

A plazmában keringő szabad DNS jellemzői és diagnosztikai alkalmazási lehetőségei vastagbélrák esetén

Barták Barbara Kinga dr.¹ ■ Márkus Eszter dr.¹
 Kalmár Alexandra dr.^{1, 2} ■ Galamb Orsolya dr.^{1, 2}
 Szigeti Krisztina Andrea¹ ■ Nagy Zsófia Brigitta¹ ■ Zsigrai Sára dr.¹
 Tulassay Zsolt dr.^{1, 2} ■ Dank Magdolna dr.³
 Igaz Péter dr.^{1, 2} ■ Molnár Béla dr.^{1, 2}

¹Semmelweis Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, II. Belgyógyászati Klinika, Molekuláris Gasztroenterológia Laboratórium, Budapest

²Magyar Tudományos Akadémia, Molekuláris Medicina Kutatócsoport, Budapest

³Semmelweis Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, Onkológiai Központ, Budapest

A vastagbélrák (CRC) incidenciája és mortalitása is kiemelkedően magas a közép-európai országokban, hazánkban a második leggyakoribb daganattípus mind a férfiak, mind a nők körében. Az évente újonnan regisztrált betegek száma 10 000 köré tehető. Ezek az adatok jelzik, hogy szükséges olyan szűrőmódszerek kifejlesztése, amelyek a betegek számára kevésbé megterhelőek, ezáltal növelhető a vizsgálatokon történő részvétel. A vérben található, sejten kívüli szabad DNS (skDNS) szintje bizonyos fiziológiás állapotokban megnő, többek között terhesség vagy erőteljes fizikai aktivitás esetén. Az skDNS koncentrációja azonban egyes kórállapotokban, például autoimmun és gyulladásos megbetegedésekben, valamint különböző daganattípusokban, többek között vastagbélrákban is emelkedett értéket mutat. Az skDNS eredetére, funkciójára és hatásmechanizmusára vonatkozóan számos tanulmány található a szakirodalomban. Jelen összefoglaló közleményünk célja a szabad DNS mennyiségi és minőségi változásainak ismertetése, funkcióinak áttekintése, valamint diagnosztikus alkalmazási lehetőségeinek bemutatása a vastagbélrák korai észlelésének szempontjából. A szabad-DNS-molekulák többféle módon kerülhetnek a keringésbe, az apoptózis és nekrozis mellett az élő sejtek által történő direkt szekréció is lehetséges. Daganat kialakulása esetén az egészséges és a rákos sejtek egyaránt képesek DNS-t kibocsátani a perifériás vérbe, így a tumorsejtekben bekövetkező genetikai (például mutáció: *APC*, *KRAS*, *BRAF*) és epigenetikai (például DNS-metiláció: *SEPT9*, *SFRP1*) elváltozásokat a szabad-DNS-frakcióban is vizsgálhatjuk. Számos nagy átteresztőképességű, érzékeny és automatizált módszer is rendelkezésünkre áll, amelyek lehetőséget biztosítanak a minták standardizált feldolgozására, illetve a markerek kvantitatív elemzésére. Ezek a fejlesztések segíthetnek különböző alternatív szűrési módszerek kialakításában, amelyek a klinikai gyakorlatba is könnyedén beépíthetők, így hozzájárulhatnak a betegségek mielőbbi diagnosztizálásához. *Orv Hetil.* 2019; 160(30): 1167–1177.

Kulcsszavak: sejten kívüli DNS, plazma, vastagbélrák, DNS-metiláció, mutáció

Characteristics and diagnostic applications of circulating cell-free DNA in colorectal cancer

The incidence and mortality of colorectal cancer (CRC) are considerably high in Central European countries, it is the second most common cancer in both men and women in Hungary with 10,000 newly registered patients per year. These data indicate the necessity of new screening methods that are more comfortable for patients, hence the compliance can be increased. Cell-free DNA (cfDNA) level in blood is elevated in certain physiological conditions, such as pregnancy or high physical activity. Furthermore, cfDNA concentration alterations can also be detected in some pathological processes; increased cfDNA amount was observed in autoimmune and inflammatory diseases, as well as in various cancers including CRC. Numerous studies about origin, function, and mechanism of cfDNA can be found in the scientific literature. In this review, we aimed to describe the quantitative and qualitative changes of cfDNA, to

A Szerkesztőség felkérésére készített tanulmány.

present its functions, and to provide an overview of the available diagnostic applications for CRC. CfDNA can be released to the circulatory system *via* apoptosis, necrosis or by direct secretions by living cells. In cancer patients, cfDNA can originate from healthy and cancer cells, hence genetic (*e.g.* mutations in *APC*, *KRAS*, *BRAF*) and epigenetic (*e.g.* methylation in *SEPT9*, *SFRP1*) alterations of tumor cells can be examined in cfDNA fraction. Several high-throughput, sensitive and even automated methods are available providing opportunity to perform standardized sample preparation and to analyse biomarker candidates quantitatively. These enhancements can help to develop alternative screening methods that can be easily integrated into the clinical practice and can contribute to early cancer detection.

Keywords: cell-free DNA, plasma, colorectal cancer, DNA methylation, mutation

Barták BK, Márkus E, Kalmár A, Galamb O, Szigeti KA, Nagy ZsB, Zsigrai S, Tulassay Zs, Dank M, Igaz P, Molnár B. [Characteristics and diagnostic applications of circulating cell-free DNA in colorectal cancer]. *Orv Hetil.* 2019; 160(30): 1167–1177.

(Beérkezett: 2019. március 19.; elfogadva: 2019. április 17.)

Rövidítések

AD = adenoma; *ALX4* = Aristaless-like homeobox-4 gén; *APC* = adenomatous polyposis coli gén; *BCAT1* = (branched chain amino acid transaminase 1) elágazó láncú aminosav-transzamináz-1; BE = bystandereffektus; *BRAF* = (rapidly accelerated fibrosarcoma B) B-Raf protoonkogén; CpG = (cytosine-phosphate-guanine) citozin-foszfát-guanin dinukleotid; CRC = (colorectal cancer) vastagbélrák; DAPK1 = (death associated protein kinase 1) halálasszociált proteinkináz-1; DNáz = deoxiribonukleáz; DHPLC = (denaturing high-performance liquid chromatography) denaturáló nagy hatékonyságú folyadékkromatográfia; DNS = deoxiribonukleinsav; E-cad = E-kadherin; ELISA = (enzyme-linked immunosorbent assay) enzimhez kapcsolt immunszorbensteszt; FDA = (Food and Drug Administration) az Egyesült Államok Élelmiszer és Gyógyszer-ellenőrzési Hivatala; FHIT = (fragile histidine triad protein) fragilis hisztidintriád-fehérje; FIT = (fecal immunochemical test) immunalapú széletvér-vizsgálat; HELPP-szindróma = (hemolysis, elevated liver enzymes, low platelet count) hemolízissel, emelkedett májenzimértékekkel és alacsony vérlemezkeszámmal járó szindróma; HUVEC = (human umbilical vein endothelial cells) humán köldökvéna-endothelisejtek; *IKZF1* = (IKAROS family zinc finger 1) IKAROS-család cinkujj-1 gén; *KRAS* = (Kirsten rat sarcoma oncogene) Kirsten-patkány-sarcoma vírusos onkogén; MeDIP = (methylated DNA immunoprecipitation) metilált-DNS-immunprecipitáció; MetCap = methyl capture szekvenálás; MPO = mieloperoxidáz enzim; NET = (neutrophil extracellular trap) neutrophil extracelluláris csapda; NGS = (next generation sequencing) új generációs szekvenálás; NPY = neuropeptid Y; *NRAS* = neuroblastoma RAS onkogén; PCR = (polymerase chain reaction) polimeráz-láncreakció; PENK = proenkefalin; PNA-PCR = (peptide nucleic acid-polymerase chain reaction) peptid-nukleinsav polimeráz-láncreakció; *PRIMA1* = (proline rich membrane anchor 1) prolingazdag membránhorgony-1; RNáz = ribonukleáz; RT-PCR = (real-time polymerase chain reaction) valós idejű polimeráz-láncreakció; SDC2 = szindekán-2; *SEPT9* = septin-9; *SFRP1* = (secreted frizzled related protein 1) szekretált frizzled-rokon fehérje-1; *SFRP2* = (secreted frizzled related protein 2) szekretált frizzled-rokon fehérje-2; skDNS = sejten kívüli DNS; SLE = (systemic lupus erythematosus) szisztémás lupus erythematosus; *SMAD4* = a *SMAD*-család 4. tagja; SSCP = (single strand conformation polymorphism) egyszálú konfor-

mációs polimorfizmus; TP53 = tumorprotein-53; TRX = (total body resistance exercise) teljes testtel végzett ellenállásos edzés; WIF1 = WNT-gátló faktor-1

