

AKCİĞER KANSERİNDE LİKİT BİYOPSİNİN YERİ

LIQUID BIOPSY FOR LUNG CANCER

Hüseyin Baloğlu

Anadolu Sağlık Merkezi Patoloji Bölümü, Kocaeli, Türkiye

e-mail: huseyinbaloglu@gmail.com

DOI: 10.5578/tcb.2017.011

Özet

İstatistiksel veriler akciğer kanseri için daha etkin tarama, tanı ve tedavi araçlarına ihtiyaç duyulduğunu göstermektedir. Günümüzde öne çıkan her bireyin kendi tümörüne özel verilere dayanan tedavi modellerinin daha avantajlı sonuçlar sağlayabildiğine dair önemli kanıtlar mevcuttur. Sağlanan avantajın temel çıkış noktası ise her bir tümörün biyolojik seyrine göre etkin tedaviye olanak sağlayan genetik değişikliklerin tespiti ve ilişkili devrimin takibine olanak sağlayan teknolojilerdir. Bu makalede yeni bir perspektif olarak, tarama, tanı ve tedaviye yönelik tümör genotipik özelliklerine ait bilgilerin elde edilme yöntemlerinden biri olarak likit biyopsinin potansiyeli ve akciğer kanseri için kullanımı anlatılmıştır.

Anahtar kelimeler: Likit biyopsi, hedefe yönelik tedavi, akciğer kanseri, CTC, cftDNA

Abstract

Statistical analysis reveals that there is a need for more effective screening, diagnostic and therapeutic applications for lung cancer. Core data coming from respectful studies prove that tailored therapy based on each patient's tumor characteristics give more reliable therapy results. The rationale of this advantage is the technologic improvements that enable to detect and monitor genetic profile of individual's tumor which creates an opportunity to plan therapy according to tumor biology. In the present article, the liquid biopsy as an application to reach tumor genotype details in lung cancer screening, diagnosis and therapy is discussed as new perspective in lung cancer.

Keywords: Liquid biopsy, targeted therapy, lung cancer, CTC, cftDNA

GİRİŞ

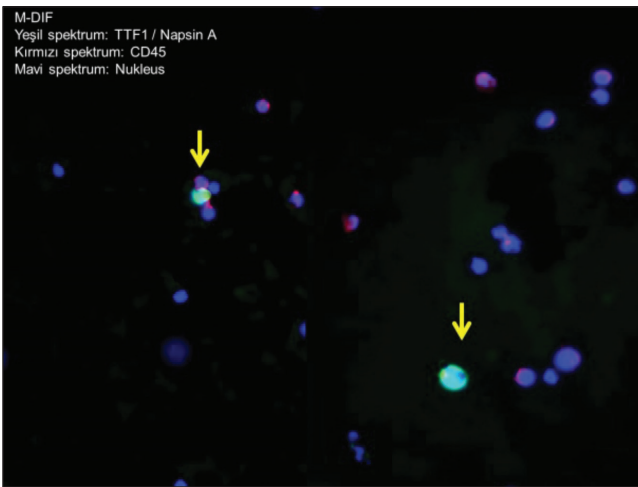
Akciğer kanseri halen yaygın bir sağlık sorunu ve ölüm nedenidir. Daha etkin tarama, tanı ve tedaviyi hedefleyen çalışmaların hemen tamamı, temel olarak, tümör ve hastaya ait ortak verilere dayanan standardizasyon çıkarımlarıdır. Yani bireye, bireyin her bir tümörüne ait bilgilerden çok, popülasyon verilerine dayanan tedavi modelleri ön planda olmuştur. Teknolojik gelişmelere paralel olarak hızlanan ve Haziran 2014'te ilk verileri yayınlanan "The Cancer Genome Atlas (TCGA)"-Akciğer kanseri projesi, daha önce yapılmış diğer çalışma sonuçlarıyla birlikte, akciğer kanserinin biyolojisiyle ilişkili moleküler özelliklerin ayrıntılı olarak anlaşılmasına ışık tutmuştur (1). Böylece, daha önce aynı gruplarda evrelenerek tedavisi planlanan hastaların, aslında farklı genotipik özelliklerde tümörlere sahip olabildikleri, bu nedenle de aynı tedaviye farklı ya-

