

MINIMALNO INVAZIVNI DIAGNOSTIČNI PRISTOPI PRI PRIMARNIH MOŽGANSKIH TUMORJIH Z UPORABO PROSTO CIRKULIRAJOČIH NUKLEINSKIH KISLIN

Marija Skoblar Vidmar¹, Jernej Mlakar², Uroš Smrdel¹, Alenka Matjašič², Jože Pižem², Andrej Zupan²

¹ *Onkološki inštitut Ljubljana; Sektor radioterapije, Zaloška 2, 1000 Ljubljana, Slovenija*

² *Inštitut za patologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Korytkova 2, 1000 Ljubljana, Slovenija*

Elektronski naslov: mskoblar@onko-i.si

Izvleček

Tekočinska biopsija predstavlja minimalno invazivni postopek, ki zagotavlja podobne informacije iz telesnih tekočin, kot jih običajno dobimo iz vzorca biopsije tkiva. Uporaba tekočinske biopsije v kliničnem okolju dopolnjuje področje onkologije z vidika natančnega in personaliziranega pristopa po meri bolnika. Lahko se uporabi že pri postavitvi diagnoze in molekularno genetskem profiliranju možganskih tumorjev, kot tudi kasneje med onkološko terapijo ter spremljanjem odziva na zdravljenje.

Ključne besede: tekočinska biopsija, možganski tumorji, onkološko zdravljenje

Primarni možganski tumorji

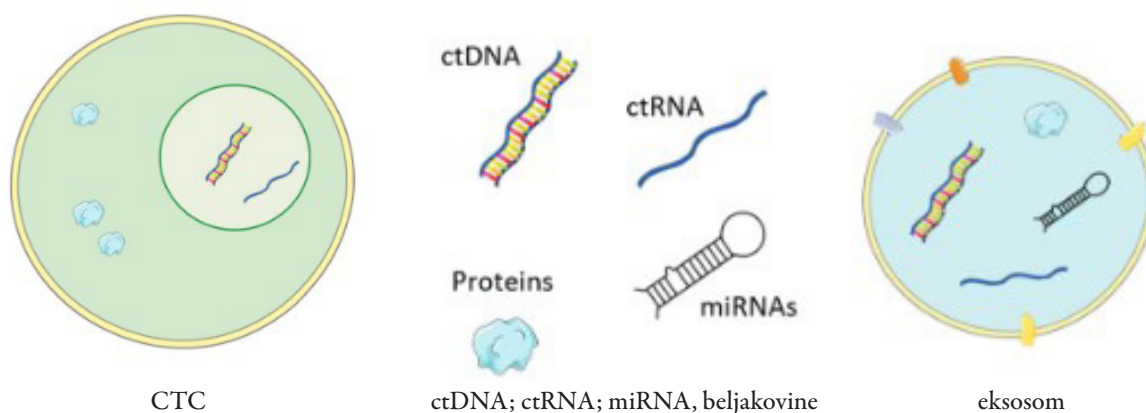
Primarni možganski tumorji vzniknejo v možganih ali hrbtenjači iz možganskih celic, ovojnic, živcev ali žlez. Obstaja več kot 120 različic, ki se razlikujejo po etiologiji, histologiji, molekularno genetski sliki, načinu in izidu zdravljenja. Pojavljajo se v razponu od benignih, asimptomatskih tumorjev, ki ne zahtevajo zdravljenja, do zelo invazivnih, najbolj malignih tumorjev, ki so običajno neozdravljivi. Trenutna klasifikacija možganskih tumorjev uporablja molekularno genetske značilnosti kot dodatek k histologiji pri mnogih tumorskih entitetah (1). Molekularno genetske značilnosti izboljšajo diagnostično natančnost in s spreminjanjem priporočil za zdravljenje vplivajo na klinični potek. Znano je, da mutacije v genih, ki kodirajo izocitrat dehidrogenazo (IDH) 1 ali 2 igrajo odločilno vlogo pri razvrščanju gliomov. Difuzni astrocitom IDH-divjega tipa se klinično obnaša kot najbolj maligni med glialnimi tumorji oz. kot glioblastom (2). Onkološko zdravljenje, ki vključuje kirurgijo, radioterapijo in sistemsko terapijo je vedno potrebno kadar gre za primarni glialni tumor IDH-divjega tipa, ne glede na histološki gradus. Glioblastom IDH-divjega tipa predstavlja približno 50 % vseh gliomov. Povprečno preživetje bolnikov s temi tumorji je 12- 15 mesecev (od postavitve diagnoze), 5 letno preživetje pa manj kot 5 %. Standardno zdravljenje glioblastoma in večine gliomov IDH-divjega tipa vključuje maksimalno kirurško resekcijo ter dodatno radiokemoterapijo s temozolomidom (3). Zaradi proliferativne, radiorezistentne in kemorezistentne narave tumorja ter izrazite heterogenosti se bolezen ponavlja, možnosti dodatnega zdravljenja pa so zelo skromne (4, 5).

