

Voľná nádorová DNA u pacientov s Hodgkinovým lymfómom

Alexandra Kredátusová¹, Veronika Hanáčková², Marie Lukášová², Helena Urbánková², Vít Procházka²

¹Lékařská fakulta Univerzity Palackého, Olomouc

²Hemato-onkologická klinika Lékařské fakulty Univerzity Palackého a Fakultní nemocnice Olomouc

Voľná cirkulujúca nádorová DNA (circulating tumour DNA – ctDNA) je typ extracelulárnej voľnej DNA (circulating cell-free DNA – ccfDNA) nachádzajúci sa v periférnej krvi pacientov s onkologickým ochorením. Jej neinvazívna analýza vo forme tzv. tekutej biopsie (liquid biopsy) má potenciálne využitie v klinickej praxi predovšetkým v situáciách, keď nie je dostupný dostatok vhodného materiálu pre podrobné genetické testovanie nádoru, prípadne by bol odber takéhoto materiálu technicky komplikovaný či pre pacienta zaťažujúci. Hodnotenie ctDNA z kvantitatívneho aj kvalitatívneho hľadiska môže pomôcť spresniť diagnostiku a manažment daného ochorenia a prispieť k personalizácii terapeutického prístupu. Uplatnenie v manažmente Hodgkinovho lymfómu by mohla nájsť pri diagnóze v screeningu mutácií, počas liečby a po jej ukončení ruka v ruku spolu so zobrazovacím vyšetrením aj v ďalšom sledovaní. Významným objavom je možnosť sledovania klonálnej evolúcie nádorových buniek pri liečbe checkpoint inhibítormi spojennej s prípadnou rezistenciou na tento moderný typ liečby.

Kľúčové slová: Hodgkinov lymfóm, tekutá biopsia, cirkulujúca nádorová DNA.

Circulating tumour DNA in patients with Hodgkin lymphoma

Circulating tumour DNA (ctDNA) is extracellular DNA which can be found in peripheral blood of patients suffering from malignancies. A liquid biopsy as a method of its non-invasive assessment might be potentially useful in clinical practice especially in cases when there is no available source of tumour DNA for genotyping or when a sampling could be problematic due to technical issues or a patient's condition. Quantitative and qualitative analysis of ctDNA might improve diagnostics and management of a disease and contribute to more personalised healthcare. It can be used in diagnostic screening for mutations, during therapy and at the end of treatment hand in hand with PET/CT imaging, as well as during follow-up. Better understanding of clonal evolution might help to identify patients resistant to checkpoint blockade.

Key words: Hodgkin lymphoma, liquid biopsy, circulating tumour DNA.

Úvod

Klasický Hodgkinov lymfóm (cHL) je najčastejšie nádorové ochorenie mladých dospelých. Hlavným pilierom liečby sú stále režimy polychemoterapie v závislosti na štádiu doplnené rádioterapiou (počiatočné a intermediárne štádiá obligatórne). Vysoká kurabilita je vykúpená nezanedbateľnou akútnou aj neskorou toxicitou. Histologicky je lymfóm charakterizovaný prítomnosťou neoplastických Hodgkinových a Reedovej-Sternbergových (HRS) buniek na po-

lymorfnom nenádorovom a zápalovom pozadí (1). Ich malé množstvo v biopstickej vzorke limituje následnú genetickú analýzu a sledovanie dynamiky mutácií v rôznych štádiách ochorenia a v priebehu liečby. Potenciál vyriešiť tento technický nedostatok má práve metóda vyšetrenia voľnej cirkulujúcej DNA, označovaná ako tekutá biopsia. Využitie by mohla nájsť pri hlbšom poznaní genetických zmien lymfómu (genotypizácii) pred liečbou aj v reakcii na ňu, rovnako môže byť využitá aj pri sledovaní minimálnej

reziduálnej choroby (MRD). Táto technológia tak predstavuje významný príspevok v poznaní biológie HL, ale zároveň aj nádejný nástroj na spresnenie monitorovania správania sa lymfómu, a teda zvýšenie istoty pri rozhodovaní o zmene (eskalácii/deeskalácii) liečby.

