

TARTU ÜLIKOOL  
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND  
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT  
BIOTEHNOLOOGIA ÕPPETOOL

Vjacheslav Morozov

**Vedelbiopsia ja selle perspektiivid vähi diagnostikas ning  
genoomikas**

Bakalaureusetöö

12 EAP

Juhendaja  
Professor Ants Kurg PhD

Tartu 2024

## **INFOLEHT:**

### **Vedelbiopsia ja selle perspektiivid vähi diagnostikas ning genoomikas**

Viimastel aastatel on vähi diagnoosimiseks ja jälgimiseks kasutatud invasiivsed meetodid järk-järgult asendatud minimaalselt invasiivsete meetoditega, sealhulgas vedelbiopsiaga. Vedelbiopsia võimaldab kasvajaga seotud komponentide eraldamisest vähahaigete kehavedelikest, mida seejärel analüüsitakse nende nukleiinhapete ja valkude andmete osas. See muudab kahtlemata kliinilist onkoloogiat, pakkudes klassikalise biopsia ees mitmeid eeliseid, nagu näiteks turvalisem juurdepääs kasvaja proovidele, pidev jälgimine korduvate proovide võtmisega, individuaalse ravi planeerimine ja raviresistentsuse skriinimine. Vähahaigete vedelbiopsiad on avanud uusi võimalusi raviresistentsuse markerite avastamisel, pideval jälgimisel, täppisravigil ja sõeluuringul. Kuigi vedelbiopsia tehnoloogia ei ole veel diagnostiline meetod, vaid seda kasutatakse ainult abitehnoloogiana, avab selle mitteinvasiivne olemus suurepärased väljavaated kliinilise onkoloogia arenguks.

Märksõnad: vedelbiopsia, kasvaja, vähirakk, CTC, vähidiagnoos

B200 Tsütoloogia, onkoloogia, kantseroloogia

### **Liquid biopsy and its perspectives in cancer diagnostics and genomics**

In recent years, invasive methods used to diagnose and monitor cancer have gradually been replaced by minimally invasive methods, especially liquid biopsy. Liquid biopsy allows the isolation of tumor-related components from the body fluids of cancer patients, which are then analyzed for their nucleic acid and proteomic data. It will undoubtedly change clinical oncology, offering several advantages over classic biopsies, such as safer access to tumor samples, continuous monitoring with repeated sampling, individualized treatment planning, and screening for treatment resistance. Liquid biopsies of cancer patients have opened up new opportunities in the discovery of markers of treatment resistance, continuous monitoring, precision treatment, and screening. Although liquid biopsy technology is not a diagnostic method, it is used only as an auxiliary technology. Its non-invasive nature opens up excellent prospects for the development of clinical oncology.

Keywords: liquid biopsy, tumor, cancer cell, CTC, cancer diagnosis

B200 Cytology, oncology, cancerology

## **SISUKORD**

KASUTATUD LÜHENDID .....	4
SISSEJUHATUS .....	5
1 KIRJANDUSE ÜLEVAADE .....	6
1.1 ÜLDINE INFO VÄHIST .....	6
1.2 MIS ON VEDELBIOPSIA .....	6
1.3 KASVAJA DNA VABANEMINE .....	9
1.3.1 TSIRKULEERIV RAKUVABA DNA .....	10
1.3.2 TSIRKULEERIV VÄHI DNA .....	11
1.4 EKSTRATSELLULAARSED VESIHKULID .....	13
1.5 TSIRKULEERIVAD VÄHIRAKUD .....	15
1.6 HEALOOMULINE KASVAJA .....	17
1.7 RNA .....	19
1.8 KASVAJAGA SEOTUD TROMBOTSÜÜDID .....	21
1.9 ANALÜÜTILINE TÖÖ VEDELBIOPSIA PUHUL .....	22
1.10 VÄHI TÜÜBI JA ASUKOHA TUVASTAMINE VEDELBIOPSIA ABIL .....	25
2 UURIMUS .....	27
2.1 TÖÖ EESMÄRGID .....	27
2.2 MATERJAL JA METOODIKA .....	27
2.3 TULEMUSED JA ARUTELU .....	27
KOKKUVÕTE .....	30
KIRJANDUSE LOETELU .....	32
LIHTLITSENTS .....	41

## KASUTATUD LÜHENDID

ALK	( <i>anaplastic lymphoma kinase</i> ) Anaplastilise lümfoomi kinaas
CCC	( <i>circulating cancer cells</i> ) Tsirkuleerivad vähirakud
CTC	( <i>circulating tumor cells</i> ) Tsirkuleerivad kasvjarakud
cfDNA	( <i>cell-free DNA</i> ) Tsirkuleeriv rakuvaba DNA
cfRNA	( <i>cell-free RNA</i> ) Tsirkuleeriv rakuvaba RNA
ctDNA	( <i>circulating tumor DNA</i> ) Tsirkuleeriv vähi DNA
ddPCR	( <i>droplet digital PCR</i> ) Digitaalne tilkade polümeraasi ahelreaktsioon
EGFR	( <i>epidermal growth factor receptor</i> ) Epidermaalse kasvufaktori retseptor
EGFR <sup>vIII</sup>	( <i>epidermal growth factor receptor variant III</i> ) Epidermaalse kasvufaktori retseptor variant III
EV	( <i>extracellular vesicle</i> ) Ekstratsellulaarsed vesiikulid
exDNA	( <i>extracellular DNA</i> ) Ekstratsellulaarne DNA
FDA	( <i>Food and Drug Administration</i> ) Ameerika Ühendriikide Toidu- ja Ravimiamet
lncRNA	( <i>long non-coding RNA</i> ) Pikk mittekodeeriv RNA
MRD	( <i>minimal residual disease</i> ) Minimaalne jääkhaigus
mRNA	( <i>messenger RNA</i> ) Messenger RNA
miRNA	( <i>micro RNA</i> ) MikroRNA
NGS	( <i>next generation sequencing</i> ) Järgmise põlvkonna sekveneerimine
NIPT	( <i>non-invasive prenatal testing</i> ) Mitteinvasiivne prenataalne testimine
qPCR	( <i>quantitative PCR</i> ) Kvantitatiivne polümeraasi ahelreaktsioon
snoRNA	( <i>small nucleolar RNA</i> ) Väike nukleolaarne RNA
SNP	( <i>single-nucleotide polymorphism</i> ) Üksiknukleotiidi polümorfism
TEP	( <i>tumor-educated platelets</i> ) Kasvajaga seotud trombotsüüdid
TTF-1	( <i>thyroid transcription factor-1</i> ) Kilpnäärme transkriptsiooni-faktor-1

