

Tekočinska biopsija pri raku

Liquid biopsy in cancer

Jesenko Tanja¹, Grašič Kuhar Cvetka¹, Čemažar Maja^{1, 2}

¹Onkološki inštitut Ljubljana, Zaloška cesta 2, 1000 Ljubljana

²Fakulteta za vede o zdravju, Univerza na Primorskem, Polje 42, 6310 Izola

Korespondenca: prof. dr. Maja Čemažar, univ. dipl. biol.

Onkološki inštitut Ljubljana, Zaloška cesta 2, 1000 Ljubljana

E-mail: mcemazar@onko-i.si

Poslano / Received: 07.09.2018

Sprejeto / Accepted: 09.05.2018

doi: 10.25670/oi2018-019on

IZVLEČEK

V zadnjih letih smo v onkologiji pričali hitremu napredku na področju biopsije telesnih tekočin oz. tekočinske biopsije. Tekočinska biopsija predstavlja analizo vzorca odvzete telesne tekočine (v onkologiji je to običajno kri), v katerem iščemo znake navzočnosti raka. V krvi lahko analiziramo cirkulirajočo prosto/cirkulirajočo tumorsko DNA (cf/ctDNA) iz tumorskih celic, eksosome, ki jih v kri sproščajo tumorske celice, in tudi cirkulirajoče tumorske celice (CTC). V pregledu predstavljamo najnovejša dognanja in raziskave na področju tekočinske biopsije pri raku in poleg uporabnosti izpostavljamo tudi njihove omejitve, ki jih bo treba natančno opredeliti, če bomo želeli to metodo uporabljati v vsakodnevni obravnavi bolnikov.

Ključne besede: tekočinska biopsija, cfDNA, ctDNA, cirkulirajoče tumorske celice, eksosomi.

ABSTRACT

Recently, new exciting developments in oncology have been made in the field of liquid biopsies. In liquid biopsy, samples of blood or other body fluids are analyzed for tumor-derived material. Tumor-derived material comprises cell-free circulating tumor DNA (cf/ctDNA), exosomes released by tumor cells, or circulating tumor cells themselves (CTC). In this review, we highlight the studies that summarize the state of the art in the field of liquid biopsy, and also represent the current challenges which should be addressed in the future to successfully implement liquid biopsy in a clinical setting.

Keywords: liquid biopsy, cfDNA, ctDNA, circulating tumor cells, exosomes.

UVOD

Biopsija tkiva je ena od standardnih metod za diagnostiko raka in njeni prvi opisi segajo že v čas pred 1000 leti, v arabsko medicino, kjer lahko zasledimo primer biopsije ščitnice z inštrumenti, ki so podobni sodobnim pripomočkom za aspiracijsko biopsijo (1). S klasično biopsijo, kjer odvezamo košček tkiva (tumorja), lahko histološko ovrednotimo tip in značilnosti tumorja, prav tako lahko določimo tudi genetski profil tumorja, ta informacija pa nam lahko služi za napoved odgovora na določena zdravila in tudi prognoze bolezni. Vendar pa ima poleg velike uporabnosti metoda biopsije tudi določene omejitve, saj je invazivna metoda, poleg tega pa dobimo vpogled v trenutno stanje le tistega dela tumorja, kjer je bila odvzeta biopsija. Gerlinger in sod. so s preučevanjem vzorcev, odvzetih iz različnih delov primarnega tumorja in njegovih metastaz, v študiji pokazali veliko genetsko raznolikost in evolucijo tumorja (2), kar pomeni, da nam enkraten vzorec tumorja ne predstavlja najboljših osnov za določanje načina zdravljenja, saj ne upošteva vse genetske raznolikosti in

kompleksnosti tumorja. Vsi tumorji tudi niso dostopni za biopsijo in nekateri bolniki niso primerni za biopsijo, še posebno tisti, ki prejemajo antiangiogeno terapijo (3). Prav tako se ob klasični biopsiji pojavlja možnost razsejanja tumorskih celic (4).

