

Volná cirkulující DNA a její potenciál v diagnostice a léčbě maligních lymfomů

Circulating free DNA and its potential in the diagnostics and therapy of malignant lymphoma

Hricko S.¹, Navrkalová V.¹⁻³, Janíková A.¹

¹ Interní hematologická a onkologická klinika LF MU a FN Brno

² Centrum molekulární medicíny, CEITEC MU – Středoevropský technologický institut, MU Brno

³ Ústav lékařské genetiky a genomiky, LF MU Brno

Souhrn

Východiska: Maligní lymfomy představují vysoce heterogenní skupinu nádorů s rozmanitým klinickým chováním – od indolentních až po velmi agresivní formy s přežitím v rámci měsíců. Tato onemocnění jsou od počátku považována za systémová, často se vyskytující na několika místech současně. Nicméně diagnóza a přesná klasifikace obvykle probíhá z biopsie jediné patologické uzliny či infiltrátu. Klinické zkušenosti přitom ukazují, že biologické chování lymfomu nemusí být v různých jeho lokalizacích zcela shodné. Ve snaze vyřešit tento problém, ale také zlepšit diagnostiku z obtížně dostupných kompartmentů, je poslední dobou intenzivně zkoumána tzv. volná cirkulující DNA (cfDNA), jejíž součástí je také DNA uvolněná z nádorových buněk – cirkulující nádorová DNA (ctDNA). Tuto DNA lze snadno získat z tekutých biopsií, jako je krev, případně jiné tělní tekutiny. **Cíl:** Tento článek shrnuje dosavadní poznatky o cfDNA a ctDNA, zejména pak právě v kontextu maligních lymfomů, a nastiňuje potenciální směry jejího budoucího praktického využití. **Závěr:** Detekce a analýza ctDNA představuje novou modalitu, která může v budoucnu vést ke zkvalitnění všech fází léčby maligních lymfomů od diagnostiky až po sledování tzv. minimální zbytkové choroby.

Klíčová slova

cirkulující nádorová DNA – cirkulující volná DNA – maligní lymfom – tekutá biopsie – monitorace průběhu choroby – minimální reziduální nemoc

Summary

Background: Malignant lymphomas represent a highly heterogeneous group of tumors with varied clinical behavior – from indolent to very aggressive forms with survival in the order of months. From the very beginning, these diseases are considered systemic, often occurring in several anatomical locations simultaneously. However, diagnosis and exact classification are usually inferred from a biopsy of a single pathological lymph node or infiltrate, even though clinical experience shows that the biological behavior of lymphoma is not necessarily identical across anatomical locations. In an effort to address this issue as well as the problem of biopsy of not easily accessible compartments, circulating free DNA (cfDNA), which contains circulating tumor DNA (ctDNA) released from dead tumor cells, has been extensively studied in recent years. This DNA is easily accessible from liquid biopsies such as blood or other patient's bodily fluids. **Purpose:** This article summarizes current scientific knowledge on cfDNA and ctDNA, particularly in the context of malignant lymphoma, and foreshadows its potential future uses. **Conclusion:** Detection and analysis of cfDNA represents a new approach that can lead to future improvements in all phases of lymphoma treatment from diagnostics to minimal residual disease monitoring.

Key words

circulating free DNA – circulating tumor DNA – malignant lymphoma – liquid biopsy – disease monitoring – minimal residual disease

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.

The authors declare that they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE recommendation for biomedical papers.



doc. MUDr. Andrea Janíková, Ph.D.

Interní hematologická
a onkologická klinika

FN Brno

Jihlavská 20

625 00 Brno

e-mail: janikova.andrea@fnbrno.cz

Obdrženo/Submitted: 18. 7. 2022

Přijato/Accepted: 26. 2. 2023

doi: 10.48095/ccko2023273

Volná nádorová DNA v kontextu biologie lymfomů

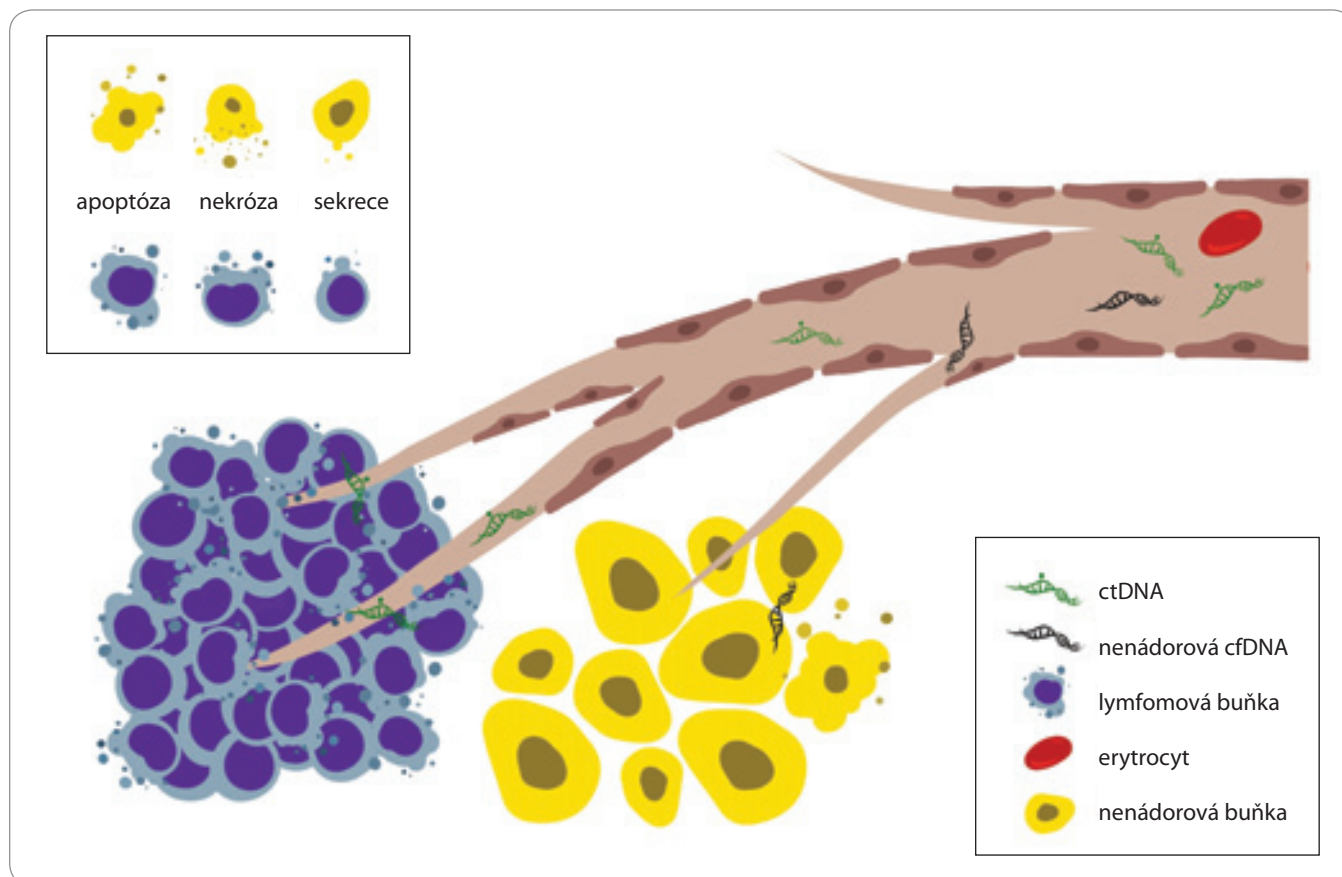
V posledních 20 letech došlo pomocí moderních laboratorních metod k výraznému pokroku v porozumění složitě molekulární a genetické podstatě maligních lymfomů [1–3]. Navíc se značně rozšířil repertoár léčebných možností, zejména u pacientů s nedostatečnou odpovědí na standardní léčbu [4,5]. S těmito změnami přichází potřeba přesnější identifikace pacientů, kteří by profitovali z časnější změny léčby nebo a priori z jiného léčebného režimu. Dosavadní diagnostika a sledování lymfomů se stále opírá o invazivní biopsii postižené tkáně, která s sebou ale přináší nezanedbatelná rizika a v případě postižení špatně přístupných oblastí (např. hluboké struktury centrální nervové soustavy (CNS) nebo těsný vztah k velkým cévám) někdy ani není realizovatelná.

