

**Univerzita Karlova
2. lékařská fakulta**

Autoreferát disertační práce



Predikce terapeutické odpovědi na neoadjuvantní léčbu u nádorů rekta.

Filip Pazdírek

Praha 2020

Disertační práce byla vypracována v rámci kombinovaného studia doktorského studijního programu Experimentální chirurgie na Chirurgické klinice 2. LF UK a FN Motol.

Autor: MUDr. Filip Pazdírek, Chirurgická klinika 2. LF UK a FN Motol

Školitel: prof. MUDr. Jiří Hoch, CSc., Chirurgická klinika 2. LF UK a FN Motol

Konzultant: doc. RNDr. Marek Minárik, Ph.D., Elphogene Praha

Oponenti: doc. Lubomír Martínek, Ph.D., Chirurgické oddělení, Nemocnice Agel Nový Jičín

doc. Jaromír Šimša, Ph.D., Chirurgická klinika 1. LF UK a Thomayerovy nemocnice

Obhajoba se bude konat před komisí pro obhajoby oborové rady Experimentální chirurgie

v Praze dne od hod.

.....

Předseda komise pro obhajobu disertační práce v doktorském studijním programu
Experimentální chirurgie

Předseda OR a garant doktorského studijního programu: prof. MUDr. Zdeněk Krška, DrSc.

Děkan 2. lékařské fakulty UK: prof. MUDr. Vladimír Komárek, CSc.

Tato práce vznikla za podpory grantu AZV 15-27939A .

S disertační prací je možno se seznámit na Oddělení Ph.D. studia děkanátu 2. lékařské fakulty Univerzity Karlovy, V Úvalu 84, 150 06, Praha 5 (tel. 224 435 836).

Souhrn

Úvod: Léčba lokálně pokročilého karcinomu rekta je multimodální. Její součástí je neoadjuvantní radiochemoterapie (NCHRT), která snižuje riziko lokální recidivy. Tato léčba je však doprovázena také vedlejšími účinky. Proto se hledají prediktivní markery umožňující identifikovat skupinu pacientů neodpovídající na léčbu, a tím je uchránit od nepříznivých účinků této léčby. S tímto cílem jsme monitorovali cirkulující nádorovou DNA (ctDNA) jako potenciální biomarker založený na tekuté biopsii. Zkoumali jsme plazmatické změny ctDNA během prvních dnů NCHRT a jejich vztah k časné odpovědi nádoru na léčbu a k celkovému přežití nemocných.

Metodika a soubor: Soubor zahrnoval 36 pacientů s LARC (klinické stadium II nebo III) podstupujících NCHRT před chirurgickou léčbou. Před zahájením léčby byly vyšetřeny somatické mutace v biopsiích tkáně odebraných během endoskopického vyšetření. CtDNA byla extrahována ze vzorků plazmy pacientů před terapií a na konci prvního týdne léčby. Abychom optimalizovali náklady na testování, využili jsme dvoustupňový přístup, při kterém byla nejprve použita finančně dostupná metoda, a to detekce za pomoci denaturační kapilární elektroforézy, po které následovalo vyšetření původně negativních vzorků vysoce citlivým testem BEAMING. CtDNA byla následně korelována s klinickými parametry, včetně stupně regrese nádoru (TRG), stádia TNM a přežití nemocných.

Výsledky: Somatickou mutaci jsme detekovali u 33 z 36 pacientů (91,7 %). 7 pacientů (7/33, 21,2 %) mělo před zahájením léčby přítomnou ctDNA. Tyto nálezy nebyly dostatečné k rozhodnutí vynechat u detekovaných pacientů NCHRT. V dlouhodobém intervalu pozitivita ctDNA před léčbou snížila přežití bez nemoci (DFS) a celkové přežití (OS) v průměru o 1,47, respektive 1,41 roku ($p = 0,015$ a $p = 0,010$). U všech pacientů byla ctDNA do konce prvního týdne NCHRT významně snížena nebo zcela eliminována z plazmy, bohužel bez korelace s některým z klinických parametrů.

Závěr: CtDNA byla bez rozdílu snížena či eliminována z oběhu všech pacientů, proto dynamika změn během prvního týdne NCHRT není vhodná k predikci časné léčebné odpovědi u nádoru rekta. Předléčebná pozitivita ctDNA představovala statisticky významný negativní prognostický biomarker pro celkové přežití pacientů. Přesto obecný princip rychlé eliminace ctDNA během počátečních dnů NCHRT je pozoruhodný a měl by být dále studován.

Klíčová slova: nádor rekta, neoadjuvantní chemoradioterapie, cirkulující nádorová ctDNA, predikce, prognóza, odpověď, léčba, biomarker

Summary

Introduction: The treatment of locally advanced rectal cancer is multimodal. It includes neoadjuvant radiochemotherapy (NCHRT), which reduces the risk of local recurrence.

However, this treatment is also accompanied by side effects. Accordingly, there is an unmet need to identify predictive markers allowing to identify non-responders to avoid its adverse effects. We monitored circulating tumor DNA (ctDNA) as a potential liquid biopsy-based biomarker. We have investigated ctDNA changes plasma during the early days of NCHRT and its relationship to the immediate tumor response as well as overall patients survival.