Voľná cirkulujúca nádorová DNA je špecifickým typom extracelulárnej DNA, v zahraničnej literatúre známej ako circulating cell-free DNA (ccfDNA). U zdravých jedincov ide o kratšie fragmenty normálnej DNA, uvoľňované do krvné-



KORESPONDENČNÁ ADRESA AUTORA:

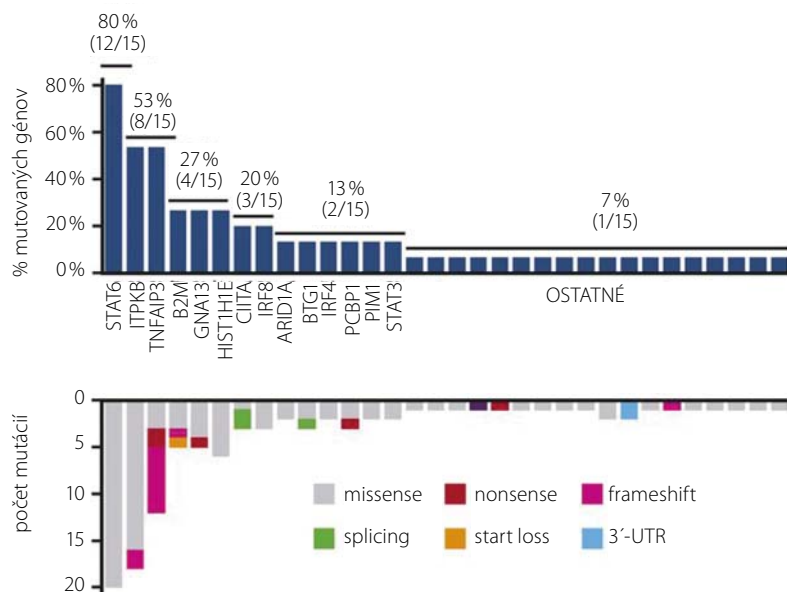
MUC. Alexandra Kredátusová, alexandra.kredatusova@gmail.com

Lékařská fakulta Univerzity Palackého v Olomouci, Hněvotínská 3, 775 15 Olomouc

Cit. zkr. Onkologie 2020; 14(3): 122–125

Článek přijat redakcí: 13. 3. 2020

Článek přijat k publikaci: 16. 4. 2020

Obr. 1. Najčastejšie mutované gény u pacientov s cHL (voľne upravené podľa Spina et al. 2018)

ho obehu fyziologicky apoptózou lymfocytov a iných buniek. U pacientov s cHL zároveň často dochádza k nekrotickým zmenám nádorových buniek aj okolitého zápalového infiltrátu, v súvislosti s čím pozorujeme signifikantne vyššie hodnoty ccfDNA a zároveň vyšší pomer dlhších fragmentov ku kratším (DNA integrity index, DII) (2). Zvýšené hodnoty ccfDNA predstavujú zvýšené riziko lymfómu, celková senzitivita a špecifickosť však neprekračuje 75 %, preto prostá kvantifikácia ccfDNA zrejme v budúcnosti nebude slúžiť ako samostatná diagnostická metóda pri podozrení na toto ochorenie (3).

Prvý dôkaz, že genetické zmeny HRS buniek je možné zachytiť v DNA voľne cirkulujúcej v plazme pacienta, pochádza z roku 2015. išlo o náhodný nález v rámci prenatalného vyšetrenia. Asymptomatická pacientka podstúpila neinvazívne prenatalné testovanie (NIPT) zamerané na najčastejšie aneuploidie súvisiace s Downovým, Patauovým a Edwardovým syndrómom. Výsledky však boli neštandardné, preto bolo vyšetrenie opakované a následne doplnené amniocentézou, ktorá nepotvrdila u plodu žiadnu anomáliu. K rovnakému záveru došiel aj vyšetrujúci ultrasonografista. Najpravdepodobnejšou príčinou záchytu mutácií pri vyšetrení NIPT sa javilo nádorové ochorenie tehotnej. Celotelové vyšetrenie magnetickou rezonanciou ukázalo nádorovú masu v mediastíne a zväčšené uzliny cervikálne a retroklavikulárne. Diagnostická biopsia potvrdila klasický Hodgkinov lymfóm typu nodulárnej sklerózy. Genetické zmeny chromozomálnych oblastí HRS

buniek z biopsie zistené pomocou fluorescenčnej in-situ hybridizácie (FISH) zodpovedali nálezom pri NIPT, čo následne viedlo k hypotéze, že nádorové zmeny HRS buniek môžu byť detekované vo voľnej DNA (4). Toto prelomové zistenie vzápätí viedlo k rozvoju výskumu využitia tekutej biopsie v oblasti genetického profilovania HL.