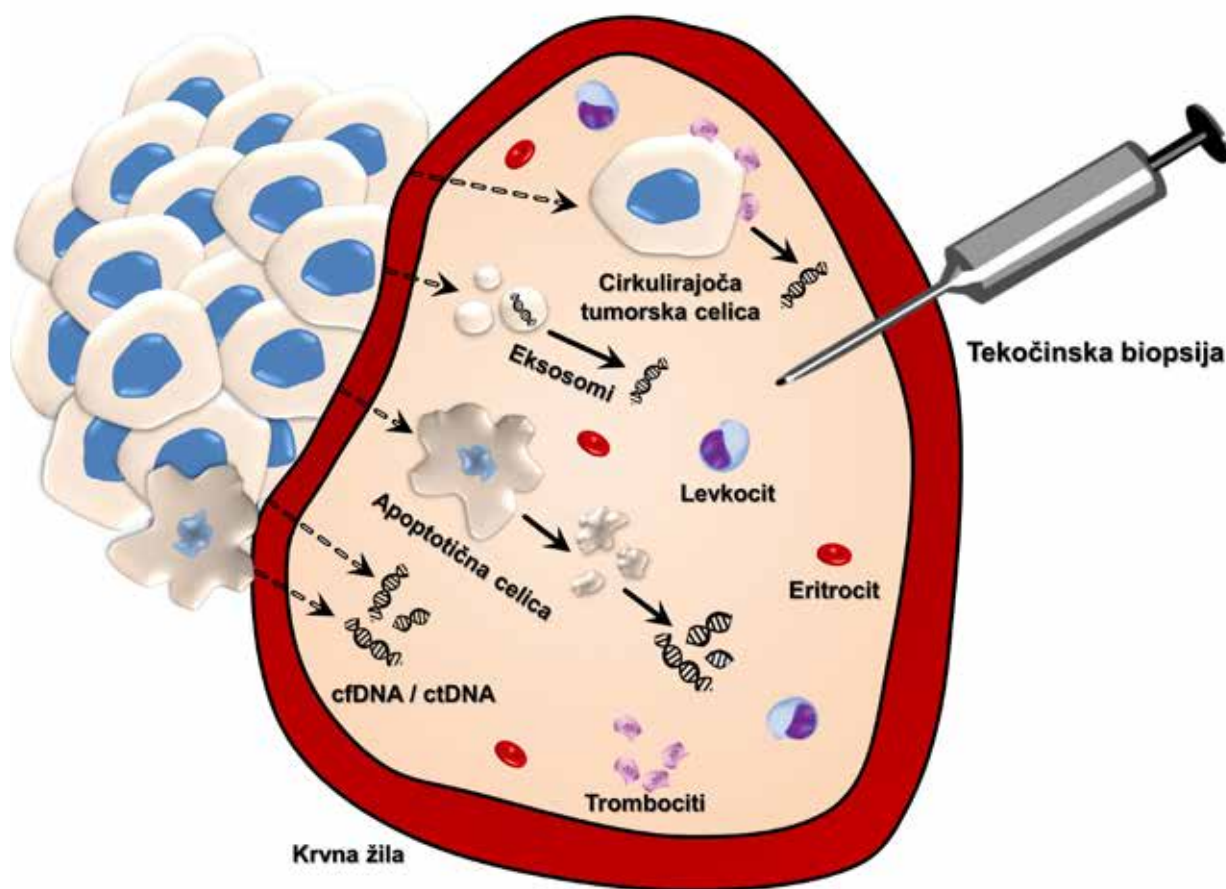
V zadnjem času se kot dodatna možnost, ki bi preseгла našete omejitve in tako dopolnila klasično biopsijo tkiva, vedno bolj uveljavlja t. i. tekočinska biopsija (ang. liquid biopsy), ki predstavlja analizo vzorca odvzete katerekoli telesne tekočine (običajno krvi), v katerem iščemo znake navzočnosti raka. V nekaterih strokovnih in poljudnih člankih se v slovenščini uporablja tudi pojem tekoča biopsija (5), vendar se nam ta prevod ne zdi strokovno najbolj primeren. Bolj primerni prevodi v slovenščino bi bili biopsija telesnih tekočin, biopsija tekočin ali tekočinska biopsija. Za mnenje smo zaprosili tudi Sekcijo za terminološke slovarje Inštituta za slovenski jezik Frana Ramovša, Znanstvenoraziskovalnega centra Slovenske akademije znanosti in umetnosti, ki predlaga uporabo izraza tekočinska biopsija. V skladu z njihovim mnenjem bo v pričujočem članku uporabljen izraz tekočinska

biopsija. Že leta 1948 je bila objavljena prva raziskava, v kateri so opisali navzočnost cirkulirajoče proste DNA in RNA (cfDNA/RNA; ang. circulating free DNA/RNA) v človeški krvi (6). Kasneje je bila objavljena še raziskava, da je te cfDNA v krvi več pri bolnih ljudeh s sistemskim lupusom v primerjavi z zdravimi (7). Nekaj let kasneje je bil objavljen prvi opis navzočnosti tumorske DNA v krvi, ki so jo določili pri tretjini preiskovanih bolnikov z rakom (8). Šele nekaj let kasneje je bila objavljena prva raziskava, v kateri so opisali navzočnost DNA zarodka v krvi nosečnice, ki je vodila v hiter razvoj prenatalne diagnostike (9). Danes je prenatalna diagnostika genetskih sprememb zarodka na podlagi tekočinske biopsije z določanjem cirkulirajoče DNA že napredovala do stopnje, da je v redni uporabi pri nosečnicah in je zelo specifična ter občutljiva metoda za določanje aneuploidij zarodka (npr. trisomija 21) že od 10. tedna nosečnosti dalje, ko količina DNA zarodka v krvi matere doseže 10 % (vrednost praga za zanesljivo preiskavo se giblje okoli 4 %). V nasprotju z razvojem tekočinske biopsije pri fiziološki nosečnosti pa je razvoj tekočinske biopsije pri bolnikih z rakom veliko počasnejši in zahtevnejši. Ker je rak zelo kompleksen, heterogen in dinamičen patološki proces, se v krvi bolnikov pojavlja različno število mutiranih fragmentov DNA, to število pa se običajno giblje pod vrednostjo praga 4 %, kar močno otežuje standardizacijo metode (10). Vseeno pa postaja področje uporabe tekočinske biopsije za določevanje cfDNA z razvojem modernih tehnologij analize DNA vedno bolj klinično zanimivo. Poleg določevanja cfDNA se razvijajo tudi metode, s katerimi lahko določamo eksosome,

