

# Akciğer Kanserinde Sıvı (Likit) Biyopsinin Yeri

## Liquid Biopsy in Lung Cancer

Dr. Pınar AKIN KABALAK, Dr. Ükü YILMAZ

SBÜ Atatürk Göğüs Hastalıkları ve Cerrahisi Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Ankara

### ÖZET

Son yıllarda hedefe yönelik tedaviler ve immün hedefli tedavi yaklaşımları ile ileri evre akciğer kanserli hasta tedavisinde önemli gelişmeler yaşanmıştır. Tümör heterojenitesi ve klonal değişim nedeniyle hemen hemen tüm tümörler sistemik tedavi sırasında tedaviye direnç geliştirmektedir. Bu sorunun çözümü için ayrıca hastalığın erken tanısı ve izlemine yönelik olarak kanda genetik belirteçlerin değerlendirilmesi temeline dayanan likit biyopsi, gittikçe daha popüler olmaktadır. Dolaşımdaki serbest tümör DNA'sı tümör genomunu temsil edebildiğinden, likit biyopsi tümörün genetik izleminde yardımcı olabilir.

**Anahtar Kelimeler:** Akciğer kanseri, biyopsi, tanı, mutasyon.

### SUMMARY

Targeted therapies and immune checkpoint inhibitors have markedly improved the therapeutic management of advanced lung cancer through last years. However, almost all tumorigenic cells acquire resistance to systemic treatment as a result of tumor heterogeneity and clonal evolution. To overcome these issues and their clinical use for early diagnosis and prognosis, blood-based tests or so-called "liquid biopsies" are gaining popularity. Because the cell-free circulating tumor DNA (ctDNA) is represent entire tumor genom, the use of ctDNA as a liquid biopsy tool may help to obtain genetic follow-up data.

**Keywords:** Lung cancer, biopsy, diagnosis, mutation.

### Yazışma Adresi / Address for Correspondence

Uzm. Dr. Pınar AKIN KABALAK  
SBÜ Atatürk Göğüs Hastalıkları ve Cerrahisi Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Ankara  
e-posta: pinarakinn@gmail.com  
DOI: 10.5152/gghs.2018.036

## GİRİŞ

Akciğer kanseri kansere bağlı ölümlerin önde gelen nedenidir<sup>(1)</sup>. Tüm akciğer kanserlerinin yaklaşık olarak %85'i küçük hücreli dışı akciğer kanseridir (KHDAK). Akciğer kanserinin yüksek mortalitesi, saldırgan tümör biyolojisine ve hastaların çok büyük bir bölümünün lokal ileri ve ileri evrelerde tanı almalarına bağlıdır. Küçük hücre dışı akciğer kanserli hastaların küçük bir bölümü lokalize, erken evrede tanı almaktadır ve hastalığın seçkin küratif tedavi yaklaşımı cerrahi rezeksiyondur. Optimal cerrahi yaklaşıma rağmen beş yıllık sağ kalım evre IA için %90, evre II için %60 olarak bildirilmektedir<sup>(2,3)</sup>. Erken evre akciğer kanseri nedeniyle opere olan hastalarda beş yıl içerisinde gelişen nüksler genellikle sistemik olmakta ve bu durum hastalığın başlangıçta sistemik yayımı olduğunu düşündürmektedir. Günümüzde hastalığın erken tanısına yönelik pek çok çalışma devam etmektedir. Bu çalışmalar ağırlıklı olarak yüksek riskli hastalarda görüntüleme teknikleri ile hastaların taranması temelindedir. Taramanın akciğer kanser mortalitesini azalttığı ortaya konduktan sonra tarama çalışmaları hız kazandı ve rehberlerde yer almaya başladı<sup>(4,5)</sup>. Tarama çalışmaları erken tanı ile ilgili önemli bir adım olmakla birlikte bu yöntemle ilgili olarak çözülmesi gereken bir takım problemler söz konusudur. Bu problemlerin başında; yanlış pozitif sonuçlar elde edilmesi gelmektedir. Radyasyon maruziyeti ve fazla tanı konması (overdiagnosis) da diğer problemlerdir<sup>(6)</sup>. Bu nedenle akciğer kanserinin erken tanısında radyolojik yöntemlerin tamamlayıcısı veya bu yöntemlere alternatif, daha spesifik, invaziv olmayan biyolojik belirteçlere gereksinim vardır. Bu amaçla dolaşımdaki biyolojik belirteçler akciğer kanser taramasında ve erken tanısında ilgi çekici bir yöntem olmuştur.

