



'25

ХЕМИЈСКИ ПРЕГЛЕД

год. 66
бр. 3 (јун)

YU ISSN 04406826
UDC 54.011.93



Век од рођења

академика
Пауле Путанов
(1925-2014)



оснивача и дугогодишњег руководиоца
Одељења за катализу ИХТМ у Београду

П. Путанов

Хемијски Преглед
hp.shd.org.rs

ХЕМИЈСКИ ПРЕГЛЕД CHEMICAL REVIEW



Editor-in-Chief
DRAGICA D. TRIVIĆ
Deputy Editor-in-Chief
VESNA D. MILANOVIĆ
MAŠTRAPOVIĆ
Honorary editor
RATKO M. JANKOV

Volume 66
NUMBER 3
(June)

Годиште 66

број 3
јун

Publisher
SERBIAN CHEMICAL SOCIETY
Belgrade/Serbia, Karnegijeva 4

Издаје
СРПСКО ХЕМИЈСКО ДРУШТВО

Телефон 3370-467

Карнегијева 4

излази двомесечно

ОДГОВОРНИ И ГЛАВНИ УРЕДНИК
Драгица Д. Тривић

ПОМОЋНИК ОДГОВОРНОГ И ГЛАВНОГ УРЕДНИКА
Весна Д. Милановић Маштраповић

ПОЧАСНИ УРЕДНИК
Ратко М. Јанков

ЧЛАНОВИ РЕДАКЦИЈЕ
Душанка М. Милојковић Опсеница, Тамара Р.
Тодоровић, Игор М. Опсеница, Милан Р. Николић,
Ксенија Стојановић, Александра Данчевић

УРЕЂИВАЧКИ ОДБОР
Иван Гутман, Душан Сладић, Снежана Зарић, Сузана
Јовановић Шанта, Драган Марковић, Радомир Саичић,
Мелина Калагасидис Крушић, Живорад Чековић
(председник)

Web site: <https://hp.shd.org.rs/>

e-mail редакције: hempred@chem.bg.ac.rs

Припрема за штампу и штампа:
РИЦ графичког инжењерства
Технолошко-металуршки факултет
Београд, Карнегијева 4

Насловна страна:
Слободан и Горан Ратковић
RatkovicDesign
www.ratkovicdesign.net
office@ratkovicdesign.net

Напомена о одговорности

Ставови, мишљења и закључци изнети у објављеним радовима представљају искључиво личне ставове аутора и не одражавају нужно ставове или политику Српског хемијског друштва. Као издавач часописа *Хемијски преглед*, Српско хемијско друштво не сноси одговорност за садржај објављених чланака.

САДРЖАЈ

ЧЛАНЦИ

Миљан БИГОВИЋ, Софија ВУЧУРОВИЋ, Марија
КАЛУЂЕРОВИЋ, Јована ЈОВАНОВИЋ, Ана РАКОЧЕВИЋ
Miljan BIGOVIĆ, Sofija VUČUROVIĆ, Marija KALUĐEROVIĆ,
Jovana JOVANOVIĆ, Ana RAKOČEVIĆ
МЕТАЛИ ИЗМЕЂУ ЖИВОТА И СМРТИ
METALS BETWEEN LIFE AND DEATH _____ 58

Теодора ЋАТО, Миодраг ВУКОВИЋ, Милена ЧАВИЋ
Teodora ČATO, Miodrag VUKOVIĆ, Milena ČAVIĆ
ПРИМЕНА ТЕЧНЕ БИОПСИЈЕ У ОНКОЛОШКОЈ
ДИЈАГНОСТИЦИ И НАУЧНИМ ИСТРАЖИВАЊИМА
LIQUID BIOPSY APPLICATION IN CANCER DIAGNOSTICS
AND SCIENTIFIC RESEARCH _____ 65

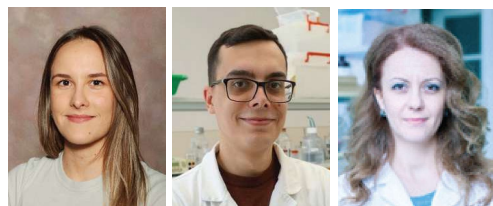
Бранислав КОКИЋ
Branislav KOKIĆ
ОДАБРАНИ НАПРЕЦИ У ОРГАНСКОЈ ХЕМИЈИ У
ПРВОМ КВАРТАЛУ 2025. ГОДИНЕ
SELECTED ADVANCEMENTS IN ORGANIC CHEMISTRY
PUBLISHED IN THE FIRST QUARTER OF 2025 _____ 78

ВЕСТИ из / за ШКОЛЕ

Ивана МИЋИЋ
Ivana MIĆIĆ
ХЕМИЈСКИ ИНКУБАТОР: ПРОЈЕКТНА НАСТАВА У
ХЕМИЈИ
CHEMICAL INCUBATOR: PROJECT-BASED LEARNING IN
CHEMISTRY _____ 80

- Savic, A. R. (2014). *Kompleksi platine(II) i rutenijuma(II) sa diaminskim ligandima: sinteza, karakterizacija i citotoksičnost (Doktorska disertacija)*. Univerzitet u Beogradu-Hemijski fakultet, Beograd.
- Schluga, P., Hartinger, C. G., Egger, A., Reisner, E., Galanski, M., Jakupec, M. A., & Keppler, B. K. (2006). Redox behavior of tumor-inhibiting ruthenium(III) complexes and effects of physiological reductants on their binding to GMP. *Dalton Transaction*, 1796-1802. <https://doi.org/10.1039/b601246g>

- Stewart, D. J. (2007). Mechanisms of resistance to cisplatin and carboplatin. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 63, 12-31. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2007.02.001>
- Trudu, F., Amato, F., Vaňhara, P., Pivetta, T., Peña-Méndez, E. M., & Havel, J. (2015). Coordination compounds in cancer: Past, present and perspectives. *Journal of Applied Biomedicine*, 13 (2), 79-103. <https://doi.org/10.1016/j.jab.2015.02.001>
- Vogelstein, B., & Kinzler, K. W. (2004). Cancer genes and the pathways they control. *Nature Medicine*, 10 (8), 789-99. <https://doi.org/10.1038/nm1087>



Теодора ЋАТО, Миодраг ВУКОВИЋ, Милена ЧАВИЋ

Институт за онкологију и радиологију Србије, Пастерова 14, Београд

Е-пошта: teodoracato2101@gmail.com;
miodragvuk97@gmail.com; milena.cavic@ncrc.ac.rs

ПРИМЕНА ТЕЧНЕ БИОПСИЈЕ У ОНКОЛОШКОЈ ДИЈАГНОСТИЦИ И НАУЧНИМ ИСТРАЖИВАЊИМА

ИЗВОД

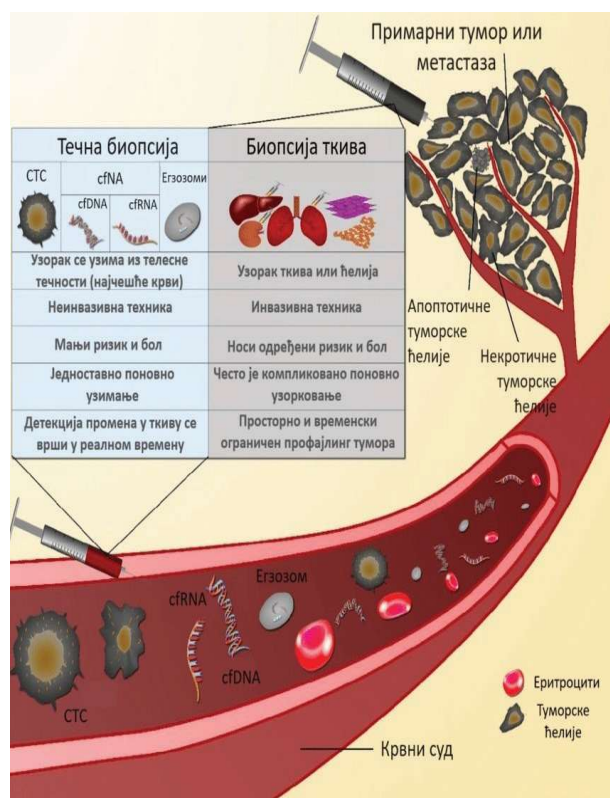
Течна биопсија се протеклих година испитивала као алтернатива инвазивној биопсији ткива, а за комплементарна испитивања карцинома већ полако проналази место у рутинској клиничкој примени. Течном биопсијом се из телесних течности, као што су крв, урин, пљувачка, плеурални излив и церебро-спинална течност, изолују биомаркери попут циркулишућих туморских ћелија, циркулишућих слободних нуклеинских киселина или екстрацелуларних везикула, након чега се анализира њихов генетички или протеински садржај. На релативно лак и једноставан начин, са могућношћу вишеструког узорковања, могуће је добити информације у вези порекла, састава и механизма еволуције тумора. Континуалним унапређивањем метода за детекцију и анализу биомаркера из течне биопсије омогућена су интензивна научна истраживања о примени течне биопсије у праћењу еволуције тумора у свим стадијумима болести и у току терапије. Обећавајући резултати указују на будућу примену у клиничкој онколошкој пракси за рану детекцију болести и релапса, дијагнозу и прогнозу, детекцију потенцијалних терапеутских мета и механизма резистенције на терапију. У овом раду описани су најбоље истражени аналити течне биопсије, као и неки од најважнијих резултата истраживања о њиховој клиничкој примени у области онкологије у свету и у Србији.

Кључне речи: биомаркер, екстрацелуларне везикуле, течна биопсија, циркулишућа слободна ДНК, циркулишуће туморске ћелије

УВОД

Карцином представља малигно обољење које карактерише неконтролисано дељење измењених ћелија. Према стопи смртности коју узрокује, налази се на дру-

гом месту у свету, након обољења кардиоваскуларног система (Malvezzi et al., 2017). Због високе инциденције обољевања, као и стопе смртности, интензивно се ради на разјашњавању механизма настајања и развоја болести, у сврху унапређивања програма превенције, ране детекције и ефикасности терапијских приступа. Анализа молекуларног профила карцинома има изузетан значај у успостављању прецизне дијагнозе и прогнозе болести, као и у одабиру одговарајућег терапијског приступа. Тренутни златни стандард у анализи молекуларног профила карцинома је биопсија ткива. Биопсија ткива, односно хируршко узимање чврстог узорка тумора, има неколико мана: инвазивна је и скупа, често и болна за пацијента, понекад ризична, могуће су и компликације услед неприступачне локације тумора (Marrugo-Ramírez et al., 2018). Такође, због хетерогености тумора, као и слабијег квалитета или недовољне количине узорка, информације које се добијају могу бити некомплетне, а неопходно је и континуално праћење промена у тумору услед селективног деловања терапије и временске промене тумора. Вишеструке биопсије ткива у току и након лечења су често немогуће и некомфорне за пацијента. Течна биопсија је све чешћи, алтернативни извор узорка тумора, а огледа се у анализи циркулишућих биомаркера изолованих из телесних течности: крви, урина, пљувачке, плеуралног излива и церебро-спиналне течности (Lone et al., 2022). Течна биопсија је мање инвазивна, јефтинија и могуће је чешће узорковање, а студије су указале на могуће примене у клиничкој пракси (Слика 1). Анализом биомаркера пореклом из тумора, који се изолују из узорка течне биопсије различитим техникама, омогућено је праћење одговора на терапију, резистентности тумора на исту и прогнозе лечења. Детаљнијим испитивањима биомаркера као важних актера у многим процесима везаним за малигне ћелије може се доћи до додатних разјашњења еволуције карцинома и унапређења опција персонализоване терапије, те побољшања исхода лечења (Soda et al., 2022).



