

Biopsia dychu: potenciálny zdroj DNA pre biomedicínske aplikácie

Ondrej Pös^{1,2}, Monika Kubáňová³, Jakub Styk^{1,2,4}, Silvia Bokorová^{1,2}, Werner Krampfl^{1,2,3}, Tatiana Sedláčková^{1,2}, Vanda Repiská⁴, Bálint Nagy^{2,5}, Tomáš Szemes^{1,2,3}

¹Geneton, s. r. o., Bratislava, Slovensko

²Vedecký park Univerzity Komenského, Bratislava, Slovensko

³Prírodovedecká fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave, Slovensko

⁴Ústav lekárskej biológie, genetiky a klinickej genetiky, Lekárska fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave, Slovensko

⁵Ústav humánnej genetiky, Lekárska fakulta, Univerzita Debrecín, Maďarsko

Koncept biopsie dychu s cieľom identifikovať alterácie na úrovni genómu jedinca je v záujme výskumu už niekoľko dekád. Rozvoj metodických prístupov záchytu a extrakcie DNA zo vzduchu a zavádzanie výkonných genomických technológií do rutinej praxe posúva jej využitie v sfére modernej personalizovanej medicíny na úroveň neinvazívnej biopsie. Mnohé závažné a časté patológie sa v skorých štádiách prejavujú s minimálnym, prípadne nulovým fenotypom. Vo väčšine týchto prípadov všeobecne platí, že čím neskôr je ochorenie diagnostikované, tým je liečba pacienta menej efektívna. Biopsia dychu tak môže poskytovať včasný spôsob detekcie ochorenia vrátane rakoviny už od ich počiatočných štádií. Preukazuje sľubný potenciál stať sa novým diagnostickým a skriningovým štandardom preventívnych, prediktívnych a cielených biomedicínskych aplikácií. Analýza vzoriek dychu umožňuje okrem identifikácie inovatívnych DNA biomarkerov detekciu infekčných agensov, napríklad vírusových častíc, a hodnotenie ich vplyvu na ľudské zdravie. V danej práci poskytujeme prehľad aktuálnych metodických prístupov dychovej biopsie a poukazujeme na jej vysoký potenciál v oblasti biomedicínskych aplikácií. **Kľúčové slová:** biopsia dychu, cfDNA, eDNA, biomarker, rakovina

Breath biopsy: a potential source of DNA for biomedical applications

The concept of breath biopsy to identify alterations in the genome has been in the interest of research for decades. The development of systematic approaches to collecting and extracting DNA from the breath and the introduction of powerful genomic technologies into routine practice brings its use in modern personalized medicine to the level of non-invasive biopsy. Many severe and frequent pathologies manifest in the early stages with a minimal phenotype or even without manifestation. In most of these cases, it is generally true that the later the disease is diagnosed, the less effective the patient's treatment. Breath biopsy can thus provide a method of early disease detection, including cancer, from its initial stages. It shows promising potential to become a new diagnostic and screening standard for preventive, predictive, and targeted biomedical applications. In addition to identifying innovative DNA biomarkers, the analysis of breath samples also enables the detection of infectious agents, such as viral particles, and the assessment of their impact on human health. In this work, we overview the current methodological approaches to respiratory biopsy and point out its high potential in biomedical applications. **Keywords:** breath biopsy, cfDNA, eDNA, biomarker, cancer