Tanı sırasında tümör dokusunun moleküler profilinin çıkarılması, hedeflenebilir mutasyonların tespit edilmesi ileri evre küçük hücreli dışı akciğer kanseri tedavi kararının belirlenmesinde standart yaklaşım olarak rehberlerde yerini almıştır<sup>(7,8)</sup>. Son yıllarda yeni biyolojik belirteçlerin bulunması anlamında çok sayıda gelişme yaşanmıştır. Sözü geçen biyolojik belirteçler: Epidermal büyüme faktör reseptörü (Epidermal Growth Factor Receptor: EGFR), anaplastik lenfoma kinaz translokasyonu (anaplastic lymphoma kinase: ALK translocation), ROS 1 translokasyonu, BRAF mutasyonu, MET amplifikasyonudur<sup>(9)</sup>. Hedeflenebilir mutasyonlar son yıllarda kanser tedavisinde kökten değişimlere neden olmuştur, ancak bu tedaviler beraberinde yeni sorun ve konuları da beraberinde

de getirmiştir. Bu sorunlar; tümör heterojenitesi ve bunun belirlenmesi, klonal değişim, biyopsi yöntemlerinin potansiyel morbiditesi ve uygulanabilirliği, tespit edilen genetik değişikliğe yönelik ilaca erişim sorunları ve etkin ilaçların olmamasıdır<sup>(10)</sup>. En önemli biyolojik konu; tümör heterojenitesidir. Tedavi altındaki tüm tümörler, tümör heterojenitesi, klonal değişim ve seleksiyon nedeniyle mevcut tedaviye direnç geliştirir. Çoğunlukla yeni tedavi kararı tümörün yeni genetik kompozisyonu değerlendirilmeksizin verilmektedir, kimi zaman da biyopsi için tümöre erişim güç olmaktadır. İşte tüm bu sorunların çözümüne yönelik olarak yapılan çalışmalar sonucunda, akciğer kanserinin erken tanısında, tümörün tedaviye yanıtını ve tedavi direncini belirlemek üzere, rezidüel hastalığın tespitinde kan, serum ve plazma örneklerinde tümör ve tümör ürünlerinin tespiti temeline dayanan likit (sıvı) biyopsi kavramı ortaya atılmıştır.