nıtların oluşabildiği yönündeki düşünceler kanıta ulaşmıştır. TCGA proje verileri, tümör genotipine özgün tedavi seçeneklerinin de rasyonelini oluşturmuştur (2). Uluslararası genel kabul gören bir konsensus olarak "American Joint Committee on Cancer (AJCC)" 2017'de güncellenen kanser evreleme protokollerindeki (8 versiyon) radikal değişimin rasyonelinden de anlaşılacağı üzere, popülasyon özelliklerine dayanan sınıflama/evreleme ve ilişkili tedavilerden, tümör biyolojisine/genetiğine dayanan bireyselleştirilmiş özgün tedavilere geçiş artık kaçınılmazdır (3).

Bu makalede yeni bir perspektif olarak, tarama, tanı ve tedaviye yönelik tümör genotipik özelliklerine ait bilgilerin elde edilme yöntemlerinden biri olarak likit biyopsinin (LB) potansiyeli ve akciğer kanserindeki yeri irdelenmiştir.

LİKİT BİYOPSİNİN TANIMI ve KAPSAMI

Medikal literatürde metastaz, çoğalan tümör hücrelerinin köken aldığı yerden kan ya da lenf damarları yoluyla başka bir bölgeye ulaşım çoğalmasında olarak tanımlanır. Kanser ve metastazın bilinen en eski kanıtı yaklaşık 70 milyon yıllık fosilleşmiş dinazor kemiklerinde saptanan tümörlerdir (4). Tümör köken aldığı yerde büyüyüp geliştikçe bazı hücrelerin değişen genetik özellikleri (farklı bir klon) onların ana tümör kitlesinden ayrılarak dolaşıma geçmesini kolaylaştırmaktadır. İşte bir tümör kitlesinde ayrılarak kanda serbest olarak dolaşan bu hücreler dolaşımdaki tümör hücresi (circulating tumor cell-CTC) olarak tanımlanır (Resim 1). Bunlar tek tek ya da birbirlerine tutunmuş küçük hücre grupları şeklinde olabilmektedir. CTC'lerin önemli bir kısmı immünsistem tarafından yıkıma uğratılır. Bir kısmı da viabilitesini kaybeder ve ölür. Kalan ve bugünün kanıtlarına göre sayıca çok az oldukları bilinen tümör hücreleri ise, genetik özelliklerinin sağladığı üstünlükle selektif/nonselektif hedef organ/doku yerleşmelerine tutunur (homing) ve çoğalırlar (metastaz). Tümör hücrelerinin herhangi bir nedenle yıkılmasıyla serbest olarak dolaşıma karışan genetik materyal, hücrenin dışında bulunan ve kanda dolaşan DNA (circulating cell free tumor DNA-ccftDNA), kanda serbest dolaşan tümör DNA'sı (cftDNA) ya da dolaşımdaki tümör DNA'sı (ctDNA) olarak literatürde karşılık bulmaktadır. Bazı tümör hücreleri ise eksozom adı verilen veziküller içinde DNA moleküllerini sekrete ederler (ExoDNA). İşte tümöre ait olan ve dolaşımda serbest olarak bulunan hücre ve/veya diğer genetik materyal kullanılarak, tümöre ait moleküller özellikleri tanımlamak için, kan örneklerinden yapılan tüm işlemler, likit biyopsi olarak tanımlanmıştır (5).