NewsLab, 2022; roč. 13 (2): 96 – 98

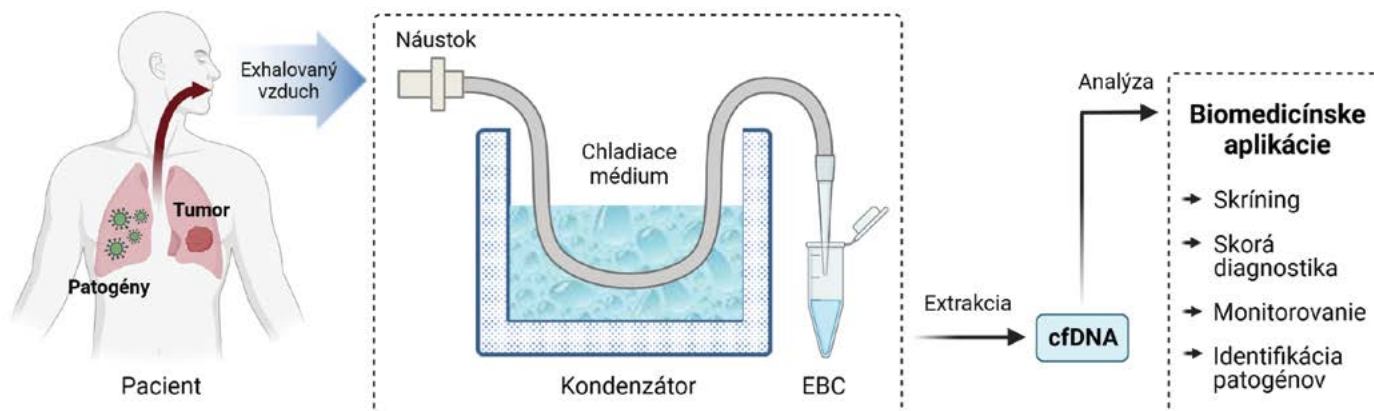
Úvod

Koncept odoberania vzoriek vydychovaného vzduchu, známy tiež ako dychová biopsia (angl. *breath biopsy*), pre analýzu zmien spojených s patogenézou ochorenia nie je úplne nový. Dávno pred súčasnou diagnostikou bol vydychovaný vzduch využívaný na rozpoznávanie niektorých chorôb. Napríklad sladký zápach dychu bol spájaný s diabetom mellitom, rybí zápach s ochorením pečene a zápach podobný moču s ochorením obličiek⁽¹⁾. V súčasnosti je zavedených viacero dychových testov, ktoré sa bežne využívajú v praxi, napr. meranie vydychovaného oxidu dusnatého pri diagnostike a monitorovaní astmy⁽²⁾.

Nové technológie a tiež zvýšený dôraz na vysokovýkonnú biologickú analýzu a metabolomiku v súčasnej ére genomi-

ky pomohli rozšíriť výskum v oblasti dychovej biopsie, a preto rýchlo rastie záujem o tzv. *Breathomiku*⁽³⁾. Vydychovaný ľudský vzduch obsahuje tisíce prchavých organických zlúčenín (angl. *volatile organic compounds*; VOC), ktoré majú potenciál ako biomarkery pre diagnostiku ochorenia vrátane rakoviny^(4,5). O viacerých zavedených dychových testoch, ktoré využívajú analýzu endogénnych alebo exogénnych VOC, sa diskutuje v práci Pham and Beauchamp 2021⁽⁶⁾. Avšak vydychovaný vzduch obsahuje okrem volatilných zlúčenín respiračné kvapôčky pochádzajúce z pľúc a dýchacích ciest. Tieto mikroskopické častice aerosólu v sebe dokážu niesť nevolatilnú hmotu, ako sú elektrolyty, sacharidy, enzýmy, nukleové kyseliny, zvyšky dehydrovaných epitelových buniek a/alebo bielych krviniek⁽⁷⁾ a tiež rôzne infekčné agensy (napr. bakté-

Obrázok 1. Schéma dychovej biopsie. Cieľom prístupu je odber vydychovaného vzduchu a jeho následná kondenzácia, pričom vznikne tekutý kondenzát (EBC), z ktorého možno extrahovať cfDNA pre genetické analýzy. Účelom môžu byť biomedicínske aplikácie, ako je identifikácia patogénov respiračného traktu alebo skríning, skorá diagnostika či monitorovanie nádorových ochorení.



rie, huby a vírusy)⁽⁸⁾. Napriek tomu, že vydychovaný vzduch je v podstate odpadovým produktom, predstavuje bohatý zdroj pre neinvazívne získavanie a analýzu biomarkerov využiteľných vo výskume a v potenciálnych biomedicínskych aplikáciách.

