

# Folyadékbiopszia-vizsgálatok alkalmazási lehetőségei az onkohematológiában

Nagy Ákos<sup>1,@</sup>, Bátai Bence<sup>1</sup>, Kiss Laura<sup>1</sup>, Marx Anita<sup>2</sup>, Pinczés László Imre<sup>3</sup>, Papp Gergő<sup>1</sup>,  
Kacskovics Imre<sup>2</sup>, Alpár Donát<sup>1</sup>, Bödör Csaba<sup>1,@</sup>

<sup>1</sup>Semmelweis Egyetem, I. sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet,

MTA-SE Lendület Molekuláris Onkohematológiai Kutatócsoport, Budapest

<sup>2</sup>Eötvös Lóránd Tudományegyetem, Természettudományi Kar, Immunológiai Tanszék, Budapest

<sup>3</sup>Debreceni Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, Belgyógyászati Intézet, Hematológiai Tanszék, Debrecen

A molekuláris biológiai technikák utóbbi évtizedekben látott fejlődésének köszönhetően a vérplazmában keringő biomolekuláknak, így például a tumor eredetű sejtmentes DNS-fragmentumoknak is korábban elképzelhetetlen mélységű vizsgálata vált elérhetővé. A minimális invazivitással járó folyadékbiopsziás mintavétel metasztatikus tumorok esetében lehetővé teszi eltérő anatómiai lokalizációval megjelenő genetikai aberrációk egyidejű feltérképezését, azok nyomon követését, illetve a klonális evolúció következtében megjelenő további abnormalitások kimutatását is. Ebből következően számos, szolid tumorokat vizsgáló, folyadékbiopsziás mintavételt alkalmazó tanulmány jelent meg az utóbbi évtizedben, néhány entitás vonatkozásában pedig az eljárás már a rutindiagnosztikában is alkalmazásra került. Onkohematológiában az ebből a szempontból legintenzívebben kutatott megbetegedések közé a diffúz nagy B-sejtes limfóma, a Hodgkin-limfóma, illetve a plazmasejtes mielóma tartozik. Saját, illetve irodalmi adatok alapján a tumor eredetű sejtmentes DNS vizsgálata hasznos lehet a kezelést megelőző prognózisbecslésben, a célozható molekuláris eltérések azonosításában, a terápiás hatékonyság és a minimális reziduális betegség monitorozásában, valamint a terápiarezisztens klónok kimutatásában. Jelen összefoglaló közleményünkben a folyadékbiopszia-vizsgálatok onkohematológiai alkalmazásait tekintjük át.

**Kulcsszavak:** folyadékbiopszia, keringő sejtmentes DNS, keringő tumor-DNS, onkohematológia, prognózisbecslés, terápia-monitorozás

## Potential applications of liquid biopsy analyses in oncohematology

Advances in molecular biology techniques during the past decades allowed for the scrutiny of tumor derived biomolecules, including circulating tumor DNA fragments at an unprecedented level. In case of metastatic tumors, the minimally invasive liquid biopsy sampling provides great opportunity to simultaneously detect and monitor genetic aberrations emerging at distinct anatomical sites, and to identify alterations associated with clonal evolution. Consequently, several studies have recently interrogated the utility of liquid biopsy in the analysis of solid tumors, with this approach already being incorporated into the diagnostic workflow of some diseases. In oncohematology, diffuse large B-cell lymphoma, Hodgkin lymphoma and multiple myeloma are the most intensively studied entities in this regard. Based on data previously published by our group and others, the investigation of circulating tumor DNA in hematology has a potential to convey invaluable prognostic information prior to treatment, to detect actionable genetic alterations, to monitor treatment efficacy and minimal residual disease as well as to identify therapy resistant clones. In this review, we provide an overview of the potential applications of liquid biopsy analysis in oncohematology

**Keywords:** liquid biopsy, circulating cell-free DNA, circulating tumor DNA, oncohematology, prognosis assessment, treatment monitoring

(Beérkezett: 2020. szeptember 20.; elfogadva: 2020. október 10.)

@ Levelezési cím: Dr. Nagy Ákos, 1085 Budapest, Üllői út 26.; E-mail: nagy.akos1@med.semmelweis-univ.hu; Tel.: +3630/531-0236; Dr. Bödör Csaba, 1085 Budapest, Üllői út 26.; E-mail: bodor.csaba1@med.semmelweis-univ.hu



**1. táblázat.** A hagyományos szövetbiopszia és a folyadék-biopsziás eljárások előnyeinek és hátrányainak összehasonlítása. CHIP: időskori klonális vérvérvétel (*clonal hematopoiesis of indeterminate potential*)

|           | Szövetbiopszia                                            | Folyadékbiopszia                                                                                                  |
|-----------|-----------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Előnyök   | „gold standard”                                           | minimálisan invazív                                                                                               |
|           | általában nagy mennyiségű DNS nyerhető ki                 | többszöri mintavétel lehetséges                                                                                   |
| Hátrányok | invazív                                                   | monitorozásra alkalmas                                                                                            |
|           | monitorozásra nem alkalmas                                | térbeli heterogenitás szempontjából reprezentatív                                                                 |
|           | térbeli heterogenitás vizsgálatára korlátozottan alkalmas | nehezen biopszizálható területekről is ad információt                                                             |
|           |                                                           | metasztázis pontos lokalizációjának ismerete nem szükséges                                                        |
|           |                                                           | gyakran kevés DNS nyerhető ki                                                                                     |
|           |                                                           | egészséges sejtekből felszabaduló keringő DNS „hígítja”                                                           |
|           |                                                           | szomatikus genetikai eltéréseket hordozó nem tumoros állapotok (pl. CHIP) befolyásolhatják a vizsgálat eredményét |
|           |                                                           | nem ad anatómiai információt a primer tumorról vagy a metasztázisokról                                            |

rokból felszabaduló vagy remisszióban lévő betegekben jelenlevő csekély mennyiségű ctDNS jelenti [11]. Ezenkívül a nem tumoros szövetekből folyamatosan felszabaduló cfDNS tovább csökkenti a ctDNS folyadékbiopsziában mutatkozó arányát, aminek a mértéke 90% és 0,1% között változhat [12]. További nehézséget jelent a biológiai öregedés során felhalmozódó szomatikus genetikai eltéréseknek, illetve az időskori klonális vérvérvételhez (*„clonal hematopoiesis of indeterminate potential”*, CHIP) társulóan megjelenő mutációknak a kiszűrése és elkülönítése a daganatból eredő eltérésektől (1. táblázat) [13].

A felsorolt limitációkból következik, hogy a folyadékbiopsziás minták vizsgálata magas érzékenységű technológiákat igényel, melyeket PCR és szekvenálás alapú technikákra oszthatunk. A PCR alapú technikák közül a digitális droplet PCR-t (ddPCR) az eljárás nagy érzékenysége (akár 0,01%-os érzékenység is elérhető) teszi alkalmassá folyadékbiopsziás vizsgálatokra [14–16]. Hátránya, hogy a módszerrel csak limitált számú molekuláris célpont vizsgálható. A szekvenálás alapú technikák közül az új generációs szekvenálás (NGS) rendelkezik megfelelő érzékenységgel a folyadékbiopsziás vizsgálatokhoz [2, 17], amivel akár teljes genom- (WGS) vagy teljes exom- (WES) szintű lefedettség is elérhető (bár WGS vagy WES esetén csak alacsony érzékenység érhető el).

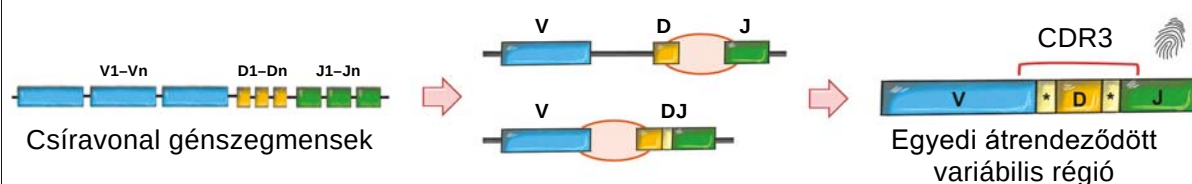
Szolid tumorok kapcsán az utóbbi évtizedben számos folyadékbiopszia alapú tanulmányt publikáltak, kiemelve hogy tüdő-adenocarcinomák és vastagbél-daganatok esetén a ctDNS-vizsgálatok már a rutindiagnosztikus [18], illetve „screening” [19] irányelvek részeként képezik. A folyadékbiopszia szenzitivitása meghaladja a képalkotó vizsgálatok érzékenységét, így a közelgő relapszus előrejelzésére és terápiás beavatkozásra kínál lehetőséget [20], melynek következtében onkohematológiában az eljárás egyik legígéretesebb felhasználási területe a daganatok molekuláris nyomon követése lehet.

