

Cirkulujúca nádorová DNA a jej využitie ako markera s prognostickou, prediktívnou a diagnostickou hodnotou u pacientov s nádorovými ochoreniami

Gabriel Minárik¹, Tatiana Sedláčková²

¹Lekárska genetika, Medirex, a. s., Bratislava

²Univerzita Komenského Lekárska fakulta, Bratislava

Zistenie prítomnosti nádorovej DNA v cirkulácii onkologických pacientov prinieslo nové možnosti ich využitia v klinickodiagnostickej praxi. V nadväznosti na etablovanie nových metód umožňujúcich ich vysokosenzitívnu a dostatočne špecifickú detekciu boli realizované mnohé štúdie poukazujúce na ich rozsiahly potenciál v klinickom manažmente onkologických pacientov. Aj preto sme za posledné roky svedkami enormného úsilia o implementáciu výsledkov týchto štúdií do rutinej klinickej praxe, pričom podľa aktuálnych poznatkov možno s ich využitím počítať v rámci skorej diagnostiky, prognostiky, skorej detekcie relapsu ochorenia či ako biomarkera pre výber klinickej terapie a to všetko v neinvazívnom prevedení, teda vo forme tzv. tekutej biopsie.

Kľúčové slová: cirkulujúca DNA, cirkulujúca nádorová DNA, nádorové ochorenia, tekutá biopsia

Circulating tumor DNA and its utilization as marker with prognostic, predictive and diagnostic value in patients with oncological diseases

Identification of the presence of tumor DNA in circulation of oncological patients has brought new possibilities for their use in clinical-diagnostic practice. Following the utilization of new methods, that enabled highly sensitive and sufficiently specific detection of circulating tumor DNA, many studies have been published demonstrating the vast potential of detection and quantification of circulating tumor DNA in clinical management of oncological patients. That is why we have seen enormous efforts in recent years to implement results of these studies into routine clinical practice and, according to current knowledge, we can look forward for their use in early diagnosis, prognosis, early detection of disease relapse, or as a biomarker for the selection of clinical therapy all in so-called non-invasive manner, in the form of liquid biopsy.

Keywords: circulating DNA, circulating tumor DNA, oncological diseases, liquid biopsy

NewsLab, 2018; roč. 9 (2): 102 – 107

Cirkulujúca nádorová DNA

Zvýšená hladina cirkulujúcich nukleových kyselín u pacientov s rakovinou bola prvýkrát opísaná už v roku 1977⁽¹⁾. Trvalo ďalších 10 rokov, pokým Stroun a kol. preukázali prítomnosť neoplastických charakteristík v cirkulácii, keď zistili, že cirkulujúca DNA vykazuje určitú dvojvláknovú instabilitu, ktorá je špecifická pre nádorovú DNA⁽²⁾. Definitívny dôkaz, že voľná cirkulujúca DNA v plazme onkologických pacientov je nádorového pôvodu, bol dosiahnutý po tom, ako Sorenson a kol. a Vasioutkin a kol. detegovali KRAS mutácie v cirkulácii pacientov s rakovinou pankreasu⁽³⁾, respektíve NRAS mutácie u pacientov s akútnou myeloidnou leukémiou⁽⁴⁾. Týmto objavmi sa otvorila možnosť potenciálneho využitia cirkulujúcej nádorovej DNA (ctDNA) ako molekulárneho markera v diagnostike a monitorovaní nádorových ochorení.

Pôvod cirkulujúcej nádorovej DNA

Zdrojom ctDNA v cirkulácii onkologických pacientov sú malígne bunky primárneho nádoru alebo nádorových metastáz (**obrázok 1**). Podobne ako v prípade cirkulujúcich nádorových buniek (CTCs) aj ctDNA sa do obehu môže dostať buď pasívnym, alebo aktívnym spôsobom. Pasívny spôsob uvoľňovania ctDNA sa spája s apoptózou a nekrotizáciou nádorových buniek, ktoré boli fagocytované makrofágmi a inými čistiacimi bunkami⁽⁵⁾.

V prípade aktívneho uvoľňovania boli publikované viaceré štúdie s cieľom objasniť, prečo životaschopné nádorové bunky aktívne uvoľňujú DNA do cirkulácie. Dôvodom je pravdepodobne schopnosť nádorových buniek ovplyvniť transformáciu vnímavých buniek na vzdialených miestach v procese genometastázy^(6,7).

Ďalším zdrojom ctDNA sú CTCs prítomné v krvi, avšak v počte CTCs a množstve ctDNA v krvi je značný nesúlad. Pretože jedna ľudská bunka obsahuje 6 pg DNA a mililiter plazmy onkologických pacientov obsahuje priemerne 17 ng DNA⁽⁸⁾, bolo by potrebných viac ako 2 000 CTCs na ml plazmy v prípade, že by CTCs boli primárnym zdrojom ctDNA. V zmysle publikovaných štúdií však 10 ml krvi obsahuje 1 – 10 CTCs u väčšiny onkologických pacientov⁽⁹⁾.