ki jih sproščajo tumorske celice in cirkulirajoče tumorske celice (CTC), ki jih tumorji sproščajo v krvni obtok in druge telesne tekočine. Oboje, eksosomi in CTC so lahko tudi vir cfDNA. Razvoj metod za določevanje eksosomov in CTC je tudi zelo hiter, rezultati teh metod pa bodo morda imeli pomembno klinično vrednost pri napovedovanju odgovora tumorjev na terapijo, in tudi kot prognostični dejavniki. V nadaljevanju bomo opisali vse tri potencialne biomarkerje raka, ki jih analiziramo v telesnih tekočinah: cfDNA, eksosome in CTC.

CIRKULIRAJOČA PROSTA DNA (cfDNA)

Trenutno obstajajo različne razlage, kako fragmenti DNA vstopijo v krvni obtok. Največkrat je opisan pasivni mehanizem, pri katerem celice, ki umirajo bodisi z apoptozo ali nekrozo, sprostijo DNA v krvni obtok v procesu razpada celic (Slika 1). Pod fiziološkimi pogoji to DNA odstranijo fagociti in je zato količina DNA pri zdravih ljudeh v krvi majhna. V določenih procesih (vnetje, rak) pa odstranjevanje ne poteka dovolj učinkovito in ta DNA lažje potuje v krvni obtok (11). Drugi opisani mehanizem je aktivno spontano sproščanje DNA iz celic, kar je bilo potrjeno v raziskavah na celičnih kulturah, vendar mehanizem sproščanja DNA še ni znan (12). Vir cfDNA so lahko tudi cirkulirajoče tumorske celice (CTC), ki se sprostijo iz tumorja in krožijo po krvnem obtoku (Slika 1). Prav tako so lahko vir cfDNA eksosomi, membranski vezikli, ki delujejo kot prenašalci informacij iz celice izvora do prejemniške celice (Slika 1).



Slika 1: Viri cirkulirajoče DNA, ki jo lahko zajemamo s tekočinsko biopsijo (TB). Cirkulirajoča prosta DNA (cfDNA), cirkulirajoča tumorska DNA (ctDNA), cirkulirajoča tumorska celica (CTC), apoptotična celica (AC), eksosomi (EK), eritrocit (E), levkociti (L) in trombociti (T).

Splošna uporaba količine cfDNA v krvi kot diagnostični dejavnik zaenkrat še ni mogoča zaradi prevelike variacije v koncentraciji cfDNA pri zdravih osebah. Leta 2004 so bili objavljeni izsledki velike multicentrične prospektivne študije, ki je vključevala devet evropskih držav. Testirali so 1184 vzorcev krvne plazme, od tega 776 od zdravih oseb, 359 od bolnikov z rakom in 49 od bolnikov s kronično obstruktivno pljučno boleznijo (KOPB). V študiji so dokazali velike razlike v koncentraciji DNA v krvi zdravih ljudi, poleg tega koncentracija cfDNA ni bila značilno povišana pri vseh vrstah raka, je pa bila močno povišana pri KOPB (13). Zato je nemogoče razločiti cfDNA, ki izvira iz patoloških procesov in DNA, ki se sprosti kot posledica vnetnih procesov ali obnavljanja tkiva (na primer pri hudi telesni obremenitvi). V nasprotju z rezultati te študije pa so v nekaterih študijah pokazali statistično značilne razlike v količini cfDNA med zdravimi osebami in bolniki z rakom (14, 15). Prav tako načeloma velja, da imajo bolniki z bolj napredovalo boleznijo večje količine cfDNA v krvi (16). Zaradi naštetih omejitev je bolj kot merjenje celotne količine cfDNA obetavno dokazovanje proste tumorske DNA v krvi (ctDNA; ang. circulating tumor DNA) z določevanjem somatskih mutacij v genih (npr. APC, KRAS, EGFR, PIK3CA ...), določevanje izgube heterozigotnosti ali kromosomskih aberacij, ki so značilne za tumorske celice.