Proto jsou v posledních letech intenzivně studovány možnosti využití

tzv. tekutých biopsií, tedy odběru biologického materiálu minimálně invazivní metodou z relativně snadno dostupné tělesné tekutiny: z periferní krve, příp. i z likvoru, ascitu či komorové tekutiny [6–11]. V obecné rovině jsou tekuté biopsie určeny k získání tří možných cílových analytů: cirkulujících nádorových buněk (circulating tumor cells – CTC), extracelulárních vezikul (EV) a ctDNA [12]. Zatímco u mnoha hematologických onemocnění je zde zpravidla hojná přítomnost CTC, maligní lymfomy se v tomto ohledu chovají poněkud méně konzistentně. Některé, zejména lymfom z plášťových buněk (mantle cell lymphoma – MCL), lymfom z malých lymfocytů (small lymphocytic lymphoma – SLL) nebo méně také folikulární lymfom (FL), leukemizují, a mohou tedy poskytnout dostatečný materiál pro analýzu CTC. U jiných, např. u difuzního velkobuněčného B-lymfomu (diffuse large B cell lymphoma – DLBCL), však periferní krev ani kostní dřeň ty-

picky nejsou primárním kompartmentem a lymfomové buňky zde ve většině případů buď nenacházíme vůbec, nebo jsou do těchto tkání uvolněny sekundárně, často s určitým zpožděním oproti růstu v uzlinách nebo jiné primární tkáni [13,14].

V souvislosti s maligními lymfomy se proto výzkum soustředí na jiný analyt – volnou cirkulující DNA (circulating free DNA – cfDNA). Tato fragmentovaná jaderná DNA je fyziologicky uvolňována všemi buňkami při jejich zániku. U zdravých jedinců je cfDNA v plazmě přítomna v ssDNA a dsDNA fragmentech o průměrné délce 166 párů bází (base pair – bp), v koncentraci 0–100 ng/ml (medián 5 ng/ml), přibližně 85 % z toho je hematopoetického původu [15–18]. U pacientů s nádorovým onemocněním zpravidla obsahuje i frakci DNA z nádorových buněk, tzv. cirkulující nádorovou DNA (circulating tumor DNA – ctDNA) (obr. 1). Četné studie prokázaly,



Obr. 1. Buněčné procesy uvolňující cirkulující volnou DNA a cirkulující nádorovou DNA z normálních a nádorových buněk do krevního řečiště.

cfDNA – cirkulující volná DNA, ctDNA – cirkulující nádorová DNA

že ctDNA dobře reflektuje jadernou DNA z tumoru, ze kterého pochází: nese všechny typy tumor specifických genetických aberací (bodové mutace, inzercie/delece, translokace, numerické abnormality), jako i případné sekvence onkogenních virů (EBV, HPV a jiné) a původní metylaci [15,16,19–23]. Navíc ctDNA představuje jakousi „sumu všech nádorových klonů“ z různých lokalit. To je proti běžně praktikované biopsii jediné uzliny/infiltrátu výhodou, jelikož lze geneticky profilovat nemoc napříč tělem a zachytit tak i aberace, které se nutně nevyskytují v buňkách bioptované tkáně. Tímto přístupem lze získat komplexnější a podrobnější pohled na sledovanou malignitu.

Analýza cfDNA u lymfomů je prozatím ve stadiu aplikovaného výzkumu, nicméně představuje velmi slibný přístup pro využití v klinické praxi. Zásadními limitujícími faktory, které je nutné překonat, jsou:

1. citlivost dosud dostupných analytických metod;
2. optimalizace a standardizace odběru, zpracování a analýzy vzorku s průměrnou dobou odezvy;
3. klinický význam hladin ctDNA u jednotlivých druhů malignit a v různých fázích léčby.

Současné metody analýzy cfDNA

Problematika analýzy ctDNA je vlastně problematikou detekce velmi malých koncentrací DNA. Pro představu uvádíme příklad: standardní 10 ml odběrová zkumavka lidské krve obsahuje řádově desítky mikrogramů DNA v jádrech leukocytů, ale jen nanogramová množství nestabilní cfDNA, přičemž nádorová frakce se potom pohybuje v širokém rozmezí 0,01–90 % z celkového množství cfDNA v závislosti na klinicko-patologických vlastnostech nádoru [24–28]. Cesta k úspěšné analýze tekuté biopsie (nejčastěji krve) začíná už způsobem odběru – ten vyžaduje speciální zkumavku se stabilizačním médiem, které zabrání odebraným buněčným elementům rozpadnout se a kontaminovat plazmu buněčnou DNA [29,30]. Dnes jsou takovéto zkumavky běžně dostupné a vzorek je v nich spolehlivě stabilní po dobu 4 dnů i při pokojové teplotě. Jelikož odběr

séra stimuluje uvolnění cfDNA z krevních buněk, čímž se dále ředí zastoupení ctDNA, měla by být preferovaným materiálem pro analýzu krevní plazma [31].

Samotná analýza ctDNA je skutečnou technickou výzvou. Fragments ctDNA jsou oproti nenádorové cfDNA mírně kratší, svými fyzikálně-chemickými vlastnostmi se však neliší dostatečně na to, aby od sebe mohly být konzistentně odděleny, a proto se většinou analyzuje celková cfDNA [32,33]. Základním požadavkem na metodu vhodnou pro analýzu nádorových variant v cfDNA je její dostatečná citlivost pro varianty s nízkou alelickou frekvencí (variant allele frequency – VAF). Tyto nároky v současnosti splňují dvě skupiny metod – metody založené na polymerázové řetězové reakci (polymerase chain reaction – PCR) a technologie sekvenování nové generace (next-generation sequencing – NGS). Metody na bázi PCR disponují vynikající citlivostí a pomocí moderních modifikací s bioinformatickými vylepšeními, zejména pomocí digitální PCR (dPCR), lze detekovat mutovanou alelu už při frekvenci 0,005 % [34–36]. Zásadní nevýhodou PCR metod je schopnost detekce pouze konkrétní alely, což brání plošnému použití tohoto přístupu u lymfomů, které jsou charakteristické přítomností značného množství rekurentních variant. Výjimku tvoří zejména MYD88 L265P substituce přítomná u 90 % případů Waldenströmovy makroglobulinemie, 70 % primárních lymfomů CNS nebo u nově definovaného MCD molekulárního podtypu DLBCL [3,37–39]. Navíc množství ctDNA po léčbě klesá na velmi nízké hladiny, takže ani vysoká technická citlivost PCR nezaručuje dokonalý záchyt zbytkové nemoci, přestože je lymfom pořád přítomen.

