

Inovatívne monitorovanie pacientov s metastatickým kolorektálnym karcinómom

Mgr. Katarína Fabišíková¹
(Patologická anatómia a súdne lekárstvo)

Spoluautor: MUDr. Simona Humplíková¹
Školiteľ: prof. RNDr. Vanda Repiská, PhD.¹

¹ Ústav lekárskej biológie, genetiky a klinickej genetiky LF UK a UNB

Úvod

Cirkulujúca nádorová DNA (ctDNA) je časť voľnej cirkulujúcej DNA (cfDNA), ktorá je uvoľňovaná priamo z nádorového tkaniva, v čoho dôsledku je táto ctDNA geneticky identická s korešpondujúcim primárnym tumorom (1). ctDNA má potenciál zmeniť klinickú prax v štyroch kľúčových oblastiach, ktorými sú detekcia minimálneho reziduálneho ochorenia, manažment pacientov s nádormi konečníka, monitorovanie odpovede na liečbu a sledovanie klonálnej dynamiky v reakcii na ciele terapeutie a ďalšie systémové liečby (2).

Analýza ctDNA sa u pacientov s metastatickým kolorektálnym karcinómom (mCRC) používa na testovanie mutácií v génoch *KRAS*, *NRAS* a *BRAF*. V prípade génov *KRAS* a *NRAS* môže analýza ctDNA identifikovať pacientov s horšou prognózou, ktorí môžu profitovať z agresívnejšieho režimu chemoterapie, ktorý môže byť v prípade *wild-type* mutačného statusu kombinovaný s biologickou liečbou, nakoľko z liečby monoklonálnymi protilátkami (cetuximab a panitumumab) profitujú len pacienti bez mutácie v génoch *KRAS* a *NRAS*. Mutácie v géne *BRAF* možno použiť ako negatívny prognostický biomarker pre celkové prežívanie a rovnako môžu mať úlohu pri výbere vhodnej liečby (3).

V našej práci sme pomocou plne automatizovaného diagnostického systému IdyllaTM analyzovali mutácie v génoch *KRAS*, *NRAS* a *BRAF* v nádorových tkanivách fixovaných vo formalíne (FFPE) a v cirkulujúcej nádorovej DNA (ctDNA) z krvnej plazmy u pacientov so sporadickým mCRC. Analýzou ctDNA v krvi pacientov počas terapie monoklonálnymi protilátkami sme monitorovali potenciálnu zmenu mutačného statusu génov *RAS* a *BRAF* medzi jednotlivými odbermi, čo nám následne umožnilo sledovať pokrok v liečbe monoklonálnymi protilátkami, resp. progresiu ochorenia u jednotlivých pacientov.

Materiál a metódy

Náš súbor pozostával zo 49 pacientov s diagnostikovaným mCRC vo vekovom rozpätí od 39 do 91 rokov. Všetkým pacientom boli odobraté FFPE vzorky a vzorky periférnej krvi. Prvotný DNA test bol u každého pacienta vykonaný z FFPE vzorky získanej z chirurgicky resektovaného nádorového tkaniva. Ďalšie DNA testy boli vykonané z periférnej krvi (resp. ctDNA) odobratej pred, počas a po ukončení terapie monoklonálnymi protilátkami. Pacientov sme rozdelili podľa počtu odberov krvnej plazmy (1-5 odberov), ktorý bol u jednotlivých pacientov stanovený na základe rozhodnutia klinických onkológov.

Pracovný postup izolácie krvnej plazmy z periférnej krvi

Vzorku krvnej plazmy sme pripravovali z 10 mL odobratej periférnej krvi dodanej v EDTA skúmavke (izoláciu bolo nutné urobiť do 4 hodín) alebo v STRECK skúmavke (izoláciu bolo nutné urobiť do 72 hodín). Krv v skúmavke sme centrifugovali pri 1500 g po dobu 10 minút pri laboratórnej teplote. Medzitým sme si pripravili 1,5 mL skúmavky. Supernatant (krvnú plazmu) sme rozpipetovali po 1,2 mL do pripravených 1,5 mL skúmaviek, pričom sme dávali pozor, aby sme špičkou nenabrali krvné bunky z pelety. Následne sme skúmavky centrifugovali pri 15000 – 20000 g po dobu 1 minúty pri laboratórnej teplote. Na záver sme supernatant (krvnú plazmu) rozpipetovali po 1,1 mL do nových 1,5 mL skúmaviek.