## A folyadékbiopszia vizsgálatának jelentősége onkohematológiában

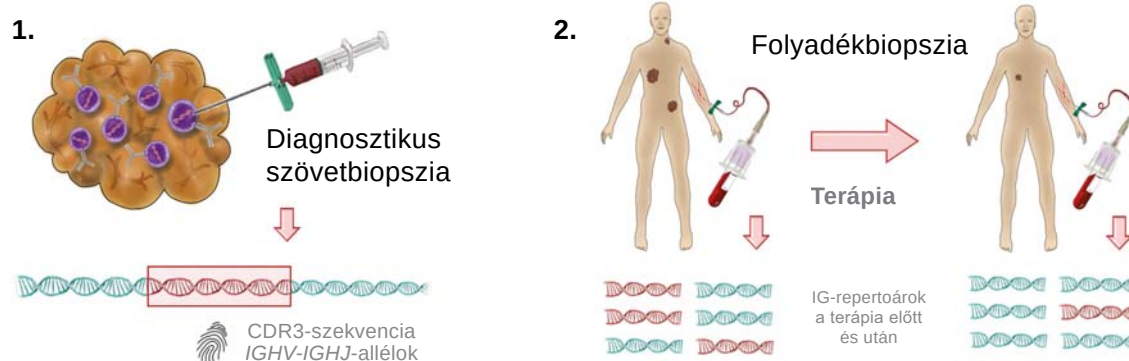
Onkohematológiai kórképek esetében a ctDNS vizsgálata történhet az első vonalbeli kezelést megelőzően, célozható és/vagy követhető molekuláris eltérések kimutatásának és a prognózis meghatározásának céljából, illetve kezelés alatti szekvenciális mintavételekkel a terápiás válasz monitorozása, valamint rezisztenciamutációk detektálása végett [21]. Kezelést követően a kuratív szándékkal kezelt agresszív hematológiai betegségek esetén főleg a minimális reziduális betegség (MRD) jelenlétének kizárása, indolens megbetegedések esetén pedig jellemzően a relapszusoknak és a betegség akcelerációjának a kimutatása, illetve a klonális evolúció vizsgálata a cél [22].

A nem leukémiás vérképpel járó hematológiai malignitások esetén a keringő tumorsejtek (CTC) hiányának, illetve alacsony számának köszönhetően kiemelt igény mutatkozik a ctDNS alapú betegségvizsgálatra. A legintenzívebben kutatott entitások a diffúz nagy B-sejtes limfóma (DLBCL), a Hodgkin-limfóma (HL) és a plazma-sejtes mielóma (PCM). Bár leukémiás megbetegedések esetén elsősorban a véráramban keringő leukémiás sejtek képezik a vizsgálat tárgyát, e betegségek kapcsán is lehet létjogosultsága a ctDNS alapú vizsgálatoknak limfo/leukopénia, MRD-kimutató vagy különböző anatómiai kompartmentekbe (pl. csontvelő, nyirokcsomó) szekvesztrálódott klónok vizsgálata esetén.

Onkohematológiában az NGS alapú vizsgálatokkal a malignus klónra ujjlenyomatszerűen jellemző immunoglobulin- (IG) vagy T-sejt-receptor- (TCR) génátrendezés diagnosztikus szövetbiopsziából (pl.: nyirokcsomó, csontvelő) történő meghatározását követően, a már ismert átrendezés vérplazmából is kimutatható és nyomon követhető nagy áteresztőképességű IG vagy TCR NGS-sel (TCR/IG high-throughput sequencing, IGHTS/TCR-HTS) [17] vagy ddPCR-rel (2. ábra). Több gén mu-

a) VDJ-rekombináció – *IGH*

## b) Folyadékbiopszia vizsgálata IGHTS-sel



**2. ábra.** Az immunoglobulin-génátrendeződés kialakulása, valamint kimutatása és nyomon követése NGS-sel. **a)** Az immunoglobulin-nehézlánc- (*IGH*) gén átrendeződésének folyamata véletlenszerűen, egy „variable”, egy „diversity” és egy „joining” génszegmens rekombinációja által jön létre. A folyamat során a génszegmensek közé templát nélküli, ún. N/P-nukleotidok beépülése (az ábrán sárga mezőben \* jelöléssel) tovább növeli az ún. kapcsolódási régió (complementarity-determining region, CDR3) variabilitását. A CDR3 szekvenciája minden B-sejtet egyedi ujjlenyomatként jellemez, így ennek kimutatása kellőképpen specifikus egy-egy vizsgált tumor vonatkozásában. **b)** 1. A malignus limfoid klónra jellemző immunoglobulin- (*IGH*) génátrendeződés azonosítása diagnosztikus szövetbiopsziából új generációs szekvenálással (Immunoglobulin High-throughput Sequencing, IGHTS). 2. A kezelés során az előzőleg azonosított *IGH*-szekvencia (az ábrán piros DNS-sel jelölve) kimutatása és követése minimálisan invazív molekuláris biológiai technikával

tációs státuszának szimultán vizsgálatára betegség specifikus génpanelek alkalmazhatóak. A ddPCR-t az egyes entitásokra jellemző pontmutációk minimál invazív kimutatására és nyomon követésére használhatjuk az onkohematológiai kórképek esetében.

Összefoglalónkban először a folyadékbiopsziás vizsgálatok fő célpontjának számító non-Hodgkin-limfómákkal (NHL) kapcsolatos tanulmányokat összegezzük, melyet a HL, a PCM és a krónikus limfocitás leukémia (CLL) tárgyalása után a mieloid betegségekkel kapcsolatos közlemények áttekintése követ.

## Diffúz nagy B-sejtes limfóma

A folyadékbiopszia szempontjából jelenleg a DLBCL a legrészletesebben tanulmányozott onkohematológiai entitás; az eljárást tesztelték a terápiát megelőzően nyert mintavételek prognosztikus értékének vizsgálatára, illetve kezelési hatékonyság monitorozása és korai relapszus detektálásának tekintetében is.

A kezelés előtti folyadékbiopsziás minta reprezentativitását Roschewski és mtsai 126, míg Kurtz és mtsai 75 betegen vizsgálták IGHTS-sel [23, 24]. Mindkét munka-

csoport 82–92%-os találati aránnyal tudta a daganatos klónra jellemző immunoglobulin-nehézlánc- (*IGH*) génátrendeződést kimutatni cfDNS-ből. A klonálisan átrendeződött *IGH* és a nem klonálisan átrendeződött *IGH*-génszekvenciák arányából meghatározott ctDNS-szintek korreláltak a képző technikákkal meghatározott tumortömeggel, a nemzetközi prognosztikus indexszel és a szérumban laktát dehidrogenáz- (se-LDH) szinttel. A folyadékbiopsziás tanulmányok között etalonnak számító vizsgálatban, Scherer és mtsai 268 gén mutációs státuszát vizsgálták 92 DLBCL-ben szenvedő beteg vérplazmáimintáin [25]. Célzott génpanel-szekvenálással minden egyes beteg kezelés előtti mintájából sikeresen tudtak kimutatni tumor eredetű szekvenciát, ami előrelépés az IGHTS 82–92%-os szenzitivitásához képest (a leggyakrabban talált eltérések a *KMT2C*, *TP53*, *PIM1*, *BCL6* és a *BTG1* gének szomatikus mutációi voltak). A primer tumorszövetből korábban kimutatott, centrum germinativum eredetű limfómákra, így DLBCL-re is jellemző géntöréseket és transzlokációkat (*BCL-2*, *BCL-6*, *C-MYC* és *IGH*) 78%-os találati aránnyal tudtak minimál invazív módon detektálni, továbbá a DLBCL sejteredetét (centrum germinativum vs. aktivált B-sejt fenotípusú) is meg tudták határozni. Rossi és mtsai olyan DLBCL-re jellemző

szomatikus mutációkat mutattak ki ctDNS-analízissel, melyeket a betegek szövettani mintáiban nem detektáltak, ezáltal feltételezhető, hogy ezek a mutációk a szövettani analízis során nem vizsgált nyirokcsomókból eredtek [26]. A jövőben a plazmából kimutatott genetikai eltéréseknek akár prediktív, kezelést befolyásoló értéke is lehet; ugyanis minimálisan invazív módon detektálhatónak bizonyultak az immunellenőrzőpont-gátló *PD-L1* és *PD-L2* célgének amplifikációi [27], illetve a HDAC-gátló panobinostatra érzékenyítő *MEF2B* gén szomatikus mutációi [28].

A folyadékbiopsziás vizsgálat alkalmazhatóságát DLBCL monitorozására elsőként Roschewski és mtsai tesztelték EPOCH-R immunkemoterápiás kezelésben részesülő betegeken [24]. Eredményeik szerint a második ciklust követően észlelt reziduális ctDNS csökkent 5 éves progressziómentes túléléssel (PFS) társul a későbbiekben (80,2% ctDNS-negatív, 41% ctDNS-pozitív betegek esetén). A 107 vizsgált betegből 11 év medián követési idő mellett a betegek 16%-a relabált, e betegek 91%-ában sikerült ctDNS-t kimutatni medián 3,5 hónappal a klinikai relapszus előtt. A relapszusrizikó 228-szorosára növekedett azon betegeken, akikben képkotókkal megerősített komplett remisszió (CR) ellenére ctDNS-t lehetett detektálni. Rossi és mtsai tanulmányában R-CHOP-kezelésre reagáló betegeken gyors ctDNS-elimináció, R-CHOP-kezelésre refrakter esetekben perzisztáló szomatikus mutációk, illetve újonnan megjelenő mutációk voltak jellemzőek [26]. Kurtz és mtsainak 2018-as tanulmánya alapján a második terápiás ciklus befejeztével legalább kettő, a kezelés harmadik ciklusát követően pedig legalább 2,5 nagyságrendű ctDNS-szintcsökkenés szignifikánsan jobb 2 éves esemény nélküli túléléssel társul [29]. Ennek kapcsán a szerzők felvetették a krónikus mieloid leukémia *BCR-ABL1* alapú molekuláris monitorozásánál alkalmazott, korai molekuláris válaszként, illetve major molekuláris válaszként értelmezett küszöbértékek bevezetését. Újabb irodalmi adatok alapján a kiméra antigénreceptorral felruházott T-sejtes terápia hatékonysága is kimutatható és monitorozható DLBCL-ben folyadékbiopsziás vizsgálat [30].