Methods and Patients: The studied cohort included 36 LARC patients (stage II or III) undergoing NCHRT with subsequent surgical treatment. We have detected somatic mutations in tissue biopsies taken during endoscopic examination prior to the therapy. CtDNA was extracted from patient plasma samples prior to therapy and at the end of the first week. In order to optimize the analytical costs of liquid-biopsy testing, we have utilized a two-level approach in which first a low-cost detection method of denaturing capillary electrophoresis was used followed by examination of initially negative samples by a high-sensitivity BEAMING assay. The ctDNA was related to clinical parameters including tumor regression grade (TRG), TNM staging and patient survival.

Results: We have detected a somatic mutation in 33 out of 36 patients (91.7%). Seven patients (7/33, 21.2%) had ctDNA present prior to therapy. These findings were not sufficient to decide not to administer NCHRT to detected patients. The ctDNA positivity before treatment reduced post-operative disease-free survival and overall survival by an average of 1.47 and 1.41 years, respectively ($p = 0.015$, and $p = 0.010$). In all patients, ctDNA was strongly reduced or completely eliminated from plasma by the end of the first week of NCHRT, with no correlation to any of the parameters analyzed.

Conclusions: As ctDNA was reduced indiscriminately from the circulation of all patients, therefore the dynamics during the first week of NCHRT is not suitable for predicting the immediate therapeutic response in rectal cancer. The baseline ctDNA presence represented a statistically significant negative prognostic biomarker for the overall patient survival. However, the general effect of rapid ctDNA disappearance apparently occurring during the initial days of NCHRT is noteworthy and should further be studied.

Keywords: rectal cancer, neoadjuvant chemoradiotherapy, circulating tumor ctDNA, prediction, prognosis, response, therapy, biomarker

1. Úvod

Současná léčba nádorů rekta je multimodální. Pouze u časných nádorů je postupem volby operace jako jediná léčebná modalita. Pacienti s lokálně pokročilým nádorem klinického stádia II a III jsou před operací indikováni k neoadjuvantní léčbě spočívající v kombinaci zevního ozáření a konkomitantní systémové chemoterapie (NCHRT). Hlavním pozdním onkologickým rizikem léčby karcinomu rekta jsou lokální recidivy. Cílem neoadjuvantní léčby je toto riziko eliminovat.

Neoadjuvantní léčba je zatížena nežádoucími účinky, zejména postradiačním poškozením pánve končící fibrózou, poruchou funkce análního svěrače, inkontinencí a sexuálními dysfunkcemi. NCHRT zvyšuje riziko pooperačních komplikací a prohlubuje projevy LARS (Low Anterior Resection Syndrome). Neoadjuvantní radiochemoterapii lze aplikovat v tzv. krátkém nebo dlouhém režimu. Jen po dlouhém režimu a odstupu lze očekávat patrnou léčebnou odpověď, která se individuálně liší. U části nemocných dojde účinkem NCHRT ke kompletnímu vymizení nádoru, u další skupiny k částečné regresi, vyjádřené zmenšením nádoru, zmenšením počtu uzlin v mezorektu nebo jejich vymizením. Stupeň regrese nádoru účinkem NCHRT je nejlépe hodnocen histopatologicky. Nejvíce užívaný je systém podle Dworaka/Rödela [1, 2]. Důležitým zjištěním je, že TRG koreluje s celkovým přežitím nemocných (OS), ale i s dobou bez nemoci (DFS, disease free survival). OS i DFS plynule stoupá s mírou histopatologické regrese nádoru [2-4].

Pacienti s kompletní léčebnou odpovědí mají vynikající prognózu. Téměř 90 % pacientů je v remisi po 5 letech od operace [5]. U těchto pacientů je možné volit za přísně stanovených kritérií neoperační postup a nemocné jen sledovat (Watch and Wait). Naopak až u 40 % pacientů zůstane stav léčbou neovlivněn. Přesto jsou i tito nemocní vystaveni všem rizikům, která z neoadjuvantní léčby vyplývají, jsou zatíženi odkladem operace, ačkoliv z neoadjuvantní léčby neprofitují. U těchto tzv. nonresponderů by bylo vhodnější předoperační léčbu modifikovat či zcela vynechat a tím eliminovat její nežádoucí účinky.

Proto se hledají prediktivní markery, které by umožnily identifikovat nemocné s dobrou odpovědí na léčbu a nemocné s minimální odpovědí. Tím by bylo možné omezit nežádoucí účinky léčby u neprofitujících pacientů a snížit neefektivně vynaložené finanční prostředky na léčbu. Optimálně by tyto markery měly být prokázány před zahájením nebo časně po zahájení NCHRT. Stanovení těchto markerů by mělo být finančně i časově přijatelné.

Tyto markery je možné dělit na klinické, radiologické, molekulární, imunologické, genetické a na volné nádorové elementy.

