

DROBEK, Dominik, WOJTALA, Kacper, TUREK, Michał, WINIARZ, Aleksandra, SZLENDAK, Paula, TOŚ, Katarzyna, WAŚALA, Katarzyna, GROSMAN, Sylwia, WĘGRZYŃIAK, Agata & WOKURKA, Wojciech. Blood sample as a promising diagnostic tool in oncology - literature review. Journal of Education, Health and Sport. 2023;42(1):11-23. eISSN 2391-8306. DOI <http://dx.doi.org/10.12775/JEHS.2023.42.01.001> <https://apcz.umk.pl/JEHS/article/view/44044> <https://zenodo.org/record/8077367>

The journal has had 40 points in Ministry of Education and Science of Poland parametric evaluation. Annex to the announcement of the Minister of Education and Science of December 21, 2021. No. 32343. Has a Journal's Unique Identifier: 201159. Scientific disciplines assigned: Physical Culture Sciences (Field of Medical sciences and health sciences); Health Sciences (Field of Medical Sciences and Health Sciences). Punkty Ministerialne z 2019 - aktualny rok 40 punktów. Załącznik do komunikatu Ministra Edukacji i Nauki z dnia 21 grudnia 2021 r. Lp. 32343. Posiada Unikatowy Identyfikator Czasopisma: 201159. Przypisane dyscypliny naukowe: Nauki o kulturze fizycznej (Dziedzina nauk medycznych i nauk o zdrowiu); Nauki o zdrowiu (Dziedzina nauk medycznych i nauk o zdrowiu). © The Authors 2023. This article is published with open access at License Open Journal Systems of Nicolaus Copernicus University in Torun, Poland Open Access. This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Noncommercial License which permits any noncommercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author (s) and source are credited. This is an open access article licensed under the terms of the Creative Commons Attribution Non commercial license Share alike. (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0>) which permits unrestricted, non commercial use, distribution and reproduction in any medium, provided the work is properly cited. The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper. Received: 17.05.2023. Revised: 15.06.2023. Accepted: 18.06.2023. Published: 27.06.2023.

Próbka krwi jako obiecujące narzędzie diagnostyczne w onkologii – przegląd literatury

Blood sample as a promising diagnostic tool in oncology - literature review

Dominik Drobek

Medical University of Lublin, Biomedical Sciences Department, Lublin, Poland

<https://orcid.org/0000-0001-6072-2513>

Kacper Wojtala

Independent Public Clinical Hospital No. 1 in Lublin, Poland

<https://orcid.org/0000-0002-3531-4603>

Michał Turek

Independent Public Clinical Hospital No. 4 in Lublin, Poland

<https://orcid.org/0000-0001-9117-517X>

Aleksandra Winiarz

Independent Public Clinical Hospital No. 1 in Lublin, Poland

<https://orcid.org/0000-0002-6994-5796>

Paula Szlendak

Independent Public Clinical Hospital No. 4 in Lublin, Poland

<https://orcid.org/0000-0001-8880-3139>

Katarzyna Toś

Independent Public Health Care Center in Lubaczów, 168 Mickiewicza St., 37-600 Lubaczów

<https://orcid.org/0000-0002-4674-4078>

Katarzyna Wąsala

Clinical Hospital of Poznan University of Medical Sciences, 1/2 Długa St., 61-848 Poznań

<https://orcid.org/0009-0008-1795-6259>

Sylwia Grosman

Clinical Hospital of Poznan University of Medical Sciences, 1/2 Długa St., 61-848 Poznań

<https://orcid.org/0000-0003-2126-6011>

Agata Węgrzyniak

Central Clinical Hospital of the Ministry of Interior and Administration in Warsaw, Wołoska 137, 02-507 Warszawa

<https://orcid.org/0000-0001-8638-0013>

Wojciech Wokurka

Department of Anatomy, Medical University of Lublin, 20-059 Lublin, Poland; Independent Health Care Center of the Ministry of Interior and Administration, Grenadierów Street 3, 20-331 Lublin

<https://orcid.org/0000-0001-9936-5656>

Abstract:

Introduction

Cancer is one of the leading causes of death worldwide. The molecular characterization of solid tumors has provided significant advances in oncology, and genome profiling using circulating tumor DNA (ctDNA) has helped improve the quality of medical care for patients with cancer. Liquid biopsy is a diagnostic molecular test to demonstrate the presence of circulating tumor DNA or circulating tumor cells released from primary or metastatic solid tumors. In addition, the minimally invasive nature of the liquid biopsy enables quick verification of the grade of malignancy. Observation of ctDNA in blood tests is of great importance at the treatment stage, it allows to determine resistance to the applied treatment, response to therapy and to predict relapse before it occurs.