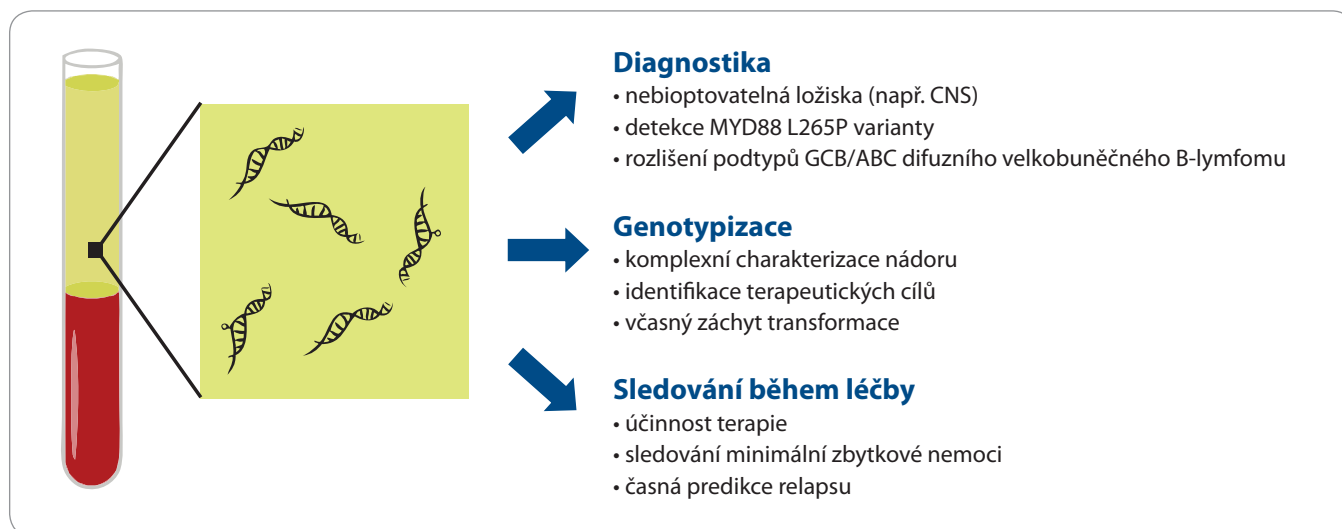
Mnohem širšího využití dosáhly metody založené na kvantitativním sekvenování. Prvními pokusy takto monitorovat přítomnost lymfomu bylo vysokokapacitní sekvenování imunoglobulinových genů, které sledovalo výskyt klonálních přestaveb v plazmě [40]. Tento přístup je slibný, nicméně je opět mířen proti jedinému genovému lokusu, tedy trpí stejnými biologickými limitacemi jako PCR. Proto je preferován komplexnější NGS přístup, který cílí na více

genů současně, teoreticky i na celý nádorový genom. Analýza více cílových oblastí umožňuje záchyt širšího spektra patologických změn, nicméně za cenu záchytu i nesouvisejících somatických mutací. Limit detekce se obecně pohybuje kolem VAF 0,01 %, což je zejména po ukončení léčby, kdy je nálož nádorových buněk velmi malá, stále nedostatečná citlivost. Ve vývoji jsou však ultracitlivé sekvenční metody s citlivostí až 0,0005 % [41,42].

Obecnou nevýhodou NGS přístupů je vysoká pracnost a ekonomická nákladnost, která stoupá úměrně k hloubce sekvenování a rozsahu analyzovaných genomických oblastí. Vhodným kompromisem jsou tzv. capture-based NGS panely cílené vůči vybranému setu genů nebo oblastí, ve kterých se vyskytují rekurentní aberace [41]. Dnes jsou tyto panely dostupné v desítkách komerčních modifikací optimalizovaných pro analýzu cfDNA, žádná z těchto platform ale zatím není schválena ke klinickému použití [43]. Komplikujícím faktorem při tzv. tumor naivní analýze ctDNA, kdy ještě není znám genetický profil, je přítomnost nenádorových mutací a klonální hematopoézy, které často doprovází tato onemocnění u starších pacientů. Částečným řešením je párová analýza cfDNA a buněčné nenádorové DNA pacienta, kterou se odliší germinální mutace. Pořád ale není uspokojivě vyřešena právě otázka odfiltrování nenádorových somatických mutací [44,45].

Potenciál využití cfDNA u maligních lymfomů v klinické praxi

Výsledky z analýzy cfDNA poskytují v zásadě dva typy informací. První je kvantitativní výstup, který indikuje, jaké absolutní množství volné DNA je přítomno v analyzované tekutině. To poukazuje na velikost nádorové masy, která do této tekutiny DNA uvolňuje. Druhý typ informace je kvalitativní, ten ukazuje, jaké genetické aberace jsou v této DNA přítomny. Obě tyto informace by mohly představovat cenný doplněk ke standardním klinickým vyšetřením u maligních lymfomů. Přibývá kvalitních prací ukazujících, že ctDNA je na rozdíl od cirkulujících nádorových buněk zachyti-



Obr. 2. Přehled možností využití analýzy cirkulující volné DNA pro diagnostiku, charakterizaci a monitorování lymfomů.
ABC – activated B-cell, GCB – germinal center B-cell

telná prakticky u všech pacientů, a to vč. nemoci v časných stádiích, a že spektrum molekulárních aberací v cfDNA z periferní krve dobře koreluje s genotypem identifikovaným v nádorové tkáni [46]. Nejvíce výzkumu v této oblasti bylo provedeno u DLBCL jakožto nejčastěji se vyskytujícího lymfomu u dospělé populace v západním světě [47]. Pilotní studie byly uveřejněny prakticky už u všech typů lymfoproliferací od FL přes Hodgkinův lymfom (HL), primární mediastinální velkobuněčný B-lymfom až po T-lymfomy [48–51]. Jednotlivé diagnózy jsou podrobněji komentovány v dalším textu a možnosti využití analýzy cfDNA u lymfomů jsou shrnuty na obr. 2.