## Folikuláris limfóma

Az utóbbi két évtized tanulmányaiban ellentmondásos adatok születtek a t(14;18)-pozitív sejtek kimutathatóságának és monitorozásának hatékonyságáról FL-ben [31–36]. A változó siker háttérében többek között a perifériás vérben keringő tumorsejtek hiánya állhat, ezért FL-ben is a folyadékbiopszia alapú megközelítésnek lehet kiemelt jelentősége.

DLBCL-hez hasonlóan FL esetén is a diagnóziskori magas ctDNS-értékek rövidebb PFS-sel [37] és PET-CT-n detektált nagyobb tumortömeggel társulnak [38]. Scherer és mtsai klonális evolúciós mintázatokat vizsgálva megfigyelték, hogy az FL DLBCL-be történő transzformációját a plazma-DNS-mintákban detektálható szomatikus mutációk számának nagyfokú emelkedése előzi meg [25].

FL-es betegek esetén a leggyakrabban előforduló mutációk (*KMT2D*, *CREBBP*, *TNFRSF14*) közül kiemelendők az esetek 25%-ában kimutatható *EZH2*-génmutációk [39, 40], melyek aktiváló jellegük miatt attraktív gyógyszerfejlesztési célpontok [41]. A szelektív *EZH2*-inhibitor tazemetostatot idén nyáron engedélyezte az Amerikai Élelmiszer és Gyógyszerengedélyeztetési Hivatal korábban legalább két szisztémás kezelésben részesült relabáló/refrakter FL-es betegek kezelésére [42]. A kezelésre adott biztató terápiás eredmények mellett (teljes válaszadási arány *EZH2*-mutáns betegeknél 77%, *EZH2* vad típusú betegeknél 34%) [43] kiemelendő, hogy a vizsgált génmutációk közül szövetmintákban és a kezelés előtti ctDNS-mintákban kizárólag az *EZH2*-mutációk bizonyultak prediktívnek a kezelés vonatkozásában [44]. Munkacsoportunk legújabb eredményei alapján immunkemoterápiás kezelésben részesülő, *EZH2*-mutáns FL-es betegeknél az *EZH2*-mutációk allélfrekvenciája párhuzamosan változik a kezelés hatékonyságával, illetve a PET-CT-n látott tumortömeg kiterjedésével [45].

## Központi idegrendszeri limfómák

A központi idegrendszeri (KIR) limfómák jelentik a folyadékbiopsziás vizsgálatok egyik legkézenfekvőbb célcsoportját a hematológiai malignitások közül, mivel ennél a betegségnél hatványozott igény van a minimálisan invazív vizsgálatokra.

Az első PCNSL-lel foglalkozó tanulmányok ctDNS-vizsgálattal változó mértékben tudtak kimutatni korábban tumorszövetben azonosított genetikai léziókat (NGS-sel kb. 30%-os [46], nagy érzékenységgel *MYD88*-mutáció specifikus ddPCR-rel 50 [47], illetve 100%-os korrelációt találva [48]), aminek magyarázata intakt vér-agy gát esetén az agyszövet vér irányú alacsony átteresztőképeség lehet. Ezt követően több kutatócsoport vizsgálta és bizonyította a cerebrospinális folyadék használhatóságát folyadékbiopszia alapú vizsgálatokra PCNSL-ben [49–52], ami egy ugyancsak minimálisan invazív alternatívája lehet a PCNSL molekuláris vizsgálatainak. Watanabe és mtsai ezenfelül 9 *MYD88*-mutációt hordozó PCNSL-es beteg vizeletéből 8 esetben mutatták ki a mutációt [48], a leírt megközelítés így egy valóban non-invazív mintagyűjtési alternatívaként kecsegtet.

Az eddigi legátfogóbb folyadékbiopsziás vizsgálatot Bobillo és mtsai közölték, 19 limfómás beteg (6 PCNSL, 1 szisztémás limfóma KIR érintettséggel, 12 szisztémás limfóma) mintáinak analízise során a korábbi tanulmányokkal egybevágóan a liquor-ctDNS-analízis 100%-ban, míg a plazma-ctDNS-analízis 30%-ban fedett át a tumorszövet molekuláris vizsgálatával. A detektált mutációk allélfrekvenciája a plazmában alacsonyabb volt, mint az azonos időben nyert liquormintákban. Kezelés hatására ebben a betegségben is a ctDNS-frakciók eliminációja volt megfigyelhető, két relabáló esetben a mutációk újbóli megjelenését észlelték 3, illetve 8 hónappal a relapszus előtt.

MRD-vizsgálat szempontjából a liquor-folyadékbiopszia érzékenyebbnek bizonyult, mint a liquoráramlási citometriás (FCM) vizsgálata [52].

Egy Ib. fázisú klinikai kutatásban a vizsgált kombinációs kezelés (metotrexát, ibrutinib, rituximab) hatékonyságának felmérése mellett a liquor-ctDNS-biomarkerként való alkalmazhatóságát is tesztelték. A 15 kezeléssel átesett beteg közül 7 ért el CR-t, mely esetekben a liquor-DNS-ben a korábban detektált mutációk eltűnését észlelték, melyek relapszust megelőzően újfent detektálhatóvá váltak [53].

## Köpenysejtes limfóma

MCL esetén a vérben keringő tumorsejtek gyakori jelenléte miatt viszonylag kevés tanulmány foglalkozott a ctDNS alapú betegség- és terápiamonitorozással. A tanulmányokban a *CCND1*- és az *IGH*-gén átrendeződésével járó t(11;14) transzlokáció kimutatása a leginkább széleskörűen használt molekuláris biológiai módszer az MRD detektálására, ami a betegek 40–90%-nál alkalmazható [54, 55]. Az esetek 20%-ában az atípusos transzlokáció a szokványos PCR primerekkel nem mutatható ki, ezért MCL esetén is az *IGH*-génátrendeződés detektálásának és monitorozásának, illetve specifikus célzott génpanelek alkalmazásának térhódítása várható.

Elsőként Roschewski és munkacsoportja vizsgálta a folyadékbiopszia rejtette lehetőségeket az MCL terápiájának nyomon követésében [56]. Terápiát megelőzően 48 beteg vizsgálata során 46 (96%) esetben mutattak ki ctDNS-t a plazmában IGHTS segítségével. Az így detektált ctDNS-szintek szorosabban korreláltak a képzőanyagok módszerekkel meghatározott tumorterheléssel, mint a se-LDH-szint vagy a tumorbiopsziával meghatározott Ki-67 proliferációs index. Negyvenegy progrediáló betegből 31 esetén medián 9 hónappal tudták előre jelezni a progressziót, míg a nem progrediáló betegek 88%-ának vérplazmamintájában nem volt kimutatható ctDNS. A DLBCL-ben leírtakhoz hasonlóan MCL esetén is a korai, 1–2 ciklust követő ctDNS-elimináció kedvező PFS-t (76,4 vs. 20,7 hónap) és 4 éves várható túlélést (OS) jelez előre (92,3% vs. 73,0%) [57].

Egy II. fázisú klinikai vizsgálat keretén belül Agarwal és mtsai 23 ibrutinib és venetoclax kombinált kezelésben részesülő, relabáló/refrakter MCL-es betegen vizsgálták a ctDNS prediktív értékét. Az *ATM*-mutáns betegek jellemzően jól reagáltak a kezelésre, a 9p21.1–p24.3 kromoszóma régió delécióját hordozó betegek kétharmada azonban relabált, míg a primeren refrakter betegek mindegyikében kimutatható volt az eltérés [58].

## Perifériás T-sejtes limfómák

Az utóbbi évek molekuláris biológiai kutatásainak eredményeként egyre több ismerettel rendelkezünk a perifériás T-sejtes limfómák (PTCL) egyes altípusainak hátteré-

ben álló genetikai eltérésekről, ami megnyitotta a teret a betegségekre jellemző mutációk vérplazmából történő kimutatása és követése előtt [59].

Sakata-Yanagimoto és mtsai angioimmunoblasztos T-sejtes limfómában és tovább nem osztályozható PTCL-ben szenvedő betegek esetében vizsgálták a betegségre jellemző *TET2*-, *RHOA*-, *DNMT3A*- és *IDH2*-mutációk kimutathatóságát vérplazmamintákból [60]. 14 beteg szövethiopsziás mintájában azonosított 29 mutáció közül 24 a kezelést megelőző ctDNS-mintában is detektálható volt NGS-sel. Egy másik tanulmányban Sun és mtsai 12 NK/T-sejtes limfómában szenvedő beteg vérplazmamintájából összesen 30 gén mutációját mutatták ki. A mutációk leggyakrabban a *TP53* és a *STAT3*, valamint az epigenetikai szabályozásban szerepet játszó géneket érintették [61].

A folyadékbiopszia alkalmazását a terápia monitorozására elsőként Melani és mtsai vizsgálták 50 PTCL-ben szenvedő beteg esetében [62]. A 18 tumorszérum mintapárral rendelkező beteg közül 10 esetben detektálták a *TCR*-gén klonális átrendeződését NGS alapú analízissel. Tanulmányukban a ctDNS megjelenése átlagosan 13,2 hónappal előzte meg a klinikai progressziót.

A PTCL altípusok genetikai hátterének közelebbi megismerésével és a célzott terápiás lehetőségek megjelenésével a ctDNS-ből történő mutációanalízis és az MRD-monitorozás előtérbe kerülhet a B-sejtes non-Hodgkin-limfómákhoz hasonlóan ebben az entitásban is.