Aim of the study

The aim of this review is to present information on the use of circulating tumor DNA together with circulating tumor cells in oncological diagnostics.

Materials and methods

The work was created based on the PubMed database. Articles were searched in English using the following keywords: ctDNA, CTC, cfDNA.

Results

Currently, ctDNA analysis is an alternative to traditional molecular diagnostics of cancer tissue, assessment of the effectiveness of therapy, monitoring of tumor dynamics, monitoring of progression and predicting recurrence.

Summary

There are not many diagnostic methods for detecting ctDNA. Due to the short length of the fragments and the low content in the samples, ctDNA analysis requires more sensitive techniques to ensure its reliability compared to methods used in solid tissue biopsies. Existing techniques of ctDNA analysis focus mainly on the identification of mutations in advanced stages of cancer, less often on early diagnosis.

Key words: ctDNA; circulating tumor DNA; CTC; liquid biopsy; tumor; cancer

Streszczenie:

Wprowadzenie

Choroby nowotworowe stanowią jedną z głównych przyczyn zgonów na świecie. Molekularna charakterystyka guzów litych zapewniła znaczący postęp onkologii, a profilowanie genomu wykorzystujące krążące DNA nowotworowe (circulating tumor DNA - ctDNA) pomogło poprawić jakość opieki medycznej nad pacjentami z nowotworami. Płynna biopsja należy do diagnostycznych testów molekularnych mających na celu wykazanie obecności krążącego DNA nowotworowego bądź krążących komórek nowotworowych uwalnianych z pierwotnych bądź przerzutowych guzów litych. Ponad to, mało inwazyjny charakter płynnej biopsji umożliwia szybką weryfikację stopnia złośliwości. Obserwacja ctDNA w badaniach krwi ma duże znaczenie na etapie leczenia, umożliwia określenie oporności na zastosowaną kurację, odpowiedzi na terapię oraz przepowiadanie nawrotu zanim on nastąpi.

Cel pracy

Celem tej pracy przeglądowej jest prezentacja informacji na temat zastosowania krążącego DNA nowotworowego wraz z krążącymi komórkami nowotworowymi w diagnostyce onkologicznej.

Materiały i metody

Praca została stworzona w oparciu o bazę danych PubMed. Artykuły wyszukiwano w języku angielskim przy użyciu następujących słów kluczowych: ctDNA, CTC, cfDNA.

Wyniki

Obecnie analiza ctDNA jest alternatywą dla tradycyjnej diagnostyki molekularnej tkanki nowotworowej, oceny skuteczności terapii, monitorowania dynamiki nowotworu, monitorowania progresji i prognozowania nawrotu.

Wnioski

Nie istnieje wiele metod diagnostycznych do wykrywania ctDNA. Ze względu na krótką długość fragmentów i niską zawartość w próbkach, analiza ctDNA wymaga bardziej czułych technik, aby zapewnić jej wiarygodność w porównaniu z metodami stosowanymi w

biopsjach tkanek stałych. Istniejące techniki analizy ctDNA skupiają się głównie na identyfikacji mutacji w zaawansowanych stadiach nowotworu, rzadziej na wczesnej diagnostyce.

