

Федеральное  
государственное  
бюджетное учреждение  
«Национальный  
медицинский  
исследовательский центр  
онкологии»

им. Н.Н. Петрова»  
Минздрава России  
(Санкт-Петербург, Россия)

## МЕСТО ЖИДКОСТНОЙ БИОПСИИ В ОНКОЛОГИИ\*

Е.Н. Имянитов, Е.Ш. Кулигина, Г.А. Янус

### LIQUID BIOPSY IN CLINICAL ONCOLOGY

**Е.Н. Имянитов**

*Доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН, НМИЦ онкологии  
им. Н.Н. Петрова Минздрава России,  
197758, Россия, Санкт-Петербург, пос. Песочный, Ленинградская ул., 68.*

**Е.Ш. Кулигина**

*Старший научный сотрудник научной лаборатории молекулярной онкологии.*

**Г.А. Янус**

*Научный сотрудник научной лаборатории молекулярной онкологии.*

**E.N. Imyanitov**

*Doctor of Medicine, Professor, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences,  
N.N. Petrov Institute of Oncology,  
197758, Russia, St. Petersburg, Pesochny, Leningradskaya ul., 68.*

**E.Sh. Kuligina**

*Senior Researcher at the Scientific Laboratory of Molecular Oncology.*

**G.A. Janus**

*Researcher at the Scientific Laboratory of Molecular Oncology.*

Жидкостная биопсия (ЖБ) подразумевает анализ фрагментов опухоли (цельных клеток, нуклеиновых кислот, белков и т. д.) в физиологических и патологических жидкостях организма. Этот метод уже вошел в стандарты выявления мутаций, ассоциированных с приобретенной резистентностью к лекарственной терапии. Жидкостная биопсия имеет большие перспективы использования для ранней диагностики рака, контроля радикальности операции, мониторинга динамики злокачественного клона (минимальной остаточной болезни), оценки эффективности лечения и т.д.

**Ключевые слова:** жидкостная биопсия, циркулирующая опухолевая ДНК, циркулирующие опухолевые клетки.

Liquid biopsy is the analysis of tumor fragments (entire cells, nucleic acids, proteins) in physiological and pathological body liquids. This technology has already been included in standard procedures of detecting secondary mutations, which are associate with acquired drug resistance. Liquid biopsy is a promising tool for early cancer detection, evaluation of the success of radical cancer surgery, monitoring of residual tumor disease, assessment of treatment efficacy etc.

**Key words:** liquid biopsy, circulating tumor DNA, circulating tumor cells.

### Введение

Молекулярно-генетический анализ опухолей является основой для выбора персонализированных методов терапии, оценки эффективности лекарственных препаратов, выявления механизмов лекарственной устойчивости и прогнозирования рецидивов. Стандартный

\* Работа поддержана грантом РФФ 18-75-10070.

метод молекулярно-генетического анализа опухоли подразумевает получение фрагментов неопластической ткани с помощью хирургических вмешательств. Применение таких инвазивных процедур не всегда допустимо, зачастую этому препятствуют локализация и размеры очагов, а также общее состояние пациента. Для мониторинга ответа опухоли на терапевтическую схему необходим анализ нескольких последовательных биопсий – в этом случае частое применение инвазивных методов забора материала может оказаться травмирующим для больного [1, 2]. С другой стороны, информативность локальных диагностических интервенций компрометируется внутриопухолевой гетерогенностью [3, 4]. В процессе метастазирования отдельные опухолевые клоны распространяются в разные ниши и эволюционируют независимо друг от друга [5]. Принимая во внимание перечисленные проблемы, связанные с «тканевыми» биопсиями, современные исследования в области онкологии уделяют большое внимание анализу различных биологических жидкостей, контактирующих со злокачественными очагами – эти технологии получили собирательное название «жидкостной биопсии» (ЖБ) (рисунок 1). Установлено, что в жидкостных средах онкологического пациента могут присутствовать разнообразные фрагменты опухолевого происхождения – нуклеиновые кислоты, белковые комплексы, везикулы и даже «свободные» раковые клетки [6]. Поскольку кровь активно контактирует с опухолями различных локализаций, жидкостная биопсия, как правило, подразумевает анализ именно плазмы, хотя в ряде случаев рекомендуется использовать в качестве источника и другие анализы – мочу, плевральный выпот, спинномозговую жидкость и др.

Жидкостная биопсия обеспечивает достаточно высокую чувствительность в отношении детекции циркулирующих опухолевых маркеров, а простота процедуры забора материала делает этот подход незаменимым для неинвазивного мониторинга состояния опухоли и ранней диагностики прогрессирования заболевания [7, 8]. Более того, в последнее время удалось достичь большого прогресса в разработке сверхчувствительных методов жидкостной биопсии, нацеленных на раннее выявление онкологических заболеваний [9]. Препятствием для широкого распространения ЖБ являются методические затруднения, вызванные крайне низкой концентрацией нуклеиновых кислот, которые неопластические клетки высвобождают в кровь. В этой связи требуется не только создание новых сверхчувствительных модификаций методов детекции мутаций, но и оптимизация, а также стандартизация преаналитических этапов жидкостной биопсии. Эти разработки будут способствовать удешевлению и упрощению процедуры, что поможет повсеместно внедрить в клиническую практику этот метод и позволит добиться межлабораторной воспроизводимости его результатов.

### 1. Циркулирующая опухолевая ДНК (цоДНК)

Циркулирующие опухолевые ДНК (цоДНК, circulating tumor DNA, ctDNA) – это фрагменты генома клеток опухоли, которые наравне с фрагментами ДНК нормальных клеток свободно содержатся в плазме периферической крови. Они представляют собой фракцию бесклеточных нуклеиновых кислот, несут те же генетические и эпигенетические вариации, что и «материнская» опухоль. Поэтому цоДНК вполне мо-

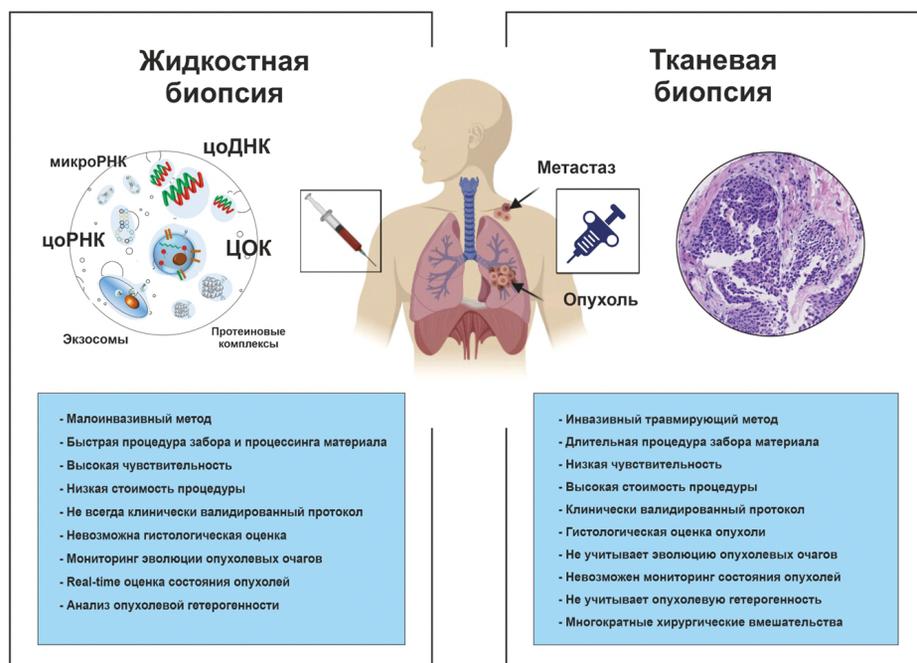


Рис. 1. Особенности жидкостной биопсии по сравнению со стандартной биопсией опухолевого очага

гут быть объектом для изучения опухолевого генома [10–13]. Таким образом, использование цоДНК для жидкостной биопсии является крайне перспективным подходом для молекулярной характеристики и динамического мониторинга опухолей.

Циркулирующие опухолевые ДНК имеют ряд преимуществ перед циркулирующими опухолевыми клетками (ЦОК) в плане использования их для неинвазивной диагностики и мониторинга. Количество ЦОК в периферической крови ничтожно по сравнению с нормальными клетками, их трудно дифференцировать и практически невозможно детектировать на ранних стадиях заболевания – даже в случаях метастатических опухолей ЦОК обнаруживаются только у 30–70% онкологических больных [14, 15]. Напротив, свободные фрагменты опухолевых нуклеиновых кислот в избытке циркулируют в биологических жидкостях у пациентов с опухолями самых разнообразных локализаций на разных стадиях болезни [16, 17].

В основе высвобождения ЦОК и цоДНК из опухоли в кровотоки лежат разные механизмы. В то время как ЦОК представлены, в основном, потенциально метастатическими опухолевыми клетками, мигрирующими в кровеносные сосуды, цоДНК – это останки клеток, подвергшихся апоптозу или некрозу. Среди циркулирующей бесклеточной ДНК опухолеспецифические мутации выявляются прежде всего на коротких фрагментах, прошедших фрагментацию каспазами [18]. Вероятно, такие фрагменты ДНК, попавшие в плазму, защищены от действия ферментов нуклеосомы и/или связанными с ними факторами транскрипции. Во многих случаях по характеру распределения длины фрагментов, их представленности и локализации в геноме удается даже предсказать тканевое происхождение клеток-источников циркулирующих ДНК. Так, циркулирующая ДНК у здоровых людей, в основном, несет черты гемопоэтического происхождения [19]. И все же множество аспектов влияния биологии опухоли на выбросы в кровотоки цоДНК еще не исследованы [20, 21].

