

Asam nukleat bebas untuk deteksi DNA dan RNA Dalam plasma dan serum

Legiran^{1*}

1. Bagian Anatomi, Fakultas Kedokteran, Universitas Sriwijaya
legiran@yahoo.com

Abstrak

Latar belakang. Sejak pertama kali ditemukan pada tahun 1940an, *circulating nucleic acid in plasma and serum* (CNAPS) masih banyak hal perlu dijawab sebelum konsep ini dapat benar-benar diterapkan untuk mendeteksi DNA dan RNA dalam plasma atau serum. Berbagai penelitian mendukung bahwa DNA dan RNA bebas memiliki peluang untuk menjadi pemeriksaan laboratorium untuk diagnosis dan prognosis penyakit terutama keganasan.

Tujuan. Memberi gambaran perkembangan konsep CNAPS dari awal ditemukan disertai hasil-hasil penelitian yang mendukungnya.

Hasil. DNA sel bebas (*cell-free DNA*) dapat berasal dari sel nekrosis, apoptosis, atau yang asalnya dari sel itu sendiri, khususnya sel limfosit dan dapat disimpulkan dua sumber yang mungkin CNAPS adalah pelepasan pasif dari sel mati (apoptosis) dan dari pelepasan aktif dari sekresi sel. Asal CNA pada orang normal dari hasil apoptosis limfosit dan inti sel lainnya dan pada pasien kanker, dimana apoptosis sel hilang karena proliferasi sel meningkat yang ditunjukkan seringkali pada elektroforesis muncul pola tangga (pada kanker paru dan pankreas) yang mirip seperti pola apoptosis sel. Untuk DNA fetal yang masuk ke plasma maternal, dapat berasal dari berbagai kemungkinan yaitu transfer DNA langsung, sel-sel placenta dan hematopoietic, dan placenta sebagai sumber predominan.

Kesimpulan. Penelitian-penelitian yang telah dilakukan memberi harapan CNAPS dapat menjadi metode pemeriksaan yang cepat, non invasif, sensitif, dan akurat jika diteliti dengan standarisasi teknik pemeriksaan, evaluasi yang hati-hati, dan analisis data sesuai parameter.

Kata kunci: CNA, CNAPS, *cell-free DNA*

1. Latar Belakang

Asam nukleat dalam sirkulasi (*circulating nucleic acid* – CNA) pertama kali dalam sejarah dilaporkan oleh Mandel dan Mëtais di salah satu jurnal di Perancis pada tahun 1940an. Ketika itu mereka mengungkapkan tentang asam nukleat bebas dalam plasma (1). Mereka mengklaim mendeteksi DNA dan RNA dalam plasma darah pada individu sehat maupun pada pasien, sayangnya temuan tersebut tidak diperhatikan kemungkinan karena saat itu konsep tentang CNA masih belum jelas (2). Sampai kemudian Leon, dkk pada tahun 1977 menemukan kadar DNA sirkulasi menurun signifikan dihubungkan dengan kemoterapi pada pasien kanker dan berharap agar temuan tersebut dapat menjadi cara untuk mengevaluasi terapi pasien kanker

(3). Hal penting yang telah diakui tentang CNA ketika pada 1994 onkogen mutasi sekuen gen K-ras yang diidentifikasi dengan PCR menggunakan primer spesifik yang deteksinya diambil dari plasma atau serum tiga pasien karsinoma pankreas (4).

Peningkatan kadar CNA (DNA dan RNA) dalam darah pasien menggambarkan bahwa CNA merupakan pemeriksaan atau marker yang menjanjikan karena merupakan pemeriksaan non invasif bersifat non invasive, cepat, sensitif, akurat dalam mendiagnosis berbagai penyakit untuk deteksi dini pada beberapa penyakit melalui DNA dan RNA bebas (2). Istilah CNA kadang juga disebut CNAPS (*circulating nucleic acid in plasma and serum*), telah terbuka bagi berbagai penelitian yang terbingkai pada dua area penelitian translasional: pengembangan teknik

baru diagnosis non invasif pada prenatal (5) dan pemanfaatannya dalam diagnosis dan manajemen sejumlah patologi, paling tidak sebagai sebuah alat (*tools*) pelengkap diagnosis (6-8). Nilai potensial CNAPS dan sedikitnya pengetahuan dasar dan implikasinya telah menarik perhatian para peneliti khususnya dua dekade terakhir yang dapat diketahui dari publikasi pada tahun 2011 lebih dari 100 sementara di tahun 1999 hanya ada 30 publikasi (9).