## SISSEJUHATUS

Vedelbiopsia on kaasaegne meetod, mida praegu kasutatakse vähi diagnoosimisel ja jälgimisel abivahendina, aga millest tulevikus võib kujuneda oluline tööriist. Tänu sellele on võimalik tuvastada verest või muudest kehavedelikest erinevaid rakke, nende DNA-d ja muid komponente. See meetod võib olla väga kasulik diagnostikutele ja onkoloogidele, sest erinevalt klassikalisest biopsiast ei nõua vedelbiopsia patsiendiga seotud invasiivseid protseduure ega põhjusta talle kahju. Samas klassikaline biopsia eeldab proovi võtmist vajalikust organist või moodustisest. Küll aga ei ole siiani saavutatud üksmeelt vedelbiopsia kui diagnostikameetodi täpsuse osas (Malapelle et al., 2022). Selle põhjus on see, et haigusega seotud DNA-d on vereplasmas äärmiselt vähe. Siiski võib selle kogus olenevalt patsiendist või huvipakkuvast haigusest erineda. Uurimiseks sobivate rakkude arv ja ctDNA kogus kasvab aga võrdeliselt vähi arenguga, mis tõstab selle meetodi täpsust. Metastaatilise leviku või haiguskoormuse astme tõttu on sama haiguse tüübi ja staadiumiga inimestel kogus erinev ning see muudab haiguse progresseerumise hindamiseks standardse läve kehtestamise keeruliseks (Alexander & Mark, 2018).

Vedelbiopsia meetodi arendamine võib positiivselt mõjutada diagnostilist meditsiini, sest inimvere või muude bioloogiliste vedelike kaudu saab vajaliku teabe vähi olemasolu detekteerimiseks ja edasiseks ravimiseks. See lihtsustab analüüse ja võimaldab arstidel neid läbi viia patsientide jaoks ohutult.

Minu töö põhieesmärk on anda kirjanduse põhjal ülevaade erinevatest vedelbiopsia meetoditest ja võimalustest ning juba saavutatud tulemustest. Samuti uurida selle diagnostikameetodi edasisi kasutusvõimalusi ja hinnata kirjanduse põhjal nende praktikas rakendamise perspektiive.

# 1 KIRJANDUSE ÜLEVAADE

## 1.1 ÜLDINE INFO VÄHIST

Vähk kujutab tõsist probleemi, nimelt sureb Ameerika Vähiliidu andmetel aastas enam kui 10 miljonit inimest vähi tõttu (L. Chang et al., 2022). Samas langeb see arv iga aastaga, mis on seletatav meditsiini arenguga vähi diagnoosimisel ja ravi vallas selle varases staadiumis. Kuid hoolimata sellest on numbrid endiselt märkimisväärsed. Just selletõttu teevad teadlased ja valitsusasutused suuri jõupingutusi ja investeerivad teadusuuringutesse, püüdes mõista võimalusi surma ärahoidmiseks ja tulevaste vähihaigete elude päästmiseks. Vähk võib mõjutada inimese iga kehaosa põhjustades keha jaoks ebatavaliste rakkude kasvu, mis võivad hiljem kontrollimatult paljuneda. Samuti võivad vähkkasvajad levida lähedalasuvatesse kudedesse ning organitesse ja liikuda keha kaugematesse kohtadesse, moodustades seal uusi kasvaja. Seda protsessi nimetatakse metastaseerumiseks. Ülaltoodud põhjustel peetakse vähki väga raskesti ravitavaks haiguseks. (Pallari & Lewison, 2022).

Lisaks sellele, et vähki on raske ravida, on vähi teket raske ennustada, kuna see ei sõltu soost, vanusest, rassist ega teistest sarnastest teguritest. Siiski on teadlaste poolt eraldi välja toodud mõned riskifaktorid (tabel 1). Need tegurid võivad olla nii välised kui ka sisemised, kuid samas ei ole need garantiiks vähi tekkel või puudumisel (Pallari & Lewison, 2022).

**Tabel 1.** Vähi riskifaktorid (Pallari & Lewison, 2022) järgi

Sisemised tegurid	Välised tegurid
Vananemine Pärilikkus	Füüsilised kantserogeenid, nagu UV-kiirgus ja mõned kemikaalid  Suitsetamine

## 1.2 MIS ON VEDELBIOPSIA

Vedelbiopsia on vähiuuringute kaasaegne meetod, mis on hõlbustanud vähi tuvastamise protseduuri, kuid hetkel peetakse seda vaid abistavaks diagnostiliseks vahendiks. Küll aga on diagnostiline meetod selle peamine alternatiiv – invasiivne koebiopsia. See on kõige levinum diagnostiline tööriist, mille käigus võetakse tavaliselt primaarsest kasvajast

koeproov selle bioloogilise profiili määramiseks. Võrdluseks on vedelbiopsia, mille käigus võetakse kehavedelikku (verd) ja analüüsitakse selle koostist (L. Chang et al., 2022). Kui inimesel on vähk, peegeldab see ulatuslikke pahaloomulisi tunnuseid, mida on võimalik leida inimese veres ringlevast bioloogilisest materjalist (tabel 2). Just tänu nendele tehnoloogiatele vähendab vedelbiopsia vajadust invasiivsete diagnostikameetodite järele ning suurendab vähi varajase avastamise täpsust ja ohutust kliinilistes tingimustes (Malapelle et al., 2022).

