

# A perifériás vérben keringő szabad DNS molekuláris vizsgálata epeúti malignitásokban

Csoma Szilvia Lilla<sup>1</sup> ■ Bedekovics Judit dr.<sup>1</sup>  
Veres Gergő<sup>2</sup> ■ Árokszállási Anita dr.<sup>3</sup> ■ András Csilla dr.<sup>3</sup>  
Méhes Gábor dr.<sup>1</sup> ■ Mokánszki Attila dr.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Debreceni Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, Pathologia Intézet, Debrecen

<sup>2</sup>Debreceni Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, Orvosi Képképző Klinika, Radiológia, Debrecen

<sup>3</sup>Debreceni Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, Onkológiai Klinika, Debrecen

**Bevezetés:** A perifériás vérben szabadon keringő tumoreredetű DNS-ek lehetővé teszik cholangiocarcinomákban a molekuláris genetikai eltérések tanulmányozását, akár a kemoterápiára adott válasz hatékonyságát is.

**Célkutatás:** A liquid ("folyékony") biopszia alkalmazása kedvező megoldás, hiszen a szövettinél sokkal egyszerűbben kivitelezhető, és elkerülhető az ismételt invazív szövettani mintavétel. A liquidbiopszia-alapú szekvenálás hatékonysága a tumor progressziójával és ezáltal a nagyobb mennyiségű szabad DNS felszabadulásával növekszik.

**Módszer:** A jelen vizsgálatban klinikailag releváns pontmutációkat mutattunk ki epeúti tumorok mind szövettani, mind liquid biopsziás mintáiból.

**Eredmények:** Újgenerációs szekvenálás alkalmazásával 33 betegből származó, szövettani és liquid biopszia során nyert DNS-mintákat analizáltunk 67 génes szolidtumor-panelt felhasználva.

**Megbeszélés:** Dolgozatunkban egy minimálisan invazív vizsgálati megközelítést mutatunk be a cholangiocarcinoma és az epehólyag-daganat molekuláris genetikai eltéréseinek azonosítására.

**Következtetés:** A szabad DNS diagnosztikai alkalmazása a tumorok térbeli heterogenitását tükrözi, ezáltal egy új megközelítés a precíziós onkológiai kezeléseknél.

Orv Hetil. 2022; 163(50): 1982–1991.

**Kulcsszavak:** epeúti tumorok, liquid biopszia, újgenerációs szekvenálás, szabad DNS, cholangiocarcinoma

## Molecular analysis of cell-free DNA in peripheral blood in biliary tract malignancies

**Introduction:** Tumor-derived free-circulating DNA in peripheral blood allows the study of the molecular genetic profile in cholangiocarcinomas and even the effective monitoring of the response to chemotherapy.

**Objective:** The use of a liquid biopsy is a favourable solution, as repeated invasive histological sampling is much more practicable and avoidable. The efficiency of liquid biopsy-based sequencing increases with tumor progression and thus with the release of larger amounts of free DNA.

**Method:** In the present study, clinically relevant point mutations were detected from both histological and liquid biopsy specimens of bile duct tumors.

**Results:** During next-generation sequencing, histological and DNA samples obtained during liquid biopsy from 33 patients were analyzed using a 67-gene solid tumor panel.

**Discussion:** In our prospective study, we present a minimally invasive approach to identify molecular genetic changes in cholangiocarcinoma and gallbladder tumors.

**Conclusion:** The diagnostic application of free DNA reflects the spatial heterogeneity of tumors, making it a new approach to precision oncology treatments.

**Keywords:** biliary tract cancers, liquid biopsy, next-generation sequencing, cell-free DNA, cholangiocarcinoma

Csoma SZL, Bedekovics J, Veres G, Árokszállási A, András Cs, Méhes G, Mokánszki A. [Molecular analysis of cell-free DNA in peripheral blood in biliary tract malignancies]. Orv Hetil. 2022; 163(50): 1982–1991.

(Beérkezett: 2022. augusztus 24.; elfogadva: 2022. szeptember 16.)

## Rövidítések

CA = (cancer antigen) rákantigén; cfDNS = (cell-free DNS) szabad DNS; CK = citokeratin; COSMIC = (Catalogue of Somatic Mutations in Cancer) tumorok szomatikus mutációinak katalógusa; CT = (computed tomography) komputertomográfia; DNS = dezoxiribonukleinsav; EDTA = (ethylenediaminetetraacetic acid) etilén-diamin-tetraecetsav; ETV = (estimated tumor volume) becsült tumortérfogat; FFPE = (formalin-fixed paraffin-embedded) formalinfixált, paraffinba ágyazott; FOLFOX = fluorouracil-oxaliplatin; HSA = hepatocytaspecifikus antigén; MRI = (magnetic resonance imaging) mágnesesrezonancia-képalkotás; PD1 = (programmed cell death protein 1) programozott sejthalál fehérje-1; PDL1 = (programmed death-ligand 1) programozott sejthalál ligand-1; SNP = (single nucleotide polymorphism) egy nukleotidot érintő polimorfizmus; SNV = (single nucleotide variant) egy pontos nukleotidvariáns; TMB = (tumor mutational burden) tumor-mutációs terhelés; TVB = (tumor varitational burden) tumor-variáns-terhelés; VAF = (variant allele frequency) variáns-allelfrekvencia

Az epeúti daganatok (biliary tract cancers) egy ritka, kifejezetten rossz prognózisú betegségcsoport, melyre jelenleg korlátozottak az onkológiai kezelés lehetőségei. Nagy mortalitása leginkább a késői felismerésének tudható be [1, 2]. Anatómiai csoportosítás alapján intrahepaticus cholangiocarcinomáról, extrahepaticus cholangiocarcinomáról, valamint epehólyagtumorról (cholecystocarcinoma) beszélhetünk [3]. A cholangiocarcinomás betegek kétharmadában extrahepaticus típusú a betegség [4]. Az elmúlt évtizedben a betegség prevalenciája növekvő tendenciát mutatott. Egy vizsgálat szerint az intrahepaticus csoportba tartozó betegek öt éves túlélési aránya 12%, míg az extrahepaticus típusúaké 30% [3]. Annak ellenére, hogy a különböző szubtypusokba tartozó daganatok eltérő molekuláris aberrációkat hordozhatnak, a betegek hasonló kezelésben részesülnek. A terápia alapvetően a teljes reszekálható tumor eltávolításán alapul, ez viszont gyakran nem oldható meg, így személyre szabott kemoterápiás kezelésre lenne szükség [2, 5]. Általánosságban gemcitabin és kapecitabin adjuváns terápia tűnik ígéretesnek, epehólyagtumorok esetében pedig gemcitabin és ciszplatin kombinációja alkalmazandó első vonalbeli kemoterápiaként [6–9]. A progrediáló betegség kezelésére nincs egyértelműen meghatározott protokoll. Egyes tanulmányok szerint a FOLFOX-kezelés lehet másodvonalban a legkedvezőbb [2, 10]. Ezek mellett számos vizsgálat szerint szóba jöhet az immunterápia abban az esetben, ha a programozott sejthalál ligand-1 (PDL1) és a programozott sejthalál-1 (PD1) gének expressziója megfelelő mértékű [11–13].