Первые попытки использовать циркулирующие опухолевые ДНК в качестве биомаркеров для «жидкой биопсии» сводились к простой количественной оценке их концентрации в периферической крови [22]. Было показано, что пациенты со злокачественными опухолями имеют более высокое содержание циркулирующей ДНК, чем здоровые люди, – это обусловлено дополнительным поступлением в кровь фрагментов ДНК из опухолевых клеток. Позднее обнаружилось, что всевозможные aberrации, присутствующие «материнской» опухоли, могут быть достоверно детектированы в циркулирующих фрагментах ДНК: мутации в онкогенах и опухолевых супрессорах [23]; микросателлитная нестабильность [24]; транслокации, делеции и амплификации [25–28]; нарушения метилирования [29, 30]

Исследования последних лет подтверждают высокую репрезентативность цоДНК по отношению к злокачественному заболеванию в целом, что в сочетании с доступностью этого материала обеспечивает его исключительную ценность и перспективность для молекулярной диагностики. Принимая во внимание гетерогенность опухолевой ткани, можно ожидать, что жидкостная биопсия во многих случаях может оказаться даже предпочтительней, чем традиционная биопсия опухолевых очагов [31–34].

Анализ цоДНК может применяться для различных целей:

- ранней диагностики опухолей;
- оценки ответа опухоли на терапию;
- изучения эволюции резистентности к терапии в реальном времени;
- идентификации генетических детерминант для таргетной терапии;
- мониторинга динамики развития опухоли;
- оценки риска рецидива;
- мониторинга минимальной остаточной болезни.

Изначально наибольшие надежды, связанные с жидкостной биопсией и исследованием цоДНК, были связаны с ранним неинвазивным выявлением опухолей [35]. Действительно, современные методы высокопроизводительного секвенирования и биоинформатической обработки результатов (targeted error correction sequencing (TEC-Seq), integrated digital error suppression (iDES)-enhanced cancer personalized profiling by deep sequencing (CAPP-Seq)) достигли исключительно высоких аналитических показателей – они позволяют обеспечить выявление единичных копий опухолевого генома на фоне присутствия больших количеств неопухолевой ДНК [36, 37]. Вероятно, предел возможного методического прогресса в этом направлении уже достигнут [9]. В недавней работе, использующей метод TEC-Seq, удалось добиться выявления мутаций в цоДНК в 59–71% случаев опухолевых заболеваний I–II стадии [36]. Такие высокотехнологичные методы, однако, весьма дороги для внедрения в качестве рутинного скрининга. Кроме того, выявление единичных патогенных мутаций в «драйверных» генах может быть не связано с онкологическим заболеванием. Наконец, даже самые совершенные методы ДНК-диагностики все же иногда дают ложноположительные результаты [23, 38]. Тем не менее, работы нескольких последних лет показывают, что применение комплексных тестов позволяет эффективно осуществлять первые этапы скрининга, т.е. отбирать пациентов с подозрением на опухолевый процесс для дальнейшего обследования [39, 40]. Хотя подобные тесты и являются весьма дорогостоящими, предварительные расчеты показывают клиническую и экономическую целесообразность их применения у лиц среднего и старшего возраста, поэтому в настоящее время уже идет апробация таких технологий в реальной практике [41, 42]. Особым направлением

работ в данной области является поиск отдельных разновидностей опухолей в группах высокого риска – больных с наследственными опухолевыми синдромами, хронических курильщиков с большим стажем употребления табака и т.д. [43, 44].

Другим направлением ЖБ, нашедшим широкое применение в практической онкологии, является анализ цоДНК для мониторинга ответа опухоли на терапию и оценки риска рецидивов. Накоплено значительное количество данных о том, что падение уровня цоДНК в крови больных раком легкого на фоне применения противоопухолевых препаратов может расцениваться как благоприятный прогностический признак [45–47]. Аналогично длительный мониторинг концентрации и анализ мутаций цоДНК в плазме пациентов с раком прямой кишки на фоне лекарственной терапии позволяет выполнять эффективный контроль течения заболевания [48–50]. Некоторые исследования демонстрируют, что клинический ответ на ингибиторы тирозинкиназ можно с определенной долей уверенности предсказать с помощью анализа изменений концентрации цоДНК в плазме в первые сутки после начала терапии [51–53]. Так, в работе Moiseyenko et al. [51] показано, что пациенты, у которых происходит снижение уровня мутантных цоДНК в первые 48 часов после начала терапии, имеют более продолжительный период до прогрессирования и лучший клинический ответ, чем пациенты со стабильным или возрастающим уровнем цоДНК. Возможность рано оценить ответ опухоли на лечение может оказаться особенно значимой при оценке эффективности иммунотерапии, нередко сопряженной с феноменом «псевдопрогрессии» [54, 55].

Перспективным является и использование жидкостной биопсии для обнаружения и мониторинга минимальной остаточной болезни (minimum residual disease – MRD). Наличие в организме даже очень небольшого количества жизнеспособных неопластических клеток, выдержавших лечебное воздействие, тесно связано с повышенной вероятностью рецидива заболевания. Щадящий характер процедуры ЖБ позволяет выполнять мониторинг циркулирующих в крови опухолевых маркеров у больных, находящихся в ремиссии, и оперативно регистрировать рост опухолевых очагов, а также метастазирование [56, 57]. Ключевым ограничением таких тестов является низкая концентрация опухолевой ДНК в пуле циркулирующих в плазме нуклеиновых кислот «нормального» происхождения, поэтому, как и в случае ранней диагностики рака, это направление ЖБ подразумевает использование сверхчувствительных модификаций NGS и ddPCR. Чувствительность детекции MDR с помощью ЖБ при раке легкого, молочной железы, прямой кишки варьирует от 36% до 99%; специфичность – от 71% до 100% [58–60].

Возникновение вторичной резистентности к таргетным препаратам зачастую связано с появлением

новых мутаций в генах-мишенях. В этом случае жидкостная биопсия также является информативным и безопасным методом для мониторинга молекулярной эволюции опухоли, а поскольку в пуле циркулирующей опухолевой ДНК представлены нуклеиновые кислоты из всех очагов опухолевого поражения, то и проблема гетерогенности неопластических клонов в этом случае нивелируется [61, 62]. Так, например, в клиническую практику повсеместно вошло генотипирование цоДНК из периферической крови больных с немелкоклеточным раком легкого, прогрессирующих на фоне анти-EGFR терапии. В ряде масштабных клинических испытаний было показано, что у значительной доли пациентов (24–37%) формирование резистентности к таргетному препарату сопровождается появлением в плазме фрагментов опухолевой ДНК, несущих приобретенную мутацию EGFR T790M [63–64]. Для поиска активирующих мутаций в гене EGFR (exon 19del, L858R) и отслеживания момента появления мутации резистентности EGFR T790M в цоДНК у пациентов с раком легкого был адаптирован метод цифровой капельной ПЦР (droplet-digital PCR, ddPCR). Его высокая чувствительность позволяет следить за мутационным статусом, корректировать терапию, избегая, таким образом, повторных биопсий, – и даже выявлять мутации EGFR T790M в тех случаях, когда традиционное генотипирование биоптатов оказалось безрезультатным из-за внутриопухолевой гетерогенности резистентных клонов [65–67]. Эти разработки, в отличие от других областей применения жидкостной биопсии, уже внедрены в клиническую практику.

Diaz et al. [68] изучали цоДНК у пациентов, получавших лечение панитумумабом. Оказалось, что в процессе лечения у 38% пациентов наблюдается появление мутаций в генах RAS, объясняющее приобретение опухолью резистентности к данному виду терапии. Интересно, что у ряда пациентов устойчивость к цетуксимабу или панитумумабу возникает вследствие появления вторичных мутаций в гене рецептора эпидермального фактора роста EGFR [61]. В другом исследовании с помощью аллель-специфической количественной ПЦР был исследован статус мутации BRAF V600E в крови у пациентов с метастатическим колоректальным раком на момент начала таргетной терапии. Продемонстрирована стопроцентная диагностическая специфичность и чувствительность в отношении мутаций BRAF, а также специфичность в 98% и чувствительность в 92% случаев использования этого молекулярного теста в отношении семи точечных мутаций в гене KRAS [12]. Статус мутации BRAF V600E имеет первостепенное значение для назначения таргетной терапии у больных метастатической меланомой, поэтому значительные усилия были направлены на разработку методов детекции этой мутации в плазме. На сегодняшний день чувствительность аллель-специфической ПЦР в этом случае составляет

57–75%, специфичность – 100% [69]. Количество мутантных копий гена, циркулирующих в крови, падает сразу же после начала терапии; в 60% случаев мутантная ДНК исчезает в течение 6-ти недель лечения [70]. На данный момент ЖБ уже достаточно хорошо адаптирована к использованию в клинической практике в отношении таких разновидностей опухолей, как рак легкого и рак толстой кишки [71–75].

## 2. Циркулирующие опухолевые микроРНК

МикроРНК – это обширный класс малых некодирующих молекул РНК, выполняющих разнообразную транскрипционную и пост-транскрипционную регуляцию экспрессии таргетных генов путем РНК-интерференции. Предполагается, что под контролем микроРНК находятся практически все сигнальные каскады. Чрезвычайно важным для разработки методов неизвазивной молекулярной диагностики оказалось то обстоятельство, что эти специфические регуляторные молекулы выделяются в кровотоки «материнской» опухоли и в избытке циркулируют там в свободном виде, будучи связанными с защитными белками-транспортёрами или внутри экзосом [76, 77]. Благодаря малому размеру и «инкапсуляции» эти РНК, в отличие от информационных РНК, защищены от действия РНКаз, поэтому очень стабильны и удобны в работе. Это быстро привлекло к ним внимание как к потенциальным биомаркерам. К настоящему времени предприняты многочисленные попытки использовать предиктивную и диагностическую значимость циркулирующих микроРНК для целей «жидкой биопсии» [78, 79].