Słowa kluczowe: ctDNA; krążące DNA nowotworowe; CTC; płynna biopsja; nowotwór; rak

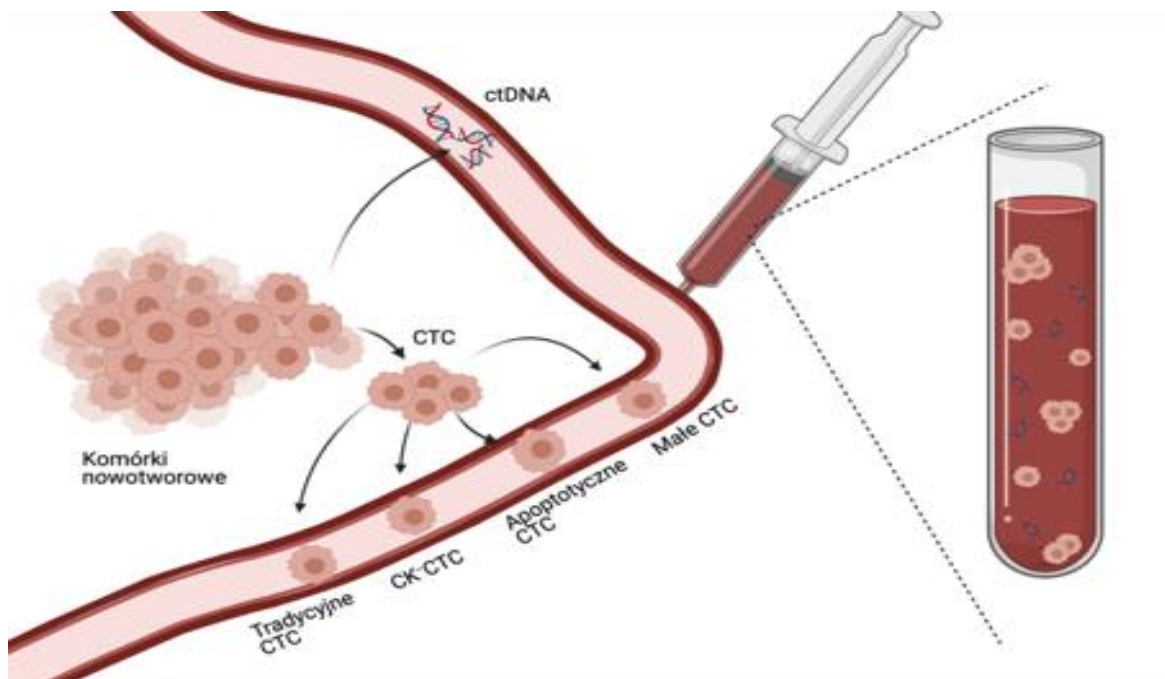
Wprowadzenie

Choroby nowotworowe stanowią jedną z głównych przyczyn zgonów na świecie. Ich przyczyną na poziomie molekularnym jest nieprawidłowa oraz nadmierna kariokineza (1). Molekularna charakterystyka guzów litych znacząco pomogła w rozwoju onkologii, natomiast profilowanie genomu z wykorzystaniem krążącego DNA nowotworowego (*circulating tumor DNA – ctDNA*) zapewniło poprawę w opiece medycznej nad pacjentami z nowotworami (2). Wolno krążące DNA (*circulating free DNA – cfDNA*) to pofragmentowane DNA znajdujące się we krwi, które uwalniane jest z komórek na skutek martwicy, apoptozy lub autofagii komórek. CfDNA, które pochodzi z komórki nowotworowej nosi nazwę ctDNA i jest nośnikiem zmian genomowych charakterystycznych dla nowotworu. W cechach odróżniających cfDNA od ctDNA wyróżnione są m.in. mutacje somatyczne, krótsze długości fragmentów oraz zmiany strukturalne (3). Ze względu na krótki okres półtrwania analiza ctDNA umożliwia monitorowanie nowotworu w czasie rzeczywistym. Wykrywanie ctDNA jest wyborem mniej inwazyjnym oraz bezpieczniejszym od biopsji tkanki (4). Obecność cfDNA w ludzkim osoczu stwierdzono przez Mandela i Matelsa w 1948 roku (5). Natomiast w 1977 roku Leon i wsp. stwierdzili obecność ctDNA w krwi obwodowej osób chorujących na raka (6).