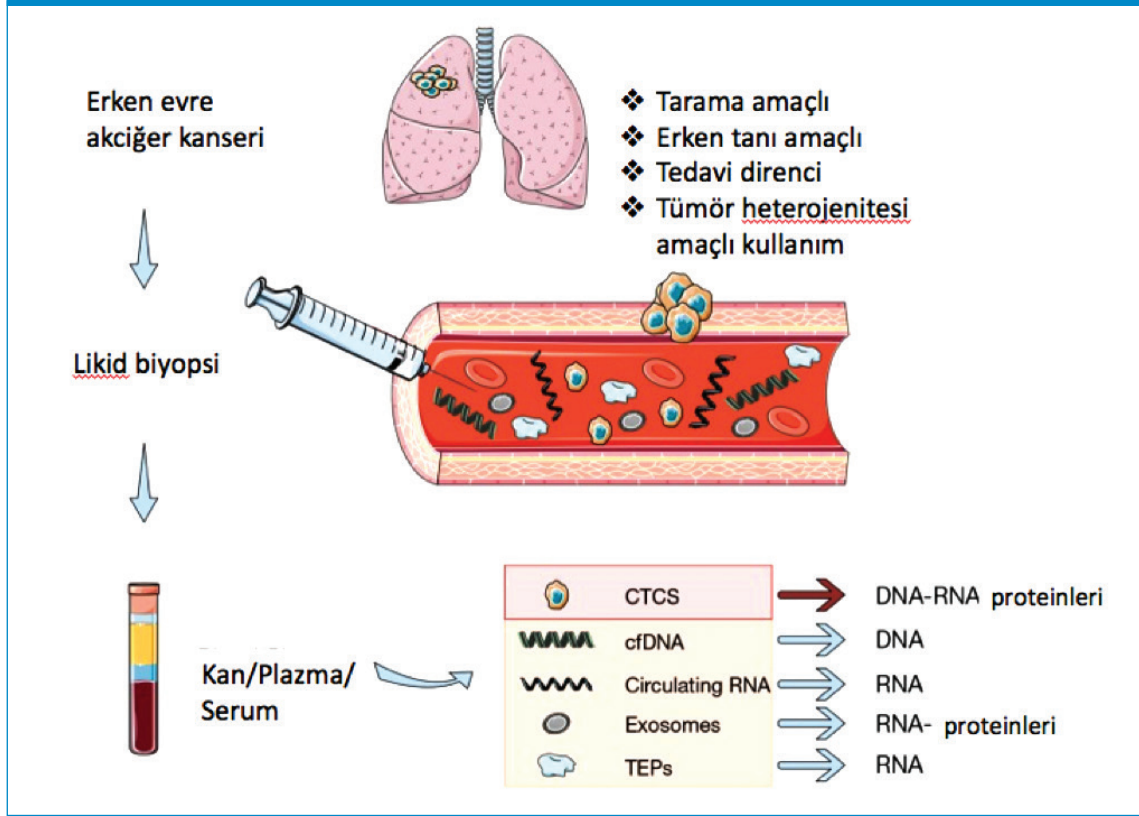
Günümüzde artık kullanımı gittikçe yaygınlaşan likit biyopsiler ile tümör kaynaklı bir ürün dolaşımdaki tümör hücresi (CTCs), egzozom, dolaşımdaki tümör DNA (ctDNA) ya da RNA'sı (ctRNA) ya da tümör eğitilmiş trombositler (tumor educated platelets: TEPs) basit bir kan örneğinden tespit edilebilmektedir (Şekil 1)<sup>(8,11,12)</sup>.

Egzozomlar; kanser hücresi dahil bir çok hücre tarafından ekstrasellüler ortama salınan 40-100 nm boyutunda ekstrasellüler veziküllerdir. Egzozomlar DNA, mRNA ve miRNA özelliğinde nükleik asit içermekte, hücre-hücre iletişiminin sağlanmasında anahtar rol üstlenmektedir. Bu yapılar tümör büyümesi, progresyonu, ilaç direnci ve metastatik niş hazırlığı gibi tümör biyolojisi ile ilgili bir çok konuda anahtar rolüdür<sup>(13)</sup>.

Trombositler tümör hücreleri ile etkileşerek, tümör büyümesi, invazyon ve uzak metastaz gelişiminde etkin rol oynamaktadır. Plateletler dolaşımdaki mRNA'yı içlerine alabilmektedir. Bu aşamadan sonra farklı yüzey reseptörleri geliştirmekte ve kendi pre-RNA larını üreten trombositler kanser tanısında kullanılabilir<sup>(14)</sup>.

Dolaşımdaki tümör hücresi ve ctDNA likit biyopsilerde en sık analiz edilen ve yüksek spesifiteye sahip komponentlerdir. İlk olarak 1989'da tanımlanan CTCs, dolaşımda tek tek hücreler şeklinde olduğu gibi mikrobomboli (CTM) olarak da saptanabilmektedir ve bu embolilerin varlığı akciğer kanserinde kötü prognozla ilişkilidir<sup>(15)</sup>. Dolaşımdaki tümör DNA'sı tümörün tüm genetik özelliklerini temsil etmekte ve tümör spesifik genetik ve epigenetik değişikliklerin

Şekil 1. Likit biyopside değerlendirilebilen tümör kaynaklı ürünler.