Tekintettel a betegség incidenciájának növekedésére és a korlátozott onkológiai kezelési lehetőségekre, sok erőfeszítés történt az epeúti daganatok kialakulásának hátterében álló molekuláris mechanizmusok megismeré-

sére [4]. Összességében elmondható, hogy a hosszú távú megoldást egy olyan biomarker azonosítása jelentené, amely megkönnyítené ezen daganatok korai diagnosztizálásának lehetőségét, szubtypusokba való besorolását, valamint az onkológiai terápia kiválasztását is.

Az újgenerációs szekvenálás egy manapság népszerű technológia, amely lehetővé teszi több gén egyidejű vizsgálatát. A személyre szabott precíziós onkomedicina korszakában alapvető szerepet játszik az aberrációk azonosításában, ami segítheti a kezelés megválasztását és a prognózist is [14].

A daganatos betegek testfolyadékai változó mennyiségű, a tumorból származó nekrotikus sejteket és apoptózis során felszabaduló szabad DNS-t (cell-free, cfDNS) tartalmaznak, melyek vizsgálatára a liquid ('folyékony') biopsziának nevezett módszerrel van lehetőség. Liquid biopszia során bármilyen testfolyadékból minta nyerhető, mely alkalmas a cfDNS izolálására. A leggyakrabban alkalmazott liquid biopsziás mintavételi mód a perifériás vérvétel. Ez a minimális beavatkozást igénylő mintavétel bekerült a klinikai rutinyakorlatba, hiszen a betegek szempontjából sokkal egyszerűbb eljárás, mint egy tumorszöveti biopsziás mintavétel. A liquid biopszia során kvantitatív (tumoros betegek esetében magasabb cfDNS-mennyiség) és kvalitatív (genetikai eltérések) információkat nyerhetünk a cfDNS analízisével. A cfDNS mennyiségét és összetételét számos tényező befolyásolja, beleértve a tumor stádiumát és anatómiai lokalizációját, a daganatos szubklónok relatív tömegét, a növekedési sebességet, a stromalis és gyulladáshoz kapcsolódó komponenseket, az apoptózist és a nekrozis mértékét [15]. A cfDNS a daganatos betegek perifériás vérében nagyobb mennyiségben fordul elő, mint egészséges, tumorral nem rendelkezők vérében (6,58 vs. 0,33 ng/ml) [16]. Tekintettel arra, hogy a cfDNS-ek alacsony koncentrációban vannak jelen a perifériás vérben, nagy áteresztőképességű módszer szükséges a vizsgálatukhoz, mint például az újgenerációs szekvenálás. A liquid biopszia minimális kockázattal jár, megismételhető, ezért úgy gondoljuk, hogy óriási előrelépés lehet olyan esetekben, amelyeknél a szövettani mintavétel nem kivitelezhető.

Munkánk célkitűzése az epeúti daganatokból származó cfDNS mennyiségi meghatározása, a becsült tumortérfogat (estimated tumor volume, ETV) és a cfDNS koncentrációja közötti összefüggés vizsgálata. Mindezek mellett a szomatikus mutációk azonosítását, valamint a tumorvariáns-terhelés (TVB) számszerűsítését és összehasonlítását is elvégeztük. Vizsgáltuk az epeúti tumor három altípusában előforduló nukleotidvariánsok megoszlását. Az újgenerációs szekvenálás során ugyanazon betegből származó, szövettani és liquid biopszia során nyert DNS-mintákat analizáltunk 67 génes szolidtumorpantelt alkalmazva. A vizsgálatokat 33 epeúti tumoros beteg szövettani és párosított liquid biopsziás mintáján végeztük el.

## Betegek és módszer

### A betegek mintái

Összesen 33 epeúti daganat formalinban fixált paraffinba ágyazott szövettani mintáin és a hozzájuk párosított 33 liquid biopsziás mintán végeztük el az újgenerációs szekvenálási vizsgálatot. Tekintettel arra, hogy a betegek döntő része hasonló kezelésben részesült, a liquid biopsziás mintát a szövettani mintavételtől átlagosan 24 hónapra vettük (tartomány: 12–36 hónap) a kemoterápia hatásosságának értékelése miatt (az etikai engedély száma: 60355-2/2016/EKU és 4648-6/2018/EÜIG).

### Becsült tumortérfogat

A daganatok térfogatát CT és/vagy MRI képalkotói felvételek alapján határoztuk meg a 'szélesség' és 'hosszúság' paraméterek segítségével [17]. A felvételek a szövettani mintavétel előtti vagy pedig a reszekció előtti állapotot tükrözték. A tumor maximális szélességének ( $w$ ) és hosszúságának ( $l$ ) értékéből becsült tumortérfogatot számítottunk az alábbi képlet segítségével [18]:

$$V(\text{mm}^3) = \frac{w^2(\text{mm}^2) \times l(\text{mm})}{2}$$

### Immunhisztokémia

A daganatok szövettani jellemzésére a következő antitesteket használtuk: CK7 (OV-TL klón 12/30, 1 : 100 hígítás, Dako, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), CK18/8 (5D3 klón, 1 : 100 hígítás, Leica Biosystems, Wetzlar, Németország), CK19 (Ks19.1 klón, 1 : 200 hígítás, Biocare Medical, Concord, CA, USA), CK20 (Ks20.8 klón, 1 : 200 hígítás, Leica Biosystems), CA19-9 (C241:5:1:4 klón, 1 : 200 hígítás, Leica Biosystems), HSA (OCH1E5 klón, 1 : 700 hígítás, Dako, Agilent Technologies), argináz (poliklonális, 1 : 20 000 hígítás, Merck, Darmstadt, Németország) és glipikán-3 (1G12 klón, 1 : 50 hígítás, Biocare Medical).

### DNS-izolálás

A liquid biopszia perifériás vérvétellel történt EDTA antikoagulált vérvételi csövekbe. A liquid biopsziás minta feldolgozása során a plazma centrifugálása ( $16\,000 \times g$ , 10 perc) után nyertük a cfDNS izolálására alkalmas felülúszót.