Анализ профилей экспрессии микроРНК в крови у здоровых людей и онкологических пациентов показал, что существуют специфические паттерны циркулирующих микроРНК, характерные для разных видов рака: печени, желудка, прямой кишки, легких и др. [80–83]. Ведутся исследования с целью приспособить циркулирующие микроРНК для диагностики рака яичников [84], меланомы [85–87], рака легкого [88], рака молочной железы [89], карцином печени [90], колоректального рака [91]. Более того, предполагается, что в случае наличия в опухоли ключевой драйверной мутации (EGFR, KRAS, BRAF и т.д.), реализация каждого конкретного сценария молекулярного канцерогенеза будет сопровождаться специфическим координированным изменением в профиле экспрессии регуляторных РНК, – в частности, микроРНК. Подобные наблюдения уже были сделаны при сравнении профилей микроРНК в различных видах карцином [92–94]. Повышенная экспрессия miR-155 при острой миелоидной лейкемии является предиктивным маркером присутствия в опухоли мутаций FLT3 [95]. В работах, выполненных с помощью техники профилирования микроРНК, было обнаружено более 20 miRs, гиперэкспрессия которых ассоциирована с соматическими мутациями EGFR в аденокарциномах легкого, в част-

ности, miR-148a, miR-452, miR-184, miR-30d, miR-224, miR-3607-5p [96], miR-21 [97], miR-25 [98]. Hatley et al. [99] предоставили доказательства того, что miR-21 является вероятным драйвером патогенеза KRAS-индуцированных аденокарцином легкого. МикроРНК miR-107 была предложена на роль циркулирующего в плазме маркера EGFR-ассоциированных опухолей [100, 101]. Эти открытия утвердили циркулирующие микроРНК в роли перспективных неизвазивных маркеров для диагностики и мониторинга злокачественных заболеваний.

## 3. Циркулирующие опухолевые клетки (ЦОК)

Первые свидетельства наличия опухолевых клеток, циркулирующих в крови и диссемилируемых первичным очагом, относятся еще к середине XIX в. [102]. Как правило, даже при распространенных злокачественных опухолях число ЦОК в кровяном русле не превышает десятка клеток на миллилитр крови, поэтому необходимы методы, позволяющие селективно выделять опухолевые клетки из взятого на анализ образца. На данный момент предложено множество методов обогащения и высокочувствительной детекции ЦОК, которые можно разделить на три группы в соответствии с используемыми подходами:

а) те, что базируются на различии физико-механических свойств опухолевых клеток и форменных элементов крови,

б) те, что предполагают использование поверхностных маркеров для иммуноопосредованной селекции ЦОК,

в) заключающиеся в косвенной идентификации ЦОК по содержащимся в них транскриптам.

Возможны также так называемые «комбинированные» методики, сочетающие в себе несколько подходов.

Простейший критерий селекции опухолевых клеток на основании физико-механических характеристик – отбор по размеру. Для этого могут быть использованы даже обычные пористые фильтры, ибо размер большинства разновидностей раковых клеток превышает средний размер лейкоцита [103]. Так как для многих опухолей характерен большой разброс по размеру опухолевой клетки, а прохождение через пористый фильтр может повреждать клетку, чувствительность такой методики невелика, что ограничивает ее практическое применение. Особенно заметным это оказалось в рамках серии клинических испытаний, посвященных задаче неизвазивного дифференциального диагноза доброкачественных и злокачественных новообразований, выявленных при скрининге у лиц в группе риска (хронические курильщики, страдающие хронической обструктивной болезнью легких) [104]. Существует ряд более современных методик, использующих магнитоэлектрические, деформационные, оптические или акустические воздействия для селекции опухолевых клеток [105–107].

Наиболее популярные методики отбора ЦОК основаны на использовании частиц, конъюгированных с антителами к эпителиальным маркерам [108, 109]. В случае применения иммунофенотипирования обычно задействуются как позитивная селекция раковых клеток по эпителиальным маркерам (EpCAM, MUC1, HER2), так и активное устранение лейкоцитов с использованием эпитопа CD45; иногда применяют большее число маркеров [110, 111]. Интересны различные модификации микрофлюидных устройств для клеточного сортирования, в которых клетки крови (а среди них – ЦОК), отбираются по физическим и/или иммунофенотипическим критериям, проходя через узкие каналы биочипа, заполненные буферной средой: в таких устройствах механическое повреждение клеток сводится к минимуму, что позволяет получить жизнеспособные ЦОК, готовые для создания *ex vivo* клеточных культур, ксенографтов и т.д. [106, 112–114].

Выявление ЦОК не считается оптимальным методом для ранней детекции новообразований, хотя можно заметить, что некоторые разновидности неоплазм отличаются повышенной склонностью диссеминировать ЦОК (например, рак молочной железы, мелкоклеточный рак легкого и т.д.) [115]. Но анализ ЦОК может эффективно дополнять иные разновидности ЖБ [116]. Уникальность анализа ЦОК заключается в возможности создания *ex vivo* тестов на чувствительность к лекарственным препаратам [110, 111]. Однако на данный момент эта задача, хотя и необычайно многообещающая, все еще носит экспериментальный характер. Можно отметить, что в контексте более рутинной диагностики предварительный отбор ЦОК помогает улучшить детекцию предиктивных мутаций [45, 110, 117, 118]. Кроме того, важно, что выделение ЦОК помогает упростить ЖБ в отношении выявления химерных транскриптов, методики детекции которых в реальной практике обычно основаны на анализе мРНК [119–120]. Доказанным предиктивным значением обладает выявление в ЦОК при раке предстательной железы особой сплайсинговой изоформы андрогенового рецептора, AR v7: в таких случаях назначение химиотерапии намного превосходит по эффективности стандартную эндокринную терапию [121, 122].

Установлено, что эффективная терапия опухолей сопровождается исчезновением ЦОК [45, 113, 123]. Многочисленные исследования в самых разных клинических ситуациях неизменно показывают, что обнаружение ЦОК само по себе обладает негативным прогностическим значением [124–128].

Впрочем, приходится констатировать, что характеристики ЦОК не всегда соответствуют свойствам первичной опухоли. В некоторых случаях при HER2-негативном раке молочной железы наблюдаются HER2-позитивные по своему иммунофенотипу ЦОК: клинические испытания показывают ограниченную

эффективность анти-HER2 терапии в подобных ситуациях [129]. Оказалось, что для таких формально HER2-позитивных ЦОК нехарактерна амплификация HER2: их иммунофенотип пластичен и обычно отражает обратимые транскриптомные, а не стойкие геномные изменения [130]. Интересно, что эксперименты на первичных опухолях печени показали, что транскриптомный профиль и потенциал формирования метастатического очага у клеток, давно циркулирующих в крови, и только что покинувших первичный очаг, может быть различен: даже локализация кровеносного сосуда, откуда происходит забор крови для анализа ЦОК, может повлиять на результат некоторых тестов [131].

#### 4. Методические особенности молекулярно-генетического анализа циркулирующих нуклеиновых кислот

Вышеизложенные примеры убедительно свидетельствуют о заманчивых перспективах использования цоДНК и микроРНК в качестве материала для «жидкой биопсии». Однако несмотря на всю привлекательность использования циркулирующих ДНК и РНК в онкологии, в течение длительного времени этому препятствовало отсутствие эффективных и надежных методов выделения цоДНК среди общего пула циркулирующей ДНК пациента, а также методик количественного подсчета и поиска мутаций.

##### 1.1. Преаналитические этапы: забор и процессинг материала, экстракция препаратов цоДНК

Для циркулирующих опухолевых ДНК характерна высокая степень фрагментации; при этом ее концентрация в кровотоке ничтожна на фоне большого количества ДНК из нормальных клеток. Степень деградации нуклеиновых кислот и концентрация циркулирующих опухолевых ДНК в препаратах, полученных из плазмы или других сред организма, могут существенно исказить результаты количественного молекулярного анализа и снижать чувствительность скрининга мутаций [132, 133]. Таким образом, необходимо сформулировать методические правила получения и процессинга биологического материала, а также стандартизации преаналитических этапов жидкостной биопсии.

В этом обзоре мы сосредоточены на перспективах использования крови в качестве источника циркулирующих опухолевых маркеров, однако концепция жидкой биопсии может быть расширена на другие жидкости организма. При этом выбор оптимального материала напрямую зависит от локализации очагов. Так, в случаях новообразований мозга, периферическая кровь, как правило, малоинформативна, и предпочтительнее использовать для анализа спинномозговую жидкость; при раке мочевого пузыря или почки наиболее подходящим анализом будет моча, а в случае карцином легкого, вероятно, следует

включить в исследование образцы слюны, мокроты или плеврального выпота [134–136]. Уже довольно долго существует и применяется одобренный FDA тест для ранней диагностики рака толстой кишки на основе генотипирования ДНК, выделенной из кала, который дополняет тест на скрытую кровь [137, 138]. Бесклеточную ДНК опухолевого происхождения можно детектировать в желчи пациентов с раком желчевыводящих путей. При этом чувствительность таких тестов в плане обнаружения драйверных мутаций многократно превосходит возможности стандартного анализа цоДНК в плазме крови и часто является единственным способом мониторинга состояния опухоли [139, 140]. Локализованная в глазном яблоке ретинобластома (опухоль сетчатки, характерная для детского возраста), не должна подвергаться «солидной» биопсии, если остается возможность органосохраняющего лечения, так как в противном случае велика опасность распространения опухоли за пределы глазницы. Поэтому целый ряд работ посвящен исследованиям ДНК-маркеров ретинобластомы, легко выявляемых в водянистой влаге передней камеры глаза, с целью уточнения диагноза, прогноза и т.д. [141, 142].

Полагают, что для выделения цоДНК плазма крови более пригодна, чем сыворотка, поскольку она в меньшей степени контаминирована ДНК «дикого типа» [143–145]. Препараты бесклеточной ДНК из сыворотки обогащены фрагментами большего размера >800 п.н.; по-видимому, они высвобождаются в кровотоки в результате некроза, а не апоптоза раковых клеток [146].