## Hodgkin-limfóma

Más onkohematológiai kórképektől eltérően a HL nem rendelkezik klasszikus, kromoszómaszintű, visszatérő citogenetikai eltéréssel, ráadásul a daganatos sejtek szórványos előfordulása az érintett nyirokszövetben állandó nehézséget okoz a daganatos Hodgkin- és Reed-Sternberg-(HRS) sejtek célzott vizsgálatában. Ennek ellenére mind a HRS-sejtek DNS-ének izolációja, mind a folyadékbiopsziás minták szekvenálása számos, akár 30–50%-os gyakorisággal előforduló, jellemző szubmikroszkópikus genetikai aberrációt tárt fel HL-ben [63]. Külön kiemelendő, hogy a HL-es betegek vérplazmájában előforduló ctDNS mennyisége összemérhető a más limfoproliferatív betegségekből tapasztaltakkal [64], melynek hátterében a HRS sejtek jelentős „turnover”-e állhat.

Hohaus és mtsai már 2009-ben bemutatták, hogy a magasabb ctDNS-koncentrációk rosszabb prognózissal társulnak [65]. A HL ctDNS-analízisében rejlő igazi lehetőségekre azonban Vandenberghe és mtsai véletlen felismerése hívta fel a figyelmet: egy panaszmentes várandós nő keringő DNS-ének genomikai eltérései egy klinikai tüneteket nem okozó, korai stádiumú HL diagnózisához vezettek [66]. Az ezt követően vizsgált kilenc, nodularis sclerózis szövettani altípussal rendelkező HL-es beteg vérplazmájának ctDNS-tartalma reprezentatívnak bizonyult a párhuzamosan vett biopsziás mintákból kimutatható genetikai eltérésekre. A ctDNS kemoterápiás kezelést

követő rapid csökkenése pedig jól tükrözte a terápiás választ.

Camus és mtsai ezt követően már nagyobb betegcsoporton a terápia hatékonyságának feltérképezését tűzték ki célul [67]. Egyetlen „hotspot” mutáció, az *XPO1* jelenlétét vizsgálták ddPCR-rel a diagnózis idején és az első vonalbeli kezelés befejezését követően. A kontrollmintában még kimutatható mutáns *XPO1* ctDNS-fragmentumokkal rendelkező betegek 2 éves OS-e és PFS-e egyaránt elmaradt az *XPO1*-negatív betegtársakétól. Figyelmet érdemel, hogy a relabáló betegek közül mindössze egy volt PET-pozitív a „restaging” vizsgálat alkalmával. A HL és ctDNS vonatkozásában jelenleg etalonnak számító vizsgálatba Spina és mtsai 80 újonnan diagnosztizált és 32 refrakter HL-s beteget vontak be [68]. A betegek longitudinális vizsgálata igazolta, hogy a ctDNS független biomarkerként alkalmas lehet a terápia hatékonyságának ellenőrzésére, ezáltal a terápiarefrakter-betegek korai azonosítására. A DLBCL-ben látottakhoz hasonlóan a második ciklus ABVD-kezelést követően a ctDNS-szint 100-szoros esése kedvező kimenetelt és jobb remissziós arányt jelölt. Érdekesség, hogy a nivolumabbal kezelt betegek mutációs profilja kifejezetten gyors átalakuláson ment át, ami felveti, hogy az immunellenőrzőpont-gátlók által kiváltott szelekciós nyomás nagyobb, mint a klasszikus kemoterápiáké.

A transzplantációt követő MRD-monitorozás fogja a kutatások következő fejezetét jelenteni HL-ben. Ebben hosszú távon az *IGH*-génátrendeződések vizsgálatánál minden bizonnyal kevésbé ellentmondásos célpontok lesznek segítségünkre [69, 70]. Összességében elmondható, hogy a ctDNS vizsgálata HL-ben a minimálisan invazív MRD-monitorozás és a klonális evolúció korai felismerésének lehetőségét hordozza magában. A módszer mindennapi betegellátásba való beemelése első lépése egy HL-re reprezentatív, ám költséghatékony genetikai szűrőpanel összeállítása lehet. Amennyiben ez teljesül, prospektív tanulmányok adhatják meg arra a választ, hogy a ctDNS specificitásában és szenzitivitásában felül tudja-e múlni a PET-CT korántsem makulátlan mutatóit.

## Plazmasejtes mielóma

Az új generációs terápiák és az egyre hatékonyabb kezelési algoritmusok következtében a PCM esetén is felértékelődött az MRD kimutatásának és követésének jelentősége [71, 72]. A mielomás klónok jellegzetes csontvelői elhelyezkedése következtében a „gold standard” mintavételi eljárás a csontvelő-biopszia és aspiráció, melyek invazivitásuk következtében nagy terhet rónak a betegekre. Ezenkívül a PCM-re is jellemző térbeli heterogenitás miatt az egyetlen helyről nyert csontvelői minták reprezentativitása is kérdéses [73]. A fenti okok miatt a PCM a hematológiai megbetegedéseken belül kitüntetett szereppel bír a folyadékbiopszia központú kutatások terén.

Gerber és mtsai, valamint Kis és mtsai 21, illetve 53 PCM-ben szenvedő beteg NGS-analízise során megfi-

gyelték, hogy a csontvelőmintából azonosított mutációk nagy többsége kimutatható ctDNS-ből is [74, 75]. Mithraprabhu és mtsai eredményei alapján, a kezelés előtti ctDNS-szintek korrelálnak a betegség stádiumával, így közvetve a várható túléléssel is, a kutatók viszont nem találtak összefüggést a ctDNS-koncentráció, a szérumban lévő paraprotein és a szérumban lévő könnyűláncmennyiséggel, illetve a csontvelő plazmasejtes infiltrációjának mértékével [76]. Az *IGH*-gén átrendeződését Biancon és mtsai 25 PCM-es beteg 88%-ában azonosították csontvelőből IGHTS-sel, mely átrendeződések mindegyike detektálható volt a plazmában is [77]. Ezzel ellentétben egy másik tanulmányban csak a betegek mintegy felénél (51,4%) tudták a csontvelőből meghatározott *IGH*-génszekvenciát a vérplazmából kimutatni, ami felveti a tumorspecifikus *IGH* kimutatása mellett további gének együttes vizsgálatának szükségességét [78].

A ctDNS-vizsgálatban rejlő potenciált a terápia monitorozását illetően PCM-ben először Oberle és mtsai vizsgálták 27 beteg követésével [79]. A kezelés befejezését követően a terápiára nem vagy rosszul reagáló páciensek 91%-ában, míg a terápiára jól reagálók csupán 41%-ában lehetett ctDNS-t kimutatni. Rustad és mtsai megfigyelték, hogy a ctDNS-szintek remisszió alatt gyakran detektálási szint alá csökkennek, míg a betegség agresszívvá válását a ctDNS-szintjének gyors és jelentős emelkedése előzi meg [80]. Kezeletlen betegek folyadékbiopsziás mintáiban az *NRAS*-mutációk számítanak a leggyakoribb szomatikus eltérésnek, míg relapszuskor a *KRAS*-mutációk arányának a növekedését lehet megfigyelni a szomatikus *TP53*-aberrációk megjelenése mellett [76]. Egy új, érdekes lehetőség a plazma extracelluláris vezikulák vizsgálata, melyek felszíni fehérjeiben kezelés hatására létrejövő fenotípusváltozások a terápia hatékonyság követésére használhatóak [81].

Több tanulmányban is azonosítottak mutációkat vagy *IGH*-átrendeződéseket kizárólag a plazmából, mely eltérések a csontvelői minta analízisével nem voltak detektálhatók, aminek hátterében PCM esetén is a térbeli heterogenitás feltételezhető [75–77, 82]. „Smouldering” PCM-es betegekben és nem meghatározott jelentőségű monoklonális gammopátiában szenvedőkben is kimutathatók PCM-asszociált molekuláris eltéréseket hordozó ctDNS-fragmentumok, melyek abszolút mennyisége elmarad a klasszikus PCM-ben észlelt mennyiségektől, alátámasztva azt a kézenfekvő feltételezést, hogy a plazma-ctDNS-frakció kiterjedése arányos a betegség agresszivitásával [74, 82].

## Krónikus limfocitás leukémia

Leukémiák esetében a keringő leukémiás sejteken alapuló vizsgálatok nagyobb jelentőséggel bírnak a betegség kimutatásában és nyomon követésében, mint a ctDNS-analízis, ezért viszonylag kevés irodalmi adat áll rendelkezésre folyadékbiopsziás mintákat vizsgáló kutatásokról.

CLL-ben elsőként Yeh és mtsai vizsgálták a 7 leggyakrabban mutált gén (*SF3B1*, *NOTCH1*, *ATM*, *TP53*, *MYD88*, *KRAS*, *BIRC3*) vérplazmában való detektálhatóságát [83]. A vérplazmában, illetve a keringő tumorsejtekben 96%-ban egyezett az egyes gének mutációs státusza az ibrutinib- vagy a venetoclaxterápia megkezdése előtt, míg kezelés után az esetek 20%-ában találtak a ctDNS-frakcióban olyan mutációt, amely a keringő tumorsejtekben nem volt kimutatható. Ezt a különbséget valószínűleg a nyirokcsomókban szekvesztrálódott klónokból származó ctDNS okozhatta. A mutációanalízis mellett követték a ctDNS mennyiségi változása és a perifériás vér limfocitaszáma (PBL) közötti korrelációt is. Venetoclaxkezelés hatására a PBL- és a ctDNS-szint egyaránt csökkent, míg ibrutinibterápia mellett a limfadenopátia párhuzamosan mérséklődött a ctDNS-szintcsökkenéssel, ami jelezheti a terápiára adott kedvező választ a növekvő PBL ellenére. Három Richter-szindrómás (RS) beteg csontvelő- vagy nyirokcsomómintájából kimutatott, transzformációt okozó molekuláris eltérések detektálhatók voltak ctDNS-ből is, ellenben a véráramban keringő CLL-es sejtek vizsgálatával nem tudták igazolni ezeket. Egy esetben a klinikailag manifest RS kialakulása előtt két hónappal tudták előre jelezni a későbbi transzformációt.