**Tabel 2.** Vedelbiopsia erinevad võimalused vähi tuvastamiseks verest (Chen et al., 2022) järgi

Isoleeritud materjal	Biomarkerid	Tuvastamistehnoloogiad	Kliiniline rakendus
CTC-d	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Suurus</li> <li>• Arv</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• CellSearch™</li> <li>• Mikroskoopia</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Diagnoos</li> <li>• MRD</li> </ul>
Trombotsüüdid	<ul style="list-style-type: none"> <li>• DNA</li> <li>• RNA</li> <li>• Valgud</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Järgmise põlvkonna sekveneerimine</li> <li>• Geenikiibid</li> <li>• Digital Droplet PCR</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Prognosis</li> <li>• Teraapia juhendamine</li> </ul>
Eksosoomid ehk (EV)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Geneetiline muutus</li> <li>• Epigeneetiline muutus</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Western blot</li> <li>• Valgu ekspressioon</li> <li>• Massispektromeetria</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Teraapia jälgimine</li> </ul>
ctDNA	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Geneetiline muutus</li> <li>• Epigeneetiline muutus</li> </ul>		
cfRNA	<ul style="list-style-type: none"> <li>• RNA taseme muutus</li> <li>• RNA valgu kompleks</li> </ul>		

Praegu on lisaks vähianalüüsile aktiivses kasutuses veel üks vedelbiopsia meetod. Selle nimetus on mitteinvasiivne sünnieelne testimine (*Non-Invasive Prenatal Testing* -NIPT). Mitteinvasiivne sünnieelne testimine on kiiresti arenev looteuuringute valdkond. See

progressiivne meetod võimaldab varakult avastada loote kromosomaalseid kõrvalekaldeid ja suuremaid aberratsioone, analüüsides loote rakuvaba DNA-d (cfDNA) ema vereringes (Abedalthagafi et al., 2023). NIPT kasutuselevõtt on muutnud sünnieelset hooldust, pakkudes ohutumalt ja vähem invasiivset alternatiivi traditsioonilistele invasiivsetele meetoditele, nagu amniotsentees ja koorioni biopsia.

Kõige levinumad analüütilised meetodid NIPT puhul hõlmavad järgmise põlvkonna sekveneerimist (*next generation sequencing* – NGS), suunatud sekveneerimist ja üksiknukleotiidsete polümorfismide (*Single Nucleotide Polymorphism* – SNP) genotüüpiseerimist (Bedei et al., 2021). Need meetodid on kõrge tundlikkuse ja spetsiifilisusega võimaldades edukalt tuvastada enamlevinud aneuploidiaid, nagu trisoomia 21 (Downi sündroom), trisoomia 18 (Edwardsi sündroom) ja trisoomia 13 (Patau sündroom) ning suuremaid aberratsioone. Nii on NIPT meetodit hiljuti kasutatud subkromosomaalsete kõrvalekallete, näiteks mikrodeletsioonide ja duplikatsioonide tuvastamiseks (Xue et al., 2022).

Lisaks väärtuslikule teabele loote kromosomaalse maastiku, sealhulgas aneuploidiate ja subkromosomaalsete kõrvalekallete kohta annab NIPT infot ka loote soo, RhD staatuse ja isalt päritud autosomaalsete dominantsete häirete kohta (Chitty & Lo, 2015). Siiski on oluline märkida, et praegu ei ole NIPT veel diagnostiline vahend vaid seda kasutatakse skriinimiseks ning vastava leiu korral tuleks selle kinnituseks teha ka invasiivne test. Lisaks ei pruugi NIPT tuvastada kõiki kromosomaalseid kõrvalekaldeid, mis toob kaasa valenegatiivseid või -positiivseid tulemusi, mistõttu on täpsuse parandamiseks vaja täiendavaid uuringuid ja arendustegevust (Xue et al., 2022).

NIPT tööpõhimõte põhineb platsentast vabaneva ja ema vereringes leiduva loote cfDNA analüüsil (Abedalthagafi et al., 2023), mis isoleeritakse, amplifitseeritakse ja analüüsitakse kromosomaalsete aberratsioonide tuvastamiseks täiustatud sekveneerimistehnoloogiate abil. Tavaliselt on loote cfDNA osakaal ema plasmas umbes 10–15%, mis võib varieeruda sõltuvalt sellistest teguritest nagu rasedusaeg, ema kaal ja platsenta mosaiiksus (Barrett et al., 2017).

Kokkuvõtteks võib öelda, et NIPT on revolutsiooniliselt muutnud sünnieelset hooldust, pakkudes mitteinvasiivset ja täpset meetodit loote kromosomaalsete kõrvalekallete tuvastamiseks. Täiustatud sekveneerimistehnoloogiad ja analüütilised meetodid võimaldavad teha kõikehõlmavat analüüsi, andes väärtuslikku teavet loote kromosoomimaastiku kohta.

### 1.3 KASVAJA DNA VABANEMINE

Kasvaja DNA vabanemine on vedelbiopsia kriitiline stadium, mis sillutab teed vähi varajaseks avastamiseks, ravivastuse jälgimiseks ja võimalike terapeutiliste sihtmärkide tuvastamiseks. Kasvaja DNA vabaneb vereringesse erinevate mehhanismide kaudu, mis hõlmavad apoptoosi, nekroosi ja aktiivset sekretsiooni kasvajarakkude poolt (Wan et al., 2017).

**Apoptoos:** Apoptoos ehk programmeeritud rakusurm on tervetes ja vähirakkudes loomulik protsess. Apoptoosi käigus genoomne DNA fragmenteerub ja vabaneb vereringesse. ctDNA fragmendid on üldiselt lühikesed, pikkusega 120-220 aluspaari (Dao et al., 2023).

**Nekroos:** Nekroos on rakusurma vorm, mis on põhjustatud hüpoksiast, toitainete puudusest või põletikust. Erinevalt apoptoosist iseloomustab nekroosi rakumembraani purunemine ja sellele järgnev raku sisu, sealhulgas DNA vabanemine rakuvälisesse ruumi (Lee et al., 2018).

**Aktiivne sekretsioon:** Teatud kasvajarakud vabastavad DNA otse vereringesse. See bioloogiline mehhanism toimib mikrovesiikulite ja eksosoomide kaudu. Need kapslid on membraaniga suletud osakesed, mis sisaldavad suurt hulka bioloogilisi molekule, nagu DNA fragmente, valke ja mitut RNA vormi (Dilsiz, 2022).

