



Tekočinska biopsija – diagnostični in terapevtski pripomoček pri zdravljenju nedrobnoceličnega raka pljuč

Liquid biopsy – a diagnostic and therapeutic tool in the treatment of non-small cell lung cancer

Maša Majcen,^{1,2} Aleš Rozman,^{2,3} Izidor Kern^{2,3}

Izvleček

Rak pljuč je ena najbolj pogostih in smrtonosnih rakavih bolezni na svetu. V zadnjih 10 letih je z odkritjem vodilnih mutacij prišlo do velikega napredka pri zdravljenju. Zdravljenje postaja vse bolj prilagojeno bolniku oz. biološkim lastnostim raka, proti katerim so usmerjena tarčna onkološka zdravila, ki so bolnikom z napredovalo rakavo boleznijo pomembno podaljšala preživetje. Med tarčnim zdravljenjem se v tumorju razvijajo nove genetske spremembe, ki vodijo v odpornost tarč v rakavem tkivu, s čimer dolgoročno omejujejo uspešnost zdravljenja. Tekočinska biopsija (*angl.* liquid biopsy) je metoda, ki se je v zadnjih letih uveljavila kot manj invazivni diagnostični postopek, ki omogoča spremljanje odziva na zdravljenje in prepoznavanje mehanizmov odpornosti. Pri raku pljuč se najbolj uveljavlja vloga cirkulirajoče tumorske DNK (ctDNK), aktivne pa so raziskave tudi drugih bioloških označevalcev. V preglednem članku predstavljamo uporabo tekočinske biopsije pri klinični obravnavi bolnikov z nedrobnoceličnim rakom pljuč, ki se kaže v možnosti zgodnjega odkrivanja raka pljuč, identifikaciji vodilnih in odpornih mutacij, potencialni oceni bremena bolezni ter dolgoročnega spremljanja bolnika.

Abstract

Lung cancer is one of the most prevalent cancers and the leading cause of cancer mortality worldwide. The past decade has brought important progress in drug treatments by discovering the driver mutations. The evolution of targeted oncological treatments directed to the biological properties of lung cancer in the individual patient has led to a significant increase in survival. During treatment, new mutations accumulate in the tumour, which prevents the long-term success of the therapy. Liquid biopsy is a method that has established itself in recent years as a less invasive diagnostic procedure that allows monitoring the response to treatment and identifying the mechanisms of resistance. The circulating tumor DNA is the most prevalent biomarker in lung cancer, but research on other biomarkers is also active. In this review article,

¹ Splošna bolnišnica Celje, Celje, Slovenija

² Medicinska fakulteta Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, Slovenija

³ Univerzitetna klinika za pljučne bolezni in alergijo Golnik, Golnik, Slovenija

Korespondenca / Correspondence: Maša Majcen, e: masa.majcen@gmail.com

Ključne besede: rak pljuč; tekočinska biopsija; cirkulirajoča tumorska DNK; PCR; NGS

Key words: lung cancer; liquid biopsy; circulating tumor DNA; PCR; NGS

Prispelo / Received: 3. 8. 2021 | **Sprejeto / Accepted:** 2. 3. 2022

Citirajte kot/Cite as: Majcen M, Rozman A, Kern I. Tekočinska biopsija – diagnostični in terapevtski pripomoček pri zdravljenju nedrobnoceličnega raka pljuč. Zdrav Vestn. 2023;92(1–2):59–69. DOI: <https://doi.org/10.6016/ZdravVestn.3294>



Avtorske pravice (c) 2023 Zdravniški Vestnik. To delo je licencirano pod Creative Commons Priznanje avtorstva-Nekomercialno 4.0 mednarodno licenco.

we present the use of liquid biopsy in the clinical treatment of patients with non-small cell lung cancer. Its use is increasingly recognized in early detection of lung cancer, identifying resistant mutations, potential assessment of disease burden, and longitudinal monitoring.

1 Uvod

V zadnjih letih se je razvoj medicine usmeril k bolniku prilagojenemu, t.i. personaliziranemu zdravljenju. Gre za individualni pristop pri preprečevanju in zdravljenju bolezni, ki temelji na genetski in molekularni raznolikosti ter vplivu okolja na posameznikovo zdravstveno stanje (1). Največji napredek se zaznava prav na področju onkologije, ki je v zadnjem desetletju ena najbolj raziskovalno dejavnih vej medicine. Rak je namreč genetska bolezen, ki vsebuje za bolnika specifični in unikaten profil mutacij. Z razvojem vse bolj občutljivih, specifičnih ter cenovno dostopnih tehnologij za izoliranje in analizo tumorskega dednega materiala, se vloga personaliziranega zdravljenja vse bolj vključuje v smernice onkološkega zdravljenja po vsem svetu. Z odkrivanjem mutacij in s tem novih prijemališč za učinkovita tarčna zdravila so tudi pri zdravljenju bolnikov z rakom pljuč že vidni uspehi personaliziranega pristopa, saj so na ta način dosegli podaljšanje preživetja (2).

2 Rak pljuč

Rak pljuč je ena najbolj pogostih in smrtonosnih rakavih bolezni na svetu (3). V Sloveniji je rak pljuč na 3. mestu med vrstami raka pri moških in 4. pri ženskah, pri čemer delež bolnic z rakom še vedno narašča (4). Pomembno je čim prej posumiti na možnost pljučnega raka in začeti diagnostično obravnavo (5). Kljub napredku medicine se bolezen v večini primerov odkrije v napredovali fazi, zato je preživetje nizko, možnosti zdravljenja s ciljem ozdravitve pa omejene. V zadnjih 10 letih je z odkritjem vodilnih mutacij prišlo do velikega napredka pri zdravljenju, ki postaja vse bolj prilagojeno bolniku oz. biološkim lastnostim bolnikovega rakastega tkiva (6,7).

Rak pljuč je heterogena bolezen, ki jo glede na histološko klasifikacijo po Svetovni zdravstveni organizaciji delimo na več podvrst (8). Glede na način zdravljenja je pomembna predvsem delitev na drobnocelični in nedrobnocelični rak pljuč, ki vključuje žlezni in ploščatocelični rak pljuč. Zaradi pojava številnih tarčnih zdravljenj se ob postavitvi histološke diagnoze žleznega raka priporoča aktivno in usmerjeno iskanje vodilnih mutacij. Pri bolnikih z drobnoceličnim ali ploščatoceličnim rakom pljuč nimamo specifičnega tarčnega

zdravljenja, zato rutinska identifikacija vodilnih mutacij ni smiselna (9).

2.1 Žlezni rak pljuč

Najbolj raziskana in pogosta mutacija pri nedrobnoceličnem žleznem raku pljuč je mutacija v genu receptorja za epidermalni rastni faktor (*angl.* epidermal growth factor receptor, EGFR), druge vrste mutacij npr. genetske prerazporeditve ALK (*angl.* anaplastic lymphoma kinase), točkovna mutacija V600E v genu BRAF (*angl.* v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1), genetske prerazporeditve ROS1 (*angl.* c-ros oncogene 1), RET (*angl.* rearranged during transfection), NTRK (*angl.* neurotrophic tyrosine receptor kinase) ter mutacija s preskakovanjem v eksonu 14 gena MET so redkejšje (6,7,10). Tako v Sloveniji danes bolnikom ob postavitvi diagnoze žleznega raka pljuč v vzorcu tumorja določamo mutacije EGFR, KRAS (*angl.* Kirsten rat sarcoma viral oncogene homologue) in BRAF ter genske prerazporeditve ALK, ROS 1 in NTRK (9). Zaradi usmerjenega tarčnega zdravljenja se je preživetje bolnikov z napredovalo rakavo boleznijo pomembno podaljšalo, prav tako pa se je izboljšala tudi kakovost njihovega življenja (2). Med tarčnim zdravljenjem se v tumorju razvijajo nove genetske spremembe, ki preprečujejo dolgoročno uspešnost tega zdravljenja. Po svetu potekajo obsežne raziskave za čim bolj natančno, manj invazivno in hitro prepoznavanje mehanizmov odpornosti na zdravljenje. Omejitev nam predstavlja potreba po ponovnih odvzemih vzorcev tumorskega tkiva, kjer si svojo pot utira novejša metoda, t. i. tekočinska biopsija (11).

2.2 Ploščatocelični rak pljuč

Na zahtevo onkologa se testirajo prej naštetje mutacije tudi pri izbranih bolnikih s ploščatoceličnim rakom, ki so mlajši in so nekadilci, ter pri drugih redkih histoloških tipih nedrobnoceličnih rakov pljuč, saj so te prisotne le redko. Praviloma se pri bolnikih s ploščatoceličnim rakom (ter žleznim rakom z negativnimi testiranimi markerji) zaradi možnosti imunoterapevtskega zdravljenja izvede le imunohistokemična določitev statusa PD-L1 (*angl.* programmed death-ligand 1) (9).