Munkacsoportunk 2018-ban az elsők között írta le, hogy az eltérő kompartmentekben megjelenő, célzott terápiára rezisztens klónok egyszerre detektálhatók ctDNS-analízissel [84]. Esettanulmányunkban egy 47 éves, ibrutinibbel kezelt beteg perifériás vérében keringő leukémiás sejteiben mutattuk ki az ibrutinibrezisztenciát okozó *BTk* C481S aminosavcserét, mely eltérésre a beteg nyirokcsomó-biopsziás mintája negatívnak bizonyult. *PLCG2*-mutáció esetében a helyzet fordított volt: a vad típusú allél volt jelen a leukémiás sejtekben, a mutáns allél pedig a nyirokcsomóban. A ctDNS-ben, ugyan alacsony allélfrekvenciával, de mindkét génre nézve ki tudtuk mutatni a mutációkat ddPCR-rel. Az eset jó példa a térben elkülönülő, klinikailag releváns klonális evolúció egyidejű, minimálisan invazív detektálására.

## Akut mieloid leukémia és mielodiszpláziás szindróma

Az akut mieloid leukémia (AML) diagnosztikájában és monitorozásában kiemelt szereppel bírnak a molekuláris diagnosztikai vizsgálatok, melyeknek a betegség prognózisának meghatározása mellett számos esetben prediktív értékük is van [85–89]. Az utóbbi években a citogenetikai eltérések mellett AML-ben is előtérbe került a génmutációk vizsgálata, azonban a betegség követése során a rutinszerű monitorozásra továbbra is a keringő AML-es sejtek multiparaméteres FCM- és valós idejű kvantitatív PCR- (RT-qPCR) analízise használatos [90]. Bár ezek a vizsgálatok a relapszus kimutatására jól használhatók, segítségükkel a betegség klonális összetételének változása nem vagy

csak nagyon körülményes módon követhető. További nehézséget jelent az MRD perifériás vérből történő kimutatása, amennyiben a csontvelői blasztok nem vagy csak minimális arányban jelennek meg a periférián. AML-ben ezen limitációknak az áthidalására jelenthet jó lehetőséget a folyadékbiopsziás vizsgálat, mellyel közelebbi képet kaphatunk a csontvelőben végbemenő folyamatokról.

A hematológiai malignitások közül mielodiszpláziás szindrómában (MDS) és AML-ben elsőként Vasioukhin és mtsai vizsgálták a ctDNS-ben megjelenő mutációkat, 1994-ben [91]. Tíz remisszióban lévő beteg vérplazmamintáját vizsgálva öt beteg esetében sikerült kimutatni az *NRAS*-gén mutációit. A plazmából végzett biomarker-kutatásoknak az érzékenyebb molekuláris diagnosztikai módszerek megjelenése adott új lendületet. Ennek első példáiként két kutatócsoport nagyobb szenzitivitással detektált *NPM1*-mutációkat RT-qPCR-rel folyadékbiopsziás mintákban, mint keringő AML-es tumorsejtekben [92, 93]. Allogén hematopoetikus őssejtátültetés (allo-HSCT) vonatkozásában elsőként Nakamura és mtsai vizsgálták a vérplazmában megjelenő ctDNS prognosztikai szerepét. A tanulmányban transzplantációt megelőzően csontvelőből azonosított pontmutációk jelenlétét vizsgálták folyadékbiopsziás mintákban egy, illetve három hónappal az allo-HSCT-t követően. Az egy hónap után pozitív vérplazmamintával rendelkezőkben a relapszusarány 65,6% vs. 9,0%, míg a három hónap után mutációt hordozókban 71,4% vs. 8,4% volt a negatív mintát adókhöz képest [94].

Az MDS monitorozása az AML-hez hasonlóan elsősorban a csontvelőminták vizsgálatával történik, azonban a rendszeres mintavételek nagy megterhelést jelenthetnek a betegek számára. A betegségre jellemző ineffektív vérképzést nagyszámú sejtszétesés jellemzi, ami jó lehetőséget biztosít a keringésbe jutó ctDNS vizsgálatára. Suzuki és mtsai 33 MDS-es beteget vizsgálva a nagyobb tumorterhelést jelző magasabb IPSS pontszámhoz, illetve se-LDH szinthez társulóan magasabb ctDNS-szinteket figyeltek meg a betegekben [95], a limfoid megbetegedésekhez hasonlóan. Yeh és mtsai 12 beteg monitorozása során 10 beteg esetében mutattak ki drivermutációkat a csontvelőminták célzott szekvenálásával, melyek ddPCR-rel minden esetben azonosíthatók voltak a ctDNS-ből is. A kimutatott mutációk VAF-ja szignifikáns korrelációt mutatott a csontvelői mintában detektált mutációk allélfrekvenciájával. Egy beteg esetében 9q deléciót azonosítottak a ctDNS-mintából, mely a terápia hatására eltűnt mind a csontvelő-, mind a perifériás kompartmentből, majd újra megjelent a plazmában, három hónappal megelőzve a relapszust [96].

A ctDNS vizsgálata AML-ben és MDS-ben a csontvelő-, valamint perifériás vérminták keringő leukémiás sejteiben végzett vizsgálatok kiegészítésére szolgálhat, hosszú távon pedig hozzájárulhat ezen entitások érzékeny, minimálisan invazív monitorozásához, valamint a célzott terápiák hatékonyságának követéséhez.

## Mieloproliferatív neopláziák

A perifériás vérből történő molekuláris diagnosztika a hematológiai malignitások közül elsőként a krónikus mieloid leukémia esetében vette át részlegesen a hagyományos patológiai vizsgálatok szerepét. A *BCR-ABL1*-fúziós transzkriptum mérése a perifériás vérben keringő leukémiás sejtekből mára standard vizsgálatnak tekinthető, mely a terápia követésére szolgál [97]. A Philadelphia-negatív mieloproliferatív neopláziák (MPN) diagnosztikájában és követésében az esetek jelentős részénél a perifériás vér leukocitáinak vizsgálata elegendő, míg primer mielofibrózisban a csontvelő párhuzamos vizsgálata elengedhetetlen. MPN-ben eddig a ctDNS vizsgálatát egyetlen egyetlen esettanulmányt publikáltak. Egy Erdheim–Chester-hisztiocitózisban szenvedő betegnél a folyadékbiopsziás mintában végzett mutációanalízis során a *BRAF* V600E-mutáció mellett véletlenszerűen *JAK* V617F-mutációt is azonosítottak. Tizenhárom hónappal később a betegnél anémia, trombocitopénia és lépmegnagyobbodás jelentkezett, majd a csontvelő-biopszia igazolta a *JAK* V617F-mutációra nézve pozitív primer mielofibrózist [98].

Ezen betegségekben a ctDNS-vizsgálat kis potenciálját jól tükrözi a témával foglalkozó publikációk hiánya, melynek okaként elsősorban a tumorsejtek érpályában való megjelenése jelölhető meg.

## Összefoglalás

Az elérhető irodalmi adatok arra utalnak, hogy a folyadékbiopsziás vizsgálatok számos onkohematológiai entitás esetében nyújtanak jelentős hozzáadott értéket a kezelést megelőző prognózisbecslésben, a célozható genetikai eltérések detektálásában, a terápia hatékonyságának nyomon követésében, illetve a minimális reziduális betegség és a terápiarefrakter klónok kimutatásában (2. táblázat). Ezek alapján a közeljövőben a szolid tumoroknál látottakhoz hasonlóan a folyadékbiopsziás eljárások megjelenése várható az onkohematológiai betegségek rutin diagnosztikájában is.

**Nyilatkozat:** A cikk nem jelent meg más folyóiratban és nem áll publikáció alatt. A levelező szerzők a szerzői útmutatót elolvasták.