Kasvaja DNA vabanemist vereringesse mõjutavad mitmed tegurid, sealhulgas kasvaja suurus, staadium, histoloogia ja patsiendiga seotud tegurid. Need tegurid mõjutavad kasvaja DNA üldist kontsentratsiooni veres ning tõstavad vedelbiopsiatestide tundlikkust ja spetsiifilisust (Sánchez-Herrero et al., 2022).

Kasvaja DNA vabanemine vereringesse mängib vedelbiopsia puhul olulist rolli, kuna see võimaldab varakult avastada vähki, isegi enne sümptomite ilmnemist või kuvamismeetodite abil avastatud kõrvalekalded (Mouliere et al., 2018). Üldiselt on kasvaja DNA vabanemine vedelbiopsiarakenduste alus, pakkudes mitteinvasiivset ja reaalajas lähenemist vähiravile.

Vaatamata vedelbiopsia võimalikele eelistele on kasvaja DNA vabanemise tuvastamine mitmete tegurite tõttu endiselt keeruline. Esiteks, madal kontsentratsioon vereringes, eriti varajases staadiumis vähi korral, nõuab tundlike ja spetsiifiliste tehnikate kasutamist (Newman

et al., 2014). Järelikult on vaja jätkata uurimis- ja arendustegevust, et ületada need väljakutsed ja parandada kasvaja DNA vabanemise tuvastamist vedelbiopsias.

### 1.3.1 TSIRKULEERIV RAKUVABA DNA

Tsirkuleeriv rakuvaba DNA (*cell-free* -cfDNA) on vereringes leiduv vaba DNA, mis pärineb normaalsetest ja kasvajarakkudest. Hiljuti on see pälvinud üha suuremat tähelepanu kui võimalik mitteinvasiivne biomarker vähi tuvastamiseks ja jälgimiseks vedelbiopsia abil (Dao et al., 2023).

Vähahaigetel on cfDNA ja sealhulgas ctDNA tase tavaliselt kõrgem kui tervetel inimestel (Mouliere et al., 2018). Rakuvaba DNA (cfDNA) koosneb peamiselt lühikestest DNA fragmentidest, mille pikkus on alla 200 aluspaari (bp) ja mida leidub tavaliselt madalates kontsentratsioonides. Rakuvaba DNA suhteliselt lühike eluiga vereringes viitab pidevale vabanemisele surevatest rakkudest, millele järgneb kiire lagunemine või filtreerimine. CfDNA fragmentide suuruste jaotus ühtib selle päritoluga, näidates selgeid piike, mis on seotud nukleosoomidega (~147 aluspaari) ja kromosoomidega (nukleosoom + linkerhistoon; ~167 aluspaari). Lisaks väärrib märkimist, et mõned cfDNA-d võivad tsirkuleerida pigem nukleosoomide või kromatosoomidena, mitte eksisteerida vaba DNA-na (Snyder et al., 2016). CfDNA kontsentratsioon tervetel inimestel on vahemikus 0 kuni 100 ng/ml, samas kui vähahaigetel võib see olla kõrgem kuni 1000 ng/ml (Kustanovich et al., 2019).

Vaatamata cfDNA tohutule potentsiaalile vedelbiopsias, tuleb selle kliinilise kasulikkuse täielikuks ärakasutamiseks lahendada mitmeid väljakutseid:

Ekstratsellulaarse DNA (cfDNA) vabanemist võivad soodustada mitmesugused tegurid, sealhulgas kaasuvad haigused, põletikud, koekahjustused ja füüsiline koormus. Tervetel inimestel aitab vereloome küpsemine oluliselt kaasa standardsele cfDNA tasemele (Fernández-Domínguez et al., 2021).

Bioloogiline varieeruvus: mitmed tegurid, nagu vanus ja sugu võivad mõjutada cfDNA taset veres, raskendades cfDNA andmete tõlgendamist (Mouliere et al., 2018). Selle probleemi lahendamiseks töötavad teadlased võrdlusvahemike loomise ja cfDNA analüüsi standardiseeritud meetodikate väljatöötamise kallal.

Praegu on vaja cfDNA eraldamiseks, kvantifitseerimiseks ja analüüsimiseks standardiseeritud protokolle. Standardiseeritud meetodite väljatöötamine ja nende valideerimine erinevates laborites on cfDNA usaldusväärseks ja reprodutseeritavaks kasutamiseks kliinilises praktikas ülioluline (Merker et al., 2018).

### 1.3.2 TSIRKULEERIV VÄHI DNA

Vähahaigetel pärineb cfDNA osa, mida nimetatakse kasvaja ringlevaks DNA-ks (*circulating tumor-ctDNA*), kasvajarakkudest ja kannab kasvajaspetsiifilisi mutatsioone. ctDNA kontsentratsioon võib ületada 10% cfDNA kogusest, kuid selle kontsentratsioon võib varieeruda sõltuvalt kasvaja suurusest, vaskulaarsusest ja asukohast (Arisi et al., 2022). CtDNA tuvastamine ja analüüs pakub vähktõve diagnostikas mitteinvasiivset meetodit kasvaja kohta olulise geneetilise teabe saamiseks. Kuid praegu on sellel meetodil ka negatiivseid külgi, näiteks: võib ctDNA fragmenteerumine põhjustada mittetäieliku või ebatäpse genoomse teabe, mis raskendab vedelbiopsia tulemuste tõlgendamist (Mouliere et al., 2018). Samuti võib ctDNA analüüsi täpsust mõjutada ka bioloogiline ja tehniline varieeruvus, sealhulgas kasvaja DNA vabanemiskiiruste ja eelanalüütiliste tegurite erinevused (Sánchez-Herrero et al., 2022).