A kórszövettani minták DNS-izolálásához QIAamp DNA FFPE Tissue Kitet, míg a perifériás vérben szabadon keringő, tumorból származó DNS kivonásához QIAamp Circulating Nucleic Acid Kitet (Qiagen, Hilden, Németország) alkalmaztunk. A DNS-koncentrációkat Qubit dsDNA HS Assay Kittel mértük Qubit 4.0 fluorométer használatával (Thermo Fisher Scientific,

Waltham, MA, USA). Liquid biopszia esetében a kapott DNS-koncentrációból DNS-hozamot számoltunk az alábbi képlet segítségével:

$$\text{DNS-hozam} \left( \frac{\text{ng}}{\text{ml}} \text{ plazma} \right) = \frac{\text{DNS-koncentráció} \left( \frac{\text{ng}}{\mu\text{l}} \right) \times \text{eluálási térfogat} (35 \mu\text{l})}{\text{plazmatérfogat} (\text{ml})}$$

### Újgenerációs szekvenálás

Az újgenerációs szekvenálási vizsgálatra 67 génes Archer VariantPlex Solid Tumor Kitet (ArcherDX, Boulder, CO, USA) alkalmaztunk. A könyvtárak koncentrációját KAPA Universal Library Quantification Kit (Hoffmann-La Roche, Bazel, Svájc) segítségével mértük. A szekvenálás Illumina MiSeq készüléken történt (MiSeq Reagent Kit v3 600 ciklus, Illumina, San Diego, CA, USA). A végső futási koncentráció 8 pM könyvtár és 1% PhiX volt. A FASTQ-fájlokat az Archer Local Virtual Machine alkalmazásával elemeztük (6.2.7-es verzió, ArcherDX). Referenciagenomnak a GRCh37 humán genomot használtuk.

A szekvenáció minőségét figyelembe véve a variáns-állélfrekvenciát (VAF) FFPE-minták esetében 3%-ra, liquid biopsziás minták esetében 2%-ra állítottuk. Nagy méretű insertiók/deletiók (>50 bp) és komplex szerkezeti változások kimutatására a módszer nem alkalmas. Az azonosított mutációk klinikai jelentőségének meghatározásához a COSMIC adatbázist használtuk, míg a terápiás lehetőségek megítélése az OncoKB adatbázis alapján történt.

### Statisztikai analízis

A statisztikai analízist GraphPad Prism 9 programmal (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) végeztük. Az epeúti betegek három altípusában az ETV-k, a cfDNS-hozamok és a TVB összehasonlításához párosítatlan  $t$ -próbát alkalmaztunk. Az ETV és a cfDNS-hozam közötti összefüggés vizsgálata, az ETV és a TVB, valamint a plazma-cfDNS-mennyiség és a plazma-TVB összehasonlítása Pearson-féle korrelációs analízissel történt. A  $p < 0,005$  értéket tekintettük statisztikailag szignifikánsnak.

### Eredmények

A betegek átlagéletkora 63,69 év volt (tartomány: 41–80), a nemek eloszlása alapján 17/16 férfi/nő került bevonásra vizsgálatunkba. A tumorlokalizáció alapján megkülönböztettünk 17 intrahepaticus, 8 extrahepaticus cholangiocarcinomás és 8, epehólyagtumorról rendelkező beteget. A tumorok térfogatának méréséből az átlagos ETV-érték  $189\,747 \text{ mm}^3$  volt. 6 esetben metasztázis

alakult ki (1., 2., 3., 13., 14. és 32. eset), ezek méretét hozzáadtuk a primer tumor ETV-értékéhez. Intrahepaticus és extrahepaticus cholangiocarcinoma esetében szöveti biopszia történt a diagnózis felállításának időpontjában, míg epehólyagtumor esetén eltávolították a tumort. A legtöbb esetben gemcitabinalapú kemoterápiát kaptak a betegek. A klinikopatológiai adatokat részletesen az 1. táblázat mutatja be.

1. táblázat | A betegek klinikopatológiai adatai a kemoterápia, illetve a műtéti beavatkozás előtt

Esetek	Nem	Életkor (év)	ETV (mm <sup>3</sup> )	BTC-típus
1.	Nő	80	83 349*	IHCC
2.	Nő	75	88 200*	IHCC
3.	Férfi	76	56 784*	IHCC
4.	Férfi	59	37 044	IHCC
5.	Férfi	68	168 000	IHCC
6.	Férfi	68	37 462	IHCC
7.	Férfi	60	259 200	IHCC
8.	Férfi	68	62 500	IHCC
9.	Nő	63	1 230 187	IHCC
10.	Férfi	53	263 250	IHCC
11.	Férfi	70	12 800	IHCC
12.	Nő	61	283 500	IHCC
13.	Férfi	75	9 126*	IHCC
14.	Nő	49	140 625*	IHCC
15.	Nő	66	670 372	IHCC
16.	Férfi	69	83 356	IHCC
17.	Nő	67	138 627	IHCC
18.	Nő	64	36 162	EHCC
19.	Férfi	43	952 544	EHCC
20.	Férfi	51	6 664	EHCC
21.	Nő	70	98 606	EHCC
22.	Nő	71	32 000	EHCC
23.	Nő	54	259 400	EHCC
24.	Nő	64	10 236	EHCC
25.	Férfi	72	526 345	EHCC
26.	Nő	58	6 750	GBC
27.	Férfi	70	126 000	GBC
28.	Férfi	68	3 179	GBC
29.	Nő	71	137 312	GBC
30.	Nő	60	98 000	GBC
31.	Nő	60	75 324	GBC
32.	Férfi	58	16 000*	GBC
33.	Férfi	41	252 756	GBC

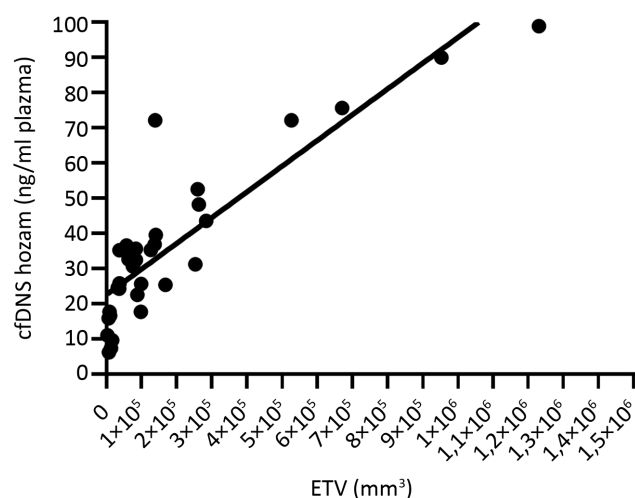
BTC = epeúti tumor; EHCC = extrahepaticus cholangiocarcinoma; GBC = epehólyag-daganat; IHCC = intrahepaticus cholangiocarcinoma  
A \*-gal jelölt becsült tumortérfogati (estimated tumor volume – ETV) értékek tartalmazzák a metasztázisok méretét is

Kórszövettani szempontból az epeúti tumorok esetében a daganatsejtek pleomorfak, magas nukleáris/citoplazma aránnyal, kifejezett sejtmagatípiával rendelkeznek, grade 2–3. típusba sorolva. Immunhisztokémiai vizsgálatokkal CK7- (31/33, 93%), CK8/18- (29/33, 87%), CK19- (33/33, 100%) és CA19.9- (29/33, 87%) pozitivitást találtunk, míg CK20 (27/33, 81%), HSA (33/33, 100%), argináz (29/33, 87%) és gliplikán (27/33, 81%) esetében immunnegativitást tapasztaltunk (2. táblázat).

Nem találtunk szignifikáns eltérést a tumortömeget figyelembe véve az intrahepaticus és az extrahepaticus csoport között ( $p = 0,5875$ ), valamint az intrahepaticus cholangiocarcinomával és az epehólyagtumorról rendelkezők ( $p = 0,238$ ), illetve az extrahepaticus cholangiocarcinomával és az epehólyagtumorról rendelkezők ( $p = 0,5737$ ) között sem.

