

ΠΑΝΤΕΛΕΗΜΩΝ ΚΩΝΣΤΑΝΤΟΥΛΑΚΗΣ

ΟΛΟΚΛΗΡΩΜΕΝΟ ΓΕΝΕΤΙΚΟ ΠΡΟΦΙΛ ΤΟΥ ΟΓΚΟΥ: ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΣΤΗΝ ΕΛΛΑΔΑ, ΑΠΟ ΤΗΝ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΟΥ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΕΩΣ ΤΟ ΚΛΙΝΙΚΑ ΑΞΙΟΠΟΙΗΣΙΜΟ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ

Κωνσταντουλάκης Π. PhD, Οικονομάκη Κ. MSc, Σαμαρά Σ. PhD, Χριστοπούλου Γ PhD.

Genotypos Science Labs, A.I.E.



ΠΕΡΙΛΗΨΗ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ: Η πρόωπη διάγνωση του καρκίνου επιτρέπει την έγκαιρη ιατρική παρέμβαση, βελτιώνοντας σημαντικά τις πιθανότητες επιβίωσης και ποιότητα ζωής των ασθενών. Οι βιοδείκτες βοηθούν στη διάγνωση και παρακολούθηση της εξέλιξης της νόσου. Η βασική έρευνα έχει αναδείξει χιλιάδες υποψήφιας βιοδείκτες για τον καρκίνο, από τους οποίους επιλέγονται ολόένα και περισσότεροι για εφαρμογή στην κλινική πράξη. Η πρωτογενής εστία του καρκίνου είναι συχνά ελάχιστα και δυσπρόσιτα υλικά, στο οποίο εφαρμόζονται αναλύσεις για την καθοδήγηση των θεραπευτικών επιλογών.

ΜΕΘΟΔΟΙ: Σε 25-40 mg DNA/RNA από πρωτοπαθείς και δευτεροπαθείς εκτός συμπυκνωθέντες όγκους εφαρμόστηκε η μέθοδος TruSight Oncology 500 σε πλατφόρμα Illumina NextSeq 500, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Τα δεδομένα αλληλούχησης νέας γενιάς επεξεργάστηκαν στην επικυρωμένη πλατφόρμα PierianDx και τα αποτελέσματα συσχετίστηκαν με την κλινική έκβαση των ασθενών.

ΣΚΟΠΟΣ: Η εφαρμογή ολοκληρωμένης γενετικής ανάλυσης του όγκου για όλους τους γνωστούς και αναδυόμενους βιοδείκτες του καρκίνου με μία εξέταση.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ: Από τα 25 κλινικά δείγματα που αναλύθηκαν, 11 εξετάστηκαν μόνο σε επίπεδο DNA για μονονουκλεοτιδικές παραλλαγές (SNVs), μικρού μεγέθους ελλείψεις και προσθήκες (In/Dels), παραλλαγές αριθμού αντιγράφων (CNVs), παραλλαγές υφίστασης του RNA, μικροδομορφική αστάθεια (MSI), συνολικό φορτίο μεταλλάξεων (TMB) και 14 σε επίπεδο DNA και RNA για συντήξεις γονιδίων (fusions). Ανιχνεύθηκαν συνολικά 130 παραλλαγές σε γνωστά γονίδια-βιοδείκτες κλινικής σημασίας για θεραπευτική καθοδήγηση και 173 παραλλαγές σε νέα γονίδια αγνώστου κλινικής σημασίας την παρούσα στιγμή.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ: Η εφαρμογή της πλέον ολοκληρωμένης ανάλυσης του γενετικού προφίλ συσταμένων όγκων, με τη μέθοδο TruSight Oncology 500, σε υλικά από πρωτοπαθείς και μεταστατικές εστίες διαφορετικών τύπων καρκίνων, προσφέρει ολιστική προσέγγιση στην ανίχνευση γνωστών και νέων γενετικών παραλλαγών. Αποτελεί την ορθολογικότερη διαχείριση του πολύτιμου και αυθημερόν ελάττου καρκινικού βιοψιακού υλικού, προσφέροντας όλες τις δυνατές πληροφορίες για υπέρβαση αλλά και για μελλοντικούς διαγνωστικούς, προβλεπτικούς και προγνωστικούς βιοδείκτες, που θα αποτελέσουν πυλώνα για τον κλινικό ογκολόγο στη βέλτιστη διαχείριση του ασθενούς.