Metódy získavania a analýzy DNA z vydychovaného vzduchu

Jedným z prístupov na získanie genetického materiálu z dychovej biopsie je kondenzácia vydychovaného vzduchu (angl. *exhaled breath condensate*; EBC). V štúdiách boli na zber tohto typu vzorky opísané rôzne customizované aj komerčne dostupné systémy, ako sú RTube, EcoScreen, TURBO-DECCS alebo Anacon⁽⁹⁾. Princíp odberu EBC prebieha tak, že teplý vzduch vydychovaný z pľúc začne kondenzovať, keď príde do kontaktu s chladiacim médiom, respektíve kondenzačným systémom prístroja. Vydychovaný vzduch sa po kondenzácii mení na kvapalinu zachytávanú v systéme. Na chladienie sa môžu použiť rôzne médiá, ako je napríklad ľad, suchý ľad, tekutý dusík alebo elektrické chladiace systémy a iné. Pri teplotách pod 4 °C dochádza ku kondenzácii vydychovaného vzduchu, avšak samotná teplota kondenzácie môže ovplyvniť koncentráciu biomarkerov v EBC. Čas potrebný na odber vzoriek je priamoúmerný získanému objemu EBC, pričom podľa dostupnej literatúry možno získať za 10 – 30 minút približne 1-3 ml vzorky. S prihliadnutím na individuálnu variabilitu sa však môže výsledný objem EBC pre každého jedinca líšiť⁽¹⁰⁾. Množstvo DNA extrahovanej z EBC je pomerne nízke a nie vždy spĺňa kvantitu požadovanú pre daný typ analýzy⁽¹¹⁾, no v literatúre bola opísaná priemerná koncentrácia extrahovanej DNA v 100 µl eluátu približne 20 ng/µl⁽¹²⁾⁽¹²⁾.

Aplikácie DNA extrahovanej z ovzdušia a biopsie dychu

Vzduch obsahuje rôzne častice (napr. spóry, peľ, prach, baktérie, vírusy, respiračné kvapôčky), ktoré môžu zotrvať v atmosfére aj niekoľko dní. V závislosti od podmienok prostredia (napr. vlhkosti vzduchu) a veľkosti častíc môžu byť potom transportované na pomerne veľké vzdialenosti⁽¹³⁾. Aj preto sa molekuly DNA uvoľňujú do okolitého ovzdušia v po-

dobe tzv. environmentálnej DNA (eDNA), ktorá v súčasnosti predstavuje jeden z najrýchlejšie sa rozvíjajúcich prístupov pre monitorovanie biodiverzity⁽¹⁴⁾. Fakt, že respiračné kvapôčky môžu obsahovať vírusy, je okrem iného dobrým predpokladom na monitorovanie prítomnosti patogénov⁽¹⁵⁾. Analýza eDNA na exponovaných stanovištiach s vysokou hustotou osôb by teda mohla predstavovať prístup na monitorovanie vírusov, ktoré sa šíria kvapôčkovou infekciou, ako je napríklad vírus SARS-CoV-2 v čase pandémie ochorenia COVID-19.

Na druhej strane analýza nukleových kyselín priamo z vydychovaného vzduchu má väčší potenciál pre biomedicínske aplikácie. Môže taktiež poslúžiť na identifikáciu patogénov respiračného traktu, no vydychovaný vzduch poskytuje aj neinvazívny prístup ku genetickému materiálu epitelovej výstelky pľúc⁽⁹⁾. Biopsia dychu sa preto javí ako vhodná alternatíva pre štúdium genetických zmien spojených s malignitami dýchacieho traktu, ako je napríklad rakovina pľúc⁽¹⁶⁾. Štandardné prístupy ako bronchoskopia a biopsia ihlou majú súvisiace riziká, a preto nie sú vhodné pre populačný skríning, ktorý by umožnil včasnú diagnostiku tohto ochorenia. Diagnostika nádoru v pokročilých štádiách však výrazne zhoršuje prežívanie pacientov, a preto sú žiaduce nové, neinvazívne diagnostické nástroje na skríning a včasnú diagnostiku rakoviny pľúc⁽¹⁷⁾. Ako vhodný a ľahko dostupný orgánovošpecifický zdroj biologických informácií sa javí dychová biopsia, pretože umožnila identifikáciu genetických zmien spojených s karcinogéznou tohto ochorenia v EBC pacientov s nemalobunkovým karcinómom pľúc⁽¹²⁾.

