

Laisvos DNR reikšmė diagnozuojant plaučių vėžį

Danielius Serapinas, Arina Medvedeva, Justė Čepaitė, Giedrė Mickevičiūtė

LSMU MA Genetikos ir molekulinės medicinos klinika

Reikšminiai žodžiai: laisva DNR, plaučių vėžys, diagnostika.

Santrauka. Tradiciškai vėžio diagnozė nustatoma taikant histologinius ir radiologinius tyrimo metodus, tačiau tobulėjant molekuliniais tyrimo metodams, atrandama vis daugiau biožymenų, kurie padeda vėžį klasifikuoti į molekulinis tipus. Remiantis šiais molekuliniais tipais, galima skirti navikui specifinį gydymą ir sulaukti geresnių rezultatų. Daugumai biožymenų aptikti ir nustatyti reikalingos invazinės procedūros: chirurginė naviko ekscizija, biopsijos paėmimas ar plonos adatos aspiracija. Tuo tarpu aptikti ir ištirti laisvą DNR (angl. *cell free DNA*, cfDNA) reikia minimaliai invazinės procedūros, vadinamosios skystos biopsijos. cfDNA – jautrus, specifiškas biožymuo, suteikiantis galimybę anksti nustatyti naviko diagnozę, stebėti naviko masę, liekamąją ligą bei atsparumą gydymui. cfDNA atspindi visą naviko genomą bei navikui būdingą heterogeniškumą, o tai leidžia skirti pacientui individualizuotą gydymą.

ĮVADAS

Plaučių vėžys skiriamas į du tipus: smulkiųjų ląstelių plaučių vėžį, kuris sudaro apie 15 proc. atvejų, ir stambiųjų ląstelių plaučių vėžį (SPV). SPV toliau klasifikuojamas remiantis naviko histomorfologinėmis savybėmis: suragėjusių ląstelių karcinoma, adenokarcinoma, stambiųjų ląstelių karcinoma, neuroendokrininiai augliai ir karcinomos su sarkomos elementais. Histomorfologinė diagnozė tradiciškai buvo naudojama norint parinkti gydymą, paremtą klinikiniais patologijos veiksniais, ir tinkamus vaistus individualiai kiekvienam pacientui [1–3]. Tačiau dėl naujų individualizuotos medicinos pasiekimų šis būdas buvo pakeistas.

Dabar SPV jau gali būti suskirstytas į atskiras molekulinis grupes su skirtingomis gydymo implikacijomis ir standartinę paciento, sergančio išplitusiu SPV, priežiūra. Empirinę terapiją, kuri remiasi paciento klinikiniais patologijos bruožais, keičia biožymenimis grindžiami gydymo algoritmai, sudaromi remiantis paciento auglio molekulinio pobūdžiu [3, 4]. Dauguma dabartinių individualizuotų vaistų, kurių taikynys – konkretus genas, yra paremti vieno geno molekulinio testu, o tai padeda parinkti specifiskus vaistus kiekvienam pacientui individualiai [4].

MOLEKULINIAI BIOŽYMENYS

Biožymuo yra cheminis ar biologinis junginys, kuris gali būti panaudotas ligai diagnozuoti ar eigai stebėti. Vėžio atvejais biožymenys naudojami ankstyvai vėžio diagnozei,

ligos progresavimo ir atsako į gydymą stebėjimui. Biožymenys gali būti suskirstyti į dvi plačias grupes: nuspėjamieji ir prognoziniai. Nuspėjamieji veiksniai – patologiniai ar klinikiniai požymiai, kurie nulemia tikėtiną atsaką į tam tikrą gydymą, o prognoziniai veiksniai – patologiniai ar klinikiniai biožymenys, kurie nulemia paciento ligos baigtį ar išgyvenimo tikimybę. Biožymuo tuo pačiu gali būti ir nuspėjamasis, ir prognozinis. Kad biožymuo būtų naudingas, jis turi būti techniškai bei kliniškai įvertinamas ir turėti įtakos klinikinių sprendimų priėmimui [5].

