

Význam cirkulujúcej nádorovej DNA u karcinómu kolorekta

Importance of circulating tumor DNA in colorectal cancer

Tolmáči B.¹, Řehulková A.^{2,3}, Žuffa P.¹, Klein J.^{1,4,5}

¹ Chirurgické oddělení, Krajská nemocnice T. Bati, Zlín, Česká republika

² I. chirurgická klinika LF UP a FN Olomouc, Česká republika

³ Ústav molekulární a translační medicíny, LF UP a FN Olomouc, Česká republika

⁴ Onkologická klinika LF UP a FN Olomouc, Česká republika

⁵ Fakulta zdravotníctva, Trenčianska univerzita Alexandra Dubčeka v Trenčíne, Slovenská republika

Súhrn

Východiská: V managemente pacientov s kolorektálnym karcinómom (colorectal cancer – CRC) stále existuje priestor pre zlepšenie stratifikácie rizika a tým presnejšie „ušitie“ liečby na mieru. Veľmi sľubným sa v tomto ohľade javia biomarkery získavané prostredníctvom takzvanej tekutej biopsie, čo je neinvazívna metóda odberu telesných tekutín pacienta, najčastejšie periférnej krvi. Analyzujú sa rozličné biomarkery súvisiace s nádorom, ktoré môžu mať ako prognostickú, tak aj prediktívnu hodnotu. Jedným z najviac prebádaných nádorových biomarkerov je práve nádorová cirkulujúca DNA, ktorej spektrum využitia bolo spočiatku len u pokročilých a metastatických karcinómov a spočívalo v molekulárnom profilovaní alebo zisťovaní získanej rezistencie k liečbe. V súčasnosti sa využitie cirkulujúcej nádorovej DNA (ctDNA) posunulo už k skorým štádiám karcinómov, kde okrem iného slúži k identifikácii minimálnej reziduálnej choroby alebo k skoršej diagnostike CRC. Doterajšie štúdie ukazujú veľmi sľubný potenciál týchto biomarkerov, ale k využitiu v klinickej praxi bude potrebné získať viac informácií a počkať na výsledky prebiehajúcich výskumov. **Cieľ:** V tomto prehľadovom článku sa budeme venovať ctDNA, jej aspektom, možnostiam diagnostiky a súčasnému využitiu v rámci CRC.

Kľúčové slová

kolorektálny karcinóm – minimálna reziduálna choroba – cirkulujúca nádorová DNA – prognóza – dispenzarizácia

Summary

Background: Space still exists in the management of patients with colorectal cancer (CRC) for improving risk stratification and thus the precision of treatment tailoring. Quite promising in this regard are biomarkers acquired via liquid biopsy, which is a non-invasive method of body fluid draw, most commonly peripheral blood. A variety of biomarkers associated with the tumor are analyzed, which can have either prognostic or predictive value. Circulating tumor DNA (ctDNA) is one of the most explored tumor biomarkers. Initially, its utility spectrum was only in advanced or metastatic cancers and consisted of molecular profiling and detecting acquired resistance to treatment. Nowadays, the use of circulating tumor DNA has shifted to earlier cancer stages, where it can identify minimal residual disease or diagnose colorectal cancer early. Existing studies show promising potential of these biomarkers, but more information needs to be gathered and information from ongoing studies needs to be obtained in order to use them in everyday practice. **Aim:** In this review article, we will discuss ctDNA, its aspects, diagnostic possibilities and current use in CRC.

Key words

colorectal cancer – minimal residual disease – circulating tumor DNA – prognosis – surveillance

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 zaslané do biomedicínských časopisů.

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



MUDr. Benjamín Tolmáči
Chirurgické oddělení
Krajská nemocnice T. Bati
Havlíčkovo nábřeží 600
762 75 Zlín
e-mail: benjamin.tolmaci@bnzlin.cz

Submitted/Obdržané: 12. 11. 2024

Accepted/Prijaté: 13. 1. 2025

doi: 10.48095/ccko202532

Úvod

Kolorektálny karcinóm (colorectal cancer – CRC) patrí celosvetovo na popredné priečky v rámci incidencie aj mortality. Toto platí aj napriek tomu, že v rozvinutých krajinách dochádza k poklesu oboch parametrov. Vo svete sa radí na tretiu priečku najčastejšie diagnostikovaných nádorov a na druhé miesto v rámci úmrtnosti spojeného s rakovinou [1]. Česká republika tento svetový trend kopíruje, v roku 2021 bola incidencia 65,7 prípadov na 100 000 osôb, čím CRC predstavuje tretí najčastejšie diagnostikovaný novotvar a mortalita 30,2 úmrtí na 100 000 osôb radí CRC na druhé miesto v rámci úmrtnosti [2]. Prognóza CRC je úzko spojená so štádiom ochorenia. V rokoch 2017–2021 bolo 43 % novo diagnostikovaných CRC v Českej republike zachytených v klinických štádiách I a II (tj. v skorom štádiu) [2]. V Európe je 5-ročné prežitie pre štádium I 89,1 %, pre štádium II 81,2 %, pre štádium III 69,4 % a pre štádium IV 15,4 % [3]. Celkové 5-ročné prežitie predstavuje 65 % [4].