analizine olanak sağlamaktadır<sup>(8)</sup>. Kanserli bireylerde, sağlıklı bireylere göre daha fazla serbest DNA olduğunu ve metastatik hastalarda metastatik olmayan hastalara göre daha yüksek düzeylerde bulunduğunu bildiren başlangıç yayınlardan sonra<sup>(16)</sup> yapılan çalışmalarda, hastalık yükü ve tümör evresi ile ilişkili olduğu ortaya konmuştur<sup>(17)</sup>. Tümör DNA'sının kana nasıl geçtiği tam olarak ortaya konmamış olmakla beraber başlıca apoptotik ve nekrotik hücrelerden kaynaklandığı düşünülmektedir<sup>(18)</sup>. Nekrotik neoplastik hücrelerin fagositozu yoluyla makrofajlar tümör DNA fragmanlarının kana salınımında önemli role sahiptir<sup>(19)</sup>. Günümüzde dolaşımdaki tümör DNA'sını tespit etmeye yönelik oldukça duyarlı testler mevcuttur. Bu testlerin temeli polimeraz zincir reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction: PCR) ve yeni nesil sıralama (Next-Generation Sequencing: NGS) teknolojisidir<sup>(8)</sup>.

Tarama amaçlı dolaşımdaki DNA'nın değerlendirildiği bir çalışmada, küçük hücreli akciğer kanseri ve kanser olmayan hasta grubunda TP53 mutasyonu değerlendirilmiş, 225 kanser olmayan grubun %11'inde TP53 mutasyonu tespit edilmiştir<sup>(20)</sup>. Sonuçta tarama için geliştirilmesi gereken bir yöntem olduğu vurgulanmıştır.

Amerikan Klinik Onkoloji Derneği (American Society of Clinical Oncology: ASCO) ve Amerikan Patologlar Koleji (College of American Pathologists: CAP) tarafından kanserli hastalarda ctDNA konusunda varılan ortak görüş doğrultusunda, ileri evre kanserde ctDNA testlerinin çoğunun kullanımını destekleyecek yeterli kanıtın bulunmadığı sonucuna varılmıştır. Ayrıca, tedavi sonrası periyodik ctDNA takibi, rezidüel hastalığın saptanması ve tedavi yanıtının değerlendirilmesinde sıvı biyopsisi kılavuzlara girecek kanıt düzeyine sahip değildir<sup>(21)</sup>.

Her ne kadar her iki yöntemin prognoz, metastaz ve progresyon açısından anlamlılığını gösteren yayınlar olsa da klinik pratiğimiz için sıvı biyopsilerin kullanımındaki en önemli nokta hedeflenebilir mutasyon varlığının ve hedefe yönelik tedavilere direnç gelişiminin güvenilir ve kolay bir biçimde saptanabilmesidir. Calabuig-Fariñas ve arkadaşlarına ait derlemede CTCs için tümöre ait tüm hücrelerin incelenemesi, genotiplendirmede hem in-vivo hem ex-vivo başarısının yüksek olması avantajları belirtilirken, ctDNA'nın kanserin erken dönemlerinden itibaren dolaşıma salınması ve daha sensitif olması nedeni ile mutasyon ve DNA metilasyon değişikliklerini saptamada tercih edilecek materyal olarak vurgulanmıştır<sup>(22)</sup>.

Çok merkezli, randomize, faz III ENSURE çalışması verilerine dayanarak, ilk defa 1 Haziran 2016'da FDA tarafından, plazma örnekleri kullanılarak EGFR egzon 19 delesyonu veya egzon 21 değişimi için cobas EGFR mutasyon test (v2) onaylanmıştır<sup>(23,24)</sup>. Onaylanan ilk sıvı biyopsi testi olan bu yöntem ile ctDNA kullanılarak dört saatten az sürede mutasyonların tespiti yapılabilmektedir. Artık günümüzde sıvı biyopsi incelemeleri, KRAS, BRAF, EGFR ve T790Ms mutasyonlarının saptanmasında torasik onkoloji bölümlerinin önemli bir tanı yöntemi haline gelmektedir. Sonuçların negatif çıkması durumunda altın standart olarak patoloji preparatından yeniden analiz önerilmektedir<sup>(23,25)</sup>.

Tümör heterojenitesinin önemli bir göstergesi olarak bazı olgularda biyopsi örneğinde negatif saptanan EGFR mutasyonu sıvı biyopsi ile pozitif saptanabilmektedir<sup>(26)</sup>. Günümüzde rutin kullanımda kılavuzlarda yer almamakla beraber ctDNA düzeyleri ile tümör yükü arasında doğrusal bir ilişki mevcuttur. Küçük hücreli dışı akciğer kanseri tanılı 84 olgu ve 43 sağlıklı birey ile yapılan çalışmada ctDNA düzeylerinin kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu gösterilmiştir<sup>(27)</sup>. Yine hasta grubunda ctDNA düzeyinin operasyon sonrası anlamlı gerilediği, relaps olmayan olgularda düşük düzeyde seyrettiği ancak nüks görülen olgularda 20 kata kadar yükselebildiği gösterilmiştir<sup>(28)</sup>.