Слика 1. Разлика између биопсије ткива и течне биопсије (Модификовано према Qi et al., 2018)

Најчешће анализирани циркулишући биомаркери су циркулишуће туморске ћелије (енгл. *circulating tumor cells* – CTC), циркулишућа слободна ДНК (дезоксирибонуклеинска киселина) (енгл. *cell-free DNA* – cfDNA) и екстрацелуларне везикуле (енгл. *extracellular vesicles* – EV). Ови биомаркери се ослобађају у систем за циркулацију из некротичних и апоптотичних примарних или метастатских туморских ћелија, а неки од њих су укључени у механизме који омогућавају даље метастазирање тумора у околне или удаљене органе. Управо због дијапазона информација које је могуће добити анализом циркулишућих биомаркера (мутације, информације о протеому, транскриптому, липодому, метаболому или фрагменту који су у вези са малигном болешћу, затим броју измењених копија (енгл. *copy number alterations* – CNA) кључних гена, епигенетичким варијацијама и слично (Lone et al., 2022)) у току су бројна испитивања која би побољшала рано откривање болести, дијагностику, праћење тока лечења и детекцију релапса (Marrugo-Ramírez et al., 2018). Иако се испитује применљивост додатних потенцијалних биомаркера (Marrugo-Ramírez et al., 2018), у оквиру овог рада биће описана три поменути типа биомаркера, уз додатак циркулишуће слободне РНК (рибонуклеинска киселина) (енгл. *cell-free RNA* – cfRNA), као и њихова тренутна примењивост у онколошкој дијагностици и научним истраживањима.

ЦИРКУЛИШУЋЕ ТУМОРСКЕ ЋЕЛИЈЕ

Циркулишуће туморске ћелије су ћелије које се спонтано одвајају од тумора и системом за циркулацију

доспевају до различитих ткива и органа, а затим интерагују са микрооколином. Састоје се из више субпопулација различитих фенотипских и функционалних карактеристика (Fernández-Lázaro et al., 2020). У поређењу са другим крвним елементима као што су леукоцити, заступљени су и до 10^9 пута мање, а појединачне ћелије могу бити различите величине и облика у зависности од стадијума и врсте тумора (Marrugo-Ramírez et al., 2018). Од леукоцита се разликују по додатним површинским маркерима: епителијалном ћелијском адхезионом молекулу ЕpCAM и цитокератинима, или по одсуству CD45 маркера, типичног за леукоците (Fernández-Lázaro et al., 2020). CTC се у циркулацији детектују као целе, апоптотичне, ћелије или у кластерима (Fernández-Lázaro et al., 2020), а такође могу бити везане за тромбоците или фибробласте у крви, при чему су заштићене од оксидативног стреса и имунског система (Lone et al., 2022). Сматра се да CTC одвајањем од тумора и уласком у циркулацију могу да доведу до формирања метастаза у другим органима, у процесу епителијално-мезенхималне транзиције (енгл. *epithelial mesenchymal transition* – EMT) туморских ћелија. EMT представља реверзибилну фенотипску трансформацију која омогућава покретљивост, инвазивност, отпорност на апоптозу и повећану продукцију екстрацелуларних протеина (Fernández-Lázaro et al., 2020; Soda et al., 2022). Различите генетичке и епигенетичке промене у примарним туморима утичу на овај процес, а самим тим на способност ширења и метастазирања тумора. Стога, CTC дају информације о маркерима који су у вези са EMT, као и њему супротног процеса мезенхимално-епителијалне транзиције (енгл. *mesenchymal epithelial transition* – MET), који може бити разлог појаве резистенције на одређене терапије. Због свега поменутог, CTC могу мењати експресију одређених маркера у току свих поменутих процеса, што им управо и омогућава да избегавају ћелијску смрт и даље се шире (Fernández-Lázaro et al., 2020).

Изолација CTC

Технике које се користе за изолацију и обогаћивање CTC из узорак течне биопсије заснивају се на њиховим специфичним физичким и биохемијским карактеристикама: величини, могућности деформације, густини, или одређеним маркерима на површини од којих је најчешћи поменути ЕpCAM (Soda et al., 2022).

Најчешћа метода за изолацију CTC се заснива на принципу раздвајања ћелија коришћењем обележених антитела у магнетном пољу. Две врсте антитела се користе за раздвајање: једни се везују за маркере на CTC, углавном ЕpCAM, а други везују маркер CD45 и на тај начин се уклањају ометајући и много заступљенији леукоцити. CellSearch® систем (<https://www.cellsearchctc.com/>) је систем који је одобрила Америчка управа за храну и лекове (енгл. *U.S. Food and Drug Administration* – FDA) за изолацију засновану на овом принципу, а за запремину пуне крви од 7,5 mL показује специфичност > 99 % и селективност од 97 % (Fernández-Lázaro et al., 2020). FDA је најпре одобрио CellSearch® систем за предикцију исхода болести код пацијената са метастатским карциномом

дојке 2004. године, а до 2008. године и за праћење пацијената са карциномом колоректума и панкреаса (Millner et al., 2013). Треба имати на уму да овај приступ не може да детектује ћелије које пролазе кроз EMT, када долази до губитка маркера (Fernández-Lázaro et al., 2020).

Микрофлуидни уређаји добијају на популарности због једноставности производње и потребне мање количине реагенса. На имуноафинитетном принципу развијен је и први CTC чип (енгл. *CTC chip*) (Nagrath et al., 2007), ХБ чип (енгл. *HB chip - Herringbone chip*) (Stott et al., 2010), Ефезиа (енгл. *Ephesia*) CTC чип (Saliba et al., 2010) и други (Soda et al., 2022). Још једна метода изолације ћелија може се извести помоћу инструмента CellCollector® (Gilupi, <https://gilupi.com/>), који раздваја и хвата CTC *in vivo*, односно представља катетер обложен антителима ЕрСАМ, који се ставља и задржава 30 минута у вени руке пацијента, што систем чини више инвазивним. Иако се овим превазилази ниска запремина крви, и даље је показао мању специфичност (90 % у студији са пацијентима оболелим од карцинома плућа) и селективност (52.94 %) од CellSearch® система. Поред CellSearch® и CellCollector®, на сличним принципима са извесним модификацијама, заснивају се и есеји MACS® (*Magnetic Activated Cell Sorting system*, Miltenyibiotec, <https://www.miltenyibiotec.com/US-en/>) и AdnaTest® (Qiagen, <https://www.qiagen.com/us>). Комплети који изолују CTC на основу морфолошких карактеристика су ISET® (енгл. *Isolation by Size of Epithelial Tumor cells*, Rarecells, <https://www.rarecells.com/iset-technology>), а на основу густине најпознатији је OncoQuick® (Greiner Bio-One, <https://www.gbo.com/en-int/company>) (Fernández-Lázaro et al., 2020). Иако су установљене потенцијалне примене CTC у свим стадијумима болести, потребно је унапредити поменуте методе изолације, квантификације и детекције да би се, поред CellSearch® система, нашле на листи одобрених за клиничку употребу (Fernández-Lázaro et al., 2020). Радна група за циркулишуће туморске ћелије Европског друштва за течну биопсију (<https://www.uke.de/english/departments-institutes/institutes/tumor-biology/european-liquid-biopsy-society-elbs/working-groups/index.html>) интензивно се бави стандардизацијом ових метода да би се омогућила њихова шира примена ван истраживачких лабораторија.

ЦИРКУЛИШУЋА СЛОБОДНА ДНК И ЦИРКУЛИШУЋА СЛОБОДНА РНК

Циркулишућа слободна ДНК (енгл. *cell-free DNA – cfDNA*) је дужине 150 – 200 базних парова (енгл. *base pairs – bp*) и дефинише се као део екстрацелуларне ДНК која није део субцелуларне и нема њој сличну молекуларну структуру. Пореклом је из апоптотичних или некротичних ћелија, а иако тачан механизам није утврђен, сматра се да је могуће да cfDNA отпуштају и здраве ћелије. Присутна је и код здравих особа, али је у знатно већој концентрацији присутна код оболелих од патолошких процеса као што су карциноми. Концентрација cfDNA код здравих особа у плазми износи око 30 ng/mL, односно у распону 0 до 100 ng/mL, док се код пацијената оболелих од карцинома бележи концентрација и до 1000 ng/mL (Marrugo-Ramírez et al., 2018).

Разлог томе је неефективно уклањање остатака ових ћелија из циркулације фагоцитима код патолошких стања, као што се иначе дешава код здравих особа (Soda et al., 2022). Фракција cfDNA која је отпуштена из туморских ћелија назива се циркулишућа туморска ДНК (енгл. *circulating tumor DNA – ctDNA*), а дефинисана је на основу тачкастих мутација, метилације и секвенци типичних за ћелије тумора. Може бити једноланчана или дволанчана ДНК, а дужина варира у зависности од порекла: да ли их отпуштају апоптотичне или некротичне ћелије, CTC, или пак потичу из екстрацелуларних везикула живих ћелија (Marrugo-Ramírez et al., 2018). Поред поменуте ctDNA, из узорак течне биопсије могуће је анализирати и друге циркулишуће туморске нуклеинске киселине: циркулишућа туморска РНК, дуге некодирајуће РНК (енгл. *long noncoding RNA – lncRNA*), микро РНК (енгл. *microRNA – miRNA*), и друге (Marrugo-Ramírez et al., 2018).

Циркулишућа слободна РНК – (енгл. *cell-free RNA – cfRNA*) је мање заступљена од cfDNA, али може да се детектује у серуму пацијената. Поред некодирајућих РНК, још један важан део cfRNA је циркулишућа туморска РНК (енгл. *circulating tumor RNA – ctRNA*). CtRNA би могла да се користи у клиничкој пракси за детекцију одређених мутација, али важније информације може да пружи о релативним нивоима експресије одређених гена. Међутим, применљивост анализе ових биомаркера у течној биопсији је ограничена због ниске концентрације, нестабилности и лоше репродукцибилности мерења (Fernández-Lázaro et al., 2020).

lncRNA и miRNA су две врсте некодирајућих РНК, прве су дужине преко 200 нуклеотида, а друге су краће од 200 нуклеотида. Њихове улоге су везане за интеракцију са протеинима и нуклеинским киселинама, што утиче на генску експресију. lncRNA учествује у регулацији обраде информационе РНК (иРНК) и стабилности исте, а њена потенцијална улога као биомаркера у онкологији се последњих година интензивније испитује. miRNA је једноланчана, најчешће дуга 18–25 нуклеотида, и учествује у експресији скоро 30 % протеин-кодирајућих гена. Због промене у експресији могу наступити различити биолошки процеси као што су туморигенеза или прогресија болести. Откривене су неке од потенцијалних дијагностичких примена miRNA као биомаркера из крви који могу да помогну разликовање патолошких од здравих стања (Marrugo-Ramírez et al., 2018).