Tabela 1: Primerjava tkivne in tekočinske biopsije pri raku pljuč (13-26).

	Tkivna biopsija	Tekočinska biopsija
Vrsta vzorca	biopsija tumorskega tkiva (bronhoskopska biopsija, s CT vodena igelna biopsija, kirurška biopsija)	vzorec krvi (redkeje plevralna tekočina, slina, urin, ascites, cerebrospinalna tekočina)
Invazivnost posega	invazivno	minimalno invazivno, neinvazivno
Zahtevnost posega	zahtevno	manj zahtevno
Zapleti	redki, lahko življenje ogrožajoči	zelo redki, manj nevarni
Zaznavanje heterogenosti tumorja	ne	da
Obremenitev za bolnika	da	ne
Longitudinalno spremljanje značilnosti tumorja	ne	da
Spremljanje odziva na zdravljenja	ne	da
Občutljivost metode	visoka	visoka, vendar različna glede na avtorje in vrsto uporabljene metode

Legenda: CT – računalniška tomografija (*angl.* computed tomography).

3 Tekočinska biopsija

3.1 Primerjava tekočinske in tkivne biopsije

Tekoča ali tekočinska biopsija je postopek, pri katerem v odvzetih telesnih tekočinah iščemo znake navzočnosti rakave bolezni in molekularne značilnosti tumorskega tkiva (12). Za razliko od tradicionalnih odvzemov tkiva s pomočjo bronhoskopskih ali drugih minimalno invazivnih postopkov ta veliko manj obremenjuje bolnika. Po svetu za analizo uporabljajo različne vrste telesnih tekočin (npr. plevralna tekočina, urin, sputum), najbolj pogosto pa vzorec periferne krvi oz. plazme (13-16). Vloga tekočinske biopsije pri zdravljenju rakavih bolezni je predvsem v prepoznavi vodilnih, aktivirajočih genetskih mutacij, ki nam omogočajo izbirati usmerjeno, t.i. tarčno zdravljenje, spremljanje odgovora nanj in uspešnost izbrane terapije ter zgodnje odkrivanje ponovitve bolezni (17).

Tkivna biopsija je še vedno zlati standard za postavitve diagnoze rakave bolezni, opredelitev vrste tumorja in njegovih značilnosti. Po odvzemih vzorcev tumorskega tkiva ter z njihovo obdelavo so v zadnjih desetletjih odkrili vodilne mutacije in razvili tarčno zdravljenje. Z odvzemi vzorcev tkiva pred in po pojavu odpornosti na tarčno zdravljenje so raziskovalci identificirali mehanizme novih, t. i. sekundarnih mutacij. Kljub prednostim, ki jih ponuja tkivna biopsija, gre vendarle za

invazivno metodo, ki je časovno obremenjujoča, za izvedbo posega in obdelavo vzorcev pa je potrebna izkušena ekipa strokovnjakov. Obstaja več kontraindikacij za invazivni poseg odvzema vzorca tumorja, kar omejuje uporabo metode pri bolniku z napredovalo rakavo boleznijo. Pri biopsiji so možni tudi zapleti (18). Ena največjih omejitev je časovna ter t. i. intra- in intertumorjska heterogenost rakavega tkiva. Natančna opredelitev mutacij s tkivno biopsijo pogosto sploh ni možna, saj se zaradi velike heterogenosti tumorjev dogaja, da biopsijski vzorec ne zajame vsega nabora mutacij (19). Poleg tega nam tkivna biopsija ne omogoča spremljati spreminjanje tumorskega genetskega profila v času in morebitnega odkrivanja novih mutacij, ki pomenijo večje tveganje za pojav odpornosti na zdravljenje (20).

Tekočinska biopsija kot novejša metoda pa je na drugi strani bolj dostopna, lažje in hitreje izvedljiva, minimalno- ali sploh neinvazivna ter manj obremenjujoča za bolnika. Metoda je ponovljiva. V primerjavi s tkivno biopsijo pa je število zapletov zanemarljivo (18). Možno je večkrat odvzeti vzorce, kar nam omogoča takojšnji vpogled v spremembo tumorja oz. njegovo longitudinalno spremljanje (21,22). Kljub številnim prednostim, ki tekočinsko biopsijo postavljajo ob bok uveljavljeni tkivni biopsiji (Tabela 1), pa se uporaba le-te v vsakdanji praksi uveljavlja počasi predvsem zaradi dilem glede zanesljivosti testa za dokaz prisotnosti mutacije in trenutnih visokih cen ob uporabi visoko občutljivih

tehnik. Tekočinska biopsija je pri nedrobnoceličnem raku pljuč že našla mesto v rutinski klinični praksi. Že v mednarodnih priporočilih (23) je tekočinska biopsija prva metoda izbire pri iskanju na zdravljenje odporne mutacije T790M pri bolniku z EGFR mutiranim rakom pljuč, ki se zdravi z zaviralci tirozinske kinaze EGFR. Širšo uporabo tekočinske biopsije pri bolnikih z rakom pljuč so predstavila zadnja priporočila IASLC (*angl.* International Association for the Study of Lung Cancer) (24). Občutljivost in specifičnost testa je nedvomno odvisna tako od velikosti tumorske mase, prisotnosti metastaz in vrste metode, ki jo uporabimo za dokaz oz. določanje mutacije (25,26).

4 Vrste tekočinskih biopsij

Tekočinska biopsija temelji na spoznanju, da so rakave celice, prisotne v krvnem obtoku, identične primarnemu rakavemu tkivu, kar je prvi dokazal avstralski znanstvenik Thomas R. Ashworth davnega leta 1869 (27). Ocenjuje se, da se v obtok dnevno sprosti na tisoče celic, ki imajo povprečno razpolovno dobo 1–2,5 uri. Že leta 1948 sta raziskovalca Mandel in Metais opisala prosto cirkulirajoče fragmente DNK (cfDNK) v plazmi, a so povezavo med koncentracijo cfDNK in bolezenskimi stanji dokazali šele več let kasneje (28). cfDNK je celokupna prosto cirkulirajoča DNK, ki izvira iz vseh celic v organizmu, tj. zdravih in bolezensko spremenjenih. Z izpopolnitvijo tehnologij za izoliranje dednega materiala je danes na voljo zaznavanje in spremljanje različnih vrst mutacij, ki služijo kot specifični biološki označevalci za prisotnost rakavega tkiva v krvnem obtoku.

4.1 Molekularne tehnologije

Pri tekočinski biopsiji se uporablja več vrst molekularnih tehnologij, ki jih po načinu pristopa grobo razdelimo na dve skupini. Prva, tarčna skupina, predstavlja hitro, cenovno bolj dostopno, visoko občutljivo in specifično tehniko, ki lahko prepozna že majhno število predvsem točkovnih mutacij v enem genu. V to skupino uvrščamo metode, ki temeljijo na uporabi verižne reakcije s polimerazo (*angl.* polymerase chain reaction, PCR). So ozko usmerjene metode, zato pred uporabo potrebujemo predhodni podatek o tipu tumorja in vrsti mutacije. V drugo skupino spadajo visoko zmogljivostne metode, ki identificirajo mutacije v več genih (metode sekvenciranja nove generacije, *angl.* next-generation sequencing, NGS). Ker so usmerjene na identificiranje večjega dela genoma, lahko identificirajo

tako specifične kot nespecifične mutacije, prehodna informacija o tipu in vrsti tumorja pred preiskavo pa ni potrebna. Njihova največja omejitev je visoka cena, daljši čas izvedbe, zahtevnejša tehnologija in analiza (23,29). Po podatkih iz literature je občutljivost metod dokaza ctDNK z uporabo NGS med 75 % in 90 % z visoko konkordanco s tkivnimi metodami (30).

4.2 Vrste bioloških označevalcev

Tekočinska biopsija vključuje različne metode iskanja cirkulirajočih označevalcev. S kliničnega vidika so med temi označevalci prav plazemsko prosto DNK, katere komponenta je tumorska DNK, daleč najbolj široko raziskovali in uporabljali za genotipizacijo solidnih vrst raka, tudi raka pljuč (predvsem nedrobnoceličnega raka pljuč), pri katerem je že vključena v rutinsko obravnavo bolnikov (24). Obstaja še več drugih bioloških označevalcev. Njihova klinična uporaba pa je pri pljučnem raku redkejša ter se trenutno omejuje na raziskovanje.