A modern orvostudomány számára egyre inkább szükségessé válik olyan diagnosztikai módszerek fejlesztése és alkalmazása, amelyek a lehető legkisebb traumát okozzák a pácienseknek, mégis a legtöbb információhoz juttatják az orvost. A daganatos megbetegedések incidenciájának és mortalitásának növekedése, továbbá a gyulladással járó kórfolyamatok gyakori előfordulása egyaránt felhívja a figyelmet a patológiai állapotok időben történő felismerésének jelentőségére. Számos kutatás irányul olyan biomarkerek azonosítására, amelyek minimálisan invazív beavatkozásokkal, megfelelő érzékenységgel és az adott elváltozásra specifikusan jelzik a kórfolyamat előrehaladottságának fokát. Napjainkban kerültek előtérbe az úgynevezett „folyadékbiopszia” (liquid biopsy), ezen belül is a véralapú szűrési technikák. Ezek az eljárások a véráramban keringő szabad nukleinsavak elemzését tűzik ki célul. Jelen közlemény a sejten kívüli DNS (skDNS) mennyiségi és minőségi jellemzőit, funkcióit és a vastagbél-daganatok diagnosztizálásában és szűrésében rejlő lehetőségeit foglalja össze.

A keringő szabad DNS felfedezése

Mandel és Métais voltak az elsők, akiknek sikerült keringő szabad nukleinsavakat azonosítaniuk 1948-ban [1]. Megfigyelték, hogy egészséges és különböző betegségekben szenvedő emberekben extracellulárisan is található nukleinsavak a vérben. Később szisztémás lupus erythematosusban (SLE) szenvedő páciensek vérében DNS ellen termelődő ellenanyagokat detektáltak, valamint *Tan és mtsai* a betegek szabadon keringő DNS-ében abnormális mintázatot figyeltek meg [2]. További kísérletek során 1977-ben *Leon és mtsai* szabad, sejten kívüli DNS-t (skDNS) mutattak ki tüdő-daganatos bete-

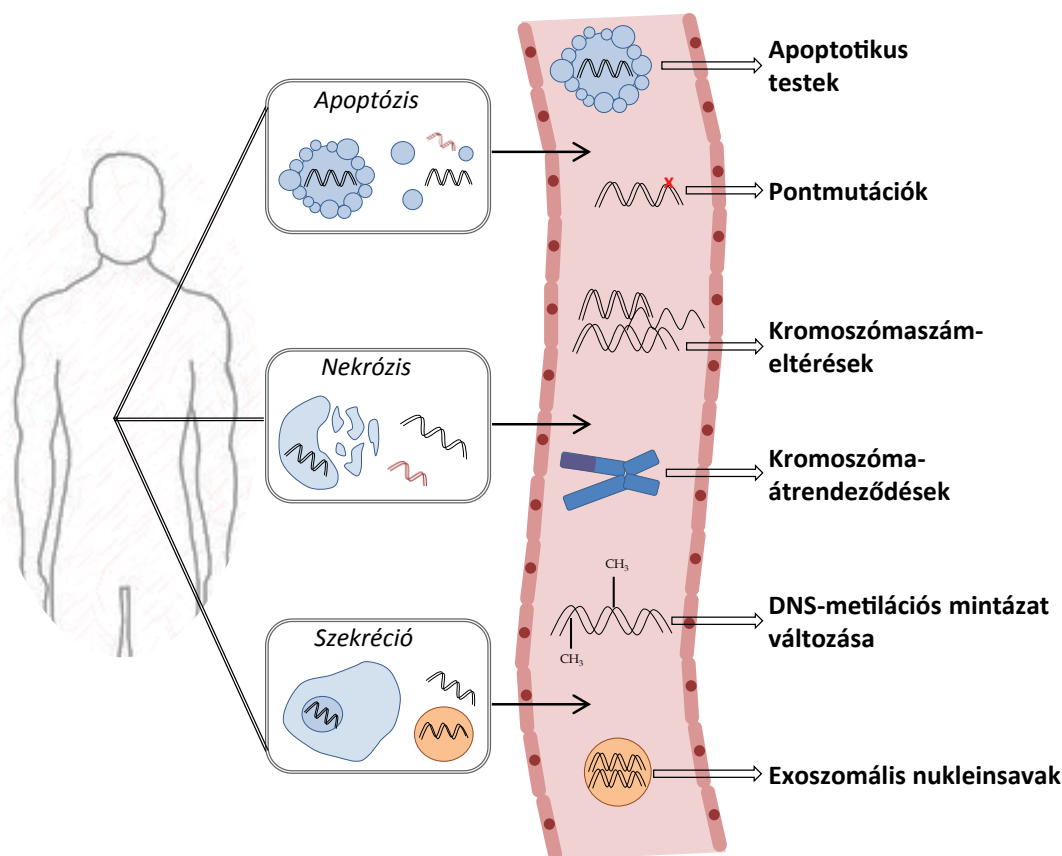
gek plazmájában, és radioimmunoassay módszerrel a DNS mennyiségét is mérni tudták [3]. A későbbiekben kimutatták, hogy a tumoros betegek vérkeringésében található skDNS-molekulák neoplastikus tulajdonságokkal jellemezhetők, ami arra utal, hogy DNS-molekulák a daganat szövetéből is bekerülhetnek a véráramba [4]. Az skDNS szintjének, valamint minőségi jellemzőinek változása a daganatos megbetegedéseken kívül számos egyéb kórfolyamatban megfigyelhető, többek között a gyulladáshoz kapcsolódó megbetegedésekben, szepszisben, valamint akut stroke vagy atherosclerosis esetén is.

A szabad DNS eredete és formája

A DNS-keringésben való megjelenésére három fő mechanizmust ismerünk: az apoptózist, a nekrozist, illetve a direkt szekréción, amely daganatos betegek esetén az egészséges és rákos sejtekből is történhet [5] (1. ábra). Egészséges egyénekben az apoptotikus sejtekből történő kiáramlást tartják a cirkuláló szabad DNS fő forrásának, azonban tumoros betegekben a proliferáló sejtek apoptotizáló képessége megszűnik, ezért az emelkedett szabad-DNS-szint feltehetően nem a programozott sejtha-

lálón átesett sejtekből kiáramló DNS-nek köszönhető [6]. Daganat jelenléte esetén a nekrotizáló sejteket bekebelező makrofágok nagy mennyiségű DNS-t ürítenek környezetükbe, valamint bizonyított, hogy a vérben keringő lymphocyták *in vitro* spontán képesek DNS-kibocsátásra, ami felveti a szabad DNS aktív felszabadulásának lehetőségét [7]. Ezek mellett új generációs szekvenálással nem humán eredetű DNS-szekvenciákat is kimutattak a véráramban, amelyek elsősorban a szervezetünkben található mikrobákból, illetve az elfogyasztott táplálékból kerülnek a keringési rendszerbe [8, 9].