Nedavno so bili v reviji *Science* objavljeni izsledki študije CancerSEEK, ki so jo izvedli na John Hopkins University in je vključevala 1005 bolnikov z ne-metastatskim klinično zaznavnim rakom jajčnikov, jeter, želodca, trebušne slinavke, požiralnika, debelega črevesa in danke, pljuč in dojke (17). Zasnovali so krvni test za detekcijo naštetih 8 vrst raka, ki deluje na principu določevanja cirkulirajočih proteinov in različnih mutacij v ctDNA. Pri testu so določevali nivo 8 različnih proteinov, ki so uveljavljeni tumorski označevalci, in navzočnost mutacij pri 16 genih na 2001 genomskih delih, ki so značilni za različne vrste raka. Test je dosegel občutljivost od 69 % do 98 %, odvisno od vrste raka, in specifičnost nad 99 %, kar je dober rezultat glede na to, da za večino vrst raka ne obstajajo presejalni testi za ljudi, ki nimajo povišanega tveganja. Poleg tega je test na podlagi pridobljenih podatkov lahko predvidel vrsto raka pri 83 % bolnikih. Največja omejitev študije je, da je bila ta izvedena na bolnikih z rakom in ne na širši populaciji, kot je to pri presejalnih testih. V tem primeru bi pričakovali nižjo občutljivost testa, saj bi med širšo preiskovano populacijo oboleli imeli manj napredovalo bolezen, ki še ne bi povzročala kliničnih znakov, zato bi imeli manj ctDNA in cirkulirajočih proteinov v krvi. Poleg tega so bile zdrave kontrole v testu res zdrave, pri presejanju pa bi imelo več preiskovancev vnetne ali druge bolezni, kar bi lahko povzročilo več lažno pozitivnih rezultatov kot v študiji. Da bi dokazali klinično uporabnost testa, avtorji načrtujejo novo prospektivno študijo na večji populaciji, izsledki katere bodo znani v prihodnosti.

Poleg uporabe tekočinske biopsije za diagnostične namene je trenutno bolj obetavna klinična aplikacija tekočinske biopsije za zgodnje odkrivanje ponovitve bolezni po radikalnem zdravljenju, saj lahko s to metodo neinvazivno določimo minimalno rezidualno bolezen (MRD; angl. minimal residual disease). Z radiološkimi metodami, ki so trenutno na voljo, namreč ne moremo ločiti med bolniki, ki so ozdravljeni in tistimi, ki imajo MRD (bolezen se jim bo ponovila). V študiji Diehl in sod. so pokazali, da lahko s spremljanjem mutacij, specifičnih za tumorske celice (APC, TP53 in KRAS) v krvi bolnikov po operaciji raka debelega črevesa in danke, z visoko občutljivostjo in specifičnostjo predvidimo, pri katerih bolnikih bo prišlo do ponovitve bolezni (18). Tudi Birkenkamp-Demtröder in sod. so s študijo dokazali, da lahko s spremljanjem ctDNA v krvi bolnikov po radikalni cistektomiji določimo ponovitev bolezni IOI dan (mediana) prej, kot na podlagi kliničnih znakov (19). Vendar pa moramo

pri uporabi tekočinske biopsije za namen odkrivanja ponovitve bolezni upoštevati, da se lahko preiskovane mutacije izgubljajo ali pridobivajo nove, še posebno, če bolniki prejemajo (neo)adjuvantno kemoterapijo. Zdaj, ko imamo iz velikih študij genoma raka na voljo podatke o genih, ki so pogosto mutirani pri določenih vrstah raka, bomo lahko v prihodnosti načrtovali teste, ki bi spremljali več različnih genskih mutacij v krvi in bi lahko tako bolj zanesljivo napovedali ponovitev ali napredovanje bolezni.

Zelo uporabna klinična aplikacija tekočinske biopsije je tudi spremljanje pridobljene odpornosti proti zdravilom, saj se, žal, mnogo bolnikov pri tarčnem zdravljenju sreča z razvojem odpornosti. S hitro detekcijo razvoja odpornosti na zdravilo bi lahko bolnike zaščitili pred toksičnimi učinki zdaj že neučinkovitega zdravila, poleg tega bi to tudi zmanjšalo stroške zdravljenja. Ta aplikacija tekočinske biopsije je tudi lažje izvedljiva, saj so to običajno bolniki z bolj napredovalo boleznijo in imajo posledično v krvi načeloma več ctDNA. Raziskave kažejo, da je možno določiti razvoj odpornosti na zdravljenje s spremljanjem navzočnosti specifičnih genetskih sprememb v ctDNA že več mesecev pred radiološkimi metodami (20, 21). Možno je tudi določiti mutacije iz krvi, ki jih ni možno določiti oz. se jih ne zaznava na podlagi biopsije tkiva zaradi heterogenosti tumorja oz. tumorjev (22). Ena izmed mutacij, ki povzroča odpornost proti gefitinibu in erlotinibu pri bolnikih s pljučnim rakom, je T790M substitucija v receptorju za epidermalni rastni dejavnik EGFR. To mutacijo so sprva opazili pri bolnikih s ponovitvijo bolezni v vzorcih klasične biopsije in nato tudi potrdili z analizo vzorcev krvne plazme, kar dokazuje, da lahko nastanek odpornosti spremljamo tudi v krvi (23, 24). Naraščajoče znanje o genetskih spremembah, ki so vpletene v razvoj odpornosti proti različnim zdravilom, nam bo v prihodnje omogočilo še bolj natančno spremljanje razvoja odpornosti proti zdravilom.