Skorá diagnóza je kľúčová pre úspešnú liečbu CRC, preto sa v Českej republike v roku 2009 zaviedol program na skríning CRC. Vykonáva sa u pacientov od 50. roku života prostredníctvom každoročného testu na okultné krvácanie alebo skrínin-govej kolonoskopie, ktorú pri negatívnom náleze možno opakovať až za desať rokov. Medzi ďalšie skrínin-gové programy v Českej republike patrí program na skríning rakoviny prsníka, ktorý bol zavedený ako prvý a funguje už od roku 2002. Ženy nad 45 rokov sú v dvojročnom intervale pozývané na skrínin-govú mamografiu. Ďalším programom je skríning rakoviny krčku maternice vykonávaný gynekologickými pracoviskami a nové skrínin-gové programy zamerané na rakovinu pľúc a rakovinu prostaty. Skríning rakoviny pľúc je projekt ktorý funguje od roku 2022. Cieľovú skupinu tvoria fajčiari nad 55 rokov, ktorí fajčili viac ako 20 balíčok-rokov (počas 20 rokov fajčili jeden balíček, tj. 20 cigariet, za deň). Skríning sa robí pomocou nízкодávkovkej počítačovej tomografie hrudníka (low dose CT). Od 1. 1. 2024 je spustený skríning karcinómu prostaty, pri ktorom sa mužom vo veku 50–69 rokov meria prostatický špecifický antigén (PSA).

Miera rekurencie CRC ostáva vysoká aj napriek zavedeniu skrínin-gového programu a zlepšeniu liečebných modalít vrátane neoadjuvantnej liečby. Celkovo dochádza k lokálnej recidíve alebo vzniku vzdialených metastáz u 20 % pacientov a to aj pri adekvátnej chirurgickej a onkologickej liečbe [5]. Riziko rekurencie sa rovnako ako 5-ročné prežívanie vzťahuje priamo k štádiu ochorenia, pričom sa jedná o priamu úmeru, tj. pre štádium I je riziko 7,4 %, v štádiu II 16 %, v štádiu IIIa + b 33,5 % a v štádiu IIIc 54,5 % [6].

V súčasnosti určujú indikáciu k adjuvantnej liečbe klinicko-patologické charakteristiky. Aj napriek adekvátne poskytnutej liečbe však ostáva riziko rekurencie vysoké, čo znamená, že kritériá určujúce následnú onkologickú liečbu sú nepresné [7]. To ukazuje, že sú potrebné nové markery k personalizácii liečby a k tomu, aby nedochádzalo k podliečeniu alebo naopak nadliečeniu pacientov. Kľúčom k riešeniu môže byť monitorácia tzv. minimálnej reziduálnej choroby (minimal residual disease – MRD). Tento termín označuje prítomnosť nádorových buniek (circulating tumor cells – CTC) alebo komponentov v telesných tekutinách po radikálnej chirurgickej resekcii, ktoré nie sú zistiteľné súčasnými konvenčnými metódami. Okrem samotných CTC alebo ich zhlukov patria medzi ukazovatele odhaľujúce MRD cirkulujúca nádorová DNA (ctDNA), exozómy a nádorom edukované doštičky [8]. Zber týchto biomarkerov sa uskutočňuje prostredníctvom tekutej biopsie (liquid biopsy), takže neinvazívnymi metódami odberu telesných tekutín, najčastejšie periférnej krvi.

Azda najviac informácií a dát je nazi-bieraných o ctDNA, ktorá je veľmi senzitivným ukazovateľom MRD [9]. V tomto prehľadovom článku sa budeme venovať práve ctDNA, jej aspektom, možnostiam diagnostiky a súčasnému využitiu v rámci CRC. Podobnej problematike sa venovali Ilnát et al. v nedávnej publikácii, v ktorej rozoberali CTC u pacientov s CRC, možnostiam detekcie a takisto ich klinickému významu [10].

Charakteristika ctDNA

V krvnom obehú sa nachádza voľná cirkulujúca DNA (cfDNA), ktorá je vylučovaná normálnymi aj nádorovými bun-

kami hlavne pri apoptóze a nekróze buniek [11]. Viacero stavov nesúvisiacich s nádorovým ochorením zvyšuje koncentráciu cfDNA v obehú, medzi tieto patria napríklad úrazy, ischemia alebo infekcia [12]. U onkologických pacientov predstavuje ctDNA väčšinou menej ako 1 % z celkovej cfDNA [13]. Jedná sa o jednovláknové alebo dvojitovláknové fragmenty DNA neustále vylučované nádorovými bunkami, ktorých polčas v cirkulácii je krátky kvôli rýchlej degradácii nukleázami a následnému vylúčeniu z cirkulácie obličkami alebo pečeňou [14]. Okrem periférnej krvi sa dá ctDNA zachytiť v moči, slinách, spúte, stolici, pleurálnej tekutine a mozgomiešnom moku [15]. Rýchly obrat ctDNA (polčas rozpadu v periférnej krvi je 16 min až 2,5 hod) umožňuje získanie mutačného statusu a nádorovej záťaže v reálnom čase [16,17].