Pirmasis vėžio biožymuo buvo aprašytas 1848 metais. Tyrimo metu 75 proc. pacientų, sergančių daugine mieloma, šlapime buvo identifikuotos imunoglobulino lengvosios grandinės [6]. Šis vėžio biožymuo naudojamas iki šiol, tačiau dabar, patobulėjus laboratoriniams metodams, galima tiksliau apskaičiuoti šio biožymens koncentraciją. XX a. iš vėžiu sergančių pacientų paimtų kūno skysčių buvo identifikuoti dar keli žymenys (baltymai, fermentai ir hormonai), tačiau onkologinės ligos stebėjimas iš tikrųjų prasidėjo septintajame dešimtmetyje identifikavus du biožymenis: alfa fetoproteiną ir karcinoembrioninį antigeną.

Atrastų vėžio biožymenų staiga padaugėjo ir jau dabar yra aprašyti keli tūkstančiai biožymenų, tačiau tik keli iš jų naudingi kliniškai. Nesėkmės pritaikant žymenį klinikoje praktikoje gali būti siejamos su techniniais sunkumais, kylančiais juos tiriant, tačiau dažniausiai jas lemia persipinančios sveikų ir vėžiu sergančių pacientų grupės, taigi sveikų ir vėžio pacientų tiriamosios grupės negali būti visiškai atskirtos. Daugumai biožymenų vėžinėse ir normaliose ląstelėse būdingas santykinis raiškios skirtumas, nustatoma

padidėjusi biožymens raiška vėžinėse ląstelėse. Tačiau net ir baltyminiams biožymenims, kaip antai CA15.2, CA19.2, CA125 ir PSA, kurie klinikinėje praktikoje naudojami atsakui į gydymą stebėti ir ankstyvai diagnozei nustatyti, stinga jautrumo ir specifškumo – jų rodmenys ne visada gerai sutampa su auglio stadija [7].

Norint įvertinti vėžio progresavimą, dažnai kartu atliekami skirtingų metodų tyrimai (biožymenų ar vaizdo atkūrimo tyrimai), tačiau daugėjant gydymo taktikų, reikia efektyvesnio auglio atsako į gydymą įvertinimo, kad gydymo taktikos būtų optimizuotos.

Biožymenys gali būti aptinkami įvairiuose kūno skysčiuose: kraujyje, šlapime, seilėse ar pačiuose auglio audiniuose. Vėžio diagnozė dažniausiai nustatoma remiantis morfologiniu vėžio audinio, gauto biopsijos, chirurginės ekscizijos ar plonos adatos aspiracijos būdu, įvertinimu. Šios procedūros yra santykinai invazinės, kai kuriais atvejais paimamo audinio kiekis gali būti per mažas arba auglys netinkamas biopsinei medžiagai paimti ar chirurgiškai pašalinti – tai gali užkirsti kelią nustatyti kliniškai naudingus biožymenis. Su kliniškai reikšmingų biožymenų paieškomis kartu ieškoma ir santykinai neinvazinių, pacientui skausmo nesukeliančių biožymenų, kurie suteiktų galimybę nuolat stebėti pacientą už santykinai žemą kainą.

Užbaigtas Žmogaus genomo projektas praplėtė biožymenų sritį, ir dabar į ją įeina DNR, RNR, ncRNR, miRNR ir epigenetika. Tarptautiniai bendradarbiaujantys projektai, tarp kurių yra ir Tarptautinis vėžio genomo konsorciūmas bei Vėžio mutacijų katalogas, nustatė pagrindines mutacijas daugumoje vėžio tipų. Kai kurie iš šių molekulinų biožymenų yra naudojami kasdienėje klinikinėje praktikoje. Šiuo metu atliekama BARF mutacijos analizė melanomai nustatyti, EGFR ir ALK tyrimas plaučių vėžiui bei RAS tyrimas gaubtinės ir tiesiosios žarnos vėžiui nustatyti.