Molekularno genetsko profiliranje gliomov je poleg heterogenosti med tumorji pokazalo tudi pomembno heterogenost znotraj posamičnega tumorja, v katerem so prisotne različne celične populacije z različnimi genetskimi profili (6, 7). Pridobitev

vzorca možganskega tumorja je invazivni postopek, ki neredko predstavlja tveganje za bolnika zaradi krvavitve v tumor ali možnosti nevrološkega poslabšanja. Poleg tega je biopsija tkiva odvzeta iz majhnega in lokaliziranega področja v tumorju, v katerem ne bo reprezentativno prikazana celotna intratumorska heterogenost. Zaradi naštetega biopsija tumorskega tkiva zagotovo ni metoda, primerna za spremljanje odziva možganskih tumorjev na zdravljenje. V vsakdanjem kliničnem delu temelji ocena odziva možganskih tumorjev na zdravljenje na slikovni diagnostiki, v prvi vrsti magnetni resonanci (MR) glave. Žal je korelacija terapijskega odziva s slikovnimi izsledki zapletena in otežena zaradi t. i. pseudoprogrsa in radiacijske nekroze, ki pogosto simulirata progres tumorja (8). Obsevanje možganskih tumorjev povzroča poškodbo krvno možganske pregrade, kar lahko vodi v zunajžilno iztekanje kontrastnega sredstva, ki ima lahko na MR posnetkih enak videz kot vitalni ostanek ali progres tumorja. Ta neželeni učinek onkološkega zdravljenja je opredeljen kot psevdoprogres in se začne pojavljati približno tri mesece po obsevanju, njegova incidenca pa znaša pri kombiniranem onkološkem zdravljenju do 50 %. Drugi stranski učinek, ki ima na postkontrastnih MR slikah videz ostanka ali ponovitve tumorja, je radiacijska nekroza. Njena incidenca je ocenjena na do 30 % in se viša z daljšanjem obdobja od obsevanja. Pojavljati se začne 6 mesecev po obsevanju, pogostoje šele po 1 ali 2 letih po obsevanju. Uporabljajo se dodatne slikovne metode, kot sta MR s perfuzijo ali MR spektroskopija, ter funkcionalne metode, kot je FET- PET-CT, vendar razlikovanje stranskih učinkov onkološkega zdravljenja od progressa tumorja še vedno predstavlja izziv (9, 10).

Tekočinska biopsija

Potrebne so nove objektivne metode za vrednotenje bremena bolezni med zdravljenjem in po njegovem zaključku (12, 13). V zadnjem desetletju se z razvojem modernih tehnologij odpirajo možnosti uporabe tekočinske biopsije tudi za bolnike z glialnimi tumorji (14-18). Kot je prikazano na sliki 1, so komponente tekočinske biopsije (kri/plazma ali cerebrospinalna tekočina), ki lahko posredujejo informacije o primarnem tumorju: cirkulirajoče tumorske celice (CTC) (ang. Cirrculating Tumor Cells), cirkulirajoča prosta tumorska DNA (ctDNA), cirkulirajoča prosta tumorska RNA (ctRNA), mikro RNA (miRNA) in ekstracelularni vezikli (eksosomi) (19).



Slika 1: Komponente, ki jih lahko analiziramo s tekočinsko biopsijo plazme: CTC-cirkulirajoča tumorska celica, ctDNA-cirkulirajoča prosta tumorska DNA, ctRNA- cirkulirajoča prosta tumorska RNA, miRNA mikro RNA, ekstracelularni vezikli (eksosomi); povzeto iz: Saenz-Antoñanzas A, et al. *Cancers* 2019; 11(7): 950 (19).

Nabor bolnikov, analize vzorcev in primerjava podatkov

V raziskavo bomo vključili 150-200 odraslih in otroških bolnikov s primarnim možganskim tumorjem in jih sledili od diagnoze, v času zdravljenja in po njem. Prvi vzorec krvi bo odvzet pred kirurškim posegom, drugi pred pričetkom zdravljenja z radiokemoterapijo in nato vsake tri mesece med zdravljenjem s kemoterapijo in med spremljanjem po zaključku zdravljenja. Skupno bo bolnikom odvzetih 4-6 vzorcev krvi. Primerjali bomo podatke iz tkivne biopsije s podatki iz tekočinskih biopsij, z namenom preučiti heterogenost in evolucijo tumorjev. Uporabljali bomo izjemno občutljive teste na osnovi digitalnega kapljičnega PCR-ja za visoko občutljivo odkrivanje ctDNA in ctRNA v krvi. Za zaznavanje širšega nabora molekularnih označevalcev (IDH1, EGFR, TP53, PTEN, NF1, MET, TERT, ATRX, H3F3A in drugi) bomo uporabili metodo sekvenciranja naslednje generacije. Z metodo sekvenciranja naslednje generacije bomo pri vzorcih krvi analizirali 52 genov, ki so pogosto pojavljajo pri teh tumorjih. Podatke bomo primerjali s podatki, pridobljenimi iz tkivnih vzorcev, ki so bili bolnikom odvzeti med operacijo tumorja; tu bo panel pri odraslih bolnikih obsegal 29 genov, pri otrocih pa 161 genov. V nabor bodo vključene tudi mutacije genov, ki bi lahko predstavljali tarče bodočih terapij (npr. BRAF, NTRK, ALK, ROS1, itd.). Opravili bomo tudi analizo izražanja RNA in analizo metilacijskega statusa.