Pacienti v pokročilom štádiu rakoviny pľúc nie sú vždy schopní absolvovať opakovanú biopsiu na ďalšiu molekulárnu analýzu, preto sa aktívne vyvíjajú neinvazívne metódy na báze cell-free DNA (cfDNA). V tejto spojitosti Smyth a kol. študovali možnosť detekcie mutácie *EGFR* T790M na vzorkách *EGFR*-pozitívnych pacientov s adenokarcinómom pľúc vo IV. štádiu. Výsledky naznačujú, že EBC sú pre zachytenie cfDNA s mutáciou *EGFR* dokonca vhodnejším typom vzorky ako krvná plazma. Nedokonalá citlivosť plazmy je pravdepodobne spôsobená vysokými hladinami *wild-type* genómovej DNA, ktorá maskuje menej zastúpenú mutantnú alelu a príčinou je tiež vysoká nukleázová aktivita v krvi. EBC je acelulárna tekutina, a preto môže obsahovať nižšie hladiny *wild-type*

pe DNA, pričom aj hladina endogénnej nukleázy v pľúcach je v porovnaní s krvou oveľa nižšia⁽¹⁸⁾.

Nízky výťažok DNA z EBC komplikuje podrobnejšiu analýzu mutácií konvenčnými metódami, v dôsledku čoho je tento prístup relatívne slabo preskúmaný. Pozornosť je potrebné venovať optimalizácii odberu, uskladneniu a spracovaniu vzoriek EBC aj aplikácii citlivejších metód na analýzu genetického materiálu, ako je masívne paralelné sekvenovanie. Výsledky štúdie, ktorá skúmala túto problematiku, naznačujú, že DNA z vydychovaného vzduchu zdravých jedincov má potenciál na odhalenie mutácií, ktoré by mohli reprezentovať veľmi skoré neoplastické zmeny⁽¹⁶⁾. Analýza nukleových kyselín z EBC by teda mohla predstavovať sľubný prístup pre skrining a včasnú diagnostiku rakoviny pľúc, no keďže je to orgánovošpecifická biotekutina, môže mať potenciál aj pri vyšetrovaní metastatických ochorení v oblasti hrudníka⁽¹⁸⁾.

Záver

Na rozdiel od konvenčných skriningových prístupov vychádzajúcich predovšetkým z tkanivovej a tekutej biopsie, ktorých proces získavania predstavuje pre pacienta viac alebo menej stresujúci zákrok, je proces získavania dychovej biopsie z pohľadu diagnostickej aplikácie maximálne neinvazívnou stratégiou. Vydychovaný aerosól je rezervoárom klinicky relevantných genomických informácií, akými sú nukleové kyseliny, ale tiež proteínov, signálnych molekúl či rôznych vírusových a patogénnych agensov. Množstvo biomarkerov derivovaných z dychovej biopsie sa do pľúc a ná-

sledne do aerosólu dostáva prostredníctvom systematickej cirkulácie a difúzie priamo z krvi. Výskumy prebiehajúce v tejto oblasti naznačujú, že pomocou dychovej biopsie možno detegovať a následne monitorovať aj ochorenia vzdialených orgánových sústav, ako je centrálna nervová sústava, respektíve gastrointestinálny trakt. Z dychu extrahované substancie môžu slúžiť pri skoršej detekcii ochorenia v expandujúcej oblasti precíznej a personalizovanej biomedicíny. Vznikajúce skriningové testy na báze dychovej biopsie môžu práve vďaka svojej jednoduchej implementácii nájsť uplatnenie aj v centrách primárnej starostlivosti. Majú veľký potenciál stať sa vhodným nástrojom populačných skriningových programov a dramaticky zlepšiť včasnú detekciu závažných patológií, a tým aj prežívanie pacientov s mnohými typmi onkologických a vírusových ochorení.