LAISVOJI DNR

cfDNR (angl. *cell-free DNA*) išskiriama iš normalių ir navikinių ląstelių

dėl užprogramuotos ląstelės mirties (apoptozės), ji sudaryta iš mažų nukleorūgščių fragmentų, kurie nėra susiję su ląstelėmis ar jų fragmentais. cfDNR yra visų žmonių kraujo plazmoje. Kraujyje cfDNR fragmentai yra nuo 150 iki 200 bp ilgio [8], o ctDNR (angl. *circulating tumor DNA*) sudaro nuo 0,01 proc. iki 90 proc. cfDNR [9]. Navikai, turintys apie 50 mln. piktybinių ląstelių, išskiria pakankamą DNR kiekį, kad kraujyje būtų galima nustatyti cirkuliuojančią nuo ląstelių laisvą DNR [10]. Didėjant naviko dydžiui dėl padidėjusios ląstelinės kaitos apoptozinių ir žuvusių ląstelių daugėja. ctDNR gali būti specifškai tiriamą norint nustatyti ir stebėti naviko tipą ir pacientui specifines mutacijas, taip pat atliekant *de novo* sekvenavimą ieškoti platesnio diapazono mutacijų [11]. DNR somatinių mutacijų naudojimo pranašumas yra tas, kad šios mutacijos būdingos tik naviko ląstelių DNR ir neaptinkamos normaliose ląstelėse. Tai suteikia itin specifšką naviko biožymenį, kuris gali būti nustatomas ir stebimas tam tikrą laiką. Dabar ctDNR aptikti naudojamas masyvus paralelinis sekvenavimas (MPS), nes jam nereikia žinių apie tam tikrą mutaciją pirminiame navike [7].

Kadangi laisva nuo ląstelių cfDNR yra potencialus viso naviko genomo pakaitalas, ji buvo tiriamą kaip alternatyva biopsijai, vadovaujantis „skystos biopsijos“ terminu [12]. Gydant plaučių vėžį, vis dažniau taikomas molekulinis subtipavimas, tačiau sąlygos prieti prie naviko audinio, norint atlikti molekulinį tyrimą, kartais yra ribotos. cfDNR nustatymas – gero specifškumo, jautrumo ir sutapimo tyrimas, padedantis lengvai identifikuoti genominius pokyčius, kuriems yra sukurta tikslinių vaistų, tai rodo EGFR mutacijos aptikimas [13–15].

Tyrime, publikuotame *European Respiratory Journal*, TISSOT ir kt. [16] įvertino cfDNR. Tyrimo tikslas – išsiaiškinti, ar šis biožymuo gali būti naudojamas prognozuoti auglio atsaką į gydymą bei SPV sergančių pacientų, gydomų chemoterapija platinos pagrindu, išgyvenamumą. Tyrėjai praneša, kad cfDNR koncentracija kraujyje plazmoje, paimtoje prieš chemoterapiją iš 218 pacientų, sergančių SPV (lokaliai išplitusiu ar metastaziniu), turėjo nepriklausomą prognozinę vertę. Pacientų, kurių plazmoje nustatyta didesnė cfDNR koncentracija, išgyvenamumas be auglio progresavimo ($p = 0,034$) bei bendrasis išgyvenamumas ($p = 0,001$) buvo pastebimai mažesnis nei tų, kuriems nustatyta mažesnė cfDNR koncentracija. Tačiau bendrosios cfDNR koncentracijos pokyčiai gydymo metu nebuvo nuspėjami ir nepadėjo įvertinti chemoterapijos efektyvumo SPV sergantiems pacientams. Buvo įrodyta, kad didelis cfDNR kiekis yra neinvazinis blogos prognozės biožymuo sergant plaučių vėžiu [17–19], bet kiti tyrimai tokio ryšio nenustatė [20]. Tai aiškinama prastu cfDNR tyrimų standartizavimu: labiausiai skiriasi cfDNR gryninimas ir kiekybinis įvertinimas. Kitas trūkumas yra susijęs su cfDNR šaltiniu: jos koncentracija atspindi ne tik cfDNR pokyčius, bet ir medicininės būklės ar paciento savybes, kurios gali lemti cfDNR koncentracijos padidėjimą [21]. cfDNR koncentracijos prognozei vertei įtakos gali turėti ir naviko molekulinės savybės [22]. Taigi, pacientų savybės gali daryti įtaką pradinei cfDNR koncentracijai, o tai gali paveikti galutinę prognozę.