Voľné fragmenty DNA boli po prvýkrát zaznamenané už v roku 1948 Mandelom a Metaisom [18]. Po dlhú dobu sa tomuto objavu neprisudzoval väčší význam a až v roku 1977 Leon et al. zistili, že hladiny cfDNA u onkologických pacientov sú vyššie ako u zdravej populácie [19]. Následne v roku 1989 potvrdil Stroun, že časť cfDNA pochádza z nádorových buniek [20]. Postupné napredovanie výskumu ctDNA vyústilo v roku 2014 prvým schválením ctDNA na detekciu EGFR mutácií u karcinómov Európskou agentúrou pre liečivé prípravky (EMA). Toto označuje prvé použitie ctDNA v klinickej praxi.

Možnosti detekcie ctDNA

Úspešnosť zachytenia ctDNA je priamo závislá na nádorovej záťaži. Pri generalizovanom CRC je miera detekcie ctDNA skoro 100 %, pri lokalizovanom ochorení klesá približne na 73 % [21]. Do úvahy treba brať aj pokles úspešnosti detekcie po resekcčných výkonoch, kde napr. pri štádiu II CRC klesá detekovateľnosť na 10–15 % [22]. Zároveň dochádza k poklesu frakcie ctDNA z celkovej cfDNA, často až na menej ako 0,1 % [22]. Z týchto dôvodov je potrebné využívať metódy s vysokou mierou senzitivity. Na zvýšenie senzitivity analýz ctDNA sa takisto využíva selekcia fragmentov medzi 90 až 150 bázových párov, keďže ná-

dorové DNA fragmenty sú kratšie ako u zdravých buniek [23]. Na vyšetrenie sa používajú vzorky plazmy pretože sérum obsahuje vysoké množstvo DNA kvôli lýze leukocytov ku ktorej dochádza počas zrážania, táto DNA narúša výsledky vyšetrenia [24].

Súčasnú metódu využívajú k vyšetreniu ctDNA sa dajú obecné rozdeliť na dve hlavné kategórie a to založené na polymerázovej reťazovej reakcii (polymerase chain reaction – PCR) a založené na sekvenovaní novej generácie (next generation sequencing – NGS). Základným predstaviteľom PCR metód je droplet digitálna PCR, ktorá využíva generátor kvapiek na rozdelenie jednotlivých fragmentov DNA do kvapiek pomocou emulzie oleja a vody, to znamená, že jedna kvapka obsahuje jeden fragment DNA. Cieľové sekvencie každej molekuly sú individuálne analyzované a tým sa detegujú úseky DNA, ktoré sú mutované alebo divokého typu (wild type). Výhodou tejto metódy je, že dokáže zachytiť viaceré mutácie z rovnakého vzorku s vysokou senzitivitou, zároveň je rýchla a lacná, limitáciou je však možnosť vyšetriť iba 5–10 cieľových sekvencií [25]. Ďalším predstaviteľom je tzv. BEAMing metóda, ktorá je založená na PCR analýze jednotlivých molekúl DNA prichytených na magnetické mikročastice v olejovej emulzii s vodou [26]. Táto metóda je však príliš komplexná a ťažko využiteľná v každodennej praxi, a kvôli tomu sa nestala tak populárnou ako droplet digitálna PCR. Vo všeobecnosti sú PCR metódy vhodné na vyšetrenie malého množstva mutácií, ktoré musia byť vopred známe, čím zaniká možnosť na zisťovanie novovzniknutých mutácií [27].

Metódy založené na NGS majú výhodu oproti PCR metódam v tom, že dokážu identifikovať mutácie v rozsiahlych častiach genómu a dokážu pátrať nielen po známych, ale aj neznámych mutáciách [28]. Nevýhodou je, že sú omnoho drahšie a časovo náročnejšie. NGS môžu byť využité v cieľných paneloch na detekciu konkrétnych mutácií s vysokou senzitivitou a špecificitou [29]. Medzi najpopulárnejšie platformy v rámci NGS metód patria platformy s cieľným sekvenovaním, tzv. targeted sequencing platforms. K nim patrí hlboké sekvenovanie

pomocou značených amplicónov (tagged-amplicon deep sequencing – Tam-Seq) [30], systém bezpečného sekvenovania (safe-sequencing system – Safe-SeqS) [31] a personalizované profilovanie hlbokým sekvenovaním (cancer personalized profiling by deep sequencing – CAPP-Seq) [32].

Metódy používané na detekciu ctDNA sa ďalej dajú rozdeliť do dvoch širokých kategórií a to na tumor informované a tumor neinformované platformy. Obe majú svoje výhody, nevýhody a unikátne úlohy.