Žádný z dosud zkoumaných markerů zatím není dostatečně spolehlivý. V posledních letech se zkoumá význam volné nádorové DNA (ctDNA) přítomné v krevním oběhu při diagnostice a prognóze nádorových onemocnění. CtDNA je do krevního oběhu uvolňovaná z nádoru. Množství uvolněné ctDNA závisí na typu a pokročilosti nádoru. Během NCHRT dochází k poškození nádorových buněk a k uvolnění jejich DNA do krevního oběhu. Množství uvolněné DNA během NCHRT by mělo postupně klesat v korelaci se stupněm poškození nádoru během onkologické léčby. CtDNA jsme schopni detekovat a potencionálně ji využít k predikci léčebné odpovědi na NCHRT.

2. Cíle práce

Hlavním cílem práce bylo zjistit, zda jsme schopni stanovením hladin ctDNA v krevním séru nemocných predikovat terapeutickou odpověď na NCHRT u nádorů rekta. Tedy, zda existuje korelace mezi hladinami ctDNA v séru nemocných před zahájením a v průběhu chemoradioterapie a histopatologickým stupněm regrese nádoru a TNM stagingem po proběhlé léčbě. Pokud by tato korelace existovala, dovolovala by rozdělit pacienty na respondery a nonrespondery a modifikovat u každé skupiny multimodální léčbu. Dalším cílem bylo také zjistit, zda přítomnost ctDNA v séru nemocných má vliv na jejich přežití.

3. Soubor a metodika

Do prospektivní studie bylo zařazeno 36 pacientů s lokálně pokročilým adenokarcinomem rekta v období od 2013 do 2017. Soubor tvořilo 27 mužů a 9 žen s průměrným věkem 64,1 roku. Protokol studie byl schválen etickou komisí a pacienti účast ve studii potvrdili podpisem informovaného souhlasu. Do studie byli zařazeni jen pacienti v celkově dobrém stavu a spolupracující.

U každého pacienta bylo provedeno koloskopické vyšetření a nádor byl histologicky verifikován. Staging onemocnění byl stanoven na základě CT a MRI vyšetření a byl určen přesný protokol léčby.

Nádorová tkáň (obvykle tři vzorky získané bioptickými kleštěmi) odebrané během počáteční endoskopie před onkologickou léčbou byly okamžitě zmrazeny na -30°C a odeslány do laboratoře ke genetickému testování. Následně byla nádorová tkáň vyšetřena na přítomnost nejčastějších mutací dříve pozorovaných u CRC (zahrnujících *KRAS* / *MIM* # 190070 /, *TP53* / *MIM* # 191170 /, *APC* / *MIM* # 611731 /, *PIK3CA* / *MIM* # 171834 /,

BRAF / *MIM* # 164757 / a *CTNNB1* / *MIM* # 166806 /). Plazma byla získána centrifugací ze vzorků krve odebraných před a během NCHRT.

Všichni pacienti podstoupili neoadjuvantní chemoradioterapii sestávající se z 50.4 Gy radiace a konkomitantního podání Xelody (capecitabin) v celkové dávce 825 mg/m². Ozáření bylo provedeno formou 25 frakcí s úvodním boostem 5.4 Gy. Po ukončení prvního týdne NCHRT byl proveden kontrolní odběr na přítomnost ctDNA v séru. Za 6 týdnů po ukončení NCHRT bylo provedeno kontrolní MRI pánve. V odstupu 8-10 týdnů po ukončení NCHRT všichni pacienti podstoupili operaci. Resekát byl podrobně histopatologicky zhodnocen patologem, byl určen pTNM nádoru a také vyšetřena histopatologická regrese nádoru po proběhlé NCHRT. Dlouhodobý výsledek byl hodnocen ze sledování po dobu nejméně 3 let po operaci. V pravidelných intervalech bylo prováděno standardní vyšetření nádorových markerů, kolonoskopie a zobrazení pomocí počítačové tomografie (CT).

Vyšetření mutací, stanovení ctDNA

Extrakce DNA z nádorové tkáně a plazmy byla prováděna pomocí standardních spin-kolonových postupů. K extrakci ze vzorků tkáně byla použita sada GenEluteTM pro savčí genomovou DNA Miniprep (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA). Extrakce ctDNA ze vzorků krevní plazmy byla provedena pomocí soupravy NucleoSpin Plasma XS (Macherey-Nagel, Düren, Německo), objem zpracované plazmy byl 600 µl, což poskytlo typicky mezi 5 a 50 ng cfDNA na vzorek stanovenou fluorometrem Qubit 2.0 (Life Technologies, Camarillo, CA).