Cirkulirajoča tumorska DNA (ctDNA) se lahko uporablja tudi za napoved odgovora na zdravljenje. Išče se specifične mutacije v tumorski DNA, ki so tarče za določena zdravila, kar lahko pomaga pri odločitvi za zdravljenje pri bolnikih, kjer klasična biopsija ni mogoča. Možno jo je uporabiti za določevanje mutacije BRAF pri bolnikih z melanomom, za pomoč pri odločitvi o uporabi zdravila vemurafenib (25) ali določevanju statusa KRAS, kot pomoč pri odločanju o zdravljenju s cetuximabom ali panitumumabom pri raku debelega črevesa in danke (26). Leta 2016 je Uprava ZDA za hrano in zdravila (FDA, ang. U. S. Food and Drug Administration) tudi prvič odobrila uporabo tekočinske biopsije za diagnostični test za določevanje delecije eksona 19 ali substitucijske mutacije eksona 21 (1858R) v genu EGFR, v krvi pri bolnikih z nedrobnoceličnim rakom pljuč, z namenom odločitve o zdravljenju z inhibitorji EGFR tirozin-kinaz (erlotinibom) za bolnike, pri katerih ni mogoče pridobiti vzorca klasične biopsije (27).

Dosedanje raziskave torej potrjujejo, da je tekočinska biopsija z analizo ctDNA klinično zanimiva, vendar je trenutno njena največja ovira standardizacija, ki je pomanjkljiva že od odvzema krvi, do kvantifikacije genetskih sprememb z različnimi metodami analize DNA in na koncu tudi do analize in interpretacije dobljenih rezultatov. CtDNA je namreč zelo neobstojna in je zato standardizacija postopka odvzema krvi, kot tudi prenosa do laboratorija in izvedba analize, izredno pomembna za pridobitev verodostojnih rezultatov. Vse to predstavlja svojevrstne izzive, ki jih bo treba v prihodnje natančno opredeliti, če bomo želeli to metodo uporabljati v vsakodnevni obravnavi bolnikov.

CIRKULIRAJOČE TUMORSKE CELICE (CTC)

Tekočinska biopsija nam omogoča tudi ocenjevanje tveganja za ponovitev ali napredovanje bolezni z določevanjem CTC v krvi

bolnikov. Tumorske celice lahko sicer neprekinjeno vstopajo v kri, vendar je velika večina celic mrtvih, saj niso sposobne preživeti brez pritrditve in interakcije z zunajceličnim matriksom. Prav tako jih v žilah lahko poškodujejo strižne sile pretoka krvi ali jih napadejo imunske celice. Majhen delež CTC uspe v žilah vseeno preživeti in ocenjuje se, da je število CTC v krvi pri napredovali bolezni približno 1 CTC na 100 milijonov krvnih celic; z drugimi besedami, najdemo lahko do 10 CTC v 10 ml bolnikove krvi (28). V zadnjih letih je postalo tudi znano, da celice, ki so zmožne tvoriti metastaze, za preživetje v krvnem obtoku potrebujejo trombocite. Trombociti se agregirajo okoli CTC in jih zaščitijo pred strižnimi silami ter imunskimi celicami, pomagajo pri epiteljsko-mezenhimskem prehodu (EMT) in na oddaljenih tkivih omogočajo adhezijo (29). Prav tako naj bi nekatere CTC potovale v celičnih skupkih in ne kot posamezne celice (29). CTC v krvi so fenotipsko različne. Lahko obdržijo karakteristike epiteljskih celic, pridobijo mezenhimske fenotipe s procesom EMT, ali pa so v hibridnem epiteljskem/mezenhimskem stanju, torej izražajo oba fenotipa naenkrat. Ravno celice, ki so zmožne prehajati iz enega v drugi fenotip, so tiste, ki naj bi bile zmožne tvorbe metastaze (30, 31).

Zaradi naštetih razlik med CTC in njihovega majhnega števila v krvi, predstavljata izolacija in analiza velik tehnološki izziv. Razvija se veliko različnih metod, s katerimi lahko izoliramo CTC. Velika večina metod trenutno temelji na pozitivni selekciji na specifični površinski celični označevalec, ki je večinoma epiteljski - EpCAM (ang. epithelial cell adhesion molecule) ali cito-keratin. Sistem, ki deluje na takšen način selekcije, je sistem CELLSEARCH, ki je tudi edini odobren v FDA kot prognostični test za detekcijo CTC pri raku dojk, prostate in raku debelega črevesa ter danke (32, 33). Poleg sistema CELLSEARCH so na voljo tudi različni CTC-čipi, s katerimi lahko izoliramo celice na podlagi površinskih celičnih označevalcev (34–36). Vendar pa je takšen način selekcije primeren samo za rake epiteljskega izvora, poleg tega CTC pogosto izgubijo epiteljske označevalce s procesom EMT, zato z navedenimi metodami ne moremo izolirati vseh tipov CTC, ki krožijo po krvi. Zato se razvijajo drugačne metode, ki temeljijo na deplekciji CD45 (označevalec, značilen za levkocite) pozitivnih celic (37) ali sortiranju celic glede na velikost - sistem ScreenCell (38). V eni izmed najnovejših študij pa so razvili metodo, ki temelji na izolaciji CTC, prekritimi s trombociti, s pozitivno selekcijo na celični označevalec za trombocite CD41 v primerjavi s selekcijo na epiteljski označevalec EpCAM (39). V študiji so na bolnikih z rakom pljuč, dojk in melanomom dokazali, da obstajajo različne populacije CTC, ki so lahko kot posamezne neprekrivane CTC, posamezne CTC prekrivane s trombociti ali pa se nahajajo v celičnih skupkih, ki so prekriti s trombociti. Poleg tega so opazili, da CTC niso vezani samo na trombocite, temveč tudi na levkocite (39). Zelo obetaven je tudi sistem Parsortix za detekcijo CTC, kjer izolacija temelji na podlagi velikosti in kompresibilnosti celic. Izolacija poteka na mikrofluidni platformi in ne deluje na selekciji na površinski označevalec (ne potrebuje protiteles). Izolirane CTC so zbrane v kaseti velikosti objektnega stekelca za mikroskop, kjer lahko poteka nadaljnja molekularna karakterizacija na različne celične označevalce (40). Druga možnost je, da CTC izperejo in analizirajo. Število izoliranih CTC je veliko večje kot s sistemom CELLSEARCH, poleg tega so celice po izolaciji viabilne. Gojenje CTC v kulturi ex-vivo je raziskovalcem prvič uspelo letos pri metastatskem raku dojk (41). Izolacija CTC je potekala s sistemom Parsortix, ki se poteguje tudi za odobritev v FDA. Ta možnost odpira novo poglavje v personalizirani terapiji, saj obeta zdravljenje na podlagi in vitro senzitivnosti na zdravila, saj bo bolnik prejel pravo zdravilo, ob pravem času.