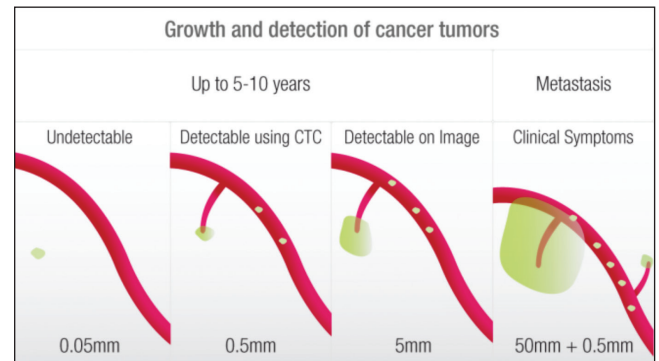
Resim 1. Metastatik akciğer kanseri hastasının LB'den elde edilen CTC'ler. Multi-color FISH uygulaması: Yeşil spektrum NapsinA/TTF1 (Akciğer orijinli CTC). Kırmızı spektrum CD45 (lenfositik seri hücreler). Mavi spektrum DNA içeren nekleus (Baloğlu, ASM-Patoloji-2016).

LİKİT BİYOPSİNİN KANSERLİ HASTALARDA POTANSİYEL KULLANIM ALANLARI

LB ilişkili tüm çalışmalar, kanser biyolojisini daha iyi anlama, kanser riski için daha etkin tarama, doğru ve kolay tanı koyma ve daha etkin tedavi için yapılan uygulamalarıdır. Günümüz görüntüleme teknolojilerinin sağladığı en etkin rezolüsyon ile saptanabilen tümör boyutundan çok daha önce, LB (CTC ve/veya ccftDNA) ile kanser kanıtlarının yakalanabilmesi olasıdır (Resim 2) (6-9). Neoplastik transformasyon sonrası kontrolsüz çoğalan tümör hücrelerinin ve bunların yıkımıyla dolaşıma giren DNA'nın, neoplastik transformasyonun erken dönemlerinde bile plazmadan izole edilerek analizi ile tümör tanısının konulması, özgün bir kanser tarama programının en güçlü ayağı olacaktır. LB'nin tanımlanan bu potansiyel gücü, aynı zamanda tümör tanı için de konvansiyonel biyopsiye göre çok daha kolay bir uygulama olarak görülecektir. Bu rasyonelle planlanarak uygulamaya konulmuş ve halen devam etmekte olan hem tarama hem de primer tanı amaçlı birçok klinik çalışma devam etmektedir. Bunların içinde diğer kanserler gibi akciğer kanserinin taramasına ve primer tanısına yönelik olanlar da vardır (10-13). LB'nin potansiyel gücünün en erken kanıt bulunduğu alan ise akciğer kanserinin sistemik tedavisinde kullanılan hedefe yönelik tedavi ilişkili moleküler analizlerdir. Bu süreçte, endikasyon dahilinde, LB artık iyi bir seçenek olarak konsensus klavuzlarda da yer almaktadır (6,14).

Kanser tedavisi sırasında yanıtın monitörizasyonu için, hem ccftDNA hem de CTC içeriği ile LB, rezidüel hastalık, tedavi yanıtı/direnci ya da iyi/tam metabolik yanıt değerlendirilmesi için önemli avantajlar sunmaktadır (15-17).

Yine kanser hastalığının sistemik tedavisinde rutin tedavi uygulamalardan sonuç alınamadığı durumlarda, diğer hedefe yönelik tedavi olasılıkları ya da mevcut ise,



Resim 2. Neoplastik gelişimin büyüme kapasitesi, görüntüleme teknolojisinin limitleri ve CTC deteksiyonu: CTC'leri, görüntüleme teknolojilerinin sunduğu deteksiyon zamanından daha önce daha kanda yakalanabilir (<http://www.rarecells.com/competitive-advantage.html>).

hastanın devam eden bir klinik çalışmaya katılabilmesi için tümör özelliklerinin (genotip) uygunluğuna yönelik araştırmalarda (genotipleme) sıklıkla kullanılan çoklu gen panelleri, tümöre ait parafin bloklardan ve LB'de yapılabilmektedir (18).