ctDNR, kaip naviko dinamikos žymens, matavimas akivaizdžiai pranaoksta tradicinius baltymų biožymenis ar netgi vaizdo atkūrimo tyrimus. Pirma, cfDNR gyvavimo laikas palyginti trumpas (apie 2 val.), tai leidžia vertinti naviko pokyčius valandų, o ne savičių ar mėnesių, laikotarpiu [23]. Be to, ctDNR gali geriau atspindėti naviko heterogeniškumą negu mažas biopsinės medžiagos mėginys ir padėtų tirti įgyjamo atsparumo mechanizmus bei suteiktų galimybę tyrėjams stebėti atsparumo vystymąsi per tam tikrą laiką [24].

ctDNR, kaip naviko dinamikos žymens, matavimas akivaizdžiai pranaoksta tradicinius baltymų biožymenis ar netgi vaizdo atkūrimo tyrimus. Pirma, cfDNR gyvavimo laikas palyginti trumpas (apie 2 val.), tai leidžia vertinti naviko pokyčius valandų, o ne savičių ar mėnesių, laikotarpiu [23]. Be to, ctDNR gali geriau atspindėti naviko heterogeniškumą negu mažas biopsinės medžiagos mėginys ir padėtų tirti įgyjamo atsparumo mechanizmus bei suteiktų galimybę tyrėjams stebėti atsparumo vystymąsi per tam tikrą laiką [24].

BIOŽYMENŲ PRITAIKYMAS

Pagrindinis cfDNR naudojimo tikslas – papildyti arba pakeisti audinio biopsiją. Tyrimas yra minimaliai invazinis ir gali būti lengvai kartojamas įvairiu laiku – taip būtų galima atidžiai stebėti paciento atsaką į gydymą ar atkrytį ir anksti diagnozuoti vėžį.

Mutantinės cfDNR geba atspindėti pokyčius navike gali būti pritaikoma įvairiose onkologijos srityse. Pirmasis ir turbūt lengviausiai įgyvendinamas būdas – naudoti cfDNR kaip naują biožymenį, panašų į jau naudojamus baltymų biožymenis naviko masei stebėti. Kiti pritaikymo būdai: minimalios liekamosios ligos nustatymas, ankstyvas atsparumo gydymui nustatymas, molekulinio heterogeniškumo įvertinimas ir ankstyvas ligos aptikimas.

cfDNR analizė yra galima alternatyva tradicinei audinio analizei, nepriklausoma nuo naviko tipo ir metastazavimo vietos. cfDNR gali būti naudojama ir tuo atveju, kai nepavyksta audinio biopsija arba ji negali būti atlikta dėl audinio neprieinamumo. cfDNR gali būti naudojama dauginiam mutacijų nustatymui parenkant individualizuotą gydymą, remiantis paciento naviko genetinė sandara [25].

Naviko dydžio stebėjimas

Stebėti naviko dydį gali būti problemiška. Po gydymo radiologiniai pokyčiai gali neatspindėti tikrojo liekamojo naviko dydžio, nes sudėtinga atskirti naviką nuo aplinkinių audinių. Pakartotinę biopsiją ir netgi plonos adatos aspiraciją liekamajam navikui histologiškai patvirtinti gali būti sunku atlikti ar ji gali būti nereprezentatyvi kiekvienam individualiam navikui dėl mėginio ėmimo variacijų. Dėl šios priežasties, esant galimybei, naviko masei po gydymo stebėti naudojami kraujo biožymenys. cfDNR pokyčiai gali įvykti anksčiau negu jie bus pastebėti vaizdo atkūrimo tyrimais [26, 27], nes cfDNR gyvavimo kraujyje pusinis laikas yra trumpas, nuo maždaug 15 minučių [25] iki keleto valandų [28]. Pokyčiai navike gali būti vertinami dienomis, o ne savaitėmis [28]. Be to, ctDNR yra specifiška individo navikui.