Az átlagos cfDNS-hozam a plazmában 36,42 ng/ml (tartomány: 6,18–98,9) volt. Statisztikailag nem volt szignifikáns eltérés az intra- és az extrahepaticus ( $p = 0,5196$ ), valamint az extrahepaticus és az epehólyagtumoros ( $p = 0,3282$ ) csoportok cfDNS-hozama között, azonban szignifikánsan magasabb cfDNS-mennyiséget izoláltunk az intrahepaticus csoport esetén az epehólyagtumorról rendelkező alcsoporthoz képest ( $p = 0,03$ ). Emellett szignifikáns kapcsolatot találtunk az ETV és a cfDNS-hozam között az összes esetet figyelembe véve, Pearson-féle korrelációt alkalmazva ( $r = 0,8776$ ,  $p < 0,0001$ ) (1. ábra), míg a tumorméret és a TVB között nem volt összefüggés sem szöveti ( $r = -0,24$ ;  $p = 0,088$ ), sem liquid biopsziás minták esetében ( $r = -0,02$ ;  $p = 0,0458$ ).

A TVB a detektált génvariánsok számát jelöli mindhárom csoportban és mindkét mintatípusban (>2% VAF-fel rendelkező SNP-k száma, 2. ábra). A legnagyobb genetikai terheltség a 2., 20., 28. és 32. esetenél figyelhető



1. ábra | A becsült tumortérfogat (ETV) és a tumorból származó szabad (cell-free) DNS hozama közötti összefüggés. A Pearson-féle együthartható szignifikáns korrelációt mutatott ( $r = 0,8776$ ,  $p < 0,0001$ )



2. táblázat | A betegek immunhisztokémiai jellemzői

Esetek	CK7	CK8/18	CK19	CK20	CA19.9	HSA	Argináz	Glipikán	PDL1 (SP142)
1.	+	+	+	-	+	-	-	-	-
2.	+	+	+	+	+	-	-	-	-
3.	+	+	+	-	+	-	-	-	-
4.	+	+	+	-	+	-	-	-	-
5.	+	+	+	-	+	-	-	-	-
6.	+	-	+	-	+	-	-	-	-
7.	+	+	+	-	+	-	-	-	-
8.	+	+	+	-	+	-	-	+	-
9.	+	+	+	+	+	-	-	-	-
10.	+	+	+	-	+	-	-	-	-
11.	+	+	+	-	+	-	+	-	-
12.	+	+	+	+	+	-	-	-	-
13.	+	+	+	-	-	-	-	-	-
14.	+	+	+	-	+	-	-	+	-
15.	+	-	+	-	+	-	-	-	-
16.	+	-	+	-	+	-	-	+	-
17.	+	+	+	-	+	-	-	-	-
18.	+	+	+	-	+	-	-	-	-
19.	+	+	+	-	+	-	-	-	-
20.	-	+	+	-	+	-	-	-	-
21.	+	+	+	-	-	-	-	-	-
22.	+	+	+	-	+	-	-	-	-
23.	+	-	+	-	+	-	-	-	-
24.	+	+	+	-	+	-	-	-	-
25.	-	+	+	+	-	-	-	+	-
26.	+	+	+	-	+	-	-	-	-
27.	+	+	+	+	+	-	-	-	-
28.	+	+	+	-	+	-	+	+	-
29.	+	+	+	-	+	-	+	-	-
30.	+	+	+	-	+	-	-	-	-
31.	+	+	+	-	+	-	-	+	-
32.	+	+	+	+	+	-	-	-	-
33.	+	+	+	-	-	-	+	-	-

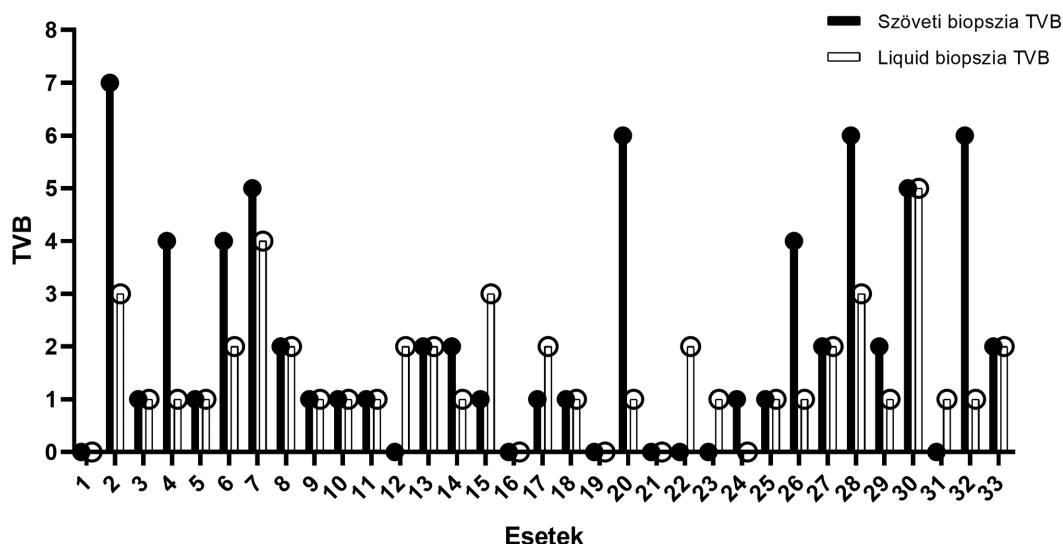
CA = rákantigén; CK = citokeratin; HSA = hepatocytaspecifikus antigén; PDL1 = programozott sejthalál ligand-1

meg, míg az 1., 16., 19. és 21. beteg esetében nukleotid-eltérés nem fordult elő. 4 esetben (12., 22., 23. és 31. beteg) csak a liquid biopszia bizonyult informatívnak a mutációk kimutatása szempontjából. A szöveti és a liquid biopsziás mintákat összehasonlítva nem volt szignifikáns különbség a három altípus átlagos TVB-értékében (szöveti *vs.* liquid biopszia intrahepaticus cholangiocarcinómában: 1,94 *vs.* 1,588,  $p = 0,3839$ ; szöveti *vs.* liquid biopszia extrahepaticus cholangiocarcinómában: 1,125 *vs.* 0,75,  $p = 0,0155$ ; szöveti *vs.* liquid biopszia epehólyagtumorban: 3,375 *vs.* 2,  $p = 0,1708$ ). Nem találtunk korrelációt a plazmából izolált cfDNA-hozam és a plazma-

TVB között az összes esetet figyelembevéve ( $r = -0,06824$ ;  $p = 0,353$ ).

A betegek 88%-ában nukleotideltérést igazoltunk (29/33), míg az 1., 16., 19. és 21. esetben a nukleotid-szekvenciában eltérést nem detektáltunk. Az analízis során 4 esetben csak a liquid biopsziás minta volt informatív (a szöveti biopsziából származó DNS mennyisége nem volt megfelelő a molekuláris analízishez: 12., 22., 23. és 31. eset) (3. táblázat).