Sıvı biyopsinin iki önemli kısıtlamasından bahsedebiliriz. Birincisi duyarlılığının %60-80 arasında değişkenlik göstermesi nedeni ile hala doku biyopsisinin yerini tutmamaktadır<sup>(29)</sup>. İkincisi bir kısıtlama ise, tümörlerin dolaşımında bırakabileceği küçük ve değişken DNA miktarları göz önüne alındığında, mevcut çalışma türlerinin geleneksel biyopsi ile karşılaştırıldığında yanlış negatif olma olasılığının daha yüksek olmasıdır. Ayrıca, immünoterapi başlama kararını vermede ve bu tedavilere yanıtın bir göstergesi olan PD-L1 düzeyinin sıvı biyopsi yöntemleri ile çalışılması klinik pratikte uygulanmamaktadır. Ancak bu konuyla ilgili yapılan yakın tarihli ve ileri evre olguların alındığı çalışmalarda dolaşımdaki tümör hücreleri kullanılarak yapılan analizde PD-L1 düzeyinin doku biyopsisine göre daha yüksek oranda pozitif saptandığı görülmektedir<sup>(30,31)</sup>.

Sonuç olarak; doku örneğine ulaşılamayan ya da hasta kaynaklı nedenlerle (biyopsi reddi ya da performans durumunun uygun olmaması) elde edilemeyen olgularda, sıvı biyopsi yöntemi ile hedeflenebilir mutasyon varlığının incelenmesi daha az invazif ve hızlı

sonuçlanan alternatif bir metottur. Akciğer kanseri tedavisinde kişiye özgü tedavi modalitelerinin belirlenmesi ve tedavi sürecinin yönetiminde önemli bir yeri olan sıvı biyopsinin gerçek doku biyopsisinin yerine geçemeyeceği asla unutulmamalıdır.

#### KAYNAKLAR

1. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Global cancer statistics, 2017. *CA Cancer J Clin* 2017; 67: 7-30.
2. Kris MG, Gaspar LE, Chaft JE, et al. Adjuvant Systemic Therapy and Adjuvant Radiation Therapy for Stage I to IIIA Completely Resected Non-Small-Cell Lung Cancers: American Society of Clinical Oncology/Cancer Care Ontario Clinical Practice Guideline Update. *J Clin Oncol* 2017; 35: 2960-74.
3. Chansky K, Detterbeck FC, Nicholson AG, et al. The IASLC Lung Cancer Staging Project: external validation of the revision of the TNM stage groupings in the eighth edition of the TNM classification of lung cancer. *J Thorac Oncol* 2017; 12: 1109-21.
4. National Lung Screening Trial Research Team, Aberle DR, Adams AM, et al. Reduced lung-cancer mortality with low-dose computed tomographic screening. *N Engl J Med* 2011; 365: 395-409.
5. Mazzone PJ, Silvestri GA, Patel S, et al. Screening for Lung Cancer: CHEST Guideline and Expert Panel Report 2018; 153: 954-85.
6. Santarpia M, Liguori A, D'Aveni A, et al. Liquid biopsy for lung cancer early detection. *J Thorac Dis* 2018; 10 (Suppl 7): 882-97.
7. Hanna N, Johnson D, Temin S, et al. Systemic Therapy for Stage IV non-small-cell lung cancer: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline Update. *J Clin Oncol* 2017; 35: 3484-515.
8. Santarpia M, Altavilla G, Salazar ME, et al. Tyrosine kinase inhibitors for non-small-cell lung cancer: finding patients who will be responsive. *Expert Rev Respir Med* 2011; 5: 413-24.
9. Chadhuri AA, Chabun JJ, Lovejoy AF, et al. Early detection of molecular residual disease in localized lung cancer by circulating tumor DNA profiling. *Cancer Discov* 2017; 7: 1394-403.
10. Heitzer E, Ulz P, Geigl JB. Circulating tumor DNA as a liquid biopsy for cancer. *Clinical Chemistry* 2015; 61: 112-23.
11. Molina-Vila. Liquid biopsy in lung cancer: present and future. *Transl Lung Cancer Res* 2016; 5: 452-4.
12. Nilsson RJ, Balaj L, Hulleman E, et al. Blood platelets contain tumor-derived RNA biomarkers. *Blood* 2011; 118: 3680-3.
13. Weidle UH, Birzele F, Kollmorgen G, et al. The multiple roles of exosomes in metastasis. *Cancer Genomics Proteomics* 2017; 14: 1-15.
14. Joosse SA, Pantel K. Tumor-educated platelets as liquid biopsy in cancer patients. *Cancer Cell* 2015; 28: 552-4.
15. Hou JM, Krebs MG, Lancashire L, et al. Clinical significance and molecular characteristics of circulating tumor cells and circulating tumor microemboli in patients with small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2012; 30: 525-32.