Первостепенное внимание по традиции уделялось тщательному соблюдению правил сбора и хранения биологического материала на этапах, предшествующих выделению свободных циркулирующих нуклеиновых кислот. Было показано, что многие преаналитические особенности процессинга материала могут существенно менять концентрацию искомого продукта и, вероятно, исказить результаты [146–148]. Промежуток времени более 8 часов между забором крови и центрифугированием имеет критическое влияние на концентрацию цоДНК при использовании сыворотки и практически не влияет на выход продукта в случае процессинга плазмы, даже если хранить кровь при комнатной температуре [149]. Условия центрифугирования, как выяснилось, не имеют большого значения [150]. Chan et al. [147] изучал вопрос, каким образом образование сгустков крови, повторное замораживание и размораживание, немедленная сепарация плазмы от клеток крови и т.д. влияют на степень фрагментации цоДНК и ее концентрацию. Оказалось, что критическим деструктивным моментом является повторное замораживание плазмы на этапах, предшествующих выделению нуклеиновых кислот. Не совсем понятно, оказывают ли влияние на уровень в крови цоДНК и на вероятность обнаружения в плазме опухоль-специфических мутаций физиологический статус боль-

ного, время суток забора материала, сопутствующие заболевания. Известно, например, что физическая нагрузка увеличивает общее количество циркулирующей ДНК, причем в большей степени такое увеличение наблюдается в ситуации поражения сосудов [151, 152]. Работ, посвященных связи циркадианных ритмов и представленности циркулирующей ДНК в плазме, практически не существует [153]. Исследование Kuligina et al [154] продемонстрировало, что уровень цоДНК в плазме онкологических больных действительно может значительно варьировать у одного и того же пациента в течение относительно коротких промежутков времени, однако авторам не удалось зафиксировать причину этих колебаний – концентрация мутантных циркулирующих фрагментов не зависела ни от циркадных ритмов, ни от индивидуальных физиологических параметров пациентов на момент сбора материала (предшествующая физическая нагрузка, прием пищи). Поскольку, как выяснилось, «успех» жидкостной биопсии во многом зависит от ряда неизвестных неконтролируемых факторов, рекомендуется выполнять серийный забор биологического материала и повторные испытания в тех случаях, когда результаты жидкостной биопсии имеют решающее значение для последующего принятия клинически важных решений.

### 1.2. Способы детекции опухоль-специфических мутаций в цоДНК.

Выбор метода для молекулярно-генетической характеристики опухолей с помощью жидкостной биопсии зависит от того, насколько велика фракция цоДНК по сравнению с прочими циркулирующими в крови «нормальными» ДНК. Для небогатых фракций (<1%) рекомендованы методы с использованием высокопроизводительного секвенирования нового поколения (NGS) – Plasma-Seq [155]; CAPP-seq (cancer personalized profiling by deep sequencing) [156]; TEC-Seq (targeted error correction sequencing) [36] и др. Большинство перечисленных методов, будучи дорогостоящими и технически сложными, непригодны для рутинных анализов. Наиболее перспективным методом для внедрения в клиническую практику, по-видимому, является цифровая капельная ПЦР (ddPCR) [157]. Эта высокочувствительная методика в равной мере годится и для поиска низкокопийных aberrаций, и для количественной оценки экспрессии циркулирующих маркеров, например микроРНК [158]. Так, с помощью ddPCR удалось с 66%-ой чувствительностью и 85%-ой специфичностью дифференцировать пациентов с раком легкого от здоровых индивидуумов на основании количественной оценки экспрессии двух циркулирующих микроРНК – miR-31 и miR-210 [159].

### Заключение

Начав свое существование в качестве разнородной группы сугубо экспериментальных методик, совершенно не пригодных к практическому использова-

нию, жидкостная биопсия за минувшее десятилетие стремительно вошла в число перспективных методов клинической онкологии. В целом ряде клинических ситуаций ее применение целесообразнее, чем использование солидной (тканевой) биопсии (например анализ T790M в EGFR при раке легкого) или даже является единственным безопасным вариантом

обследования больного (верификация диагноза ретинобластомы). Идея раннего выявления широкого спектра новообразований по анализу крови получила возможности реализации в рамках таких тестовых платформ, как CancerSEEK и Galleri. Ожидается, что жидкостная биопсия получит значительное распространение в недалеком будущем.

#### Сокращения:

ЖБ – жидкостная биопсия;  
 ХОБЛ – хроническая обструктивная болезнь легких;  
 цодНК – циркулирующие опухолевые ДНК;  
 ЦОК – циркулирующие опухолевые клетки;  
 ctDNA – circulating tumor DNA;  
 ddPCR – droplet digital PCR;  
 FDA – Food and Drug Administration;  
 MRD – minimal residual disease;  
 NGS – next-generation sequencing.

#### References

1. Horgan D., Čufer T., Gatto F., et al. Accelerating the Development and Validation of Liquid Biopsy for Early Cancer Screening and Treatment Tailoring. Healthcare (Basel). 2022 Sep 7; 10(9): 1714. Doi: 10.3390/healthcare10091714.
2. Connors D., Allen J., Alvarez J.D., et al. International liquid biopsy standardization alliance white paper. Crit Rev Oncol Hematol. 2020 Dec; 156: 103112. Doi: 10.1016/j.critrevonc.2020.103112.
3. Gilson P., Merlin J.L., Harlé A. Deciphering Tumour Heterogeneity: From Tissue to Liquid Biopsy. Cancers (Basel). 2022 Mar 8; 14(6): 1384. Doi: 10.3390/cancers14061384.
4. Russano M., Napolitano A., Ribelli G., et al. Liquid biopsy and tumor heterogeneity in metastatic solid tumors: the potentiality of blood samples. J Exp Clin Cancer Res. 2020 May 27; 39(1):95. Doi: 10.1186/s13046-020-01601-2.
5. Kavan S., Kruse T.A., Vogsen M., Hildebrandt M.G., Thomassen M. Heterogeneity and tumor evolution reflected in liquid biopsy in metastatic breast cancer patients: a review. Cancer Metastasis Rev. 2022 Jun; 41(2): 433-446. Doi: 10.1007/s10555-022-10023-9.
6. Alix-Panabières C., Pantel K. Liquid Biopsy: From Discovery to Clinical Application. Cancer Discov. 2021 Apr; 11(4): 858-873. Doi: 10.1158/2159-8290.CD-20-1311.
7. Honoré N., Galot R., van Marcke C., Limaye N., Machiels J.P. Liquid Biopsy to Detect Minimal Residual Disease: Methodology and Impact. Cancers (Basel). 2021 Oct 26; 13(21): 5364. Doi: 10.3390/cancers13215364.
8. Cheng F.T., Lapke N., Wu C.C., et al. Liquid Biopsy Detects Relapse Five Months Earlier than Regular Clinical Follow-Up and Guides Targeted Treatment in Breast Cancer. Case Rep Oncol Med. 2019 Sep 10; 2019: 6545298. Doi: 10.1155/2019/6545298.
9. Crosby D. Delivering on the promise of early detection with liquid biopsies. Br J Cancer. 2022 Feb; 126(3): 313-315. Doi: 10.1038/s41416-021-01646-w.
10. Martins I., Ribeiro I.P., Jorge J., et al. Liquid Biopsies: Applications for Cancer Diagnosis and Monitoring. Genes (Basel). 2021 Feb 27; 12(3): 349. Doi: 10.3390/genes12030349. PMID: 33673461; PMCID: PMC7997281.
11. Heitzer E., Ulz P., Geigl J.B. Circulating tumor DNA as a liquid biopsy for cancer. Clin Chem. 2015 Jan; 61(1): 112-23.
12. Thierry A.R., Mouliere F., El Messaoudi S., et al. Clinical validation of the detection of KRAS and BRAF mutations from circulating tumor DNA. Nat Med. 2014; 20: 430-5.
13. Chan K.C., Jiang P., Chan C.W., et al. Noninvasive detection of cancer-associated genome-wide hypomethylation and copy number aberrations by plasma DNA bisulfite sequencing. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013; 110: 18761-8.
14. Bettegowda C., Sausen M., Leary R.J., Kinde I., et al. Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. Sci Transl Med. 2014 Feb 19; 6(224): 224ra24. Doi: 10.1126/scitranslmed.3007094.
15. Bidard F.C., Madić J., Mariani P., et al. Detection rate and prognostic value of circulating tumor cells and circulating tumor DNA in metastatic uveal melanoma. Int J Cancer. 2014; 134: 1207-13.
16. Lebofsky R., Decraene C., Bernard V., et al. Circulating tumor DNA as a non-invasive substitute to metastasis biopsy for tumor genotyping and personalized medicine in a prospective trial across all tumor types. Mol Oncol. 2015 Apr; 9(4): 783-90.
17. Dawson S.J., Tsui D.W., Murtaza M., et al. Analysis of circulating tumor DNA to monitor metastatic breast cancer. N Engl J Med. 2013; 368: 1199-209.
18. Diehl F., Li M., Dressman D., et al. Detection and quantification of mutations in the plasma of patients with colorectal tumors. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 Nov 8; 102(45): 16368-73.
19. Snyder M.W., Kircher M., Hill A.J., Daza R.M., Shendure J. Cell-free DNA Comprises an In Vivo Nucleosome Footprint that Informs Its Tissues-Of-Origin. Cell. 2016 Jan 14; 164(1-2): 57-68.