Изолација и детекција cfDNA

За изолацију cfDNA постоје различити приступи, а одлука о томе који је најбољи зависи од даље примене cfDNA, јер преаналитичка фаза може да има велики утицај на жељену детекцију и анализу. Када говоримо о детекцији cfDNA и промена унутар ње, два су принципа коришћених техника: засноване на PCR (енгл. *polymerase chain reaction*) методи или NGS (енгл. *next generation sequencing*) технологијама.

Бројне технологије развијене су на принципу једноставне и јефтине PCR методологије, а техника дигиталног PCR се показала као корисна за детекцију мутација. Уз помоћ система микрофлуидног чипа и

дисперзије капи узорака, истовремено се врши вишеструка амплификација фрагмената ДНК, а најпознатији су BEAMing и ddPCR (енгл. *droplet digital PCR*) (Soda et al., 2022). Иако је BEAMing показао моћ детекције једног мутираног фрагмента према 10000 немутираних, сматра се непрактичним за рутинску клиничку употребу (Li et al., 2006). Због своје високе специфичности и селективности, оптималном технологијом за детекцију специфичних мутација заснованој на PCR реакцијама сматра се ddPCR, чак и за рану детекцију болести, када је концентрација cfDNA веома ниска (Junca et al., 2020).

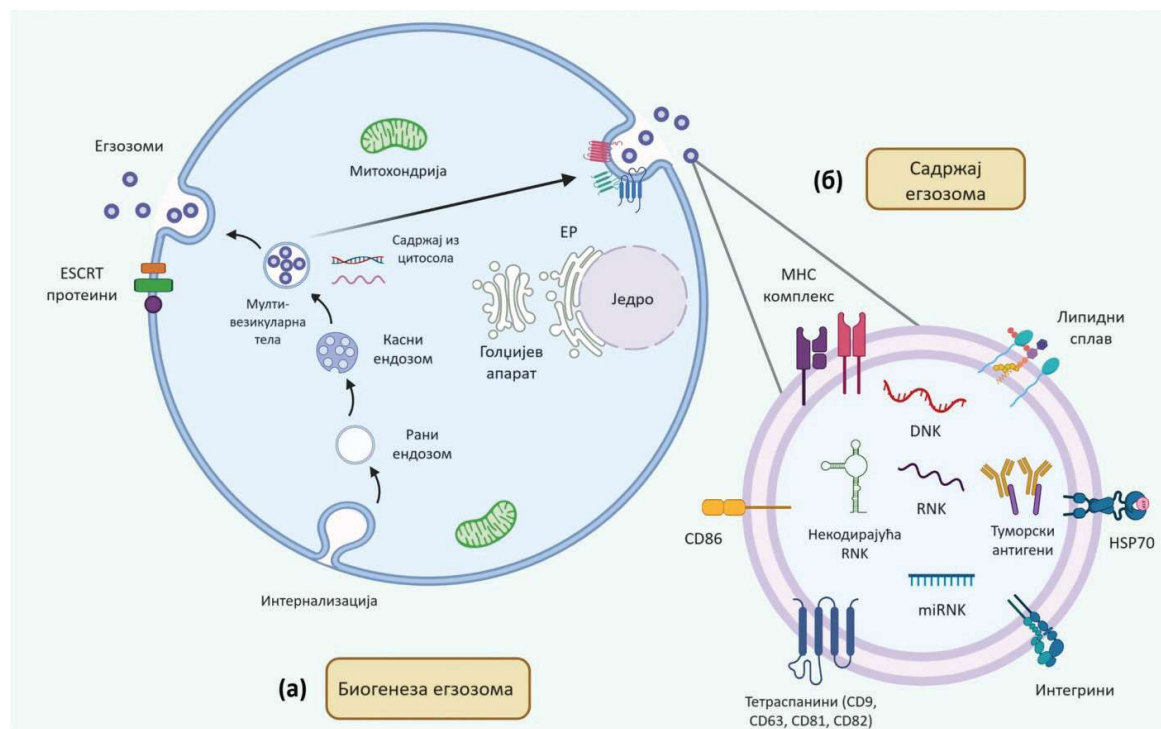
Са друге стране, NGS технологије служе за паралелну анализу милиона кратких секвенци које се пореде са неком постојећом, а могу и да се склапају *de novo*, без ослањања на референтни геном. Постоји неколико метода које се користе за анализирање специфичних секвенци: енгл. *tagged-amplicon deep sequencing* (TAm-seq), *safe-sequencing system* (Safe-SeqS) и *Cancer personalized profiling by deep sequencing* (CAPPSeq), а једна од најчешће коришћених је Ion-AmpliSeq (Soda et al., 2022). Поред поменутих техника, користе се и други приступи који подразумевају нетаргетовано секвенцирање целог генома или егзома за добијање информација о броју CNA или неспецифичних тачкастих мутација, у циљу детекције промена које се дешавају у току или након терапије (Fernández-Lázaro et al., 2020).

Методe нетаргетованог секвенцирања још могу да се односе и на испитивање профила метилације специ-

фичног региона или целог генома ДНК. Методе користе конверзију бисулфитом и повећање метилације ctDNA, након чега следе амплификације фрагмената неком од техника заснованим на PCR: PCR специфичан за метилацију (енгл. *methylation specific PCR* – MSP), квантитативни мултиплексни PCR специфичан за метилацију (енгл. *quantitative multiplexed methylation-specific PCR* – QM-PCR) и модификовани PCR – метилација на куглицама (енгл. *methylation on beads* – MOB) (Marrugo-Ramírez et al., 2018).

ЕКСТРАЦЕЛУЛАРНЕ ВЕЗИКУЛЕ – ЕГЗОЗОМИ

Егзозоми се дефинишу као мале везикуле обавијене мембраном које ћелије отпуштају као средство комуникације, односно транспорта важних протеина и нуклеинских киселина (Marrugo-Ramírez et al., 2018). Скоро сви типови ћелија отпуштају егзозоме, као подврсту екстрацелуларних везикула, у ванћелијски простор (Soda et al., 2022), а туморске ћелије у много већој мери. Овако настали егзозоми се могу детектовати у различитим телесним течностима (Fernández-Lázaro et al., 2020). Инвагинацијом ћелијске мембране долази до стварања примарних ендозомалних везикула, у оквиру којих се формирају егзозоми, а затим се ослобађају у ванћелијски простор (Слика 2) (Marrugo-Ramírez et al., 2018; Fernández-Lázaro et al., 2020; Soda et al., 2022). Пречника



Слика 2. Биогенеза и састав екстрацелуларних везикула.

а) Приказана је синтеза EV која започиње инвагинацијом ћелијске мембране, као и транспорт који је зависан или независан од ендозомалног сортирајућег комплекса потребног за транспорт (енгл. *endosomal sorting complex required for transport* – ESCRT). Рани ендозоми преузимају садржај из цитоплазме – РНК, ДНК и протеине. Затим се мултивезикуларна тела са својим разноврсним ћелијским садржајем спајају са ћелијском мембраном у циљу ослобађања EV. Одређени антигени се додају на EV у процесу ослобађања из ћелије. б) На шеми је приказан и састав EV. За приказане маркере на површини или у унутрашњости везикула се испитује применљивост у карактеризацији тумора. (Модификовано према Lone et al., 2022)

су од 40 – 150 nm, а садрже цитоскелетне, трансмембранске и протеине топлотног шока, липиде, ензиме као што су GAPDH, PGK1, АТР-аза, и нуклеинске киселине: иРНК, miRNA и ДНК.

Егзозоми учествују у интрацелуларним сигналним путевима, утичући на експресију гена и фенотип ћелија до којих пристижу. Прва улога егзозома је откривена 1996. године, а утврђено је да секретовани од стране Б лимфоцита, егзозоми доводе до специфичне активације CD4+ Т лимфоцита (Raposo et al., 1996). Садржај егзозома зависи од ћелија ткива из којих су секретовани, што значи да уколико их секретују туморске ћелије, указују на стање и природу тумора (Fernández-Lázaro et al., 2020), због чега би могли имати улогу у дијагностици и праћењу болести. Ова област је тренутно изузетно актуелна и нова сазнања се свакодневно могу наћи у научној литератури.

Изолација EV

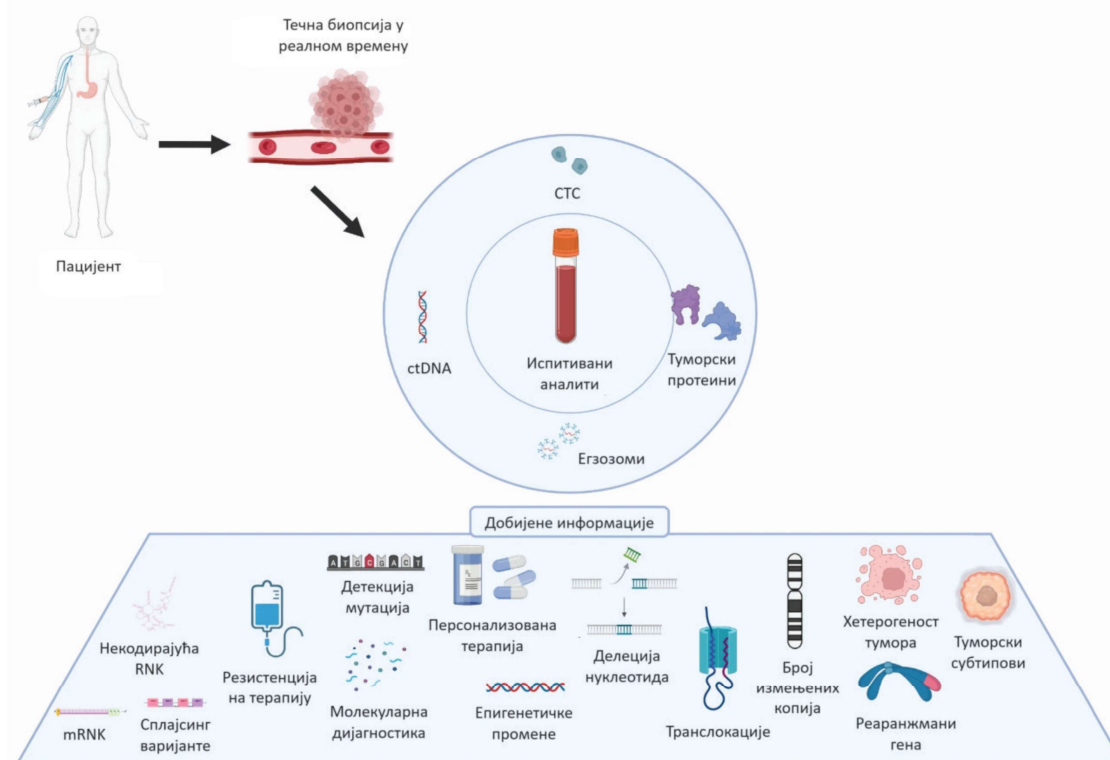
Постоји више техника изолација екстрацелуларних везикула које се заснивају на њиховим физичким карактеристикама, од којих је ултрацентрифугирање најпознатија и најчешће коришћена, потом ултрафилтрација и хроматографске методе (Lone et al., 2022). Друге врсте метода користе одређене имуноафинитетне интеракције за изолацију егзозома у односу на експресионе маркере на њиховим површинама. Пример методе су ELISA тестови, а један такав есеј са микроплејтом за изолацију и квантификацију егзозома из урина, плазме или серума, развили су Заровни (Zarovni) и сарадници (Zarovni et al., 2015). Ове методе, иако доста специфич-

не и ефикасне, релативно су скупе и потребна су њихова унапређења (Soda et al., 2022). Пример развијене методе је ExoChir, који су развили Канвар (Kanwar) и сарадници, а у питању је микрофлуидни уређај прављен на полидиметилсилоксану (PDMS) са антителима против CD63 (Kanwar et al., 2014).