4.2.1 Cirkulirajoča tumorska DNK

Cirkulirajoča tumorska DNK (ctDNK) je podvrsta cfDNK, ki se izloča iz tumorskih celic in vsebuje zapis zunajcelične tumorske DNK (dvovijačna ali mitohondrijska). Predstavlja le del celokupne prosto cirkulirajoče cfDNK, ki izvira tudi iz netumorskih celic. Najdemo jo v telesnih tekočinah (najpogosteje v krvi), v katere se sprošča preko različnih mehanizmov, kot so nekroza, apoptoza, aktivna sekrecija ali senescenca tumorskih celic (31). Koncentracija ctDNK v telesnih tekočinah ni stalna. Njena količina je odvisna od več dejavnikov, najbolj pa od obsežnosti tumorja. Razpolovna doba ctDNK je kratka (od nekaj minut do 2 uri), zato omogoča spremljanje trenutnega stanja tumorja. Kljub vsemu pa je žal njihova koncentracija nizka, zato je za identificiranje ctDNK potrebna visoko občutljiva, napredna izolacijska in detekcijska molekularna tehnologija (32).

Dodatna ovira ob odvzemu vzorca periferne krvi za analizo je cfDNK nerakavega porekla, ki se izloča iz belih krvnih celic. Ta razredči prisotne ctDNK, kar še dodatno zmanjša občutljivost metode. V praksi to rešujemo s prilagojenimi epruvetami za odvzem vzorca in s čimprejšnjim centrifugiranjem vzorca po odvzemu (33). Poleg lažno negativnih izvidov lahko beležimo tudi lažno pozitivne izvide tekočinske biopsije s ctDNK. Pri zdravih preiskovancih lahko iz hematopoetskih celic s procesom klonske hematopoeze nastanejo s tumorjem nepovezane somatske mutacije, ki otežujejo

interpretiranje rezultatov tekočinske biopsije. Te mutacije največkrat izhajajo iz genov, povezanih s hematološkimi malignimi boleznimi, manj pogosto pa s tem procesom lahko nastanejo tudi mutacije, ki jih povezuje z rakom pljuč, npr. mutacije KRAS. Pri bolnikih, pri katerih opravimo tekočinsko biopsijo zaradi suma na raka pljuč, lahko tako dokažemo mutacijo KRAS kljub odsotnosti pljučnega raka (34,35). Nekatere specifične tumorske mutacije, npr. EGRF in BRAF, nimajo hematopoetskega izvora, zato pri njih zaznava lažne mutacije zaradi klonske hematopoeze ni možna.

Kljub odličnim obetom bo pred pričakovano širšo klinično uporabo ctDNK v onkologiji nasploh, za verodostojnost rezultatov potrebna natančna standardizacija celotnega postopka od odvzema vzorca do končne izvedbe analize (12). V strokovni literaturi se trenutno za uvedbo ctDNK v klinično okolje pojavljajo raziskave, ki uporabljajo usmerjene, tudi cenovno bolj dostopne metode PCR. Zaradi vse boljše občutljivosti in cenovno dostopnejših metod NGS pa se v prihodnosti pričakuje širitev uporabe teh metod tudi v klinično prakso.

4.2.2 Cirkulirajoče tumorske celice

Cirkulirajoče tumorske celice so posamezne tumorske celice, ki zapustijo svoje izvirno mesto nastanka (primarni tumor ali metastaza). Po telesu potujejo na oddaljena mesta po krvnem obtoku (36). Kri je zato primeren vzorec za njihovo identificiranje, diagnosticiranje raka in spremljanje rakave bolezni. CTC že igrato pomembno vlogo pri diagnosticiranju metastatskega raka dojke, prostate in debelega črevesa, njihova možna vloga pa se nakazuje tudi pri zdravljenju raka pljuč (37-39). Podobno kot pri ctDNK je njihova koncentracija v krvi žal nizka (0,1–10 CTC/ml polne krvi) in razpolovna doba kratka (1–2,4 ure). Za odkrivanje je potrebna visoko občutljiva tehnologija, ki na podlagi njihovih fizikalnih, morfoloških in bioloških značilnosti razloči CTC od ostalih celic, prisotnih v obtoku (40).

4.2.3 Drugi biološki označevalci

Obstaja še več vrst bioloških označevalcev, trenutno pa se uporabljajo pri pljučnem raku v primerjavi s ctDNK zaenkrat le v raziskovalne namene. Zaradi obsežnih raziskav o njihovi možni uporabi in že nakazane pomembne vloge pri zdravljenju raka pljuč v prihodnosti jih v članku le omenjamo. Ker v trenutni klinični praksi nimajo še svoje vloge, podrobna predstavitev presega vsebinski okvir članka.

V raziskovalne namene se uporabljajo raznovrstni

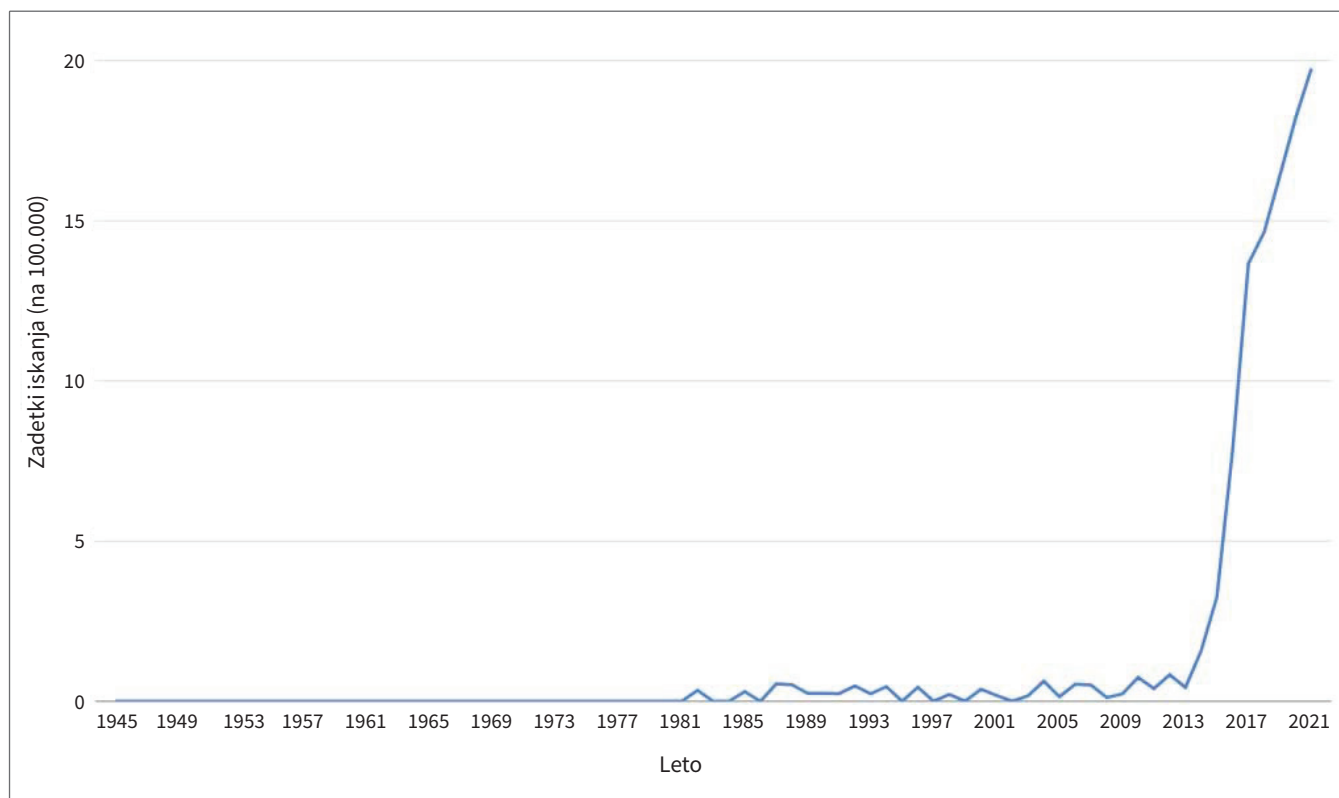
biološki označevalci, katerih vloga se nakazuje v razvoju rakavega tkiva. Eksomi so majhni, 30–100 nm veliki vezikli, obdani s celično membrano, ki nastanejo z endocitozo ali sekrecijo iz celic. Vsebujejo proteine in nukleinske kisline, ki jih lahko prenašajo med celicami. Zaradi svoje lipidne membrane so zaščiteni pred razgradnjo, lahko prehajajo preko membrane in so dlje prisotni v krvnem obtoku. Igrajo veliko različnih vlog v razvoju raka, saj sodelujejo v kancerogenezi, nastanku metastaz in prenosu onkogenih dejavnikov med celicami. Omenja se tudi uporaba TEP (*angl.* tumor educated platelets), s tumorjem povezanih protiteles (*angl.* tumor-associated autoantibodies, TAAb) ter mikroRNK (36,41).