20. Heidary M., Auer M., Ulz P., et al. The dynamic range of circulating tumor DNA in metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2014 Aug 9; 16(4): 421.
21. Schwarzenbach H., Hoon D.S., Pantel K. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nat Rev Cancer* 2011; 11: 426-37.
22. Sozzi G., Conte D., Leon M., et al. Quantification of free circulating DNA as a diagnostic marker in lung cancer. *J Clin Oncol.* 2003 Nov 1; 21(21): 3902-8.
23. Wang J.Y., Hsieh J.S., Chang M.Y., et al. Molecular detection of APC, K- ras, and p53 mutations in the serum of colorectal cancer patients as circulating biomarkers. *World J Surg.* 2004 Jul; 28(7): 721-6.
24. Shaw J.A., Smith B.M., Walsh T., et al. Microsatellite alterations plasma DNA of primary breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 1119-24.
25. Goh J.Y., Feng M., Wang W., et al. Chromosome 1q21.3 amplification is a trackable biomarker and actionable target for breast cancer recurrence. *Nat Med.* 2017 Nov; 23(11): 1319-1330.
26. Liang W., He Q., Chen Y., et al. Metastatic EML4-ALK fusion detected by circulating DNA genotyping in an EGFR-mutated NSCLC patient and successful management by adding ALK inhibitors: a case report. *BMC Cancer.* 2016; 16: 62.
27. Sboda K., Masuda K., Ichikawa D., et al. HER2 amplification detected in the circulating DNA of patients with gastric cancer: a retrospective pilot study. *Gastric Cancer.* 2015 Oct; 18(4): 698-710.
28. Lavon I., Refael M., Zelikovitch B., Shalom E., Siegal T. Serum DNA can define tumor-specific genetic and epigenetic markers in gliomas of various grades. *Neuro Oncol.* 2010 Feb; 12(2): 173-80.
29. Rodriguez-Casanova A., Costa-Fraga N., Castro-Carballeira C., et al. A genome-wide cell-free DNA methylation analysis identifies an epignature associated with metastatic luminal B breast cancer. *Front Cell Dev Biol.* 2022 Oct 25; 10: 1016955. Doi: 10.3389/fcell.2022.1016955.
30. Barault L., Amatu A., Siravegna G., et al. Discovery of methylated circulating DNA biomarkers for comprehensive non-invasive monitoring of treatment response in metastatic colorectal cancer. *Gut.* 2018 Nov; 67(11): 1995-2005. Doi: 10.1136/gutjnl-2016-313372.
31. Dietz S., Harms A., Endris V., et al. Spatial distribution of EGFR and KRAS mutation frequencies correlates with histological growth patterns of lung adenocarcinomas. *Int J Cancer.* 2017 Nov 1; 141(9): 1841-1848.
32. Sun R., Hu Z., Sottoriva A., et al. Between-region genetic divergence reflects the mode and tempo of tumor evolution. *Nat Genet.* 2017 Jul; 49(7): 1015-1024.
33. Grellety T., Lucchesi C., Hostein I., et al. High-depth sequencing of paired primary and metastatic tumours: Implications for personalised medicine. *Eur J Cancer.* 2017 Oct; 84: 250-256.
34. De Mattos-Arruda L., Caldas C. Cell-free circulating tumour DNA as a liquid biopsy in breast cancer. *Mol Oncol.* 2016 Mar; 10(3): 464-74.
35. Aravanis A.M., Lee M., Klausner R.D. Next-Generation Sequencing of Circulating Tumor DNA for Early Cancer Detection. *Cell.* 2017 Feb 9; 168(4): 571-574.
36. Phallen J., Sausen M., Adleff V., Leal A., Hruban C., White J., Anagnostou V., Fiksel J., Cristiano S., Papp E., Speir S., Reinert T., Orntoft M.W., Woodward B.D., Murphy D., Parpart-Li S., Riley D., Nesselbush M., Sengamalay N., Georgiadis A., et al. Direct detection of early-stage cancers using circulating tumor DNA. *Sci Transl Med.* 2017 Aug 16; 9(403).
37. Newman A.M., Lovejoy A.F., Klass D.M., et al. Integrated digital error suppression for improved detection of circulating tumor DNA. *Nat Biotechnol.* 2016 May; 34(5): 547-555.
38. Morgan S.R., Whiteley J., Donald E., et al. Comparison of KRAS Mutation Assessment in Tumor DNA and Circulating Free DNA in Plasma and Serum Samples. *Clin Med Insights Pathol.* 2012; 5: 15-22.
39. Lennon A.M., Buchanan A.H., Kinde I., et al. Feasibility of blood testing combined with PET-CT to screen for cancer and guide intervention. *Science.* 2020 Jul 3; 369(6499): eabb9601. Doi: 10.1126/science.abb9601.
40. Klein E.A., Richards D., Cohn A., Tummala M., Lapham R., Cosgrove D., Chung G., Clement J., Gao J., Hunkapiller N., Jamsbidi A., Kurtzman K.N., Seiden M.V., Swanton C., Liu M.C. Clinical validation of a targeted methylation-based multi-cancer early detection test using an independent validation set. *Ann Oncol.* 2021 Sep; 32(9): 1167-1177. Doi: 10.1016/j.annonc.2021.05.806.
41. Hacksbaw A., Cohen S.S., Reichert H., Kansal A.R., Chung K.C., Ofman J.J. Estimating the population health impact of a multi-cancer early detection genomic blood test to complement existing screening in the US and UK. *Br J Cancer.* 2021 Nov; 125(10): 1432-1442. Doi: 10.1038/s41416-021-01498-4.
42. Neal R.D., Johnson P., Clarke C.A., Hamilton S.A., Zhang N., Kumar H., Swanton C., Sasieni P. Cell-Free DNA-Based Multi-Cancer Early Detection Test in an Asymptomatic Screening Population (NHS-Galleri): Design of a Pragmatic, Prospective Randomised Controlled Trial. *Cancers (Basel).* 2022 Oct 1; 14(19): 4818. Doi: 10.3390/cancers14194818.
43. Galati L., Combes J.D., Le Calvez-Kelm F., McKay-Chopin S., Forey N., Ratel M., McKay J., Waterboer T., Schroeder L., Clifford G., Tommasino M., Gheit T. Detection of Circulating HPV16 DNA as a Biomarker for Cervical Cancer by a Bead-Based HPV Genotyping Assay. *Microbiol Spectr.* 2022 Apr 27; 10(2): e0148021. Doi: 10.1128/spectrum.01480-21.
44. Zhang B., Liang H., Liu W., Zhou X., Qiao S., Li F., Tian P., Li C., Ma Y., Zhang H., Zhang Z., Nanjo S., Russo A., Puig-Butillé J.A., Wu K., Wang C., Zhao X., Yue D. A novel approach for the non-invasive diagnosis of pulmonary nodules using low-depth whole-genome sequencing of cell-free DNA. *Transl Lung Cancer Res.* 2022 Oct; 11(10): 2094-2110. Doi: 10.21037/tlcr-22-647.