Постоји још неколико приступа изолације егзозома заснованих на различитим принципима: гел-филтрациона хроматографија – комплекти произвођача iZON (<https://www.izon.com/>), и 101Bio (<https://www.101bio.com/>); преципитација: ExoQuick PLUS (System Biosciences, <https://www.systembio.com/>); ултрафилтрација ExoMir™ (Bioo Scientific, <http://www.biooscientific.com>) и други. Упркос свом великом потенцијалу у дијагностици и праћењу развоја малигних болести, примена EV у клиничке сврхе је ограничена због тешкоћа у ефикасности изолације и добијању недовољно високих приноса неоштећених EV, неопходних за дијагностику (Lone et al., 2022).

ПРИМЕНА У ДИЈАГНОСТИЦИ И НАУЧНИМ ИСТРАЖИВАЊИМА

Течна биопсија је нашла своје место у клиничкој пракси, али је и даље више заступљена у научним истраживањима. На Слици 3. су приказани најчешћи аналити који се испитују из узорак течне биопсије, као и њихова примена, док ће у даљем тексту бити описани резултати најважнијих истраживања о применљивости четири описана биомаркера у будућој клиничкој пракси, као и већ успостављеним применама у клиничкој онкологији.



Слика 3. Испитивани аналити течне биопсије и њихова примена у дијагностици, праћењу и лечењу карцинома (Модификовано према Lone et al., 2022)

СТС су у бројним студијама показале свој потенцијал да се користе у праћењу одговора на терапију и прогнозу при раној дијагнози болести. Након изолације могућа је генетичка анализа нуклеинских киселина чак и појединачних ћелија, а као алат за предикцију могао би се користити и број детектованих ћелија (Soda et al., 2022). Методе изоловања, детекције и квантификације се стално унапређују да би се ови биомаркери могли користити у клиничком окружењу за дијагностиковање и праћење различитих врста тумора. ctDNA из течне биопсије се испитује у сврху дијагностиковања, прогнозирања и асистенције при лечењу канцера, и то у реалном времену, због могућности генотипизације којом се стиче слика целокупног тумора (Fernández-Lázaro et al., 2020). Због својих структурних карактеристика и заступљености разних маркера, егзозоми су у студијама показали потенцијал за примену у дијагностици и праћењу одговора на терапију у будућности (Lone et al., 2022; Soda et al., 2022).

Рана детекција болести

Рана детекција малигних болести повећава успешност лечења и даје бољи исход, јер терапија у ранијим стадијумима умногоме повећава шансу за дугорочну ремисију. Од поменутих циркулишућих биомаркера, врло често се детектују и анализирају cfDNA, екстрацелуларне везикуле и метилација ДНК (Nikanjam et al., 2022).

CancerSEEK есеј је један од примера успешне примене анализе cfDNA, односно детекције генетичких варијација као потенцијалних биомаркера ране болести. Овај есеј је био коришћен за детекцију неметастатског рака јајника, јетре, желуца, панкреаса или једњака анализом cfDNA, сензитивност је износила од 69 до 98 %, а специфичност преко 99 %. CancerSEEK истовремено испитује генетичке варијације и 8 протеинских маркера, те на тај начин детектује присуство и локацију тумора у раним стадијумима (Cohen et al., 2018). Такође је показано да стопа фрагментације cfDNA може бити индикатор присуства болести у комбинацији са другим маркерима, што је доказано у студијама о карциному плућа (Cristiano et al., 2019; Mathios et al., 2021).

Што се тиче других циркулишућих нуклеинских киселина, развијен је miR-Test за скрининг значајних циркулишућих miRNA из узорак течне биопсије које указују на постојање карцинома плућа код високо ризичних особа. Детекција се показала бољом него у случају употребе само нискодозног СТ (енгл. *computed tomography*) скенера који је метода избора за скрининг карцинома плућа (Montani et al., 2015). Дизајнирани су и тестови за изоловање и испитивање егзозома који садрже специфичне маркере, ради лакше употребе ових биомаркера у детекцији карцинома: ExoScreen препознаје маркере канцера колоректума, ExoTest служи за детекцију калвеолина-1 и CD63 код меланома, као и ExoQuick® (System Biosciences, <https://www.systembio.com/>) за изолацију miRNA, које би се користили као маркери карцинома панкреаса (Yoshioka et al., 2014; Jia et al., 2017; Junqueira-Neto et al., 2019). Поред тога, Хинестроса (Hinestrosa) и сарадници су испитивали маркере изолованих екстра-

целуларних везикула у циљу ране детекције карцинома панкреаса, јајника и бешике, а стопе детекције за први стадијум износиле су респективно 95 %, 74 % и 44 % (Hinestrosa et al., 2022).

Лиу (Liu) и сарадници су дошли до закључка да је за циљано испитивање метилације cfDNA у случају узнапредовалог колоректалног карцинома, неситноћелијског карцинома плућа, меланома и карцинома дојке, тачност резултата забележена у 83,8 %, специфичност је била 100 %, а у 78,9 % случајева је одређен тип болести (Liu et al., 2018). Значај у детекцији карцинома има и повећана метилација у тумор-супресорским генима. Један од примера одобрених тестова за рану детекцију карцинома је скрининг тест за колоректални карцином, при чему се детектује абнормална стопа метилације *SEPTIN9* гена из крви (Lamb & Dhillon, 2017). Такође је развијен дијагностички маркер специфичне метилације у хепатоцелуларном карциному, а панел је показао већу осетљивост и специфичност од маркера алфа фетопротеина (Xu et al., 2017).

Дијагноза и прогноза болести

Прецизна дијагноза болести последично доводи до примене бољег плана лечења, као и процене узнапредовалости и ризика поновног појављивања болести који дефинишу адекватну прогнозу.

Анализом укупне cfDNA трага се за ctDNA која може дати информације корисне за прецизније постављање дијагнозе болести. Генетички и епигенетички профил ctDNA из крви значајно се подудара са оним из ткива из којег потиче, па је могуће користити течну биопсију као алтернативно дијагностичко средство када није доступан узорак ткивне биопсије (Martins et al., 2021). Генотипизација биомаркера би се такође, могла користити за дијагностику, до чега би се дошло на основу резултата анализа и испитивања протеина и нуклеинских киселина из EV. Бројни примери су откривени анализирањем и испитивањем протеина и нуклеинских киселина из EV. Тако повећана експресија глипикана-1, заједно са мутацијом у гену *KRAS* би могла имати улогу у дијагностици тумора панкреаса (Melo et al., 2022), док присуство EV богатих миграционим инхибиторним фактором потенцијално указује на метастазе на јетри (Costa-Silva et al., 2015). Подједнако се могу испитивати и одређене miRNA: повећана експресија miR-1246, miR-4644, miR-3976 и miR-4306 у EV добри су биомаркери за дијагностику карцинома панкреаса (Madhavan et al., 2015), а miR-23b-3p, miR-10b-5p и miR-21-5p би исто тако могли бити значајни биомаркери за неситноћелијски карцином плућа (енгл. *non-small cell lung cancer* – NSCLC) (Q. Liu et al., 2017).

Иначе, сматра се да ниво ctDNA није довољан прогностички маркер. Са друге стране, број СТС пре неoadјувантне терапије или у време хируршког захвата директно корелише са прогнозом болести, што потврђује да СТС осликавају капацитет тумора да се шири. На пример, у студијама о карциному дојке је показано да се одређивањем броја СТС може препознати група пацијента која има висок ризик да дође до релапса болести. Ове и друге бројне студије су доказале и да су прогно-

тички потенцијал СТС и одговор на терапију независни, односно да одвојене СТС не морају да реагују исто као и ћелије примарног тумора. Да би се боље проценила поузданост ових маркера за прогнозирање неопходне су додатне студије (Alix-Panabières & Pantel, 2021).

Детекција релапса болести

Садашња пракса праћења релапса болести након операције ослања се на клиничке и патолошке факторе. С обзиром на то да не постоји поуздана метода за детекцију минималне резидуалне болести (МРД) и релапса, тренутна препорука је да већина пацијената прима неки вид адјувантне терапије, од које ће релативно мали број пацијената имати бенефит. Развој нових биомаркера за детекцију МРД после хируршке интервенције или радиотерапије значајно би допринео идентификацији група пацијената са већим и мањим ризиком од појаве релапса, где би се група пацијената са повишеним ризиком подвргла даљем терапијском третману или учесталијим контролама, док би пацијенти са малим ризиком за релапс били потенцијално поштеђени непотребног третмана, уз адекватно клиничко праћење (Beaver et al., 2014).

Обећава чињеница да су одређена испитивања показала да би СТС и ctDNA могли бити коришћени за детекцију релапса пре појаве клиничких симптома и потврде добијене тзв. имидинг методама медицинске дијагностике. У више студија показано је да детекција ctDNA након радиотерапије или хируршког уклањања тумора може да укаже на микрометастазе и висок ризик од релапса, што би помогло у одабиру пацијената код којих би било пожељно увести и адјувантну терапију (Marrugo-Ramírez et al., 2018).

Једна студија је показала да појава СТС 2 до 5 година након примања терапије за карцином дојке корелише са високим ризиком релапса болести. Осим тога, вишеструко периодично анализирање узорака, при чему се пореди количина овог маркера, такође би могла указати на агресивност тумора, односно присуство минималне резидуалне болести (Chaudhuri et al., 2017; Haselmann et al., 2018).

Истраживања су показала да се и ИРНК може испитивати у сврхе детекције резидуалне болести, односно да нивои одређене ИРНК указују на резидуални тумор код плућних неуроендокриних тумора (Malczewska et al., 2019), односно miRNA у узорцима оболелих од хепатоцелуларног карцинома (Okajima et al., 2016) и карцинома плућа (Sestini et al., 2015).

Поменути подаци указују на то да је течна биопсија корисна у праћењу резидуалне болести, а различитим анализама циркулишућих биомаркера као додатних средстава уз постојеће технике за праћење тумора повећава се шанса за рану детекцију релапса.

Избор циљане терапије и детекција механизма резистенције

Течна биопсија има велику предност због једноставности чешћег и прецизнијег праћења разних догађаја који се дешавају у току терапије. У наредном тексту биће описана важна открића, као и већ успостављене

клиничке праксе анализе течне биопсије у сврху одлучивања о избору терапије, предвиђању или праћењу одговора на њу, као и детекције механизма резистенције који се појављују.