Patogén variánsok az esetek 70%-ában jelentek meg (23/33), leginkább az epeúti daganatokra specifikus génekben, mint például *FGFR2*, *IDH1*, *IDH2*, *KRAS* és



2. ábra | A tumorvariáns-terhelés (TVB) mértéke az egyes betegek esetében. A TVB-t a 2% VAF (variáns-allélfrekvencia) feletti génvariánsok számának megadásával fejeztük ki

3. táblázat | A kimutatott nukleotideltérések variánsallélfrekvencia-megoszlása (VAF%) szöveti és liquid biopsziás mintákban. A genetikai elváltozások klinikai jelentőségét a COSMIC adatbázis alapján határoztuk meg

Esetek	Gén	Nukleotidváltozás	Aminosav-változás	VAF (%) szöveti biopszia	VAF (%) liquid biopszia	Klinikai jelentőség
2.	<i>KRAS</i>	c.407G>A	p.Ser136Asn	50	21,3	Patogén
	<i>IDH1</i>	c.395G>T	p.Arg132Leu	25	19,6	Patogén
	<i>PTEN</i>	c.925G>A	p.Ala309Thr	20	15,2	Neutrális
	<i>FBXW7</i>	c.239C>T	p.Thr80Ile	6	0	Feltehetően patogén
	<i>IDH2</i>	c.332G>A	p.Gly111Asp	4,6	0	Feltehetően neutrális
	<i>CDH1</i>	c.596C>T	p.Thr199Ile	4,3	0	Feltehetően neutrális
	3.	<i>PIK3CA</i>	c.1634A>C	p.Glu545Ala	3	3
6.	<i>FOXL2</i>	c.536C>G	p.Ala179Gly	57,6	15,2	Neutrális
	<i>APC</i>	c.7504G>A	p.Gly2502Ser	49,5	6,7	Feltehetően patogén
	<i>PIK3CA</i>	c.1634A>C	p.Glu545Ala	3,8	0	Patogén
7.	<i>JAK3</i>	c.2164G>A	p.Val722Ile	45,5	6,9	Neutrális
	<i>TP53</i>	c.518T>C	p.Val173Ala	13,2	4,9	Patogén
	<i>KRAS</i>	c.35G>T	p.Gly12Val	12,8	3,6	Patogén
8.	<i>TP53</i>	c.460G>A	p.Gly154Ser	4	2,1	Patogén
9.	<i>FGFR2</i>	c.827T>G	p.Phe276Cys	37	6,3	Patogén
10.	<i>IDH2</i>	c.515G>T	p.Arg172Met	24,3	21,5	Patogén
11.	<i>IDH2</i>	c.359G>A	p.Arg120Lys	27,6	8,4	Patogén
12.	<i>KDR</i>	c.1444T>C	p.Cys482Arg	alacsony tumorsejt arány	47,2	Patogén
	<i>STK11</i>	c.1189G>A	p.Ala397Thr		46,3	Neutrális
13.	<i>TP53</i>	c.536A>G	p.His179Arg	62,6	5,6	Patogén
	<i>IDH2</i>	c.359G>A	p.Arg120Lys	30,2	4,2	Patogén
14.	<i>MET</i>	c.2975C>T	p.Thr992Ile	0	45,8	Patogén
15.	<i>CSF1R</i>	c.2916C>G	p.Cys972Trp	0	7,9	Neutrális
	<i>RET</i>	c.1946C>T	p.Ser649Leu	0	7,8	Feltehetően patogén
	<i>FOXL2</i>	c.536C>G	p.Ala179Gly	61,6	4,5	Neutrális
17.	<i>FOXL2</i>	c.536C>G	p.Ala179Gly	0	65,23	Neutrális
18.	<i>TP53</i>	c.796G>T	p.Gly266Ter	29,2	5,2	Patogén

3. táblázat folyt.

Esetek	Gén	Nukleotidváltozás	Aminosav-változás	VAF (%) szöveti biopszia	VAF (%) liquid biopszia	Klinikai jelentőség
20.	<i>MET</i>	c.1124A>G	p.Asn375Ser	59,7	48,21	Patogén
	<i>HRAS</i>	c.182A>G	p.Gln61Arg	33,3	0	Patogén
	<i>PIK3CA</i>	c.44T>G	p.Leu15Trp	7,3	0	Neutrális
	<i>PIK3CA</i>	c.40C>A	p.His14Asn	7,2	0	Feltehetően neutrális
	<i>PIK3CA</i>	c.42C>G	p.His14Gln	7,1	0	Neutrális
	<i>PIK3CA</i>	c.1634A>C	p.Glu545Ala	4,6	0	Patogén
22.	<i>FOX L2</i>	c.536C>G	p.Ala179Gly	alacsony tumorsejt arány	67,5	Neutrális
	<i>PIK3CA</i>	c.1571G>A	p.Arg524Lys		7,7	Patogén
24.	<i>KRAS</i>	c.35G>A	p.Gly12Asp	8,4	0	Patogén
25.	<i>KRAS</i>	c.35G>A	p.Gly12Asp	15	5,6	Patogén
26.	<i>NRAS</i>	c.104C>T	p.Thr35Ile	8,3	2,6	Neutrális
27.	<i>CDKN2A</i>	c.442G>A	p.Ala148Thr	57,8	52	Neutrális
	<i>EGFR</i>	c.2543C>T	p.Pro848Leu	41	39	Feltehetően neutrális
28.	<i>CDKN2A</i>	c.442G>A	p.Ala148Thr	49	52,8	Neutrális
	<i>CDH1</i>	c.2474C>T	p.Pro825Leu	46	50,7	Patogén
	<i>MLH1</i>	c.1044G>T	p.Leu348Phe	24,8	0	Neutrális
	<i>HN F1A</i>	c.862delG	p.Pro291GlnfsTer51	5,2	5,14	Feltehetően patogén
	<i>TP53</i>	c.325T>G	p.Phe109Val	4,9	0	Patogén
	<i>PTEN</i>	c.802G>T	p.Asp268Tyr	4,6	0	Patogén
29.	<i>STK11</i>	c.842del	p.Pro281ArgfsTer6	6,3	0	Patogén
30.	<i>MLH1</i>	c.1321G>A	p.Ala441Thr	46,2	49,1	Patogén
	<i>TP53</i>	c.707_711del	p.Tyr236LeufsTer2	12,1	3,4	Feltehetően patogén
	<i>PIK3CA</i>	c.1571G>A	p.Arg524Lys	11,3	5,3	Patogén
	<i>CTNNB1</i>	c.133T>C	p.Ser45Pro	11,2	2,4	Patogén
	<i>KRAS</i>	c.34G>T	p.Gly12Cys	6,6	0	Patogén
	<i>FOX L2</i>	c.743T>C	p.Leu248Pro	0	3,1	Feltehetően patogén
32.	<i>EGFR</i>	c.2518G>A	p.Ala840Thr	49,52	48,1	Patogén
	<i>TP53</i>	c.817C>T	p.Arg273Cys	36,49	0	Patogén
	<i>CDKN2A</i>	c.247C>T	p.His83Tyr	25,61	0	Patogén
	<i>SRC</i>	c.1571C>T	p.Thr524Met	25,26	0	Patogén
	<i>PIK3CA</i>	c.3140A>G	p.His1047Arg	11,22	0	Patogén
33.	<i>FGFR4</i>	c.407C>T	p.Phe136Leu	90	90	Neutrális
	<i>MYC</i>	c.217A>C	p.Thr73Phe	23,4	25,4	Patogén