Tumor informované postupy zahŕňajú sekvenovanie vzorku tumoru od pacienta, čím sa umožní detekcia unikátnych aberácií tumoru a vytvorí sa špecifický podpis tumoru (tzv. tumor-specific signature) [33]. Iniciálne profilovanie sa robí prostredníctvom sekvenovania celého exómu (whole exome sequencing) alebo sekvenovania celého genómu (whole genome sequencing). Tieto stratégie sú založené na metódach NGS. Po tom, ako boli identifikované alterácie genómu sa vytvoria personalizované panely, ktoré môžu byť založené ako na PCR, tak na NGS k seriálovému monitorovaniu ctDNA [9]. Senzitivita u tumor informovaných postupov je vyššia vďaka sústredeniu sa na identifikované alterácie a ich hlbšie pokrytie [33]. Vyššia je aj špecificita, a to redukciou vplyvu sekvenčných chýb alebo prirodzene sa vyskytujúcich klonálnych populácií, akými je klonálna hematopoéza neurčitého potenciálu (tzv. clonal hematopoiesis of indeterminate potential – CHIP) [34]. Medzi limitácie týchto metód patrí dlhší čas získania definitívnych výsledkov v dôsledku sekvenovania genómu/exómu a konštrukcii tumor špecifických sond, čo trvá asi 4 týždne. Testovanie plazmy vytvorenými sondami je rýchlejšie, trvá asi 1–2 týždne, avšak toto oneskorenie môže spôsobiť posunutie podania adjuvantnej liečby s priamym dopadom na prežívanie [35]. Ďalšou limitáciou môže byť neodhalenie všetkých mutácií pri sekvenovaní kvôli vnútrotumorovej heterogenite [36]. Sekvenovanie takisto nezachytí novovznikajúce mutácie v dôsledku terapie [37]. Nesmie sa zabudnúť, že je nutné získať dostatočné množstvo tkaniva k sekvenovaniu a tvorbe sond.

Tumor neinformované platformy využívajú priamo vyšetrenie plazmy bez nutnosti sekvenovania primárneho tumoru. Sú to metódy založené na cieľných NGS paneloch, ktoré využívajú už známe a bežne sa vyskytujúce mutácie u CRC. Výhodami sú rýchlejšie získanie výsledkov, nižšia cena a vyhnutie sa potrebe získať bioptické vzorky tkaniva [33].

Longitudinálna (tj. získaná opakovanými vyšetreniami počas určitého časového obdobia) senzitivita a špecificita tumor informovaných metód na detekciu rekurencie je 88 % a 98 % [38]. Tumor neinformované metódy majú referovanú longitudinálnu senzitivitu a špecificitu k detekcii rekurencie 69 % a 91 % [39]. V oboch prípadoch sú tieto hodnoty omnoho vyššie ako pri monitorovaní hladín karcinoembryonálneho antigénu (CEA), ktorého senzitivita a špecificita je 69 % a 64 % [9].

Skorá diagnostika CRC

Štandardným skriningovým a diagnostickým vyšetrením u CRC je kolonoskopia. Predstavuje efektívny a presný nástroj k diagnostike, avšak jedná sa o invazívne a pre pacienta nepríjemné vyšetrenie. Ďalšou možnosťou je použitie testov na okultné krvácanie, ktoré sú síce neinvasívne, ale sú zatažené vysokou mierou falošne pozitívnych výsledkov a limitovanou senzitivitou k detekcii prekancerózných štádií (pokročilých adenómov) [40]. Atraktívnou alternatívou sú vyšetrenia založené na odbere periférnej krvi, čiže neinvasívne a málo rizikové testy, medzi ktoré sa zaraďuje aj vyšetrenie ctDNA. Wang et al. vo svojej metaanalýze potvrdili, že ctDNA je schopné diagnostikovať aj skoré formy CRC a to rôznymi metódami, konštatujú však, že diagnostika prostredníctvom týchto metód má neuspokojivú senzitivitu, ale akceptovateľnú špecificitu [41]. Táto metaanalýza zahŕňa štúdie, ktoré ako biomarker nevyužívajú mutované alebo metylované gény. Avšak práve aberantná metylácia DNA je sľubným biomarkerom pre skorú diagnostiku CRC, keďže jej výskyt bol pozorovaný aj pri premalígnych štádiách [42]. Americká Food and Drug Administration (FDA) povolila využívanie dvoch dia-

gnostických biomarkerov založených na metylovannej DNA.

Prvým schváleným a najpreskúmanejším je *SEPT9*, génový promótor, ktorý patrí do rodiny septínov a riadi bunkový cyklus. Detekcia metylovannej *SEPT9* ctDNA je monogenetické vyšetrenie z plazmy, schválené bolo pod názvom Epi proColon [43]. V apríli 2016 bola schválená druhá generácia *SEPT9* vyšetrenia s názvom Epi proColon 2, ktorá má udávanú senzitivitu 75 % a špecificitu 96 %, čím je považovaná za spoľahlivú metódu [44]. Senzitivita testu na okultné krvácanie je pre porovnanie 58 % [44].

V roku 2014 bol FDA schválený Cologuard test [45]. Jedná sa o vyšetrenie stolice, založené na kombinácii detekcie mutácie *KRAS*, prítomnosti fekálneho hemoglobínu a metylácie génov *NDRG4* a *BMP3*. Imperiale et al. v roku 2014 vyšetřili 9 989 účastníkov štúdie pomocou Cologuard testu a zistil senzitivitu 92 % pri CRC a 42 % pri prekancerózných léziách, špecificita bola 90 % [45].

Inou metódou je CancerSEEK test, ktorý využíva identifikáciu mutácií v 16 nádorových génoch prostredníctvom voľnej cirkulujúcej DNA s meraním cirkulujúcich proteínov. CRC patrí medzi osem nádorových ochorení detekovateľných touto metódou [46]. Cohen et al. referujú detekciu ctDNA u 43 % CRC v štádiu I a 70 % detekciu pri štádiách II–III [46].