Számos hipotézis látott napvilágot a szabad DNS formáját illetően. A véráramban egy- és kétszálú DNS-molekulák is megtalálhatók, hosszuk 100 bp és 10 kbp között váltakozik [6]. Fragmentumelemzések rávilágítottak arra is, hogy az skDNS mérete jellemzően 180 bp és annak egész számú többszöröse [10]. Ez azzal magyarázható, hogy a nukleoszómákat megközelítőleg ekkora DNS alkotja, így a köztük lévő linker-DNS-szakaszon történő, nukleázok általi emésztés speciális fragszintázot eredményez. A DNS-szakaszok méret szerinti eloszlásának megjelenése eltérhet a különböző betegcsoportokban, ami – többek között – mikrokapilláris-



1. ábra

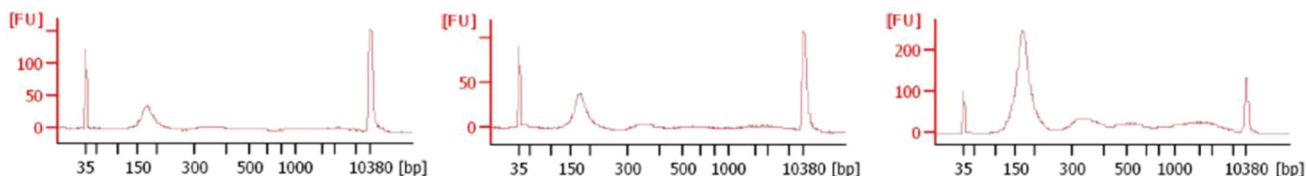
A sejten kívüli DNS megjelenési formái. A szabad DNS keringési rendszerbe történő bejutására három alapvető mechanizmust ismerünk: az apoptózist, a nekrozist és a direkt szekréción. A felszabadulás pontos menete és élettana egyelőre azonban nem teljesen tisztázott. A véráramban az skDNS-molekulák egy- és kétszálú formában vannak jelen, és a tumoros sejtekben bekövetkező genetikai és epigenetikai változásokat is tükrözik. A kép forrása: Wan és mtsai (2017) alapján, újraserkesztve [5]

DNS = dezoxiribonukleinsav; skDNS = sejten kívüli DNS

Egészséges

Adenoma

CRC



2. ábra

A szabad DNS méret szerinti eloszlása különböző betegcsoportokban. A sejten kívüli DNS egészséges mintákban jellemzően rövid fragmentumokként van jelen a keringésben, míg a daganatos elváltozásokban a hosszabb szakaszok is megjelennek amellet, hogy a rövid szakaszok is nagy mennyiségben jelen vannak (Agilent BioAnalyzer 2100 [Santa Clara, CA, USA] készülékkel mérve)

CRC = vastagbélrák; DNS = dezoxiribonukleinsav

elektroforézissel is vizsgálható (2. ábra). Egészségesekben jellemzően az alacsonyabb tartományban mozog az skDNS-fragmentumok hossza, míg adenomás és carcinomás mintákban a hosszabb skDNS-szakaszok is nagyobb mennyiségben vannak jelen, ami feltételezhetően a rákos betegekben megfigyelt csökkent DNáz-enzimaktivitásnak is köszönhető [11].

A keringésben lévő DNS önállóan, nukleoszóma részeként vagy esetlegesen más struktúrákhoz kötve is megtalálható, mint amilyenek a szállítófehérjék vagy az anti-DNS-antitestek [6]. Az utóbbi évtizedekben egyre inkább a kutatások fókuszába kerültek a microvesiculák, amelyek egy vagy több lipidmembránnal körülvett, különféle sejtalkotó elemeket és molekulákat tartalmazó partikulák (exoszómák, apoptotikus testek és egyéb microvesiculák). Számuk a daganatos betegek vérében magasabb az egészségesekéhez képest, és – megfigyelések szerint – ezek a microvesiculák daganat esetén a tumoros sejtek DNS-ét is tartalmazzák [12]. Sikertült igazolni, hogy a 30–100 nm-es mérettartományba eső exoszómákban található kettős szálú DNS két formában létezik: az egyik nagyobb méretű (>2,5 kbp) és az exoszóma membránjához kötődik, míg a kisebb (100 bp–2,5 kbp) a vesiculák belsejében található. Az exoszómákon kívül más microvesiculák is hordoznak DNS-molekulákat, mint például az apoptotikus testek, amelyek az apoptózis során lebomlott DNS-t tartalmazzák, és a partikulán belül védettek a DNáz enzimekkel szemben. A szabad DNS egyik megjelenési formájaként tarják számon a vircsómát is, amely egy DNS/RNS lipoprotein komplex. Szabályozott módon szabadul fel élő sejtekből, és más sejtekbe bekerülve immunológiai változásokat vagy akár malignus transzformációt is előidézhethet [13].

A szabad DNS féléletideje rövid, körülbelül 15 perc és néhány óra közé tehető [14], ezért szükségessé vált olyan vérvételi csövek fejlesztése, amelyek képesek megőrizni az skDNS stabilitását. Az elsők között a Streck cég (La Vista, NE, Amerikai Egyesült Államok [USA]) által forgalmazott Cell-Free DNA BCT® vérvételi csövek kerültek forgalomba, amelyek formaldehidmentes tartósítóreagenseket tartalmaznak, és ennek köszönhetően a szabad DNS akár 14 napig intakt marad szobahőmérsék-

leten tárolt vérmintákban [15]. A reagensek képesek megakadályozni az skDNS nukleázok általi lebontását, továbbá gátolják a genomiális DNS kijutását a vér alakos elemeiből. Kang és mtsai egy összehasonlító vizsgálat során emlőrákos betegektől gyűjtöttek vért standard K3EDTA (Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Ausztria), Streck- és CellSave (CellSearch; Menarini Silicon Biosystems Inc., Huntington Valley, PA, USA) csövekbe [16]. A mintákat 4 °C-on és szobahőmérsékleten tárolták 2, 6 és 48 órán keresztül, majd plazmát szeparáltak, és megmérték a kivont szabad DNS mennyiségét. Megállapításuk szerint az skDNS 6 órával a gyűjtés után még stabil marad a gyűjtőcső típusától függetlenül, hosszú ideig tartó tárolás esetén azonban javaslatuk szerint a Streck-csővek használata előnyösebb volt. Munkacsoportunk 5 adenomás (AD) és 5 vastagbélrákos beteg plazmamintáin végzett hasonló vizsgálatokat, megfigyeléseink szerint azonban a gyűjtőcső típusa nem befolyásolja jelentősen az skDNS mennyiségét, hiszen 10 mintából 6 esetben tapasztaltunk magasabb DNS-szintet a Streck-csővek használatát követően a standard K3EDTA csövekkel szemben [17].

A szabad DNS mennyiségi jellemzői és lehetséges funkciói

Az skDNS szintje tág határok között változhat, azonban általánosságban elmondható, hogy míg az egészséges szervezetekben alacsonyabb (10–20 ng/ml), addig egyes gyulladással járó, traumás, autoimmun vagy fertőzőes kórállapotok esetén emelkedett mennyiséget mutat [18]. A daganatok közül magas szabad-DNS-mennyiség észlelhető például vastagbél-, emlő-, prosztatá-, hasnyálmirigy- és tüdőrák esetén is [5]. Különbség figyelhető meg továbbá a plazma- és szérumbinták szabad-DNS-szintje között is. CRC esetén egyes tanulmányok körülbelül 20 és 200 ng/ml közötti skDNS-t mértek a plazmamintákban, míg szérumban akár 800 ng/ml értéket is mutathat az skDNS koncentrációja [19, 20]. Ezekon kívül különböző fiziológiás folyamatokban – mint az erőteljes fizikai aktivitás, terhesség vagy az öregedés – szintén magas skDNS-koncentrációt figyelhetünk meg.

Sport és fizikai aktivitás

A sportolás következtében megnövekedett skDNS-koncentrációt számos tanulmányban vizsgálták. Megerőltető testmozgáskor oxidatív és mechanikai stresszfolyamatok játszódnak le a szervezetben, amelyek a leukocyták és az izomsejtek sérüléséhez, valamint akutfázis-válaszhoz vezetnek. Hasonló folyamatok történnek fertőzések vagy különböző traumák következtében is, amelyek esetében emelkedett skDNS-koncentrációt figyeltek meg, csakúgy, mint különböző fizikai feladatok elvégzése után. A fiziológias skDNS-szinthez képest mennyiségi növekedést tapasztaltak többek között félmaraton, ultramaraton, illetve TRX- (total body resistance exercise) gyakorlatokat követően [21, 22]. A sportolás során a plazmába kerülő szabad DNS egyik fő forrása valószínűleg a neutrophil granulocyták aktivitása során felszabaduló extracelluláris csapdák, azaz a NET-ek (neutrophil extracellular traps). A NET-ek ugyanis nemcsak az antimikrobiális védelemben vesznek részt, hanem a szervezetben lezajló steril gyulladásokban is, mint amilyeneket a fizikai aktivitás is eredményezhet. Ezt az is bizonyítja, hogy sportolók véréből készített perifériás keneten dezintegrált neutrophil granulocyták láthatók dekonzenzált kromatinstruktúrával. Immunhisztokémiai festéssel szintén láthatóvá tehető a látszólag intakt, ámde megduzzadt magvú neutrophil granulocyták és a körülöttük elhelyezkedő, magfestéssel megjelenített finom DNS-struktúra [23]. A fenti hipotézist tovább erősítette az a tény is, hogy az aktivitás után gyűjtött plazmában a szabad DNS szintjének emelkedése egyedül a mieloperoxidáz enzim (MPO) szintjével korrelált, amely a neutrophil granulocyták specifikus granulumaiból szabadul ki [23].