Podobně jako v jiných pracích [6-8] byla mutační analýza vzorků tkání zaměřena na panel vybraných onkogenů s nejvyšším podílem somatických mutací u nádoru rekta podle mezinárodní „databáze COSMIC“ ([https:// cancer.sanger.ac.uk/cosmic](https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic)). Tento panel zahrnoval hotspoty v *KRAS*, *BRAF*, *PIK3CA* a *CTNNB1*, stejně jako vybrané oblasti tumor supresorových genů *APC* (mutační klastrová oblast) a *TP53* (exony 5–8). Mutační analýzy byly prováděny metodou denaturační kapilární elektroforézy (DCE) s využitím dříve popsanych experimentálních parametrů [9-12]. Somatické mutace detekované ve vzorcích tkáně byly následně vyšetřeny ve vzorcích cfDNA získaných z plazmy. Genetické testování bylo provedeno pomocí dvou samostatných metod, jak bude dále diskutováno. Podskupina vzorků, u kterých nebyla metodou DCE ctDNA prokázána [13] byla následně znovu testována pomocí „BEAMING assay“ s vysokým rozlišením [14] zaměřeného na detekci *KRAS*-specifické ctDNA. Vyšetření bylo provedeno externí

smluvní laboratoří (Oddělení patologie, Jesseniova lékařská fakulta Univerzity Komenského v Martině, Slovensko).

Statistické metody

Všechny statistické analýzy byly provedeny pomocí jazyka R pro statistické výpočty a grafiku [15]. Vzájemné vztahy mezi přežitím nemocných a dalšími prediktory, jako je přítomnost ctDNA před a během NCHRT, byly analyzovány pomocí Coxova modelu proporcionálního rizika a t-testů a vyneseny pomocí boxplots a Kaplan-Meierových křivek. Výstupy s hodnotami p pod 0,05 byly považovány za statisticky významné.

4. Výsledky

Příznivá odpověď na léčbu (TRG skóre 3 nebo 4) byla pozorována u 5 pacientů (5/36, 13,9 %), zatímco u 11 pacientů (11/36, 30,5 %) byla léčebná odpověď velmi malá nebo žádná (TRG skóre 0 nebo 1).

Z biopsií nádorové tkáně jsme před zahájením léčby detekovali somatické mutace u 33 z 36 pacientů (91,7 %). Nejčastěji jsme prokázali mutaci KRAS nebo TP53 samostatně či s jiným typem mutace. Nebyl zjištěn žádný vztah mezi přítomností specifické mutace (nebo mutační kombinace) v nádorové tkáni a léčebnou odpovědí na NCHRT hodnocenou pomocí TRG nebo TNM stagingu.

CtDNA byla detekována ve vzorcích plazmy u 7 pacientů (7/33, 21,2 %) před zahájením NCHRT pomocí kombinace analytické metody s nízkým a posléze s vysokým rozlišením. Přítomnost ctDNA před zahájením léčby měla prognostický vliv. Zatímco celková pravděpodobnost tříletého přežití byla u všech pacientů 86,7 %, v podskupině ctDNA negativních pacientů bylo celkové tříleté přežití 91,2 %, ale v podskupině pacientů ctDNA pozitivních to bylo 71,4 %.

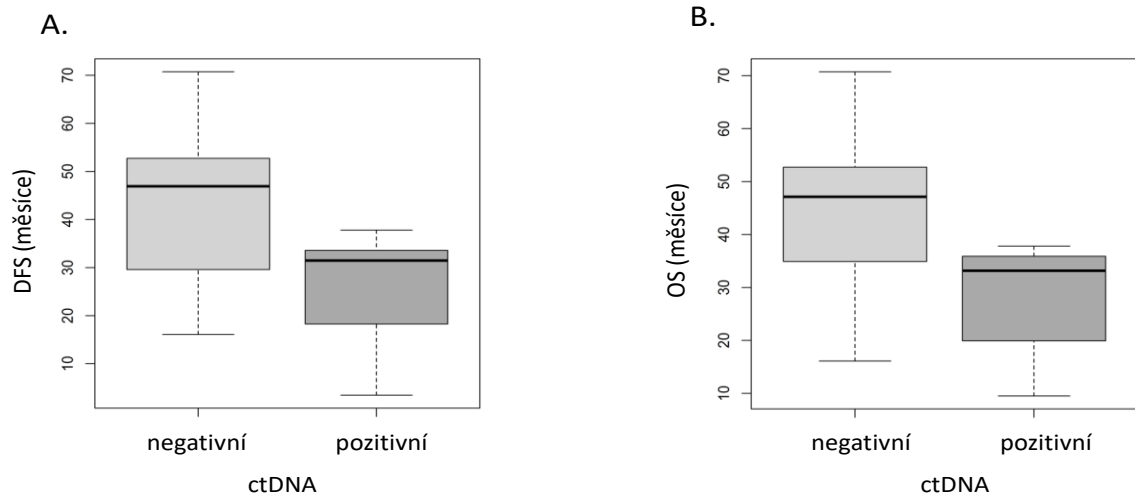
Při porovnání obou skupin pacientů s pozitivní a negativní ctDNA byla pozitivita ctDNA před zahájením NCHRT významně spojena s kratším DFS i OS. DFS i OS bylo u těchto pacientů kratší průměrně o 1,47, respektive 1,41 roku [t (DFS) = 2,95, df (DFS) = 9,88, p (DFS) = 0,015 a t (OS) = 3,15, df (OS) = 10,31, p (OS) = 0,010], Graf 1.