Mnohé štúdie ukazujú, že testy zamerané na meranie ctDNA v plazme majú vysokú senzitivitu a špecificitu, čo nasvedčuje, že by mohli byť využiteľné na diagnostiku a skrining CRC. Je však nutné stanoviť klinickú účinnosť prostredníctvom štúdií s väčšími kohortami pacientov, ktoré budú reflektovať skriningovú populáciu.

Prognóza a detekcia MRD

Viacero štúdií potvrdilo, že ctDNA dokáže určovať prognózu pacientov, väčšinou sa však analyzujú pacienti s metastatickým CRC. Basnet vo svojej meta-analýze sumarizoval výsledky 9 štúdií, ktoré zahrnovali štádiá CRC I–IV a zhodnotil, že ctDNA má značnú prognostickú hodnotu vo vzťahu k prežitiu

bez relapsu (relapse free survival – RFS) a celkovému prežitiu (overall survival – OS) [47]. Po kuratívnej resekcii CRC môžeme pri pooperačnom záchyte ctDNA hovoriť o detekcii MRD. Toto znamená prítomnosť jednotlivých CTC alebo ich zhlukov, ktoré nie sme schopní objaviť klinicky alebo konvenčnými metódami, akými sú radiologické metódy alebo metódy nukleárnej medicíny. MRD predstavuje predpoklad pre rekurenciu ochorenia, či už lokoregionálnu alebo vzdialenú [48].

Výsledky metaanalýzy Basnet potvrdzuje Tie v analýze troch kohortových štúdií zahrnujúcich 485 pacientov (230 v štádiu II, 96 v štádiu III a 159 s lokálne pokročilým karcinómom rekta) [49]. Medzi 4. až 10. pooperačným týždňom odoberali plazmu, percento pacientov s prítomnou ctDNA korelovalo so štádiom ochorenia, pri štádiu II bola detekcia 8,7 %, pri štádiu III 21 %. ctDNA bola detegovaná u 59 (12 %) pacientov, ich 5-ročné prežitie bez recidívy bolo 38,6 % a celkové prežitie 64,6 %, pričom pacienti bez detekcie ctDNA mali 5-ročné prežitie bez recidívy výrazne lepšie, až 85,5 % a celkové prežitie 89,4 %. Zaujímavé je takisto pozorovanie, že ctDNA lepšie predpovedá vzdialené recidívy oproti lokoregionálnym [49]. V ďalšej, tentokrát však prospektívnej štúdií, referujú Reinert et al. o kohorte 125 pacientov s CRC v štádiách I–III so sedemnásobne vyšším rizikom relapsu u pacientov, keď bola ctDNA zistená v 30. pooperačnom dni oproti pacientom bez prítomnosti ctDNA [9].

Okrem detekcie ctDNA v skorom pooperačnom období je ďalším dôležitým prognostickým ukazovateľom detekcia ctDNA po skončení adjuvantnej liečby. Viaceré štúdie ukazujú, že ctDNA pozitivita po skončení adjuvantnej chemoterapie je spojená s vyšším rizikom relapsu [9,50]. Konkrétne Tarazona et al. pozorovali rekurenciu v 85,7 % prípadov u pacientov s preukázateľnou ctDNA po skončení adjuvantnej chemoterapie (šesť zo siedmich pacientov). Pritom traja pacienti nemali nález ctDNA v pooperačných odberoch, avšak po skončení chemoterapie vykazovali ctDNA pozitivitu a všetci traja v čase zrecidivovali [51].

Detekcia ctDNA po liečbe, či už chirurgickej alebo systémovej, by mohla pomôcť selektovať pacientov vhodných k adjuvantnej liečbe alebo jej prolongácii, a to aj napriek tomu, že by pacient podľa klasických klinicko-patologických kritérií nebol kandidátom k jej podaniu. Naopak, pacienti pôvodne indikovaní k adjuvantnej liečbe by pri ctDNA negativite mohli byť ponechaní ku sledovaniu a adjuvantná liečba by bola pozdržaná.

Dispenzarizácia

Cieľom dispenzarizácie, v tomto prípade sledovania po kuratívnej liečbe, je skoré odhalenie rekurencie a tým možnosť poskytnúť ďalšiu liečbu s kuratívnym zámerom. Recidíva po kuratívnej liečbe CRC vznikne u 5–30 % pacientov, v závislosti od štádia pri diagnóze [35]. Súčasné dispenzárne protokoly využívajú periodické meranie sérového CEA, CT a kolonoskopiu. Záchyt rekurencie je však neskorý a kuratívna liečba je možná iba pri 10–20 % pacientov [52]. ctDNA v kontexte skorého záchytu rekurencie predstavuje perspektívnu metódu, keďže viaceré štúdie preukázali skorší záchyt ako pri štandardných dispenzárnych metódach [9,22,50,51]. Zmienené štúdie preukázali, že v prípade detekcie ctDNA počas sledovania dôjde k relapsu takmer u všetkých pacientov. Dôležitejšie však je, že detekcia ctDNA predchádza radiologický relaps o časový medián v rozsahu 3–11,5 mesiaca. Pacienti s nálezom ctDNA by teda mohli byť kandidátmi k častejším radiologickým vyšetreniam, čo by mohlo viesť k skoršiemu záchytu relapsu a teda k potencionálnemu zvýšeniu liečby s kuratívnym zámerom.