Избор терапије

Иако је актуелна клиничка примена бројања и анализе СТС ограничена, потенцијал за њихову примену је велики због мноштва информација које пружају и различитог порекла, односно субпопулација СТС. Доказана је клиничка употребљивост броја СТС као податка који помаже у избору између хемотерапије и хормонске терапије у случају метастатског карцинома дојке позитивног на хормонски рецептор (HR, енгл. *hormone receptor*) и негативног на HER2 (енгл. *receptor tyrosine-protein kinase erbB-2*) (Bidard et al., 2021). Додатно, код карцинома простате, пацијенти код којих се детектује резистенција на хормонску терапију, односно формира тзв. тумор простате резистентан на кастрацију, уводе се лекови нове генерације, чије су мете андрогени рецептори. Међутим, може доћи до резистенције и на ове лекове, што се може детектовати одређивањем ARv7 сплајсоване варијанте имуноцитохемијским одређивањем експресије у нуклеусу СТС ћелија (Scher et al., 2017). Промене у ARv7 указују на потенцијалну резистенцију на блокаторе андрогених рецептора ензалутамида или абиратерона, односно установљено је да је бољи одговор на терапију цитостатиком таксаном (Antonarakis et al., 2015). У случају карцинома панкреаса, анализа СТС би могла служити приликом избора пацијената који би примали циљану анти-PSMA (енгл. *prostate-specific membrane antigen*) терапију, односно праћење одговора на њу. PSMA је један је од маркера канцера простате због његове високе експресије у малигним ћелијама, међутим, сматра се да одређени број метастатских ћелија карцинома не експримира овај маркер, због чега долази до резистенције (Nikanjam et al., 2022).

Детекција механизма резистенције на терапију

Једна од најзначајнијих примена течне биопсије је у праћењу прогресије болести и одговора на терапију. Редовном анализом и праћењем у реалном времену, разјашњавају се механизми стварања резистенције, а анализом ctDNA се откривају мутације у генима који доводе до резистенције на терапију (Soda et al., 2022). Мутације у *ESR1* гену указују на резистенцију ER (енгл. *estrogen receptor*) позитивног карцинома дојке на ендокрину терапију. Откривањем резистенције на време може се брже донети одлука о благовременој промени терапије и спречавању ширења тумора. На пример, пацијенту може бити преписана терапија инхибиторима CDK4/6, чија резистенција се детектује појавом мутација у *PI3K* гену (O'Leary et al., 2018). Даље, присуство мутација *KRAS* се истражује код пацијената оболелих од колоректалног карцинома, што је узрок резистенције на EGFR инхибиторе (Bettegowda et al., 2014). Још један пример је детекција мутација у гену *EGFR*, које указују на резистенцију на терапију тирозин-киназним инхибиторима код пацијената оболелих од NSCLC. Детектоване су и ретке мутације у *ROS1* или транслокације у *ALK* генима, које такође омогућавају увођење персонализоване терапије

код оболелих од те болести (Berger et al., 2018). Даље, резистенција на трастузумаб код HER2 позитивног метастатског канцера желуца, детектује се на основу промена у *ERBB2* гену (Wang et al., 2019). Квантитативна анализа мутације *BRAF*^{V600} у плазми, користи се као средство за праћење тока терапије, предикцију одговора и детекцију резистенције, приликом лечења пацијената оболелих од меланома BRAF/MEK инхибиторима (Ascierto et al., 2013; Santiago-Walker et al., 2016).

Праћење и предвиђање одговора на терапију

Познато је да се у току терапије одвија еволуција тумора, а управо је течна биопсија алат којим би се потенцијално пратиле промене услед терапије, или чак предвиђало на који начин ће пацијент одговорити на њу.

У циљу предикције одговора на хормонску терапију код пацијената са ER позитивним метастатским карциномом дојке, Паолети (Paoletti) и сарадници су развили вишепараметарски CTC-Endocrine Therapy Index (CTC-ETI) који користи CellSearch® систем, а поред бројања користи и детекцију четири маркера на CTC: ER, BCL2, HER2 и Ki-67 (Paoletti et al., 2015). Анализом података овим алатом долази се до закључака који показују постојање ER-негативних CTC у циркулацији, поред дијагностификованог примарног ER-позитивног карцинома дојке, чиме се сматра да је то механизам метастазирања, односно разлог неуспешности хормонске терапије (Babayan et al., 2013). У току су испитивања клиничке употребљивости овог алата.

У случају анализе miRNA код одређивања ефикасности терапије, смањена експресија miR-125b-5p се повезује са бољим одговором на имунотерапију (Peng et al., 2020), док се код NSCLC повећан ниво miR-146a-5p повезује са бољом осетљивошћу тумора на хемиотерапију (Yuwen et al., 2017), а повећана експресија miR-211-5p код меланома се повезује са резистенцијом на BRAF инхибиторе коришћене у лечењу метастатског меланома (Lunavat et al., 2017).

Имунотерапијски приступи се базирају на активацији имунског система, циљањем инхибитора контролних тачака (енгл. *Immune checkpoint inhibitors* - ICI). CtDNA и CTC су испитиване као средство праћења одговора на ову врсту терапије. Неке од студија су спровели Риђути (Ricciuti) и сарадници, испитивањем промене нивоа ctDNA код оболелих од NSCLC, у покушају да предвиде одговор на терапију. Мерени су нивои ctDNA на почетку и на контролом прегледу, код пацијената који су примали пембролизумаб са или без хемиотерапије базиране на платини/пеметрекседу. Резултати студија су показали да је пад нивоа ctDNA указивао на много боље одговор на терапију, дужи период без прогресије и дуже преживљавање, наспрот пацијентима код којих је забележен пораст овог биомаркера (Ricciuti et al., 2021). Слични резултати су добијени испитивањем везе између нивоа ctDNA и одговором на терапију антителима против PD-1 (енгл. *programmed cell death protein 1*), код пацијената оболелих од метастатског меланома (Lee et al., 2018). Такође, Занг (Zang) и сарадници су одређивали фреквенцију варијанте алела код пацијената, пре и у

току терапије дурвалумабом са или без тремелидумаба. Виши ниво је корелисао са лошијим опоравком и нижом стопом преживљавања, док је пад истих након терапије указивао на супротно (Zhang et al., 2020). Ове и још неке студије говоре о корисности динамичког праћења cfDNA/ctDNA да се предвиди одговор на терапију уз дијагностичке имидинг методе.

Одређеним анализама cfDNA такође би било могуће предвидети одговор на имунотерапију. NGS методама су мерене TMB (енгл. *tumor mutational burden*) из узорака ткива тумора и MSI-H (енгл. *microsatellite instability high*), а то је вршено и испитивањем ctDNA из крви (Nikanjam et al., 2022). Гандера (Gandera) и сарадници су установили да се TMB поклапа у ткивима и ctDNA из крви код оболелих од NSCLC, као и да су анализом ctDNA могли да установе који пацијенти би били погодни за примање PD-L1 (енг. *programmed death-ligand 1*) антитела (атезолизумаба) као секундарне терапије (Gandera et al., 2018).

УПОТРЕБА ТЕЧНЕ БИОПСИЈЕ У ОНКОЛОШКОЈ ПРАКСИ У СРБИЈИ

У претходном тексту описане су неке од најважнијих клиничких примена и резултата истраживања у вези употребе течне биопсије у онколошкој дијагностици и научним испитивањима у свету. У Србији, на Институту за онкологију и радиологију Србије (ИОРС), на одељењу за Експерименталну онкологију, течна биопсија је такође нашла примену у молекуларној дијагностици и научним истраживањима.

У сврху молекуларног профилисања тумора најчешће се користи узорак ткивне биопсије. У циљу персонализованог лечења пацијената, од 2008. године испитују се мутације у *RAS* генима у метастатском карциному дебелог црева, као и најчешће мутације у гену *EGFR* код пацијената оболелих од карцинома плућа и мутације у *BRAF* гену у метастатском меланому. Такође, из узорака крви су анализирани полиморфизми неких гена који кодирају одређене ензиме, што је коришћено за предикцију токсичности одређених лекова: ензима CYP2D6 за предострожност увођењу тамоксифена у терапију против карцинома дојке, односно дихидропиридин-дехидрогеназе пре терапије 5-флуороурацилом, као и метилентетрахидрофолат редуктазе у лечењу метотрекатом (Cavic et al., 2016).

Течна биопсија је први пут уведена 2016. године за детекцију мутација у гену *EGFR* из крви код пацијената оболелих од карцинома плућа (Cavic et al., 2021). Такође, на ИОРС се користи и плеурални излив (ПИ) као узорак течне биопсије. ПИ представља компликацију код пацијената са карциномом плућа и јавља се код 7 до 23 % пацијената (Froudarakis, 2012). Обично се пунктира ради уклањања симптома отежаног дисања. У већем броју научних истраживања је показано да је ПИ богат извор циркулишућих нуклеинских киселина, па је због тога и генетичко тестирање на присуство резистентне *EGFR* T790M мутације из cfDNA пореклом из ПИ пацијената уведено као рутинско тестирање само на ИОРС. Показано је да анализе из ПИ имају готово подједнаку, а у неким случајевима и бољу сензитивност детекције те

мутације у односу на тестирање из узорак крви (Табела 1) (Vukovic et al., 2023). Од 2018. године се на ИОРС из течне биопсије (узорак крви) врши NGS генетичко тестирање на присуство наследног неполипозног колоректалног карцинома, познатијег као Линчов синдром, код особа оболелих од колоректалног карцинома или карцинома ендометријума у раном животном добу и/или особа са богатом породичном историјом карцинома из Линчовог синдрома (Cavic et al., 2024).

Табела 1. Детекција *EGFR* T790M мутације у упареним узорцима течне биопсије пацијената код којих је установљена клиничка резистенција на *EGFR* тирозин-киназне инхибиторе (крв и плеурални излив). (Презето из Vukovic et al., 2023, модификовано).