Genetický profil Hodgkinovho lymfómu

Pôvodné štúdie venujúce sa tejto problematike sa opierajú o záchyt mutácií v bioptickej vzorke. Vzorky boli fixované formalínom a ukotvené v parafrínovom bločku. Využívala sa hlavne metóda FISH, expresia proteínov bola určovaná imunohistochemicky. Obmedzením kvalitnej detekcie mutácií v prípade klasického Hodgkinovho lymfómu je nedostatok HRS buniek a zároveň možná genetická heterogenita v rôznych oblastiach nádoru. Štúdie nasvedčujú, že ctDNA odzrkadľuje mutačný profil HRS buniek bez nutnosti mikrodisekcie a poskytuje teda náhradný zdroj genetického materiálu pre následnú analýzu (5, 6). Vhodným postupom sú metódy sekvenovania novej generácie (CAPP-seq – Cancer Personalized Profiling by Deep Sequencing), ktoré dokážu zachytiť všetky typy mutácií vrátane inzercíí, delécií, variácií počtu kópií a génových prestavieb (7).

Najčastejšie mutovanými génmi sú STAT6 (Signal Transducer and Activator of Transcription 6), TNFAIP3 (Tumour Necrosis Factor Alpha Induced Protein 3), ITPKB (Inositol-Triphosphate 3-Kinase B), GNA13 (Guanine Nucleotide-

binding protein subunit alpha-13), B2M (Beta-2-Microglobulin), SPEN (Split Ends), ktoré postihujú signálne dráhy NF- κ B (Nuclear Factor kappa-light chain-enhancer of activated B cells), PI3K-AKT (Phosphatidylinositol 3-Kinase – Protein kinase B), NOTCH a cytokínové dráhy, a ovplyvňujú teda procesy súvisiace s apoptózou, bunkovým cyklom či imunitným dozorom (5, 8) (obrázok 1). Frekvencia mutácií sa líši medzi jednotlivými histologickými subtypmi cHL, v súvislosti s infekciou vírusom Epstein-Barrovej (EBV) aj s vekom pacienta. Genetika cHL je teda značne komplexná, čo súvisí s rozdielnym priebehom ochorenia u rôznych pacientov.

Dôležitým zistením je skutočnosť, že HRS bunky unikajú antitumorovému imunitnému dozoru zvýšenou expresiou PD-1 a PD-2 ligandov, ktorých väzba na PD-1 (programmed death) receptor T-lymfocytov vedie k inhibícii ich aktivácie a proliferácie, znemožňuje efektívnu T-bunkovú protinádorovú odpoveď a uľahčuje šírenie nádoru. K tejto hyperexpresii dochádza na podklade génových zmien v oblasti 9p24.1, najčastejšie ziskom génového materiálu (60 %) a amplifikáciou (27 %) (9). Štúdie na bioptických vzorkách dokazujú, že amplifikácia oblasti 9p24.1 je spojená s kratšou dobou prežitia bez progresie po liečbe prvej línie a je častá u pacientov s pokročilým ochorením (10).

Praktickou aplikáciou poznatkov o genetických zmenách PD dráhy je vznik novej generácie imunomodulačných liečiv, tzv. checkpoint inhibítorov (immune checkpoint inhibitors, ICI), ako sú nivolumab a pembrolizumab. Tieto humanizované monoklonálne protilátky proti PD-1 receptoru blokujú väzbu PD ligandov nádorových buniek na T-lymfocyty a zabráňujú tak funkčnej anergii T-bunkovej zložky imunity. Štúdie ICI preukázali efektívnosť blokády dráhy programovanej bunkovej smrti u pacientov s relabovaným Hodgkinovým lymfómom (11, 12). Zatiaľ však máme veľmi málo prediktorov zlyhania tejto terapie. V tomto kontexte tekutá biopsia ponúka možnosť sledovať nádorovo špecifické mutácie (prípadne ich zmeny v čase) u relabovaných/refraktérnych pacientov liečených spomínanými ICI. V dlhodobom sledovaní di Trani a spol. po ukázali na dva rôzne typy klonálnej evolúcie: 1. klonálny reshaping spojený so senzitivitou, keď u pacientov, ktorí po liečbe nivolumabom dosiahli remisiu (kompletnú alebo parciálnu), došlo už po piatich cykloch k vymiznutiu pôvodných

mutácií v ctDNA a k ich nahradeniu novými a 2. klonálna perzistencia pôvodných klonov súvisiaca s rezistenciou na checkpoint inhibítory (13). Tento vzorec poukazuje na snahu nádoru uniknúť liečbe, môže teda svedčiť o jej účinnosti (5).