Prebieha viacero prospektívnych štúdií, ktoré sa venujú postaveniu ctDNA v adjuvantnej liečbe a pooperačnom sledovaní pacientov s CRC. Jednou z nich je štúdia TRACC, ktorej observačná časť B sleduje sériové pre- a pooperačné hodnoty ctDNA, pričom už preukázala lepšie RFS v 12 a 24 mesiacoch po operácii u ctDNA negatívnych pacientov [53]. Na časť B nadväzuje TRACC časť C, ktorá má za cieľ zistiť, či je adjuvantná liečba riadená nálezom ctDNA ekvivalentná k štandardnej adjuvantnej liečbe u pacientov v štádiách II a III CRC. Problematiku aplikácie adjuvantnej liečby podľa

hladiny ctDNA skúmala už štúdiá DYNAMIC II. Ukázala, že nedôjde k zhoršeniu RFS pri deeskalácii alebo úplnom vynechaní adjuvantnej liečby u nízkorizikových pacientov v štádiu II CRC, ktorí sú v pooperačnom období ctDNA negatívni (odber vzoriek 4 týždne po operácii) [54]. Rozsiahlou prospektívnou štúdiou je CIRCULATE-Japan, ktorá sa venuje eskalačným alebo deeskalačným stratégiám u pacientov s CRC na základe výsledku merania ctDNA [55]. Má tri ramená, GALAXY, VEGA a ALTAIR, pričom GALAXY rameno sa venuje pooperačným odberom ctDNA v pravidelných časových intervaloch [56]. Ide o observačné rameno zamerané na pacientov v štádiách II–IV CRC s resekabilným ochorením a sú už známe prvé výsledky. V kohorte 1 039 pacientov s mediánom sledovania 16,74 mesiaca sa ukázalo, že pri detekcii ctDNA mala adjuvantná chemoterapia benefit a pri jej vymiznutí (tzv. ctDNA clearance) v priebehu adjuvantnej liečby sa zlepšili výsledky liečby. U pacientov s resekovaným ochorením v štádiách II a III takisto veľmi dobre korelovalo riziko relapsu ochorenia s ctDNA pozitivitou (4 týždne po operácii). Napokon ešte bolo pozorované, že ctDNA negatívni pacienti nemali benefit z adjuvantnej liečby [56].

Záver

Koncept tekutej biopsie, ktorý zahŕňa analýzu ctDNA alebo iných nádorových markerov ako CTC alebo mitochondriálna RNA, je veľmi lákavý. Umožňuje rýchle, neinvazívne vyšetrenie, ktoré dokáže v reálnom čase poskytnúť širokú škálu informácií od diagnostiky po liečbu. O ctDNA sa hromadí množstvo štúdií, ktoré preukazujú, že jej využitie v klinickej praxi by mohlo byť nápomocné, hlavne v otázke zlepšenia adjuvantnej liečby a jej správnej indikácie u liečby „šitej na mieru“. Avšak na to, aby vyšetrenie ctDNA mohlo byť zahrnuté do každodennej praxe, je dôležité nielen zvyšovať senzitivitu a špecificitu metód analýzy ctDNA, ale takisto počkať na výsledky rozsiahlych prospektívnych štúdií s veľkými súbormi pacientov, ktoré ukážu, či sa sľubné predbežné výsledky na menších kohortách ozaj potvrdia.