Крв	Плеурални излив	
	<i>EGFR</i> T790M позитивни	<i>EGFR</i> T790M негативни
<i>EGFR</i> T790M позитивни	4	0
<i>EGFR</i> T790M негативни	6	10

Значај здравствено-економских анализа

Иако постоји потенцијал примене и других дијагностичких тестова из течне биопсије, процес укључивања нове технологије или терапије у свакодневну клиничку праксу је често дуг и компликован. Иза сваке интеграције нове врсте терапије или технологије, а након њеног пуштања на тржиште, стоје економски и финансијски аспекти који омогућавају правдање њене корисности, добити друштва и одрживости у клиничком окружењу. Због ограничености средстава за финансирање иновативних технологија или терапија у здравственом систему, постоје методе помоћу којих се изводе процене вредности, односно клиничке ефикасности и исплативости датих технологија у циљу одабира оне која ће бити финансирана. За сваку тзв. процену здравствене технологије – терапију, дијагностичку процедуру и слично, потребно је прикупити информације из адекватно дизајнираних и спроведених студија које су у вези са тим технологијама. Након тога, потребна је адекватна анализа прикупљених информација (енгл. *Health Technology Assessment - HTA*), а затим и њихово стављање у национални контекст, да би се добиле што реалније, тачније и транспарентније процене применљивости у свакој земљи. Стручњаци који учествују у проценама здравствених технологија, на основу тога саветују доносиоце одлука да нове технологије учине доступним што већем броју пацијената, уз најмању штету по друге процесе и националне потребе у здравственом систему. Државе које имају државно здравствено осигурање ослањају се на државне органе који праве ове здравствено-економске процене на основу којих се даје препорука о томе које интервенције могу да буду усвојене у наредном периоду (Pearson & Rawlins, 2005; Grusenmeyer & Wong, 2007). Важно је напоменути да постоје различити приступи проценама здравствених технологија, који

различно дефинишу вредност и да се процене врше, а одлуке доносе, у зависности од опредељења здравственог система државе или неког другог доносиоца одлуке (<https://www.janssenwithme.rs/lt-sr-sp/advocacy-center/vazne-informacije/zdravstvena-ekonomija/pristupi-proceni-zdravstvenih-tehnologija-hta>). У Србији, за увођење нове здравствене технологије, здравствена установа или произвођач упућују захтев уз који се прилаже документација, административна и здравствено-економска, коју између осталог чине поменути подаци о делотворности из клиничких студија и економска анализа примене нове технологије. Процену здравствене технологије и давање мишљења о процени врши Завод за јавно здравље, а министар здравља на основу процене одлучује да ли ће захтев за увођење нове здравствене технологије бити прихваћен или одбијен (<https://www.zdravlje.gov.rs/tekst/350554/pravilnik-o-blizim-uslovima-i-nacinu-vrsenja-procene-zdravstvenih-tehnologija.php>).

ПРЕДНОСТИ И МАНЕ ТЕЧНЕ БИОПСИЈЕ

Поред потенцијалних и већ успостављених примена течне биопсије у онкологији, постоји велики број недостатака који отежавају употребу течне биопсије у клиничкој пракси. Низак број CTC отежава детекцију, а ниска концентрација и честа фрагментација cfDNA отежава изолацију и анализу. Због немогућности директне анализе, потребна су додатна пречишћавања или амплификације које захтевају више времена. Проблем такође представља и хетерогеност узорак, као и несигурност да су ћелије свих хетерогених делова тумора обухваћене (Siravegna et al., 2017). Додатни изазови техничке природе су одабир и припрема узорка, а с тим у вези и поређење резултата добијених различитим методама квантификације (Soda et al., 2022). Сви ови недостаци праћени су и тренутно високом ценом већине постојећих метода, што отежава примену у свакодневной онколошкој пракси, нарочито у земљама са ограниченим финансијским ресурсима.

Ипак, тачна биопсија је минимално инвазивна, једноставна и релативно поуздана за детекцију и праћење болести, а информације које се добијају анализом циркулишућих биомаркера су бројне (Soda et al., 2022). У даљем развоју метода које би пронашле примену у клиничкој онкологији, потребно је обратити пажњу на стандардизацију преаналитичких и аналитичких метода и протокола, а потом и на начине интерпретирања резултата (Hodson, 2016).

ЗАКЉУЧАК

Тачна биопсија је моћно средство које омогућава анализирање различитих елемената туморског порекла из крви и других телесних течности, а даје бројне и комплементарне информације о примарном тумору и метастазама. Могућност ажурирања података о тумору сваком следећом течном биопсијом на релативно лагодан начин, олакшава детекцију и праћење еволуције целокупног тумора. Једноставност и минимална инвазивност течне биопсије у поређењу са биопсијом ткива,

такође је допринело интензивном испитивању могућих примена у клиничкој онкологији. Анализа cfDNA је пронашла примену у праћењу појаве резистенције на терапију, док употреба EV за сада остаје предмет научних истраживања. За имплементацију течне биопсије у рутинску клиничку праксу, потребна је оптимизација и стандардизација у свим деловима процеса анализирања биомаркера, као и даље испитивање клиничке валидности и корисности у великим клиничким студијама. О потенцијалу за њихову широку примену сведоче позитивни резултати бројних истраживања, који указују на то ће течна биопсија имати своје шире рутинско место у клиничкој онкологији у веома блиској будућности.

ЗАХВАЛНИЦА

Овај рад је проистекао из истраживања у оквиру пројеката STEPUIORS, Horizon Europe Framework Programme (HORIZON-WIDERA-2021-ACCESS-03, STEPUIORS - 101079217) и EXPAND-EV, Horizon Europe Framework Programme (HORIZON-MSCA-2023-SE-01, EXPAND-EV - 101182851) уз подршку Министарства науке, технолошког развоја и иновација Републике Србије (бр. уговора 451-03-136/2025-03/ 200043).

Abstract

LIQUID BIOPSY APPLICATION IN CANCER DIAGNOSTICS AND SCIENTIFIC RESEARCH

Teodora ĆATO, Miodrag VUKOVIĆ, Milena ČAVIĆ, Institute for Oncology and Radiology of Serbia, Belgrade

In recent years, liquid biopsy has been studied as an alternative to invasive tissue biopsy, while its use in complementary analysis of tumor is slowly finding its way into the clinical workflow. A variety of biomarkers from different liquid biopsy samples, such as blood, urine, saliva, pleural effusion and cerebrospinal fluid, are extracted and analysed for their molecular characteristics. Some of those biomarkers include circulating tumor cells, circulating free nucleic acids and extracellular vesicles. Liquid biopsy enables obtaining information regarding tumor's origin, structure and evolution mechanisms, in a relatively easy, minimally invasive and low-cost manner. Modern methods for detection and analysis of liquid biopsy biomarkers enabled intensified research and their use in tumor monitoring throughout all stages of disease as well as treatment. Promising results highlight the future use in clinical oncology for early detection and disease relapse, diagnosis, prognosis, search for novel therapeutic targets and mechanisms of resistance to treatment. This review provided an overview of the most frequently analysed liquid biopsy biomarkers and the most important results regarding their global clinical application and in Serbia.

Keywords: biomarker, liquid biopsy, circulating free DNA, extracellular vesicles, circulating tumor cells

ЛИТЕРАТУРА

- Alix-Panabières, C., & Pantel, K. (2021). Liquid biopsy: From discovery to clinical application. *Cancer Discovery*, 11 (4). <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-20-1311>
- Antonarakis, E. S., Lu, C., Luber, B., Wang, H. Y., Nakazawa, M., Nadal, R., Paller, C. J., Denmeade, S. R., Carducci, M. A., Eisenberger, M. A., & Luo, J. (2015). Androgen receptor splice variant 7 and efficacy of taxane chemotherapy in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer. *JAMA Oncology*, 1 (5). <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2015.1341>
- Ascierto, P. A., Minor, D., Ribas, A., Lebbe, C., O'Hagan, A., Arya, N., Guckert, M., Schadendorf, D., Kefford, R. F., Grob, J. J., Hamid, O., Amaravadi, R., Simeone, E., Wilhelm, T., Kim, K. B., Long, G. V., Martin, A. M., Mazumdar, J., Goodman, V. L., & Trefzer, U. (2013). Phase II trial (BREAK-2) of the BRAF inhibitor dabrafenib (GSK2118436) in patients with metastatic melanoma. *Journal of Clinical Oncology*, 31 (26). <https://doi.org/10.1200/JCO.2013.49.8691>
- Babayan, A., Hannemann, J., Spötter, J., Müller, V., Pantel, K., & Joosse, S. A. (2013). Heterogeneity of Estrogen Receptor Expression in Circulating Tumor Cells from Metastatic Breast Cancer Patients. *PLoS ONE*, 8 (9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075038>
- Beaver, J. A., Jelovac, D., Balukrishna, S., Cochran, R. L., Croessmann, S., Zabransky, D. J., Wong, H. Y., Toro, P. V., Cidado, J., Blair, B. G., Chu, D., Burns, T., Higgins, M. J., Stearns, V., Jacobs, L., Habibi, M., Lange, J., Hurley, P. J., Luring, J., ... Park, B. H. (2014). Detection of cancer DNA in plasma of patients with early-stage breast cancer. *Clinical Cancer Research*, 20 (10). <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-2933>
- Berger, L. A., Janning, M., Velthaus, J. L., Ben-Batalla, I., Schatz, S., Falk, M., Iglaue, P., Simon, R., Cao, R., Forcato, C., Manaresi, N., Bramlett, K., Buson, G., Hanssen, A., Tiemann, M., Sauter, G., Bokemeyer, C., Riethdorf, S., Reck, M., ... Loges, S. (2018). Identification of a High-Level MET Amplification in CTCs and ctDNA of an ALK-Positive NSCLC Patient Developing Evasive Resistance to Crizotinib. *Journal of Thoracic Oncology*, 13 (12). <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2018.08.2025>
- Bettgowda, C., Sausen, M., Leary, R. J., Kinde, I., Wang, Y., Agrawal, N., Bartlett, B. R., Wang, H., Luber, B., Alani, R. M., Antonarakis, E. S., Azad, N. S., Bardelli, A., Brem, H., Cameron, J. L., Lee, C. C., Fecher, L. A., Gallia, G. L., Gibbs, P., ... Diaz, L. A. (2014). Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Science Translational Medicine*, 6 (224). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3007094>
- Bidard, F. C., Jacot, W., Kiavue, N., Dureau, S., Kadi, A., Brain, E., Bachelot, T., Bourgeois, H., Gonçalves, A., Ladoire, S., Naman, H., Dalenc, F., Gligorov, J., Espié, M., Emile, G., Ferrero, J. M., Loirat, D., Frank, S., Cabel, L., ... Pierga, J. Y. (2021). Efficacy of Circulating Tumor Cell Count-Driven vs Clinician-Driven First-line Therapy Choice in Hormone Receptor-Positive, ERBB2-Negative Metastatic Breast Cancer: The STIC CTC Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncology*, 7 (1). <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2020.5660>
- Cavic, M., Krivokuca, A., Boljevic, I., Brotto, K., Jovanovic, K., Tanic, M., Filipovic, L., Zee, M., Malisic, E., Jankovic, R., & Radulovic, S. (2016). Pharmacogenetics in cancer therapy - 8 years of experience at the Institute for Oncol-