Várandósság

Magzati szabad-DNS-molekulákat az anya keringési rendszerében 1997-ben figyeltek meg először [24]. Számos magzati kromoszóma-rendellenesség, valamint a terhesség során fellépő különböző komplikációk is befolyásolják a keringő DNS mennyiségét. Emelkedett skDNS-szintet mértek a magzat 21-es és 13-as kromoszómájának triszómiája esetén, vészes terhességi hányáskor (hyperemesis gravidarum), kórosan nagy mennyiségű magzatvíz (polyhydramnion), rendellenesen tapadó placenta, praeeclampsia, illetve HELLP-szindróma (hemolízissel, emelkedett májenzimértékekkel és alacsony vérlemezkeszámmal járó szindróma) esetén is [25]. A magzati szabad DNS vizsgálata segítséget nyújthat ezen kórállapotok diagnosztizálásában, valamint a magzat nemének és Rh-vércsoportjának meghatározásában is a terhesség korai szakaszában [26]. A magzati DNS eredetére vonatkozóan több elmélet is létezik, egyértelmű bizonyítékok azonban még nem kerültek közlésre. Feltételezik, hogy az elsődleges forrás a placenta lehet, de lehetséges, hogy az erythroid sejtekből is szabadulnak ki DNS-molekulák [25].

Öregedés

A szabad DNS mennyisége és minőségi jellemzői az életkor előrehaladásával is változhatnak. *Jylhävä és mtsai* a Finnországban zajló Vitality 90+ projektben részt vevő, 90 évnél idősebb férfiak és nők (n = 144) szabad-DNS-koncentrációját vetették össze fiatal kontrollcsoportjával (n = 30) [27]. A teljes skDNS-mennyiség mellett meghatározták – többek között – a nem metilált szabad DNS, az RNáz P-t kódoló skDNS és az 'Alu' ismétlődő szekvenciák mennyiségét is, és mindegyik paraméter esetében emelkedett koncentrációt találtak az idős korcsoport mintáiban a kontrollcsoporttal viszonyítva ($p < 0,05$). Egy másik tanulmány három korcsoportban (20–40 éves; 41–60 éves; ≥ 61 éves) elemezte a keringő DNS mennyiségét párosított plazma- és szérummintákban [18]. Szignifikánsan emelkedett skDNS-koncentrációt csak a 60 évnél idősebb nőkben tapasztaltak a többi csoporthoz képest ($p < 0,05$). Megállapították továbbá, hogy szérummintákban magasabb az skDNS szintje a plazmához viszonyítva, valamint leírták, hogy a nem és a gyakori véradás sem befolyásolja az skDNS mennyiségét.

Stressz-szignál

A sejtek az őket ért károsító behatásokra különböző stressz-szignálok bocsátanak ki. Megfigyelések szerint egy sejt kultúrában belül a sugárral kezelt sejtek információt adnak át a nem besugározott sejteknek, amit „bystander-effektusnak” (BE) neveznek, és amely folyamat többek között a sejthalál, a genominstabilitás és a sejtek adaptív válaszreakciói során is megfigyelhető [28]. A sejtek közötti jelátvitel mechanizmusára több lehetőséget is ismerünk. Újabb hipotézisek szerint a bystandereffektus során a szabad DNS oxidációjának szerepe is fontos lehet a besugározott és az ép sejtek közötti jelátvitelben. A feltevés onnan eredeztethető, hogy kísérletesen igazolták, hogy a magas oxidatív stressznek kitett páciensek plazmájából izolált szabad DNS szignifikánsan megváltoztatja a normális sejtek fiziológias állapotát [28]. Egy másik tanulmányban megfigyelték, hogy akut myocardialis infarctuson átesett betegekben kinyert skDNS-sel kezelt patkányban a neonatalis szívizomsejtek összehúzódásának ereje és frekvenciája csökkent [29]. Leírták továbbá, hogy szignifikánsan csökkent azoknak a humán köldökvéna-endothelsejtek (HUVEC) tenyészetéből származó sejtek a nitrogén-monoxid-tartalma, amelyeket olyan páciensek plazmájából izoláltak szabad DNS-sel kezelve, akiknek magas vérnyomása és érlemezésedése volt [30]. A fenti kísérletek alapján feltételezhető, hogy a szabad DNS – mint szolúbilis stressz-szignál – számos patológias folyamatban játszik szerepet.

Thrombusképzés

A keringő szabad DNS-sel kapcsolatos kutatások rávilágítottak arra, hogy a szabad DNS nem csupán inert,

inaktív molekulaként van jelen a keringésben, hanem fontos biológiai aktivitással is rendelkezhet. Megfigyelések szerint az előzőekben már említett – neutrophil granulocyták által kibocsátott – NET-ek mellett, hogy fontos szerepet játszanak a baktériumok és gombák elleni védekezésben, olyan felületet biztosítanak, amely hozzájárulhat a thrombusképződéshez is [31]. A NET-mediált thrombusképződésben több mechanizmus is részt vesz. Egyrészt a thrombocyták képesek összekapcsolódni a neutrophil granulocytákkal, ezáltal stimulálják a gyors NET- és microthrombus-képződést, továbbá az extracelluláris kromatin, illetve a nukleoszómák DNS-molekulái képesek beindítani a véralvadási kaskád intrinsek útját [31]. Emellett olyan másodlagos szerkezettel rendelkeznek, amely kötőhelyet biztosít a koagulációs kaskád fehérjéi számára, ezzel aktiválva őket [32]. A szabad DNS- és a NET-mediált thrombusképződést nemcsak az artériás, hanem a vénás oldalon is megfigyelték: különböző állatkísérletekben sikerült kimutatni, hogy a NET-ekből felszabaduló skDNS aktiválja a thrombocytákat és a szöveti faktort, ezenkívül az idegen felszín indukálta koagulációban is fontos szerepe van [33].

A szabad DNS mennyiségi és minőségi változásainak elemzésére alkalmas technikák

Az skDNS izolálása a DNS alacsony mennyisége és töredezettsége (fragmentáltsága) miatt technikai kihívások elé állítja a kutatókat. Számos, kereskedelmi forgalomban kapható, DNS-kivonásra alkalmas kit közül választ-

hatunk, amelyek alapvetően két módon képesek megkötni a DNS-molekulákat: mágneses gyöngy felszínén vagy szilikagél-alapú membránon [34]. Az utóbbi években a kézi módszerek mellett automata skDNS-izolálási rendszerek is elérhetővé váltak, amelyeknek köszönhetően párhuzamosan, standardizált körülmények között lehet nagyszámú plazmamintából DNS-t kinyerni, ami fontos szempont a diagnosztikai és prognosztikai tesztek fejlesztésénél is. Lényeges azonban kiemelni, hogy a különböző DNS-extrakciós módszerek befolyásolhatják a további vizsgálatok eredményeit, így többek között a metilációs mintázat detektálására is hatással lehetnek [17]. A szabad-DNS-mennyiség meghatározásának széleskörűen alkalmazott technikái közé tartoznak a fluorimetriás és a PCR-alapú mérések. Az skDNS szintjének kvantifikálása mellett azonban a DNS minőségi jellemzőinek vizsgálata is fontos. Az skDNS genetikai, illetve epigenetikai mintázatának elemzésére számos módszer áll rendelkezésünkre. A mutációk elemzésére használhatunk különböző PCR-technikákat (például digitális PCR-t), denaturáló nagy hatékonyságú folyadékkromatográfiát (DHPLC) vagy enzimhez kapcsolt immunszorbeneszteket (ELISA), továbbá nagy áteresztőképességű módszereket is, mint az array-vizsgálatok vagy az új generációs szekvenálás (NGS) [35]. A leginkább kutatót epigenetikai módosulás a DNS-metiláció, amelyet tanulmányozhatunk teljesgenom-szinten vagy célzottan, az adott génekhez tartozó promóter régiókban is. A technikákat csoportosíthatjuk aszerint, hogy enzimátikus emésztést, affinitásalapú dúsitást vagy biszulfidkonverziós kezelést alkalmaznak. A teljesgenom-szintű DNS-metilációs változásokat kimutathatjuk – egyebek