Minimalios liekamosios ligos stebėjimas

Po vėžio išoperavimo nėra priemonių nustatyti pacientus, kurie yra išgydyti ir kurie vis dar gali turėti liekamąją ligą. Šiuo metu išgydytų pacientų atranka grindžiama daugiausia klinikiniais ir pataloginiais kriterijais. Cirkuliuojančios navikų ląstelės buvo

naudojamos stebėti pacientus, sergančius specifinių potipių navikais, jų skaičius rodė koreliaciją su krūties, prostatos ir plaučių vėžio prognoze [29]. cfDNR yra galimas liekamosios ligos po operacijos žymuo ir turėtų būti matuojamas po operacijos, bet prieš pradėdant gydymą adjuvantais (iš viso 6–8 savaitės po operacijos) [30]. Kol kas cfDNR pokyčiai kaip atsakas į gydymą atitinka visų navikų tipų tyrimus. ctDNR kiekiai atitinka klinikinę eigą ir cfDNR didėja progresuojant ligai ir mažėja esant atsakui į gydymą.

Naviko heterogeniškumo ir molekulinio atsparumo stebėjimas

Tam tikro laipsnio heterogeniškumas būdingas visiems navikams. Navikai gali turėti ląstelių populiacijų įvairovę, rodančią klonų evoliuciją ir skirtingas mutacijų kombinacijas [31, 32]. Tai gerai žinoma anatomicinėje patologijoje: histopatologai dažniausiai pastebi navikų morfologines atmainas. Gerai žinoma ir morfologinių biožymenų variacija.

Tarptautiniuose projektuose sekvenuotas didelis skaičius pirminių navikų ir nustatytas molekulių heterogeniškumo laipsnis pirminiuose navikuose tiriant platų spektrą žmogaus navikų [33]. Naviko genomo atlasas (TCGA) išanalizavo 12 skirtingų navikų tipų ir identifikavo iš viso 127 pagrindinius genus, su vidutiniškai 2–6 pagrindinių genų mutacijomis atskirame navike [34].

cfDNR analizė gali suteikti visų paciento naviko ląstelių apžvalgą tuo pačiu metu. Masyvus paralelinis sekvenavimas (MPS) buvo taikomas kaip šios idėjos įrodymas tiriant pacientus, sergančius krūties karcinoma, norint pademonstruoti, jog plazmos cfDNR tikslinis MPS gali būti naudojamas *de novo* mutacijų identifikavimui ir somatinių genetinių pokyčių stebėjimui taikant tikslinės terapijos kursą [35]. Šis būdas padėtų išvengti sunkumų, kuriuos kelia intranavikinis genetinio heterogeniškumas [35]. Mutacijos įvairiuose navikinių ląstelių keliuose gali būti panaudotos planuojant sudėtinį gydymą – taip būtų užkirstas kelias išsivystyti navikinių ląstelių atsparumui ir pagerintas atsakas [36].

Atsparumą gydymui lemia atsi-randantys nauji molekuliniai pokyčiai naviko ląstelėse [37–39]. Dėl naviko heterogeniškumo susidaro atsparūs klonai [37–39], o stebėti atsparumo gydymui formavimąsi gali padėti cfDNR ar skystoji biopsija. Tai buvo pademonstruota leukemijos, plaučių, žarnyno navikų ir piktybinės melanomos atvejais [30, 39].