Vlastnosti cirkulujúcej nádorovej DNA

DNA v cirkulácii je dvojvláknová a fragmentovaná s výrazne nižšou molekulovou hmotnosťou v porovnaní s genomickou DNA. Dĺžka fragmentov v krvi cirkulujúcej voľnej DNA (cfDNA) sa pohybuje medzi krátkymi fragmentmi s dĺžkou 70 – 200 bp a fragmentmi dlhými približne 21 kilobáz⁽¹¹⁾ v závislosti od toho, akým mechanizmom bola cirkulujúca DNA uvoľnená do obehu. Krátke fragmenty pochádzajú z buniek, ktoré prešli procesom apoptózy. Ide o programovanú bunkovú smrť, počas ktorej je DNA štiepená nukleázami

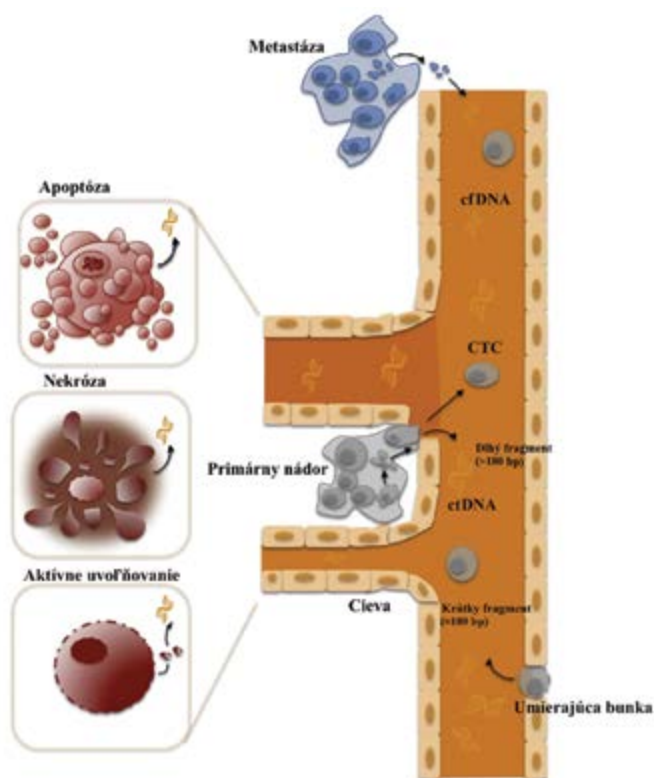
na špecifických miestach, medzi nukleozómami. V súlade s apoptotickým pôvodom a dĺžkou vlákna DNA ovitú okolo nukleozómu vrátane spojovacích oblastí je distribúcia dĺžok cfDNA fragmentov prevažne vo veľkosti 166 bp (alebo jej násobkov) (**obrázok 2**). Viacero štúdií preukázalo, že DNA prítomná v plazme vykazuje očakávaný vzor fragmentácie (vzor „rebríka“), pripomínajúci DNA štiepenú nukleázami v miestach medzi nukleozómami, ktorý je typický práve pre apoptické bunky^(11,12). Naopak, nekroza je nekontrolovaná bunková smrť, v dôsledku ktorej sú komponenty bunky nekontrolovane uvoľňované do prostredia bunky, čo vedie k poškodeniu bunky, a tým aj k uvoľneniu DNA fragmentov do

cirkulácie. Tie sú však výrazne dlhšie v porovnaní s fragmentmi pochádzajúcimi z apoptických buniek. V nedávno publikovanej štúdii zameranej na určenie dĺžky fragmentov nádorovej DNA autori Underhill a kol. preukázali na animálnom modeli ľudského glioblastómu a hepatocelulárneho karcinómu, že najčastejšie zastúpené fragmenty ctDNA sú dlhé 134 a 144 bp, zatiaľ čo v normálnej cfDNA bol najčastejšie prítomný 167 bp dlhý fragment. Tieto zistenia boli zopakované u pacientov s melanómom. Navyše autori práce ukázali, že frekvencia mutovanej alely u pacientov s rakovinou pľúc bola vyššia vo frakcii, ktorá obsahovala kratšie DNA fragmenty, najmä ak distribúcia fragmentov cirkulujúcej DNA u onkologických pacientov bola podobná distribúcii DNA fragmentov u zdravých kontrol. Okrem toho pozorovali aj ~10 bp periodicitu v dĺžke fragmentov, ktorá je veľmi dobre opísaná v súvislosti s nukleázovou aktivitou⁽¹³⁾, čo je v súlade s predchádzajúcimi zisteniami, že ctDNA aj cfDNA sú spojené najmä s apoptózou buniek⁽¹¹⁾.