1. táblázat | A CRC-s páciensek skDNS-frakciójában megfigyelt jelentősebb mutációk

A gén neve	Mintatípus	A kontrollminták száma	A CRC-minták száma	Mutáció előfordulása CRC-mintákban	Az alkalmazott módszer	Referencia
<i>APC</i>	Szérum	50	104	14 (13,5%)	PCR-SSCP	[41]
<i>APC</i>	Plazma	21	22	16 (72,7%)	BEAMing	[43]
<i>BRAF</i>	Plazma	–	97	5 (5,2%)	Allélspecifikus PCR	[45]
<i>BRAF</i>	Plazma	–	503	17 (3,4%)	BEAMing	[34]
<i>KRAS</i>	Szérum	–	44	3 (6,8%)	Oligonukleotidligációs teszt	[40]
<i>KRAS</i>	Szérum	50	104	16 (15,4%)	PCR-SSCP	[41]
<i>KRAS</i>	Plazma	–	106	33 (31,1%)	PNA-PCR	[42]
<i>KRAS</i>	Szérum	–	78	32 (41%)	PCR	[44]
<i>KRAS</i>	Plazma	–	97	38 (39,2%)	Allélspecifikus PCR	[45]
<i>KRAS</i>	Plazma	–	115	59 (51,3%)	BEAMing	[46]
<i>KRAS</i>	Plazma	–	503	349 (69,4%)	BEAMing	[34]
<i>TP53</i>	Szérum	–	44	7 (15,9%)	Oligonukleotidligációs teszt	[40]
<i>TP53</i>	Szérum	50	104	13 (12,5%)	PCR-SSCP	[41]

CRC = vastagbélrák; SSCP = egyszálú konformációs polimorfizmus; PNA-PCR = peptid-nukleinsav polimeráz-lánreakció

mellett – különböző metilációs array-k, biszulfitszekvenálás, metilált-DNS-immunprecipitáció (MeDIP) vagy methyl capture (MetCap) szekvenálás segítségével. Az előre kiválasztott gének metilációs státuszának meghatározására alkalmas technikák nagy része biszulfitkonverziós lépéssel indul. Idesorolhatjuk a metilációs-specifikus és MethyLight PCR-t, a biszulfitspecifikus PCR-t követő nagy felbontású olvadáspont-elemzési, illetve a különböző szekvenálási módszereket (például Sanger-szekvenálás, piroszekvenálás, NGS) [36].

A szabad DNS mint diagnosztikai marker vastagbélrák esetén

A vastagbélrák (CRC) az egyik leggyakoribb daganatos megbetegedés világszerte, mind a férfiak, mind a nők körében. 2018-ban Európában 772 000 újonnan diagnosztizált eset és 242 000 haláleset kötődött a CRC-hez [37]. Magyarországon az incidenciája és a halálozási aránya is folyamatosan emelkedik; évente körülbelül 10 000 új beteget diagnosztizálnak, és 5000 haláleset következik be a vastagbélrák miatt. A diagnózis mihamarabbi felállí-

tása nagymértékben növeli a betegek túlélési esélyeit, hiszen korai stádiumban (Dukes A) az öt éves túlélési arány 90%-os, míg előrehaladott fázisban, távoli szervi áttét esetén csupán 5% alatti [37]. Ezek az adatok is alátámasztják, hogy szükséges a szűrőmódszerek folyamatos fejlesztése, amelyek közé a szabad-DNS-frakció elemzését célzó minimálisan invazív, vérvételalapú vizsgálatok is sorolhatók. A CRC kialakulását az egészséges vastagbélnyálkahártyasejtekben bekövetkező molekuláris biológiai elváltozások indukálják, amelyek közé a különböző genetikai, illetve epigenetikai módosításokat sorolhatjuk, és amelyek a keringési rendszerbe kerülő szabad-DNS-frakciónak köszönhetően plazma- és szérummintákban is elemezhetőek [35]. A következőkben bemutatjuk a vastagbél-daganatok kialakulása során leggyakrabban előforduló mutációs és DNS-metilációs elváltozásokat (1. és 2. táblázat). Kutatócsoportunk korábbi vizsgálata szerint a metilált-DNS-fragmentumok stabilabbak a véráramban, mint a nem-metilált-DNS-szakaszok [38], ezért – egyebek mellett – ez is magyarázhatja, hogy a rákos mintákban nagyobb arányban fordulnak elő a DNS-metilációs elváltozások (65–100%), mint a mutációk (5–75%).

2. táblázat | Az skDNS-frakcióban megfigyelt jelentősebb DNS-metilációs változást mutató gének adenoma és CRC esetén

A gén neve	Mintatípus	A kontroll-minták száma	Az AD-minták száma	A metilált AD-minták száma (%)	Szenzitivitás és specificitás AD	A CRC-minták száma	A metilált CRC-minták száma (%)	Szenzitivitás és specificitás CRC	Az alkalmazott módszer	Referencia
<i>FHIT</i> <i>APC</i> <i>SMAD4</i> <i>E-cad</i> <i>DAPK1</i>	Plazma	60	40	NA	NA	60	NA	50% és 85% 57% és 86% 52% és 64% 60% és 84% 50% és 74%	Metilációs-specifikus PCR	[58]
<i>BCAT1</i> <i>IKZF1</i>	Plazma	144	–	–	–	74	48 (64,9%) 50 (67,6%)	77% és 92,4%	Metilációs-specifikus PCR	[59]
<i>BCAT1</i> <i>IKZF1</i>	Plazma	867	448	41 (9,2%)	NA	66	41 (62,1%)	62,1% és 91,8%	Multiplex RT-PCR	[60]
<i>NPY</i> <i>PENK</i> <i>WIFI</i>	Szérum	30	10	NA	NA	9	9 (100%)	100% és 73%	Metilációs-specifikus PCR, Biszulfitszekvenálás	[61]
		131	16			23	21 (91,3%)	91% és 25%		
<i>SFRP1</i> <i>SFRP2</i> <i>SDC2</i> <i>PRIMA1</i>	Plazma	37	37	33 (89,2%) 31 (83,8%) 30 (81,1%) 26 (70,3%)	89,2% és 86,5%	47	40 (85,1%) 34 (72,3%) 42 (89,4%) 38 (80,9%)	91,5% és 97,3%	MethyLight PCR	[62]
<i>SEPT9</i>	Plazma	172 155	–	–	–	97 90	55 (56,7%) 50 (55,6%)	57% és 98% 56% és 95%	RT-PCR	[49]
<i>SEPT9</i>	Plazma	33	94	27 (28,7%)	NA	33	24 (72,7%)	NA	RT-PCR	[50]
<i>SEPT9</i>	Plazma	92	–	–	–	92	73 (79,3%)	79% és 99%	RT-PCR	[51]
<i>SEPT9</i>	Plazma	193	–	–	–	97	70 (72,2%)	72% és 81%	RT-PCR	[55]
<i>ALX4</i>	Szérum	30	–	–	–	30	25 (83,3%)	83% és 70%	MethyLight PCR	[56]
	Plazma	22	36	16 (44,4%)	44% és 82%	–	–	–		

AD = adenoma; CRC = vastagbélrák; NA = nincs adat; RT-PCR = valós idejű polimeráz-lánreakció