- ogy and Radiology of Serbia. *Journal of B.U.ON.*, 21 (5).
- Cavic, M., Krivokuca, A., Pavlovic, M., Boljevic, I., Rakobradovic, J., Mihajlovic, M., Tanic, M., Damjanovic, A., Malisic, E., & Jankovic, R. (2021). EGFR mutation testing from liquid biopsy of non-small cell lung cancer at the Institute for Oncology and Radiology of Serbia. *Journal of B.U.ON.*, 25 (6).
- Cavic, M., Nikolic, N., Marinkovic, M., Damjanovic, A., Krivokuca, A., Tanic, M., ... & Spasic, J. (2024). Two Decades of Progress in Personalized Medicine of Colorectal Cancer in Serbia—Insights from the Institute for Oncology and Radiology of Serbia. *Biomedicines*, 12 (10). <https://doi.org/10.3390/biomedicines12102278>
- Chaudhuri, A. A., Chabon, J. J., Lovejoy, A. F., Newman, A. M., Stehr, H., Azad, T. D., Khodadoust, M. S., Esfahani, M. S., Liu, C. L., Zhou, L., Scherer, F., Kurtz, D. M., Say, C., Carter, J. N., Merriott, D. J., Dudley, J. C., Binkley, M. S., Modlin, L., Padda, S. K., ... Diehn, M. (2017). Early detection of molecular residual disease in localized lung cancer by circulating tumor DNA profiling. *Cancer Discovery*, 7 (12). <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-17-0716>
- Cohen, J. D., Li, L., Wang, Y., Thoburn, C., Afsari, B., Danilova, L., Douville, C., Javed, A. A., Wong, F., Mattox, A., Hruban, R. H., Wolfgang, C. L., Goggins, M. G., Molin, M. D., Wang, T. L., Roden, R., Klein, A. P., Ptak, J., Dobbyn, L., ... Papadopoulos, N. (2018). Detection and localization of surgically resectable cancers with a multi-analyte blood test. *Science*, 359 (6378). <https://doi.org/10.1126/science.aar3247>
- Costa-Silva, B., Aiello, N. M., Ocean, A. J., Singh, S., Zhang, H., Thakur, B. K., Becker, A., Hoshino, A., Mark, M. T., Molina, H., Xiang, J., Zhang, T., Theilen, T. M., Garcia-Santos, G., Williams, C., Ararso, Y., Huang, Y., Rodrigues, G., Shen, T. L., ... Lyden, D. (2015). Pancreatic cancer exosomes initiate pre-metastatic niche formation in the liver. *Nature Cell Biology*, 17 (6). <https://doi.org/10.1038/ncb3169>
- Cristiano, S., Leal, A., Phallen, J., Fiksel, J., Adleff, V., Bruhm, D. C., Jensen, S. Ø., Medina, J. E., Hruban, C., White, J. R., Palsgrove, D. N., Niknafs, N., Anagnostou, V., Forde, P., Naidoo, J., Marrone, K., Brahmer, J., Woodward, B. D., Husain, H., ... Velculescu, V. E. (2019). Genome-wide cell-free DNA fragmentation in patients with cancer. *Nature*, 570 (7761). <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1272-6>
- Fernández-Lázaro, D., Hernández, J. L. G., García, A. C., Martínez, A. C., Mielgo-Ayuso, J., & Cruz-Hernández, J. J. (2020). Liquid biopsy as novel tool in precision medicine: Origins, properties, identification and clinical perspective of cancer's biomarkers. *Diagnostics*, 10 (4). <https://doi.org/10.3390/diagnostics10040215>
- Froudarakis, M. E. (2012). Pleural effusion in lung cancer: More questions than answers. *Respiration*, 83 (5). <https://doi.org/10.1159/000338169>
- Gandara, D. R., Paul, S. M., Kowanetz, M., Schleifman, E., Zou, W., Li, Y., Rittmeyer, A., Fehrenbacher, L., Otto, G., Malboeuf, C., Lieber, D. S., Lipson, D., Silterra, J., Amler, L., Riehl, T., Cummings, C. A., Hegde, P. S., Sandler, A., Ballinger, M., ... Shames, D. S. (2018). Blood-based tumor mutational burden as a predictor of clinical benefit in non-small-cell lung cancer patients treated with atezolizumab. *Nature Medicine*, 24 (9). <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0134-3>
- Grusenmeyer, P. A., & Wong, Y. N. (2007). Interpreting the economic literature in oncology. *Journal of Clinical Oncology*, 25 (2). <https://doi.org/10.1200/JCO.2006.09.0738>
- Haselmann, V., Gebhardt, C., Brechtel, I., Duda, A., Czerwinski, C., Sucker, A., Holland-Letz, T., Utikal, J., Schadendorf, D., & Neumaier, M. (2018). Liquid profiling of circulating tumor DNA in plasma of melanoma patients for companion diagnostics and monitoring of BRAF inhibitor therapy. *Clinical Chemistry*, 64 (5). <https://doi.org/10.1373/clinchem.2017.281543>
- Hinestrosa, J. P., Kurzrock, R., Lewis, J. M., Schork, N. J., Schroeder, G., Kamat, A. M., Lowy, A. M., Eskander, R. N., Perrera, O., Searson, D., Rastegar, K., Hughes, J. R., Ortiz, V., Clark, I., Balcer, H. I., Arakelyan, L., Turner, R., Billings, P. R., Adler, M. J., ... Krishnan, R. (2022). Early-stage multi-cancer detection using an extracellular vesicle protein-based blood test. *Communications Medicine*, 2 (1). <https://doi.org/10.1038/s43856-022-00088-6>
- Hodson, R. (2016) Precision medicine. *Nature*, 537, S49. <https://doi.org/10.1038/537S49a>
<https://www.janssenwithme.rs/lt-sr-sp/advocacy-center/vazne-informacije/zdravstvena-ekonomija/pristupi-proceni-zdravstvenih-tehnologija-hta>
<https://www.zdravlje.gov.rs/tekst/350554/pravilnik-o-blizim-uslovima-i-nacinu-vrsenja-procene-zdravstvenih-tehnologija.php>
- Jia, Y., Chen, Y., Wang, Q., Jayasinghe, U., Luo, X., Wei, Q., Wang, J., Xiong, H., Chen, C., Xu, B., Hu, W., Wang, L., Zhao, W., & Zhou, J. (2017). Exosome: Emerging biomarker in breast cancer. *Oncotarget*, 8 (25). <https://doi.org/10.18632/oncotarget.16684>
- Junca, A., Tachon, G., Evrard, C., Villalva, C., Frouin, E., Karayan-Tapon, L., & Tougeron, D. (2020). Detection of colorectal cancer and advanced adenoma by liquid biopsy (Decalib study): The ddPCR challenge. *Cancers*, 12 (6). <https://doi.org/10.3390/cancers12061482>
- Junqueira-Neto, S., Batista, I. A., Costa, J. L., & Melo, S. A. (2019). Liquid Biopsy beyond Circulating Tumor Cells and Cell-Free DNA. *Acta Cytologica*, 63 (6). <https://doi.org/10.1159/000493969>
- Kanwar, S. S., Dunlay, C. J., Simeone, D. M., & Nagrath, S. (2014). Microfluidic device (ExoChip) for on-chip isolation, quantification and characterization of circulating exosomes. *Lab on a Chip*, 14 (11). <https://doi.org/10.1039/c4lc00136b>
- Lamb, Y. N., & Dhillon, S. (2017). Epi proColon® 2.0 CE: A Blood-Based Screening Test for Colorectal Cancer. *Molecular Diagnosis and Therapy*, 21 (2). <https://doi.org/10.1007/s40291-017-0259-y>
- Li, M., Diehl, F., Dressman, D., Vogelstein, B., & Kinzler, K. W. (2006). BEAMing up for detection and quantification of rare sequence variants. *Nature Methods*, 3 (2). <https://doi.org/10.1038/nmeth850>
- Liu, L., Toung, J. M., Jassowicz, A. F., Vijayaraghavan, R., Kang, H., Zhang, R., Kruglyak, K. M., Huang, H. J., Hinoue, T., Shen, H., Salathia, N. S., Hong, D. S., Naing, A., Subbiah, V., Piha-Paul, S. A., Bibikova, M., Granger, G., Barnes, B., Shen, R., ... Janku, F. (2018). Targeted methylation sequencing of plasma cell-free DNA for cancer detection and classification. *Annals of Oncology*, 29 (6). <https://doi.org/10.1093/annonc/mdy119>

- Liu, Q., Yu, Z., Yuan, S., Xie, W., Li, C., Hu, Z., Xiang, Y., Wu, N., Wu, L., Bai, L., & Li, Y. (2017). Circulating exosomal microRNAs as prognostic biomarkers for non-small-cell lung cancer. *Oncotarget*, 8 (8). <https://doi.org/10.18632/oncotarget.14369>
- Lone, S. N., Nisar, S., Masoodi, T., Singh, M., Rizwan, A., Hashem, S., El-Rifai, W., Bedognetti, D., Batra, S. K., Haris, M., Bhat, A. A., & Macha, M. A. (2022). Liquid biopsy: a step closer to transform diagnosis, prognosis and future of cancer treatments. *Molecular Cancer*, 21 (1). <https://doi.org/10.1186/s12943-022-01543-7>
- Lunavat, T. R., Cheng, L., Einarsdottir, B. O., Bagge, R. O., Muralidharan, S. V., Sharples, R. A., Lässer, C., Gho, Y. S., Hill, A. F., Nilsson, J. A., & Lötvall, J. (2017). BRAFV600 inhibition alters the microRNA cargo in the vesicular secretome of malignant melanoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114 (29). <https://doi.org/10.1073/pnas.1705206114>
- Madhavan, B., Yue, S., Galli, U., Rana, S., Gross, W., Müller, M., Giese, N. A., Kalthoff, H., Becker, T., Büchler, M. W., & Zöller, M. (2015). Combined evaluation of a panel of protein and miRNA serum-exosome biomarkers for pancreatic cancer diagnosis increases sensitivity and specificity. *International Journal of Cancer*, 136 (11). <https://doi.org/10.1002/ijc.29324>
- Malczewska, A., Oberg, K., Bodei, L., Aslanian, H., Lewczuk, A., Filosso, P. L., Wójcik-Giertuga, M., Rydel, M., Zielińska-Leś, I., Walter, A., Suarez, A. L., Kolasińska-Cwikła, A., Roffinella, M., Jamidar, P., Ziora, D., Czyzewski, D., Kos-Kudła, B., & Cwikła, J. (2019). NETest Liquid Biopsy Is Diagnostic of Lung Neuroendocrine Tumors and Identifies Progressive Disease. *Neuroendocrinology*, 108 (3). <https://doi.org/10.1159/000497037>
- Malvezzi, M., Carioli, G., Bertuccio, P., Boffetta, P., Levi, F., La Vecchia, C., & Negri, E. (2017). European cancer mortality predictions for the year 2017, with focus on lung cancer. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology*, 28 (5). <https://doi.org/10.1093/annonc/mdx033>
- Marrugo-Ramírez, J., Mir, M., & Samitier, J. (2018). Blood-based cancer biomarkers in liquid biopsy: A promising non-invasive alternative to tissue biopsy. *International Journal of Molecular Sciences*, 19 (10). <https://doi.org/10.3390/ijms19102877>
- Martins, I., Ribeiro, I. P., Jorge, J., Gonçalves, A. C., Sarmiento-Ribeiro, A. B., Melo, J. B., & Carreira, I. M. (2021). Liquid biopsies: Applications for cancer diagnosis and monitoring. *Genes*, 12 (3). <https://doi.org/10.3390/genes12030349>
- Mathios, D., Johansen, J. S., Cristiano, S., Medina, J. E., Phallen, J., Larsen, K. R., Bruhm, D. C., Niknafs, N., Ferreira, L., Adleff, V., Chiao, J. Y., Leal, A., Noe, M., White, J. R., Arun, A. S., Hruban, C., Annapragada, A. V., Jensen, S. Ø., Ørntoft, M. B. W., ... Velculescu, V. E. (2021). Detection and characterization of lung cancer using cell-free DNA fragmentomes. *Nature Communications*, 12 (1). <https://doi.org/10.1038/s41467-021-24994-w>
- Melo, S. A., Luecke, L. B., Kahlert, C., Fernandez, A. F., Gammon, S. T., Kaye, J., LeBleu, V. S., Mittendorf, E. A., Weitz, J., Rahbari, N., Reissfelder, C., Pilarsky, C., Fraga, M. F., Piwnica-Worms, D., & Kalluri, R. (2022). Author Correction: Glypican-1 identifies cancer exosomes and detects early pancreatic cancer (Nature, (2015), 523, 7559, (177-182), 10.1038/nature14581). *Nature*, 610 (7932). <https://doi.org/10.1038/s41586-022-05062-9>
- Millner, L.M., Linder, M.W., Valdes, R. Jr. Circulating tumor cells: a review of present methods and the need to identify heterogeneous phenotypes. (2013) *Ann Clin Lab Sci*, Summer; 43 (3). PMID: 23884225; PMCID: PMC5060940.
- Montani, F., Marzi, M. J., Dezi, F., Dama, E., Carletti, R. M., Bonizzi, G., Bertolotti, R., Bellomi, M., Rampinelli, C., Maisonneuve, P., Spaggiari, L., Veronesi, G., Nicassio, F., Di Fiore, P. P., & Bianchi, F. (2015). MiR-test: A blood test for lung cancer early detection. *Journal of the National Cancer Institute*, 107 (6). <https://doi.org/10.1093/jnci/djv063>
- Nagrath, S., Sequist, L. V., Maheswaran, S., Bell, D. W., Irimia, D., Utkus, L., Smith, M. R., Kwak, E. L., Digumarthy, S., Muzikansky, A., Ryan, P., Balis, U. J., Tompkins, R. G., Haber, D. A., & Toner, M. (2007). Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology. *Nature*, 450 (7173). <https://doi.org/10.1038/nature06385>
- Nikanjam, M., Kato, S., & Kurzrock, R. (2022). Liquid biopsy: current technology and clinical applications. *Journal of Hematology and Oncology*, 15 (1). <https://doi.org/10.1186/s13045-022-01351-y>
- Okajima, W., Komatsu, S., Ichikawa, D., Miyamae, M., Kawaguchi, T., Hirajima, S., Ohashi, T., Imamura, T., Kiuchi, J., Arita, T., Konishi, H., Shiozaki, A., Moriumura, R., Ikoma, H., Okamoto, K., Taniguchi, H., Itoh, Y., & Otsuji, E. (2016). Circulating microRNA profiles in plasma: Identification of miR-224 as a novel diagnostic biomarker in hepatocellular carcinoma independent of hepatic function. *Oncotarget*, 7 (33). <https://doi.org/10.18632/oncotarget.10781>
- O'Leary, B., Hrebien, S., Morden, J. P., Beaney, M., Fribbens, C., Huang, X., Liu, Y., Bartlett, C. H., Koehler, M., Cristofanilli, M., Garcia-Murillas, I., Bliss, J. M., & Turner, N. C. (2018). Early circulating tumor DNA dynamics and clonal selection with palbociclib and fulvestrant for breast cancer. *Nature Communications*, 9 (1). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03215-x>
- Paoletti, C., Muñoz, M. C., Thomas, D. G., Griffith, K. A., Kidwell, K. M., Tokudome, N., Brown, M. E., Aung, K., Craig Miller, M., Blossom, D. L., Schott, A. F., Lynn Henry, N., Rae, J. M., Connelly, M. C., Chianese, D. A., & Hayes, D. F. (2015). Development of circulating tumor cell-endocrine therapy index in patients with hormone receptor-positive Breast Cancer. *Clinical Cancer Research*, 21 (11). <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-1913>
- Pearson, S. D., & Rawlins, M. D. (2005). Quality, innovation, and value for money: NICE and the British National Health Service. *JAMA*, 294 (20). <https://doi.org/10.1001/jama.294.20.2618>