cfDNR SĄLYGOTAS PROVERŽIS PRENATALINĖJE GENETINĖJE DIAGNOSTIKOJE

Pirmieji cfDNR tyrimai biomedicinoje pradėti perinatologijos srityje vaisiaus kraujo grupei nustatyti, vėliau – vaisiaus chromosomų ligoms įvertinti. Nėščiosios kraujotakoje cirkuliuoja laisva vaisiaus DNR, kurios pėdsakus galima aptikti jau nuo 4 nėštumo savaitės. Nuo 9 savaitės vaisiaus DNR pasiekia koncentraciją, kuri būna pakankama tyrimui dėl vaisiaus chromosomų ligų (angl. *non invasive prenatal testing*, NIPT). Taikant unikalų kiekybinį VNP metodą išanalizuojamas vaisiaus ir motinos laisvos DNR rinkinys. VNP kiekvieno žmogaus yra skirtinga ir unikali. NIPT metodų efektyvumas nustatant chromosomų ligas yra 96–99 proc. Didžiausias efektyvumas pastebėtas nustatant Dauno sindromą (21 chromosomos trisomiją) (99 proc.), kiek mažesnis Edwardso (18 trisomija), Patau (13 trisomija) ir Turnerio (X monosomija) sindromus. Kai kurie šiuolaikiniai NIPT testai (*Natera Panorama*) įgalina nustatyti ne tik standartinius chromosomų skaičiaus pakitimus, bet ir smulkius chromosomų struktūros defektus, vadinamuosius mikrodelecinius sindromus (Angelmano, Prader-Willio, „katės kniaukimo“, 22q11.2 (Di Džordžo) bei 1p36 delecijos ir kt.). Šis neinvazinis testas rodo ir kūdikio lytį (100 proc. tikslumu).

Šiuolaikinis NIPT testas *Natera Panorama* šiandien prieinamas ir Lietuvos nėščiosioms (*In Medica* bei Motinos ir vaiko klinikose). Tyrimas sudaro galimybes, be standartinių chromosomų trisomijų bei mikrodelecinių sindromų, įvertinti ir retą vaisiaus ligą – triploidiją, kai būna visų chromosomų trigubas rinkinys. Pati

vaisius liga gali paveikti ir nėščiosios sveikatą – didinti eklampsijos riziką.

NIPT tyrimų tikslumas ženkliai pagerino prenatalinių tyrimų efektyvumą. Seniau plačiai taikytų biocheminių nėščiosios tyrimų (PRISCA) efektyvumas nustatant vaisiaus chromosomų ligas yra apie 80 proc., o klaidingai teigiami rezultatai sudaro 5–10 proc. Tai reiškia, kad iš 100 moterų 5–10-čiai tyrimai rodo didesnę riziką, nors iš tiesų vaikas yra sveikas. Kita vertus, tikslieji invaziniai tyrimai (amniocentezė arba choriono gaurelių biopsija) kelia komplikacijų riziką, kad ir labai nedidelę. Labai dažnai po rizikingo nėščiųjų biocheminio (PRISCA) tyrimo rezultatų, NIPT tyrimas padėtų išvengti invazinio tyrimo ir nereikalingo streso. Todėl pasaulio genetikos ekspertai rekomenduoja NIPT kaip pirmos eilės tyrimus nėščiosioms, kurios pageidauja tikslių ir saugių tyrimų.

Verta paminėti, kad kompanija „Natera“ greitai laiku pasiūlys ir komercinę cfDNR paslaugą onkologinėms ligoms tirti.

IMPACT OF CELL FREE DNA ON LUNG CANCER DIAGNOSTICS

DANIELIUS SERAPINAS, ARINA MEDVEDEVA, JUSTĖ ČEPAITĖ, GIEDRĖ MICKEVIČIŪTĖ
DEPARTMENT OF GENETICS AND MOLECULAR MEDICINE LITHUANIAN UNIVERSITY
OF HEALTH SCIENCES

Keywords: free DNA, lung cancer, diagnostics.

Summary. Traditionally, lung cancer is diagnosed using histological and imaging studies. However with a development of molecular research more biomarkers are found, which helps to classify tumours into molecular types. It enables to determine a treatment specific to each individual's tumour and achieve better outcome. However usually identification of biomarkers requires invasive procedures such as surgical excision, biopsy or a fine needle aspiration. While cell free DNA (cfDNA) detection and analysis requires minimally invasive procedure - "liquid biopsy". cfDNA can be used as a sensitive and specific biomarker for early detection of cancer, to monitor tumour burden and to detect a minimal residual disease and therapy resistance. cfDNA reflects the whole tumour genome and tumor heterogeneity, which allows to plan a personalized treatment.