Poznanie genetického profilu nádoru je dôležité pri rozvoji nových cieľov protinádorovej liečby a u konkrétného pacienta by mohla pomôcť klinika nasmerovať k výberu nového liečiva „šitého na mieru“ v intenciách precíznej medicíny.

Nástroj na spresnenie hodnotenia liečebnej odpovede

V súčasnej dobe sa na hodnotenie chemosenzitivity HL využíva vyšetrenie pozitronovou emisnou tomografiou kombinovanou s výpočtovou tomografiou (PET/CT). Štandardne sa sleduje efekt liečby po dvoch cykloch indukčnej terapie (interim PET/CT) a po jej absolvovaní (final PET/CT). Výsledok interim PET/CT ako súčasť bežnej praxe má vplyv hlavne u intermediárnych a pokročilých štádií choroby, kde ovplyvňuje pokračovanie v liečbe v zmysle zníženia jej intenzity alebo naopak jej zintenzívnenia.

Novým prístupom, zatiaľ využívaným len v klinických štúdiách, je doplnenie diagnostického stagingového vyšetrenia o kvantifikáciu celkového metabolického objemu nádoru (TMTV-total metabolic tumour volume), keďže Ann Arbor klasifikácia len slabo reflektuje nádorovú nálož, čo môže viesť k zaradeniu pacienta do nesprávnej rizikovej skupiny (14). TMTV zároveň koreluje s výsledkami interim PET/CT, preto sa zdá byť významným prognostickým faktorom.

Problémom vyšetrenia PET/CT však môže byť falošná pozitivita v dôsledku reaktívnych zmien postihnutého lymfatického tkaniva. Cirkulujúca nádorová DNA môže byť technologickým doplnkom napríklad u vybraných prípadov hraničnej positivity (skóre 3 podľa Deauville), kedy dramatický pokles jej koncentrácie nasvedčuje citlivosti nádoru na použitú liečbu. Iným prípadom je negatívny výsledok final PET/CT vyšetrenia, keď pretrvávajúca pozitivita spresňuje hodnotenie liečebnej odpovede.

Význam doplnenia PET/CT analýzou biomarkerov, medzi inými aj ctDNA, v podobných situáciách potvrdzujú aj Cirillo a Borchmann, ktorí sa domnievajú, takýto postup zlepšuje stratifikáciu pacientov do rizikových skupín (15).

Momentálne neexistuje žiaden optimálny prístup k sledovaniu minimálnej reziduálnej choroby a ctDNA sa preto javí ako vhodný nástroj vďaka svojej vysokej senzitivite a nízkej invazivite pri jej získavaní (7). Zdrojom je plazma pacienta a k dispozícii je viacero komerčných súprav na jej izoláciu.

Koncentrácia ctDNA pred liečbou koreluje so štádiom ochorenia a jej zmeny odrážajú odpoveď na liečbu už v jej priebehu. Prahom je pokles koncentrácie o dva rady (2-log) u pacienta s pokročilým cHL (práca na 24 dospelých pacientoch, cHL s nodulárnou sklerózou, so zmiešanou celularitou, bohatý na lymfocyty) po dvoch cykloch ABVD (adriamycín, bleomycin, vinblastín, dakarbazín) v porovnaní s hodnotami pri diagnóze, ktorý je asociovaný s kompletnou remisiou bez ohľadu na prípadnú pozitivitu interim PET/CT vyšetrenia, ktoré môže byť falošne pozitívne v dôsledku reaktívnych zmien. Naopak pacienti, ktorí nedosiahnu takýto pokles, sú ohrození progresiou ochorenia (5).

Tekutá biopsia sa v danej práci Spiny a spol. v porovnaní s PET/CT v tomto prípade javí ako spoľahlivejšia metóda cieleného vyhľadávania pacientov s týmto rizikom, keďže odráža nádorovú nálož, zatiaľ čo PET/CT odráža hlavne metabolickú aktivitu zápalovej zložky nádoru (16).