ΕΠΙΚΟΙΝΩΝΙΑ

Παντελεήμων Κωνσταντουλάκης, PhD
Genotypos Science Labs A.I.E
Email: rconstantoulakis@genotypos.gr
Phone: +30 210 7770870
Website: www.genotypos.gr

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η πρόωπη διάγνωση του καρκίνου επιτρέπει την έγκαιρη ιατρική παρέμβαση, βελτιώνοντας σημαντικά τις πιθανότητες επιβίωσης και ποιότητα ζωής των ογκολογικών ασθενών. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιείται πλήθος βιοδεικτών με τεκμηριωμένη κλινική χρησιμότητα τόσο στη διάγνωση όσο στην επιλογή τη βέλτιστης θεραπευτικής στρατηγικής και παρακολούθηση της πορείας της νόσου. Διαρκώς αξιολογούνται νέοι βιοδείκτες ως αναδυόμενοι και τα τελευταία χρόνια προεξέχουσα θέση μεταξύ αυτών έχουν οι γενετικοί/γενωμικοί βιοδείκτες. Στην ομάδα αυτή είναι μεταλλάξεις σε γονίδια με ρόλο στην καρκινογένεση, η μικροδομορφική αστάθεια (Microsatellite Instability, MSI) και το συνολικό φορτίο μεταλλάξεων στο γενετικό υλικό του όγκου (Tumor Mutational Burden, TMB).

Η επιλογή της κατάλληλης μεθόδου, για τον προσδιορισμό και την αξιολόγηση των γενετικών βιοδεικτών, είναι υψίστης σημασίας. Επιπλέον, η περιοριστική ποσότητα του καρκινικού ιστού, η ποιότητα του παρασκευάσματος και η ανάγκη για αποτελέσματα σε σύντομο χρόνο καθιστούν τις μεμονωμένες προσεγγίσεις με παλιές μεθοδολογίες λιγότερο αποτελεσματικές. Η επιλογή μιας αξιόπιστης μεθόδου, η οποία θα μπορεί να προσδιορίζει πολλαπλούς γενετικούς βιοδείκτες, από ελάχιστη ποσότητα ιστού και σε εύλογο χρόνο είναι από τα κείρα, σύγχρονα ζητούμενα στην ογκολογία.

ΜΕΘΟΔΟΙ

Σε 25 δείγματα μονιμοποιημένων ιστών, εγκλεισμένων σε παραφίνη (FFPE) προσδιορίστηκε η καρκινική περιοχή και το ποσοστό των καρκινικών κυττάρων, κατόπιν ιστολογικής διερεύνησης. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε απομόνωση DNA/RNA από 5 τμήμα των 5µm (QIAGEN AllPrep DNA/RNA FFPE kit, QIAGEN). Ακολούθησε κατασκευή βιβλιοθηκών με περιοχές-στόχους σε 523 γονίδια και 55 υβριδικά γονίδια (fusion genes), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (TruSight™ Oncology 500, Illumina), οι οποίες αλληλούχησης σε NextSeq500 (Illumina). Η βιοπληροφορική ανάλυση των δεδομένων αλληλούχησης έγινε με πιστοποιημένους αλγόριθμους (BaseSpace, Illumina και Clinical Genomics Workspace, PierianDx).

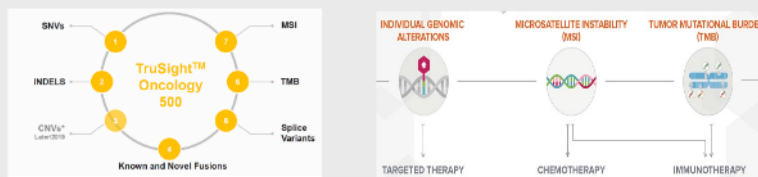
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στα 25 περιστατικά που αναλύθηκαν καλύφθηκε το 98,9% των εξωνίων 523 γονιδίων, ενώ ο μέσος όρος κάλυψης των περιοχών-στόχων ήταν 94,17% σε 100X. Σε επίπεδο RNA, οι περιοχές-στόχοι καλύφθηκαν κατά μέσο όρο 5.445X. Ανιχνεύθηκαν συνολικά 300 παραλλαγές (SNVs, In/Dels, CNVs, splice site). Η αξιολόγησή τους, προκειμένου να ταξινομηθούν ως παθόνες ή ως κλινικά χρήσιμες στα πλαίσια της φαρμακογενωμικής, έγινε με βάση τις πληροφορίες που είναι καταχωρημένες σε ειδικές βάσεις δεδομένων και οι οποίες είναι ενσωματωμένες στους αλγόριθμους προ-ταξινόμησης της πλατφόρμας ανάλυσης Clinical Genomics Workspace (CGW, PierianDx). Η ίδια πλατφόρμα ανάλυσης χαρακτηρίζει τη μικροδομορφική αστάθεια και προσδιορίζει το ποσοστό των μεταλλάξεων σε μήκος καρκινικού DNA 1Mb (TMB). Ιδιαίτερα για το TMB, καθορίστηκε ως όριο >10% μεταλλάξεις/Mb, παρ' ότι αποτελεί ακόμα αναδυόμενο βιοδείκτη και αναμένονται δεδομένα από μελέτες προκειμένου να προσδιοριστεί καλύτερα το όριο συναρτήσης της κλινικής του χρησιμότητας. Από τα 25 δείγματα τα 14 αναλύθηκαν και σε επίπεδο RNA, στα οποία αναζητήθηκαν προϊόντα γονιδιακής σύντηξης. Τα αποτελέσματα συνοψίζονται στον πίνακα 1.