LITERATŪRA

- AIHW. Cancer in Australia: An. Overview; AIHW: 2012. Internetinė nuoroda: <http://www.aihw.gov.au/publication-detail/?id=60129542359>.
- AIHW. Lung Cancer in Australia An. Overview; AIHW: 2011. Available online: <http://www.aihw.gov.au/publication-detail/?id=10737420419> (accessed on 19 June 2015).
- Li T, Kung HJ, Mack PC, Gandara DR. Genotyping and genomic profiling of non-small-cell lung cancer: Implications for current and future therapies. *J Clin Oncol* 2013; 31:1039–1049.
- Luo SY, Lam DCL. Oncogenic driver mutations in lung cancer. *Transl Respir Med* 2013; 1:1–8.
- Allred DC, Harvey JM, Berardo M, Clark GM. Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis. *Mod Pathol* 1998; 11:155–168.
- Jones HB. On a new substance occurring in the urine of a patient with mollities ossium. *Philos Trans R Soc* 1848; 138:55–62.
- Marzese DM, Hirose H, Hoon DS. Diagnostic and prognostic value of circulating tumor-related DNA in cancer patients. *Exp Rev Mol Diagn* 2013; 13:827–844.
- Fleischhacker M, Schmidt B. Circulating nucleic acids (CNAs) and cancer—A survey. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1775:181–232.
- Schwarzenbach H, Stoecklacher J, Pantel K, Goekkurt E. Detection and monitoring of cell-free DNA in blood of patients with colorectal cancer. *Ann N Y Acad Sci* 2008; 1137: 190–196.
- Diaz LA Jr, Williams RT, Wu J, Kinde I, Hecht JR, Berlin J, Allen B, Bozic I, Reiter JG, Nowak MA, et al. The molecular evolution of acquired resistance to targeted EGFR blockade in colorectal cancers. *Nature* 2012; 486:537–540.
- Rothe F, Laes JF, Lambrechts D, Smeets D, Vincent D, Maetens M, Fumagalli D, Michiels S, Drisis S, Moerman C, et al. Plasma circulating tumor DNA as an alternative to metastatic biopsies for mutational analysis in breast cancer. *Ann Oncol* 2014; 25:1959–1965.
- Heitzer E, Ulz P, Geigl JB. Circulating tumor DNA as a liquid biopsy for cancer. *Clin Chem* 2015; 61: 112–123.
- Luo J, Shen L, Zheng D. Diagnostic value of circulating free DNA for the detection of EGFR mutation status in NSCLC: a systematic review and meta-analysis. *Sci Rep* 2014; 4: 6269.
- Douillard JY, Ostoros G, Cobo M, et al. Gefitinib treatment in EGFR mutated caucasian NSCLC: circulating-free tumor DNA as a surrogate for determination of EGFR status. *J Thorac Oncol* 2014; 9: 1345–1353.
- Mok T, Wu YL, Lee JS, et al. Detection and Dynamic Changes of EGFR Mutations from Circulating Tumor DNA as a Predictor of Survival Outcomes in NSCLC Patients Treated with First-line Intercalated Erlotinib and Chemotherapy. *Clin Cancer Res* 2015; 21: 3196–3203.
- Tissot C, Toffart AC, Villar S, et al. Circulating free DNA concentration is an independent prognostic biomarker in lung cancer. *Eur Respir J* 2015; 46: 1773–1780.
- Sirera R, Bremnes RM, Cabrera A, et al. Circulating DNA is a useful prognostic factor in patients with advanced non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 2011; 6: 286–290.
- Gautschi O, Bigosch C, Huegli B, et al. Circulating deoxyribonucleic Acid as prognostic marker in non-small-cell lung cancer patients undergoing chemotherapy. *J Clin Oncol* 2004; 22: 4157–4164.
- Sozzi G, Roz L, Conte D, et al. Plasma DNA quantification in lung cancer computed tomography screening: five-year results of a prospective study. *Am J Respir Crit Care Med* 2009; 179: 69–74.
- Kumar S, Guleria R, Singh V, et al. Efficacy of circulating plasma DNA as a diagnostic tool for advanced non-small cell lung cancer and its predictive utility for survival and response to chemotherapy. *Lung Cancer* 2010; 70: 211–217.