Názor, že analýza cirkulujúcej DNA je citlivejšou metódou predikcie hroziaceho relapsu, zdieľajú aj Camus a spol. Vo svojej štúdii zdôrazňujú, že detekovateľné mutácie exportínového génu XPO-1 zachytené v plazme dospelých pacientov s cHL po skončení indukčnej liečby sú spojené s kratšou dobou prežitia bez progresie bez ohľadu na výsledok final PET/CT. Dokonca len jeden pacient zo siedmich pozitívne testovaných mal pozitívny PET/CT nálež (17).

Tento prístup dokazuje, že ccfDNA odobratá počas liečby aj po jej skončení veľmi presne predikuje osud pacientov – prakticky eliminuje falošnú negatívitu aj falošnú pozitivitu PET/CT.

Záver

Pri rozhodovaní o manažmente liečby pacienta s Hodgkinovým lymfómom sa stretávame s viacerými komplikáciami. PET/CT vyšetrenie v úvodnej stratifikácii pacientov podľa rizika nie je dostatočne presné a môže viesť k výberu nesprávneho terapeutického prístupu. Využitie metabolických parametrov (TMTV) zlepšuje odhad iniciálnej prognózy v primoterapii aj

v relapse, avšak nerieši technické limity vyšetrenia ako takého (18, 19). Ďalším problémom je hodnotenie liečebnej odpovede. Hoci je interim PET/CT vyšetrenie celosvetovou štandardnou praxou, stále musíme čeliť falošnej pozitivite, ktorá pri eskalácii terapie môže pacienta poškodiť z dlhodobého hľadiska. A naopak, známe sú aj falošne negatívne výsledky následne spojené s progresiou ochorenia. Neposlednou otázkou je vzťah genetiky nádoru a účinnosti terapie, keďže donedávna boli možnosti jeho pochopenia limitované nedostatkom vhodného materiálu a nutnosťou biopsie. Metóda tekutej biopsie má napriek svojej technickej náročnosti predpoklady stať sa vo vybraných prípadoch doplnkom manažmentu HL: pri diagnóze v screeningu mutácií (korelácia s prognózou, chemosenzitivita, záchyt markerov na sledovanie MRD), počas liečby (zvýšenie istoty pri rozhodnutí o eskalácii/deeskalácii liečby, sledovanie klonálnej evolúcie pri liečbe ICI), po liečbe (spresnenie výsledku final PET/CT) aj v ďalšom sledovaní (včasná predikcia relapsu). Pokrok na poli molekulárnej genetiky časom sprístupní túto metódu širšiemu spektru pacientov, napríklad nahradením zložitej metódy sekvenovania novej generácie (NGS) jednoduchšími metódami (digital polymerase chain reaction – dPCR) (17).

Tekutá biopsia je bezpečná a moderná metóda získavania genetického materiálu od pacientov s nádorovým ochorením. Doterajšie štúdie potvrdzujú jej využiteľnosť v manažmente klasického Hodgkinovho lymfómu vďaka jej senzitivite a špecifickosti. Predstavuje alternatívu k mikrodisekcii HRS buniek a zjednodušuje možnosti monitorovania genetických zmien v priebehu liečby. Voľná nádorová DNA by mohla zohrať významnú rolu v monitorovaní MRD, kde by ako biomarker mohla doplniť zobrazovacie vyšetrenie pomocou PET/CT. Výzvu predstavuje vyhľadávanie rizikových pacientov, kde hrozí podliečenie (undertreatment) a rozvoj rezistencie voči terapii a pacientov ohrozených komplikáciami z preliečenia (overtreatment). Prebiehajúca snaha o štandardizáciu tejto metódy dáva nádej na jej využiteľnosť v stále väčšom množstve prípadov (20). Napriek tomu, že v súčasnosti nejde v Českej republike o rutinne užívanú metódu, prebiehajúci výskum ponúka perspektívu budúceho praktického využitia.

Podporené grantom Ministerstva zdravotníctví
ČR (RVO grant FNOL, 00098892).