Literatúra

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 2018; 68(6): 394–424. doi: 10.3322/caac.21492.
2. ÚZIS. Novotvary 2019–2021 ČR. [online]. Dostupné z: chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://www.uzis.cz/res/ff/008447/novotvary2019-2021.pdf.
3. Cardoso R, Guo F, Heisser T et al. Overall and stage-specific survival of patients with screen-detected colorectal cancer in European countries: a population-based study in 9 countries. *Lancet Reg Health Eur* 2022; 21: 100458. doi: 10.1016/j.lanepe.2022.100458.
4. Sung H, Ferlay J, Siegel RL et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 2021; 71(3): 209–249. doi: 10.3322/caac.21660.
5. Siegel RL, Miller KD, Goding Sauer A et al. Colorectal cancer statistics, 2020. *CA Cancer J Clin* 2020; 70(3): 145–164. doi: 10.3322/caac.21601.
6. Storli PE, Dille-Amdam RG, Skjærseth GH et al. Cumulative incidence of first recurrence after curative treatment of stage I–III colorectal cancer. Competing risk analyses of temporal and anatomic patterns. *Acta Oncol* 2023; 62(12): 1822–1830. doi: 10.1080/0284186X.2023.2269644.
7. Böckelman C, Engelmann BE, Kaprio T et al. Risk of recurrence in patients with colon cancer stage II and III: a systematic review and meta-analysis of recent literature. *Acta Oncol* 2015; 54(1): 5–16. doi: 10.3109/0284186X.2014.975839.
8. Zhou H, Zhu L, Song J et al. Liquid biopsy at the frontier of detection, prognosis and progression monitoring in colorectal cancer. *Mol Cancer* 2022; 21(1): 86. doi: 10.1186/s12943-022-01556-2.
9. Reinter T, Vesterman Henriksen T, Christensen E et al. Analysis of plasma cell-free DNA by ultra-deep sequencing in patients with stages I to III colorectal cancer. *JAMA Oncol* 2019; 5(8): 1124–1131. doi: 10.1001/jamaoncol.2019.0528.
10. Ihnát P, Srovnal J, Hrubovčák J et al. Detection and clinical significance of circulating tumour cells in patients with colorectal carcinoma. *Rozhl Chir* 2023; 102(10): 376–380. doi: 10.33699/PIS.2023.102.10.376-380.
11. Sorbini M, Carradori T, Togliatto GM et al. Technical advances in circulating cell-free DNA detection and analysis for personalized medicine in patients' care. *Biomolecules* 2024; 14(4): 498. doi: 10.3390/biom14040498.
12. Schwarzenbach H, Boon DSB, Pantel K. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nat Rev Cancer* 2011; 11(6): 426–437. doi: 10.1038/nrc3066.
13. Phallen J, Sausen M, Adliff V et al. Direct detection of early-stage cancers using circulating tumor DNA. *Sci Transl Med* 2017; 9(403): eaan2415. doi: 10.1126/scitranslmed.aan2415.
14. Emlen W, Mannik M. Kinetics and mechanisms for removal of circulating single-stranded DNA in mice. *J Exp Med* 1978; 147(3): 684–699. doi: 10.1084/jem.147.3.684.
15. Peng M, Chen C, Hulbert A et al. Non-blood circulating tumor DNA detection in cancer. *Oncotarget* 2017; 8(40): 69162–69173. doi: 10.18632/oncotarget.19942.
16. Wan JCM, Massie C, Garcia-Corbacho J et al. Liquid biopsies come of age: towards implementation of circulating tumour DNA. *Nat Rev Cancer* 2017; 17(4): 223–238. doi: 10.1038/nrc.2017.7.
17. Diehl F, Schmidt K, Choti MA et al. Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. *Nat Med* 2008; 14(9): 958–990. doi: 10.1038/nm.1789.
18. Mandel P, Metais P. Nuclear acids in human blood plasma. *C R Seances Soc Biol Fil* 1948; 142(3–4): 241–243.
19. 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.
20. 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. doi: 10.1159/000226740.
21. Bettgowda 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): 224ra24. doi: 10.1126/scitranslmed.3007094.
22. Tie J, Wang Y, Tomasetti C et al. Circulating tumor DNA analysis detects minimal residual disease and predicts recurrence in patients with stage II colon cancer. *Sci Transl Med* 2016; 8(346): 346ra92. doi: 10.1126/scitranslmed.aaf6219.
23. Moulere F, Chandrananda D, Piskorz AM et al. Enhanced detection of circulating tumor DNA by fragment size analysis. *Sci Transl Med* 2018; 10(466): eaat4921. doi: 10.1126/scitranslmed.aat4921.
24. Lee J, Kim M, Seong M 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.
25. Quan PL, Suazade M, Brouzes E. dPCR: a technology review. *Sensors (Basel)* 2018; 18(4): 1271. doi: 10.3390/s18041271.
26. Diehl F, Li M, He Y et al. BEAMing: single-molecule PCR on microparticles in water-in-oil emulsions. *Nat Methods* 2006; 3(7): 551–559. doi: 10.1038/nmeth898.
27. Alizadeh AA, Aranda V, Bardelli A et al. Toward understanding and exploiting tumor heterogeneity. *Nat med* 2015; 21(8): 846–853. doi: 10.1038/nm.3915.
28. Liu S, Wang J. Current and future perspectives of cell-free DNA in liquid biopsy. *Curr Issues Mol Biol* 2022; 44(6): 2695–2709. doi: 10.3390/cimb44060184.
29. Bai Y, Wang Z, Liu Z et al. Technical progress in circulating tumor DNA analysis using next generation sequencing. *Mol Cell Probes* 2020; 49: 101480. doi: 10.1016/j.mcp.2019.101480.
30. Gale D, Lawson ARJ, Howarth K et al. Development of a highly sensitive liquid biopsy platform to detect clinically-relevant cancer mutations at low allele fractions in cell-free DNA. *PLoS One* 2018; 13(3): e0194630. doi: 10.1371/journal.pone.0194630.
31. Kinde I, Wu J, Papadopoulos N et al. Detection and quantification of rare mutations with massively parallel sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108(23): 9530–9535. doi: 10.1073/pnas.1105422108.
32. 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.
33. Fangman B, Raghav K, Kopetz S. Circulating tumor DNA as a marker of minimal residual disease. *Oncology (Williston Park)* 2022; 36(10): 600–603. doi: 10.46883/2022.25920975.
34. Abbosh C, Swanton C, Birkbak NJ. Clonal haematopoiesis: a source of biological noise in cell-free DNA analyses. *Ann Oncol* 2019; 30(3): 358–359. doi: 10.1093/annonc/mdy552.
35. Chakrabarti S, Peterson CY, Sriram D et al. Early stage colon cancer: current treatment standards, evolving paradigms, and future directions. *World J Gastrointest Oncol* 2020; 12(8): 808–832. doi: 10.4251/wjgv.12.8.808.
36. Punt CJA, Koopman M, Vermeulen L. From tumour heterogeneity to advances in precision treatment of colorectal cancer. *Nat Rev Clin Oncol* 2017; 14(4): 235–246. doi: 10.1038/nrclinonc.2016.171.
37. Nikbakht H, Jessa S, Sukhai MA et al. Latency and interval therapy affect the evolution in metastatic colorectal cancer. *Sci Rep* 2020; 10(1): 581. doi: 10.1038/s41598-020-57476-y.
38. Gong J, Hendifar A, Gangi A et al. Clinical applications of minimal residual disease assessments by tumor-informed and tumor-uninformed circulating tumor DNA in

