prosta DNA v plazmi iz najmanj 2.000 celic. Ker je razmerje krožečih tumorskih celic in normalnih krvnih celic odločno v prid normalnim celicam, je verjetno tudi izvor proste DNA prav v normalnih celicah. Zato se upravičeno postavlja

dvom v uporabno vrednost proste DNA za zgodnje odkrivanje raka, pač pa, kot v primeru bolnikov z nedrobnoceličnim rakom pljuč, obstaja veliko možnosti za uporabo proste DNA pri določanju specifičnih sprememb v rakastih celicah.

Eksosomi so aktivno izločeni celični vezikli (strukture z dvojno lipidno membrano), ki vsebujejo DNA, RNA in proteine. Eksosomi naj bi delovali kot prenašalci informacij in zato naj bi bila njihova vloga v medceličnih komunikacijah. Velikost eksosomov je med 30-200 nm in so prisotni v vseh bioloških tekočinah, kot so serum, plazma, slina, urin in likvor. Tumorske celice naj bi dnevno izločale na desettisoče eksosomov, kar pomeni, da dosega koncentracije, ki so $>10^{11}$ /ml plazme. Zaradi njihove strukture in materiala, ki ga vsebujejo (DNA, RNA), predstavljajo obetaven vir za tumorske biooznačevalce. Prav tako naj bi eksosomi predstavljali pomembno sredstvo za vplivanje tumorja na okolico (spodbujanje tumorske rasti, zaviranje delovanja imunskega sistema, spodbujanje angiogeneze) in so zato tudi obetavna tarča za biološka zdravila.

Prednost uporabe eksosomov je v varno shranjeni vsebini, ki zagotavlja nespremenjeno DNA ali RNA v daljšem času. To pomeni, da vzorce lahko tudi zamrzujemo, ne da bi pri tem poškodovali DNA ali RNA. Zato obstajajo prepričanja, da so eksosomi najustreznejši vir za spremljanje izražanja genov v tumorskih celicah ali določanje specifičnih mutacij brez agresivnih posegov na bolnikih. Pomanjkljivost eksosomov je predvsem njihova velikost, ki omogoča shranjevanje relativno majhnih količin DNA in RNA. Če jih primerjamo z retrovirusi, ki so približno enakih velikosti, lahko pričakujemo, da vsebujejo največ do 10 kb. Na osnovi tega je jasno, da posamični eksosomi ne morejo vsebovati DNA in RNA, ki bi zagotavljala vpogled v spremembe v tumorskih celicah v celoti. Ker pa jih je veliko, obstaja velika verjetnost, da te spremembe opredelimo na osnovi analize materiala, izoliranega iz večjega števila eksosomov. Eksosomi imajo na svojih površinah specifične proteine, ki nakazujejo na njihov izvor oz. na tip celic, kjer so nastali. Izolirali so specifične eksosome za različne vrste raka, vključujoč rak trebušne slinavke, rak jajčnikov in rak pljuč. Te specifične proteine izkoriščajo tudi metode za izolacijo eksosomov, saj temeljijo na vezavi proteinov na protitelesa, ki so vezana na različne nosilce.

Zaključek

Molekularna diagnostika in molekularnobiološki označevalci so nepogrešljivi pri natančnejši opredelitvi in klasifikaciji tumorjev ter pri izbiri najustreznejših zdravil in protokolov za zdravljenje, ki so prilagojeni posameznemu bolniku in njegovemu tumorju – t. i. personalizirano zdravljenje. Pomen določanja genetskih sprememb pri dednih oblikah raka je predvsem v pravočasni in pravilni oceni tveganja nosilcev mutacij, da zbolijo za določeno vrsto raka, ter v pripravi ustreznega programa spremljanja nosilcev mutacij in pretehtani izvedbi profilaktičnih ukrepov. Pri sporadičnih oblikah raka pa je vloga molekularne diagnostike pri napovedovanju prognoze bolezni, napovedovanju ponovitve bolezni ali

odgovora na zdravljenje. Nove tehnologije s področja sekvenciranja so prinesle zelo velike količine novih spoznaj na področju tumorske biologije ter omogočile opredelitev gonilnih genov oz. sprememb pri raku. Zato bo metoda NGS v prihodnje nepogrešljiva za onkološko diagnostiko in odločitev o specifičnem zdravljenju. Zavedanje o genetski heterogenosti znotraj tumorjev enake vrste ter znotraj celic istega tumorja odpira nove poglede na optimalen pristop določanja sprememb - tako z vidika najprimernejšega tkiva za biopsijo (primarni tumor, kateri del primarnega tumorja, metastaza), števila odvzetih biopsij iz različnih delov tumorja, kot tudi z vidika časovnih intervalov oz. pogostnosti izvedbe biopsij. Oba dejavnika (tkivo in čas odvzema) sta pomembna pri odločitvah o uvedbi zdravljenja ter pri ugotavljanju razvoja odpornosti proti določenim biološkimi zdravilom. Kot obetavna oblika za določanje sprememb značilnih za tumorje se ponujajo materiali, ki jih pridobimo s tekočinskimi biopsijami. Te naj bi kompleksno odražale spremembe v genotipu tumorskih celic v različnih fazah razvoja tumorja ter različnih delih tumorja. Glede na poligeno osnovo raka ter genetsko nestabilnost celic so pričakovanja od genetskih informacij na osnovi kompleksnih panelov genov v prednosti pred določanjem sprememb v posameznem genu. Nenazadnje bi rad poudaril, da je bodočnost diagnostike raka v razvoju in prepoznavanju strokovnih profilov, ki bodo ustrezno poskrbeli za razvoj zahtevnih specifičnih področij in ki bodo med seboj tesno sodelovali in se dopolnjevali. Pričakovati, da bo strokovnjak s specialnimi znanji z enega področja zadostil vsem potrebam diagnostike raka, je utopija.

Viri in literatura

1. Alix-Panabières C, Pantel K. Clinical applications of circulating tumor cells and circulating tumor DNA as liquid biopsy. *Cancer Discov* 2016; 6(5): 479-91.
2. Brock G, Castellanos-Rizaldos E, Hu L, Coticchia C, Skog J. Liquid biopsy for cancer screening, patient stratification and monitoring. *Transl Cancer Res* 2015; 4(3): 280-90.
3. Crowley E, Di Nicolantonio F, Loupakis F, Bardelli A. Liquid biopsy: monitoring cancer-genetics in the blood. *Nat Rev Clin Oncol* 2013; 10(8): 472-84.
4. Dietel M, Jöhrens K, Laffert MV et al. A 2015 update on predictive molecular pathology and its role in targeted cancer therapy: a review focussing on clinical relevance. *Cancer Gene Ther* 2015; 22(9): 417-30.
5. Gonzalez de Castro D, Clarke PA, Al-Lazikani B, Workman P. Personalized cancer medicine: molecular diagnostics, predictive biomarkers, and drug resistance. *Clin Pharmacol Ther* 2013; 93(3): 252-9.
6. Luthra R, Chen H, Roy-Chowdhuri S, Singh RR. Next-generation sequencing in clinical molecular diagnostics of cancer: Advantages and Challenges. *Cancers* 2015; 7(4): 2023-36.