Pravděpodobnost přežití v závislosti na ctDNA je také dokumentována Kaplan-Meierovou analýzou, Graf 2.

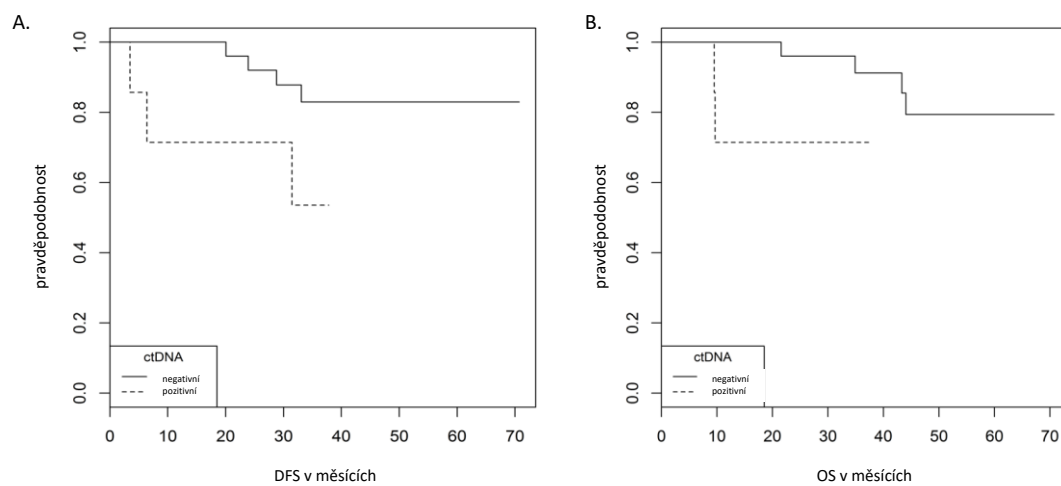
CtDNA byla během prvního týdne NCHRT bez rozdílu eliminována nebo významně snížena z krevního oběhu u všech pacientů. Neprokázali jsme žádnou souvislost mezi

změnou hladin ctDNA (před a během NCHRT) a léčebnou odpovědí na NCHRT hodnocenou pomocí TRG.

Graf 1. Vliv předléčebné pozitivity ctDNA na dobu bez nemoci, DFS (A) a celkové přežití, OS (B), boxplot, doba v měsících



Graf 2. Pravděpodobnost DFS (A) a OS (B) v závislosti na pozitivitě ctDNA před zahájením NCHRT, graf Kaplan-Meier, doba v měsících, $p = 0,05$ resp. $p = 0,01$



5. Diskuze

Ve studii jsme se zaměřili na predikci terapeutického účinku NCHRT u nádoru rekta pomocí stanovení hladiny ctDNA. V literatuře je několik prací zkoumajících souvislost mezi přítomností cfDNA/ctDNA a predikcí léčebné odpovědi na NCHRT u nádorů rekta. Zitt et al. stanovil hladinu cirkulující DNA u lokálně pokročilého karcinomu rekta (LARC) před léčbou, po ukončení NCHRT a po operaci [16]. Soubor rozdělil na nonrespondery a respondery. Medián hladiny předléčebné cfDNA byl 4.2 ng/ml, po ukončení NCHRT 1 ng/ml a po operaci 4.1 ng/ml. Zjistil, že předléčebné hladiny ctDNA nonresponderů a responderů se neliší. Na konci léčby, ale byla hladina ctDNA vyšší ve skupině nonresponderů. Prakticky u všech pacientů hladina cfDNA poklesla po ukončení NCHRT. Limitem této práce byl malý počet pacientů.

Agostini v roce 2011 publikoval soubor 67 pacientů s LARC [17]. Měřil hladiny cfDNA před, v průběhu a po ukončení NCHRT. Stanovil celkovou koncentraci cfDNA, podíl dlouhých a krátkých fragmentů DNA, tzv. DNA integrity index. Podobně jako Zitt nezjistil korelaci předléčebné hladiny cfDNA a odpovědi na NCHRT. Podařilo se mu prokázat, že u pacientů s dobrou odpovědí na léčbu byl po ukončení NCHRT DNA integrity index u responderů signifikantně nižší než u nonresponderů.

Sun et. al. již nehledal jen celkovou volnou DNA (cfDNA), ale i konkrétní nádorové mutace v krevní plazmě (ctDNA) [18]. Sun ověřil, že množství cfDNA u pacientů s CRC je signifikantně vyšší než u zdravých jedinců. Dále zjišťoval koncentraci dvou fragmentů DNA (100bp a 400bp) v plazmě před NCHRT a po jejím ukončení. Zjistil, že koncentrace fragmentu 400 bp byla signifikantně nižší po ukončení NCHRT ve skupině responderů.