DNS-mutációk elemzése a szabad-DNS-frakcióban

A vastagbélrák kialakulásához számos mutáció felhalmozódása, például az *APC*-, a *TP53*-, a *KRAS*- és a *BRAF*- génekben történő változások járulnak hozzá. Ezek a mutációk a vastagbél szövetében nagy arányban megjelennek a daganat fejlődése során, azonban plazma- és szérummintákban eltér a kimutathatóságuk [39] (1. táblázat). Számos tanulmányban leírták, hogy előrehaladott stádiumokban a mutációkat magas érzékenységgel lehet kimutatni a szabad-DNS-frakcióban, ami a daganat fejlődése során emelkedő skDNS-mennyiségnek köszönhető [40, 41]. *Hibi és mtsai* mutáns *KRAS*-gént csak a Dukes C- és D-stádiumú CRC-s betegek szérummintáiban detektáltak, a betegség korai szakaszában nem figyeltek meg mutációt [40]. Az *APC*-, a *TP53*- és a *KRAS*-gén mutációi összefüggésbe hozhatók a nyirokcsomóáttétek megjelenésével, a daganat kiújulásával, valamint rossz prognózist is jelezhetnek [41–43]. A mutáns *KRAS*-, *NRAS*- és *BRAF*-génnek az skDNS-frakcióban történő kimutatása a CRC prognózisának meghatározására és a terápia monitorozására is használható [34, 41, 44–46]. *Messaoudi és mtsai* a *BRAF*- (V600E) és a *KRAS*-gén elemzése során megállapították, hogy a magas mutáns szabad-DNS-koncentráció és a megnövekedett mutációs terhelés (a teljes skDNS-ben lévő mutáns allélok százalékos aránya) áttétes CRC-s páciensekben szignifikánsan csökkenti a túlélési arányt [45]. Egy másik munkacsoport MassDetect CRC-panel (Sequenom) segítségével 74, CRC-hez kapcsolt gén 155 mutációját vizsgálta, és megállapították, hogy az 5 éves túlélés szignifikánsan alacsonyabb azokban a betegekben, akikben megtalálhatók a mutációk (48%), a mutációkat nem hordozókkal szemben (77%) [47].

A cirkuláló DNS metilációs mintázata

A DNS-t érintő metiláció az egyik leglényegesebb epigenetikai módosulás. A folyamat során egy metilcsoport kapcsolódik a DNS citozinbázisához a citozin-guanin dinukleotid (CpG)-helyeken. A CpG-gazdag DNS-régiókat CpG-szigeteknek nevezzük (a CpG dinukleotidok legalább 60%-os arányban vannak jelen), amelyek gyakran a gének promóter régióiban találhatóak. Az itt előforduló fokozott DNS-metiláció jellemzően befolyásolja a gének átíródását, hiszen a metilcsoport gátolja egyes transzkripció faktorok kötődését, valamint olyan változásokat indukál a kromatin szerkezetében, amelyek végül a transzkripció csökkenéséhez vagy teljes gátlásához vezethetnek [48]. Az aberráns metilációs mintázatot mutató gének ígéretes biomarkerként szolgálhatnak, hiszen – csakúgy, mint a mutációk – a szöveti minták mellett a perifériás vérben is vizsgálhatók a szabad-DNS-frakciónak köszönhetően. Egyes tanulmányok egy-egy marker azonosítását tűzték ki célul, míg mások több metilációs markert tartalmazó panelt állítottak össze (2. táblázat).

Az Epi proColon 2.0 teszt (Epigenomics AG, Berlin, Németország) az egyik legismertebb, FDA-engedéllyel (Food and Drug Administration) rendelkező vastagbélrák-specifikus véralapú szűrőteszt, amely a septin-9 (*SEPT9*)-gén metiláltsági fokát méri. A kvantitatív valós idejű PCR módszert alkalmazó teszt érzékenysége 65–75%, míg specificitása 80–95% közé esik, és elsősorban a CRC késői stádiumaiban mutat pozitívítást [49–51]. Munkacsoportunk a teszt kifejlesztésében és tesztelésében is részt vett, amelynek eredményeiről több közleményben is beszámoltunk [51–54]. *Johnson és mtsai* a klinikai gyakorlatban alkalmazott FIT (immunalapú székletvér-vizsgálat – fecal immunochemical test) teszttel vetették össze az Epi proColon 2.0 teszt érzékenységét 97 CRC-s és 193 kontrollmintában [55]. A rákos minták 72,2%-a bizonyult septin-9-pozitívnak 80,8%-os specificitás mellett, míg a FIT teszt kissé alacsonyabb szenzitivitást (68%) jelzett 97,4%-os specificitásértékkel. A FIT és az Epi proColon 2.0 tesztről is elmondható, hogy adenomás esetek kimutatására kevésbé érzékenyek [55]. A *SEPT9*-gén mellett egyéb ígéretes DNS-metilációs markerek is ismertek a szakirodalomban. Az *ALX4*-gén által kódolt fehérje a Wnt/ β -katenin jelátviteli útvonal bizonyos elemeinek aktivitását szabályozza, és kifejeződése kismértékű a vastagbélrákos betegek szöveti mintáiban. Az *ALX4* promóter fokozott metilációját CRC mellett nyelőcső-, epevezeték-, hasnyálmirigy- és gyomorrák esetén is megfigyelték [56, 57]. *Ebert és mtsai* szérumminták elemzésével 83,3%-os szenzitivitással és 70%-os specificitással tudták elkülöníteni a CRC-s betegeket a kontrolloktól [56]. Egy másik tanulmány a CRC kialakulásában szerepet játszó *FHIT*, *APC*, *SMAD4*, *E-cad* és *DAPK1* gének metilációs mintázatát adenomás és CRC-s betegek plazmamintáiban elemezte [58]. Mind az öt marker szignifikánsan magasabb metilációs szintet mutatott a rákos betegek plazmáiban a rosszindulatú daganattal nem rendelkező (egészséges és AD) egyénekhez viszonyítva, az adenomás csoportban azonban nem találtak jelentős metilációs szint-emelkedést az egészséges kontrollokhoz képest. Az eredmények alapján megállapítható, hogy korai CRC-stádiumban (Dukes A) csak az *APC*-gén promóterében fokozott a DNS-metiláció. A két legmegbízhatóbb markernek az E-cadherin és az *APC* mutatkozott 84%-os és 86%-os specificitásértékek mellett 60%-os és 57%-os érzékenységgel [58]. *Pedersen és mtsai* az *IKZF1*- és a *BCAT1*-gént analízálták kvantitatív metilációs-specifikus PCR-módszerrel vastagbélrákos (n = 74) és egészséges (n = 144) páciensek plazmamintáiban [59]. Vizsgálatukban a két markert kombinálva 77%-os szenzitivitással és 92,4%-os specificitással tudták elkülöníteni a CRC-mintákat a kontrolloktól. Egy másik kutatócsoport ugyanezeket a géneket 1381 mintában elemezte és vetette össze a FIT teszt érzékenységgel [60]. A markerek együttesen 62,1%-os érzékenységet mutattak a CRC-s, 16%-osat az előrehaladott adenoma és 25%-osat a korai adenoma stádiumú betegek mintáiban. A FIT teszt a rákos és a korai adenomás betegek

esetében is kissé alacsonyabb értékeket jelzett (59,1% és 7,2%). *Roperch és mtsai* az *NPY*-, a *PENK*- és a *WIFI*-gén metilációs státuszát 161 egészséges, 26 polipos és 32 CRC-s beteg szérumbintáiban elemezték, és a CRC-s mintákat 59%-os érzékenységgel és 95%-os specificitással azonosították [61]. Munkacsoportunk egy 4 gént (*SFRP1*, *SFRP2*, *SDC2* és *PRIMA1*) tartalmazó panel metilációs állapotát vizsgálta egészséges, AD és CRC-betegek plazmamintáiban (n = 121) [62]. A négy gént együttesen elemezve megállapítottuk, hogy legalább 3 marker emelkedett metilációs szintű a CRC-s minták 89%-ában (42/47) és az adenomák 81%-ában (30/37). A markerek metilációja továbbá folyamatos emelkedést mutatott az egészséges–vastagbél-adenoma–carcinoma szekvencia mentén. Látható tehát, hogy az ígéretes és nagy szenzitivitású markerek széles tárháza található a szakirodalomban, azonban jövőbeli diagnosztikai alkalmazásuk érdekében ezek nagy mintaszámon történő további vizsgálata és az eredmények validálása elengedhetetlen.