Analýza vzoriek ctDNA pomocou diagnostického systému Idylla™

Otvorili sme príslušnú Idylla™ kazetu (ctKRAS/ ctNRAS-BRAF) na analýzu ctDNA a napipetovali sme 1 mL izolovanej krvnej plazmy. Na ovládacej konzole Idylla™ sme navolili testovanie, vyplnili sme potrebné identifikačné údaje o analyzovanej vzorke a naskenovali sme identifikačný kód na analyzačnej kazete a spustili sme analýzu. Po ukončení času potrebného na izoláciu a analýzu DNA sme vybrali analyzačnú kazetu a vyexportovali výsledok analýzy ctDNA.

Pracovný postup analýzy FFPE vzoriek pomocou diagnostického systému Idylla™

Na krúžky filtračného papiera sme napipetovali 60 µL *nuclease-free* vody. Na jeden z krúžkov filtračného papiera sme pomocou pinzety naniesli dostatočné množstvo rezov z tkanív. Rezy z tkanív sme prikryli druhým krúžkom filtračného papiera. Pripravené vzorky sme vložili pinzetou do komôrky analyzačnej kazety, ktorú sme následne zatvorili a spustili sme analýzu.

Výsledky

Z celkového počtu pacientov bol vykonaný prvý odber u 49 pacientov, z toho druhý odber u 13 pacientov, tretí odber u 8 pacientov, štvrtý odber u 2 pacientov a piaty odber u 2 pacientov (Tabuľka 1). Spomedzi 49 pacientov malo 22 pacientov *wild-type RAS* a *BRAF* status a 27 pacientov malo mutáciu v niektorom z vyšetovaných génov, pričom sme identifikovali 12 diskrepancií v mutačnom statuse medzi výsledkom vyšetrenia FFPE vzorky a vzorky krvnej plazmy (Tabuľka 2).

Tabuľka 1. Zhody a diskrepancie mutačného statusu medzi jednotlivými odbermi u pacientov, u ktorých bola vyšetrená vzorka FFPE a zároveň vzorka krvnej plazmy (ctDNA).

POČET PACIENTOV S VYŠETRENOU ctDNA + FFPE: 49			
Poradie odberov	Počet pacientov	Zhoda mutačného statusu v jednotlivých odberoch	Zmena mutačného statusu medzi jednotlivými odbermi
1. odber	49	–	–
2. odber	13	9	3
3. odber	8	4	3
4. odber	2	0	2
5. odber	2	1	1

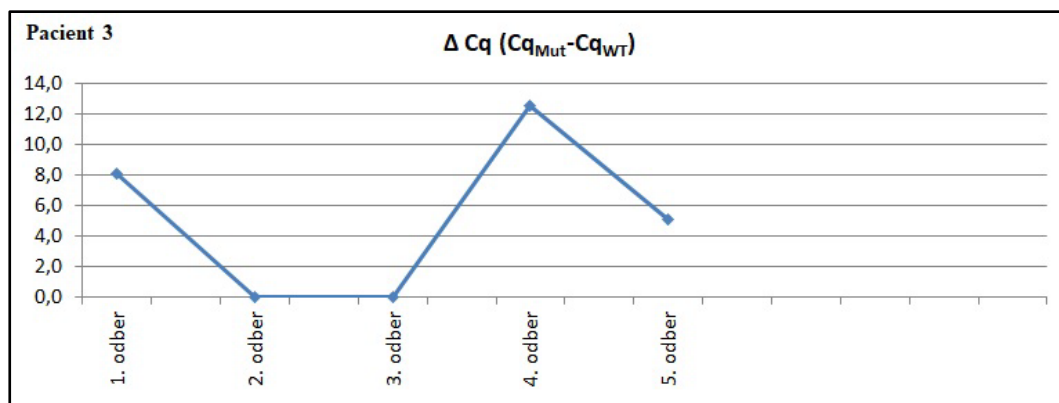
Tabuľka 2. Diskrepancie v génoch *KRAS*, *NRAS* a *BRAF* medzi vzorkou FFPE a 1. odberom ctDNA.