2. Hasil

Konsep CNAPS telah dimulai sejak pertengahan abad kedua puluh ketika Mandel and Métais untuk pertama kalinya melaporkan adanya *cell-free* DNA (cfDNA) dalam plasma (1). Pengertian "CNAPS" merujuk pada perbedaan tipe dari *cell-free nucleic acids* (cfNAs), seperti *genomic-DNA* (gDNA), *mitochondrial-DNA* (mitDNA), *viral-DNA* and RNA, *messenger* (m)RNA, dan *microRNA* (miRNA), yang telah dilaporkan ada dalam plasma (10, 11).

Analisis fragmen cfDNA dapat dipahami dari asalnya yaitu dari sel nekrosis, apoptosis, atau yang asalnya dari sel itu sendiri, khususnya sel limfosit (12-14). Sehingga dapat disimpulkan dua sumber yang mungkin CNAPS adalah pelepasan pasif dari sel mati dan dari pelepasan aktif dari sekresi sel (15). Teka-teki asal CNA masih mengemuka walaupun kadar DNA dan RNA dalam plasma pada pasien terjadi peningkatan dari hari ke hari.

Pada orang normal, diyakini asal CNA dari hasil apoptosis limfosit dan inti sel lainnya. Hal ini didukung oleh temuan bahwa kadar DNA plasma normal pada elektroforesis menunjukkan ukuran pita ekuivalen dengan jumlah multiplikasi keseluruhan (1-5x) dari DNA nucleosomal (185 – 200 bp) sehingga bisa dikatakan apoptosis merupakan sumber utama CNAPS (16). Sementara pada pasien kanker, dimana apoptosis sel hilang karena proliferasi sel meningkat sehingga seringkali pada elektroforesis muncul pola tangga (pada

kanker paru dan pankreas) yang mirip seperti pola apoptosis sel (16, 17).

Sumber DNA fetal yang masuk ke plasma maternal, berasal dari berbagai kemungkinan yaitu transfer DNA langsung, sel-sel placenta dan hematopoietic, dan placenta sebagai sumber dominan (2). Untuk RNA dengan sifat yang sangat labil dan mudah terdegradasi karena enzim RNA-ase yang ada dimanamana, kemudian orang tidak menduga akan adanya *cell-free* RNA dalam plasma. Namun hadirnya RNA endogenus stabil yang sama dengan eksogenusnya dalam sirkulasi memberi kesan bahwa RNA bisa saja terkandung dalam badan apoptosis (*apoptosis bodies*) atau terikat pada protein/phospholipid dan terlindungi dari degradasi oleh enzim nuclease (18).

3. Metode analisis CAN

DNA sirkulasi umumnya diisolasi menggunakan kit seperti *QIAmp 96 spin Blood DNA extraction* dari Qiagen. Sistem isolasi otomatis seperti MagNa Pure LC dapat menghasilkan *copy* DNA/RNA yang tinggi secara signifikan dan tampak lebih baik dari sistem manual (19). DNA plasma dengan kadar dibawah nanogram dapat dideteksi dengan radio immunoassay. Dan sekarang dengan kadar dibawah picogram dapat dideteksi dengan PCR. Bahkan sekarang dengan *real time (RT) quantitative* PCR digunakan untuk mengamplifikasi dan mengkuantifikasi DNA/RNA. *Light-cycler* RT-PCR prosesnya cepat, mampu mengeliminasi masalah kontaminasi serta tidak membutuhkan proses pasca PCR (20).

Efisiensi ekstraksi CNAPS juga lebih baik dengan memberikan representasi fragmen DNA lebih kecil pada saat ekstraksi (21). *Cell-free* RNA (cfRNA) dapat dideteksi dalam cairan tubuh lainnya seperti saliva dan urine, hasilnya memuaskan yaitu dilaporkan mampu mendeteksi sebagai marka diagnosis kanker mulut dan urologi (22).

4. Kesimpulan

Prospek masa depan metode isolasi dan kuantifikasi DNA/RNA pada plasma/serum sangat krusial dalam analisis data. Dibutuhkan standarisasi teknik, evaluasi dengan hati-hati, dan analisis data sesuai parameter umum seperti sensitifitas dan spesifisitas. Isu tentang sediaan yang cocok antara plasma atau serum telah terpecahkan. Diharapkan semua ini dapat menjadikan CNAPS sebagai salah satu teknik pemeriksaan laboratorium rutin dalam identifikasi dan kuantifikasi DNA/RNA. Deteksi CNA memberi tantangan yang memberi peluang besar jika dimanajerial secara adekuat.