Következtetés és kitekintés

A vérben található keringő szabad-DNS-molekulák mennyiségi és minőségi változásainak, valamint lehetséges szerepének elemzése intenzíven kutatott tudományterület napjainkban. Jelen összefoglaló közleményünkben az skDNS általános jellemzőinek áttekintése mellett a szabad DNS izolálására és detektálására alkalmas technikák bemutatására, valamint különböző fiziológiás és patológias folyamatokban betöltött szerepének ismertetésére törekedtünk. Rákos megbetegedések esetén a keringő DNS egyik forrása a tumorsejt-populációk, így a daganat DNS-ét érintő változások a plazma- és szérumbintákban is nyomon követhetők. A vastagbélrák az egyik legnagyobb incidenciát és mortalitást mutató ráktípus, amelynek mielőbbi felismerése kulcsfontosságú a betegek kezelése szempontjából. A CRC kialakulása során megváltozott genetikai és epigenetikai mintázatok vérben történő elemzése lehetőséget kínál olyan folyadékbiopszia-alapú, minimálisan invazív, rákspecifikus szűrési, diagnosztikai és prognosztikai tesztek kifejlesztésére, amelyek a rutin klinikai gyakorlat szerves részét képezhetik a jövőben.

Anyagi támogatás: A közlemény a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal (NVKP_16-1-2016-0004), továbbá a Nemzeti Erőforrás Minisztérium Felsőoktatási Intézményi Kiválósági Program támogatásával a molekuláris biológiai tematikus program keretén belül készült.

Szerzői munkamegosztás: B. B. K., M. E., M. B.: A kézirat megírása, a szakirodalom kutatása, válogatása és feldolgozása. Sz. K. A., K. A., G. O., N. Zs. B., Zs. S.:

A szakirodalom kutatása, a kézirat átolvasása. T. Zs., D. M., I. P., M. B.: A kézirat kritikus átolvasása. A cikk végleges változatát valamennyi szerző elolvasta és jóváhagyta.

Érdekeltségek: A szerzőknek nincsenek érdekeltségeik.

Irodalom

- [1] Mandel P, Métais P. Les acides nucléiques du plasma sanguin chez l'homme. C R Seances Soc Biol Fil. 1948; 142: 241–243.
- [2] Tan EM, Kunkel HG. Characteristics of a soluble nuclear antigen precipitating with sera of patients with systemic lupus erythematosus. J Immunol. 1966; 96: 464–471.
- [3] 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: 646–650.
- [4] Stroun M, Anker P, Maurice P, et al. Neoplastic characteristics of the DNA found in the plasma of cancer patients. Oncology 1989; 46: 318–322.
- [5] Wan JC, Massie C, Garcia-Corbacho J, et al. Liquid biopsies come of age: towards implementation of circulating tumour DNA. Nat Rev Cancer 2017; 17: 223–238.
- [6] van der Vaart M, Pretorius PJ. Circulating DNA. Its origin and fluctuation. Ann N Y Acad Sci. 2008; 1137: 18–26.
- [7] Stroun M, Maurice P, Vasioukhin V, et al. The origin and mechanism of circulating DNA. Ann N Y Acad Sci. 2000; 906: 161–168.
- [8] Kowarsky M, Camunas-Soler J, Kertesz M, et al. Numerous uncharacterized and highly divergent microbes which colonize humans are revealed by circulating cell-free DNA. Proc Natl Acad Sci U S A 2017; 114: 9623–9628.
- [9] Spisák S, Solymosi N, Ittész P, et al. Complete genes may pass from food to human blood. PLoS ONE 2013; 8: e69805.
- [10] Jiang P, Lo YM. The long and short of circulating cell-free DNA and the ins and outs of molecular diagnostics. Trends Genet. 2016; 32: 360–371.
- [11] Tamkovich SN, Cherepanova AV, Kolesnikova EV, et al. Circulating DNA and DNase activity in human blood. Ann N Y Acad Sci. 2006; 1075: 191–196.
- [12] Mouliere F, Thierry AR. The importance of examining the proportion of circulating DNA originating from tumor, microenvironment and normal cells in colorectal cancer patients. Expert Opin Biol Ther. 2012; 12(Suppl 1): S209–S215.
- [13] Gahan PB, Stroun M. The virtosome – a novel cytosolic informative entity and intercellular messenger. Cell Biochem Funct. 2010; 28: 529–538.
- [14] Hyun MH, Sung JS, Kang EJ, et al. Quantification of circulating cell-free DNA to predict patient survival in non-small-cell lung cancer. Oncotarget 2017; 8: 94417–94430.
- [15] Medina Diaz I, Nocon A, Mehnert DH, et al. Performance of Streck cfDNA blood collection tubes for liquid biopsy testing. PLoS ONE 2016; 11: e0166354.
- [16] Kang Q, Henry NL, Paoletti C, et al. Comparative analysis of circulating tumor DNA stability in K₃EDTA, Streck, and Cell-Save blood collection tubes. Clin Biochem. 2016; 49: 1354–1360.
- [17] Bartak BK, Kalmar A, Galamb O, et al. Blood collection and cell-free DNA isolation methods influence the sensitivity of liquid biopsy analysis for colorectal cancer detection. Pathol Oncol Res. 2018 Jan 27. doi: 10.1007/s12253-018-0382-z. [Epub ahead of print]
- [18] Zhong XY, Hahn S, Kiefer V, et al. Is the quantity of circulatory cell-free DNA in human plasma and serum samples associated with gender, age and frequency of blood donations? Ann Hematol. 2007; 86: 139–143.