Diskrepancie medzi FFPE a ctDNA:		
Gén s identifikovaným patogénnym variantom	FFPE wt → 1. odber ctDNA mut	FFPE mut → 1. odber ctDNA wt
	3	9
<i>KRAS</i>	2	4
<i>NRAS</i>	1	2
<i>BRAF</i>	0	3

Okrem kvalitatívneho vyhodnotenia výsledkov analýzy cirkulujúcej nádorovej DNA sme sa zaoberali aj kvantitatívnym monitorovaním jednotlivých odberov. Automatický diagnostický systém Idylla™ je založený na princípe metódy *Real-time* PCR, a teda umožňuje vizualizáciu a kvantifikáciu amplifikácie DNA v reálnom čase. Kľúčovým údajom bola pre nás hodnota Cq, t.j. tzv. prahový cyklus (*threshold cycle*), v ktorom začína exponenciálna fáza, kedy sa fluorescencia zvýši na úroveň optickej detekcie. Pre každý z odberov sme vypočítali hodnotu ΔCq , ktorá zodpovedá rozdielu hodnoty Cq mutovanej vzorky a hodnoty Cq s *wild-type* mutačným statusom ($\Delta Cq = Cq_{Mut} - Cq_{WT}$). V prípade, že výsledok vyšetrenia bol negatívny, t.j. *wild-type RAS* a *BRAF* status, hodnota ΔCq bola rovná 0 (4). V Tabuľke 3 sú uvedené výsledky ctRAS testov a hodnoty Cq a ΔCq pacienta, u ktorého sme vyšetrovali krvné plazmy z 5 odberov periférnej krvi. Následne sme zostrojili graf (ΔCq plot), ktorý znázorňuje konkrétne zmeny v mutačnom statuse medzi jednotlivými odbermi (Graf 1).

Tabuľka 3. Hodnoty Cq a ΔCq pacienta, u ktorého boli vyšetrené krvné plazmy z piatich odberov periférnej krvi.

Pacient 3 Poradie odberu	Výsledok Idylla™ ctRAS testu	Cq Mut	Cq WT	ΔCq (CqMut-CqWT)*
1. odber	<i>KRAS_G12V</i>	33,54	25,39	8,15
2. odber	wt	---	25,3	0
3. odber	wt	---	24,9	0
4. odber	<i>KRAS_A146T/V/P</i>	36,06	23,51	12,55
5. odber	<i>KRAS_G12V</i>	28,77	23,69	5,08



Graf 1. Delta Cq plot znázorňujúci monitorovanie *RAS* a *BRAF* mutačného statusu pacienta, u ktorého boli vyšetrené krvné plazmy z piatich odberov periférnej krvi.

Diskusia

Výhodou diagnostiky založenej na ctDNA pomocou diagnostického systému Idylla™ je jej neinvazívnosť, rýchlosť získania výsledkov a ich jednoduchá interpretácia bez nutnosti analýzy zložitých grafov. ctDNA poskytuje dostatočné informácie o biologických vlastnostiach nádoru, o jeho heterogenite a výsledky viacerých štúdií preukázali zhodu so vzorkami nádorového tkaniva (5, 6).

V našej práci sme nevenovali pozornosť konkrétnym typom mutácií, ale zaujímal nás najmä pomer diskrepancií k celkovému počtu vyšetrených vzoriek. V rámci inovatívneho monitorovania pacientov s mCRC nás zaujímali najmä zmeny mutačného statusu u pacientov, ktorým sme vyšetřili sériu odberov krvnej plazmy (3 až 5 odberov). Takéto sériové vyšetřenie genetických variantov vo vzorkách krvnej plazmy má potenciál poskytnúť informácie o priestorovej a časovej heterogenite nádoru v rozsahu, aký nie je možné dosiahnuť analýzou samotných vzoriek nádorového tkaniva. FFPE vzorky sú častokrát nevhodné a zamietnuté pre analýzu genetických variantov pomocou Sangerovho sekvenovania alebo metódy NGS z dôvodu nedostatočného množstva materiálu alebo nízkeho percenta nádorových buniek vo vzorke (7).