Płynna biopsja – zalety oraz zastosowanie

Płynna biopsja zaliczana jest do molekularnych testów diagnostycznych, których zadaniem jest wykazanie obecności krążącego DNA nowotworowego lub krążących komórek nowotworowych (*circulating tumor cells – CTC*) uwalnianych z pierwotnych bądź przerzutowych guzów (Rycina 1). Stosowana jest we wczesnej diagnostyce nowotworów oraz do monitorowania odpowiedzi na zastosowane leczenie (7). Ze względu na małą

inwazyjność płynnej biopsji możliwe jest wykonanie szybkiej weryfikacji złośliwości nowotworu. Obserwacja ctDNA w badaniach krwi jest znaczące na etapie leczenia, umożliwia określenie oporności na zastosowaną kurację, odpowiedzi na terapię oraz przewidywanie nawrotu choroby przed jego wystąpieniem (8,9). Obecnie zarówno ctDNA jak i CTC są traktowane jako biomarkery, ponieważ przedstawiają genetykę nowotworu nie tylko w celach diagnostycznych, ale również prognostycznych (7).



Rycina 1. Schemat substancji wydzielanych przez komórki nowotworowe, które mają zastosowanie w wykrywaniu i monitorowaniu nowotworu przy użyciu płynnej biopsji.

Schemat przedstawia wydzielanie przez komórki nowotworowe krążącego DNA nowotworowego (circulating tumor DNA - ctDNA) oraz krążących komórek nowotworowych (circulating tumor cell - CTC), z wyróżnieniem ich podtypów, do naczyń krwionośnych człowieka.

Wykaz skrótów: ctDNA – krążące DNA nowotworowe, CTC – krążące komórki nowotworowe, CK-CTC - ujemne względem cytokeratyny krążące komórki nowotworowe
Rycinę stworzono przy pomocy BioRender.com (<https://www.biorender.com>)

Krążące komórki nowotworowe i ich rodzaje

Krążące komórki nowotworowe to komórki, które są uwalniane z nowotworu do naczyń krwionośnych bądź też limfatycznych. W 1869 roku Thomas Ashworth (10) wykazał występowanie CTC w krwi chorych na nowotwór gruczołu krokowego. Z racji krótkiego okresu półtrwania CTC dostarczają informacji o stanie chorego w czasie rzeczywistym.

Badania (11,12) wykazały zależność pomiędzy rozwojem przerzutów a wielkością i rozmieszczeniem skupisk CTC. Charakterystyka krążących komórek nowotworowych potwierdziła ich heterogeniczność genomową i różnorodność fenotypową. Wyróżniono cztery główne rodzaje CTC, w tym: tradycyjne CTC, ujemne pod względem cytokeratyny CTC (CK-CTC), apoptotyczne CTC oraz małe CTC.

Tradycyjne CTC

Tradycyjne CTC charakteryzują się dużymi i nieregularnymi kształtami z nienaruszonym jądrem komórkowym. Wykazują ekspresję cytokeratyny pochodzenia nabłonkowego.

Ujemne pod względem cytokeratyny CTC (CK-CTC)

Ujemne pod względem cytokeratyny CTC to komórki nowotworowe, które są najbardziej potencjalne do tworzenia przerzutów, ponieważ nie mają cytokeratyn i antygenu różnicowania komórkowego 45 (CD45).

Apoptotyczne CTC

Apoptotyczne CTC są to tradycyjne CTC, które uległy apoptozie. Różnicowanie polega na ocenie jądra komórkowego, które w przypadku apoptotycznych CTC jest pofragmentowane oraz na obserwowaniu wybrzusze cytoplazmatycznych. Stosunek apoptotycznych CTC do tradycyjnych CTC może być stosowany w ocenie skuteczności leczenia pacjenta.

Małe CTC

Małe CTC klasyfikowane są jako CTC dodatnie pod względem cytokeratyny oraz CD45-ujemne. Ich rozmiary są zbliżone do wielkości leukocytów. Odpowiadają za progresję choroby i różnicowanie się w raki drobnokomórkowe, które często wymagają specjalnych strategii terapeutycznych (7,13).