5 Uporaba tekočinske biopsije pri bolnikih z rakom pljuč v klinični praksi

Tekočinska biopsija si je pri bolnikih z rakom pljuč utrla pot v klinično prakso. Z odkritjem kritičnih molekularnih in celičnih mehanizmov razvoja raka pljuč ter pojavom novejšega tarčnega zdravljenja so se izrazito razvile in začele uporabljati nove tehnologije predvsem pri zdravljenju nedrobnoceličnega raka pljuč. Tekočinska biopsija se je uveljavila kot metoda za prepoznavanje specifičnih mutacij EGFR pri bolnikih, pri katerih se pojavi odpornost na tarčno zdravljenje. Zaradi klinične in cenovne dostopnosti je trenutno najbolj razširjena uporaba dokazovanje ctDNK z metodo PCR, zato se v nadaljevanju osredinjamo predvsem na uporabo le-te. Pomembno pa je poudariti, da v zadnjih letih hitro narašča število znanstvenih objav, ki raziskujejo uporabo metode pri drugih onkoloških bolnikih, ne samo bolnikih z rakom pljuč (Slika 1). Pričakujemo, da bo v naslednjih letih področje uporabe tekočinske biopsije strokovno in tehnološko napredovalo, predvsem z razširitvijo uporabe metode NGS.

5.1 Zgodnje odkrivanje raka pljuč

Tekočinska biopsija je zaradi svoje neinvazivnosti in potencialne nizke cene pokazala svoj potencial za uporabo pri presejalnem testiranju in zgodnjem odkrivanju raka pljuč. Trenutno je edina priznana in priporočena metoda za presejalno testiranje pljučnega raka uporaba nizkodozne računalniške tomografije (*angl.* computed tomography, CT) s potrditveno tkivno biopsijo. Zaradi nizke občutljivosti in specifičnosti za zgodnje odkrivanje rakavih sprememb se v literaturi pojavljajo ideje o izboljšanju presejalnega testiranja s kombinacijo CT slikanja in krvnega testa – tekočinsko biopsijo (42). Po



Slika 1: Grafični prikaz časovne razporeditve rezultatov iskanja v digitalni zbirki PubMed do leta 2021. Uporabljene ključne besede poizvedbe so bile »lung cancer« in »liquid biopsy« s sopomenkami.

podatkih iz raziskave TRACERx naj bi bila ctDNK zaradi zgodnjih genomskih in kemičnih sprememb prisotna v krvnem obtoku že 6–12 mesecev pred prvimi slikovnimi znaki raka pljuč, koncentracija cfDNK pa je pri rakavih bolnikih višja v primerjavi s kontrolnimi zdravimi osebami in z bolniki z benignimi spremembami na pljučih (43,44). Številne študije se v zadnjih letih ukvarjajo s pridobitvijo najugodnejših bioloških označevalcev za uporabo v presejalnem testiranju, npr. ctDNK, CTC, mikroRNK, eksomi, proteini itd. (45–47). Ena prvih študij z izoliranjem celic CTC pri bolnikih s kronično obstruktivno boleznijo pljuč, ki predstavljajo skupino z višjim tveganjem za razvoj raka pljuč iz leta 2014, je kot prva prikazala obetavne rezultate za odkrivanje bolnikov z visokim tveganjem za razvoj raka pljuč ob normalnem izvidu CT preiskave (48). Nekatere podobne nadaljnje raziskave niso uspele dokazati podobne statistične zanesljivosti za napoved tveganja za razvoj raka pljuč (49,50). Trenutno je uporaba kombinacije nizkodozne CT preiskave in tekočinske biopsije s CTC in/ali ctDNK celic vroča raziskovalna tema za zgodnje odkrivanje raka pljuč (raziskava Spira's group, raziskava Lecia in sodelavci idr.) (51). Nedavna

večja študija Chen in sodelavcev, ki je vključila več kot 120.000 zdravih posameznikov brez simptomov, je poudarila možnost zgodnjega odkrivanja več specifičnih metilacij ctDNK v 477 regijah, ki so glede na raziskave lahko specifične za določene solidne tumorje, vključno z rakom pljuč. Poročali so o pravilnem prepoznavanju 88 % solidnih vrst raka (vključno z rakom pljuč), ki so bili dokazani v naslednjih 4 letih in 95-odstotni specifičnosti za prepoznavanje vrste raka (52). Kljub visokim pričakovanjem pa se pri uporabi ctDNK kot biološkega označevalca pojavlja težava zaradi prenizke frekvence mutiranih alelov ob zgodnjih, ozdravljivih oblikah raka pljuč, saj določitev slednjih presega občutljivost metod, ki so trenutno dostopne na trgu (53).

Danes se tekočinska biopsija kot presejalna metoda še ne zdi smiselna s stališča organizacijskega in cenovnega vidika. Dodatna težava so tudi lažno negativni testi, zato bi bilo zaenkrat smiselno preiskavo uvesti le pri bolnikih z dejavniki tveganja za razvoj raka pljuč. Glede na obsežen razvoj tekočinske biopsije pa se v prihodnosti pričakuje, da bo metoda pomenila nov pristop k obvladovanju bolezni.

5.2 Identificiranje mutacij in odpornosti na zdravljenje

V procesu razvoja raka pljuč so prepoznali več različnih vrst mutacij, ki sodelujejo pri njegovem nastanku. Identificiranje mutacij v rakavih celicah je ključno za izbor ustreznega in učinkovitega tarčnega zdravljenja. Glede na priporočila evropskih in ameriških strokovnih smernic se mora zdravljenje usmeriti glede na ugotovljeni mehanizem odpornosti, pred uvedbo prvega reda terapije pa je danes še vedno na mestu tkivna biopsija (54,55). Pomembno je prepoznavati predvsem tiste mutacije, za katere imamo na voljo tarčno zdravljenje. Največjo omejitev pri uporabi tarčne terapije pa so sekundarne mutacije ob pojavu odpornosti na primarno zdravljenje, ki terjajo ponovno biopsijo za zamenjavo zdravljenja. Glede na podatke Nosakija in sodelavcev je ponovna biopsija pljučnega tumorja neizvedljiva pri kar 20 % bolnikov z razvito odpornostjo, mnoge študije pa poročajo tudi o nezadostnih ali nepovednih vzorcih odvzetega tumorskega tkiva (56,57).

Glede na ugodne rezultate študij in omenjenih težav s ponovnimi tkivnimi biopsijami ob pojavu odpornosti je Evropska agencija za zdravila (*angl.* European Medicine Agency, EMA) leta 2015 kot prva izdala dovoljenje za uporabo plazemske ctDNK pri raku pljuč, leto kasneje je dovoljenje izdala še FDA (*angl.* US Food and Drug Administration) (58,59). Uporaba je trenutno dovoljena za določitev statusa EGFR pri bolnikih z novoodkritim nedrobnoceličnim rakom pljuč brez možnosti tkivne biopsije ali ob pojavu odpornosti med zdravljenjem s primarno ali sekundarno generacijo tirozin-kinaznih inhibitorjev (TKI) za odkrivanje točkovne mutacije v eksonu 20 T790M. Ta je najpogostejša na zdravljenje odporna mutacija (dokazana pri približno 50 % bolnikov) in je indikacija za zdravljenje s tretjo generacijo TKI. Za odkrivanje je dovoljena uporaba dveh standardiziranih, visoko občutljivih in specifičnih mutacijskih testov (Cobas EGFR mutations Test v2, Roche; Therascreen, Qiagen), ki temeljita na uporabi qPCR (20,60-62).

Glede na podatke raziskave AURA pa je potrebna previdnost pri interpretiranju rezultatov prisotnosti mutacije T790M (63). V raziskavi so ugotavljali neskladnost med prisotnostjo mutacije v tkivnem in tekočinskem vzorcu kot posledico heterogene distribucije mutacije v rakavem tkivu. Ob pozitivnem izvidu (tj. dokazani rezistenčni mutaciji) pa je zamenjava vrste zdravljenja na mestu. Poleg tega je zaradi nizke občutljivosti metode pri interpretiranju potrebno upoštevati možnost lažno negativnih rezultatov, zato se ob

negativnem rezultatu priporoča ponovni odvzem vzorca (64-66).