V rámci 12 prípadov diskrepancie mutačného stavu medzi FFPE vzorkou a prvým odberom krvnej plazmy sme identifikovali 9 prípadov, kde bola FFPE vzorka pozitívna pre mutáciu v niektorom z *RAS* onkogénov, zatiaľ čo prvý odber ctDNA vykazoval *wild-type RAS* status (Tabuľka 2).

Možným vysvetlením týchto diskrepancií je intratumorálna heterogenita. Je známe, že mutácie v génoch *KRAS*, *NRAS* a *BRAF* v kolorektálnom nádore sú priestorovo heterogénne (8). Vzorka nádorového tkaniva, v ktorej sme testovali *RAS*, resp. *BRAF* mutačný status pravdepodobne pochádzala z nádorového fragmentu, ktorý bol práve náhodou zmutovaný, zatiaľ čo väčšina zostávajúcej nádorovej hmoty bola negatívna. ctDNA, ktorá odráža priemernú hodnotu celého obsahu nádorových buniek bola pre *RAS*, resp. *BRAF* mutácie negatívna v dôsledku zriadenia mutovaných subklonov v nemutovaných klonoch nádorových buniek.

Zmenu mutačného statusu medzi jednotlivými odbermi sme zaznamenali u 9 pacientov (Tabuľka 1). U týchto pacientov sme sledovali aj kvantifikáciu amplifikácie DNA v reálnom čase. Farmakogenomická analýza buniek CRC, ktoré získali rezistenciu na cetuximab ukazuje, že po vysadení protilátok sa klony s *KRAS* mutáciou rozpadajú, zatiaľ čo populácia znovu získava citlivosť na toto liečivo. Profily ctDNA pacientov, ktorí profitujú z viacnásobného podávania anti-EGFR protilátok, vykazujú pulzatívne zmeny mutačného statusu génu *KRAS*. Tieto výsledky ukazujú, že genóm CRC sa dynamicky adaptuje na prerušované dávkovacie schémy a poskytuje molekulárne vysvetlenie účinnosti opakovaných cyklov liečby založenej na EGFR inhibítoroch (9). Uvedená farmakogenomická analýza vysvetľuje zmeny mutačného statusu génu *KRAS* medzi jednotlivými odbermi v prípade pacienta z nášho vyšetřovaného súboru, u ktorého sme vyšetřili 5 odberov krvnej plazmy. U tohto pacienta sme zaznamenali nasledujúce zmeny v mutačnom stave: *KRAS* mut G12V (1. odber ctDNA) → *KRAS* wt (2. odber ctDNA) → *KRAS* wt (3. odber ctDNA) → *KRAS* mut A146T/V/P (4. odber ctDNA) → *KRAS* mut G12V (5. odber ctDNA) (Tabuľka 3, Graf 1). U tohto pacienta sa hodnota ΔCq medzi 4. a 5. odberom výrazne líšila. V 4. odbere bola hodnota ΔCq 12,55, čo poukazuje na nižšie zastúpenie nádorových buniek s mutáciou v porovnaní s 5. odberom, kde hodnota ΔCq bola 5,08.

Naše výsledky ukázali, že sériové monitorovanie ctDNA má potenciál pomôcť klinickým lekárom pri prijímaní rozhodnutí v personalizovanej liečbe a uľahčiť včasnú prispôbenie

liečby tak, aby sa znížila miera toxicity neúčinných terapií, a taktiež aby sa umožnil rýchlejší prechod na potenciálne účinnejšiu liečbu.

Táto práca vznikla vďaka podpore v rámci Operačného programu Integrovaná infraštruktúra pre projekt: Dlhodobý strategický výskum a vývoj zameraný na výskyt Lynchovho syndrómu v populácii SR a možnosti prevencie nádorov spojených s týmto syndrómom, kód ITMS: 313011V578, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Zoznam použitej literatúry