Na Onkološkem inštitutu Ljubljana skušamo slediti raziskovalnim trendom v svetu, zato v okviru prospektivne neintervencijske

raziskave AKRA, ki poteka pri bolnicah z zgodnjim rakom dojk, ki prejemajo neoadjuvantno kemoterapijo, preučujemo tudi navzočnost CTC in ctDNA.

Tekočinska biopsija in analiza CTC vsekakor predstavljata prihodnost onkologije, vendar pa zaenkrat zaradi majhnega števila CTC v krvi predstavlja velik izziv za raziskovalce. V prihodnje bo treba razvijati metode, s katerimi bo mogoče določati vse tipe CTC, ki se nahajajo v krvi - epiteljske, mezenhimske in hibridne epiteljsko/mezenhimske fenotipe. Odgovoriti pa bo treba še na ključno vprašanje, in sicer, katere od teh celic so tiste, ki preživijo in so odgovorne za zasevanje v druge organe. Največ tako pričakujemo od metod, kjer bi izolirali viabilne CTC in jih prenesli na kulturo ex-vivo, kar bi omogočalo nadaljnje analize genoma tumorskih celic.

EKSOSOMI

Eksosomi so majhni vezikli (premera 30–140 nm), obdani z membrano. Izvirajo iz multivezikularnih teles in se v zunaj-celični prostor sprostijo po fuziji s plazemsko membrano. V svoji notranjosti vsebujejo različne vrste nukleinskih kislin in/ali proteinov. Delujejo kot prenašalci informacij iz celice izvora do prejemniške celice. Eksosomi lahko potujejo v bližini celice izvora ali pa do bolj oddaljenih celic, zato se po telesu prenašajo tudi z različnimi biološkimi tekočinami. Eksosome so že zaznali v krvi, urinu, materinem mleku, pleuralnih izlivih, slini, solzah, semenski tekočini, sinovialni tekočini, plodovnici in drugih (42).

Sproščajo jih tudi tumorske celice in čeprav je njihova velikost podobna tistim iz normalnih celic, v notranjosti prenašajo višje koncentracije proteinov, mRNA in mikro RNA (miRNA), ki lahko v ciljnem tkivu spremenijo mikrookolje ter tako pomagajo pri metastatskem procesu (43, 44). V študiji in vitro so v eksosomih zaznali mutacijo EGFR, kar kaže na to, da tumorske celice svojo DNA izločajo v eksosomih in so zato primerni kandidati za določevanje mutacijskega statusa tumorja (45). V mnogih študijah so tudi pokazali, da eksosomi iz tumorskih celic po različnih telesnih tekočinah prenašajo miRNA, ki regulira izražanje številnih genov (42).

Čeprav preučevanje vsebine eksosomov postaja vedno bolj zanimivo, pa trenutno ni na voljo dovolj študij, da bi lahko določili njihovo uporabnost v klinični praksi, prav tako ni na voljo še noben potrjen test za uporabo v klinični praksi. V prihodnje lahko pričakujemo razvoj novih metod za izolacijo in karakterizacijo eksosomov, prav tako pa izvedbo večjih kliničnih študij, ki bi lahko razjasnile, ali se bo eksosome iz telesnih tekočin v prihodnosti lahko uporabljalo za diagnozo, napoved progressa bolezni ali usmerjanje zdravljenja.

ZAKLJUČEK

Tekočinska biopsija postaja čedalje pomembnejše orodje na področju personalizirane medicine, saj je minimalno invazivna in zato omogoča, da jo lahko izvedemo večkrat kot klasično biopsijo, kar omogoča, da bolnika spremljamo bolj natančno daljše časovno obdobje. Vendar pa bo metode za uspešno uvedbo v klinično prakso treba predvsem standardizirati, kar lahko pričakujemo v prihodnjih letih.