16. 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: 646-50.
17. Sozzi G, Conte D, Leon M, et al. Quantification of free circulating DNA as a diagnostic marker in lung cancer. *J Clin Oncol* 2003; 21: 3902-8.
18. 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: 1659-65.
19. Choi JJ, Reich CF, Pisetsky DS. The role of macrophages in the in vitro generation of extracellular DNA from apoptotic and necrotic cells. *Immunology* 2005; 115: 55-62.
20. Fernandez-Cuesta L, Perdomo S, Avogbe PH, et al. Identification of Circulating Tumor DNA for the early detection of small-cell lung cancer. *EBioMedicine* 2016; 10: 117-23. [10.1016/j.ebiom.2016.06.032](https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2016.06.032)
21. Merker JD, Oxnard GR, Compton C, et al. Circulating Tumor DNA Analysis in Patients with Cancer: American Society of Clinical Oncology and College of American Pathologists Joint Review. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 2018 <https://doi.org/10.5858/arpa.2018-0901-SA>
22. Calabuig-Fariñas S, Jantus-Lewintre E, Herreros-Pomares A, Camps C. Circulating tumor cells versus circulating tumor DNA in lung cancer-which one will win? *Transl Lung Cancer Res* 2016; 5: 466-82.
23. cobas EGFR Mutation Test v2 Available online: <http://www.fda.gov/Drugs/InformationOnDrugs/ApprovedDrugs/ucm504540.htm> (accessed, 24.05.2018)
24. Wu YL, Zhou C, Liam CK, et al. First-line erlotinib versus gemcitabine/cisplatin in patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer: analyses from the phase III, randomized, open-label, ENSURE study. *Ann Oncol* 2015; 26: 1883-9.
25. Molina-Vila MA, Mayo-de-las-Casas C, Giménez-Capitán A, et al. Liquid biopsy in non-small cell lung cancer. *Frontiers in Medicine*. 2016; 3: 69.
26. Alegre E, Fusco JP, Restituto P, et al. Total and mutated EGFR quantification in cell-free DNA from non-small cell lung cancer patients detects tumor heterogeneity and presents prognostic value. *Tumour Biol* 2016; 37: 13687-94.
27. Sozzi G, Roz L, Conte D, et al. Plasma DNA quantification in lung cancer computed tomography screening: Five-year results of a prospective study. *Am J Respir Crit Care Med* 2009; 179: 69-74.
28. Sozzi G, Conte D, Mariani L, et al. Analysis of circulating tumor DNA in plasma at diagnosis and during follow-up of lung cancer patients. *Cancer Res*. 2001; 61: 4675-8.
29. Oxnard GR, Thress KS, Alden RS, et al. Association between plasma genotyping and outcomes of treatment with osimertinib (AZD9291) in advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2016; 34: 3375.
30. Kallergi G, Vetsika EK, Aggouraki D, et al. Evaluation of PD-L1/PD-1 on circulating tumor cells in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Ther Adv Med Oncol* 2018; 10: 1-11.
31. Guibert N, Delaunay M, Lusque A, et al. PD-L1 expression in circulating tumor cells of advanced non-small cell lung cancer patients treated with nivolumab. *Lung Cancer* 2018; 120: 108-12.