V primeru EGFR neodvisnih mutacij rakave celice s pridobitvijo novih mutacij, npr. KRAS, HER2, MET, PI3KCA ipd., pridobijo EGFR neodvisno alternativno pot preživetja in pomnoževanja rakave celice. Redko pri bolnikih beležimo transformiranje iz nedrobnoceličnega v drobnocelični rak pljuč. S širjenjem uporabe naprednih tehnologij v vsakdanjo klinično rabo se vse bolj uveljavlja analiza ctDNK z NGS, s katero lahko prepoznamo širši spekter mutacij rakave celice. Od izdaje zadnjih priporočil IASLC se pojavljajo številne dodatne raziskave, ki podpirajo uporabo širokospekterne analize NGS (24). Z njo lahko dokazujemo prisotnost drugih pomembnih mutacij, za katere imamo na voljo tarčna zdravljenja, npr. genske prerazporeditve ALK (67), ROS 1 (68), BRAF mutacije (69), itd. Strokovna skupina ESMO je leta 2020 že svetovala uporabo NGS tudi za odkrivanje alteracij mutacij (EGFR, ALK ipd.) pri razširjenem raku pljuč v redni klinični praksi (70). Konec leta 2020 je FDA kot prva izdala dovoljenje za dva komercialna testa NGS (Guardant360, FoundationOne Liquid CDx) (24).

Zaenkrat je uporaba NGS v svetu v primerjavi z metodami PCR še vedno omejena. Vendar pa se bo nedvomno njena vloga v prihodnosti z nižanjem cene in boljše dostopnostjo močno povečala. Kljub vse večji vlogi tekočinske biopsije v primerjavi s tkivno biopsijo pa je potrebno upoštevati, da analiza ctDNK ne odkrije nastanka nekaterih drugih mehanizmov odpornosti, npr. histološke transformacije rakavega tkiva (71).

5.3 Ocena bremena bolezni in dolgoročno spremljanje odziva na zdravljenje

S tekočinsko biopsijo bi lahko zgodaj ugotavljali prisotnost primerne odziva na prejetu zdravljenje oz. pojav napredovanja bolezni in oceno bolnikovega preživetja. V literaturi se pojavljajo študije, ki preučujejo tekočinsko biopsijo kot metodo za kvantitativno in kvalitativno spremljanje tumorskega bremena in molekularnega profila. Koncentracija ctDNK v plazmi se spreminja in je odvisna od vrste rakavega tkiva, lokacije, velikosti in prekrvljenosti tumorja, zato je smiselno spremljati predvsem trend, ne pa absolutne koncentracije (72). Zaradi te variabilnosti lahko najdemo različne koncentracije ctDNK pri bolnikih z enakim tipom tumorja in enakim stadijem bolezni. Kljub variabilnosti so v eni večjih multicentričnih prospektivnih kohortnih študij na Kitajskem iz leta 2020 poročali o pomembno krajšem preživetju bolnikov z nedrobnoceličnim rakom

pljuč pri bolnikih, ki imajo višjo koncentracijo ctDNK in mutacije pred pričetkom zdravljenja (73,74). To povezujejo z večjim izhodnim bremenom bolezni. Vendar pa na drugi strani v literaturi najdemo več podatkov, da bazalne ravni ctDNK ne napovedujejo odziva na zdravljenje (75).

Ob uvedbi novega zdravila bi s pomočjo večkratnih odvzemov krvi lahko spremljali odziv na zdravljenje in spremljali hitrost upada ravni ctDNK za oceno učinkovitosti zdravljenja. Lee in sodelavci so v svoji raziskavi iz leta 2016 z rednimi odvzemi plazme spremljali prisotnost mutacije EGFR pri bolnikih od uvedbe zdravljenja s EGFR TKI in to primerjali s kliničnim odgovorom. Ugotovili so statistično pomembno razliko v mediani preživetja brez napredovanja bolezni pri bolnikih, pri katerih po zdravljenju z EGFR TKI niso zaznali ravni mutacije EGFR v primerjavi s tistimi, pri katerih se je ta raven ponovno pojavila v 2 mesecih od začetka zdravljenja (10,1 oz. 6,3 meseca, $P=0,006$) (76). Tudi Song in sodelavci so ugotavljali daljši čas do napredovanja bolezni in preživetje pri bolnikih z večjim očistkom ctDNK, ne glede na vrsto in režim prejete terapije.

Poleg ocenjevanja učinkovitosti vrste zdravljenja bi bilo s spremljanjem ravni mutacij možno tudi zgodaj zaznati pojav odpornosti na zdravljenje (24). V slovenski raziskavi med letoma 2014 in 2017 so Kern in sodelavci preučevali raven mutacij EGFR pri bolnikih z nedrobnoceličnim rakom pljuč, ki so se zdravili s prvo generacijo EGFR TKI in spremembe ravni primerjali s kliničnimi in slikovnodiagnosticskimi znaki za napredovanje bolezni. Sledenje bolnikov s slikovnimi preiskavami so opravili po prvih 8 tednih zdravljenja in nato vsakih 16 tednov oz. prej, če so ugotavljali znake napredovanja bolezni. Vzorce krvi za testiranje EGFR mutacij v periferni krvi so odvzeli ob vsakem kontrolnem pregledu ter jih obdelali s standardizirano preiskavo Cobas EGFR, ki temelji na uporabi qPCR. Pri 12 od 35 bolnikov so ugotavljali pojav povečanja ravni mutacij EGRF v povprečju 10 tednov pred kliničnimi in

slikovnimi znaki za napredovanje bolezni (77).

Glede na nedavne podatke je hitrost odziva na prejeto zdravljenje možni označevalec dolgoročne uspešnosti zdravljenja in posredno vpliva na boljši izid bolezni. V nedavni italijanski študiji so poročali o slabšem izidu pri bolnikih s prisotno mutacijo KRAS pri bolnikih, ki so vzdrževali visoko raven ctDNK v plazmi 3–4 tedne po uvedbi terapije. V primeru dviga ravni ctDNK pa so poročali kar o 7-krat višjih obetih za napredovanje bolezni (78). Z identificiranjem teh bolnikov bi tem lahko omogočili hitrejšo zamenjavo zdravljenja z bolj ustreznim ter učinkovitim (npr. imunoterapija, kemoterapija).

6 Zaključek

Tekočinska biopsija je metoda, ki počasi že zaseda pomembno mesto pri diagnosticiranju in spremljanju odziva na zdravljenje raka pljuč. Čeprav je trenutno njena vloga pri zdravljenju raka pljuč še omejena, postopno pridobiva prostor v svetovnih smernicah (55,56). Trenutno se ctDNK v klinični praksi že uporablja pri bolnikih z nedrobnoceličnim rakom pljuč za primarno odkrivanje vodilnih mutacij (predvsem EGFR) in mehanizmov odpornosti med tarčnim zdravljenjem. Metoda veliko obeta tudi pri zgodnjem odkrivanju raka in pri spremljanju odziva na zdravljenje (24,55). Zaradi vse boljše občutljivosti in cenovno dostopnejših metod se pričakuje razširitev uporabe molekularne metode NGS v klinično prakso, velik potencial v raziskavah pa kažejo tudi druge vrste bioloških označevalcev (24). Potrebne so nadaljnje tehnološke izboljšave in raziskave, ki bodo izboljšale zanesljivost in uporabnost metode v redni klinični praksi, predvsem pa je bistvena standardizacija celotnega postopka – od odvzema vzorca do poročanja o rezultatih in njihovem vrednotenju.

Izjava o navzkrižju interesov

Avtorji nimamo navzkrižja interesov.

Literatura

1. Jain KK. Personalized medicine. *Curr Opin Mol Ther.* 2002;4(6):548-58. PMID: [12596356](#)
2. Mok TS, Wu YL, Thongprasert S, Yang CH, Chu DT, Saijo N, et al. Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. *N Engl J Med.* 2009;361(10):947-57. DOI: [10.1056/NEJMoa0810699](#) PMID: [19692680](#)
3. Boloker G, Wang C, Zhang J. Updated statistics of lung and bronchus cancer in United States (2018). *J Thorac Dis.* 2018;10(3):1158-61. DOI: [10.21037/jtd.2018.03.15](#) PMID: [29708136](#)
4. Onkološki Inštitut Ljubljana. Register raka Republike Slovenije in drugi registri. Ljubljana: Onkološki inštitut; 2018.
5. Ost DE, Yeung SC, Tanoue LT, Gould MK. Clinical and organizational factors in the initial evaluation of patients with lungcancer: Diagnosis and management of lung cancer. *Chest.* 2013;143:e121S-e141S. DOI: [10.1378/chest.12-2352](#) PMID: [23649435](#)
6. Li T, Kung HJ, Mack PC, Gandara DR. Genotyping and genomic profiling of non-small-cell lung cancer: implications for current and future therapies. *J Clin Oncol.* 2013;31(8):1039-49. DOI: [10.1200/JCO.2012.45.3753](#) PMID: [23401433](#)