**Érdekltségek:** A szerzőknek nincsenek érdekltségeik.

**2. táblázat.** Folyadékbiopszia alapú tanulmányok összefoglalása az egyes onkohematológiai entitásokban. A folyadékbiopsziás eljárásoknak az egyes malignitások esetén eltérő mértékben ugyan, de szerepe lehet kezelést megelőző prognózisbecslésben, prediktív biomarkerek kimutatásában, a terápia hatékonyságának nyomon követésében, illetve a kezelést követő minimális reziduális betegség (MRD) kimutatásában és a korai (klinikai tüneteket megelőző) relapsusdetekcióban

|                       | DLBCL                                                                | FL                                                        | KIR limfómák                           | MCL                                          | PTCL | HL                                                  | PCM                                    | CLL | AML                                       | MDS                                           |
|-----------------------|----------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|----------------------------------------|----------------------------------------------|------|-----------------------------------------------------|----------------------------------------|-----|-------------------------------------------|-----------------------------------------------|
| Prognózisbecslés      | ctDNS-szint korrelál képalkotóval, IPI-vel, se-LDH-szinttel [23, 24] | ctDNS-szintek korrelálnak képalkotókkal [38]              |                                        | ctDNS-szintek korrelálnak képalkotókkal [56] |      | magas ctDNS-szint rosszabb prognózissal társul [65] | ctDNS-szintek ISS-sel korrelálnak [76] |     | <i>NPM1</i> -mutációk kimutatása [92, 93] | ctDNS korrelál képalkotókkal és IPSS-sel [95] |
| Prognózisbecslés      | transzlokációk (SHL, DHL és THL) kimutatása, COO meghatározása [25]  | magas ctDNS-szintek kedvezőtlen PFS-t jeleznek előre [37] |                                        |                                              |      |                                                     |                                        |     |                                           |                                               |
| Prediktív biomarkerek | <i>PD-L1</i> - és <i>PD-L2</i> -gének ampliconok kimutatása [44, 45] | <i>EZH2</i> -mutációk kimutatása [27]                     | <i>MEF2B</i> -mutációk kimutatása [28] | <i>ATM</i> -mutációk kimutatása [58]         |      |                                                     |                                        |     |                                           |                                               |

2. táblázat. (folyt.)

| DLBCL                                                                                                                                                                      | FL                                                                      | KIR limfómák                                                                        | MCL                                                                                  | PTCL | HL                                                                                                                                                                    | PCM                                                                                                                                                                            | CLL                                                                                                                                                         | AML                                                                 | MDS |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|-----|
| ctDNS-szint-változás által meghatározott EMR és MMR [29]<br>terápiarefrak-<br>teritás kimuta-<br>tása [26]<br>CART-kezelés<br>hatékony-sá-<br>gának monito-<br>rozása [30] |                                                                         | génmutációk<br>eltűnése sikeres<br>terápia hatására<br>[52, 53]                     | ctDNS-szint-<br>csökkenés<br>kedvező OS-t és<br>PFS-t jelez [57]                     |      | ctDNS-szint-<br>csökkenés ked-<br>vező kimenetelt<br>jelez [68]                                                                                                       | extracelluláris<br>vezikulák feno-<br>típusváltozása<br>a kezelés<br>hatékonyágát<br>jelezheti [81]<br>[83]                                                                    | ibrutinib- és<br>venetoclax-<br>kezelés haté-<br>konyságának<br>monitorozása<br>[83]                                                                        |                                                                     |     |
| Terápiamonitorozás                                                                                                                                                         |                                                                         |                                                                                     |                                                                                      |      |                                                                                                                                                                       |                                                                                                                                                                                |                                                                                                                                                             |                                                                     |     |
|                                                                                                                                                                            |                                                                         |                                                                                     |                                                                                      |      | <i>XPO-1</i> -mutá-<br>ciók prezisz-<br>tálása kezelést<br>követően ked-<br>vezőtlen PFS-t<br>és OS-t jelöl [67]<br>transzplantációt<br>követő MRD-<br>kimutatás [69] | reziduális<br>ctDNS MRD-<br>pozitív esetek-<br>ben gyakrabban<br>detektálható<br>[79]                                                                                          | kezelést köve-<br>tően nyirok-<br>csomókba szek-<br>vesztrálódott<br>klónok kimu-<br>tatása [83]                                                            | transzplantációt<br>követő MRD-ki-<br>mutatás [94]                  |     |
| MRD-kimutatás                                                                                                                                                              |                                                                         |                                                                                     |                                                                                      |      |                                                                                                                                                                       |                                                                                                                                                                                |                                                                                                                                                             |                                                                     |     |
| relapszusdetek-<br>ció 3,5 hónap-<br>pal a klinikai<br>tüneteket meg-<br>előzően [24]                                                                                      | relapszusdetek-<br>ció a klinikai<br>tüneteket meg-<br>előzően [52, 53] | relapszusdetek-<br>ció 9 hónap-<br>pal a klinikai<br>tüneteket meg-<br>előzően [56] | relapszusdetek-<br>ció 13 hónap-<br>pal a klinikai<br>tüneteket meg-<br>előzően [62] |      |                                                                                                                                                                       | relapszust meg-<br>előzően ctDNS-<br>szintemelkedés<br>mutatható ki<br>[80]<br><i>KRAS</i> - és<br><i>TP53</i> -mutációk<br>megjelenése re-<br>lapszust jelezhet<br>előre [76] | Richter-szind-<br>róma kiala-<br>kulása akár<br>hónapokkal<br>előre jelezhető<br>[83]<br>terápiarefrak-<br>teritást okozó<br>mutációk de-<br>tektálása [84] | relapszusdetek-<br>ció a klinikai<br>tüneteket meg-<br>előzően [96] |     |
| Relapszusdetektálás                                                                                                                                                        |                                                                         |                                                                                     |                                                                                      |      |                                                                                                                                                                       |                                                                                                                                                                                |                                                                                                                                                             |                                                                     |     |

AML: akut mieloid leukémia, CART: kiméra antigénreceptorral felruházott T-sejtes terápia, CLL: krónikus limfocitás leukémia, ctDNS: keringő tumor-DNS, DHL: „double hit lymphoma”, DLBCL: diffúz nagy B-sejtes limfóma, EMR: korai molekuláris válasz, FL: follikuláris limfóma, HL: Hodgkin-limfóma, IPI: nemzetközi prognosztikus index, IPSS: nemzetközi prognosztikus osztályozó rendszer, ISS: nemzetközi „staging” rendszer, KIR limfóma: központi idegrendszeri limfóma, MCL: köpenysejtes limfóma, MDS: mielodiszplázias szindróma, PCM: plazmaszajtes mielóma, MMR: major molekuláris válasz, MRD: minimális reziduális betegség, OS: várható túlélés, PFS: progressziómentes túlélés, PTCL: perifériás T-sejtes limfóma, se-LDH: szérum laktát dehidrogenáz, SHL: „single hit lymphoma”, THL: „triple hit lymphoma”

**Anyagi támogatás:** A közlemény az MTA Lendület programjának (LP-95021) és Bolyai János Ösztöndíj programjának (BO/00320/18/5), a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal NVKP\_16-1-2016-0004, K\_16 119950, KH17-126718 és FK\_134253 pályázatainak támogatásával, valamint az ELTE Felsőoktatási Intézményi Kiválósági Program (1783- 3/2018/FEKUTSRAT) keretében az Emberi Erőforrások Minisztériuma támogatásával készült. A közlemény elkészülését támogatta továbbá az Innovációs és Technológiai Minisztérium ÚNKP-19-2-I-SE-47 és ÚNKP-20-5-SE-22 kódszámú Új Nemzeti Kiválóság Programja, valamint a Semmelweis Egyetem Kiegészítő Kutatási Kiválósági Ösztöndíja az EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-00009 pályázat keretében. Ezenfelül a publikáció elkészítését az EFOP-3.6.1-16-2016-00022 számú, Debrecen Venture Catapult Program című projekt is támogatta, mely az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósult meg.

**Szerzői munkamegosztás:** N.Á. – a kézirat szerkesztése, az általános bevezető, az onkohematológiai bevezető, a DL-BCL, az FL és a KIR limfómákkal foglalkozó fejezet írása, ábrakészítés; B.B. – PTCL, AML/MDS és MPN fejezetek írása; K.L. – MCL és CLL fejezetek írása, ábrakészítés; M.A. – PCM fejezet írása, ábrakészítés; P.L.I. – HL fejezet írása; P.G. – általános bevezető írása, a kézirat javítása és véleményezése; K.I., A.D. és B.Cs. – a kézirat javítása és véleményezése. A kéziratot valamennyi szerző elolvasta és jóváhagyta.