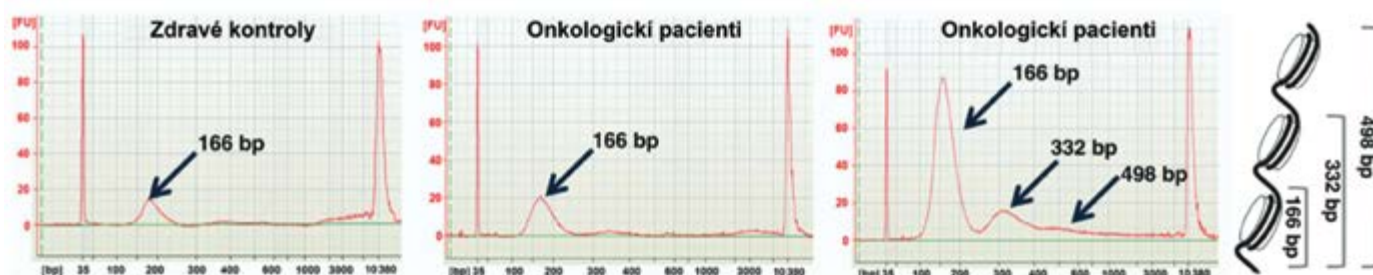
Koncentrácia cirkulujúcej nádorovej DNA

Za normálnych fyziologických podmienok je cfDNA v periférnej krvi degradovaná DNázovou aktivitou, čo u zdravých jedincov vedie k nízkej koncentrácii cfDNA (menej ako 1 – 100 ng/ml plazmy). V prípade onkologických pacientov je DNázová aktivita v ich krvnej plazme v porovnaní so zdravými jedincami znížená, čo u nich vedie k zvýšenej koncentrácii cirkulujúcich nukleových kyselín (celkovej cfDNA obsahujúcej aj ctDNA) (viac ako 1 000 ng/ml plazmy)^(11,15). Okrem toho sa predpokladá, že u onkologických pacientov je zvýšená miera apoptózy a nekrozy samotných nádorových buniek a okolitých normálnych buniek a ako nádor zväčšuje svoj objem, zvyšuje sa aj počet apoptotických a nekrotických buniek v dôsledku zvýšenej bunkovej premeny. Za normálnych podmienok sú zvyšky týchto buniek odstraňované v procese fagocytózy, avšak tá v nádorovej mase nefunguje efektívne, čo má za následok akumuláciu bunkových zvyškov a ich následné uvoľnenie do cirkulácie. Výsledkom je nerovnováha medzi uvoľňovaním a elimináciou cfDNA. Koncentrácia cfDNA medzi jednotlivcami značne varíruje a mení sa v čase, pričom onkologickí pacienti vykazujú vysokú variabilitu v množstve celkovej cfDNA a ctDNA frakcie, ktorá sa pohybuje v rozmedzí od menej ako 1 % až do viac ako 90 % v závislosti od počtu a veľkosti nádorových ložísk, proliferatívneho štádia, úrovne vaskularizácie, druhu a dĺžky trvania liečby, odpovede na liečbu atď.^(14,16).

Obrázok 1. Pôvod cirkulujúcich nukleových kyselín v krvnom riečisku. Cirkulujúca DNA môže byť do obehu uvoľňovaná rôznymi spôsobmi a môže pochádzať z rozličných zdrojov – môže byť uvoľnená z umierajúcich buniek každého orgánu tela alebo z nádoru, ktorý môže rásť kdekoľvek. Upravené podľa Schwarzenbach a kol., 2011⁽¹⁰⁾.



Obrázok 2. Veľkosť fragmentov cfDNA pochádzajúcich z plazmy onkologických pacientov a zdravých kontrol. Všetky vzorky vykazovali výrazné zastúpenie fragmentov s dĺžkou 166 bp, čo zodpovedá DNA apoptotického pôvodu. U časti pacientov možno pozorovať aj dlhšie, avšak očakávané DNA fragmenty s dĺžkou v násobkoch 166 bp. Upravené podľa Heitzer a kol., 2015⁽¹⁴⁾.



Klinické využitie cirkulujúcej nádorovej DNA

CtDNA predstavuje do budúcnosti jeden z najslubnejších nástrojov pre klinickú aplikáciu, pričom môže slúžiť ako biomarker prognózy a recidívy nádorových ochorení, môže indikovať, či je špecifická liečba v danom prípade aplikovateľná, alebo sa zníži riziko recidívy a progresie nádorového ochorenia (obrázok 3).