45. Li Y, Xu Z, Wang S, Zbu Y, Ma D, Mu Y, Ying J, Li J, Xing P. Disease monitoring of epidermal growth factor receptor (EGFR)-mutated non-small-cell lung cancer patients treated with tyrosine kinase inhibitors via EGFR status in circulating tumor DNA. *Thorac Cancer*. 2022 Aug; 13(15): 2201-2209. Doi: 10.1111/1759-7714.14545.
46. Moiseenko F.V., Volkov N.M., Zhabina A.S., Stepanova M.L., Rysev N.A., Klimenko V.V., Myslik A.V., Artemieva E.V., Egorenkov V.V., Abduloeva N.H., Ivantsov A.O., Kuligina E.S., Imyanitov E.N., Moiseyenko V.M. Monitoring of the presence of EGFR-mutated DNA during EGFR-targeted therapy may assist in the prediction of treatment outcome. *Cancer Treat Res Commun*. 2022; 31: 100524. Doi: 10.1016/j.ctarc.2022.100524.
47. Ebert E.B.F., McCulloch T., Hansen K.H., Linnet H., Sorensen B., Meldgaard P. Clearing of circulating tumour DNA predicts clinical response to first line tyrosine kinase inhibitors in advanced epidermal growth factor receptor mutated non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2020 Mar; 141: 37-43. Doi: 10.1016/j.lungcan.2019.12.016.
48. Yang W, Zou J, Li Y, Liu R, Yan Z, Chen S, Zhao X, Guo W, Huang M, Li W, Zbu X, Chen Z. Longitudinal Circulating Tumor DNA Profiling in Metastatic Colorectal Cancer During Anti-EGFR Therapy. *Front Oncol*. 2022 Feb 24; 12: 830816. Doi: 10.3389/fonc.2022.830816.
49. Salvianti F, Gelmini S, Mancini I, Pazzagli M, Pillozzi S, Giommoni E, Bruglia M, Di Costanzo F, Galardi F, De Luca F, Castiglione F, Messerini L, Pinzani P, Antonuzzo L. Circulating tumour cells and cell-free DNA as a prognostic factor in metastatic colorectal cancer: the OMITERC prospective study. *Br J Cancer*. 2021 Jul; 125(1): 94-100. Doi: 10.1038/s41416-021-01399-6.
50. Nakamura Y, Yoshino T. Clinical Utility of Analyzing Circulating Tumor DNA in Patients with Metastatic Colorectal Cancer. *Oncologist*. 2018 Nov; 23(11): 1310-1318. Doi: 10.1634/theoncologist.2017-0621.
51. Moiseyenko F.V., Kuligina E.S., Zhabina A.S., Belukhin S.A., Laidus T.A., Martianov A.S., Zagorodnev K.A., Sokolova T.N., Chuinyshena S.A., Kholmatov M.M., Artemieva E.V., Stepanova E.O., Shuginova T.N., Volkov N.M., Yanus G.A., Imyanitov E.N. Changes in the concentration of EGFR-mutated plasma DNA in the first hours of targeted therapy allow the prediction of tumor response in patients with EGFR-driven lung cancer. *Int J Clin Oncol*. 2022 May; 27(5): 850-862. Doi: 10.1007/s10147-022-02128-6.
52. Phallen J, Leal A, Woodward B.D, Forde P.M, Naidoo J, Marrone K.A, Brabner J.R, Fiksel J, Medina J.E, Cristiano S, Pulsgrove D.N, Gocke C.D, Brubm D.C, Keshavarzian P, Adleff V, Weibe E, Anagnostou V, Scharpf R.B, Velculescu V.E, Husain H. Early Noninvasive Detection of Response to Targeted Therapy in Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancer Res*. 2019 Mar 15; 79(6): 1204-1213. Doi: 10.1158/0008-5472.CAN-18-1082.
53. Riediger A.L., Dietz S., Schirmer U., et al. Mutation analysis of circulating plasma DNA to determine response to EGFR tyrosine kinase inhibitor therapy of lung adenocarcinoma patients. *Sci Rep*. 2016 Sep 19; 6: 33505.
54. Jensen T.J., Goodman A.M., Kato S., Ellison C.K., Daniels G.A., Kim L., Nakashe P., McCarthy E., Mazloom A.R., McLennan G., Grosu D.S., Ehrlich M., Kurzrock R. Genome-Wide Sequencing of Cell-Free DNA Identifies Copy-Number Alterations That Can Be Used for Monitoring Response to Immunotherapy in Cancer Patients. *Mol Cancer Ther*. 2019 Feb; 18(2): 448-458. Doi: 10.1158/1535-7163.MCT-18-0535.
55. Iijima Y, Hirotsu Y, Amemiya K, et al. Very early response of circulating tumour-derived DNA in plasma predicts efficacy of nivolumab treatment in patients with non-small cell lung cancer. *Eur J Cancer*. 2017 Nov; 86: 349-357.
56. Arisi M.F., Dotan E., Fernandez S.V. Circulating Tumor DNA in Precision Oncology and Its Applications in Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci*. 2022 Apr 18; 23(8): 4441. Doi: 10.3390/ijms23084441.
57. Peng Y, Mei W, Ma K, Zeng C. Circulating Tumor DNA and Minimal Residual Disease (MRD) in Solid Tumors: Current Horizons and Future Perspectives. *Front Oncol*. 2021 Nov 18; 11: 763790. Doi: 10.3389/fonc.2021.763790.
58. Pellini B, Chaudhuri A.A. Circulating Tumor DNA Minimal Residual Disease Detection of Non-Small-Cell Lung Cancer Treated With Curative Intent. *J Clin Oncol*. 2022 Feb 20; 40(6): 567-575. Doi: 10.1200/JCO.21.01929. Epub 2022 Jan 5. PMID: 34985936; PMCID: PMC8853615.
59. Tarazona N, Gimeno-Valiente F, Gambardella V, Zuñiga S, Rentero-Garrido P, Huerta M, Roselló S, Martínez-Ciarragli C, Carbonell-Asins J.A, Carrasco F, Ferrer-Martínez A, Bruixola G, Fleitas T, Martín J, Tébar-Martínez R, Moro D, Castillo J, Espi A, Roda D, Cervantes A. Targeted next-generation sequencing of circulating-tumor DNA for tracking minimal residual disease in localized colon cancer. *Ann Oncol*. 2019 Nov 1; 30(11): 1804-1812. Doi: 10.1093/annonc/mdz390.
60. Parsons H.A., Rhoades J., Reed S.C., Gydush G., Ram P., et al. Sensitive Detection of Minimal Residual Disease in Patients Treated for Early-Stage Breast Cancer. *Clin Cancer Res*. 2020 Jun 1; 26(11): 2556-2564. Doi: 10.1158/1078-0432.CCR-19-3005.
61. Strickler J.H., Loree J.M., Abronion L.G., et al. Genomic Landscape of Cell-Free DNA in Patients with Colorectal Cancer. *Cancer Discov*. 2018 Feb; 8(2): 164-173.
62. Gao J., Wang H., Zang W., et al. Circulating tumor DNA functions as an alternative for tissue to overcome tumor heterogeneity in advanced gastric cancer. *Cancer Sci*. 2017 Sep; 108(9): 1881-1887.
63. Selvarajah S, Plante S, Speevak M, Vaags A, Hamelinck D, et al. A Pan-Canadian Validation Study for the Detection of EGFR T790M Mutation Using Circulating Tumor DNA From Peripheral Blood. *JTO Clin Res Rep*. 2021 Jul 13; 2(8):100212. Doi: 10.1016/j.jtocrr.2021.100212.
64. Spence T, Perera S, Weiss J, Grenier S, Ranich L, Shepherd F, Stockley T.L. Clinical implementation of circulating tumour DNA testing for EGFR T790M for detection of treatment resistance in non-small cell lung cancer. *J Clin Pathol*. 2021 Feb; 74(2): 91-97. Doi: 10.1136/jclinpath-2020-206668.

65. Agulnik J.S., Papadakis A.I., Pepe C., Sakr L., Small D., Wang H., Kasymjanova G., Spatz A., Cohen V. Cell-Free Tumor DNA (ctDNA) Utility in Detection of Original Sensitizing and Resistant EGFR Mutations in Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC). *Curr Oncol*. 2022 Feb 14; 29(2): 1107-1116. Doi: 10.3390/curroncol29020094.
66. Sacher A.G., Paweletz C., Dahlberg S.E., et al. Prospective validation of rapid plasma genotyping for the detection of EGFR and KRAS mutations in advanced lung cancer. *JAMA Oncol*. 2016; 2(8): 1014-1022.
67. Karachaliou N., Mayo-de las Casas C., Queralt C., et al. Association of EGFR L858R mutation in circulating free DNA with survival in the EURTAC Trial. *JAMA Oncol*. 1, 149-157 (2015).
68. Diaz L.A. Jr, Williams R.T., Wu J., et al. The molecular evolution of acquired resistance to targeted EGFR blockade in colorectal cancers. *Nature*. 2012 Jun 28; 486(7404): 537-40.
69. Molina-Vila M.A., de-las-Casas C.M., Bertran-Alamillo J., et al. cfDNA analysis from blood in melanoma. *Annals of Translational Medicine*. 2015; 3(20): 309.
70. Schreuer M., Meersseman G., Van Den Herrewegen S., et al. Quantitative assessment of BRAF V600 mutant circulating cell-free tumor DNA as a tool for therapeutic monitoring in metastatic melanoma patients treated with BRAF/MEK inhibitors. *Journal of Translational Medicine*. 2016;14:95.
71. Merker J.D., Oxnard G.R., 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 Jun 1; 36(16): 1631-1641. Doi: 10.1200/JCO.2017.76.8671.
72. Chevrier S., Brasselet A., Carnet M., et al. Custom multi-tumor next-generation sequencing panel for routine molecular diagnosis of solid tumors: Validation and results from three-year clinical use. *Int J Mol Med*. 2022 May; 49(5): 57. Doi: 10.3892/ijmm.2022.5113.
73. Pascual J., Attard G., Bidard F.C., et al. ESMO recommendations on the use of circulating tumour DNA assays for patients with cancer: a report from the ESMO Precision Medicine Working Group. *Ann Oncol*. 2022 Aug; 33(8): 750-768. Doi: 10.1016/j.annonc.2022.05.520
74. Giménez-Capitán A., Bracht J., García J.J., et al. Multiplex Detection of Clinically Relevant Mutations in Liquid Biopsies of Cancer Patients Using a Hybridization-Based Platform. *Clin Chem*. 2021 Mar 1; 67(3): 554-563. Doi: 10.1093/clinchem/hvaa248.
75. Nicolazzo C., Gelibter A., Bottillo I., et al. Comparison of Two Blood-Based Genotyping Tests to Investigate the KRAS G12C Mutation in Patients with Non-Small-Cell Lung Cancer at Failure of First-Line Treatments. *Diagnostics (Basel)*. 2021 Nov 25; 11(12): 2196. Doi: 10.3390/diagnostics11122196.
76. De Guire V., Robitaille R., Tetreault N. Circulating miRNAs as sensitive and specific biomarkers for the diagnosis and monitoring of human diseases: promises and challenges. *Clin. Biochem*. 2013;46(10-11):846-860.
77. Mitchell P.S., Parkin R.K., Kroh E.M. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2008; 105(30): 10513-10518.
78. Montani F., Bianchi F. Circulating Cancer Biomarkers: The Macro-revolution of the Micro-RNA. *EBioMedicine*. 2016 Feb 28; 5: 4-6.
79. Ortiz-Quintero B. Cell-free microRNAs in blood and other body fluids, as cancer biomarkers. *Cell Prolif*. 2016 Jun; 49(3): 281-303.
80. Zhang Z.Q., Meng H., Wang N., et al. Serum microRNA 143 and microRNA 215 as potential biomarkers for the diagnosis of chronic hepatitis and hepatocellular carcinoma. *Diagnostic Pathology*. 2014; 9(1, article 135).
81. Zhu X., Lv M., Wang H., Guan W. Identification of circulating microRNAs as novel potential biomarkers for gastric cancer detection: a systematic review and meta-analysis. *Dig Dis Sci*. 2014 May; 59(5): 911-9.
82. Tomimaru Y., Eguchi H., Nagano H., et al. Circulating microRNA-21 as a novel biomarker for hepatocellular carcinoma. *Journal of Hepatology*. 2012; 56(1): 167-175.
83. Chen X., Ba Y., Ma L., et al. Characterization of miRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res*. 2008; 18: 997-1006.
84. Nakamura K., Sawada K., Yoshimura A., et al. Clinical relevance of circulating cell-free microRNAs in ovarian cancer. *Mol Cancer*. 2016 Jun 24; 15(1): 48.
85. Jayawardana K., Schramm S.J., Tembe V., et al. Identification, Review, and Systematic Cross-Validation of microRNA Prognostic Signatures in Metastatic Melanoma. *J Invest Dermatol*. 2016 Jan; 136(1): 245-54.
86. Fleming N.H., Zhong J., da Silva I.P. Serum-based miRNAs in the prediction and detection of recurrence in melanoma patients. *Cancer*. 2015; 121(1): 51-59.
87. Friedman J.S., Hertz C.A.J., Karajannis M.A., Miller A.M. Tapping into the genome: the role of CSF ctDNA liquid biopsy in glioma. *Neurooncol Adv*. 2022 Nov 11; 4(Suppl 2): ii33-ii40. Doi: 10.1093/noajnl/vdac034.
88. Gyoba J., Shan S., Roa W., Bédard E.L. Diagnosing Lung Cancers through Examination of Micro-RNA Biomarkers in Blood, Plasma, Serum and Sputum: A Review and Summary of Current Literature. *Int J Mol Sci*. 2016 Apr 1; 17(4): 494.
89. Usmani A., Shoro A.A., Shirazi B., Memon Z. Investigative and extrapolative role of microRNAs' genetic expression in breast carcinoma. *Pak J Med Sci*. 2016 May-Jun; 32(3): 766-72.
90. Chauban R., Labiri N. Tissue- and Serum-Associated Biomarkers of Hepatocellular Carcinoma. *Biomark Cancer*. 2016 Jul 4; 8(Suppl 1): 37-55.
91. Ferracin M., Lupini L., Mangolini A., Negrini M. Circulating Non-coding RNA as Biomarkers in Colorectal Cancer. *Adv Exp Med Biol*. 2016; 937: 171-81.