Daftar Pustaka

1. Mandel P, Metais P. [The nucleic acids of blood plasma in humans]. *C R Seances Soc Biol Fil.* 1948 Feb;142(3-4):241-3.
2. Swarup V, Rajeswari MR. Circulating (cell-free) nucleic acids--a promising, non-invasive tool for early detection of several human diseases. *FEBS Lett.* 2007 Mar 6;581(5):795-9.
3. Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, Yaros MJ. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res.* 1977 Mar;37(3):646-50.
4. Sorenson GD, Pribish DM, Valone FH, Memoli VA, Bzik DJ, Yao SL. Soluble normal and mutated DNA sequences from single-copy genes in human blood. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1994 Jan-Feb;3(1):67-71.
5. Gahan PB. Circulating nucleic acids in plasma and serum: applications in diagnostic techniques for noninvasive prenatal diagnosis. *Int J Womens Health.* 2013;5:177-86.
6. Gahan PB, Swaminathan R. Circulating nucleic acids in plasma and serum. Recent developments. *Ann N Y Acad Sci.* 2008 Aug;1137:1-6.
7. Gahan PB. Circulating nucleic acids in plasma and serum: roles in diagnosis and prognosis in diabetes and cancer. *Infect Disord Drug Targets.* 2008 Jun;8(2):100-8.
8. Gahan PB. Circulating nucleic acids in plasma and serum: diagnosis and prognosis in cancer. *EPMA J.* 2010 Sep;1(3):503-12.
9. Garcia-Olmo DC, Garcia-Olmo D. Circulating nucleic acids in plasma and serum: an intriguing phenomenon. *Expert Opin Biol Ther.* 2012 Jun;12 Suppl 1:S1-2.
10. Tsang JC, Lo YM. Circulating nucleic acids in plasma/serum. *Pathology.* 2007 Apr;39(2):197-207.
11. Yu M. Somatic mitochondrial DNA mutations in human cancers. *Adv Clin Chem.* 2012;57:99-138.
12. Stroun M, Lyautey J, Lederrey C, Olson-Sand A, Anker P. About the possible origin and mechanism of circulating DNA apoptosis and active DNA release. *Clin Chim Acta.* 2001 Nov;313(1-2):139-42.
13. Choi JJ, Reich CF, 3rd, Pisetsky DS. The role of macrophages in the in vitro generation of extracellular DNA from apoptotic and necrotic cells. *Immunology.* 2005 May;115(1):55-62.
14. Gahan PB, Anker P, Stroun M. Metabolic DNA as the origin of spontaneously released DNA? *Ann N Y Acad Sci.* 2008 Aug;1137:7-17.
15. Gonzalez-Masia JA, Garcia-Olmo D, Garcia-Olmo DC. Circulating nucleic acids in plasma and serum (CNAPS): applications in oncology. *Onco Targets Ther.* 2013;6:819-32.
16. Giacona MB, Ruben GC, Iczkowski KA, Roos TB, Porter DM, Sorenson GD. Cell-free DNA in human blood plasma: length measurements in patients with pancreatic cancer and healthy controls. *Pancreas.* 1998 Jul;17(1):89-97.
17. Fournie GJ, Courtin JP, Laval F, Chale JJ, Pourrat JP, Pujazon MC, et al. Plasma DNA as a marker of cancerous cell death. Investigations in patients suffering from lung cancer and in nude mice bearing

- human tumours. *Cancer Lett.* 1995 May 8;91(2):221-7.
18. Koprski MS, Benko FA, Kwak LW, Gocke CD. Detection of tumor messenger RNA in the serum of patients with malignant melanoma. *Clin Cancer Res.* 1999 Aug;5(8):1961-5.
 19. Alp A, Us D, Hascelik G. [Comparison of manual and automated (MagNA Pure) nucleic acid isolation methods in molecular diagnosis of HIV infections]. *Mikrobiyol Bul.* 2004 Jan-Apr;38(1-2):77-83.
 20. Gueudin M, Plantier JC, Damond F, Roques P, Mauclore P, Simon F. Plasma viral RNA assay in HIV-1 group O infection by real-time PCR. *J Virol Methods.* 2003 Oct;113(1):43-9.
 21. Devonshire AS, Whale AS, Gutteridge A, Jones G, Cowen S, Foy CA, et al. Towards standardisation of cell-free DNA measurement in plasma: controls for extraction efficiency, fragment size bias and quantification. *Anal Bioanal Chem.* 2014 Oct;406(26):6499-512.
 22. Tzimagiorgis G, Michailidou EZ, Kritis A, Markopoulos AK, Koudou S. Recovering circulating extracellular or cell-free RNA from bodily fluids. *Cancer Epidemiol.* 2011 Dec;35(6):580-9.