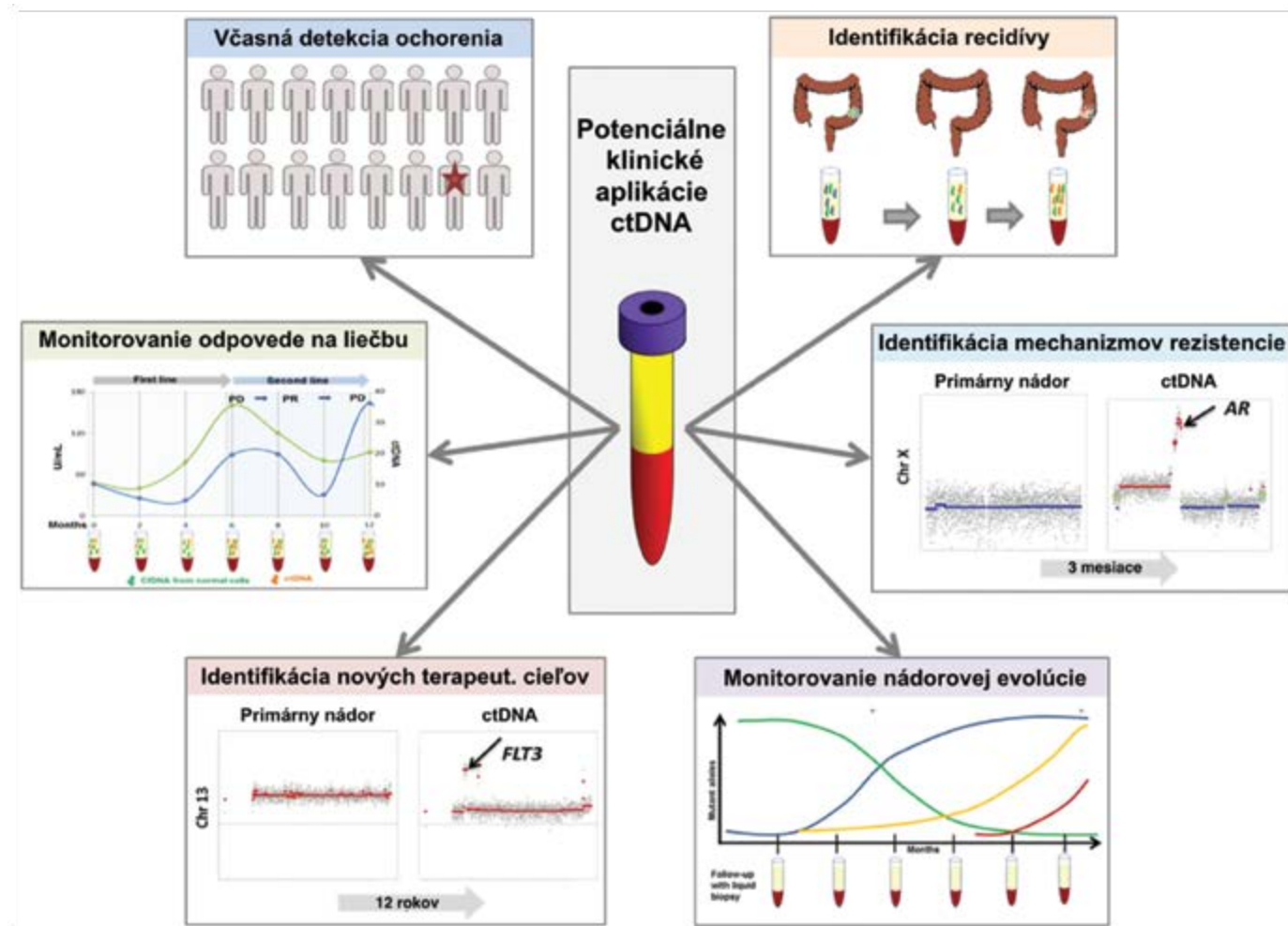
CtDNA ako diagnostický biomarker. Jednými z prvých a najviac študovaných genetických zmien vo vzťahu k nádorovým ochoreniam sú mutácie *KRAS* génu. *KRAS* je protoonkogén z rodiny *Ras* génov a mutácie v tomto géne vedú ku konstitutívnej aktivácii EGFR signálizačnej dráhy, ktorá vedie k nekontrolovateľnej bunkovej proliferácii. Mutácie v tomto géne sa bežne vyskytujú u pacientov s rakovinou pľúc a gastrointestinálneho traktu^(17,18). Mutácie *KRAS* génu v plazme alebo sére pacientov sú relatívne špecifickým markerom, pretože sú detegovateľné s vysokou špecificitou a senzitivitou u pacientov s kolorektálnym karcinómom⁽¹⁹⁾ a bola preukázaná 83 % zhoda medzi výsledkami zo vzoriek z plazmy a tými, ktoré boli získané analýzou nádorového tkaniva⁽²⁰⁾. Navyše v prípade niektorých pacientov boli mutácie v cirkulujúcej DNA *KRAS* génu prítomné ešte pred prejavom neoplastického ochorenia, čo naznačuje, že by takéto mutácie mohli predstavovať vysoké riziko vyvinutia tumoru⁽²¹⁾. Podobne *KRAS* mutácie boli detegované aj u pacientov

s rakovinou pankreasu 5 – 14 mesiacov pred diagnózou tumoru a nevyskytovali sa u pacientov s benígnymi patológiami pankreasu ani u zdravých osôb⁽²²⁾.