LITERATURA

1. Diamantis A, Magiorkinis E, Koutselini H. Fine-needle aspiration (FNA) biopsy: Historical aspects. *Folia Histochem Cytobiol* 2009; 47:191–197.
2. Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, Larkin J, Endesfelder D, Gronroos E, et al. Intratumor Heterogeneity and Branched Evolution Revealed by Multiregion Sequencing. *N Engl J Med* 2012; 366:883–892.
3. Hompes D, Ruers T. Review: Incidence and clinical significance of Bevacizumab-related non-surgical and surgical serious adverse events in metastatic colorectal cancer. *Eur J Surg Oncol* 2011; 37:737–746.
4. Robertson EG, Baxter G. Tumour seeding following percutaneous needle biopsy: The real story! *Clin Radiol* 2011; 66:1007–1014.
5. Pitamic S. Vse večji potencial metod tekoče biopsije. *Medicina danes* 2018; 34–35.
6. Mandel P, Metais P. Les acides nucléiques du plasma sanguin chez l'homme. *C R Seances Soc Biol Fil* 1948; 142:241–243.
7. Koffler D, Agnello V, Winchester R, Kunkel HG. The occurrence of single-stranded DNA in the serum of patients with systemic lupus erythematosus and other diseases. *J Clin Invest* 1973; 52:198–204.
8. Stroun M, Anker P, Maurice P, Lyautey J, Lederrey C, Beljanski M. Neoplastic Characteristics of the DNA Found in the Plasma of Cancer Patients. *Oncology* 1989; 46:318–322.
9. Lo YMD, Corbetta N, Chamberlain PF, Rai V, Sargent IL, Redman CW et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet* 1997; 350:485–487.
10. Crowley E, Di Nicolantonio F, Loupakis F, Bardelli A. Liquid biopsy: monitoring cancer-genetics in the blood. *Nat Rev Clin Oncol* 2013; 10:472–484.
11. Pisetsky DS, Fairhurst A-M. The origin of extracellular DNA during the clearance of dead and dying cells. *Autoimmunity* 2007; 40:281–284.
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; 313:139–42.
13. Gormally E, Hainaut P, Caboux E, Airoidi L, Autrup H, Malaveille C, et al. Amount of DNA in plasma and cancer risk: A prospective study. *Int J Cancer* 2004; 111:746–749.
14. Catarino R, Ferreira MM, Rodrigues H, Coelho A, Nugal A, Sousa A, et al. Quantification of Free Circulating Tumor DNA as a Diagnostic Marker for Breast Cancer. *DNA Cell Biol* 2008; 27:415–421.
15. Hashad D, Sorour A, Ghazal A, Talaat I. Free circulating tumor DNA as a diagnostic marker for breast cancer. *J Clin Lab Anal* 2012; 26:467–72.
16. Heitzer E, Perakis S, Geigl JB, Speicher MR. The potential of liquid biopsies for the early detection of cancer. *Precis Oncol* 2017; 1:36.
17. Cohen AJD, Li L, Wang Y, Thorburn C, Danilova L, Douville C, et al. Detection and localization of surgically resectable cancers with a multi-analyte blood test. *Science* 2018; 324:71–10.
18. Diehl F, Schmidt K, Choti MA, Romans K, Goodman S, Li M, et al. Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. *Nat Med* 2008; 14:985–990.
19. Birkenkamp-Demtröder K, Christensen E, Nordentoft I, Knudsen M, Taber A, Høyer S, et al. Monitoring Treatment Response and Metastatic Relapse in Advanced Bladder Cancer by Liquid Biopsy Analysis. *Eur Urol* 2018; 73:535–540.
20. Misale S, Yaeger R, Hobor S, Scala E, Janakiraman M, Liska D, et al. Emergence of KRAS mutations and acquired resistance to anti-EGFR therapy in colorectal cancer. *Nature* 2012; 486:532–6.
21. Diaz Jr LA, Williams RT, Wu J, Kinde I, Hecht JR, Berlin J, et al. The molecular evolution of acquired resistance to targeted EGFR blockade in colorectal cancers. *Nature* 2012; 486:537–540.
22. Forshev T, Murtaza M, Parkinson C, Gale D, Tsui DWY, Kaper F, et al. Noninvasive identification and monitoring of cancer mutations by targeted deep sequencing of plasma DNA. *Sci Transl Med* 2012; 4:136ra68.
23. Nakamura T, Sueoka-Aragane N, Iwanaga K, Sato A, Komiya K, Kobayashi N, et al. Application of a highly sensitive detection system for epidermal growth factor receptor mutations in plasma DNA. *J Thorac Oncol* 2012; 7:1369–81.
24. Taniguchi K, Uchida J, Nishino K, Kumagai T, Okuyama T, Okami J, et al. Quantitative detection of EGFR mutations in circulating tumor DNA derived from lung adenocarcinomas. *Clin Cancer Res* 2011; 17:7808–15.
25. Santiago-Walker A, Gagnon R, Mazumdar J, Casey M, Long G V., Schadendorf D, et al. Correlation of BRAF Mutation Status in Circulating-Free DNA and Tumor and Association with Clinical Outcome across Four BRAFi and MEKi Clinical Trials. *Clin Cancer Res* 2016; 22:567–574.
26. Trojan J, Klein-Scory S, Koch C, Schmiegel W, Baraniskin A. Clinical Application of Liquid Biopsy in Targeted Therapy of Metastatic Colorectal Cancer. *Case Rep Oncol Med* 2017; 2017:6139634.
27. Kwapisz D. The first liquid biopsy test approved. Is it a new era of mutation testing for non-small cell lung cancer? *Ann Transl Med* 2017; 5:46.
28. Buder A, Tomuta C, Filipits M. The potential of liquid biopsies. *Curr Opin Oncol* 2016; 28:130–134.
29. Lambert AW, Pattabiraman DR, Weinberg RA. Emerging Biological Principles of Metastasis. *Cell* 2017; 168:670–691.
30. Jolly MK, Mani SA, Levine H. Hybrid epithelial/mesenchymal phenotype(s): The “fittest” for metastasis? *Biochim Biophys Acta* 2018; 1870:151–157.
31. Hong Y, Fang F, Zhang Q. Circulating tumor cell clusters: What we know and what we expect (Review). *Int J Oncol* 2016; 49:2206–2216.
32. Allard WJ, Matera J, Miller MC, Repollet M, Connolly MC, Rao C, et al. Tumor Cells Circulate in the Peripheral Blood of All Major Carcinomas but not in Healthy Subjects or Patients With Nonmalignant Diseases. *Clin Cancer Res* 2004; 10:6897–6904.
33. Wang L, Balasubramanian P, Chen AP, Kummur S, Evrard YA, Kinders RJ. Promise and limits of the CellSearch platform for evaluating pharmacodynamics in circulating tumor cells. *Semin Oncol* 2016; 43:464–75.