- colorectal cancer. *Cancers (Basel)* 2021; 13(18): 4547. doi: 10.3390/cancers13184547.
39. Parikh AR, Van Seventer EE, Siravegna G et al. Minimal residual disease detection using a plasma-only circulating tumor DNA assay in patients with colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2021; 27(20): 5586–5594. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-21-0410.
40. Hewiston P, Glasziou P, Watson E et al. Cochrane systematic review of colorectal cancer screening using the fecal occult blood test (hemoccult): an update. *Am J Gastroenterol* 2008; 103(6): 1541–1549. doi: 10.1111/j.1572-0241.2008.01875.x.
41. Wang X, Shi X, Zeng P et al. Circulating cell free DNA as the diagnostic marker for colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Oncotarget* 2018; 9(36): 24514–24524. doi: 10.18632/oncotarget.25314.
42. Danese E, Montagnana M. Epigenetics of colorectal cancer: emerging circulating diagnostic and prognostic biomarkers. *Ann Transl Med* 2017; 5(13): 279. doi: 10.21037/atm.2017.04.45.
43. Payne SR. From discovery to the clinic: the novel DNA methylation biomarker (m)SEPT9 for the detection of colorectal cancer in blood. *Epigenomics* 2010; 2(4): 575–585. doi: 10.2217/epi.10.35.
44. Wu D, Zhou G, Jin P et al. Detection of colorectal cancer using a simplified SEPT9 gene methylation assay is a reliable method for opportunistic screening. *J Mol Diagn* 2016; 18(4): 535–545. doi: 10.1016/j.jmoldx.2016.02.005.
45. Imperiale TF, Ransohoff DF, Itzkowitz SH et al. Multi-target stool DNA testing for colorectal-cancer screening. *N Eng J Med* 2014; 370(14): 1287–1297. doi: 10.1056/NEJMoa1311194.
46. Cohen JD, Li L, Wang Y et al. Detection and localization of surgically resectable cancers with a multi-analyte blood test. *Science* 2018; 359(6378): 926–930. doi: 10.1126/science.aar3247.
47. Basnet S, Zhang Z, Liao W et al. The prognostic value of circulating cell-free DNA in colorectal cancer: a meta-analysis. *J Cancer* 2016; 7(9): 1105–1113. doi: 10.7150/jca.14801.
48. Luskin MR, Murakami MA, Manalis SR et al. Targeting minimal residual disease: a path to cure? *Nat Rev Cancer* 2019; 18(4): 255–263. doi: 10.1038/nrc.2017.125.
49. Tie J, Cohen JD, Serigne NL et al. Prognostic significance of postsurgery circulating tumor DNA in nonmetastatic colorectal cancer: individual patient pooled analysis of three cohort studies. *Int J Cancer* 2021; 148(4): 1014–1026. doi: 10.1002/ijc.33312.
50. Tie J, Cohen JD, Wang Y et al. Circulating tumor DNA analyses as markers of recurrence risk and benefit of adjuvant therapy for stage III colon cancer. *JAMA Oncol* 2019; 5(12): 1710–1717. doi: 10.1001/jamaoncol.2019.3616.
51. Tarazona N, Gimeno-Valiente F, Gambardella V et al. Targeted next-generation sequencing of circulating-tumor DNA for tracking minimal residual disease in localized colon cancer. *Ann Oncol* 2019; 30(11): 1804–1812. doi: 10.1093/annonc/mdz390.
52. Elferink MAG, de Jong KP, Klaase JM et al. Metachronous metastases from colorectal cancer: a population-based study in North-East Netherlands. *Int J Colorectal Dis* 2015; 30(2): 205–212. doi: 10.1007/s00384-014-2085-6.
53. Slater S, Bryant A, Chen H et al. ctDNA guided adjuvant chemotherapy versus standard of care adjuvant chemotherapy after curative surgery in patients with high risk stage II or stage III colorectal cancer: a multi-centre, prospective, randomised control trial (TRACC Part C). *BMC Cancer* 2023; 23(1): 257. doi: 10.1186/s12885-023-10699-4.
54. Tie J, Cohen JD, Lahouel K et al. Circulating tumor DNA analysis guiding adjuvant therapy in stage II colon cancer. *N Engl J Med* 2022; 386(24): 2261–2272. doi: 10.1056/NEJMoa2200075.
55. Taniguchi H, Nakamura Y, Kotani D et al. CIRCULATE-Japan: circulating tumor DNA-guided adaptive platform trials to refine adjuvant therapy for colorectal cancer. *Cancer Sci* 2021; 112(7): 2915–2920. doi: 10.1111/cas.14926.
56. Kotani D, Oki E, Nakamura Y et al. Molecular residual disease and efficacy of adjuvant chemotherapy in patients with colorectal cancer. *Nat Med* 2023; 29(1): 127–134. doi: 10.1038/s41591-022-02115-4.