- [19] Mouliere F, El Messaoudi S, Pang D, et al. Multi-marker analysis of circulating cell-free DNA toward personalized medicine for colorectal cancer. *Mol Oncol*. 2014; 8: 927–941.
- [20] Czeiger D, Shaked G, Eini H, et al. Measurement of circulating cell-free DNA levels by a new simple fluorescent test in patients with primary colorectal cancer. *Am J Clin Pathol*. 2011; 135: 264–270.
- [21] Atamaniuk J, Stuhlmeier KM, Vidotto C, et al. Effects of ultramarathon on circulating DNA and mRNA expression of pro- and anti-apoptotic genes in mononuclear cells. *Eur J Appl Physiol*. 2008; 104: 711–717.
- [22] Atamaniuk J, Vidotto C, Kinzlbauer M, et al. Cell-free plasma DNA and purine nucleotide degradation markers following weightlifting exercise. *Eur J Appl Physiol*. 2010; 110: 695–701.
- [23] Beiter T, Fragasso A, Hudemann J, et al. Neutrophils release extracellular DNA traps in response to exercise. *J Appl Physiol* (1985). 2014; 117: 325–333.
- [24] Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF, et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet* 1997; 350: 485–487.
- [25] Wataganara T, Bianchi DW. Fetal cell-free nucleic acids in the maternal circulation: new clinical applications. *Ann N Y Acad Sci*. 2004; 1022: 90–99.
- [26] Turner MJ, Martin CM, O’Leary JJ. Detection of fetal Rhesus D gene in whole blood of women booking for routine antenatal care. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2003; 108: 29–32.
- [27] Jylhävä J, Nevalainen T, Marttila S, et al. Characterization of the role of distinct plasma cell-free DNA species in age-associated inflammation and frailty. *Aging Cell* 2013; 12: 388–397.
- [28] Ermakov AV, Konkova MS, Kostyuk SV, et al. Oxidized extracellular DNA as a stress signal in human cells. *Oxid Med Cell Longev*. 2013; 2013: 649747.
- [29] Bulicheva N, Fidelina O, Mkrumova N, et al. Effect of cell-free DNA of patients with cardiomyopathy and rDNA on the frequency of contraction of electrically paced neonatal rat ventricular myocytes in culture. *Ann N Y Acad Sci*. 2008; 1137: 273–277.
- [30] Efremova LV, Alekseeva AY, Konkova MS, et al. Extracellular DNA affects NO content in human endothelial cells. *Bull Exp Biol Med*. 2010; 149: 196–200.
- [31] Oehmcke S, Mörgelin M, Herwald H. Activation of the human contact system on neutrophil extracellular traps. *J Innate Immun*. 2009; 1: 225–230.
- [32] Urban CF, Ermert D, Schmid M, et al. Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against *Candida albicans*. *PLoS Pathog*. 2009; 5: e1000639.
- [33] Brill A, Fuchs TA, Savchenko AS, et al. Neutrophil extracellular traps promote deep vein thrombosis in mice. *J Thromb Haemost*. 2012; 10: 136–144.
- [34] Xue X, Teare MD, Holen I, et al. Optimizing the yield and utility of circulating cell-free DNA from plasma and serum. *Clin Chim Acta* 2009; 404: 100–104.
- [35] Tóth K, Barták BK, Tulassay Z, et al. Circulating cell-free nucleic acids as biomarkers in colorectal cancer screening and diagnosis. *Expert Rev Mol Diagn*. 2016; 16: 239–252.
- [36] Kurdyukov S, Bullock M. DNA methylation analysis: choosing the right method. *Biology* 2016; 5: 3.
- [37] Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, et al. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries and 25 major cancers in 2018. *Eur J Cancer* 2018; 103: 356–387.
- [38] Barták BK, Nagy ZB, Spisák S, et al. *In vivo* analysis of circulating cell-free DNA release and degradation. [A sejten kívüli szabad DNS felszabadulásának és degradációjának *in vivo* elemzése.] *Orv Hetil*. 2018; 159: 223–233. [Hungarian]
- [39] Kidess E, Heirich K, Wiggin M, et al. Mutation profiling of tumor DNA from plasma and tumor tissue of colorectal cancer patients with a novel, high-sensitivity multiplexed mutation detection platform. *Oncotarget* 2015; 6: 2549–2561.
- [40] Hibi K, Robinson CR, Booker S, et al. Molecular detection of genetic alterations in the serum of colorectal cancer patients. *Cancer Res*. 1998; 58: 1405–1407.
- [41] Wang JY, Hsieh JS, Chang MY, et al. Molecular detection of *APC*, *K-ras*, and *p53* mutations in the serum of colorectal cancer patients as circulating biomarkers. *World J Surg*. 2004; 28: 721–726.
- [42] Bai YQ, Liu XJ, Wang Y, et al. Correlation analysis between abundance of K-ras mutation in plasma free DNA and its correlation with clinical outcome and prognosis in patients with metastatic colorectal cancer. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* 2013; 35: 666–671.
- [43] Diehl F, Li M, Dressman D, et al. Detection and quantification of mutations in the plasma of patients with colorectal tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 16368–16373.
- [44] Ryan BM, Lefort F, McManus R, et al. A prospective study of circulating mutant *KRAS2* in the serum of patients with colorectal neoplasia: strong prognostic indicator in postoperative follow up. *Gut* 2003; 52: 101–108.
- [45] El Messaoudi S, Mouliere F, Du Manoir S, et al. Circulating DNA as a strong multimarker prognostic tool for metastatic colorectal cancer patient management care. *Clin Cancer Res*. 2016; 22: 3067–3077.
- [46] Vidal J, Muinelo L, Dalmases A, et al. Plasma ctDNA RAS mutation analysis for the diagnosis and treatment monitoring of metastatic colorectal cancer patients. *Ann Oncol*. 2017; 28: 1325–1332.
- [47] Lin JK, Lin PC, Lin CH, et al. Clinical relevance of alterations in quantity and quality of plasma DNA in colorectal cancer patients: based on the mutation spectra detected in primary tumors. *Ann Surg Oncol*. 2014; 21(Suppl 4): 680–686.
- [48] Szigeti KA, Galamb O, Kalmár A, et al. Role and alterations of DNA methylation during the aging and cancer. [A DNS-metiláció szerepe és megváltozása az öregedés és a daganatos betegségek kialakulása során.] *Orv Hetil*. 2018; 159: 3–15. [Hungarian]
- [49] deVos T, Tetzner R, Model F, et al. Circulating methylated *SEPT9* DNA in plasma is a biomarker for colorectal cancer. *Clin Chem*. 2009; 55: 1337–1346.
- [50] Tänzer M, Balluff B, Distler J, et al. Performance of epigenetic markers *SEPT9* and *ALX4* in plasma for detection of colorectal precancerous lesions. *PLOS ONE* 2010; 5: e9061.
- [51] Tóth K, Sipos F, Kalmár A, et al. Detection of methylated *SEPT9* in plasma is a reliable screening method for both left- and right-sided colon cancers. *PLOS ONE* 2012; 7: e46000.
- [52] Wasserkort R, Kalmár A, Valcz G, et al. Aberrant septin 9 DNA methylation in colorectal cancer is restricted to a single CpG island. *BMC Cancer* 2013; 13: 398.
- [53] Tóth K, Wasserkort R, Sipos F, et al. Detection of methylated septin 9 in tissue and plasma of colorectal patients with neoplasia and the relationship to the amount of circulating cell-free DNA. *PLoS ONE* 2014; 9: e115415.
- [54] Molnár B, Tóth K, Barták BK, et al. Plasma methylated septin 9: a colorectal cancer screening marker. *Expert Rev Mol Diagn*. 2015; 15: 171–184.
- [55] Johnson DA, Barclay RL, Mergener K, et al. Plasma Septin9 *versus* fecal immunochemical testing for colorectal cancer screening: a prospective multicenter study. *PLOS ONE* 2014; 9: e98238.
- [56] Ebert MP, Model F, Mooney S, et al. Aristaless-like homeobox-4 gene methylation is a potential marker for colorectal adenocarcinomas. *Gastroenterology* 2006; 131: 1418–1430.
- [57] Henriksen SD, Madsen PH, Larsen AC, et al. Promoter hypermethylation in plasma-derived cell-free DNA as a prognostic marker for pancreatic adenocarcinoma staging. *Int J Cancer* 2017; 141: 2489–2497.

- [58] Pack SC, Kim HR, Lim SW, et al. Usefulness of plasma epigenetic changes of five major genes involved in the pathogenesis of colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis.* 2013; 28: 139–147.
- [59] Pedersen SK, Baker RT, McEvoy A, et al. A two-gene blood test for methylated DNA sensitive for colorectal cancer. *PLoS ONE* 2015; 10: e0125041.
- [60] Symonds EL, Pedersen SK, Baker RT, et al. A blood test for methylated *BCAT1* and *IKZF1* vs. a fecal immunochemical test for detection of colorectal neoplasia. *Clin Transl Gastroenterol.* 2016; 7: e137.
- [61] Roperch JP, Incitti R, Forbin S, et al. Aberrant methylation of NPY, PENK, and WIF1 as a promising marker for blood-based diagnosis of colorectal cancer. *BMC Cancer* 2013; 13: 566.
- [62] Barták BK, Kalmár A, Péterfia B, et al. Colorectal adenoma and cancer detection based on altered methylation pattern of *SFRP1*, *SFRP2*, *SDC2*, and *PRIMA1* in plasma samples. *Epigenetics* 2017; 12: 751–763.

(Barták Barbara Kinga dr.,
Budapest, Szentkirályi u 46., 1088
e-mail: bartak.barbara.kinga@gmail.com)

XIX. Romhányi Orvostalálkozó – Lelkigyakorlat (manréza) orvosoknak Szár, 2019. augusztus 31.

Moderátor: *Prof. Dr. Szelényi Zoltán*

Délelőtti program

- 9⁰⁰ Szentmise
- 10⁰⁰ Üdvözlések
Németh Norbert (polgármester)
Prof. Dr. Kellermayer Miklós: „Gyógyszer az örökhalál ellen”
- 10³⁰ *Márfi Gyula* (veszprémi érsek): A betegség hordozása és gyógyítása – mint szakrális cselekedet
- 11⁰⁰ *Legeza József* (teológus, görög katolikus parókus): A magyar görögkatolikus egyház története, helyzete
- 11³⁰ *Rieger Tibor* (szobrászművész): A művészet szellemi alapjai a Koronázó palásttól napjainkig
- Romhányi-emléktábla megkoszorúzása

Délutáni program

- 14⁰⁰ *Prof. Dr. Poór Gyula*: A kórház legyen több, mint kórház
- 14³⁰ *Prof. Dr. Losonczy Hajna*: Az immunglobulin profilaxis jelentősége krónikus lymphoid leukémiában
- 15⁰⁰ *Prof. Dr. Emőd Levente*: Romhányi György klinikopatológiai szemléletének példája az utódgenerációk számára
- 15³⁰ *Prof. Dr. Kondákor István*: A hívő orvos
- Genzwein Ferenc sírjának megkoszorúzása

A cikk a Creative Commons Attribution 4.0 International License (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>) feltételei szerint publikált Open Access közlemény, melynek szellemében a cikk bármilyen médiumban szabadon felhasználható, megosztható és újraközölhető, feltéve, hogy az eredeti szerző és a közlés helye, illetve a CC License linkje és az esetlegesen végrehajtott módosítások feltüntetésre kerülnek. (SID_1)