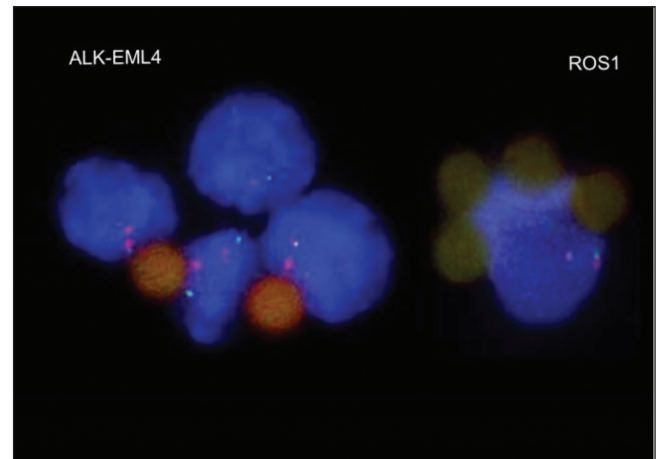
Sistemik kemoterapi gereksiniminde rasyonel ilaç seçimi kanıt düzeyi yüksek klinik çalışmalarla belirlenmektedir. Bu amaçla hastadan alınan CTC örnekleri laboratuvar ortamında kültüre edilerek çoğaltılarak bunlar üzerinde ya da CTC'lerin inoküle edildiği deney hayvanlarında (Xsenograf) çoğalan tümör hücreleri üzerinde, en iyi etkiyi oluşturacak ilaçların saptanması amacıyla devam ettirilen deneysel uygulamalar, daha etkin terapi seçiminde umut verici uygulamalardandır (15).

AKCİĞER KANSERİNDE LİKİT BİYOPSİNİN KANITA DAYALI KLİNİK UYGULAMALARI

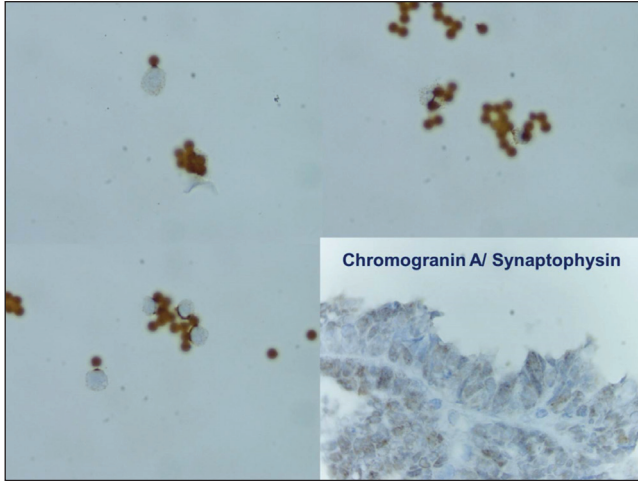
Akciğer kanserinde hedefe yönelik tedavinin başarısı ve hastalığın yönetimi için, tümöre özel moleküler profilin belirlenmesi çok önemlidir. Aynı hastada olsa bile her bir tümörün moleküler profili farklı olabilir ve yine her bir tümörün zaman içindeki moleküler devinimi değişebilir. İnter/intra-tümöral heterojenite olarak tanımlanan bu sonuç aslında tümörün klonal gelişim sürecidir ve bu dinamik moleküler değişimin bilinmesi ve takibi, tedavi başarısının takibi için esastır. Esas olarak, longitudinal klonal evölüsyonun takibi tedavi başarısında bu kadar önemli iken, aktif takip için gereken tümör örneklemeleri, yani biyopsi alınması, pratikte efektif uygulanabilirliği olan bir yaklaşım değildir. Oysa, hastanın kanı, taşıdığı tümör hücreleri (CTC) ve tümör hücresi yıkım ürünlerini (ccftDNA) nedeniyle önemli bir potansiyel biyopsi kaynağıdır. Bu özellik ve venöz kana ulaşım kolaylığı, tedavi ya da izlem altındaki hastada tümörün göstereceği biyolojik ve genetik değişikliklerin aktif takibi ve ilişkili tedavi planı güncellemeleri ile rezidüel hastalık takibinde önem kazanmaktadır (15). Metastatik akciğer kanserinde hedefe yönelik tedavi rasyoneli için eğer biyopsi alma olanağı yok ise ya da tekrarlayan biyopsiler sonuçsuz kalıyor ise, bu durumda LB'nin uygulanabileceği artık uluslararası kabul görmüş klavuz konsensusudur (14).