Hladina expresie niektorých kľúčových génov asociovaných s rakovinou môže byť zmenená nielen v dôsledku genetických zmien, ale aj v dôsledku epigenetických modifikácií. Metylácia CpG ostrovčekov v promótorovej oblasti tumor-supresorových génov (TSG) spúšťa lokálne utlmenie expresie génu. Nadmerná metylácia tumor-supresorového génu *p16* bola nájdená v sére pacientov s rakovinou pečene⁽²³⁾, pľúc⁽²⁴⁾ a prsníka⁽²⁵⁾. Metylácia TSG predstavuje jednu z prvotných príčin formovania tumoru, čím sa otvára možnosť využitia analýzy metylácie cirkulujúcej DNA tumorového pôvodu na skrining rakoviny v jej skorom štádiu. Fujiwara a kol. ukázali, že detekcia statusu metylácie TSG v sére je senzitívnejšia ako konvenčné markery používané na skorú diagnostiku rakoviny pľúc⁽²⁶⁾. Dokonca kombináciou cytologického vyšetrenia spúta a detekciou metylačného statusu *p16* génu v plazme bolo možné identifikovať 92 % pacientov s rakovinou pľúc⁽²⁷⁾.

CtDNA ako prognostický biomarker. Viaceré štúdie preukázali štatisticky významnú koreláciu medzi štádiom ochorenia a prítomnosťou nádorovo asociovaných genetických zmien v krvi pacientov s nádorom prsníka, vaječníkov, pankreasu a kolorektálnym karcinómom. U pacientov

Obrázok 3. Prehľad potenciálnych klinických aplikácií analýzy cfDNA/ctDNA pri nádorových ochoreniach. Upravené podľa Perkins a kol., 2012⁽⁸⁾.



s kolorektálnym karcinómom boli realizované štúdie zamerané na detekciu *hotspot* mutácií v *KRAS* géne a hypermetyláciu promótoru *CDKN2A* (kinázový inhibítor 2 A dependentný od cyklínu). Zistilo sa, že u 100 % pacientov s kolorektálnym karcinómom (CRC), bez detekcie *KRAS* mutácií a hypermetylácie promótoru *CDKN2A* v ctDNA, bola miera prežitia dva roky. Tieto výsledky naznačujú, že ctDNA prítomná v plazme je relevantným prognostickým markerom v prípade pacientov s CRC a takýto marker môže byť použitý na identifikáciu pacientov, u ktorých je vysoké riziko recidívy⁽²⁸⁾. Tieto výsledky boli potvrdené v ďalšej štúdii, keď u pacientov s detegovateľnou ctDNA v plazme nastala recidíva ochorenia v priebehu jedného roka po odstránení nádoru. Navyše vysoká koncentrácia cfDNA a detekcia *KRAS* mutácií sú jasným ukazovateľom nepriaznivej prognózy u pacientov s metastatickým CRC⁽²⁹⁾. Podobné výsledky boli získané aj v prípade pacientov s rakovinou prsníka⁽³⁰⁾. Na základe multivariačnej analýzy prítomnosť *KRAS* mutácií v plazme 256 pacientov s nemalobunkovým karcinómom pľúc (NSCLC) v pokročilom štádiu korelovala so zlou prognózou u pacientov dostávajúcich prvú líniu chemoterapie. Prítomnosť *KRAS* mutácií v plazme bola vyhodnotená aj v súbore 44 pacientov s rakovinou pankreasu s cieľom určiť prognózu ochorenia u týchto pacientov. Napriek nízkej senzitivite testu (27 %) bolo preukázané, že pacienti, u ktorých bola detegovaná prítomnosť *KRAS* mutácií, mali signifikantne zníženú pravdepodobnosť prežitia v porovnaní s pacientmi bez uvedených mutácií (17 % vs 41 % v prípade 6 mesiacov a 0 % vs 24 % v prípade 12 mesiacov)⁽³¹⁾.

Detekcia návratu ochorenia. Sľubnou klinickou aplikáciou tekutej biopsie je skorá detekcia návratu ochorenia po liečbe. V tomto ohľade bola dôležitá štúdia, v ktorej monitorovanie nádorovo špecifických zmien (vrátane *APC*, *TP53* a *KRAS*) u pacientov s CRC, ktorí podstúpili operáciu, viedlo k identifikácii návratu ochorenia s takmer stopercentnou senzitivitou a špecifitou. Na základe pretrvávania tumor-asociovaných genetických zmien v cfDNA bezprostredne po operácii boli identifikované aj všetky prípady neúplnej resekcie u pacientov s reziduálnou chorobou. Následné štúdie preukázali konzistentný vzťah medzi návratom ochorenia a opätovným objavením určitých nádorových zmien vrátane *APC*, *TP53* a *KRAS* mutácií, ako aj alelovej nerovnováhy⁽³²⁻³⁴⁾.

Dormancia je bežným javom mnohých nádorových ochorení a nemožno ju detegovať štandardnými metódami. Sledovanie tumorovo špecifických zmien v počte kópií genomických oblastí u 50 pacientov s rakovinou prsníka pred operáciou aj po operácii preukázalo, že tieto aberácie môžu v plazme pretrvávať až do 12 rokov po diagnóze nádorového ochorenia⁽³⁵⁾.