LITERATÚRA

1. Bachy E, Houot R. *Hématologie*. Paris: Ellipses Édition Marketing S.A. 2018; 352 s.
2. Li M, Jia Y, Xu J, et al. Assessment of the circulating cell-free DNA marker association with diagnosis and prognostic prediction in patients with lymphoma: a single-center experience. *Ann Hematol*. 2017; 96(8): 1343–1351.
3. Hohaus S, Giachelia M, Massini G, et al. Cell-free circulating DNA in Hodgkin's and non-Hodgkin's lymphomas. *Ann Oncol*. 2009; 20(8): 1408–1413.
4. Vandenberghe P, Wlodarska I, Tousseyn T, et al. Non-invasive detection of genomic imbalances in Hodgkin/Reed-Sternberg cells in early and advanced stage Hodgkin's lymphoma by sequencing of circulating cell-free DNA: a technical proof-of-principle study. *Lancet Haematol*. 2015; 2(2): 55–65.
5. Spina V, Bruscaggin A, Cuccaro A, et al. Circulating tumor DNA reveals genetics, clonal evolution, and residual disease in classical Hodgkin lymphoma. *Blood* 2018; 131(22): 2413–2425.
6. Desch A, Hartung K, Botzen A, et al. Genotyping circulating tumor DNA of pediatric Hodgkin lymphoma. *Leukemia* 2020; 34(1): 151–166.
7. Rossi D, Spina V, Bruscaggin A, et al. Liquid biopsy in lymphoma. *Haematologica* 2019; 104(4): 648–652.
8. Baus D, Nonnenmacher F, Jankowski S, et al. STAT6 and STAT1 are essential antagonistic regulators of cell survival in classical Hodgkin lymphoma cell line. *Leukemia* 2009; 23(10): 1885–1893.
9. Roemer MG, Redd RA, Cader FZ, et al. Major Histocompatibility Complex Class II and programmed Death Ligand 1 Expression Predict Outcome After Programmed Death 1 Blockade in Classic Hodgkin Lymphoma. *J Clin Oncol*. 2018; 36(10): 942–950.
10. Roemer MG, Advani RH, Ligon AH, et al. PD-L1 and PD-L2 Genetic Alterations Define Classical Hodgkin Lymphoma and Predict Outcome. *J Clin Oncol*. 2016; 34(23): 2690–2697.
11. Ansell SM, Lesokhin AM, Borello I, et al. PD-1 blockade with nivolumab in relapsed or refractory Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med*. 2015; 372(4): 311–319.
12. Khurana A, Armand P, Ansell SM. Checkpoint inhibition therapy as possible frontline therapy for Hodgkin lymphoma. *Leuk Lymphoma*. 2020; 8: 1–12.
13. Di Trani M, Rizzo E, Locatelli S, et al. Longitudinal Assessment of Circulating Tumor Mutational Burden Using a Next-Generation Sequencing Cancer Gene Panel: A Potential Biomarker of Response to Programmed Cell Death 1 (PD-1) Blockade in Patients with Relapsed/Refractory Classical Hodgkin Lymphoma. *Blood* 2019; 134(Suppl. 1): 131.
14. Procházka V, Henzlóva L, Lukasova M, et al. Metabolic Tumor Volume and Soluble Cytokines Levels in Newly Diagnosed Hodgkin Lymphoma: What It Brings into the Staging Precision? *Blood* 2018; 132(Suppl. 1): 2933.
15. Cirillo M, Borchmann S. An update on disease biomarkers for Hodgkin lymphoma.
16. Sickinger MT, von Tresckow B, Kobe C, et al. PET-adapted omission of radiotherapy in early stage Hodgkin lymphoma – a systematic review and meta-analysis. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2016; 101: 86–92.
17. Camus V, Stamatoullas A, Mareschal S, et al. Detection and prognostic value of recurrent exportin 1 mutations in tumor and cell-free circulating DNA of patients with classical Hodgkin lymphoma. *Haematologica* 2016; 101(9): 1094–101.
18. Akhtari M, Milgrom SA, Pinnix CC, et al. Reclassifying patients with early-stage Hodgkin lymphoma based on functional radiographic markers at presentation. *Blood* 2018; 131(1): 84–94.
19. Procházka V, Gawande RS, Cayci Z, et al. Positron Emission Tomography-based Assessment of Metabolic Tumor Volume Predicts Survival after Autologous Hematopoietic Cell Transplantation for Hodgkin lymphoma. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2018; 24(1): 64–70.
20. Rossi D, Kurtz DM, Roschewski M, et al. The development of liquid biopsy for research and clinical practice in lymphomas: Report of the 15-ICML workshop on ctDNA. *Hematol Oncol*. 2020; 38(1): 34–37.