Význam v diagnostice a prognóze maligních lymfomů

Prognóza pacientů s high-grade B-lymfomy je určena biologií tumoru, globální velikostí nádorové masy, celkovou kondicí pacienta a přidruženými chorobami. Lze teoreticky předpokládat, že pokročilejší a agresivnější nemoc bude mít větší objem nádoru a obrát buněk, a bude tudíž do systémového oběhu uvolňovat větší množství ctDNA. Vyšší koncentrace ctDNA tedy predikuje závažnější průběh onemocnění ve smyslu velké nádorové masy, agresivity apod. Tento předpoklad potvrdilo několik studií, ve kterých byla prokázána korelace vstupní kvantity ctDNA v krvi stanovené pomocí NGS s dalšími prognostickými parametry zjiš-

ťovanými v rámci iniciačního stadiu – hladinou laktát dehydrogenázy, klinickým stadiem dle klasifikace Ann Arbor či International Prognostic Index (IPI) skóre, event. celkovým metabolickým objemem tumoru dle PET [52]. V jiných studiích byly vysoké vstupní koncentrace ctDNA asociovány s horším přežitím bez progresu i celkovým přežitím, nadto kratší přežití bez progresu predikovaly lépe než stratifikace podle buněčného subtypu ABC/GCB, IPI skóre nebo objemu tumoru dle PET [53,54].

Další možností využití analýzy ctDNA u lymfomů je schopnost rozpoznat genetické změny relevantní k prognóze či léčebné strategii. Scherer et al. srovnávali genetické aberace zjištěné v 76 diagnostických biopsiích uzlin i extranodálních tumorů u pacientů s DLBCL s těmi, které byly identifikovány v plazmatické ctDNA. Byla nalezena shoda až 91 % mezi detekovanými aberacemi. Analýza ctDNA navíc umožnila detailní vyšetření genotypu s určením GCB/ABC subtypu pomocí DLBCL-specifického NGS panelu, kde byla shoda zhruba 80 % s imunohistochemickou typizací primárního vzorku algoritmem dle Hansové [46].

Analýza cfDNA má potenciál v identifikaci reprezentativního mutačního profilu celé nemoci napříč různými anatomickými lokalitami. Např. i u indolentní nemoci, jakou je FL, byla pozorována velmi nápadná diskrepance mezi mutačními profily identifikovanými z ctDNA

v plazmě a z tkáňové biopsie [46]. Analýza ctDNA je tak schopna identifikovat různé, někdy i agresivnější klony a detekovat časně transformaci, která je považována za prognosticky velmi nepříznivý parametr choroby. Je doložen případ, kdy v krvi pacienta s FL byly zachyceny mutace, které naopak nebyly identifikovány v biopované tříselné uzlině, nicméně byly přítomny v transformovaném ložisku v retroperitoneu, které se klinicky manifestovalo až o 9 měsíců později [50].

U HL byly zaznamenány podobné úspěchy při využití tekuté biopsie a analýzy ctDNA. Přestože jsou nádorové Hodgkinovy/Reed-Sternbergovy buňky v tumoru vzácně zastoupené a tumorová masa je v naprosté většině tvořena buňkami zánětlivé reakce, je možné detekovat ctDNA o srovnatelné koncentraci u stejné nádorové masy klasického HL (classical HL – cHL) jako u DLBCL. I když příčina není zcela jasná, možným vysvětlením je mnohem vyšší obrát těchto nádorových buněk. Dle publikovaných údajů lze pomocí ctDNA zachytit tumor specifické mutace u cHL se spolehlivostí přes 90 %, a to již ve velmi časných stádiích onemocnění. Analýzou ctDNA byly rovněž zjištěny klinicky relevantní aberace, mimo jiné např. amplifikace 9p24.1 predikující odpověď na PD-1 inhibitory [49,55,56].

Výzkum ctDNA u T-lymfomů je prozatím okrajové téma, přesto i zde proběhla

pilotní studie s použitím malého NGS panelu, na němž bylo u pacientů s angioimunoblastickým T-lymfomem zachyceno 87 % mutací nesených tumorem také v ctDNA [51].

Obzvláště důležité je potenciální využití ctDNA v situacích, kde je technicky obtížné nebo nemožné získat dostatečné množství bioptického materiálu přímo z tumoru. Typicky jde o primární či sekundární lymfomy CNS, především hlubokých struktur mozku, příp. míchy, nebo lymfomy oka s postižením sítnice, kde je biopsie často spojena s rizikem oslepnutí. cfDNA se v likvoru fyziologicky nachází ve velice nízkých koncentracích, její nárůst prakticky bez výjimky signalizuje patologický původ. Bobillo et al. v explorativní studii prokázali ve volné DNA z likvoru téměř 80% zastoupení MYD88 L265P mutace u pacientů s lymfomem CNS [7]. Dle dalších studií se u mozkových nádorů jeví analýza ctDNA z likvoru mnohem spolehlivější než z plazmy [57,58]. Kvůli poruše hematoencefalické bariéry a díky novým vysoce citlivým metodám na bázi NGS lze v jistých případech prokázat tumor specifické mutace u primárních CNS lymfomů i v krvi pacientů [59]. Malá pilotní studie prokázala, že u pacientů s primárním vitreoretinálním lymfomem není likvor spolehlivým bioptickým materiálem ani v případě využití analýzy ctDNA, a tumor specifické mutace byly naopak vysoce zastoupeny v ctDNA z komorové vody. Odběr komorové vody je navíc mnohem méně invazivní alternativou vitrektomie či biopsie retiny [60].

Sledování odpovědi na léčbu, monitorování minimální zbytkové nemoci a predikce relapsu

Sledování minimální zbytkové nemoci (minimal residual disease – MRD) u lymfomů jako parametru kvality léčebné odpovědi a prediktoru klinického relapsu je tématem několika posledních dekád. Avšak doposud nebyla u většiny lymfomů validována vhodná metodika, jako je tomu např. u monitorování transkriptu BCR-ABL pomocí kvantitativní PCR u chronické myeloidní leukemie [61]. Důvody doposud omezeného využití jsou jednak technické – nedosta-