## Irodalom

- [1] Haber DA, Velculescu VE. Blood-based analyses of cancer: circulating tumor cells and circulating tumor DNA. *Cancer Discov.* 2014; 4: 650–661.
- [2] Siravegna G, Marsoni S, Siena S, et al. Integrating liquid biopsies into the management of cancer. *Nat Rev Clin Oncol.* 2017; 14: 531–548.
- [3] Fan HC, Blumenfeld YJ, Chitkara U, et al. Analysis of the size distributions of fetal and maternal cell-free DNA by paired-end sequencing. *Clin Chem.* 2010; 56: 1279–1286.
- [4] Alix-Panabieres C, Pantel K. The circulating tumor cells: liquid biopsy of cancer. *Klin Lab Diagn.* 2014; 60–64.
- [5] Corcoran RB, Chabner BA. Application of cell-free DNA analysis to cancer treatment. *N Engl J Med.* 2018; 379: 1754–1765.
- [6] Heitzer E, Haque IS, Roberts CES, et al. Current and future perspectives of liquid biopsies in genomics-driven oncology. *Nat Rev Genet.* 2019; 20: 71–88.
- [7] Gremel G, Lee RJ, Girotti MR, et al. Distinct subclonal tumour responses to therapy revealed by circulating cell-free DNA. *Ann Oncol.* 2016; 27: 1959–1965.
- [8] Russo M, Siravegna G, Blaszkowsky LS, et al. Tumor heterogeneity and lesion-specific response to targeted therapy in colorectal cancer. *Cancer Discov.* 2016; 6: 147–153.
- [9] Camus V, Jardin F. Cell-free DNA and the monitoring of lymphoma treatment. *Pharmacogenomics* 2019; 20: 1271–1282.
- [10] Darrah JM, Herrera AF. Updates on circulating tumor DNA assessment in lymphoma. *Curr Hematol Malig Rep.* 2018; 13: 348–355.
- [11] 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. *J Clin Oncol.* 2018; 36: 1631–1641.
- [12] Bettgowda C, Sausen M, Leary RJ, et al. Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Sci Transl Med.* 2014; 6: 224ra24.
- [13] Kilgour E, Rothwell DG, Brady G, et al. Liquid biopsy-based biomarkers of treatment response and resistance. *Cancer Cell* 2020; 37: 485–495.
- [14] Hindson BJ, Ness KD, Masquelier DA, et al. High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number. *Anal Chem.* 2011; 83: 8604–8610.
- [15] Alcaide M, Yu S, Bushell K, et al. Multiplex droplet digital PCR quantification of recurrent somatic mutations in diffuse large B-cell and follicular lymphoma. *Clin Chem.* 2016; 62: 1238–1247.
- [16] Camus V, Sarafan-Vasseur N, Bohers E, et al. Digital PCR for quantification of recurrent and potentially actionable somatic mutations in circulating free DNA from patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Leuk Lymphoma* 2016; 57: 2171–2179.
- [17] Scherer F, Kurtz DM, Diehn M, et al. High-throughput sequencing for noninvasive disease detection in hematologic malignancies. *Blood* 2017; 130: 440–452.
- [18] Malapelle U, Sirera R, Jantus-Lewintre E, et al. Profile of the Roche cobas(R) EGFR mutation test v2 for non-small cell lung cancer. *Expert Rev Mol Diagn.* 2017; 17: 209–215.
- [19] Warren JD, Xiong W, Bunker AM, et al. Septin 9 methylated DNA is a sensitive and specific blood test for colorectal cancer. *BMC Med.* 2011; 9: 133.
- [20] Melani C, Wilson WH, and Roschewski M Liquid biopsy in non-Hodgkin's lymphoma. *Hematol Oncol.* 2019; 37 Suppl 1: 70–74.
- [21] Roschewski M, Staudt LM, Wilson WH. Dynamic monitoring of circulating tumor DNA in non-Hodgkin lymphoma. *Blood* 2016; 127: 3127–3132.
- [22] Kurtz DM. Prognostication with circulating tumor DNA: is it ready for prime time? *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2019; 2019: 47–52.
- [23] Kurtz DM, Green MR, Bratman SV, et al. Noninvasive monitoring of diffuse large B-cell lymphoma by immunoglobulin high-throughput sequencing. *Blood* 2015; 125: 3679–3687.
- [24] Roschewski M, Dunleavy K, Pittaluga S, et al. Circulating tumour DNA and CT monitoring in patients with untreated diffuse large B-cell lymphoma: a correlative biomarker study. *Lancet Oncol.* 2015; 16: 541–549.
- [25] Scherer F, Kurtz DM, Newman AM, et al. Distinct biological subtypes and patterns of genome evolution in lymphoma revealed by circulating tumor DNA. *Sci Transl Med.* 2016; 8: 364ra155.
- [26] Rossi D, Diop F, Spaccarotella E, et al. Diffuse large B-cell lymphoma genotyping on the liquid biopsy. *Blood* 2017; 129: 1947–1957.
- [27] Jin MC, Kurtz DM, Esfahani MS, et al. Noninvasive detection of clinically relevant copy number alterations in diffuse large B-cell lymphoma. *Journal of Clinical Oncology* 2017; 35: 7507–7507.
- [28] Assouline SE, Nielsen TH, Yu S, et al. Phase 2 study of panobinostat with or without rituximab in relapsed diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 2016; 128: 185–194.
- [29] Kurtz DM, Scherer F, Jin MC, et al. Circulating tumor DNA measurements as early outcome predictors in diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol.* 2018; 36: 2845–2853.
- [30] Sworder B, Kurtz DM, Macaulay C, et al. Circulating DNA for molecular response prediction, characterization of resistance mechanisms and quantification of CAR T-cells during axicabtagene ciloleucel therapy. *Blood* 2019; 134: 550–550.
- [31] van Oers MH, Tonnissen E, Van Glabbeke M, et al. BCL-2/IgH polymerase chain reaction status at the end of induction treatment is not predictive for progression-free survival in relapsed/resistant follicular lymphoma: results of a prospective randomized EORTC 20981 phase III intergroup study. *J Clin Oncol.* 2010; 28: 2246–2252.

- [32] Roulland S, Kelly RS, Morgado E, et al. t(14;18) translocation: A predictive blood biomarker for follicular lymphoma. *J Clin Oncol*. 2014; 32: 1347–1355.
- [33] Rambaldi A, Carlotti E, Oldani E, et al. Quantitative PCR of bone marrow BCL2/IgH+ cells at diagnosis predicts treatment response and long-term outcome in follicular non-Hodgkin lymphoma. *Blood* 2005; 105: 3428–3433.
- [34] Mandigers CM, Meijerink JP, Mensink EJ, et al. Lack of correlation between numbers of circulating t(14;18)-positive cells and response to first-line treatment in follicular lymphoma. *Blood* 2001; 98: 940–944.
- [35] Lambrechts AC, Hupkes PE, Dorssers LC, et al. Clinical significance of t(14; 18)-positive cells in the circulation of patients with stage III or IV follicular non-Hodgkin's lymphoma during first remission. *J Clin Oncol*. 1994; 12: 1541–1546.
- [36] Gribben JG, Neuberg D, Barber M, et al. Detection of residual lymphoma cells by polymerase chain reaction in peripheral blood is significantly less predictive for relapse than detection in bone marrow. *Blood* 1994; 83: 3800–3807.
- [37] Sarkozy C, Huet S, Carlton VE, et al. The prognostic value of clonal heterogeneity and quantitative assessment of plasma circulating clonal IG-VDJ sequences at diagnosis in patients with follicular lymphoma. *Oncotarget*. 2017; 8: 8765–8774.
- [38] Delfau-Larue MH, van der Gucht A, Dupuis J, et al. Total metabolic tumor volume, circulating tumor cells, cell-free DNA: distinct prognostic value in follicular lymphoma. *Blood Adv*. 2018; 2: 807–816.
- [39] Bodor C, Grossmann V, Popov N, et al. EZH2 mutations are frequent and represent an early event in follicular lymphoma. *Blood* 2013; 122: 3165–3168.
- [40] Okosun J, Bodor C, Wang J, et al. Integrated genomic analysis identifies recurrent mutations and evolution patterns driving the initiation and progression of follicular lymphoma. *Nat Genet*. 2014; 46: 176–181.
- [41] Batai B, Lévai D, Gaál-Weisinger J, et al. New perspective in the personalized medicine of follicular lymphoma – Targeting the EZH2 histone methyltransferase. *Hematológia–Transzfuziológia* 2018; 51: 61–70.
- [42] FDA, FDA granted accelerated approval to tazemetostat for follicular lymphoma. 2020: <https://www.fda.gov/drugs/fda-granted-accelerated-approval-tazemetostat-follicular-lymphoma>.
- [43] Morschhauser F, Tilly H, Chaidos A, et al. Phase 2 multicenter study of tazemetostat, an EZH2 inhibitor, in patients with relapsed or refractory follicular lymphoma. *Blood* 2019; 134: 123–123.
- [44] McDonald A, Thomas E, Daigle S, et al. Updated report on identification of molecular predictors of tazemetostat response in an ongoing NHL phase 2 study. *Blood* 2018; 132: 4097–4097.
- [45] Nagy A, Batai B, Balogh A, et al. Quantitative analysis and monitoring of EZH2 mutations using liquid biopsy in follicular lymphoma. *Genes (Basel)*. 2020; 11.
- [46] Fontanilles M, Marguet F, Bohers E, et al. Non-invasive detection of somatic mutations using next-generation sequencing in primary central nervous system lymphoma. *Oncotarget*. 2017; 8: 48157–48168.
- [47] Hattori K, Sakata-Yanagimoto M, Suehara Y, et al. Clinical significance of disease-specific MYD88 mutations in circulating DNA in primary central nervous system lymphoma. *Cancer Sci*. 2018; 109: 225–230.
- [48] Watanabe J, Natsumeda M, Kanemaru Y, et al. Comparison of circulating tumor DNA between body fluids in patients with primary central nervous system lymphoma. *Leuk Lymphoma* 2019; 60: 3587–3589.
- [49] Zorofchian S, Lu G, Zhu JJ, et al. Detection of the MYD88 p. L265P mutation in the CSF of a patient with secondary central nervous system lymphoma. *Front Oncol*. 2018; 8: 382.
- [50] Hiemcke-Jiwa LS, Leguit RJ, Snijders TJ, et al. MYD88 p.(L265P) detection on cell-free DNA in liquid biopsies of patients with primary central nervous system lymphoma. *Br J Haematol*. 2019; 185: 974–977.
- [51] Hickmann AK, Frick M, Hadaschik D, et al. Molecular tumor analysis and liquid biopsy: a feasibility investigation analyzing circulating tumor DNA in patients with central nervous system lymphomas. *BMC Cancer*. 2019; 19: 192.
- [52] Bobillo S, Crespo M, Escudero L, et al. Cell free circulating tumor DNA in cerebrospinal fluid detects and monitors central nervous system involvement of B-cell lymphomas. *Haematologica* 2020.
- [53] Grommes C, Tang SS, Wolfe J, et al. Phase 1b trial of an ibrutinib-based combination therapy in recurrent/refractory CNS lymphoma. *Blood* 2019; 133: 436–445.
- [54] Pott C, Schrader C, Gesk S, et al. Quantitative assessment of molecular remission after high-dose therapy with autologous stem cell transplantation predicts long-term remission in mantle cell lymphoma. *Blood* 2006; 107: 2271–2278.
- [55] Cheminant M, Derrieux C, Touzart A, et al. Minimal residual disease monitoring by 8-color flow cytometry in mantle cell lymphoma: an EU-MCL and LYSA study. *Haematologica* 2016; 101: 336–345.
- [56] Roschewski MJ, Melani CJ, Pittaluga S, et al. Circulating tumor DNA to predict timing of relapse in mantle cell lymphoma. *Journal of Clinical Oncology* 2018; 36: 7576–7576.
- [57] Lakhotia R, Melani C, Pittaluga S, et al. Circulating tumor DNA dynamics during therapy predict outcomes in mantle cell lymphoma. *Blood* 2018; 132: 147–147.
- [58] Agarwal R, Chan YC, Tam CS, et al. Dynamic molecular monitoring reveals that SWI-SNF mutations mediate resistance to ibrutinib plus venetoclax in mantle cell lymphoma. *Nat Med*. 2019; 25: 119–129.
- [59] Pizzi M, Margolskee E, Inghirami G. Pathogenesis of peripheral T-cell lymphoma. *Annu Rev Pathol*. 2018; 13: 293–320.
- [60] Sakata-Yanagimoto M, Nakamoto-Matsubara R, Komori D, et al. Detection of the circulating tumor DNAs in angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Ann Hematol*. 2017; 96: 1471–1475.
- [61] Sun P, Chen C, Xia Y, et al. Mutation profiling of malignant lymphoma by next-generation sequencing of circulating cell-free DNA. *J Cancer*. 2019; 10: 323–331.
- [62] Melani C, Pittaluga S, Yee L, et al. Next-generation sequencing based monitoring of circulating-tumor DNA in untreated peripheral T-cell lymphoma. *Blood* 2017; 130: 2728–2728.
- [63] Borchmann S, Engert A. The genetics of Hodgkin lymphoma: an overview and clinical implications. *Curr Opin Oncol*. 2017; 29: 307–314.
- [64] Jin MC, Schroers-Martin JG, Kurtz DM, et al. Noninvasive genotyping and monitoring of classical Hodgkin lymphoma. *Blood* 2018; 132: 2838–2838.
- [65] Hohaus S, Giachelia M, Massini G, et al. Cell-free circulating DNA in Hodgkin's and non-Hodgkin's lymphomas. *Ann Oncol*. 2009; 20: 1408–1413.
- [66] Vandenbergh P, Wlodarska I, Tousseyn T, et al. Non-invasive detection of genomic imbalances in Hodgkin/Reed-Sternberg cells in early and advanced stage Hodgkin's lymphoma by sequencing of circulating cell-free DNA: a technical proof-of-principle study. *Lancet Haematol*. 2015; 2: e55–65.
- [67] Camus V, Stamatoullas A, Mareschal S, et al. Detection and prognostic value of recurrent exportin 1 mutations in tumor and cell-free circulating DNA of patients with classical Hodgkin lymphoma. *Haematologica* 2016; 101: 1094–1101.
- [68] Spina V, Brusca G, Cuccaro A, et al. Circulating tumor DNA reveals genetics, clonal evolution, and residual disease in classical Hodgkin lymphoma. *Blood* 2018; 131: 2413–2425.
- [69] Herrera AF, Kim HT, Kong KA, et al. Next-generation sequencing-based detection of circulating tumour DNA After allogeneic stem cell transplantation for lymphoma. *Br J Haematol*. 2016; 175: 841–850.