Badania kliniczne wśród chorujących na raka piersi uwzględniające krążące komórki nowotworowe

Badania kliniczne (14) przeprowadzone wśród pacjentów z 18 kohort, w tym 2436 chorujących na przerzutowego raka piersi wykazały zależność pomiędzy ilością CTC w krwi

osób chorujących na nowotwór ze skutecznością leczenia przerzutów i śmiertelnością. U chorych na raka piersi z przerzutami, u których poziom CTC w 7,5ml krwi był równy lub przekraczał 5 kuracja zakończyła się niepowodzeniem. Przeciwnie było u osób, w których krwi wartość CTC w krwi była niższa od 5. Przełożyło się to również na przeżywalność chorujących, która była wyższa u osób z niższym poziomem CTC we krwi. Pacjenci, u których CTC przyjmuje wartość poniżej 5 w 7,5ml krwi zostali zaklasyfikowani do grupy stadium IV z powolnym rozwojem nowotworu, natomiast osoby u których $CTC \geq 5$ do stadium IV z szybką progresją choroby (14).

Metody izolacji CTC

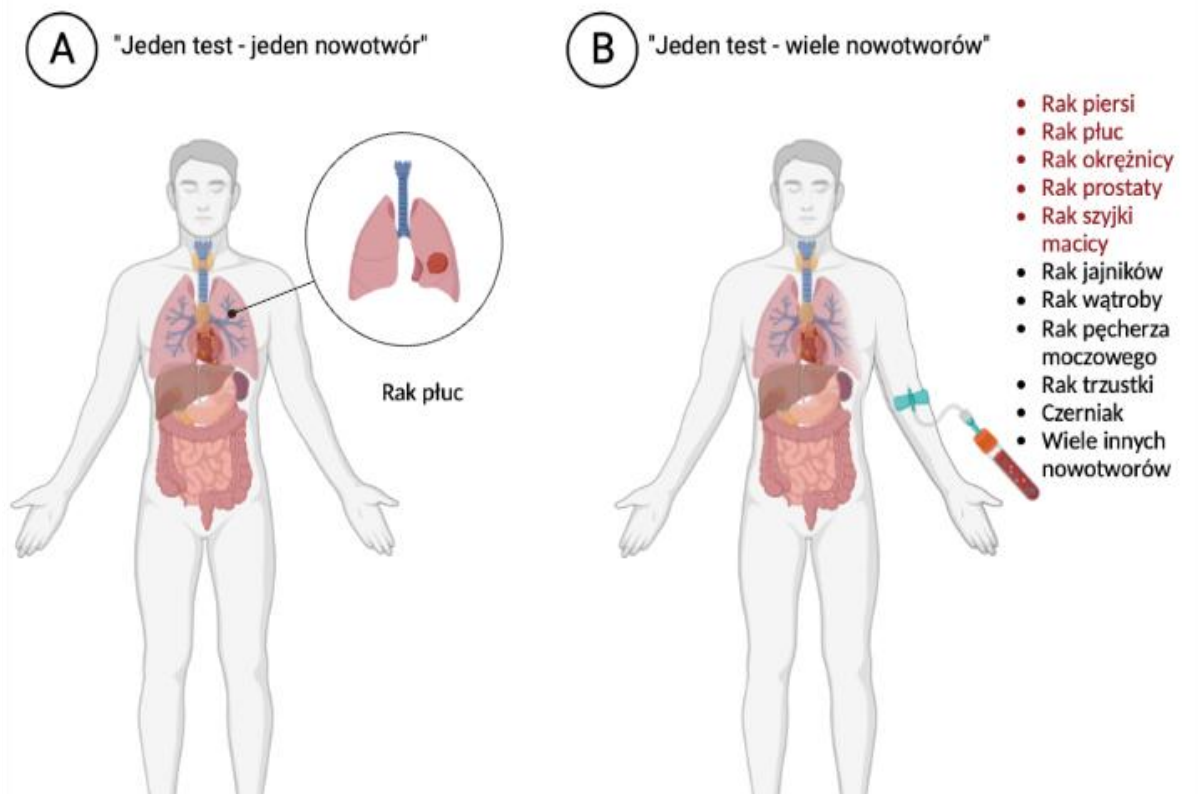
W minionej dekadzie zostało zaproponowanych wiele metod pobierania CTC. Ze względu na bardzo mały procent CTC we krwi chorych, ich precyzyjne wyizolowanie z licznych komórek krwi, a zwłaszcza znalezienie metody umożliwiającej skuteczne wykrywanie CTC nadających się do dogłębnej analizy nadal stanowi duże wyzwanie. Zasadniczy podział strategii technologicznych do analizy CTC prezentuje się następująco:

1. Izolacja i zagęszczanie
2. Wykrywanie i identyfikacja
3. Uwalnianie (15)

Pierwsza strategia opiera swe działanie na interakcjach fizycznych i oddziaływaniu antygen-przeciwciała. Druga odnosi się do metod takich jak mikroskopia fluorescencyjna, spektrofotometria czy cytometria przepływowa. W ostatniej strategii uwolnione CTC są materiałem do dalszych badań m.in. genomiki, proteomiki czy też transkryptomiki (16).

Nowe podejście diagnostyki onkologicznej - test wczesnego wykrywania wielu nowotworów

Obecne testy przesiewowe w kierunku nowotworu są specyficzne dla konkretnego narządu, co oznacza, że wyniki jednego badania w danym narządzie nie dostarczają chorym ani ich lekarzom żadnych informacji na temat innych rodzajów raka możliwie obecnych w pozostałych częściach ciała. W populacji ogólnej tylko pięć rodzajów raka jest poddawanych badaniom przesiewowym. Należą do nich rak piersi, płuc, okrężnicy, szyjki macicy oraz prostaty. Test wczesnego wykrywania wielu nowotworów może wykryć ponad 50 typów raka w oparciu o pobraną od pacjenta próbkę krwi (Rycina 2) (17).



Rycina 2. Schemat przedstawiający dwa podejścia w diagnostyce onkologicznej.

Schemat przedstawia dwa podejścia w diagnostyce onkologicznej.

(A) Test przesiewowy w kierunku konkretnego nowotworu na przykład tomografia komputerowa płuc w celu wykrycia raka płuc. To podejście nie dostarcza informacji o pozostałych narządach i możliwych nowotworach u pacjenta. W populacji badania przesiewowe wykonuje się w celu diagnozy rak piersi, płuc, okrężnicy, szyjki macicy oraz prostaty.

(B) Test wczesnego diagnozowania wielu nowotworów oparty na wykrywaniu w próbce krwi krążącego DNA nowotworowego lub krążących komórek nowotworowych. Pozwala na wykrycie ponad 50 różnych typów nowotworów, przykłady wymieniono po prawej stronie. W kolorze czerwonym zaznaczono 5 nowotworów poddawanych obecnie badaniom przesiewowym.

Rycinę stworzono przy pomocy BioRender.com (<https://www.biorender.com>)

CtDNA jako biomarkery

Dostarczenie charakterystycznych dla nowotworu biomarkerów staje się dużo łatwiejsze, dzięki wysokiej specyficzności każdego nowotworu i zachodzących w jego komórkach mutacji somatycznych. Biomarkery, takie jak ctDNA i CTC, mogą być wykorzystywane do monitorowania raka w czasie rzeczywistym przed, w trakcie i po określonych terapiach. Problem jednak stwarza mały stosunek zmutowanych fragmentów

genów do liczby pierwotnych fragmentów DNA (18). Ponad to, okres półtrwania ctDNA wynosi mniej niż 2 godziny, utrudnia to interpretację wyników klinicznych oraz dokładne wykrycie mutacji. Na przestrzeni ostatnich lat przy użyciu łańcuchowej reakcji polimerazy wykazano ponad 75% powodzenie w wykrywaniu nowotworów m.in. u chorych z zaawansowanym nowotworem żołądka, przełyku, pęcherza, piersi oraz czerniaka z wykorzystaniem ctDNA. W przypadku zastosowania PCR do wykrycia pierwotnego nowotworu mózgu, prostaty, nerek lub tarczycy wykrywalność wynosiła mniej niż 50%. Obecnie do wykrywania mutacji wykorzystuje się sekwencjonowanie nowej generacji. Umożliwia ono ocenę zmian somatycznych w setkach genów w tym samym czasie (19). Przykładami testów sekwencyjnych, które pozwalają na wykrywanie dużej ilości rodzajów zmian genetycznych są OncoPanel oraz MSK-IMPACT (20,21). Testy te osiągają nawet 98% czułości i 100% swoistości. Co ciekawe, ctDNA można zidentyfikować nie tylko w osoczu, ale również i w płynie mózgowo-rdzeniowym, moczu, ślinie, stolcu, płynie opłucnowym oraz otrzewnowym (22,23).