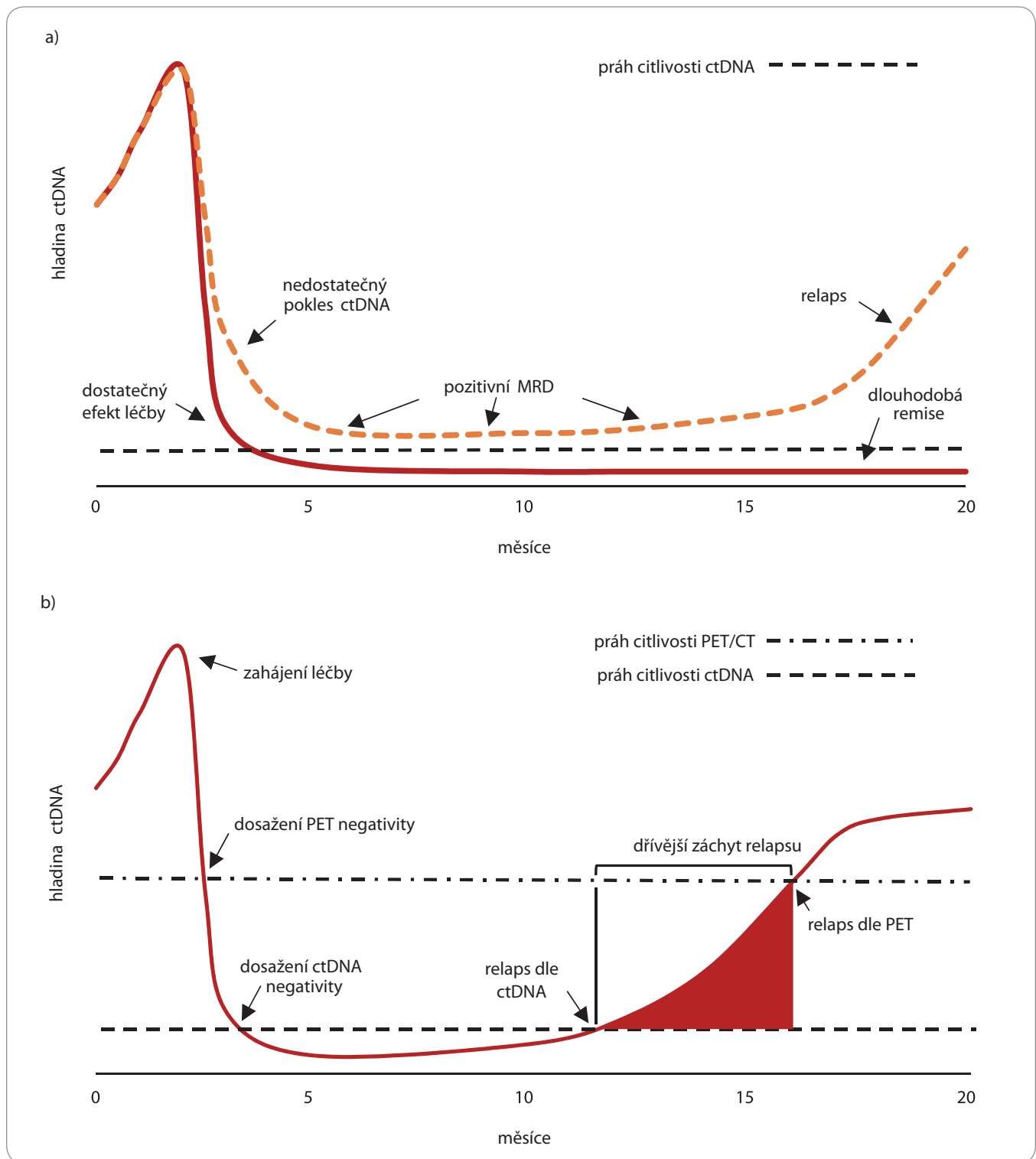
tečná citlivost dostupných metod, jednak biologické – lymfomy uvolňují do krve často řádově méně biologického materiálu než jiné hematologické malignity. Sledování MRD, potažmo klonogenního vývoje lymfomu přímo v původně postižené uzlině nebo tkáni, se pro svou technickou náročnost a nejasný přínos neprovádí. Iniciálně postižená uzlina bývá jednak v některých případech totálně extirpována (není tudíž co opakovaně bioptovat), nebo dojde k její regresi na obvyklou velikost (5–10 mm), kdy je získání biologického materiálu obtížně proveditelné i punkční biopsií pod kontrolou zobrazovacími metodami [62]. Monitorování cfDNA má potenciál tuto situaci alespoň v některých ohledech zlepšit.

Změny hladiny ctDNA, sledované pomocí určitého nádorového markeru (somatická aberace detekovaná např. pomocí cíleného NGS), velmi dynamicky reflektují měnící se počet nádorových buněk, a dávají tedy klinikovi aktuální informace o stavu nemoci po celou dobu léčby. Míra poklesu ctDNA po zahájení léčby predikuje kvalitu navození remise. Kurtz et al. identifikovali pokles koncentrace ctDNA po jednom cyklu chemoterapie o dva řády a po dvou cyklech o 2,5 řádu jako meze pro prognostickou stratifikaci pacientů s DLBCL. Rozdíly v 2letém přežití bez progresu mezi takto odlišenými skupinami byly 83 vs. 50 %, resp. 82 vs. 46 % [52]. Lze říci, že pacienti, u kterých hladiny nepoklesly pod uvedené meze, měli častěji primárně rezistentní onemocnění.

Nedokonalé individuální posouzení účinnosti léčby je obecně problémem především u pacientů s agresivním lymfomem. Momentálně není k dispozici adekvátně citlivé vyšetření, na základě něž bychom byli schopni časně zjistit nedostatečnou odpověď na léčbu. Současnou metodou, kterou lze využít, je interim PET (iPET). To je nyní standardním postupem u Hodgkinova lymfomu, ale u jiných typů lymfomů, např. DLBCL, nedokáže identifikovat část pacientů, kteří potřebují intenzivnější léčbu, a proto u těchto diagnóz není rutinně doporučováno [63,64]. Monitorace MRD pomocí ctDNA po několika cyklech chemoterapie se ukazuje být vhodným predikto-

rem léčebné odpovědi (graf 1a). Navíc její dostupnost a flexibilita doby odběru je podstatně lepší nežli u PET. Macaulay et al. u pacientů s DLBCL pozorovali po třech cyklech chemoterapie v režimu R-CHOP (rituximab, cyklofosfamid, doxorubicin, vinkristin, prednison) jen 50% konkordanci mezi iPET negativitou a ctDNA negativitou, přičemž iPET-negativní, ale zároveň ctDNA-positivní pacienti měli zásadně horší 2leté přežití než ctDNA-negativní kohorta (44 vs. 89 %) [65]. V několika nezávislých studiích byl prokázán význam pravidelné monitorace MRD pomocí ctDNA v predikci relapsu. U pacientů s DLBCL v kompletní remisi byl tímto způsobem relaps zachycen v průměru o 3–6 měsíců dřív, než byl detekovatelný zobrazovacími metodami (graf 1b) [40,46,66]. Lakhotia et al. detekovali ctDNA u pacientů s MCL v remisi v 62 % případů, průměrný nárůst vůči klinickému relapsu byl 7,2 měsíce [67]. Princip je znázorněn na grafu 1b. Merryman et al. analyzovali ctDNA ze vzorků aferezovaných hematopoetických kmenových buněk u pacientů s refrakterním DLBCL před autologní transplantací kostní dřeně (autologous stem cell transplant – ASCT). Přítomnost ctDNA detekovali jen ve 36 % vzorků pacientů, kteří později po transplantaci progredovali, nicméně specifická pro progresi nebo smrt do 5 let byla 95 %. I přes nízký záchyt se tak ctDNA ukázala být zatím nejpřesnějším nezávislým prediktorem relapsu po ASCT [68].