Bu anlamda akciğer kanseri için hedefe yönelik tedaviye moleküler analizlerin hemen tümör LB materyali ile mümkün olabilmektedir. Bunun için içlerinde uluslararası güven kurumlarının onayını taşıyan ticari kitlerin de bulunduğu çeşitli optimize sistemler kullanılmaktadır. En sık kullanılan örneklerden birisi tirozin kinaz inhibitörü (TKİ) ilişkili EGFR mutasyonlarıdır. Hedef EGFR mutasyonları içeren bir analiz hem ccftDNA hem de CTC'den elde edecek intakt genomik DNA kullanılarak yapılabilmektedir. TKİ ilişkili EGFR mutasyonlarının hemen büyük bir kısmı ccftDNA kullanılarak saptanabilir. Bunlar arasında sıklıkla

görülen ve tedavi yanıtıyla olumlu yönde ilişkili olarak tanımlanmış ekzon 18, ekzon 20 ve ekzon 21 mutasyonları ile tedavi direnci ilişkili ekzon 20, T790M ve ekzon 19, D761Y mutasyonları yer almaktadır. Ancak ekzon 19'da görülen ve tanımlı TKİ yanıtı ilişkili mutasyonların yaklaşık %45'ini oluşturduğu bilinen mutasyonlardan geniş delesyon şeklinde olanların teknik olarak ccftDNA'dan yakalanması neredeyse imkansızdır. Buradaki temel kısıt ise kullanılan yöntemin teknolojisinden, ccftDNA içinde ccftDNA miktarının çok az olmasından ve ccftDNA fragment boyutundaki kısıllıktan kaynaklanmaktadır. EGFR ilişkili bazı mutasyonlar dışında, ALK ilişkili füzyonlar, ROS1 ilişkili rearanjmanlar, cMET ilişkili amplifikasyonlar bu grupta sınıflanan ccftDNA kaynaklı kısıtlardandır. Ancak, LB'den selektif olarak toplanacak CTC'lerin intakt nükleusları, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yönteminin kısıtlarını taşımayan in situ hibridizasyon tekniklerinin uygulanabileceği tümör nükleuslarıdır ve bu hedef tümör hücrelerine uygun teknolojiler kullanarak kandan kolayca ulaşılabilir (Resim 3). Çoklu gen analizleri (multi-gene panel) gerektiren durumlarda ise ccftDNA kısıtları teknolojik olarak henüz aşılabilmiş değildir. Burada en önemli kısıt ccftDNA içinde yer alan ctDNA miktarının çok düşük miktarda olması ve bu miktarlar içinde anormal harf dizilimlerinin (mutasyon) standart ve kabul edilebilir bir doğruluk değeri ile belirlenmesindeki teknolojik yetersizliklerdir. Bununla birlikte CTC'ler selektif olarak seçilerek bu hücreler ya da bunlardan elde edilen pür tümör DNA'sı kullanılarak tümörün orijininin ve varsa tedaviye özel hedef oluşturan mutasyonların belirlenmesi mümkün olabilmektedir (Resim 4). Burada da CTC ilişkili önemli kısıt ise, tümör biyolojisinden kaynaklanan dolaşımdaki tümör hücre sayılarının bazen çok az sayıda olabilmesiyle ilişkilidir.



Resim 3. Metastatik akciğer kanserli hastanın LB'den izole edilen CTC'lerde, multi-color FISH tekniği ile ALK-EML4 füzyonu ve ROS1 translokasyonunun gösterilmesi (Balöglü, ASM-Patoloji-2017).



Resim 4. Akciğerde nöroendokrin karsinoma tanılı hastanın LB'den izole edilen CTC'lerde, sitoplazmik nöroendokrin granüllerin immüno-fenotipik identifikasyonu: Sağ alttaki küçük resimde doku tanısı için yapılan biyopside kahverenkli nöroendokrin granüller görülmektedir. Diğer resimlerde, kahrevengi boyalı EPCAM/CK molekülleriyle kaplı magnetik kürelerin yakaladığı CTC'lerde sitoplazmik ince kahverengi granüler ChromograninA/Synaptophysin immünreaktivitesi görülmektedir (Baloğlu, ASM-Patoloji-2017).