Podakovanie

Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci Operačného programu Integrovaná infraštruktúra pre projekty: Integrovaná stratégia v rozvoji personalizovanej medicíny vybraných zhubných nádorových ochorení a jej vplyv na kvalitu života, kód ITMS: 313011V446 a Pangenomika pre personalizovaný klinický manažment infikovaných osôb na základe identifikovaného virálneho genómu a ľudského exómu, kód ITMS: 313011ATL7, spolufinancované zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

LITERATÚRA

1. Lawal O, Ahmed WM, Nijssen TME, et al. Exhaled breath analysis: a review of "breath-taking" methods for off-line analysis. *Metabolomics*. 2017; 13: 110.
2. Grob NM, Dweik RA. Exhaled nitric oxide in asthma: progress since the introduction of standardized methodology. *J Breath Res*. 2008; 2: 37002.
3. Kuo TC, Tan CE, Wang SY, et al. Human Breathomics Database. *Database (Oxford)*. 2020; 2020: baz139. doi: 10.1093/database/baz139.
4. Wu X, Zhu L, Ma PC. Next-Generation Novel Noninvasive Cancer Molecular Diagnostics Platforms Beyond Tissues. *Am Soc Clin Oncol Educ Book*. 2018; 38: 964-977.
5. Krilaviciute A, Heiss JA, Leja M, et al. Detection of cancer through exhaled breath: a systematic review. *Oncotarget*. 2015; 6: 38643-38657.
6. Pham YL, Beauchamp J. Breath Biomarkers in Diagnostic Applications. *Molecules*. 2021; 26. doi: 10.3390/molecules26185514.
7. Stadnytskyi V, Bax CE, Bax A, et al. The airborne lifetime of small speech droplets and their potential importance in SARS-CoV-2 transmission. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2020; 117: 11875-11877.
8. Atkinson J, Chartier Y, Pessoa-Silva CL, et al. *Natural Ventilation for Infection Control in Health-Care Settings*. Geneva: World Health Organization; 2013.
9. Koc A, Goksel T, Pelit L, et al. cfDNA in exhaled breath condensate (EBC) and contamination by ambient air: toward volatile biopsies. *J Breath Res*. 2019; 13: 036006.
10. Youssef O, Sarhadi VK, Armengol G, et al. Exhaled breath condensate as a source of biomarkers for lung carcinomas. A focus on genet-

ic and epigenetic markers-A mini-review. *Genes Chromosomes Cancer*. 2016; 55: 905-914.

11. Chen JL, Chen JR, Huang FF, et al. Analysis of p16 gene mutations and their expression using exhaled breath condensate in non-small-cell lung cancer. *Oncol Lett*. 2015; 10: 1477-1480.
12. Carpagnano GE, Foschino-Barbaro MP, Mulé G, et al. 3p microsatellite alterations in exhaled breath condensate from patients with non-small cell lung cancer. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005; 172: 738-744.
13. Lynggaard C, Bertelsen MF, Jensen CV, et al. Airborne environmental DNA for terrestrial vertebrate community monitoring. *Curr Biol*. 2022; 32: 701-707.e5.
14. Clare EL, Economou CK, Faulkes CG, et al. eDNAir: proof of concept that animal DNA can be collected from air sampling. *PeerJ*. 2021; 9: e11030.
15. Hirota K. Air contamination with SARS-CoV-2 in the operating room. *J Anesth*. 2021; 35: 333-336.
16. Youssef O, Knuuttila A, Piirilä P, et al. Presence of cancer-associated mutations in exhaled breath condensates of healthy individuals by next generation sequencing. *Oncotarget*. 2017; 8: 18166-18176.
17. Dent AG, Suttedja TG, Zimmerman PV. Exhaled breath analysis for lung cancer. *J Thorac Dis*. 2013; 5 Suppl 5: S540-S550.
18. Smyth RJ, Toomey SM, Sartori A, et al. Brief Report on the Detection of the EGFR T790M Mutation in Exhaled Breath Condensate from Lung Cancer Patients. *J Thorac Oncol*. 2018; 13: 1213-1216.

RNDr. Ondrej Pös, PhD.

Vedecský park Univerzity Komenského v Bratislave
Ilkovičova 8, 841 04 Bratislava
e-mail: ondrej.pos@uniba.sk