Podsumowanie

Obecnie analiza ctDNA jest alternatywą dla tradycyjnej diagnostyki molekularnej tkanki nowotworowej, oceny skuteczności terapii, monitorowania dynamiki nowotworu, monitorowania progresji i prognozowania nawrotu. Nie istnieje wiele metod diagnostycznych do wykrywania ctDNA. Ze względu na krótką długość fragmentów i niską zawartość w próbkach, analiza ctDNA wymaga bardziej czułych technik, aby zapewnić jej wiarygodność w porównaniu z metodami stosowanymi w biopsjach tkanek stałych. Zniwelowanie problemu jakim jest niewystarczająca zawartością ctDNA w całym osoczu, wymaga wielu powtórzeń PCR, aby przeanalizować ctDNA i odróżnić go od innych źródeł DNA. Jednak wiele cykli PCR może powodować błędy amplifikacji (24). Istniejące techniki analizy ctDNA skupiają się głównie na identyfikacji mutacji w zaawansowanych stadiach nowotworu, rzadziej na wczesnej diagnostyce. Dlatego analiza ctDNA stoi przed poważnymi wyzwaniem technologicznymi, które mogą ostatecznie zadecydować o potencjalnym zastosowaniu klinicznym (25).

Bibliografia

1. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018. *CA Cancer J Clin* [Internet]. 2018;68(1):7–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29313949>
2. Cheng ML, Pectasides E, Hanna GJ, Parsons HA, Choudhury AD, Oxnard GR. Circulating tumor DNA in advanced solid tumors: Clinical relevance and future directions. *CA Cancer J Clin* [Internet]. 2021 Mar;71(2):176–90. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33165928>
3. Davis AA, Iams WT, Chan D, Oh MS, Lentz RW, Peterman N, et al. Early Assessment of Molecular Progression and Response by Whole-genome Circulating Tumor DNA in Advanced Solid Tumors. *Mol Cancer Ther* [Internet]. 2020;19(7):1486–96. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32371589>
4. Cheng F, Su L, Qian C. Circulating tumor DNA: a promising biomarker in the liquid biopsy of cancer. *Oncotarget* [Internet]. 2016 Jul 26;7(30):48832–41. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27223063>
5. MANDEL P, METAIS P. Nuclear Acids In Human Blood Plasma. *C R Seances Soc Biol Fil* [Internet]. 1948 Feb;142(3–4):241–3. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18875018>
6. Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, Yaros MJ. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res* [Internet]. 1977 Mar;37(3):646–50. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18875018>
7. Aghamir SMK, Heshmat R, Ebrahimi M, Khatami F. Liquid Biopsy: The Unique Test for Chasing the Genetics of Solid Tumors. *Epigenet Insights* [Internet]. 2020;13:2516865720904052. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32166219>
8. Macías M, Alegre E, Díaz-Lagares A, Patiño A, Pérez-Gracia JL, Sanmamed M, et al. Liquid Biopsy: From Basic Research to Clinical Practice. *Adv Clin Chem* [Internet]. 83:73–119. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29304904>
9. Neoh KH, Hassan AA, Chen A, Sun Y, Liu P, Xu KF, et al. Rethinking liquid biopsy: Microfluidic assays for mobile tumor cells in human body fluids. *Biomaterials*