SONUÇ

LB küçük hücreli dışı metastatik akciğer kanserinin yönetiminde önemli bir konsensus kılavuz metodudur ve ülkemizde de selektif olarak uygulanmaktadır. Teknolojik gelişimlerin katkısıyla yakın bir gelecekte LB, etkin kanser tarama programlarında, primer kanser tanısında, ilaç seçiminde, tedavi yanıtın değerlendirilmesinde ve takibinde etkin olarak kullanılabilir biyobelirteçlerin klinik uygulamalara yerleşmesine önemli katkılar sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

- Collisson EA, Campbell JD, Brooks AN, et al. Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma. The Cancer Genome Atlas Research Network. *Nature* 2014; 511:543-50.
- Tzu-Huai Chang J, Yee-Ming L, Huang RS. The impact of the cancer genome atlas on lung cancer. *Transl Res* 2015;166:568-85.
- AJCC Cancer Staging Manual. 8th ed. Springer International Publishing, Switzerland, Preface pp: ix-xii. Editor in chief Amin MB (ISBN978-3-319-406117-6). 2017.
- Rothschild BM, Tanke DH, Helbling M, Martin LD. Epidemiologic study of tumors in dinosaurs. *Naturwissenschaften* 2003;90:495-500.
- The NCI Dictionary of Cancer Terms features 8,128 terms related to cancer and medicine: <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms?cdrid=779095>.
- Integrating liquid biopsy into the management of cancer *Nature Reviews/Clinical Oncology* (doi: 10.1038/nrclinonc.2017.14. 02 Mart 2017. Advance Online Publication pp 1-18: file:///C:/Users/ASM17599/Desktop/Integrating%20liquid%20biopsies%20into%20the%20management%20of%20cancer.pdf).
- Krishnamurthy N, Spencer E, Torkamani A, Nicholson L. Liquid biopsies for cancer: coming to a patient near you. *J Clin Med* 2017;6:3 (doi: 10.3390/jcm6010003).
- Köhn L, Johansson M, Grankvist K, Nilsson J. Liquid biopsies in lung cancer-time to implement research technologies in routine care? *Ann Transl Med* 2017;5:278 (doi: 10.21037/atm.2017.04.12).
- Lebofsky R, Decraene C, Bernard V, et al. Circulating tumor DNA as a non-invasive substitute to metastasis biopsy for tumor genotyping and personalized medicine in a prospective trial across all tumor types. *Mol Oncol* 2015;9:783-90.
- <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=Lung+Cancer&term=liquid+biopsy&cntry1=&state1=&recrs=>
- <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=Lung+Cancer&term=circulating+tumor+cell&cntry1=&state1=&Search=Search>.
- Ilie M, Hofman V, Long-Mira E, et al. "Sentinel" circulating tumor cells allow early diagnosis of lung cancer in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *PLoS One* 2014;9:1-7.
- Esposito A, Criscitiello C, Trapani D, Curigliano G. The emerging role of "liquid biopsies," circulating tumor cells and circulating cell free tumor DNA in lung cancer diagnosis and identification of resistance mutations. *Curr Oncol Rep* 2017;19:1 (doi: 10.1007/s11912-017-0564-y).
- NCCN guideline V 8. 2017 Non-Small cell lung cancer. Metastatic disease management. https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/nscl.pdf
- Khoo B, Greci G, Jing T, et al. Liquid biopsy and therapeutic response: Circulating tumor cell cultures for evaluation of anticancer treatment. *Sci Adv* 2016;2:1-15.
- Bardelli A, Pantel K. Liquid biopsies, what we do not know (yet). *Cancer Cell* 2017;31:172-9.
- Villafior V, Won B, Nagy R, Banks K. Biopsy free circulating tumor DNA assay identifies actionable mutations in lung cancer. *Oncotarget* 2016;7:66880-91.
- Von Bubnoff N. Liquid biopsy: approaches to dynamic genotyping in cancer. *Oncol Res Treat* 2017;40:409-16.