7. Kris MG, Johnson BE, Berry LD, Kwiatkowski DJ, Iafrate AJ, Wistuba II, et al. Using multiplexed assays of oncogenic drivers in lung cancers to select targeted drugs. *JAMA*. 2014;311(19):1998-2006. DOI: [10.1001/jama.2014.3741](https://doi.org/10.1001/jama.2014.3741) PMID: [24846037](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24846037/)
8. World Health Organization. IARC monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans. Geneva: WHO; 1986.
9. Boc N, Kern I, Rozman A, et al. Priporočila za obravnavo bolnikov s pljučnim rakom. Ljubljana: Onkološki inštitut; 2019.
10. Lindeman NI, Cagle PT, Aisner DL, Arcila ME, Beasley MB, Bernicker EH, et al. Updated molecular testing guideline for the selection of lung cancer patients for treatment with targeted tyrosine kinase inhibitors: Guideline from the College of American Pathologists, the International Association for the Study of Lung Cancer, and the Association for Molecular Pathology. *J Mol Diagn*. 2018;20(2):129-59. DOI: [10.1016/j.jmoldx.2017.11.004](https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2017.11.004) PMID: [29398453](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29398453/)
11. Johann DJ, Steliga M, Shin IJ, Yoon D, Arnaoutakis K, Hutchins L, et al. Liquid biopsy and its role in an advanced clinical trial for lung cancer. *Exp Biol Med* (Maywood). 2018;243(3):262-71. DOI: [10.1177/1535370217750087](https://doi.org/10.1177/1535370217750087) PMID: [29405770](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29405770/)
12. Jesenko T, Grašič Kuhar C, Čemažar M. Tekočinska biopsija pri raku. *Radiol Oncol*. 2018;2:26-31.
13. Radvanyi A, Raymond VM, Erlander MG, Reckamp KL. Urine test for EGFR analysis in patients with non-small cell lung cancer. *J Thorac Dis*. 2017;9(S13):S1323-31. DOI: [10.21037/jtd.2017.06.144](https://doi.org/10.21037/jtd.2017.06.144) PMID: [29184671](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29184671/)
14. Ying S, Ke H, Ding Y, Liu Y, Tang X, Yang D, et al. Unique genomic profiles obtained from cerebrospinal fluid cell-free DNA of non-small cell lung cancer patients with leptomeningeal metastases. *Cancer Biol Ther*. 2019;20(4):562-70. DOI: [10.1080/15384047.2018.1538614](https://doi.org/10.1080/15384047.2018.1538614) PMID: [30395779](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30395779/)
15. Song Z, Wang W, Li M, Liu J, Zhang Y. Cytological-negative pleural effusion can be an alternative liquid biopsy media for detection of EGFR mutation in NSCLC patients. *Lung Cancer*. 2019;136:23-9. DOI: [10.1016/j.lungcan.2019.08.004](https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2019.08.004) PMID: [31421258](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31421258/)
16. Gu X, He J, Ji G. Combined use of circulating tumor cells and salivary mRNA to detect non-small-cell lung cancer. *Medicine* (Baltimore). 2020;99(8):e19097. DOI: [10.1097/MD.00000000000019097](https://doi.org/10.1097/MD.00000000000019097) PMID: [32080083](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32080083/)
17. Sequist LV, Neal JW. Personalized, genotype-directed therapy for advanced non-small cell lung cancer, UpToDate. Alphen aan den Rijn: Wolters Kluwer; 2020 [cited 2021 Apr 20]. Available from: <https://www.uptodate.com/contents/personalized-genotype-directed-therapy-for-advanced-non-small-cell-lung-cancer>.
18. Diaz LA, Bardelli A. Liquid biopsies: genotyping circulating tumor DNA. *J Clin Oncol*. 2014;32(6):579-86. DOI: [10.1200/JCO.2012.45.2011](https://doi.org/10.1200/JCO.2012.45.2011) PMID: [24449238](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24449238/)
19. Wang N, Zhang X, Wang F, Zhang M, Sun B, Yin W, et al. The diagnostic accuracy of liquid biopsy in EGFR-mutated NSCLC: A systematic review and meta-analysis of 40 studies. *SLAS Technol*. 2021;26(1):42-54. DOI: [10.1177/2472630320939565](https://doi.org/10.1177/2472630320939565) PMID: [32659150](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32659150/)
20. Saarenheimo J, Eigeliene N, Andersen H, Tirola M, Jekunen A. The value of liquid biopsies for guiding therapy decisions in non-small cell lung cancer. *Front Oncol*. 2019;9:129. DOI: [10.3389/fonc.2019.00129](https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00129) PMID: [30891428](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30891428/)
21. Russano M, Napolitano A, Ribelli G, Iuliani M, Simonetti S, Citarella F, et al. Liquid biopsy and tumor heterogeneity in metastatic solid tumors: the potentiality of blood samples. *J Exp Clin Cancer Res*. 2020;39(1):95. DOI: [10.1186/s13046-020-01601-2](https://doi.org/10.1186/s13046-020-01601-2) PMID: [32460897](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32460897/)
22. Lee JY, Qing X, Xiumin W, Yali B, Chi S, Bak SH, et al. Longitudinal monitoring of EGFR mutations in plasma predicts outcomes of NSCLC patients treated with EGFR TKIs: Korean Lung Cancer Consortium (KLCC-12-02). *Oncotarget*. 2016;7(6):6984-93. DOI: [10.18632/oncotarget.6874](https://doi.org/10.18632/oncotarget.6874) PMID: [26755650](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26755650/)
23. Rolfo C, Mack PC, Scagliotti GV, Baas P, Barlesi F, Bivona TG, et al. Liquid biopsy for advanced non-small cell lung cancer (NSCLC): A statement paper from the IASLC. *J Thorac Oncol*. 2018;13(9):1248-68. DOI: [10.1016/j.jtho.2018.05.030](https://doi.org/10.1016/j.jtho.2018.05.030) PMID: [29885479](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29885479/)
24. Rolfo C, Mack P, Scagliotti GV, Aggarwal C, Arcila ME, et al. Liquid biopsy for advanced non-small cell lung cancer: a consensus statement from the International Association for the Study of Lung Cancer (IASLC). *J Thorac Oncol*. 2021;16(10):1647-62. DOI: [10.1016/j.jtho.2021.06.017](https://doi.org/10.1016/j.jtho.2021.06.017) PMID: [34246791](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34246791/)
25. Sozzi G, Conte D, Leon M, Ciricione R, Roz L, Ratcliffe C, et al. Quantification of free circulating DNA as a diagnostic marker in lung cancer. *J Clin Oncol*. 2003;21(21):3902-8. DOI: [10.1200/JCO.2003.02.006](https://doi.org/10.1200/JCO.2003.02.006) PMID: [14507943](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14507943/)
26. Elazezy M, Joosse SA. Techniques of using circulating tumor DNA as a liquid biopsy component in cancer management. *Comput Struct Biotechnol J*. 2018;16:370-8. DOI: [10.1016/j.csbj.2018.10.002](https://doi.org/10.1016/j.csbj.2018.10.002) PMID: [30364656](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30364656/)
27. Ashworth TR. A case of cancer in which cells similar to those in the tumours were seen in the blood after death. *Med J Aust*. 1869;14:146147.
28. Ozkumur E, Shah AM, Ciciliano JC, Emmink BL, Miyamoto DT, Brachtel E, et al. Inertial focusing for tumor antigen-dependent and -independent sorting of rare circulating tumor cells. *Sci Transl Med*. 2013;5(179). DOI: [10.1126/scitranslmed.3005616](https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3005616) PMID: [23552373](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23552373/)
29. Progar V, Petrovič U. Vpliv parametrov sekvenciranja naslednje generacije na zanesljivost rezultatov v metagenomskih študijah. *Informativa Medica Slovenica*. 2013;18:1-8.
30. Yang SR, Schultheis AM, Yu H, Mandelker D, Ladanyi M, Büttner R. Precision medicine in non-small cell lung cancer: current applications and future directions. *Semin Cancer Biol*. 2020;S1044-579X(20):30164-4. DOI: [10.1016/j.semcancer.2020.07.00](https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2020.07.00) PMID: [32730814](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32730814/)
31. Fernandez-Cuesta L, Perdomo S, Avogbe PH, Leblay N, Delhomme TM, Gaborieau V, et al. Identification of circulating tumor DNA for the early detection of small-cell lung cancer. *EBioMedicine*. 2016;10:117-23. DOI: [10.1016/j.ebiom.2016.06.032](https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2016.06.032) PMID: [27377626](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27377626/)
32. Corcoran RB, Chabner BA. Application of cell-free DNA analysis to cancer treatment. *N Engl J Med*. 2018;379(18):1754-65. DOI: [10.1056/NEJMr1706174](https://doi.org/10.1056/NEJMr1706174) PMID: [30380390](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30380390/)
33. El Messaoudi S, Rolet F, Mouliere F, Thierry AR. Circulating cell free DNA: preanalytical considerations. *Clin Chim Acta*. 2013;424:222-30. DOI: [10.1016/j.cca.2013.05.022](https://doi.org/10.1016/j.cca.2013.05.022) PMID: [23727028](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23727028/)
34. Boettcher S, Ebert BL. Clonal Hematopoiesis of Indeterminate Potential. *J Clin Oncol*. 2019;37(5):419-22. DOI: [10.1200/JCO.2018.79.3588](https://doi.org/10.1200/JCO.2018.79.3588) PMID: [30589599](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30589599/)
35. Liu J, Chen X, Wang J, Zhou S, Wang CL, Ye MZ, et al. Biological background of the genomic variations of cf-DNA in healthy individuals. *Ann Oncol*. 2019;30(3):464-70. DOI: [10.1093/annonc/mdy513](https://doi.org/10.1093/annonc/mdy513) PMID: [30475948](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30475948/)
36. Trombetta D, Sparaneo A, Fabrizio FP, Muscarella LA. Liquid biopsy and NSCLC. *Lung Cancer Manag*. 2016;5(2):91-104. DOI: [10.2217/lmt-2016-0006](https://doi.org/10.2217/lmt-2016-0006) PMID: [30643553](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30643553/)
37. Bao-Caamano A, Rodriguez-Casanova A, Diaz-Lagares A. Epigenetics of circulating tumor cells in breast cancer. *Adv Exp Med Biol*. 2020;1220:117-34. DOI: [10.1007/978-3-030-35805-1_8](https://doi.org/10.1007/978-3-030-35805-1_8) PMID: [32304083](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32304083/)
38. Pantel K, Hille C, Scher HI. Circulating tumor cells in prostate cancer: from discovery to clinical utility. *Clin Chem*. 2019;65(1):87-99. DOI: [10.1373/clinchem.2018.287102](https://doi.org/10.1373/clinchem.2018.287102) PMID: [30602476](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30602476/)
39. Sundling KE, Lowe AC. Circulating tumor cells: overview and opportunities in cytology. *Adv Anat Pathol*. 2019;26(1):56-63. DOI: [10.1097/PAP.0000000000000217](https://doi.org/10.1097/PAP.0000000000000217) PMID: [30325755](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30325755/)
40. Alix-Panabières C, Pantel K. Clinical applications of circulating tumor cells and circulating tumor DNA as liquid biopsy. *Cancer Discov*. 2016;6(5):479-91. DOI: [10.1158/2159-8290.CD-15-1483](https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-15-1483) PMID: [26969689](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26969689/)
41. Kahlert C, Kalluri R. Exosomes in tumor microenvironment influence cancer progression and metastasis. *J Mol Med (Berl)*. 2013;91(4):431-7. DOI: [10.1007/s00109-013-1020-6](https://doi.org/10.1007/s00109-013-1020-6) PMID: [23519402](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23519402/)
42. Oudkerk M, Devaraj A, Vliegenthart R, Henzler T, Prosch H, Heussel CP, et al. European position statement on lung cancer screening. *Lancet Oncol*. 2017;18(12):e754-66. DOI: [10.1016/S1470-2045\(17\)30861-6](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(17)30861-6) PMID: [29208441](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29208441/)