1. Khakoo S, Georgiou A, Gerlinger M, Cunningham D, Starling N. Circulating tumour DNA, a promising biomarker for the management of colorectal cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 2018; 122: 72-82.
2. Dasari A, Morris VK, Allegra CJ, Atreya C, Benson AB 3rd, Boland P, Chung K, Copur MS, Corcoran RB, Deming DA, Dwyer A, Diehn M, Eng C, George TJ, Gollub MJ, Goodwin RA, Hamilton SR, Hechtman JF, Hochster H, Hong TS, Innocenti F, Iqbal A, Jacobs SA, Kennecke HF, Lee JJ, Lieu CH, Lenz HJ, Lindwasser OW, Montagut C, Odisio B, Ou FS, Porter L, Raghav K, Schrag D, Scott AJ, Shi Q, Strickler JH, Venook A, Yaeger R, Yothers G, You YN, Zell JA, Kopetz S. ctDNA applications and integration in colorectal cancer: an NCI Colon and Rectal-Anal Task Forces whitepaper. *Nat Rev Clin Oncol* 2020; 17(12): 757-770.
3. Kolenčík D, Shishido SN, Pitule P, Mason J, Hicks J, Kuhn P. Liquid Biopsy in Colorectal Carcinoma: Clinical Applications and Challenges. *Cancers (Basel)*. 2020 May; 12(6):1376.
4. Melchior L, Grauslund M, Bellosillo B, Montagut C, Torres E, Moragón E, Micalessi I, Frans J, Noten V, Bourgain C, Vriesema R, van der Geize R, Cokelaere K, Vercooren N, Crul K, Rüdiger T, Buchmüller D, Reijans M, Jans C. Multi-center evaluation of the novel fully-automated PCR-based Idylla™ BRAF Mutation Test on formalin-fixed paraffin-embedded tissue of malignant melanoma. *Exp Mol Pathol* 2015; 99(3): 485-91.
5. Thierry AR, El Messaoudi S, Mollevi C, Raoul JL, Guimbaud R, Pezet D, Artru P, Assenat E, Borg C, Mathonnet M, De La Fouchardière C, Bouché O, Gavaille C, Fiess C, Auzemery B, Meddeb R, Lopez-Crapez E, Sanchez C, Pastor B, Ychou M. Clinical utility of circulating DNA analysis for rapid detection of actionable mutations to select metastatic colorectal patients for anti-EGFR treatment. *Ann Oncol* 2017; 28(9): 2149-2159.
6. Bachet JB, Bouché O, Taieb J, Dubreuil O, Garcia ML, Meurisse A, Normand C, Gornet JM, Artru P, Louafi S, Bonnetain F, Thiot-Bidault A, Baumgaertner I, Coriat R, Tougeron D, Lecomte T, Mary F, Aparicio T, Marthey L, Taly V, Blons H, Vernerey D, Laurent-Puig P. RAS mutation analysis in circulating tumor DNA from patients with metastatic colorectal cancer: the AGEO RASANC prospective multicenter study. *Ann Oncol* 2018; 29(5): 1211-1219.
7. Samra H, Springborn S, Alexander Mackinnon A. The Idylla™ Molecular Testing System Is a Useful Option for the Detection of Clinically Actionable Variants in Challenging FFPE Samples Not Suitable for Conventional Sanger and NGS Testing. *Mod Pathol*. 2019; 32:52.
8. Baker AM, Huang W, Wang XM, Jansen M, Ma XJ, Kim J, Anderson CM, Wu X, Pan L, Su N, Luo Y, Domingo E, Heide T, Sottoriva A, Lewis A, Beggs AD, Wright NA, Rodriguez-Justo M, Park E, Tomlinson I, Graham TA. Robust RNA-based in situ mutation detection delineates colorectal cancer subclonal evolution. *Nat Commun* 2017; 8(1): 1998.

9. Siravegna G, Mussolin B, Buscarino M, Corti G, Cassingena A, Crisafulli G, Ponzetti A, Cremolini C, Amatu A, Lauricella C, Lamba S, Hobor S, Avallone A, Valtorta E, Rospo G, Medico E, Motta V, Antoniotti C, Tatangelo F, Bellosillo B, Veronese S, Budillon A, Montagut C, Racca P, Marsoni S, Falcone A, Corcoran RB, Di Nicolantonio F, Loupakis F, Siena S, Sartore-Bianchi A, Bardelli A. Clonal evolution and resistance to EGFR blockade in the blood of colorectal cancer patients. *Nat Med.* 2015 Jul; 21(7):795-801. Erratum in: *Nat Med.* 2015 Jul; 21(7). Erratum in: *Nat Med* 2015; 21{7): 827.