Sledování MRD je možné i v jiných kompartmentech než jen v periferní krvi. Bobillo et al. ve své explorativní studii prokázali, že u lymfomů CNS je ctDNA v likvoru během léčby citlivým ukazatelem relabující choroby, zejména pak pokud je už známý molekulární marker, jako např. zmiňovaná MYD88 L265P mutace, který lze sledovat. ctDNA tím předčí standardní metody sledování CTC, jako je průtoková cytometrie [7]. V likvoru byla tímto způsobem také velice časně zachycena sekundární infiltrace CNS u pacienta s primárně testikulárním DLBCL [69]. Poněkud okrajovým, snad ale v budoucnu hodnotným využitím analýzy volné DNA je monitorování dynamiky onemocnění během léčby CAR-T lymfocyty, a to nejen pomocí



Graf 1. Sledování dynamiky ctDNA pro efektivní posouzení nedostatečné léčebné odpovědi (a) a pro časnou detekci relapsu (b). ctDNA – cirkulující nádorová DNA, MRD – minimální zbytková nemoc

ctDNA lymfomu, ale i pomocí cfDNA samotných CAR-T buněk. Tento přístup má potenciál doplnit současně používanou průtokovou cytometrii [70,71].

I přes velmi dobré globální výsledky bohužel analýza ctDNA v současnosti nespĺňuje klinické požadavky na zcela spolehlivé monitorování MRD a predikci

relapsu – i když je citlivější než doposud dostupné metody, navzdory nedetekovatelné ctDNA na konci léčby pořád časně relabuje až 20 % pacientů s agre-

sivním lymfomem [52,66]. Na tomto poli jsou slibné vysoce senzitivní NGS technologie, které jsou schopny významně posunout senzitivitu i specifitu těchto analýz. V analýz 2021 byla publikována technologie PhasED-seq, která odhalila reziduální ctDNA ve 25 % vzorků, které byly předtím na základě jiného NGS panelu prohlášeny za negativní. Pacienti, od kterých vzorky s reziduální ctDNA pocházely, měli horší přežití bez progresu i celkové přežití [42]. Je samozřejmě nutné pamatovat na to, že citlivost analytické metody pro detekci ctDNA není jediným faktorem podmiňujícím úspěšnou predikci relapsu a že důležitou roli zde může hrát rovněž biologická a klinická heterogenita mezi pacienty – třeba může existovat podskupina pacientů, u kterých je produkce ctDNA lymfomem zanedbatelně malá i přes agresivní biologii a klinický průběh.

Závěr

Volná nádorová DNA představuje perspektivní, snadno dostupný biologický materiál, jehož analýza má potenciál zlepšit všechny fáze léčby pacientů postižených maligním lymfomem. V cestě k její úspěšné implementaci do klinické praxe stojí ještě několik zásadních problémů. V první řadě je to nedostatečná senzitivita i specifita metod, zejména v případech velmi nízkých hladin ctDNA nebo přítomnosti interferující klonální hematopoézy. Dále chybí standardizované analytické postupy a validované metody v kontextu jednotlivých lymfoproliferativních onemocnění. Nicméně současný intenzivní výzkum nabízí slibné výsledky na poli neinvazivní diagnostiky lymfomů, zlepšení predikce průběhu onemocnění i identifikace pacientů s časnou progresí, kteří by byli kandidáty na změnu léčebné strategie. Sledování pacientů s agresivními lymfomy pomocí analýzy molekulárních markerů v ctDNA s sebou přináší velký potenciál do budoucnosti a věříme, že časem najde uplatnění i v klinické praxi.

Poděkování

Práce byla podpořena projekty MZČR RVO 65269705 a AZV NU22-08-00227 a projektem Národního ústavu pro výzkum rakoviny (program EXCELES LX22NPO5102 – financováno Evropskou unií, Next Generation EU).

Podíl autorů na přípravě rukopisu

Samuel Hricko – příprava rukopisu, grafů a další obrazové dokumentace;
Andrea Janíková, Veronika Navrkalová – korekce a revize rukopisu.
Všichni autoři souhlasí s finální verzí rukopisu.

Literatura

- Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 2000; 403(6769): 503–511. doi: 10.1038/35000501.
- Hans CP, Weisenburger DD, Greiner TC et al. Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood* 2004; 103(1): 275–282. doi: 10.1182/blood-2003-05-1545.
- Wright GW, Huang DW, Phelan JD et al. A probabilistic classification tool for genetic subtypes of diffuse large B cell lymphoma with therapeutic implications. *Cancer Cell* 2020; 37(4): 551–568.e14. doi: 10.1016/j.ccell.2020.03.015.
- Sorigue M, Sancho J-M. Recent landmark studies in follicular lymphoma. *Blood Rev* 2019; 35: 68–80. doi: 10.1016/j.blre.2019.03.006.
- Cheson BD, Nowakowski G, Salles G. Diffuse large B-cell lymphoma: new targets and novel therapies. *Blood Cancer J* 2021; 11(4): 68. doi: 10.1038/s41408-021-00456-w.
- McEwen AE, Leary SES, Lockwood CM. Beyond the blood: CSF-derived cfDNA for diagnosis and characterization of CNS tumors. *Front Cell Dev Biol* 2020; 8: 45. doi: 10.3389/fcell.2020.00045.
- Bobillo S, Crespo M, Escudero L et al. Cell free circulating tumor DNA in cerebrospinal fluid detects and monitors central nervous system involvement of B-cell lymphomas. *Haematologica* 2021; 106(2): 513–521. doi: 10.3324/haematol.2019.241208.
- Hummelink K, Muller M, Linders TC et al. Cell-free DNA in the supernatant of pleural effusion can be used to detect driver and resistance mutations, and can guide tyrosine kinase inhibitor treatment decisions. *ERJ Open Res* 2019; 5(1): 00016–2019. doi: 10.1183/23120541.00016-2019.
- Werner B, Yuwono N, Duggan J et al. Cell-free DNA is abundant in ascites and represents a liquid biopsy of ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2021; 162(3): 720–727. doi: 10.1016/j.ygyno.2021.06.028.
- Berry JL, Xu L, Murphree AL et al. Potential of aqueous humor as a surrogate tumor biopsy for retinoblastoma. *JAMA Ophthalmol* 2017; 135(11): 1221–1230. doi: 10.1001/jamaophthalmol.2017.4097.
- Berry JL, Xu L, Kooi I et al. Genomic cfDNA analysis of aqueous humor in retinoblastoma predicts eye salvage: the surrogate tumor biopsy for retinoblastoma. *Mol Cancer Res* 2018; 16(11): 1701–1712. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-18-0369.
- Lone SN, Nisar S, Masoodi T et al. Liquid biopsy: a step closer to transform diagnosis, prognosis and future of cancer treatments. *Mol Cancer* 2022; 21(1): 79. doi: 10.1186/s12943-022-01543-7.
- Delarue R, Haioun C, Ribrag V et al. CHOP and DHAP plus rituximab followed by autologous stem cell transplantation in mantle cell lymphoma: a phase 2 study from the Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte. *Blood* 2013; 121(1): 48–53. doi: 10.1182/blood-2011-09-370320.
- Wan Mohd Zohdi WA, Ismail AZ, Yusof N et al. Rare but potentially fatal presentations of diffuse large B-cell lymphoma: leukemic phase or hemophagocytic syndrome in bone marrow. *Clin Pathol* 2022; 15: 2632010X211070774. doi: 10.1177/2632010X211070774.
- Moss J, Magenheimer J, Neiman D et al. Comprehensive human cell-type methylation atlas reveals origins of circulating cell-free DNA in health and disease. *Nat Commun* 2018; 9(1): 5068. doi: 10.1038/s41467-018-07466-6.