Carpinetti et al. odběrem tkáně nádoru a následným celogenovým sekvenováním nádorové DNA určil u každého ze 4 pacientů specifické DNA fragmenty [19]. Tyto fragmenty pak hledal v krevní plazmě. Zjistil, že u pacientů s dobrou odpovědí na léčbu došlo během NCHRT k poklesu ctDNA. Její opětovný vzestup byl spojen s progresí onemocnění a předcházel vzestupu CEA a manifestaci rekurence na zobrazovacích vyšetřeních. Pro velmi malý počet pacientů nelze výsledky korelovat.

Li et al. zjišťoval hladiny ctDNA před a v průběhu NCHRT. Predikce léčebné odpovědi na základě pozitivita ctDNA v úvodu léčby dosahovala 70 % [20]. Yang na větším souboru pacientů naopak nepotvrdil souvislost mezi předléčebnou hladinou ctDNA a odpovědí na NCHRT u pacientů s nádory rekta [21].

V naší studii jsme předpokládali, že časné změny plazmatických hladin ctDNA v průběhu NCHRT odrážejí účinek léčby a budou tedy využitelné k predikci terapeutické odpovědi. Očekávali jsme tedy, že po vyhodnocení dynamiky plazmatických hladin ctDNA budeme schopni odlišit skupinu pacientů neodpovídající na NCHRT a ušetřit je tak od nežádoucích účinků této léčby. Na základě toho jsme stanovili hladiny ctDNA před zahájením NCHRT a bezprostředně na konci prvního týdne léčby. Také jsme se zaměřili na nalezení potenciálních korelací mezi léčebnou odpovědí na NCHRT a mutacemi v panelu šesti běžně zkoumaných genů [22].

Z předchozích prací je patrné, že existuje velká variabilita v přítomnosti ctDNA krevní plazmě nemocných. Toto rozmezí je od 15 do 77 % u různých skupin pacientů s LARC a je závislé především na stadiu onemocnění [23]. Abychom snížili vysoké náklady spojené se stanovením ctDNA a umožnili tak finančně efektivní rutinní diagnostický přístup, použili jsme v této práci kaskádový přístup Obr 1. Prvním krokem bylo stanovení ctDNA pomocí relativně jednoduché a rychlé metody DCE (denaturující kapilární elektroforéza), která vyžadovala pouze malé množství vzorků (600 µl plazmy). DCE byla schopná odhalit přítomnost ctDNA na > 1% frakce minoritní alely (MAF) za pouhé 2 hodiny [13, 23]. Teprve v případě negativního výsledku jsme provedli stanovení ctDNA pomocí BEAMING metody. Tento postup vykazuje citlivost až 0,01 % (MAF). K analýze byla využita zbytková množství archivovaných ctDNA, která byla ponechána z předchozího testování. Vzhledem k specifičnosti BEAMING metody jsme takto byli schopni vyšetřit jen pacienty s nádory, u kterých byla prokázána mutace KRAS. Testování pomocí DCE odhalilo pozitivitu ctDNA u 5 pacientů (5/30, 16,7 %), testování pomocí BEAMING odhalilo pozitivitu u dalších 2 pacientů (2/4, 50 %). Celkově jsme ctDNA prokázali u 23,3 % (7/30). Vyšší průkaz ctDNA by vyžadoval jiné vysoce citlivé techniky např. vysoce nákladné ultra-hluboké sekvenování nové generace s využitím molekulárních barcodů, přesto náš výsledek je srovnatelný s dříve publikovanými údaji [24].

Na rozdíl od našich očekávání jsme nezaznamenali žádnou prediktivní korelaci mezi hladinami ctDNA a histopatologickou regresí nádoru (TRG) a TNM. Podobně ani žádná ze stanovených mutací neměla prediktivní vztah k TRG a TNM.

Přesto jsme prokázali, že pacienti, u kterých byla vstupně prokázána ctDNA, měli kratší celkové přežití (OS) a kratší dobu bez nemoci (DFS) než pacienti bez přítomnosti ctDNA v krevní plazmě Graf 1. Toto je v souladu s předchozí prací Tie et al., která uváděla ctDNA jako negativní prognostický faktor pro celkové přežití pacientů [25]. U většiny pacientů pozitivních na ctDNA následné CT či MRI vyšetření skutečně odhalilo

přítomnost dříve nerozpoznaných mikrometastatických míst. Pozitivita ctDNA by proto mohla být považována za vodítko pro rozhodnutí související s terapií po chirurgické léčbě [26-29].