- [Internet]. 2018 Jan;150:112–24. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29035737>
10. ASHWORTH T. A case of cancer in which cells similar to those in the tumours were seen in the blood after death. *Aust Med J* [Internet]. 1869;14:146. Available from: <http://ci.nii.ac.jp/naid/10027663080/en/>
 11. KNISELY WH, MAHALEY MS. Relationship between size and distribution of spontaneous metastases and three sizes of intravenously injected particles of VX2 carcinoma. *Cancer Res* [Internet]. 1958 Sep;18(8 Part 1):900–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13573362>
 12. Liotta LA, Kleinerman J, Saidel GM. Quantitative relationships of intravascular tumor cells, tumor vessels, and pulmonary metastases following tumor implantation. *Cancer Res* [Internet]. 1974 May;34(5):997–1004. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4841969>
 13. Wang L, Li Y, Xu J, Zhang A, Wang X, Tang R, et al. Quantified postsurgical small cell size CTCs and EpCAM+ circulating tumor stem cells with cytogenetic abnormalities in hepatocellular carcinoma patients determine cancer relapse. *Cancer Lett* [Internet]. 2018;412:99–107. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29031565>
 14. Cristofanilli M, Pierga JY, Reuben J, Rademaker A, Davis AA, Peeters DJ, et al. The clinical use of circulating tumor cells (CTCs) enumeration for staging of metastatic breast cancer (MBC): International expert consensus paper. *Crit Rev Oncol Hematol* [Internet]. 2019 Feb;134:39–45. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30771872>
 15. Lin D, Shen L, Luo M, Zhang K, Li J, Yang Q, et al. Circulating tumor cells: biology and clinical significance. *Signal Transduct Target Ther* [Internet]. 2021 Nov 22;6(1):404. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41392-021-00817-8>
 16. Shen Z, Wu A, Chen X. Current detection technologies for circulating tumor cells. *Chem Soc Rev* [Internet]. 2017;46(8):2038–56. Available from: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C6CS00803H>

17. Klein EA, Richards D, Cohn A, Tummala M, Lapham R, Cosgrove D, et al. Clinical validation of a targeted methylation-based multi-cancer early detection test using an independent validation set. *Annals of Oncology* [Internet]. 2021 Sep;32(9):1167–77. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0923753421020469>
18. Diehl F, Schmidt K, Choti MA, Romans K, Goodman S, Li M, et al. Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. *Nat Med*. 2008 Sep;14(9):985–90.
19. Bettegowda C, Sausen M, Leary RJ, Kinde I, Wang Y, Agrawal N, et al. Detection of Circulating Tumor DNA in Early- and Late-Stage Human Malignancies. *Sci Transl Med*. 2014 Feb;6(224):224ra24-224ra24.
20. Garcia EP, Minkovsky A, Jia Y, Ducar MD, Shivdasani P, Gong X, et al. Validation of OncoPanel: A Targeted Next-Generation Sequencing Assay for the Detection of Somatic Variants in Cancer. *Arch Pathol Lab Med*. 2017 Jun;141(6):751–8.
21. Cheng DT, Mitchell TN, Zehir A, Shah RH, Benayed R, Syed A, et al. Memorial Sloan Kettering-Integrated Mutation Profiling of Actionable Cancer Targets (MSK-IMPACT). *The Journal of Molecular Diagnostics*. 2015 May;17(3):251–64.
22. Oshi M, Murthy V, Takahashi H, Huyser M, Okano M, Tokumaru Y, et al. Urine as a Source of Liquid Biopsy for Cancer. *Cancers (Basel)* [Internet]. 2021 May 28;13(11):2652. Available from: <https://www.mdpi.com/2072-6694/13/11/2652>
23. Escudero L, Martínez-Ricarte F, Seoane J. ctDNA-Based Liquid Biopsy of Cerebrospinal Fluid in Brain Cancer. *Cancers (Basel)* [Internet]. 2021 Apr 21;13(9):1989. Available from: <https://www.mdpi.com/2072-6694/13/9/1989>
24. Boyer M, Cayrefourcq L, Dereure O, Meunier L, Becquart O, Alix-Panabières C. Clinical Relevance of Liquid Biopsy in Melanoma and Merkel Cell Carcinoma. *Cancers (Basel)* [Internet]. 2020 Apr 13;12(4). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32295074>
25. Chen X, Wang L, Lou J. Nanotechnology Strategies for the Analysis of Circulating Tumor DNA: A Review. *Med Sci Monit* [Internet]. 2020 Mar 22;26:e921040. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32200389>