*TP53*. Legtöbbjüket a liquidbiopszia-eredetű cfDNS-ben is azonosítottuk. Vizsgálatunk során 35 gén volt érintett. Ezek közül a *FOX L2*, *PIK3CA*, *KRAS* és *TP53* SNV-k minden epeúti tumoros alcsoportban megjelentek, míg a *CDH1*, *CDKN2A*, *FBXW7*, *H3F3A*, *MLH1*, *PTEN* és *STK11* aberrációk az intrahepaticus és az epehólyagtumoros esetekben voltak kimutathatók. *MET*-aberrációt intrahepaticus és extrahepaticus cholangiocarcinómában is igazoltunk. A *HRAS* c.182A>G (p.Gln61Arg) és *MAP2K1* c.308delT (p.Ile103Thrfs) variánsok csak az extrahepaticus szubtípusba tartozó betegek mintájában volt kimutatható (3. ábra).

## Megbeszélés

Az epeúti daganatok ritka, rossz prognózisú malignitások, melyek terápiás lehetőségei korlátozottak. A hatékony terápia kiválasztásához és a betegség lefolyásának pontosabb megismeréséhez elengedhetetlen a molekuláris háttér feltárása. A precíziós onkológia korszakában a korai diagnózis kiemelten fontos. Prospektív vizsgálatunk célja a cholangiocarcinoma háttérében álló prediktív genetikai aberrációk kimutatása volt.

A genetikai elváltozások ismerete nélkülözhetetlen a célzott terápia pontos kiválasztásához. A molekuláris

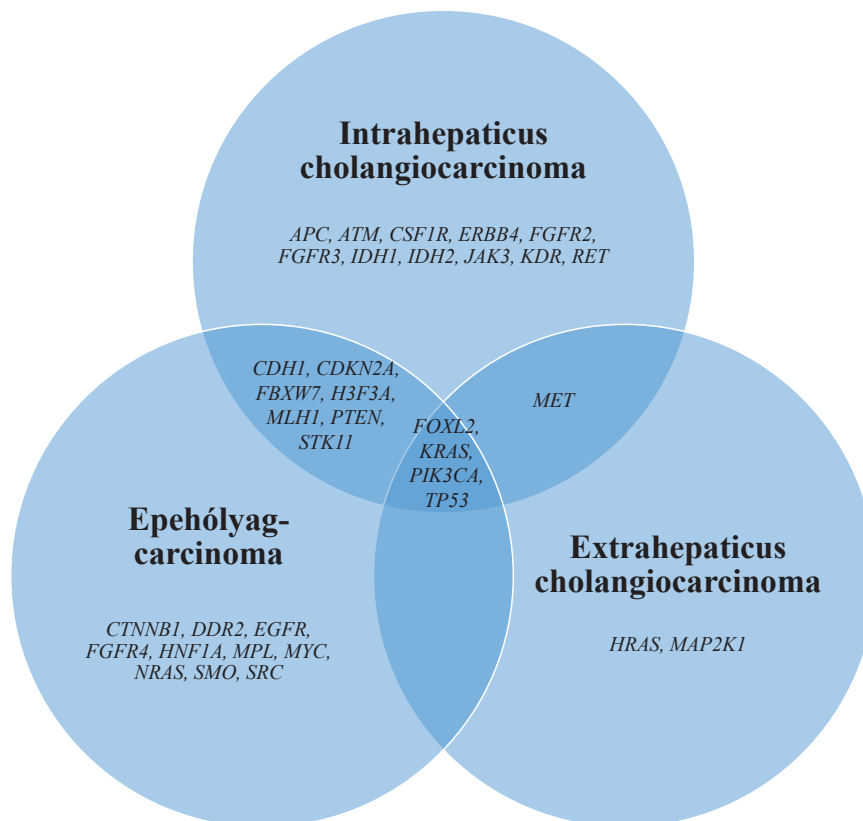
vizsgálatokhoz szükséges tumorszövet-biopszia gyakran kockázatos és nehezen kivitelezhető. A hagyományos szöveti biopsziához képest a liquid biopszia nem invazív, megismételhető eljárás, potenciálisan alternatív módszernek tekinthető. A perifériás vérvétellel történő liquid biopsziát ma már számos rosszindulatú daganat molekuláris diagnosztikájában alkalmazzák, mint például tüdő- és colorectalis adenocarcinomák, valamint melanomák esetében [15, 19–21]. Vizsgálatok történtek már a liquid biopszia használatáról agresszív lymphomák genotipizálásának kapcsán is [22].

Kevés információval rendelkezünk epeúti carcinomás betegek liquid biopsziás vizsgálatáról [23], ezért célunk a cfDNS kvalitatív és kvantitatív elemzése volt. Nem állnak rendelkezésre irodalmi adatok a tumortömeg és a liquid biopszia során nyert nukleinsav mennyiségi összefüggéseinek vizsgálatáról, ezért erre vonatkozóan is végeztünk elemzéseket. Statisztikailag szignifikáns korrelációt igazoltunk a tumor térfogata és a perifériás vérplazma cfDNS-hozama között. Az *in vivo* CT/MRI felvételek alapján számított nagyobb daganattömeg magasabb cfDNS-koncentrációt idézett elő. A metasztatizációk esetében (1., 2., 3., 13., 14. és 32. eset) az ETV meghatározásához a metasztatikus tumor térfogatát is hozzáadtuk a primer tumor méretéhez. A liquid biopsziát átlagosan 24 hónappal a szövettani mintavételt követően végeztük. Az intrahepaticus és az extrahepaticus csoport között nem volt szignifikáns különbség a tumorméret tekintetében, és mivel nem volt kivitelezhető a reszekció, maga-

sabb plazma-cfDNS-mennyiséget mértünk. Epehólyag-tumor esetében, amelynél műtéti eltávolítás történt, alacsonyabb volt a cfDNS-hozam.