- [70] Oki Y, Neelapu SS, Fanale M, et al. Detection of classical Hodgkin lymphoma specific sequence in peripheral blood using a next-generation sequencing approach. *Br J Haematol.* 2015; 169: 689–693.
- [71] Pugh TJ. Circulating tumour DNA for detecting minimal residual disease in multiple myeloma. *Semin Hematol.* 2018; 55: 38–40.
- [72] Waldschmidt JM, Anand P, Knoechel B, et al. Comprehensive characterization of circulating and bone marrow-derived multiple myeloma cells at minimal residual disease. *Semin Hematol.* 2018; 55: 33–37.
- [73] Mithraprabhu S, Khong T, Ramachandran M, et al. Circulating tumour DNA analysis demonstrates spatial mutational heterogeneity that coincides with disease relapse in myeloma. *Leukemia* 2017; 31: 1695–1705.
- [74] Gerber B, Manzoni M, Spina V, et al. Circulating tumor DNA as a liquid biopsy in plasma cell dyscrasias. *Haematologica* 2018; 103: e245–e248.
- [75] Kis O, Kaedbey R, Chow S, et al. Circulating tumour DNA sequence analysis as an alternative to multiple myeloma bone marrow aspirates. *Nat Commun.* 2017; 8: 15086.
- [76] Mithraprabhu S, Morley R, Khong T, et al. Monitoring tumour burden and therapeutic response through analysis of circulating tumour DNA and extracellular RNA in multiple myeloma patients. *Leukemia* 2019; 33: 2022–2033.
- [77] Biancon G, Gimondi S, Vendramin A, et al. Noninvasive molecular monitoring in multiple myeloma patients using cell-free tumor DNA: A pilot study. *J Mol Diagn.* 2018; 20: 859–870.
- [78] Mazzotti C, Buisson L, Maheo S, et al. Myeloma MRD by deep sequencing from circulating tumor DNA does not correlate with results obtained in the bone marrow. *Blood Adv.* 2018; 2: 2811–2813.
- [79] Oberle A, Brandt A, Voigtlaender M, et al. Monitoring multiple myeloma by next-generation sequencing of V(D)J rearrangements from circulating myeloma cells and cell-free myeloma DNA. *Haematologica* 2017; 102: 1105–1111.
- [80] Rustad EH, Coward E, Skytoen ER, et al. Monitoring multiple myeloma by quantification of recurrent mutations in serum. *Haematologica* 2017; 102: 1266–1272.
- [81] Rajeev Krishnan S, De Rubis G, Suen H, et al. A liquid biopsy to detect multidrug resistance and disease burden in multiple myeloma. *Blood Cancer J.* 2020; 10: 37.
- [82] Manier S, Park J, Capelletti M, et al. Whole-exome sequencing of cell-free DNA and circulating tumor cells in multiple myeloma. *Nat Commun.* 2018; 9: 1691.
- [83] Yeh P, Hunter T, Sinha D, et al. Circulating tumour DNA reflects treatment response and clonal evolution in chronic lymphocytic leukaemia. *Nat Commun.* 2017; 8: 14756.
- [84] Kiss R, Alpar D, Gango A, et al. Spatial clonal evolution leading to ibrutinib resistance and disease progression in chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica* 2019; 104: e38–e41.
- [85] Stone RM, Mandrekar SJ, Sanford BL, et al. Midostaurin plus chemotherapy for acute myeloid leukemia with a FLT3 mutation. *N Engl J Med.* 2017; 377: 454–464.
- [86] Papaemmanuil E, Gerstung M, Bullinger L, et al. Genomic classification and prognosis in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 2016; 374: 2209–2221.
- [87] Kline JM, Miller CA, Griffith M, et al. Association between mutation clearance after induction therapy and outcomes in acute myeloid leukemia. *JAMA* 2015; 314: 811–822.
- [88] Dohner H, Estey E, Grimwade D, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood* 2017; 129: 424–447.
- [89] Krizsán S, Dénes Z, Gángó A, et al. Visszatérő genetikai eltérések vizsgálata akut myeloid leukémiában az új célzott terápiák tükrében. *Hematológia–Transzfuziológia* 2019; 52: 96–105.
- [90] Schuurhuis GJ, Heuser M, Freeman S, et al. Minimal/measurable residual disease in AML: a consensus document from the European LeukemiaNet MRD Working Party. *Blood* 2018; 131: 1275–1291.
- [91] Vasioukhin V, Anker P, Maurice P, et al. Point mutations of the N-ras gene in the blood plasma DNA of patients with myelodysplastic syndrome or acute myelogenous leukaemia. *Br J Haematol.* 1994; 86: 774–779.
- [92] Quan J, Gao YJ, Yang ZL, et al. Quantitative detection of circulating nucleophosmin mutations DNA in the plasma of patients with acute myeloid leukemia. *Int J Med Sci.* 2015; 12: 17–22.
- [93] Ma W, Kantarjian H, Zhang X, et al. Detection of nucleophosmin gene mutations in plasma from patients with acute myeloid leukemia: clinical significance and implications. *Cancer Biomark.* 2009; 5: 51–58.
- [94] Nakamura S, Yokoyama K, Shimizu E, et al. Prognostic impact of circulating tumor DNA status post-allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in AML and MDS. *Blood* 2019; 133: 2682–2695.
- [95] Suzuki Y, Tomita A, Nakamura F, et al. Peripheral blood cell-free DNA is an alternative tumor DNA source reflecting disease status in myelodysplastic syndromes. *Cancer Sci.* 2016; 107: 1329–1337.
- [96] Yeh P, Dickinson M, Ftouni S, et al. Molecular disease monitoring using circulating tumor DNA in myelodysplastic syndromes. *Blood* 2017; 129: 1685–1690.
- [97] Hochhaus A, Baccarani M, Silver RT, et al. European LeukemiaNet 2020 recommendations for treating chronic myeloid leukemia. *Leukemia* 2020; 34: 966–984.
- [98] Choi MY, Kato S, Wang HY, et al. JAK2 V617F mutation in plasma cell-free DNA preceding clinically overt myelofibrosis: Implications for early diagnosis. *Cancer Biol Ther.* 2018; 19: 664–668.

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)