- Peng, X. X., Yu, R. Y., Wu, X., Wu, S. Y., Pi, C., Chen, Z. H., Zhang, X. C., Gao, C. Y., Shao, Y. W., Liu, L., Wu, Y. L., & Zhou, Q. (2020). Correlation of plasma exosomal microRNAs with the efficacy of immunotherapy in EGFR/ALK wild-type advanced non-small cell lung cancer. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, 8 (1). <https://doi.org/10.1136/jitc-2019-000376>
- Qi, Z. H., Xu, H. X., Zhang, S. R., Xu, J. Z., Li, S., Gao, H. L., Jin, W., Wang, W. Q., Wu, C. T., Ni, Q. X., Yu, X. J., & Liu, L. (2018). The significance of liquid biopsy in pancreatic cancer. *Journal of Cancer*, 9 (18). <https://doi.org/10.7150/jca.24591>
- Raposo, G., Nijman, H. W., Stoorvogel, W., Leijendekker, R., Harding, C. V., Melief, C. J. M., & Geuze, H. J. (1996). B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *Journal of Experimental Medicine*, 183 (3). <https://doi.org/10.1084/jem.183.3.1161>
- Ricciuti, B., Jones, G., Severgnini, M., Alessi, J. V., Recondo, G., Lawrence, M., Forshe, T., Lydon, C., Nishino, M., Cheng, M., & Awad, M. (2021). Early plasma circulating tumor DNA (ctDNA) changes predict response to first-line pembrolizumab-based therapy in non-small cell lung cancer (NSCLC). *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, 9 (3). <https://doi.org/10.1136/jitc-2020-001504>
- Saib, A. E., Saib, L., Psychari, E., Minc, N., Simon, D., Bidard, F. C., Mathiot, C., Pierga, J. Y., Fraissier, V., Salamero, J., Saada, V., Farace, F., Vielh, P., Malaquin, L., & Viovy, J. L. (2010). Microfluidic sorting and multimodal typing of cancer cells in self-assembled magnetic arrays. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107 (33). <https://doi.org/10.1073/pnas.1001515107>
- Santiago-Walker, A., Gagnon, R., Mazumdar, J., Casey, M., Long, G. V., Schadendorf, D., Flaherty, K., Kefford, R., Hauschild, A., Hwu, P., Haney, P., O'Hagan, A., Carver, J., Goodman, V., Legos, J., & Martin, A. M. (2016). Correlation of BRAF Mutation Status in Circulating-Free DNA and Tumor and Association with Clinical Outcome across Four BRAFi and MEKi Clinical Trials. *Clinical Cancer Research*, 22 (3). <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-0321>
- Scher, H. I., Graf, R. P., Schreiber, N. A., McLaughlin, B., Lu, D., Louw, J., Danila, D. C., Dugan, L., Johnson, A., Heller, G., Fleisher, M., & Dittamore, R. (2017). Nuclear-specific AR-V7 Protein Localization is Necessary to Guide Treatment Selection in Metastatic Castration-resistant Prostate Cancer. *European Urology*, 71 (6). <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2016.11.024>
- Sestini, S., Boeri, M., Marchiano, A., Pelosi, G., Galeone, C., Verri, C., Suatoni, P., Sverzellati, N., Vecchia, C. La, Sozzi, G., & Pastorino, U. (2015). Circulating microRNA signature as liquid-biopsy to monitor lung cancer in low-dose computed tomography screening. *Oncotarget*, 6 (32). <https://doi.org/10.18632/oncotarget.5210>
- Siravegna, G., Marsoni, S., Siena, S., & Bardelli, A. (2017). Integrating liquid biopsies into the management of cancer. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 14 (9). <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2017.14>
- Soda, N., Clack, K., & Shiddiky, M. J. A. (2022). Recent advances in liquid biopsy technologies for cancer biomarker detection. *Sensors and Diagnostics*, 1 (3). <https://doi.org/10.1039/d2sd00010e>
- Stott, S. L., Hsu, C. H., Tsukrov, D. I., Yu, M., Miyamoto, D. T., Waltman, B. A., Michael Rothenberg, S., Shah, A. M., Smas, M. E., Korir, G. K., Floyd, F. P., Gilman, A. J., Lord, J. B., Winokur, D., Springer, S., Irimia, D., Nagrath, S., Sequist, L. V., Lee, R. J., ... Toner, M. (2010). Isolation of circulating tumor cells using a microvortex-generating herringbone-chip. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107 (43). <https://doi.org/10.1073/pnas.1012539107>
- Vukovic, M., Tanic, M., Damjanovic, A., Pavlovic, M., Stanojevic, A., Zivic, K., Karadzic, V., Jankovic, R., & Cavic, M. (2023). EGFR mutation testing from pleural effusions of non-small cell lung cancer patients at the institute for oncology and radiology of Serbia. *Translational Oncology*, 37. <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2023.101772>
- Wang, D. S., Liu, Z. X., Lu, Y. X., Bao, H., Wu, X., Zeng, Z. L., Liu, Z., Zhao, Q., He, C. Y., Lu, J. H., Wang, Z. Q., Qiu, M. Z., Wang, F., Wang, F. H., Li, Y. H., Wang, X. N., Xie, D., Jia, W. H., Shao, Y. W., & Xu, R. H. (2019). Liquid biopsies to track trastuzumab resistance in metastatic HER2-positive gastric cancer. *Gut*, 68 (7). <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2018-316522>
- Xu, R. H., Wei, W., Krawczyk, M., Wang, W., Luo, H., Flagg, K., Yi, S., Shi, W., Quan, Q., Li, K., Zheng, L., Zhang, H., Caughey, B. A., Zhao, Q., Hou, J., Zhang, R., Xu, Y., Cai, H., Li, G., ... Zhang, K. (2017). Circulating tumour DNA methylation markers for diagnosis and prognosis of hepatocellular carcinoma. *Nature Materials*, 16 (11). <https://doi.org/10.1038/NMAT4997>
- Yoshioka, Y., Kosaka, N., Konishi, Y., Ohta, H., Okamoto, H., Sonoda, H., Nonaka, R., Yamamoto, H., Ishii, H., Mori, M., Furuta, K., Nakajima, T., Hayashi, H., Sugisaki, H., Higashimoto, H., Kato, T., Takeshita, F., & Ochiya, T. (2014). Ultra-sensitive liquid biopsy of circulating extracellular vesicles using ExoScreen. *Nature Communications*, 5. <https://doi.org/10.1038/ncomms4591>
- Yuwen, D. L., Sheng, B. B., Liu, J., Wenyu, W., & Shu, Y. Q. (2017). MiR-146a-5p level in serum exosomes predicts therapeutic effect of cisplatin in non-small cell lung cancer. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 21 (11). PMID: 28678319.
- Zarovni, N., Corrado, A., Guazzi, P., Zocco, D., Lari, E., Radano, G., Muhhina, J., Fondelli, C., Gavrilova, J., & Chiesi, A. (2015). Integrated isolation and quantitative analysis of exosome shuttled proteins and nucleic acids using immunocapture approaches. *Methods*, 87. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2015.05.028>
- Zhang, Q., Luo, J., Wu, S., Si, H., Gao, C., Xu, W., Abdullah, S. E., Higgs, B. W., Dennis, P. A., van der Heijden, M. S., Segal, N. H., Chaff, J. E., Hembrough, T., Barrett, J. C., & Hellmann, M. D. (2020). Prognostic and predictive impact of circulating tumor dna in patients with advanced cancers treated with immune checkpoint blockade. *Cancer Discovery*, 10 (12). <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-20-0047>