Predikcia odpovede na liečbu. V súčasnosti sa výber cieľenej terapie v klinickej praxi riadi prítomnosťou alebo absenciou jedinej genetickej zmeny v nádorovej DNA. Molekulárna analýza však býva často vykonávaná na archivovaných tkanivových vzorkách nádorov, čo nie je optimálny prístup, keďže nemusí odrážať aktuálne genetické pozadie ochorenia. V prípadoch, keď nemožno vykonať novú biopsiu, by ctDNA mohla slúžiť ako ideálny biomarker aktuálneho molekulárneho stavu ochorenia. Napríklad pre manažment pacientov s rakovinou prsníka je rozhodujúce vyhodnotenie HER2 statusu. Na detekciu HER2 amplifikácie v ctDNA u pacientov s metastatickým karcinómom prsníka Gevensleben a kol. optimalizovali metódu digitálnej PCR, pričom na vývoj metó-

dy bola použitá skupina 65 pacientov a na validáciu iná nezávislá skupina 58 pacientov. Pacienti s metastatickým ochorením, ktorí boli identifikovaní ako HER2 pozitívni, tak mohli profitovať z HER2 cieľenej terapie trastuzumabom. Dokonca traja pacienti s metastatickým karcinómom prsníka zahrnutí do tejto štúdie získali pri recidíve ochorenia pozitívny HER2 status napriek tomu, že boli predtým na základe biopsie tkaniva klasifikovaní ako HER2 negatívni⁽³⁶⁾.

Na predikciu odpovede na liečbu možno použiť aj detekciu zvýšeného množstva kópií iných génov, ako napr. *MET* amplifikáciu na predpovedanie odpovede na anti-EGFR terapiu v prípade rakoviny pľúc⁽³⁷⁾. Ako jasný indikátor odpovede na liečbu cetuximabom a irinotekanom pri metastatickom kolorektálnom karcinóme je prítomnosť, resp. kvantifikácia mutácií *KRAS* v plazme, pričom zvýšené množstvo koreluje so zlou prognózou. U niektorých pacientov s nízkou hladinou *KRAS* mutácií v plazme možno anti-EGFR terapiou dosiahnuť určitú úroveň stabilizácie ochorenia⁽²⁹⁾. Podobné výsledky boli opísané aj v prípade 64 pacientov s metastatickým kolorektálnym karcinómom, u ktorých bol na liečbu použitý temsirolimus a irinotekan buď samostatne, alebo v kombinácii. Pacienti so zvýšeným podielom *KRAS* mutácií v plazme liečení monoterapiou mali 77 % riziko skorej progresie ochorenia v porovnaní so 43 % rizikom v prípade pacientov, u ktorých bolo množstvo *KRAS* mutácií v plazme nízke⁽³⁸⁾.

Biomarker druhotnej rezistencie. Vývoj sekundárnej (získanej) rezistencie v dôsledku mutácie je bežným dôsledkom cieľenej terapie u väčšiny pacientov s nádorovým ochorením. Príkladom je T790M substitúcia v membránovom receptore EGFR, ktorá má za následok rezistenciu proti gefitinibu a erlotinibu asi u 50 % pacientov s rakovinou pľúc⁽³⁹⁾. Mutácia bola najskôr zistená u pacientov s relapsom a neskôr potvrdená neinvazívnou analýzou vzoriek plazmy, čím bola potvrdená možnosť využitia tekutej biopsie na monitorovanie rezistencie na cieľnú terapiu^(40,41).

Podobne sekundárna rezistencia proti anti-EGFR protilátkam cetuximabu a panitumumabu, ktoré sa využívajú na liečbu kolorektálneho karcinómu, je výsledkom vzniku *KRAS* mutácií v bunkách nádoru⁽⁴²⁾. Detekciou mutácií *KRAS* v krvi pacientov počas liečby cetuximabom a panitumumabom tak možno detegovať vznik rezistentných alel až o 10 mesiacov skôr ako so štandardnými metódami^(42,43). Diaz a kol. zistili v sére 9 z 24 pacientov s CRC, ktorých nádory boli spočiatku bez *KRAS* mutácií, prítomnosť detegovateľných mutácií *KRAS* génu, pričom pri troch z nich boli detegované viaceré rozdielne mutácie. Výskyt týchto mutácií bol veľmi konzistentný, všeobecne nastal päť až šesť mesiacov po terapii⁽⁴³⁾.

Záver

Na záver môžeme skonštatovať, že detekcia nádorovo špecifických zmien vychádzajúca z analýzy cfDNA, resp. ctDNA, predstavuje obrovský prínos v diagnostike a prognostike onkologických ochorení. Sú zároveň nádejnou cestou aj na zlepšenie ich liečby nielen vďaka tomu, že predstavujú neinvazívnu alternatívu výrazne menej zaťažujúcu pacienta aj zdravotné pracovisko pri odbere vzoriek, ale i preto, že majú možnosť lepšie charakterizovať aktuálny priebeh nádorového ochorenia, ktorého heterogenita je štandardnými postupmi identifikovateľná len vo veľmi obmedzenom rozsahu. V budúcnosti možno počítať s tým, že analýza cfDNA,

resp. ctDNA bude doplnkom ku klasickej histopatologickej analýze nádorového tkaniva, ale že v prípade, že bude možné jej potenciál využiť naplno, sa, naopak, histopatologická analýza stane doplnkovou analýzou k primárnej analýze cfDNA, resp. ctDNA.