Esmakordselt täheldasid ctDNA esinemist vähahaigete veres 1948. aastal Mandel ja Metais (Mandel & Métais, 1948). Kuid alles täiustatud molekulaarsete tehnikate tulekuga 21. sajandil pälvis ctDNA kui võimalik vähi biomarker märkimisväärset tähelepanu (Wan et al., 2017). Tundlike tehnikate, nagu ddPCR (*Droplet Digital Polymerase Chain Reaction - ddPCR*) ja järgmise põlvkonna sekveneerimine, väljatöötamine on võimaldanud teadlastel tuvastada ja kvantifitseerida ctDNA-d madalatel kontsentratsioonidel isegi varajases staadiumis vähkkasvajate korral (Wan et al., 2017). Kasvaja kvantifitseerimine on näidanud, et 1. staadiumi haigusega inimestel on vähem kui 10 ctDNA koopiat 5 ml plasma kohta (Alexander & Mark, 2018). Järgmise põlvkonna sekveneerimise ja ddPCR-tehnoloogia areng on parandanud ctDNA tuvastamise tundlikkust, kuid vaja on täiendavaid tehnoloogilisi täiustusi.

Vereringes esineva ctDNA taset võivad mõjutada mitmed tegurid. Nende hulka kuuluvad kasvaja suurus, staadium, histoloogiline tüüp ning patsiendi vanus, sugu ja üldine tervislik seisund (Bettegowda et al., 2014).

Kasvaja suurus ja staadium: suuremad ja hilisema staadiumi kasvajakid kipuvad vabastama vereringesse suuremas koguses ctDNA-d (Mouliere et al., 2018). See on tõenäoliselt tingitud rakkude suurenenud ringlusest ja nekroosist kasvaja massis.

Histoloogiline tüüp: on näidatud, et teatud kasvajatüübid, nagu kopsu-, maksa- ja jämesoolevähk, vabastavad rohkem ctDNA-d kui teised vähid (Schwarzenbach et al., 2011).

Patsiendi tegurid: vanus, sugu ja üldine tervislik seisund võivad samuti mõjutada ctDNA taset. Näiteks võib vanematel patsientidel või kaasuvate haigustega patsientidel olla kõrgem taustrakuvaba DNA tase, mistõttu on ctDNA tuvastamine keerulisem (Mouliere et al., 2018). Seetõttu on täpsete ja usaldusväärsete vedelbiopsiameetodite väljatöötamiseks oluline mõista kasvaja DNA vabanemist reguleerivaid tegureid.

Varajane avastamine: ctDNA olemasolu veres võib olla potentsiaalne biomarker vähi varajaseks avastamiseks. Mitmed uuringud on näidanud ctDNA analüüsi võimet tuvastada erinevat tüüpi vähki, sealhulgas kopsu-, rinna- ja kolorektaalvähki (Bettegowda et al., 2014). Määrares kindlaks spetsiifilised geneetilised muutused ctDNA-s, võib vedelbiopsia anda väärtuslikku teavet vähi diagnoosimiseks ja klassifitseerimiseks.

Prognoos: ctDNA esinemist vähihaigete veres on seostatud halva prognoosiga erinevate vähitüüpide, nagu kolorektaalne, rinnavähk ja kopsuvähk (Bettegowda et al., 2014).

Ravi jälgimine: ctDNA abil saab jälgida vähipatsientide ravivastust. Muutused ctDNA tase- metes aja jooksul võivad anda reaajas tagasisidet konkreetse ravi efektiivsuse kohta (Dawson et al., 2013). Lisaks võib ctDNA analüüs aidata tuvastada ravimiresistentsuse tekkimist, võimaldades arstidel ravistrateegiaid vastavalt kohandada (Murtaza et al., 2013).

Minimaalse jääkhaiguse tuvastamine: ctDNA-d saab kasutada biomarkerina vähiravi järel minimaalse jääkhaiguse (*minimal residual disease* - MRD) tuvastamiseks. CtDNA esinemine veres pärast ravi võib viidata jääkkasvajarakkude olemasolule, mis võib viia vähi kordumiseni (Tie et al., 2016). MRD tuvastamisega võib vedelbiopsia aidata suunata ravijärgset jälgimist ja teavitada võimalikest sekkumistest vähi retsidiivi ennetamiseks või edasilükkamiseks.

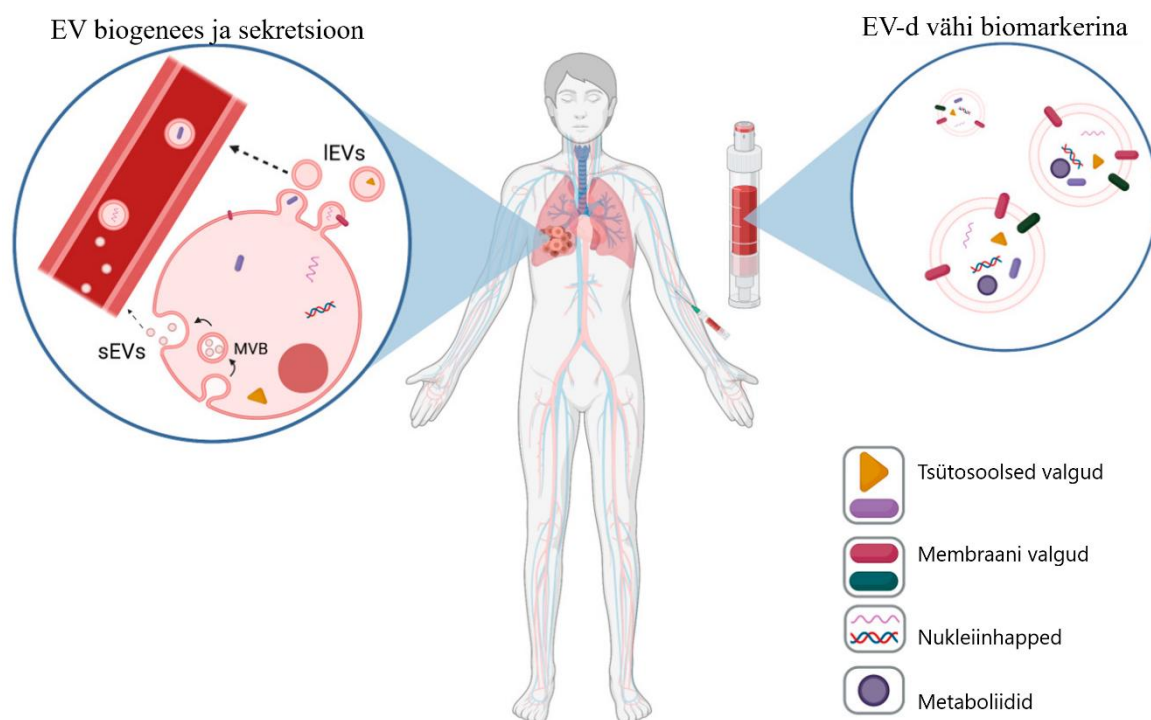
Vaatamata märkimisväärsetele edusammudele ctDNA-uuringutes, tuleb lahendada mitmeid väljakutseid. Üks peamisi väljakutseid on vajadus standardiseeritud meetodite järele ctDNA eraldamiseks, kvantifitseerimiseks ja analüüsimiseks. Lisaks vajab täiendavat uurimist