43. Jamal-Hanjani M, Wilson GA, McGranahan N, Birkbak NJ, Watkins TB, Veeriah S, et al.; TRACERx Consortium. Tracking the evolution of non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*. 2017;376(22):2109-21. DOI: [10.1056/NEJMoa1616288](https://doi.org/10.1056/NEJMoa1616288) PMID: [28445112](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28445112/)
44. Szpechcinski A, Rudzinski P, Kupis W, Langfort R, Orlowski T, Chorostowska-Wynimko J. Plasma cell-free DNA levels and integrity in patients with chest radiological findings: NSCLC versus benign lung nodules. *Cancer Lett*. 2016;374(2):202-7. DOI: [10.1016/j.canlet.2016.02.002](https://doi.org/10.1016/j.canlet.2016.02.002) PMID: [26854716](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26854716/)
45. LeBleu VS, Kalluri R. Exosomes as a multicomponent biomarker platform in cancer. *Trends Cancer*. 2020;6(9):767-74. DOI: [10.1016/j.trecan.2020.03.007](https://doi.org/10.1016/j.trecan.2020.03.007) PMID: [32307267](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32307267/)
46. Soheli MM. Circulating microRNAs as biomarkers in cancer diagnosis. *Life Sci*. 2020;248:117473. DOI: [10.1016/j.lfs.2020.117473](https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.117473) PMID: [32114007](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32114007/)
47. Tang Z, Li D, Hou S, Zhu X. The cancer exosomes: clinical implications, applications and challenges. *Int J Cancer*. 2020;146(11):2946-59. DOI: [10.1002/ijc.32762](https://doi.org/10.1002/ijc.32762) PMID: [31671207](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31671207/)
48. Ilie M, Hofman V, Long-Mira E, Selva E, Vignaud JM, Padovani B, et al. "Sentinel" circulating tumor cells allow early diagnosis of lung cancer in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *PLoS One*. 2014;9(10):e111597. DOI: [10.1371/journal.pone.0111597](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111597) PMID: [25360587](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25360587/)
49. Leroy S, Benzaquen J, Mazzetta A, Marchand-Adam S, Padovani B, Israel-Biet D, et al.; AIR Project Study Group. Circulating tumour cells as a potential screening tool for lung cancer (the AIR study): protocol of a prospective multicentre cohort study in France. *BMJ Open*. 2017;7(12):e018884. DOI: [10.1136/bmjopen-2017-018884](https://doi.org/10.1136/bmjopen-2017-018884) PMID: [29282271](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29282271/)
50. Marquette CH, Boutros J, Benzaquen J, Ferreira M, Pastre J, Pison C, 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;8(7):709-16. DOI: [10.1016/S2213-2600\(20\)30081-3](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(20)30081-3) PMID: [32649919](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32649919/)
51. Serrano MJ, Garrido-Navas MC, Diaz Mochon JJ, Cristofanilli M, Gil-Bazo I, Pauwels P, et al.; International Society of Liquid Biopsy. Precision Prevention and Cancer Interception: The New Challenges of Liquid Biopsy. *Cancer Discov*. 2020;10(11):1635-44. DOI: [10.1158/2159-8290.CD-20-0466](https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-20-0466) PMID: [33037026](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33037026/)
52. Chen X, Gole J, Gore A, He Q, Lu M, Min J, et al. Non-invasive early detection of cancer four years before conventional diagnosis using a blood test. *Nat Commun*. 2020;11(1):3475. DOI: [10.1038/s41467-020-17316-z](https://doi.org/10.1038/s41467-020-17316-z) PMID: [32694610](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32694610/)
53. Abbosh C, Birkbak NJ, Swanton C. Early stage NSCLC - challenges to implementing ctDNA-based screening and MRD detection. *Nat Rev Clin Oncol*. 2018;15(9):577-86. DOI: [10.1038/s41571-018-0058-3](https://doi.org/10.1038/s41571-018-0058-3) PMID: [29968853](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29968853/)
54. Planchard D, Popat S, Kerr K, Novello S, Smit EF, Faivre-Finn C, et al.; ESMO Guidelines Committee. Metastatic non-small cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2018;29:iv192-237. DOI: [10.1093/annonc/mdy275](https://doi.org/10.1093/annonc/mdy275)
55. Ettinger DS, Wood DE, Aggarwal C, Aisner DL, Akerley W, Bauman JR, et al.; OCN. NCCN Guidelines Insights: non-small cell lung cancer, Version 1.2020. *J Natl Compr Canc Netw*. 2019;17(12):1464-72. DOI: [10.6004/jnccn.2019.0059](https://doi.org/10.6004/jnccn.2019.0059) PMID: [31805526](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31805526/)
56. Nosaki K, Satouchi M, Kurata T, Yoshida T, Okamoto I, Katakami N, et al. Re-biopsy status among non-small cell lung cancer patients in Japan: A retrospective study. *Lung Cancer*. 2016;101:1-8. DOI: [10.1016/j.lungcan.2016.07.007](https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2016.07.007) PMID: [27794396](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27794396/)
57. Coghlin CL, Smith LJ, Bakar S, Stewart KN, Devereux GS, Nicolson MC, et al. Quantitative analysis of tumor in bronchial biopsy specimens. *J Thorac Oncol*. 2010;5(4):448-52. DOI: [10.1097/JTO.0b013e3181ca12c4](https://doi.org/10.1097/JTO.0b013e3181ca12c4) PMID: [20125040](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20125040/)
58. Food and drug administration. List of Cleared or Approved Companion Diagnostic Devices (In Vitro and Imaging Tools). Silver Spring: FDA; 2021 [cited 2021 Apr 20]. Available from: <http://www.fda.gov/MedicalDevices/ProductsandMedicalProcedures/InVitroDiagnostics/ucm301431.htm>.
59. European Medicines Agency. List of Cleared or Approved Companion Diagnostic Devices (In Vitro and Imaging Tools). Amsterdam: EMA; 2021 [cited 2021 Apr 20]. Available from: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR__Product_Information/human/004124/WC500202022.pdf.
60. Chong CR, Jänne PA. The quest to overcome resistance to EGFR-targeted therapies in cancer. *Nat Med*. 2013;19(11):1389-400. DOI: [10.1038/nm.3388](https://doi.org/10.1038/nm.3388) PMID: [24202392](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24202392/)
61. 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(3):46. DOI: [10.21037/atm.2017.01.32](https://doi.org/10.21037/atm.2017.01.32) PMID: [28251125](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28251125/)
62. Pisapia P, Pepe F, Smeraglio R, Russo M, Rocco D, Sgariglia R, et al. Cell free DNA analysis by SiRe® next generation sequencing panel in non small cell lung cancer patients: focus on basal setting. *J Thorac Dis*. 2017;9(S13):S1383-90. DOI: [10.21037/jtd.2017.06.97](https://doi.org/10.21037/jtd.2017.06.97) PMID: [29184677](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29184677/)
63. Yang JC, Ahn MJ, Kim DW, Ramalingam SS, Sequist LV, Su WC, et al. Osimertinib in pretreated T790M-positive advanced non-small-cell lung cancer: AURAstudy phase II extension component. *J Clin Oncol*. 2017;35(12):1288-96. DOI: [10.1200/JCO.2016.70.3223](https://doi.org/10.1200/JCO.2016.70.3223) PMID: [28221867](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28221867/)
64. Normanno N, Maiello MR, Chicchinelli N, Iannaccone A, Esposito C, De Cecio R, et al. Targeting the EGFR T790M mutation in non-small-cell lung cancer. *Expert Opin Ther Targets*. 2017;21(2):159-65. DOI: [10.1080/14728222.2017.1272582](https://doi.org/10.1080/14728222.2017.1272582) PMID: [28002980](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28002980/)
65. Piotrowska Z, Niederst MJ, Karlovich CA, Wakelee HA, Neal JW, Mino-Kenudson M, et al. Heterogeneity underlies the emergence of egfrt790 wild-type clones following treatment of T790M-Positive cancers with a third-generation EGFR inhibitor. *Cancer Discov*. 2015;5(7):713-22. DOI: [10.1158/2159-8290.CD-15-0399](https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-15-0399) PMID: [25934077](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25934077/)
66. Remon J, Menis J, Hasan B, Peric A, De Maio E, Novello S, et al. The APPLE Trial: feasibility and activity of AZD9291 (Osimertinib) treatment on positive plasma T790M in EGFR-mutant NSCLC patients. *EORTC 1613. Clin Lung Cancer*. 2017;18(5):583-8. DOI: [10.1016/j.clcc.2017.02.005](https://doi.org/10.1016/j.clcc.2017.02.005) PMID: [28341106](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28341106/)
67. Shaw AT, Solomon BJ, Besse B, Bauer TM, Lin CC, Soo RA, et al. ALK resistance mutations and efficacy of lorlatinib in advanced anaplastic lymphoma kinase-positive non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2019;37(16):1370-9. DOI: [10.1200/JCO.18.02236](https://doi.org/10.1200/JCO.18.02236) PMID: [30892989](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30892989/)
68. Mezquita L, Swaldz A, Jovelet C, Ortiz-Cuaran S, Howarth K, Planchard D, et al. Clinical relevance of an amplicon-based liquid biopsy for detecting ALK and ROS1 fusion and resistance mutations in patients with non-small-cell lung cancer. *JCO Precis Oncol*. 2020;4(4):4. DOI: [10.1200/PO.19.00281](https://doi.org/10.1200/PO.19.00281) PMID: [32923908](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32923908/)
69. Ortiz-Cuaran S, Mezquita L, Swaldz A, Aldea M, Mazieres J, Leonce C, et al. Circulating tumor DNA genomics reveal potential mechanisms of resistance to BRAF-targeted therapies in patients with BRAF-mutant metastatic non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2020;26(23):6242-53. DOI: [10.1158/1078-0432.CCR-20-1037](https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-20-1037) PMID: [32859654](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32859654/)
70. Mosele F, Remon J, Mateo J, Westphalen CB, Barlesi F, Lolkema MP, et al. Recommendations for the use of next-generation sequencing (NGS) for patients with metastatic cancers: a report from the ESMO Precision Medicine Working Group. *Ann Oncol*. 2020;31(11):1491-505. DOI: [10.1016/j.annonc.2020.07.014](https://doi.org/10.1016/j.annonc.2020.07.014) PMID: [32853681](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32853681/)
71. Clery E, Pisapia P, Feliciano S, Vigliar E, Marano A, De Luca C, et al. There is still a role for cytology in the 'liquid biopsy' era. A lesson from a TKI-treated patient showing adenocarcinoma to squamous cell carcinoma transition during disease progression. *J Clin Pathol*. 2017;70(9):798-802. DOI: [10.1136/jclinpath-2017-204370](https://doi.org/10.1136/jclinpath-2017-204370) PMID: [28363898](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28363898/)
72. Revelo AE, Martin A, Velasquez R, Kulandaisamy PC, Bustamante J, Keshishyan S, et al. Liquid biopsy for lung cancers: an update on recent developments. *Ann Transl Med*. 2019;7(15):349. DOI: [10.21037/atm.2019.03.28](https://doi.org/10.21037/atm.2019.03.28) PMID: [31516895](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31516895/)
73. Wan JC, Massie C, Garcia-Corbacho J, Mouliere F, Brenton JD, Caldas C, et al. Liquid biopsies come of age: towards implementation of circulating tumour DNA. *Nat Rev Cancer*. 2017;17(4):223-38. DOI: [10.1038/nrc.2017.7](https://doi.org/10.1038/nrc.2017.7) PMID: [28233803](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28233803/)