92. Yin C.Q., Yuan C.H., Qu Z., et al. Liquid Biopsy of Hepatocellular Carcinoma: Circulating Tumor-Derived Biomarkers. *Dis Markers*. 2016;2016:1427849.
93. Ruggiero C.F., Fattore L., Terrenato I., et al. Identification of a miRNA-based non-invasive predictive biomarker of response to target therapy in BRAF-mutant melanoma. *Theranostics*. 2022 Oct 24;12(17):7420-7430. Doi: 10.7150/thno.77761.
94. Caramuta S., Egybazi S., Rodolfo M., et al. Mirna expression profiles associated with mutational status and survival in malignant melanoma. *J Invest Dermatol*. 2010; 130: 2062-2070.
95. Garzon R., Garofalo M., Martelli M.P., et al. Distinctive miRNA signature of acute myeloid leukemia bearing cytoplasmic mutated nucleophosmin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008; 105: 3945–3950.
96. Bjaanaes M.M., Halvorsen A.R., Solberg S., et al. Unique microRNA-profiles in EGFR-mutated lung adenocarcinomas. *Int J Cancer* 2014, 135:1812-1821.
97. Seike M., Goto A., Okano T., et al. MiR-21 is an EGFR-regulated anti-apoptotic factor in lung cancer in never-smokers. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106: 12085-90.
98. Dacic S., Kelly L., Shuai Y., et al. miRNA expression profiling of lung adenocarcinomas: correlation with mutational status. *Mod Pathol* 2010; 23: 1577-82.
99. Hatley M.E., Patrick D.M., Garcia M.R., et al. Modulation of K-Ras-dependent lung tumorigenesis by MicroRNA-21. *Cancer Cell* 2010, 18: 282-293.
100. Liu A.M., Yao T.-J., Wang W., et al. Circulating miR-15b and miR-130b in serum as potential markers for detecting hepatocellular carcinoma: a retrospective cohort study. *BMJ Open*. 2012; 2(2).
101. Qu L., Li L., Zheng X., Fu H., et al. Circulating plasma microRNAs as potential markers to identify EGFR mutation status and to monitor epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitor treatment in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Oncotarget*. 2017 Jul 11; 8(28): 45807-45824. Doi: 10.18632/oncotarget.17416.
102. Ashworth T.R. A case of cancer in which cells similar to those in the tumors were seen in the blood after death. *Australian Med J* 1869;14:146-146
103. Vona G., Sabile A., Louba M., et al. Isolation by size of epithelial tumor cells : a new method for the immunomorphological and molecular characterization of circulating tumor cells. *Am J Pathol*. 2000 Jan; 156(1): 57-63. Doi: 10.1016/S0002-9440(10)64706-2.
104. Marquette C.H., Boutros J., Benzaquen J., et al. AIR project Study Group. Circulating tumour cells as a potential biomarker for lung cancer screening: a prospective cohort study. *Lancet Respir Med*. 2020 Jul; 8(7): 709-716. Doi: 10.1016/S2213-2600(20)30081-3.
105. Woo H.J., Kim S.H., Kang H.J., et al. Continuous centrifugal microfluidics (CCM) isolates heterogeneous circulating tumor cells via full automation. *Theranostics*. 2022 May 1;12(8):3676-3689. Doi: 10.7150/thno.72511
106. Bakhsbi M.S., Rizwan M., Khan G.J., Duan H., Zhai K. Design of a novel integrated microfluidic chip for continuous separation of circulating tumor cells from peripheral blood cells. *Sci Rep*. 2022 Oct 11;12(1):17016. Doi: 10.1038/s41598-022-20886-1.
107. Viator J.A., Hazur M., Sajewski A., Tarbini A., Sanders M.E., Edgar R.H. Photoacoustic detection of circulating melanoma cells in late stage patients. *J Innov Opt Health Sci*. 2020 Nov; 13(6): 2050023. Doi: 10.1142/s1793545820500236.
108. Rietdorf S., O'Flaherty L., Hille C., Pantel K. Clinical applications of the CellSearch platform in cancer patients. *Adv Drug Deliv Rev*. 2018 Feb 1; 125: 102-121. Doi: 10.1016/j.addr.2018.01.011.
109. Gorges T.M., Stein A., Quidde J., Hauch S., Röck K., Rietdorf S., Joosse S.A., Pantel K. Improved Detection of Circulating Tumor Cells in Metastatic Colorectal Cancer by the Combination of the CellSearch® System and the AdnaTest®. *PLoS One*. 2016 May 16; 11(5): e0155126. Doi: 10.1371/journal.pone.0155126.
110. Franken A., Bebreus B., Reinhardt F., et al. Multiparametric Circulating Tumor Cell Analysis to Select Targeted Therapies for Breast Cancer Patients. *Cancers (Basel)*. 2021 Nov 29; 13(23): 6004. Doi: 10.3390/cancers13236004.
111. Morrow C.J., Trapani F., Metcalf R.L., et al. Tumourigenic non-small-cell lung cancer mesenchymal circulating tumour cells: a clinical case study. *Ann Oncol*. 2016 Jun; 27(6): 1155-1160. Doi: 10.1093/annonc/mdw122.
112. Lin K.C., Ting L.L., Chang C.L., et al. Ex Vivo Expanded Circulating Tumor Cells for Clinical Anti-Cancer Drug Prediction in Patients with Head and Neck Cancer. *Cancers (Basel)*. 2021 Dec 2; 13(23): 6076. Doi: 10.3390/cancers13236076.
113. De Renzi G., De Marco G., De Meo M., Del Rosso E., Gazzaniga P., Nicolazzo C. In vitro cultures of circulating tumor cells: a potential tool to unravel drug sensitivity. *Cancer Drug Resist*. 2022 Mar 16; 5(1): 245-260. Doi: 10.20517/cdr.2021.121.
114. Yu M., Bardia A., Aceto N., et al. Cancer therapy. Ex vivo culture of circulating breast tumor cells for individualized testing of drug susceptibility. *Science*. 2014 Jul 11; 345(6193): 216-20. Doi: 10.1126/science.1253533.
115. Foy V., Lindsay C.R., Carmel A., et al. EPAC-lung: European pooled analysis of the prognostic value of circulating tumour cells in small cell lung cancer. *Transl Lung Cancer Res*. 2021 Apr; 10(4): 1653-1665. Doi: 10.21037/tlcr-20-1061.
116. Chapin W.J., Till J.E., Hwang W.T., et al. Multianalyte Prognostic Signature Including Circulating Tumor DNA and Circulating Tumor Cells in Patients With Advanced Pancreatic Adenocarcinoma. *JCO Precis Oncol*. 2022 Jul; 6: e2200060. Doi: 10.1200/PO.22.00060.
117. Chang Y., Wang Y., Li B., et al. Whole-Exome Sequencing on Circulating Tumor Cells Explores Platinum-Drug Resistance Mutations in Advanced Non-small Cell Lung Cancer. *Front Genet*. 2021 Sep 20; 12: 722078. Doi: 10.3389/fgene.2021.722078.