- Liu X, Ren J, Luo N et al. Comprehensive DNA methylation analysis of tissue of origin of plasma cell-free DNA by methylated CpG tandem amplification and sequencing (MCTA-Seq). *Clin Epigenetics* 2019; 11(1): 93. doi: 10.1186/s13148-019-0689-y.
- Snyder MW, Kircher M, Hill AJ et al. Cell-free DNA comprises an in vivo nucleosome footprint that informs its tissues-of-origin. *Cell* 2016; 164(1–2): 57–68. doi: 10.1016/j.cell.2015.11.050.
- 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.
- 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.
- McBride DJ, Orpana AK, Sotiriou C et al. Use of cancer-specific genomic rearrangements to quantify disease burden in plasma from patients with solid tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 2010; 49(11): 1062–1069. doi: 10.1002/gcc.20815.
- Lo YMD, Chan LYS, Lo K-W et al. Quantitative analysis of cell-free Epstein-Barr virus DNA in plasma of patients with nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Res* 1999; 59(6): 1188–1191.
- Chan KCA, Hung ECW, Woo JKS et al. Early detection of nasopharyngeal carcinoma by plasma Epstein-Barr virus DNA analysis in a surveillance program. *Cancer* 2013; 119(10): 1838–1844. doi: 10.1002/cncr.28001.
- Xian RR, Kinyera T, Otim I et al. Plasma EBV DNA: a promising diagnostic marker for endemic Burkitt lymphoma. *Front Oncol* 2021; 11: 804083. doi: 10.3389/fonc.2021.804083.
- Lee K, Tripathi A. Parallel DNA extraction from whole blood for rapid sample generation in genetic epidemiological studies. *Front Genet* 2020; 11: 374. doi: 10.3389/fgenet.2020.00374.
- Gedvilaitė V, Schweigert D, Cicėnas S. Cell-free DNA in non-small cell lung cancer. *Acta Medica Litu* 2017; 24(2): 138–144. doi: 10.6001/actamedica.v24i2.3495.
- Langman RB, Mortimer SA, Zill OA et al. Analytical and clinical validation of a digital sequencing panel for quantitative, highly accurate evaluation of cell-free circulating tumor DNA. *PLoS One* 2015; 10(10): e0140712. doi: 10.1371/journal.pone.0140712.
- Schwarzenbach H, Stoehlmacher J, Pantel K et al. Detection and monitoring of cell-free DNA in blood of patients with colorectal cancer. *Ann NY Acad Sci* 2008; 1137: 190–196. doi: 10.1196/annals.1448.025.
- Scherer F, Kurtz DM, Diehn M et al. High-throughput sequencing for noninvasive disease detection in hematologic malignancies. *Blood* 2017; 130(4): 440–452. doi: 10.1182/blood-2017-03-735639.
- Kang Q, Henry NL, Paoletti C et al. Comparative analysis of circulating tumor DNA stability in K3EDTA, Streck, and CellSave blood collection tubes. *Clin Biochem* 2016; 49(18): 1354–1360. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2016.03.012.
- Alidousty C, Brandes D, Heydt C et al. Comparison of blood collection tubes from three different manufacturers for the collection of cell-free DNA for liquid biopsy mutation testing. *J Mol Diagn* 2017; 19(5): 801–804. doi: 10.1016/j.jmoldx.2017.06.004.
- Lee J-S, Kim M, Seong M-W et al. Plasma vs. serum in circulating tumor DNA measurement: characterization by DNA fragment sizing and digital droplet polymerase chain reaction. *Clin Chem Lab Med* 2020; 58(4): 527–532. doi: 10.1515/cclm-2019-0896.
- Chen Q, Zhang Z-H, Wang S et al. Circulating cell-free DNA or circulating tumor DNA in the management of ovarian and endometrial cancer. *Oncol Targets Ther* 2019; 12: 11517–11530. doi: 10.2147/OTT.S227156.
- Lauer EM, Mutter J, Scherer F. Circulating tumor DNA in B-cell lymphoma: technical advances, clinical applica-