LITERATÚRA

1. Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, et al. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res* 1977; 37(3): 646-650.
2. Stroun M, Anker P, Maurice P, et al. Neoplastic characteristics of the DNA found in the plasma of cancer patients. *Oncology* 1989; 46(5): 318-322.
3. Sorenson GD, Pribish DM, Valone FH, et al. Soluble normal and mutated DNA sequences from single-copy genes in human blood. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1994; 3(1): 67-71.
4. Vasioukhin V, Anker P, Maurice P, et al. 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(4): 774-779.
5. Diehl F, Li M, Dressman D, et al. Detection and quantification of mutations in the plasma of patients with colorectal tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102(45): 16368-16373.
6. Garcia-Olmo DC, Dominguez C, Garcia-Arranz M, et al. Cell-free nucleic acids circulating in the plasma of colorectal cancer patients induce the oncogenic transformation of susceptible cultured cells. *Cancer Res* 2010; 70(2): 560-567.
7. Trejo-Becerril C, Perez-Cardenas E, Taja-Chayeb L, et al. Cancer progression mediated by horizontal gene transfer in an in vivo model. *PLoS One* 2012; 7(12): e52754.
8. Perkins G, Yap TA, Pope L, et al. Multi-purpose utility of circulating plasma DNA testing in patients with advanced cancers. *PLoS One* 2012; 7(11): e47020.
9. Alix-Panabieres C, Pantel K. Challenges in circulating tumour cell research. *Nat Rev Cancer* 2014; 14(9): 623-631.

Grantová podpora: Táto publikácia vznikla s podporou grantov Agentúry na podporu výskumu a vývoja – APVV-14-0273 a APVV-14-0327.

10. Schwarzenbach H, Hoon DS, Pantel K. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nat Rev Cancer* 2011; 11(6): 426-437.
11. Jahr S, Hentze H, Englisch S, et al. DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer Res* 2001; 61(4): 1659-1665.
12. Ellinger J, Wittkamp V, Albers P, et al. Cell-free circulating DNA: diagnostic value in patients with testicular germ cell cancer. *J Urol* 2009; 181(1): 363-371.
13. Underhill HR, Kitzman JO, Hellwig S, et al. Fragment Length of Circulating Tumor DNA. *PLoS Genet* 2016; 12(7): e1006162.
14. Heitzer E, Ulz P, Geigl JB. Circulating tumor DNA as a liquid biopsy for cancer. *Clin Chem* 2015; 61(1): 112-123.
15. Mouliere F, Robert B, Arnau Peyrotte E, et al. High fragmentation characterizes tumour-derived circulating DNA. *PLoS One* 2011; 6(9): e23418.
16. Bettegowda C, Sausen M, Leary RJ, et al. Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Sci Transl Med* 2014; 6(224): 224ra224.
17. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, et al. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med* 1988; 319(9): 525-532.
18. Slebos RJ, Kibbelaar RE, Dalesio O, et al. K-ras oncogene activation as a prognostic marker in adenocarcinoma of the lung. *N Engl J Med* 1990; 323(9): 561-565.
19. Sorenson GD, Pribish DM, Valone FH, et al. Soluble normal and mutated DNA sequences from single-copy genes in human blood. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1994; 3(1): 67-71.



Vaše komplexné diagnostické riešenie

Využite plno automatický systém pre molekulárnu diagnostiku, vyvinutý pre rýchle získanie klinických diagnostických informácií.

Systém Idylla™ pracuje na princípe RT-PCR. Je to komplexné diagnostické riešenie od izolácie DNA až po užívateľsky modifikovaný report. Celý proces trvá od 40 do 150 minút. **Systém Idylla™** je určený na spracovanie rôznych typov vzoriek vrátane FFPE a plazmy. Vďaka patentovanej technológii si poradí aj s problematickými alebo archívnymi vzorkami.



Idylla™ BRAF Mutation test CE-IVD
Idylla™ KRAS Mutation test CE-IVD
Idylla™ NRAS/BRAF Mutation test CE-IVD
Idylla™ NRAS Mutation test CE-IVD
Idylla™ EGFR Mutation test CE-IVD
Idylla™ ctBRAF Mutation Assay RUO
Idylla™ ctKRAS Mutation test CE-IVD
Idylla™ ctNRAS/BRAF Mutation test CE-IVD

Testy Idylla™



Idylla MSI test coming soon!