ctDNA bioloogiline ja kliiniline tähtsus erinevates vähitüüpides ja staadiumides (Wan et al., 2017).

## 1.4 EKSTRATSELLULAARSED VESIİKULID

Ekstratsellulaarsed vesiikulid (EV) on rakkude poolt rakuvälisesse keskkonda eraldatavad väikesed membraaniga ümbritsetud osakesed. Nad mängivad olulist rolli rakkudevahelises suhtluses ja on hiljuti pälvinud märkimisväärset tähelepanu tänu nende võimalikule kasutamisele vedelbiopsias. Selles kontekstis on EV-d kujunenud paljulubavaks biomarkerite allikaks, mida saab kasutada haiguste varajaseks avastamiseks, prognoosimiseks ja ravivastuse jälgimiseks (joonis 1). EV-de arv kehavedelikes varieerub olenevalt haigusseisundist ja võib olla vahemikus  $10^7$  kuni  $10^{13}$  osakest  $\text{mL}^{-1}$  kohta (Min et al., 2021).

Kasvajarakud vabastavad plasmamembraanist ja endosoomidest pärinevaid EV-sid, mis vabanevad multivesikulaarsetest kehavedelikesse, näiteks verre (vasak paneel). Neid kasvaja-EV-sid saab hinnata vedelbiopsiate abil (parem paneel) ja kasvajaspetsiifiliste EV-valkude, nukleiinhapete või metaboliitide ekspressiooni põhjal saab neid kasutada vähi biomarkeritena.



**Joonis 1.** Ekstratsellulaarsed vesiikulid vähi biomarkerina. (Irmer et al., 2023) järgi.

Ekstratsellulaarsed vesiikulid võib nende biogeneesi ja suuruse alusel liigitada kolme põhitüüpi: eksosoomid (30-150 nm), mikrovesiikulid (100-1000 nm) ja apoptootilised kehad (500-2000 nm) (Yáñez-Mó et al., 2015). Eksosoomid moodustuvad endosomaalse membraani sisemise pungumise kaudu, samas kui mikrovesiikulid tekivad plasmamembraani väljapoole pungumise kaudu. Teisest küljest vabanevad apoptootilised kehad apoptoosi või programmeeritud rakusurma käigus.

EV-d kannavad laias valikus bioaktiivseid molekule, sealhulgas valke, lipiide ja nukleiinhappeid (nii kodeerivaid kui ka mittekodeerivaid RNA-sid), mis peegeldavad nende vanemrakkude molekulaarset signatuuri (Tkach & Théry, 2016). Nende ainulaadne koostis võimaldab EV-del vahendada erinevaid bioloogilisi protsesse, nagu rakkudevaheline signalisatsioon, immuunregulatsioon, kudede parandamine ja patoloogilised seisundid, nagu vähi progresseerumine, põletik ja neurodegeneratsioon.

Haiguspetsiifiliste molekulide olemasolu EV-des on muutnud need atraktiivseteks kandidaatideks vedelbiopsia rakenduste jaoks. Näiteks vähi korral on kasvajast pärinevatel EV-del näidatud geneetilisi muutusi, nagu mutatsioonid ja koopiate arvu variatsioonid, mis esindavad kasvaja molekulaarset profiili (Kalluri & LeBleu, 2020). Lisaks on uuringud näidanud, et veres ringlevaid EV-sid saab isoleerida ja analüüsida, et tuvastada vähiga seotud biomarkereid, nagu onkoproteiinid ja kasvajast pärinevad RNA-d (Becker et al., 2016).

Vedelbiopsia EV-d pakuvad traditsioonilise koebiopsia ees mitmeid eeliseid, näiteks minimaalne invasiivsus, mis võimaldab korduvat proovide võtmist ning haiguse progresseerumise ja ravivastuse reaajas jälgimist. EV eraldamine erinevatest biovedelikest, mis suurendab biomarkerite ligipääsetavust erinevates kliinilistes kontekstides ja EV analüüs võib anda terviklikuma pildi kasvaja heterogeensusest, kuna need võivad koguda geneetilist ja molekulaarset teavet mitmest kasvaja asukohast.

Väljakutsed ja tulevikuperspektiivid:

Hoolimata mikrofluidikaseadmete paljutöötavast potentsiaalist vedelbiopsia puhul, tuleb enne nende laialdast kasutamist kliinilises praktikas lahendada mõned väljakutseid. Esiteks luua standardiseeritud meetodid EV isoleerimiseks ja iseloomustamiseks (Mateescu et al., 2017). EV-de isoleerimiseks biovedelikest on kasutatud erinevaid tehnikaid, nagu

ultratsentrifuugimine, suuruseralduskromatograafia ja immunoafiinsus kromatograafia. Need meetodid erinevad aga saagise, puhtuse ja tõhususe poolest, mis võib mõjutada järgnevat analüüsi ja tulemuste tõlgendamist.

Teine väljakutse on EV sisalduse suur varieeruvus üksikisikute vahel ja haigusega mitteseotud molekulide olemasolu, mis võivad segada haigusspetsiifiliste biomarkerite tuvastamist (Van Niel et al., 2018). Sellega seoses võib täiustatud analüütiliste tehnikate, näiteks järgmise põlvkonna sekveneerimise, proteoomika ja ühe EV analüüsi integreerimine parandada EV-põhise vedelbiopsia spetsiifilisust ja tundlikkust.