U všech pacientů jsme na konci prvního týdne NCHRT pozorovali významné snížení nebo úplnou eliminaci ctDNA v krevní plazmě. Hladiny ctDNA byly bohužel sníženy bez ohledu na případný terapeutický výsledek. Zdá se, že tato jednoznačná rychlá clearance ctDNA po aplikaci chemoradioterapie naznačuje přítomnost obecnějšího jevu, který nesouvisí se skutečnými charakteristikami pacienta nebo specifickou biologii nádoru. Eliminace ctDNA z plazmy je primárně výsledkem enzymatického štěpení [30, 31]. Nedávno bylo zveřejněno, že některé DNA exonukleázy jsou aktivní při opravě DNA a uvolňují se v důsledku radiačního poškození [32]. Lze předpokládat, že taková radiačně indukovaná aktivita exonukleáz by mohla vést k dočasnému vymizení ctDNA po podání onkologické léčby. Většina prací zkoumající ctDNA při onkologické léčbě monitoruje hladiny ctDNA sedmý den či později po zahájení léčby [33-35]. K objasnění výše uvedených jevů by mělo být monitorování ctDNA prováděno časněji a v ještě kratších časových intervalech od zahájení této léčby. Nedávno byl použit podobný přístup zaměřený na hodnocení ctDNA v moči pro monitorování dynamiky nádorové odpovědi na cílenou protinádorovou léčbu u nemalo-buněčného karcinomu plic [36]. Při stanovení ctDNA během počáteční fáze NCHRT, tzn. během několika hodin od zahájení léčby a sledování dynamiky hladin ctDNA během následujících dnů, by mohlo doložit změny v hladinách ctDNA, jejichž podkladem jsou morfologické změny nádoru a jeho poškození vyplývající z podané multimodální terapie. Podrobné pochopení časování uvolňování a clearance ctDNA v průběhu onkologické léčby může být vodítkem pro využití ctDNA k predikci terapeutické odpovědi na NCHRT o lokálně pokročilého nádoru rekta.

6. Závěr

Prokázali jsme, že monitorování časných změn hladin ctDNA u pacientů s lokálně pokročilým nádorem rekta podstupujících NCHRT může být klinicky důležité. Prokázali jsme, že přítomnost ctDNA v krevní plazmě nemocných před operací je negativní prognostický faktor pro přežití pacientů a mohla by být využita k cílení adjuvantní onkologické léčby. U všech pacientů se během počátečního týdne NCHRT hladina ctDNA snížila, ale bez jakékoliv přímé souvislosti s léčebnou odpovědí hodnocenou pomocí TRG a výsledného TNM stagingu. Na základě stanovení hladin ctDNA jsme nedokázali předpovědět terapeutickou odpověď na předoperační NCHRT u lokálně pokročilého nádoru rekta. Naše výsledky, ale mohou otevřít nové cesty k výzkumu mechanismů uvolňování a clearance ctDNA po poškození buněk v důsledku kombinovaných účinků chemoradioterapie a jejich případné využití k predikci a cílení onkologické léčby.

Literatura:

1. Dworak, O., L. Keilholz, and A. Hoffmann, *Pathological features of rectal cancer after preoperative radiochemotherapy*. Int J Colorectal Dis, 1997. **12**(1): p. 19-23.
2. Rodel, C., et al., *Prognostic significance of tumor regression after preoperative chemoradiotherapy for rectal cancer*. J Clin Oncol, 2005. **23**(34): p. 8688-96.
3. Forster, S., et al., *Differential effects of alpha-catenin on the invasion and radiochemosensitivity of human colorectal cancer cells*. Int J Oncol, 2018. **52**(4): p. 1117-1128.
4. Fokas, E., et al., *Tumor regression grading after preoperative chemoradiotherapy for locally advanced rectal carcinoma revisited: updated results of the CAO/ARO/AIO-94 trial*. J Clin Oncol, 2014. **32**(15): p. 1554-62.
5. Maas, M., et al., *Long-term outcome in patients with a pathological complete response after chemoradiation for rectal cancer: a pooled analysis of individual patient data*. Lancet Oncol, 2010. **11**(9): p. 835-44.
6. Sefrioui, D., et al., *Clinical value of chip-based digital-PCR platform for the detection of circulating DNA in metastatic colorectal cancer*. Dig Liver Dis, 2015. **47**(10): p. 884-90.
7. Spindler, K.L., et al., *Changes in mutational status during third-line treatment for metastatic colorectal cancer--results of consecutive measurement of cell free DNA, KRAS and BRAF in the plasma*. Int J Cancer, 2014. **135**(9): p. 2215-22.
8. Tie, J., et al., *Circulating tumor DNA as an early marker of therapeutic response in patients with metastatic colorectal cancer*. Ann Oncol, 2015. **26**(8): p. 1715-22.
9. Minarik, M., et al., *Application of cycling gradient capillary electrophoresis to detection of APC, K-ras, and DCC point mutations in patients with sporadic colorectal tumors*. Electrophoresis, 2004. **25**(7-8): p. 1016-21.
10. Prochazkova, K., et al., *Somatic TP53 mutation mosaicism in a patient with Li-Fraumeni syndrome*. Am J Med Genet A, 2009. **149a**(2): p. 206-11.
11. Hinselwood, D.C., T.W. Abrahamsen, and P.O. Ekstrom, *BRAF mutation detection and identification by cycling temperature capillary electrophoresis*. Electrophoresis, 2005. **26**(13): p. 2553-61.
12. Fiala, O., et al., *Gene mutations in squamous cell NSCLC: insignificance of EGFR, KRAS and PIK3CA mutations in prediction of EGFR-TKI treatment efficacy*. Anticancer Res, 2013. **33**(4): p. 1705-11.
13. Levy, M., et al., *Utility of cell-free tumour DNA for post-surgical follow-up of colorectal cancer patients*. Anticancer Res, 2012. **32**(5): p. 1621-6.
14. Diehl, F., et al., *BEAMing: single-molecule PCR on microparticles in water-in-oil emulsions*. Nat Methods, 2006. **3**(7): p. 551-9.
15. Team., R.D.C., *A language and environment for statistical computing*. 2008, R Foundation for Statistical Computing.: Vienna, Austria.
16. Zitt, M., et al., *Circulating cell-free DNA in plasma of locally advanced rectal cancer patients undergoing preoperative chemoradiation: a potential diagnostic tool for therapy monitoring*. Dis Markers, 2008. **25**(3): p. 159-65.
17. Agostini, M., et al., *Circulating cell-free DNA: a promising marker of pathologic tumor response in rectal cancer patients receiving preoperative chemoradiotherapy*. Ann Surg Oncol, 2011. **18**(9): p. 2461-8.
18. Sun, W., et al., *The role of plasma cell-free DNA detection in predicting preoperative chemoradiotherapy response in rectal cancer patients*. Oncol Rep, 2014. **31**(3): p. 1466-72.