A rosszindulatú daganatok széles körében a tumormutációs terhelés (TMB) specifikus biomarker, melyet a molekuláris diagnosztikában használnak az immunterápiára adott válasz előrejelzésére [24]. A TMB a neoplasztikus szövetszövetből izolált Mbp-egységnyi DNS mutációinak számát jelenti. Viszonylag kevés vizsgálat áll rendelkezésünkre epeúti carcinoma esetén TMB-adatokról [25]. Munkánk során a TVB-t mind a szöveti, mind a liquid biopsziás minták esetében számoltuk. A TVB a 2% VAF feletti SNP-k számát jelöli. A tumorszöveti és a liquid biopsziás eredményeket összehasonlítva a legtöbb esetben hasonló TVB-t figyelhettünk meg. Nem volt szignifikáns eltérés a három altípus szöveti és liquid biopsziás eredetű TVB-je között sem. Összesen 63 genetikai elváltozást azonosítottunk a szövetszövetekben, ebből 35-öt kimutattunk a plazmákban is (55,5%). 4 SNV-t kizárólag a plazmában detektáltunk, míg szintén 4 esetben csak a liquid biopszia volt informatív a molekuláris analízis során.

29 betegben azonosítottunk SNV-eket, melyek összhangban vannak a szakirodalmi adatokkal (3. ábra) [26–28]. A legtöbb érintett gént ( $n = 23$ ) az intrahepaticus típusban találtuk, de ezek közül 12 előfordul az extrahepaticus vagy az epehólyagtumor-típusban is. Az extrahepaticus szubtypusban mindössze 7 génelterést azonosítottunk, melyek közül 5 közös volt a többi altípussal is,



3. ábra | Az epeúti tumorokban megjelenő genetikai aberrációk csoportosítása



míg a *MAP2K1* és *HRAS* variánsok kizárólag ebben a csoportban fordultak elő. Az epehólyagtumorokban detektált 21 aberráció közül 10-et csak az ebbe az anatómiai csoportba tartozó betegeknek azonosítottunk. A *CDH1*, *CDKN2A*, *FBXW7*, *H3F3A*, *MLH1*, *PTEN* és *STK11* elváltozásokat az intrahepaticus és az epehólyagtumor-csoportban detektáltuk, míg a *FOXL2*, *PIK3CA*, *KRAS* és *TP53* variánsokat mind a három szövettani altípusban kimutattuk. Irodalmi adatok szerint ezek a variációk a leggyakrabban az extrahepaticus csoportba tartozó betegeknek mutathatók ki, míg intrahepaticus cholangiocarcinoma esetén előfordulásuk kedvezőtlen prognózissal jár [4, 26, 29].

Cholangiocarcinómában a leggyakoribb génmutáció az *IDH1/IDH2* géneket érinti, melyek a leginkább az intrahepaticus csoportban fordulnak elő. Hasonló eredményt kaptunk mi is, mivel ezek csak intrahepaticus cholangiocarcinoma esetén fordultak elő (2., 10., 11. és 13. eset) [1, 3, 26]. Az *FGFR2*-gén érintettsége az intrahepaticus csoportra jellemző [30–32], melyet 1 esetben mi is igazoltunk (9. eset).

A genetikai elváltozásokat a COSMIC adatbázis által meghatározott klinikai jelentőségük szerint kategorizáltuk. 33 beteg közül 23-ban (70%) észleltünk patogén mutációt. Az epeúti tumorokban leggyakrabban érintett gének vizsgálatunkban az *FGFR2*, *IDH1*, *IDH2*, *KRAS* és *TP53* voltak, melyek a párosított liquidbiopszia-eredetű cfDNS-ben is kimutathatók voltak. A *KRAS* és *BRAF* mutációk, az *EGFR* overexpressziója, a *HER2* onkogén jelátviteli utak aktiválása, a DNS-amplifikáció és a deletiók rossz prognózissal járnak [33, 34].

Opcionális onkoterápiás szert mindössze 4 esetben találtunk az OncoKB adatbázis alapján, melyek közül 1 volt specifikus epeúti tumorokra. Az *IDH1* p.Arg132Leu aberráció esetén alkalmazható ivoszidenib (2. eset) az FDA által jóváhagyott terápiás szer cholangiocarcinómában [35, 36]. Az AZD4547, a BGJ398, a Debio1347 és az erdafitinib az összes patogén *FGFR2*-mutációra, a tipifarnib a *HRAS*-eltérésekre alkalmazható.

## Következtetés

Az epeúti carcinómák ritka, rossz prognózissal járó daganatok, melyek esetén a diagnosztikai célú mintavétel gyakran rendkívül nehéz a speciális anatómiai lokalizáció vagy a részleges szöveti érintettség miatt. Ezen problémák megoldása lehet a liquidbiopszia-alapú, nagy átteresztőképességű újgenerációs szekvenálás alkalmazása. Munkánk során a 67 gént vizsgáló újgenerációs szekvenálási panel mindkét mintatípusban hatékonyan tűnt, ugyanakkor nem fedte le teljesen az epeúti tumorokban érintett összes gént. A módszer korlátja továbbá, hogy kópiaszám-variációk (*ERBB2*) és génfüziók (*FGFR2*, *NTRK*) nem vizsgálhatók.

**Anyagi támogatás:** A közlemény megírásáért a szerzők anyagi támogatásban nem részesültek.

**Szerzői munkamegosztás:** Cs. Sz. L., M. A.: Konceptió, tervezés, a vizsgálatok kivitelezése. A. Cs., Á. A.: A beteganyag rendelkezésre bocsátása. B. J., Cs. Sz. L., M. A., V. G.: Adatgyűjtés és ellenőrzés. Cs. Sz. L., M. A.: A kézirat megírása. M. A., M. G.: A projekt koordinálása. A cikk végleges változatát valamennyi szerző elolvasta és jóváhagyta.

**Érdekltség:** A szerzőknek nincsenek érdekltségeik.

## Irodalom

- [1] Noel MS, Hezel AF. New and emerging treatment options for biliary tract cancer. *Onco Targets Ther.* 2013; 6: 1545–1552.
- [2] Weinberg BA, Xiu J, Lindberg MR, et al. Molecular profiling of biliary cancers reveals distinct molecular alterations and potential therapeutic targets. *J Gastrointest Oncol.* 2019; 10: 652–662.
- [3] Putra J, de Abreu FB, Peterson JD, et al. Molecular profiling of intrahepatic and extrahepatic cholangiocarcinoma using next generation sequencing. *Exp Mol Pathol.* 2015; 99: 240–244.
- [4] Lendvai G, Szekerczés T, Illyés I, et al. Cholangiocarcinoma: classification, histopathology and molecular carcinogenesis. *Pathol Oncol Res.* 2020; 26: 3–15.
- [5] Horgan AM, Amir E, Walter T, et al. Adjuvant therapy in the treatment of biliary tract cancer: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Oncol.* 2021; 30: 1934–1940.
- [6] Lamarca A, Hubner RA, David Ryder W, et al. Second-line chemotherapy in advanced biliary cancer: a systematic review. *Ann Oncol.* 2014; 25: 2328–2338.
- [7] Ben-Josef E, Guthrie KA, El-Khoueiry AB, et al. SWOG S0809: A phase II intergroup trial of adjuvant capecitabine and gemcitabine followed by radiotherapy and concurrent capecitabine in extrahepatic cholangiocarcinoma and gallbladder carcinoma. *J Clin Oncol.* 2015; 33: 2617–2622.
- [8] Ma N, Cheng H, Qin B, et al. Adjuvant therapy in the treatment of gallbladder cancer: a meta-analysis. *BMC Cancer* 2015; 15: 615.
- [9] Primrose JN, Fox RP, Palmer DH, et al. Capecitabine compared with observation in resected biliary tract cancer (BILCAP): a randomised, controlled, multicentre, phase 3 study. *Lancet Oncol.* 2019; 20: 663–673. Erratum: *Lancet Oncol.* 2019 Apr 2. PMID: 30922733.
- [10] Lamarca A, Palmer DH, Wasan HS, et al. Second-line FOLFOX chemotherapy versus active symptom control for advanced biliary tract cancer (ABC-06): a phase 3, open-label, randomised, controlled trial. *Lancet Oncol.* 2021; 22: 690–701.
- [11] Tamai K, Nakamura M, Mizuma M, et al. Suppressive expression of CD274 increases tumorigenesis and cancer stem cell phenotypes in cholangiocarcinoma. *Cancer Sci.* 2014; 105: 667–674.
- [12] Fontugne J, Augustin J, Pujals A, et al. PD-L1 expression in perihilar and intrahepatic cholangiocarcinoma. *Oncotarget* 2017; 8: 24644–24651.
- [13] Mody K, Starr J, Saul M, et al. Patterns and genomic correlates of PD-L1 expression in patients with biliary tract cancers. *J Gastrointest Oncol.* 2019; 10: 1099–1109.
- [14] Kiss E, Pápai Zs. Novel targeted therapeutic option in oncology: tropomyosin receptor tyrosine kinase inhibitors. [Új célzott terápiás lehetőség az onkológiában: tropomiozin receptor-tirozin-kináz gátlók.] *Orv Hetil.* 2021; 162: 1362–1369. [Hungarian]