34. Thege FI, Lannin TB, Saha TN, Tsai S, Kochman ML, Hollingsworth MA, et al. Microfluidic immunocapture of circulating pancreatic cells using parallel EpCAM and MUC1 capture: characterization, optimization and downstream analysis. *Lab Chip* 2014; 14:1775–84.
35. Nagrath S, Sequist L V., Maheswaran S, Bell DW, Irimia D, Ulkus L, et al. Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology. *Nature* 2007; 450:1235–1239.
36. Maheswaran S, Sequist L V., Nagrath S, Ulkus L, Brannigan B, Collura C V., et al. Detection of Mutations in EGFR in Circulating Lung-Cancer Cells. *N Engl J Med* 2008; 359:366–377.
37. Wu S, Liu Z, Liu S, Lin L, Yang W, Xu J. Enrichment and enumeration of circulating tumor cells by efficient depletion of leukocyte fractions. *Clin Chem Lab Med* 2014; 52:243–51.
38. Desitter I, Guerrouahen BS, Benali-Furet N, Wechsler J, Jänne PA, Kuang Y, et al. A new device for rapid isolation by size and characterization of rare circulating tumor cells. *Anticancer Res* 2011; 31:427–41.
39. Jiang X, Wong KHK, Khankhel AH, Zeinali M, Reategui E, Phillips MJ, et al. Microfluidic isolation of platelet-covered circulating tumor cells. *Lab Chip* 2017; 17:3498–3503.
40. Hvichia GE, Parveen Z, Wagner C, Janning M, Quidde J, Stein A, et al. A novel microfluidic platform for size and deformability based separation and the subsequent molecular characterization of viable circulating tumor cells. *Int J Cancer* 2016; 138:2894–2904.
41. Zhang Q, Zhang Y, Flaum LE, Helfand B, Gerratana L, Gradishar W, et al. A novel ex vivo culture workflow to enrich and expand circulating tumor cells (CTCs) from patients with stage III/IV breast cancer (BCa). *Proceedings: AACR Annual Meeting 2018; Chicago, IL, 2018; 78:LB-370-LB-370*.
42. Halvaei S, Daryani S, Eslami-S Z, Samadi T, Jafarbeik-Iravani N, Bakhshayesh TO, et al. Exosomes in Cancer Liquid Biopsy: A Focus on Breast Cancer. *Mol Ther - Nucleic Acids* 2018; 10:131–141.
43. Grange C, Tapparo M, Collino F, Vitillo L, Damasco C, Deregibus MC, et al. Microvesicles Released from Human Renal Cancer Stem Cells Stimulate Angiogenesis and Formation of Lung Premetastatic Niche. *Cancer Res* 2011; 71:5346–5356.
44. Peinado H, Alečković M, Lavotshkin S, Matei I, Costa-Silva B, Moreno-Bueno G, et al. Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nat Med* 2012; 18:883–91.
45. Thakur BK, Zhang H, Becker A, Matei I, Huang Y, Costa-Silva B, et al. Double-stranded DNA in exosomes: a novel biomarker in cancer detection. *Cell Res* 2014; 24:766–769.