19. Carpinetti, P., et al., *The use of personalized biomarkers and liquid biopsies to monitor treatment response and disease recurrence in locally advanced rectal cancer after neoadjuvant chemoradiation*. *Oncotarget*, 2015. **6**(35): p. 38360-71.
20. Li, M., et al., *Predictive value of circulating tumor DNA in locally advanced rectal cancer patients receiving neoadjuvant radiochemotherapy*. *Journal of Clinical Oncology*, 2017. **35**(15_suppl): p. e15125-e15125.
21. Yang, L., et al., *Predicting treatment outcome of rectal cancer patients underwent neoadjuvant chemoradiotherapy by ctDNA: The potential use of ctDNA monitoring as organ-sparing approach*. *Journal of Clinical Oncology*, 2018. **36**(15_suppl): p. 3608-3608.
22. Pazdirek, F., et al., *Monitoring of Early Changes of Circulating Tumor DNA in the Plasma of Rectal Cancer Patients Receiving Neoadjuvant Concomitant Chemoradiotherapy: Evaluation for Prognosis and Prediction of Therapeutic Response*. *Front Oncol*, 2020. **10**: p. 1028.
23. Benesova, L., et al., *Mutation-based detection and monitoring of cell-free tumor DNA in peripheral blood of cancer patients*. *Anal Biochem*, 2013. **433**(2): p. 227-34.
24. Diehl, F., et al., *Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics*. *Nature Medicine*, 2008. **14**: p. 985.
25. Tie, J., et al., *Serial circulating tumour DNA analysis during multimodality treatment of locally advanced rectal cancer: a prospective biomarker study*. *Gut*, 2018.
26. Benešová, L., et al., *Significance of postoperative follow-up of patients with metastatic colorectal cancer using circulating tumor DNA*. *World J Gastroenterol*, 2019. **25**(48): p. 6939-6948.
27. Hrebien, S., et al., *Early ctDNA dynamics as a surrogate for progression-free survival in advanced breast cancer in the BEECH trial*. *Ann Oncol*, 2019. **30**(6): p. 945-952.
28. Osumi, H., et al., *Early change in circulating tumor DNA as a potential predictor of response to chemotherapy in patients with metastatic colorectal cancer*. *Sci Rep*, 2019. **9**(1): p. 17358.
29. Reece, M., et al., *The Use of Circulating Tumor DNA to Monitor and Predict Response to Treatment in Colorectal Cancer*. *Front Genet*, 2019. **10**: p. 1118.
30. Khier, S. and L. Lohan, *Kinetics of circulating cell-free DNA for biomedical applications: critical appraisal of the literature*. *Future Sci OA*, 2018. **4**(4): p. Fso295.
31. Kustanovich, A., et al., *Life and death of circulating cell-free DNA*. *Cancer biology & therapy*, 2019. **20**(8): p. 1057-1067.
32. Vanpouille-Box, C., et al., *DNA exonuclease Trex1 regulates radiotherapy-induced tumour immunogenicity*. *Nat Commun*, 2017. **8**: p. 15618.
33. Lyskjaer, I., et al., *Correlation between early dynamics in circulating tumour DNA and outcome from FOLFIRI treatment in metastatic colorectal cancer*. *Sci Rep*, 2019. **9**(1): p. 11542.
34. Vymetalkova, V., et al., *Circulating Cell-Free DNA and Colorectal Cancer: A Systematic Review*. *Int J Mol Sci*, 2018. **19**(11).
35. Raja, R., et al., *Early Reduction in ctDNA Predicts Survival in Patients with Lung and Bladder Cancer Treated with Durvalumab*. *Clinical Cancer Research*, 2018. **24**(24): p. 6212.
36. Husain, H., et al., *Monitoring Daily Dynamics of Early Tumor Response to Targeted Therapy by Detecting Circulating Tumor DNA in Urine*. *Clinical Cancer Research*, 2017. **23**(16): p. 4716.