Πίνακας 1. Σύνοψη ευρημάτων.

Είδος ευρήματος (Παθόνες/Πιθανά παθόνες παραλλαγές)	SNVs	In/Dels	CNVs	Splice variants	Gene fusions	MSI	TMB
Τεκμηριωμένης συσχέτισης γονίδια	88	9	7	14	12	✓	✓
"Άγνωστης" συσχέτισης γονίδια	124	7	11	13	15	✓	✓

Οι γενωμικοί βιοδείκτες του καρκίνου



ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Το ολοκληρωμένο γενωμικό προφίλ του όγκου με TruSight™ Oncology 500 είναι μια μέθοδος επιλογής, η οποία προσφέρει τη μέγιστη πληροφορία, σε πολύ μικρότερο χρόνο σε σχέση με άλλες μεθόδους, συμβάλλοντας σημαντικά στην λήψη έγκαιρων αποφάσεων για την ορθότερη και αποτελεσματικότερη διαχείριση της υγείας του ογκολογικού ασθενούς.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Από τις 300 συνολικά παραλλαγές που ανιχνεύθηκαν, οι 130 αφορούν παραλλαγές σε γονίδια με τεκμηριωμένο ρόλο στην καρκινογένεση ή αποτελούν γνωστούς, ισχυρούς φαρμακογενωμικούς βιοδείκτες. Ως εκ τούτου, η ανίχνευση αυτών των παραλλαγών επέτρεψε τη διάγνωση της νόσου σε 19 περιπτώσεις ενώ για 6 ασθενείς η πληροφορία συνέβαλε καθοριστικά στην επιλογή θεραπευτικής στρατηγικής. Για καθέναν από τους «γνωστούς» φαρμακογενωμικούς βιοδείκτες είναι διαθέσιμη η τρέχουσα πληροφορία για ανταπόκριση σε συγκεκριμένη φαρμακευτική αγωγή και η δυνατότητα ένταξης σε κλινικές δοκιμές.

Ο χαρακτηρισμός της μικροδομορφικής αστάθειας, πέραν της επιλογής της βέλτιστης θεραπευτικής προσέγγισης, επέτρεψε τον προσδιορισμό των περιπτώσεων με αυξημένο κίνδυνο για κληρονομούμενο καρκίνο (π.χ. σύνδρομο Lynch σε περιστατικά καρκίνου του παχέος εντέρου) και την δυνατότητα εντοπισμού επιπλέον μελών της οικογένειας με αυξημένο κίνδυνο.

Ο προσδιορισμός του συνολικού φορτίου μεταλλάξεων (TMB) αποτέλεσε χρήσιμη πληροφορία, παρ' ότι επί του παρόντος είναι αναδυόμενος βιοδείκτης. Τα πλεονεκτήματα της μεθόδου που εφαρμόσαμε, έναντι άλλων εναλλακτικών για τον προσδιορισμό του TMB, είναι η μονάδα μήκους DNA που χρησιμοποιήθηκε ως αναφορά (1Mb) και η δυνατότητα του αλγόριθμου να διαχωρίζει τις παραλλαγές στα καρκινικά κύτταρα έναντι αυτών σε φυσιολογικά (germline). Παρ' ότι δεν ήταν άμεσα αξιοποιήσιμη πληροφορία, λήφθηκε υπόψη συναρτήσει της θεραπευτικής προσέγγισης και έκβασης προκειμένου να αξιολογηθεί η χρησιμότητά του ως δείκτης.

Ένα σημαντικό συγκριτικό πλεονέκτημα της μεθόδου είναι η μικρή ποσότητα αρχικού υλικού που απαιτείται προκειμένου να αποκτηθεί η συνολική πληροφορία. Είναι γνωστό ότι σε πολλούς τύπους καρκίνου, όπως αυτός του πνεύμονα, ο διαθέσιμος ιστός προς μελέτη είναι ιδιαίτερα περιορισμένος. Εφαρμόζοντας μία μόνο μέθοδο, με την οποία μπορεί κανείς να ανιχνεύσει ταυτόχρονα όλους αυτούς τους τύπους παραλλαγών, καθίσταται εφικτή η πληρέστερη γενωμική διερεύνηση του όγκου διαφυλάσσοντας τη διαθεσιμότητα του υλικού για περαιτέρω αναλύσεις. Ταυτόχρονα, η συγκεκριμένη ολιστική ανάλυση παρέχει πληροφορίες που είναι πιθανό να ωφελήσουν το ασθενή σε μελλοντική αναζήτηση θεραπευτικών επιλογών, όταν πληροφορίες για νέα βιολογικά μονοπάτια και περισσότερες μεθόδους παρέμβασης γίνουν γνωστές από την έρευνα.