- Ilie M, Hofman V, Long E, et al. Current challenges for detection of circulating tumor cells and cell-free circulating nucleic acids, and their characterization in non-small cell lung carcinoma patients. What is the best blood substrate for personalized medicine? *Ann Transl Med* 2014; 2: 107.
- Karachaliou N, Mayo-de Las Casas C, Queralt C, et al. Association of EGFR L858R Mutation in Circulating Free DNA With Survival in the EURTAC Trial *JAMA Oncol* 2015; 1: 149–157.
- Diaz LA, Bardelli A. Liquid biopsies: genotyping circulating tumor DNA. *J Clin Oncol* 2014; 32: 579–586.
- Oxnard GR, Paweletz CP, Kuang Y, et al. Noninvasive detection of response and resistance in EGFR-mutant lung cancer using quantitative next-generation genotyping of cell-free plasma DNA. *Clin Cancer Res* 2014; 20: 1698–1705.
- McLarty JL, Yeh C. Circulating cell-free DNA: The blood biopsy in cancer management. *MOJ Cell. Sci. Rep.* 2015; 2: 0021.
- Dawson SJ, Tsui DW, Murtaza M, Biggs H, Rueda OM, Chin SF, Dunning MJ, Gale D, Forshew T, Mahler-Araujo B, et al. Analysis of circulating tumor DNA to monitor metastatic breast cancer. *N. Engl. J. Med.* 2013; 368: 1199–1209.
- Dawson SJ, Rosenfeld N, Caldas C. Circulating tumor DNA to monitor metastatic breast cancer. *N. Engl. J. Med.* 2013; 369: 93–94.
- Diehl F, Schmidt K, Choti MA, Romans K, Goodman S, Li M, Thornton K, Agrawal N, Sokoll L, Szabo SA, et al. Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. *Nat. Med.* 2008; 14: 985–990.
- Tseng JY, Yang CY, Liang SC, Liu RS, Jiang JK, Lin CH. Dynamic changes in numbers and properties of circulating tumor cells and their potential applications. *Cancers* 2014; 6: 2369–2386.
- Diaz LA Jr, Bardelli A. Liquid biopsies: genotyping circulating tumor DNA. *J. Clin. Oncol.* 2014; 32: 579–586.
- Lianos GD, Mangano A, Cho WC, Dionigi G, Roukos DH. Circulating tumor DNA: New horizons for improving cancer treatment. *Future Oncol.* 2015; 11: 545–548.
- Wang Y, Waters J, Leung ML, Unruh A, Roh W, Shi X, Chen K, Scheet P, Vattathil S, Liang H, et al. Clonal evolution in breast cancer revealed by single nucleus genome sequencing. *Nature* 2014; 512: 155–160.
- Allison KH, Sledge GW. Heterogeneity and cancer. *Oncology* 2014; 28: 772–778.
- Kandath C, McLellan MD, Vandin F, Ye K, Niu B, Lu C, Xie M, Zhang Q, McMichael JF, Wyczalkowski MA, et al. Mutational landscape and significance across 12 major cancer types. *Nature* 2013; 502: 333–339.
- De Mattos-Arruda L, Weigelt B, Cortes J, Won HH, Ng CK, Nuciforo P, Bidard FC, Aura C, Saura C, Peg V, et al. Capturing intra-tumor genetic heterogeneity by de novo mutation profiling of circulating cell-free tumor DNA: A proof-of-principle. *Ann. Oncol.* 2014; 25: 1729–1735.
- Bozic I, Reiter JG, Allen B, Antal T, Chatterjee K, Shah P, Moon YS, Yaqubie A, Kelly N, Le DT, et al. Evolutionary dynamics of cancer in response to targeted combination therapy. *Elife* 2013; 2: e00747.
- Arnedos M, Soria JC, Andre F, Tusz T. Personalized treatments of cancer patients: A reality in daily practice, a costly dream or a shared vision of the future from the oncology community? *Cancer Treat. Rev.* 2014; 40: 1192–1198.
- Arnedos M, Vielh P, Soria JC, Andre F. The genetic complexity of common cancers and the promise of personalized medicine: Is there any hope? *J. Pathol.* 2014; 232: 274–282.
- Blair BG, Bardelli A, Park BH. Somatic alterations as the basis for resistance to targeted therapies. *J. Pathol.* 2014; 232: 244–254.