20. Kopreski MS, Benko FA, Kwee C, et al. Detection of mutant K-ras DNA in plasma or serum of patients with colorectal cancer. *Br J Cancer* 1997; 76(10): 1293-1299.
21. Kopreski MS, Benko FA, Borys DJ, et al. Somatic mutation screening: identification of individuals harboring K-ras mutations with the use of plasma DNA. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92(11): 918-923.
22. Mulcahy HE, Lyautey J, Lederrey C, et al. A prospective study of K-ras mutations in the plasma of pancreatic cancer patients. *Clin Cancer Res* 1998; 4(2): 271-275.
23. Wong IH, Lo YM, Zhang J, et al. Detection of aberrant p16 methylation in the plasma and serum of liver cancer patients. *Cancer Res* 1999; 59(1): 71-73.
24. Esteller M, Sanchez-Cespedes M, Rosell R, et al. Detection of aberrant promoter hypermethylation of tumor suppressor genes in serum DNA from non-small cell lung cancer patients. *Cancer Res* 1999; 59(1): 67-70.
25. Silva JM, Dominguez G, Villanueva MJ, et al. Aberrant DNA methylation of the p16INK4a gene in plasma DNA of breast cancer patients. *Br J Cancer* 1999; 80(8): 1262-1264.
26. Fujiwara K, Fujimoto N, Tabata M, et al. Identification of epigenetic aberrant promoter methylation in serum DNA is useful for early detection of lung cancer. *Clin Cancer Res* 2005; 11(3): 1219-1225.
27. Liu Y, An Q, Li L, et al. Hypermethylation of p16INK4a in Chinese lung cancer patients: biological and clinical implications. *Carcinogenesis* 2003; 24(12):1897-1901.
28. Lecomte T, Berger A, Zinzindohoue F, et al. Detection of free-circulating tumor-associated DNA in plasma of colorectal cancer patients and its association with prognosis. *Int J Cancer* 2002; 100(5): 542-548.
29. Spindler KL, Pallisgaard N, Vogelius I, et al. Quantitative cell-free DNA, KRAS, and BRAF mutations in plasma from patients with metastatic colorectal cancer during treatment with cetuximab and irinotecan. *Clin Cancer Res* 2012; 18(4): 1177-1185.
30. Dawson SJ, Tsui DW, Murtaza M, et al. Analysis of circulating tumor DNA to monitor metastatic breast cancer. *N Engl J Med* 2013; 368(13): 1199-1209.
31. Castells A, Puig P, Mora J, et al. K-ras mutations in DNA extracted from the plasma of patients with pancreatic carcinoma: diagnostic utility and prognostic significance. *J Clin Oncol* 1999; 17(2): 578-584.
32. Frattini M, Gallino G, Signoroni S, et al. Quantitative and qualitative characterization of plasma DNA identifies primary and recurrent colorectal cancer. *Cancer Lett* 2008; 263(2): 170-181.
33. Hamana K, Uzawa K, Ogawara K, Shiiba M, Bukawa H, Yokoe H, Tanzawa H. Monitoring of circulating tumour-associated DNA as a prognostic tool for oral squamous cell carcinoma. *Br J Cancer* 2005; 92(12): 2181-2184.
34. Hsieh JS, Lin SR, Chang MY, et al. APC, K-ras, and p53 gene mutations in colorectal cancer patients: correlation to clinicopathologic features and post-operative surveillance. *Am Surg* 2005; 71(4): 336-343.
35. Shaw JA, Page K, Blighe K, et al. Genomic analysis of circulating cell-free DNA infers breast cancer dormancy. *Genome Res* 2012; 22(2): 220-231.
36. Gevensleben H, Garcia-Murillas I, Graeser MK, et al. Noninvasive detection of HER2 amplification with plasma DNA digital PCR. *Clin Cancer Res* 2013; 19(12): 3276-3284.
37. Bean J, Brennan C, Shih JY, et al. MET amplification occurs with or without T790M mutations in EGFR mutant lung tumors with acquired resistance to gefitinib or erlotinib. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104(52): 20932-20937.
38. Spindler KL, Sorensen MM, Pallisgaard N, et al. Phase II trial of temsirolimus alone and in combination with irinotecan for KRAS mutant metastatic colorectal cancer: outcome and results of KRAS mutational analysis in plasma. *Acta Oncol* 2013; 52(5): 963-970.
39. Kosaka T, Yatabe Y, Endoh H, et al. Analysis of epidermal growth factor receptor gene mutation in patients with non-small cell lung cancer and acquired resistance to gefitinib. *Clin Cancer Res* 2006; 12(19): 5764-5769.
40. Nakamura T, Sueoka-Aragane N, Iwanaga K, et al. Application of a highly sensitive detection system for epidermal growth factor receptor mutations in plasma DNA. *J Thorac Oncol* 2012; 7(9): 1369-1381.
41. Taniguchi K, Uchida J, Nishino K, et al. Quantitative detection of EGFR mutations in circulating tumor DNA derived from lung adenocarcinomas. *Clin Cancer Res* 2011; 17(24): 7808-7815.
42. Misale S, Yaeger R, Hobor S, et al. Emergence of KRAS mutations and acquired resistance to anti-EGFR therapy in colorectal cancer. *Nature* 2012; 486(7404): 532-536.
43. Diaz LA, Jr., Williams RT, Wu J, et al. The molecular evolution of acquired resistance to targeted EGFR blockade in colorectal cancers. *Nature* 2012; 486(7404): 537-540.



RNDr. Gabriel Minárik, PhD.

Lekárska genetika, Medirex, a. s.
Galvaniho 17/C, 820 16 Bratislava
e-mail: gabriel.minarik@medirex.sk