## 1.5 TSIRKULEERIVAD VÄHIRAKUD

Tsirkuleerivad vähirakud (*circulating cancer cells* - CCC), tuntud ka kui tsirkuleerivad kasvajakarakud (*circulating tumor cells* - CTC), on vähirakud, mis on primaarsest kasvajast eraldunud ja sisenenud vereringesse. Need rakud mängivad olulist rolli metastaaside tekkes, protsessis, mille käigus vähk levib teistesse kehaosadesse (Alix-Panabières & Pantel, 2021). CTC tuvastamiseks veres kasutatakse samuti vedelbiopsiat. See on hiljuti pälvinud märkimisväärset tähelepanu, kuna sellel on potentsiaal parandada vähi diagnoosimist, prognoosi ja ravi jälgimist.

CTC-de tuvastamine ja eraldamine on nende harulduse ja heterogeensuse tõttu keeruline. CTC-de arv varieerub sõltuvalt vähi tüübist ja staadiumist, kusjuures kontsentratsioonid on tavaliselt umbes 10 rakku milliliitri vere kohta (L. Chen et al., 2017). Nende rakkude püüdmiseks on välja töötatud erinevaid meetodeid, sealhulgas suurusepõhine filtreerimine, immunomagnetiline eraldamine ja mikrofluidikatehnikad (Mohamadi et al., 2015). Nende hulgas on CellSearch<sup>®</sup> süsteem praegu ainus (Food and Drug Administration) FDA poolt heaks kiidetud platvorm CTC tuvastamiseks metastaatilise rinna-, kolorektaal- ja eesnäärmevähi korral (Cristofanilli et al., 2004). Käimasolevate uuringute eesmärk on aga parandada CTC avastamismeetodite tundlikkust ja spetsiifilisust, et aidata varakult diagnoosida vähki ja mõista paremini kasvajabioloogiat.

CCC kliiniline tähtsus:

### 1. Prognostiline väärtus

Mitmed uuringud on näidanud, et CTC-de esinemine veres on seotud erinevate vähitüüpide halva prognoosiga. Näiteks Cristofanilli ja kolleegide uuringud näitasid, et metastaatilise rinnavähiga patsientide kõrgemad CTC kogused korreleerusid progresseerumisvaba elulemuse ja üldise elulemusega (Cristofanilli et al., 2004). Sarnastest leidudest on teatatud kolorektaal-, eesnäärme- ja kopsuvähi puhul (Salu & Reindl, 2024).

### 2. Teraapia jälgimine

CTC-sid tunnustatakse üha enam kui väärtuslikku vahendit ravivastuse reaalsajas jälgimiseks. CTC arvu muutused ravi ajal võivad anda olulist teavet ravi efektiivsuse kohta ja aidata suunata kliinilisi otsuseid. Näiteks Salu ja Reindl, näitasid, et CTC arvu muutused võivad ennustada keemiaravi saavate eesnäärmevähiga patsientide kliinilist tulemust (Salu & Reindl, 2024).

### 3. Molekulaarne iseloomustus

CTC-de molekulaarne iseloomustus võib anda ülevaate kasvaja progresseerumise ja metastaaside aluseks olevatest molekulaarsetest mehhanismidest ning võimaldada potentsiaalsete terapeutiliste sihtmärkide tuvastamist. Lisaks võib CTC-de geneetilise ja fenotüübilise heterogeensuse uurimine aidata mõista raviresistentsust ja tuvastada isikupärastatud ravi jaoks kasutatavaid mutatsioone (Bettegowda et al., 2014).

Väljakutsed ja tulevikuväljavaated

Hoolimata CTC-de paljutöotavast potentsiaalist vähiravis, tuleb nende täieliku kliinilise kasulikkuse realiseerimiseks lahendada mõned väljakutseid. Esiteks standardiseeritud protokollide väljatöötamine CTC tuvastamiseks ja isoleerimiseks, tuvastamismeetodite tundlikkuse ja spetsiifilisuse parandamine ning CTC heterogeensuse bioloogilise tähtsuse mõistmine. Lisaks võib CTC analüüsi integreerimine teiste vedelbiopsia komponentidega, nagu ctDNA ja EV-d, anda terviklikuma ülevaate kasvaja bioloogiast ning parandada vähi diagnoosimist ja ravi (Alix-Panabières & Pantel, 2021).

Ringlevatel vähirakkudel on märkimisväärne perspektiiv parandada vähi diagnoosimist, prognoosi ja terapeutilist jälgimist vedelbiopsia abil. Olemasolevate väljakutsete ületamiseks ja CTC-de täieliku potentsiaali vabastamiseks kliinilises onkoloogias on vaja teha jätkuvaid jõupingutusi teadus- ja arendustegevuseks.

## 1.6 HEALOOMULINE KASVAJA

Erinevalt pahaloomulistest kasvajatest on healoomulised kasvajakasvajad mittevähkkasvajad, mis ei tungi külgnevatesse kudedesse ega levi kaugematesse kehaosadesse (tabel 3). Nende olemasolu võib siiski mõjutada tervist ja nõuda jälgimist. Healoomulised kasvajakasvajad tekivad rakude ebanormaalsest proliferatsioonist ja on üldiselt kapseldatud, mis takistab neil tungimast lähedalasuvatesse kudedesse (Jang et al., 2011). Mõned levinumad healoomulised kasvajakasvajad on fibroadenoomid, lipoomid ja meningioomid. Kuigi healoomulised kasvajakasvajad ei ole vähkkasvajad, võib nende kasv põhjustada sümptomeid ja tüsistusi, nagu valu, elundite talitlushäired ja harvadel juhtudel isegi pahaloomuline transformatsioon (Bray et al., 2018).