118. *Sundaresan T.K., Dubash T.D., Zheng Z., et al.* Evaluation of endocrine resistance using ESR1 genotyping of circulating tumor cells and plasma DNA. *Breast Cancer Res Treat.* 2021 Jul; 188(1): 43-52. Doi: 10.1007/s10549-021-06270-z.
119. *Pailler E., Oulben M., Borget I., et al.* Circulating Tumor Cells with Aberrant ALK Copy Number Predict Progression-Free Survival during Crizotinib Treatment in ALK-Rearranged Non-Small Cell Lung Cancer Patients. *Cancer Res.* 2017 May 1; 77(9): 2222-2230. Doi: 10.1158/0008-5472.CAN-16-3072.
120. *Pailler E., Auger N., Lindsay C.R., et al.* High level of chromosomal instability in circulating tumor cells of ROS1-rearranged non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol.* 2015 Jul; 26(7): 1408-15. Doi: 10.1093/annonc/mdv165.
121. *Armstrong A.J., Halabi S., Luo J., et al.* Prospective Multicenter Validation of Androgen Receptor Splice Variant 7 and Hormone Therapy Resistance in High-Risk Castration-Resistant Prostate Cancer: The PROPHECY Study. *J Clin Oncol.* 2019 May 1; 37(13): 1120-1129. Doi: 10.1200/JCO.18.01731.
122. *Scher H.I., Graf R.P., Schreiber N.A., et al.* Assessment of the Validity of Nuclear-Localized Androgen Receptor Splice Variant 7 in Circulating Tumor Cells as a Predictive Biomarker for Castration-Resistant Prostate Cancer. *JAMA Oncol.* 2018 Sep 1; 4(9): 1179-1186. Doi: 10.1001/jamaoncol.2018.1621.
123. *Shibido S.N., Carlsson A., Nieva J., et al.* Circulating tumor cells as a response monitor in stage IV non-small cell lung cancer. *J Transl Med.* 2019 Aug 28; 17(1):294. Doi: 10.1186/s12967-019-2035-8.
124. *Bortolini Silveira A., Bidard F.C., Tanguy M.L., et al.* Multimodal liquid biopsy for early monitoring and outcome prediction of chemotherapy in metastatic breast cancer. *NPJ Breast Cancer.* 2021 Sep 9; 7(1): 115. Doi: 10.1038/s41523-021-00319-4. PMID: 34504096; PMCID: PMC8429692.
125. *Magbanua M.J.M., Hendrix L.H., Hyslop T., et al.* Serial Analysis of Circulating Tumor Cells in Metastatic Breast Cancer Receiving First-Line Chemotherapy. *J Natl Cancer Inst.* 2021 Apr 6; 113(4): 443-452. Doi: 10.1093/jnci/djaa113.
126. *Bidard F.C., Michiels S., Rietdorf S., et al.* Circulating Tumor Cells in Breast Cancer Patients Treated by Neoadjuvant Chemotherapy: A Meta-analysis. *J Natl Cancer Inst.* 2018 Jun 1; 110(6): 560-567. Doi: 10.1093/jnci/djy018.
127. *Sparano J., O'Neill A., Alpaugh K., et al.* Association of Circulating Tumor Cells With Late Recurrence of Estrogen Receptor-Positive Breast Cancer: A Secondary Analysis of a Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncol.* 2018 Dec 1; 4(12): 1700-1706. Doi: 10.1001/jamaoncol.2018.2574.
128. *Cristofanilli M., Budd G.T., Ellis M.J., et al.* Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *N Engl J Med.* 2004 Aug 19; 351(8):781-91. Doi: 10.1056/NEJMoa040766.
129. *Jacot W., Cottu P., Berger F., Dubot C., et al.* Actionability of HER2-amplified circulating tumor cells in HER2-negative metastatic breast cancer: the CirCe T-DM1 trial. *Breast Cancer Res.* 2019 Nov 14; 21(1): 121. Doi: 10.1186/s13058-019-1215-z.
130. *Jordan N.V., Bardia A., Wittner B.S., et al.* HER2 expression identifies dynamic functional states within circulating breast cancer cells. *Nature.* 2016 Sep 1; 537(7618): 102-106. Doi: 10.1038/nature19328. Epub 2016 Aug 24.
131. *Sun Y.F., Guo W., Xu Y., et al.* Circulating Tumor Cells from Different Vascular Sites Exhibit Spatial Heterogeneity in Epithelial and Mesenchymal Composition and Distinct Clinical Significance in Hepatocellular Carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2018 Feb 1; 24(3): 547-559. Doi: 10.1158/1078-0432.CCR-17-1063.
132. *Haselmann V., Ahmad-Nejad P., Geilenkeuser W.J., et al.* Results of the first external quality assessment scheme (EQA) for isolation and analysis of circulating tumour DNA (ctDNA). *Clin Chem Lab Med.* 2018 Jan 26; 56(2):220-228.
133. *Parpart-Li S., Bartlett B., Popoli M., et al.* The Effect of Preservative and Temperature on the Analysis of Circulating Tumor DNA. *Clin Cancer Res.* 2017 May 15; 23(10): 2471-2477.
134. *Parsons H.A., Rhoades J., Reed S.C., et al.* Sensitive Detection of Minimal Residual Disease in Patients Treated for Early-Stage Breast Cancer. *Clin Cancer Res.* 2020 Jun 1; 26(11): 2556-2564. Doi: 10.1158/1078-0432.CCR-19-3005.
135. *Tivey A., Church M., Rothwell D., Dive C., Cook N.* Circulating tumour DNA – looking beyond the blood. *Nat Rev Clin Oncol.* 2022 Sep; 19(9): 600-612. Doi: 10.1038/s41571-022-00660-y.
136. *Yan X., Liu C.* Application of Non-Blood-Derived Fluid Biopsy in Monitoring Minimal Residual Diseases of Lung Cancer. *Front Surg.* 2022 May 16; 9: 865040. Doi: 10.3389/fsurg.2022.865040.
137. *Chauban P.S., Chen K., Babbra R.K., et al.* Urine tumor DNA detection of minimal residual disease in muscle-invasive bladder cancer treated with curative-intent radical cystectomy: A cohort study. *PLoS Med.* 2021 Aug 31; 18(8): e1003732. Doi: 10.1371/journal.pmed.1003732.
138. *Imperiale T.F., Lavin P.T., Marti T.N., et al.* Three-Year Interval for the Multi-Target Stool DNA Test for Colorectal Cancer Screening: A Longitudinal Study. *Cancer Prev Res (Phila).* 2022 Oct 7; CAPR-22-0238. Doi: 10.1158/1940-6207.CAPR-22-0238.
139. *Imperiale T.F., Ransohoff D.F., Itzkowitz S.H., et al.* Multitarget stool DNA testing for colorectal-cancer screening. *N Engl J Med.* 2014 Apr 3; 370(14): 1287-97. Doi: 10.1056/NEJMoa1311194.
140. *Han J.Y., Ahn K.S., Kim T.S., et al.* Liquid Biopsy from Bile-Circulating Tumor DNA in Patients with Biliary Tract Cancer. *Cancers (Basel).* 2021 Sep 12; 13(18): 4581. Doi: 10.3390/cancers13184581.
141. *Shen N., Zhang D., Yin L., et al.* Bile cell-free DNA as a novel and powerful liquid biopsy for detecting somatic variants in biliary tract cancer. *Oncol Rep.* 2019 Aug; 42(2): 549-560. Doi: 10.3892/or.2019.7177.
142. *Ghose N., Kaliki S.* Liquid biopsy in Retinoblastoma: A review. *Semin Ophthalmol.* 2022 May 23; 1-7. Doi: 10.1080/08820538.2022.2078165.

142. Xu L., Kim M.E., Polski A., et al. Establishing the Clinical Utility of ctDNA Analysis for Diagnosis, Prognosis, and Treatment Monitoring of Retinoblastoma: The Aqueous Humor Liquid Biopsy. *Cancers (Basel)*. 2021 Mar 13; 13(6): 1282. Doi: 10.3390/cancers13061282.
143. Pittella-Silva F., Chiu Y.M., Chan H.T., et al. Plasma or Serum: Which Is Preferable for Mutation Detection in Liquid Biopsy? *Clin Chem*. 2020 Jul 1; 66(7): 946-957. Doi: 10.1093/clinchem/hvaa103.
144. Vallée A., Marcq M., Bizieux A., et al. Plasma is a better source of tumor-derived circulating cell-free DNA than serum for the detection of EGFR alterations in lung tumor patients. *Lung Cancer*. 2013 Nov; 82(2): 373-4.
145. Jung M., Klotzek S., Lewandowski M., Fleischbacher M., Jung K. Changes in concentration of DNA in serum and plasma during storage of blood samples. *Clin Chem* 2003; 49: 1028-9.
146. Lee J.S., Kim M., Seong M.W., Kim H.S., Lee Y.K., Kang H.J. Plasma vs. serum in circulating tumor DNA measurement: characterization by DNA fragment sizing and digital droplet polymerase chain reaction. *Clin Chem Lab Med*. 2020 Mar 26; 58(4): 527-532. Doi: 10.1515/cclm-2019-0896.
147. Chan K.C., Yeung S.W., Lui W.B., Rainer T.H., Lo Y.M. Effects of preanalytical factors on the molecular size of cell-free DNA in blood. *Clin Chem* 2005; 51: 781-4.
148. Lui Y.Y., Chik K.W., Chiu R.W., et al. Predominant hematopoietic origin of cell-free DNA in plasma and serum after sex-mismatched bone marrow transplantation. *Clin Chem* 2002; 48: 421-427.
149. Lui Y.Y., Woo K.S., Wang A.Y., et al. Origin of plasma cell-free DNA after solid organ transplantation. *Clin Chem*. 2003 Mar; 49(3): 495-6. Doi: 10.1373/49.3.495.
150. Lui Y.Y., Dennis Y.M. Circulating DNA in plasma and serum: biology, preanalytical issues and diagnostic applications. *Clin Chem Lab Med*. 2002 Oct; 40(10): 962-8. Doi: 10.1515/CCLM.2002.169.
151. Breithbach S., Tug S., Simon P. Circulating cell-free DNA: an up-coming molecular marker in exercise physiology. *Sports Med*. 2012 Jul 1; 42(7): 565-86.
152. Pokrywka A., Zembron-Lacny A., Baldy-Chudzik K., et al. The influence of hypoxic physical activity on cfDNA as a new marker of vascular inflammation. *Arch Med Sci*. 2015 Dec 10; 11(6): 1156-63.
153. Dierickx P., Van Laake L.W., Geijsen N. Circadian clocks: from stem cells to tissue homeostasis and regeneration. *EMBO Rep*. 2018 Jan; 19(1): 18-28.
154. Kuligina E.S., Meerovich R., Zagorodnev K.A., et al. Content of circulating tumor DNA depends on the tumor type and the dynamics of tumor size, but is not influenced significantly by physical exercise, time of the day or recent meal. *Cancer Genet*. 2021 Aug; 256-257: 165-178. Doi: 10.1016/j.cancergen.2021.05.014.
155. Ulz P., Belic J., Graf R., et al. Whole-genome plasma sequencing reveals focal amplifications as a driving force in metastatic prostate cancer. *Nature Communications*. 2016; 7: 12008.
156. Newman A.M., Bratman S.V., To J., et al. An ultrasensitive method for quantitating circulating tumor DNA with broad patient coverage. *Nat Med* 2014 May; 20(5): 548-54.
157. Taly V., Pekin D., Benbaim L., et al. Multiplex picodroplet digital PCR to detect KRAS mutations in circulating DNA from the plasma of colorectal cancer patients. *Clin Chem* 2013; 59: 1722-31.
158. Ma J., Li N., Guarnera M., Jiang F. Quantification of plasma miRNAs by digital PCR for cancer diagnosis. *Biomarker Insights*. 2013; 8: 127-136.
159. Li N., Ma J., Guarnera M.A., et al. Digital PCR quantification of miRNAs in sputum for diagnosis of lung cancer. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. 2014;140(1):145-150.