74. Song Y, Hu C, Xie Z, Wu L, Zhu Z, Rao C, et al.; Written on behalf of AME Lung Cancer Collaborative Group. Circulating tumor DNA clearance predicts prognosis across treatment regimen in a large real-world longitudinally monitored advanced non-small cell lung cancer cohort. *Transl Lung Cancer Res.* 2020;9(2):269-79. DOI: [10.21037/tlcr.2020.03.17](https://doi.org/10.21037/tlcr.2020.03.17) PMID: [32420066](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32420066/)
75. Horn L, Whisenant JG, Wakelee H, Reckamp KL, Qiao H, Leal TA, et al. Monitoring therapeutic response and resistance: analysis of circulating tumor DNA in patients with ALK+ lung cancer. *J Thorac Oncol.* 2019;14(11):1901-11. DOI: [10.1016/j.jtho.2019.08.003](https://doi.org/10.1016/j.jtho.2019.08.003) PMID: [31446141](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31446141/)
76. Lee JY, Qing X, Xiumin W, Yali B, Chi S, Bak SH, et al. Longitudinal monitoring of EGFR mutations in plasma predicts outcomes of NSCLC patients treated with EGFR TKIs: Korean Lung Cancer Consortium (KLCC-12-02). *Oncotarget.* 2016;7(6):6984-93. DOI: [10.18632/oncotarget.6874](https://doi.org/10.18632/oncotarget.6874) PMID: [26755650](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26755650/)
77. Kern I, Čufer T, Rot M, Mohorčič K, Požek I, Palma JF, et al. Dynamic changes of egfr activating mutations as an early predictor of progression in non-small cell lung cancer patients treated with EGFR tyrosine kinase inhibitors. *J Mol Biomark Diagn.* 2020;11(3):1-7.
78. Zulato E, Attili I, Pavan A, Nardo G, Del Bianco P, Boscolo Bragadin A, et al. Early assessment of KRAS mutation in cfDNA correlates with risk of progression and death in advanced non-small-cell lung cancer. *Br J Cancer.* 2020;123(1):81-91. DOI: [10.1038/s41416-020-0833-7](https://doi.org/10.1038/s41416-020-0833-7) PMID: [32376889](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32376889/)