Od sredine januarja 2021 je bilo v raziskavo vključenih 16 odraslih bolnikov. Pri petih bolnikih je bila kri vzeta dvakrat.

Zaključek

Maligni gliomi še vedno predstavljajo najbolj agresivno skupino tumorjev pri ljudeh, ki se kljub agresivnemu zdravljenju skoraj vedno ponovijo. Tkivna biopsija in slikovna diagnostika še vedno predstavljata osnovni orodji diagnostičnega postopka, za določitev prognoze, izbor zdravljenja in v spremljanju odziva na zdravljenje. Tekočinska biopsija iz plazme je privlačna in minimalno invazivna metoda za identifikacijo diagnostičnih in prognostičnih biomarkerjev, za spremljanje evolucije tumorjev, odziva na zdravljenje in izbor zdravljenja. Potrebna je celostna analiza dosedanjih raziskovalnih podatkov in standardizacija uporabnih tehnik: k temu bodo gotovo prispevali tudi rezultati naše raziskave. V primeru, da bodo rezultati raziskave potrdili zadostno občutljivost in specifičnost metode, bi lahko njena redna klinična uporaba znatno olajšala spremljanje bolnikov po zdravljenju in olajšala diagnostiko tumorjev na kirurško težko dostopnih mestih, kjer diagnostična biopsija predstavlja tveganje za razvoj nevrološke okvare.

Literatura:

1. Louis DN, Perry A, Reifenberger G, et al. The 2016 world health organization classification of tumors of the central nervous system: a summary. *Acta Neuropathol* 2016; 131: 803-20.
2. Cohen AL, Colman H. Glioma biology and molecular markers. *Cancer Treat Res* 2015; 163: 15-30.
3. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* 2005; 352: 987-96.
4. Stupp R, Hegi ME, Mason WP, et al. Effects of radiotherapy with concomitant

and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol* 2009; 10: 459-66.

5. Brennan CW, Verhaak RG, McKenna A, et al. The somatic genomic landscape of glioblastoma. *Cell* 2013; 155: 462-77.
6. Siegal T. Clinical impact of molecular biomarkers in gliomas. *J Clinical Neurosci* 2015; 22(3): 437-44.
7. Aldape K, Zadeh G, Mansouri S, et al. Glioblastoma: pathology, molecular mechanisms and markers. *Acta Neuropathologica* 2015; 129(6): 29-848.
8. Peca C, Pacelli R, Elefante A, et al. Early clinical and neuroradiological worsening after radiotherapy and concomitant temozolomide in patients with glioblastoma: tumour progression or radionecrosis? *Clin Neurol Neurosurg* 2009; 111(4): 331-4.
9. Zhou J, Tryggestad E, Wen Z, et al. Differentiation between glioma and radiation necrosis using molecular magnetic resonance imaging of endogenous proteins and peptides. *Nat Med* 2011; 17(1): 130-4.
10. Zhang H, Ma L, Wang Q, et al. Role of magnetic resonance spectroscopy for the differentiation of recurrent glioma from radiation necrosis: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Radiol* 2014; 83: 2181-2189.
11. Siravegna G, Marsoni S, Siena S, et al. Integrating liquid biopsies into the management of cancer. *Nat Rev Clin Oncol* 2017; 14(9): 531-48.
12. Shankar GM, Balaj L, Stott SL, et al. Liquid biopsy for brain tumors. *Expert Rev Mol Diagn* 2017; 17(10): 943-47.
13. Heitzer E, Haque IS, Roberts CES, et al. Current and future perspectives of liquid biopsies in genomics-driven oncology. *Nat Rev Genet* 2019; 20: 71-88.
14. Xu T, Wang H, Huang X, et al. Gene fusion in malignant glioma: an emerging target for next generation personalized treatment. *Transl Oncol* 2018; 11(3): 609-18.
15. Haase S, Garcia-Fabiani MB, Carney S, et al. Mutant ATRX: uncovering a new therapeutic target for glioma. *Expert Opin Ther Targets* 2018; 22(7): 599-613.
16. Piccioni DE, Achrol AS, Kiedrowski LA, et al. Analysis of cell-free circulating tumor DNA in 419 patients with glioblastoma and other primary brain tumors. *CNS oncology*. 2019; 8(2): CNS34.
17. Yang P, Zhang W, Wang Y, et al. IDH mutation and MGMT promoter methylation in glioblastoma: results of a prospective registry. *Oncotarget* 2015; 6(38): 40896-906.
18. Romani M, Pistillo MP, Banelli B. Epigenetic Targeting of glioblastoma. *Front Oncol* 2018; 8:448-8.
19. Saenz-Antoñanzas A, Auzmendi-Iriarte J, Carrasco-Garcia E, et al. Liquid Biopsy in glioblastoma: opportunities, applications and challenges. *Cancers* 2019; 11(7): 950.