- tions, and perspectives for translational research. *Leukemia* 2022; 36(9): 2151–2164. doi: 10.1038/s41375-022-01618-w.
34. Zhu G, Ye X, Dong Z et al. Highly sensitive droplet digital PCR method for detection of EGFR-activating mutations in plasma cell-free DNA from patients with advanced non-small cell lung cancer. *J Mol Diagn* 2015; 17(3): 265–272. doi: 10.1016/j.jmoldx.2015.01.004.
35. Watanabe M, Kawaguchi T, Isa S et al. Ultra-sensitive detection of the pretreatment EGFR T790M mutation in non-small cell lung cancer patients with an EGFR-activating mutation using droplet digital PCR. *Clin Cancer Res* 2015; 21(15): 3552–3560. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-14-2151.
36. Sanmamed MF, Fernández-Landázuri S, Rodríguez C et al. Quantitative cell-free circulating BRAFV600E mutation analysis by use of droplet digital PCR in the follow-up of patients with melanoma being treated with BRAF inhibitors. *Clin Chem* 2015; 61(1): 297–304. doi: 10.1373/clinchem.2014.230235.
37. Hattori K, Sakata-Yanagimoto M, Suehara Y et al. Clinical significance of disease-specific MYD88 mutations in circulating DNA in primary central nervous system lymphoma. *Cancer Sci* 2018; 109(1): 225–230. doi: 10.1111/cas.13450.
38. Drandi D, Genuardi E, Dogliotti I et al. Highly sensitive MYD88L265P mutation detection by droplet digital polymerase chain reaction in Waldenström macroglobulinemia. *Haematologica* 2018; 103(6): 1029–1037. doi: 10.3324/haematol.2017.186528.
39. Schmitz R, Wright GW, Huang DW et al. Genetics and pathogenesis of diffuse large B-cell lymphoma. *N Engl J Med* 2018; 378(15): 1396–1407. doi: 10.1056/NEJMoa1801445.
40. Kurtz DM, Green MR, Bratman SV et al. Noninvasive monitoring of diffuse large B-cell lymphoma by immunoglobulin high-throughput sequencing. *Blood* 2015; 125(24): 3679–3687. doi: 10.1182/blood-2015-03-635169.
41. Newman AM, Bratman SV, To J et al. An ultrasensitive method for quantitating circulating tumor DNA with broad patient coverage. *Nat Med* 2014; 20(5): 548–554. doi: 10.1038/nm.3519.
42. Kurtz DM, Soo J, Co Ting Keh L et al. Enhanced detection of minimal residual disease by targeted sequencing of phased variants in circulating tumor DNA. *Nat Biotechnol* 2021; 39(12): 1537–1547. doi: 10.1038/s41587-021-00981-w.
43. Lam SN, Zhou YC, Chan YM et al. Comparison of target enrichment platforms for circulating tumor DNA detection. *Sci Rep* 2020; 10(1): 4124. doi: 10.1038/s41598-020-60375-x.
44. Wu H-T, Kalashnikova E, Mehta S et al. Characterization of clonal hematopoiesis of indeterminate potential mutations from germline whole exome sequencing data. *J Clin Oncol* 2020; 38 (15 Suppl): 1525. doi: 10.1200/JCO.2020.38.15_suppl.1525.
45. Razavi P, Li BT, Brown DN et al. High-intensity sequencing reveals the sources of plasma circulating cell-free DNA variants. *Nat Med* 2019; 25(12): 1928–1937. doi: 10.1038/s41591-019-0652-7.
46. Scherer F, Kurtz DM, Newman AM et al. Distinct biological subtypes and patterns of genome evolution in lymphoma revealed by circulating tumor DNA. *Sci Transl Med* 2016; 8(364): 364ra155. doi: 10.1126/scitranslmed.aai8545.
47. Thandra KC, Barsouk A, Saginala K et al. Epidemiology of non-Hodgkin's lymphoma. *Med Sci* 2021; 9(1): 5. doi: 10.3390/medsci9010005.
48. Roschewski M, Rossi D, Kurtz DM et al. Circulating tumor DNA in lymphoma: principles and future directions. *Blood Cancer Discov* 2022; 3(1): 5–15. doi: 10.1158/2643-3230.BCD-21-0029.
49. 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): e55–65. doi: 10.1016/S2352-3026(14)00039-8.
50. Sarkozy C, Huet S, Carlton VEH et al. The prognostic value of clonal heterogeneity and quantitative assessment of plasma circulating clonal IG-VDJ sequences at diagnosis in patients with follicular lymphoma. *Oncotarget* 2017; 8(5): 8765–8774. doi: 10.18632/oncotarget.14448.
51. Sakata-Yanagimoto M, Nakamoto-Matsubara R, Komori D et al. Detection of the circulating tumor DNAs in angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Ann Hematol* 2017; 96(9): 1471–1475. doi: 10.1007/s00277-017-3038-2.
52. Kurtz DM, Scherer F, Jin MC et al. Circulating tumor DNA measurements as early outcome predictors in diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol* 2018; 36(28): 2845–2853. doi: 10.1200/JCO.2018.78.5246.
53. Tabari E, Lovejoy AF, Lin H et al. Molecular characteristics and disease Burden metrics determined by next-generation sequencing on circulating tumor DNA correlate with progression free survival in previously untreated diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 2019; 134 (Suppl 1): 490. doi: 10.1182/blood-2019-123633.
54. Alig S, Macaulay CW, Kurtz DM et al. Short diagnosis-to-treatment interval is associated with higher circulating tumor DNA levels in diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol* 2021; 39(23): 2605–2616. doi: 10.1200/JCO.20.02573.
55. Oki Y, Neelapu SS, Fanale M et al. Detection of classical Hodgkin lymphoma specific sequence in peripheral blood using a next-generation sequencing approach. *Br J Haematol* 2015; 169(5): 689–693. doi: 10.1111/bjh.13349.
56. Camus V, Viennot M, Lequesne J et al. Targeted genotyping of circulating tumor DNA for classical Hodgkin lymphoma monitoring: a prospective study. *Haematologica* 2021; 106(1): 154–162. doi: 10.3324/haematol.2019.237719.
57. De Mattos-Arruda L, Mayor R, Ng CKY et al. Cerebrospinal fluid-derived circulating tumour DNA better represents the genomic alterations of brain tumours than plasma. *Nat Commun* 2015; 6: 8839. doi: 10.1038/ncomms9839.
58. Scherer F. Profiling of circulating tumor DNA for noninvasive disease detection, risk stratification, and MRD monitoring in patients with CNS lymphoma. *ASH* 2021.
59. Yoon SE, Kim YJ, Shim JH et al. Plasma circulating tumor DNA in patients with primary central nervous system lymphoma. *Cancer Res Treat* 2022; 54(2): 597–612. doi: 10.4143/crt.2021.752.
60. Wang X, Su W, Gao Y et al. A pilot study of the use of dynamic cfDNA from aqueous humor and vitreous fluid for the diagnosis and treatment monitoring of vitreoretinal lymphomas. *Haematologica* 2022; 107(9): 2154–2162. doi: 10.3324/haematol.2021.279908.
61. Jovanovski A, Petiti J, Giugliano E et al. Standardization of BCR-ABL1 p210 monitoring: from nested to digital PCR. *Cancers* 2020; 12(11): 3287. doi: 10.3390/cancers12113287.
62. Janikova A, Mayer J, Kren L et al. The persistence of t(14;18)-bearing cells in lymph nodes of patients with follicular lymphoma in complete remission: the evidence for „a lymphoma stem cell“. *Leuk Lymphoma* 2009; 50(7): 1102–1109. doi: 10.1080/10428190902927005.
63. Radford J, Illidge T, Counsell N et al. Results of a trial of PET-directed therapy for early-stage Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med* 2015; 372(17): 1598–1607. doi: 10.1056/NEJMoa1408648.
64. El-Galaly TC, Jakobsen LH, Hutchings M et al. Routine imaging for diffuse large B-cell lymphoma in first complete remission does not improve post-treatment survival: a Danish-Swedish population-based study. *J Clin Oncol* 2015; 33(34): 3993–3998. doi: 10.1200/JCO.2015.62.0229.
65. Macaulay C, Alig S, Kurtz DM et al. Interim circulating tumor DNA as a prognostic biomarker in the setting of interim PET-based adaptive therapy for DLBCL. *Blood* 2019; 134 (Suppl 1): 1600. doi: 10.1182/blood-2019-131278.
66. Roschewski M, Dunleavy K, Pittaluga S et al. Circulating tumour DNA and CT monitoring in patients with untreated diffuse large B-cell lymphoma: a correlative biomarker study. *Lancet Oncol* 2015; 16(5): 541–549. doi: 10.1016/S1470-2045(15)70106-3.
67. Lakhota R, Melani C, Dunleavy K et al. Circulating tumor DNA predicts therapeutic outcome in mantle cell lymphoma. *Blood* 2022; 6(8): 2667–2680. doi: 10.1182/bloodadvances.2021006397.
68. Merryman RW, Redd RA, Taranto E et al. Prognostic value of circulating tumor DNA (ctDNA) in autologous stem cell graft and post-transplant plasma samples among patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 2020; 136 (Suppl 1): 22–23. doi: 10.1182/blood-2020-140965.
69. Zorofchian S, Lu G, Zhu J-J et al. Detection of the MYD88 p.L265P mutation in the CSF of a patient with secondary central nervous system lymphoma. *Front Oncol* 2018; 8: 382. doi: 10.3389/fonc.2018.00382.
70. Goodman AM, Holden KA, Jeong A-R et al. Assessing CAR T-cell therapy response using genome-wide sequencing of cell-free DNA in patients with B-cell lymphomas. *Transplant Cell Ther* 2022; 28(1): 30.e1–30.e7. doi: 10.1016/j.jtct.2021.10.007.
71. Mika T, Thomson J, Nilius-Eliliwi V et al. Quantification of cell-free DNA for the analysis of CD19-CAR-T cells during lymphoma treatment. *Mol Ther Methods Clin Dev* 2021; 23: 539–550. doi: 10.1016/j.jomtm.2021.10.009.