- [15] Méhes G. Liquid biopsy for predictive mutational profiling of solid cancer: the pathologist's perspective. *J Biotechnol.* 2019; 297: 66–70.
- [16] Lapin M, Oltedal S, Tjensvoll K, et al. Fragment size and level of cell-free DNA provide prognostic information in patients with advanced pancreatic cancer. *J Transl Med.* 2018; 16: 300.
- [17] Hungarian Hepatic-Pancreatic-Biliary (HPB) Research Group. Complex management of hepatocellular cancer. [Magyar Hepato-Pancreatico-Biliaris (HPB) Kutatócsoport. A hepatocellularis carcinoma komplex kezelése. Konszenzuskonferencia, Budapest, 2021. április 24.] *Orv Hetil.* 2021; 162(Suppl 2): 2–31. [Hungarian]
- [18] Sági J, Kovács L, Drexler DA, et al. Tumor volume estimation and quasi-continuous administration for most effective bevacizumab therapy. *PLOS ONE* 2015; 10: e0142190.
- [19] Rachiglio AM, Esposito Abate R, Sacco A, et al. Limits and potential of targeted sequencing analysis of liquid biopsy in patients with lung and colon carcinoma. *Oncotarget* 2016; 7: 66595–66605.
- [20] Gaiser MR, von Bubnoff N, Gebhardt C, et al. Liquid biopsy to monitor melanoma patients. *J Dtsch Dermatol Ges.* 2018; 16: 405–414.
- [21] Mack PC, Banks KC, Espenschied CR, et al. Spectrum of driver mutations and clinical impact of circulating tumor DNA analysis in non-small cell lung cancer: analysis of over 8000 cases. *Cancer* 2020; 126: 3219–3228.
- [22] Mokánszki A, Bicskó R, Gergely L, et al. Cell-free total nucleic acid-based genotyping of aggressive lymphoma: comprehensive analysis of gene fusions and nucleotide variants by next-generation sequencing. *Cancers (Basel)* 2021; 13: 3032.
- [23] Rompianesi G, Di Martino M, Gordon-Weeks A, et al. Liquid biopsy in cholangiocarcinoma: current status and future perspectives. *World J Gastrointest Oncol.* 2021; 13: 332–350.
- [24] Samstein RM, Lee CH, Shoushtari AN, et al. Tumor mutational load predicts survival after immunotherapy across multiple cancer types. *Nat Genet.* 2019; 51: 202–206.
- [25] Chen X, Wu X, Wu H, et al. Camrelizumab plus gemcitabine and oxaliplatin (GEMOX) in patients with advanced biliary tract cancer: a single-arm, open-label, phase II trial. *J Immunother Cancer* 2020; 8: e001240.
- [26] Churi CR, Shroff R, Wang Y, et al. Mutation profiling in cholangiocarcinoma: prognostic and therapeutic implications. *PLoS ONE* 2014; 9: e115383.
- [27] Brandi G, Farioli A, Astolfi A, et al. Genetic heterogeneity in cholangiocarcinoma: a major challenge for targeted therapies. *Oncotarget* 2015; 6: 14744–14753.
- [28] Nakamura H, Arai Y, Totoki Y, et al. Genomic spectra of biliary tract cancer. *Nat Genet.* 2015; 47: 1003–1010.
- [29] Montal R, Sia D, Montironi C, et al. Molecular classification and therapeutic targets in extrahepatic cholangiocarcinoma. *J Hepatol.* 2020; 73: 315–327.
- [30] Jusakul A, Cutcutache I, Yong CH, et al. Whole-genome and epigenomic landscapes of etiologically distinct subtypes of cholangiocarcinoma. *Cancer Discov.* 2017; 7: 1116–1135.
- [31] Mertens JC, Rizvi S, Gores GJ. Targeting cholangiocarcinoma. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2018; 1864: 1454–1460.
- [32] Rizvi S, Khan SA, Hallemeier CL, et al. Cholangiocarcinoma – evolving concepts and therapeutic strategies. *Nat Rev Clin Oncol.* 2018; 15: 95–111.
- [33] Andersen JB, Spee B, Blechacz BR, et al. Genomic and genetic characterization of cholangiocarcinoma identifies therapeutic targets for tyrosine kinase inhibitors. *Gastroenterology* 2012; 142: 1021–1031.e15.
- [34] Sia D, Hoshida Y, Villanueva A, et al. Integrative molecular analysis of intrahepatic cholangiocarcinoma reveals 2 classes that have different outcomes. *Gastroenterology* 2013; 144: 829–840.
- [35] Abou-Alfa GK, Macarulla T, Javle MM, et al. Ivosidenib in IDH1-mutant, chemotherapy-refractory cholangiocarcinoma (ClarIDHy): a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 study. *Lancet Oncol.* 2020; 21: 796–807. Erratum: *Lancet Oncol.* 2020; 21: e462.
- [36] Zhu AX, Macarulla T, Javle MM, et al. Final overall survival efficacy results of ivosidenib for patients with advanced cholangiocarcinoma with IDH1 mutation: the phase 3 randomized clinical ClarIDHy trial. *JAMA Oncol.* 2021; 7: 1669–1677.

(Mokánszki Attila dr.,  
Debrecen, Nagyerdei krt. 98., 4032  
e-mail: mokanszki.attila@med.unideb.hu)

„Mora cogitationis diligentia est.”  
(A hosszas gondolkodás a körültekintés serénysége.)

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)