**Tabel 3.** Healoomulise ja pahaloomulise kasvaja erinevused. (Jang et al., 2011) järgi

Iseloomustus	Healoomuline kasvaja	Pahaloomuline kasvaja
Kasvutempo	Aeglane	Kiire
Pind	Tasane, sile	Konarlik
Üldine mõju organismile	Märkimisväärse suurusega kasvajaga, mis pigistavad lähedal asuvaid elundeid, veresooni, närve või moodustised ajus ja seljaajus	Üldise seisu halvenemine, kasvaja mürgistus
Metastaaside tekke	Ei anna metastaase	Annab metastaase
Kasvumuster	Ekspansiivne, kasvaja kasvab kapslis, lükates ümbritsevaid kudesid lahku	Invasiivne, kasvab ümbritsevatessse kudedesse, läheduses asuvatesse veresoontesse ja närvidesse

Vaatamata sellele, et enamik uuringuid on keskendunud vedelbiopsia rollile vähi korral, on kasvav huvi selle kasutamise vastu ka healoomuliste kasvajakasvajate puhul.

Tsirkuleerivad kasvajakud (CTC) healoomuliste kasvajate puhul:

Vereringesse sisenenud kasvajakud, võivad potentsiaalselt põhjustada metastaase. Kuigi healoomulised kasvajakud ei anna metastaase, võivad CTC-d viidata suuremale pahaloomulise transformatsiooni riskile. Healoomuliste kasvajatega patsientidel saab tuvastada CTC-sid, mis viitab sellele, et kasvaja progresseerumise jälgimiseks ja pahaloomuliste kasvajate riski hindamiseks võib kasutada vedelbiopsiat (Cabel et al., 2017).

Rakuvaba DNA (cfDNA) healoomuliste kasvajate puhul:

Nii normaalsed kui ka kasvajakud vabastavad cfDNA-d ning seda saab analüüsida kasvajaspetsiifiliste genoomsete muutuste suhtes. Antud analüüs healoomuliste kasvajatega patsientidel võib anda ülevaate nende kasvajate genoomsest maastikust ja aidata tuvastada ravi potentsiaalseid molekulaarseid sihtmärke. Uuringutes tuvastati healoomuliste kasvajatega patsientidel cfDNA, mis tõstab esile vedelbiopsia potentsiaali healoomuliste kasvajate molekulaarseks iseloomustamiseks (Bettegowda et al., 2014).

Ekstratsellulaarsed vesiikulid (EV) healoomuliste kasvajate puhul:

Membraaniga seotud vesiikulid on seotud rakkudevahelise suhtlusega ja võivad mõjutada kasvaja progresseerumist (Lener et al., 2015). EV-de analüüs healoomuliste kasvajate kontekstis võib heita valgust kasvaja kasvu aluseks olevatele molekulaarsetele mehhanismidele ja aidata tuvastada potentsiaalseid biomarkereid kasvaja progresseerumise jälgimiseks.

Väljakutsed ja tulevikusuunad:

Hoolimata vedelbiopsia potentsiaalist healoomuliste kasvajate puhul, tuleb enne selle laialdast kliinilises praktikas kasutuselevõttu lahendada mitmeid väljakutseid. Esiteks CTC-de, cfDNA ja EV-de eraldamiseks ja analüüsimiseks on vaja standardseid protokolle, mis võivad mõjutada vedelbiopsiate tulemuste reprodutseeritavust ja usaldusväärsust (Heitzer et al., 2019). Lisaks sellele, healoomuliste kasvajatega patsientide CTC-d, cfDNA ja EV-d ei pruugi tingimata viidata pahaloomulisele kasvajale. Nende biomarkerite spetsiifilisuse kindlakstegemiseks healoomulise kasvaja progresseerumise ja pahaloomulise transformatsiooni suhtes on vaja täiendavaid uuringuid.

Vedelbiopsia ei pruugi olla piisavalt tundlik, et tuvastada healoomuliste kasvajatega patsientidel CTC-de, cfDNA või EV-de madalat taset. Uued tehnoloogilised edusammud, nagu ddPCR ja järgmise põlvkonna sekveneerimine, võivad aidata parandada vedelbiopsia tundlikkust healoomuliste kasvajate suhtes (Siravegna et al., 2017).

## 1.7 RNA

RNA-l on vedelbiopsia puhul ülioluline roll, mitmed RNA liigid on paljulubavad diagnostiliste, prognostiliste ja terapeutiliste biomarkeritena. RNA andmete integreerimine teiste vedelbiopsia analüütidega võib anda põhjalikuma ülevaate kasvaja bioloogiast ja sillutada teed isikupärastatud vähiraviks.

RNA liigid vedelbiopsias

Veres ringlevad RNA molekulid esindavad vedelbiopsias paljulubavat biomarkerite klassi. Erinevaid RNA liike, sealhulgas mRNA (*messenger RNA* - mRNA), pikk mittekodeeriv RNA (*Long non-coding RNA* - lncRNA), mikroRNA (*Micro RNA* - miRNA) ja väike nukleolaarne RNA (*small nucleolar RNA* - snoRNA), on uuritud nende kasulikkuse osas vähi tuvastamisel, prognoosimisel ja ravil (Pantel & Alix-Panabières, 2016). Need RNA liigid võivad pärineda kasvajarakkudest või muudest allikatest, näiteks immuun- või stroomarakkudest.

### **mRNA**

mRNA on kõige tuntum RNA liik, mis vastutab geneetilise teabe tõlkimise eest DNA-st valkudesse. Vähi korral võivad normist hälbivad mRNA ekspressioonimustrid kajastada selle aluseks olevaid geneetilisi muutusi, nagu mutatsioonid, koopiate arvu variatsioonid või geenifusioonid (Wan et al., 2017). Nende aberratsioonide tuvastamine tsirkuleerivas mRNA-s võib anda ülevaate kasvaja bioloogiast ja suunata terapeutilisi sekkumisi.

### **lncRNA**

lncRNA-d on mittekodeerivate RNA molekulide klass, mis võivad reguleerida geeniekspressiooni erinevate mehhanismide kaudu, nagu kromatiini remodelleerimine, transkriptsiooniregulatsioon ja transkriptsioonijärgne regulatsioon. Ebanormaalne lncRNA ekspressioon on seotud erinevate vähkkasvajate tekke ja progresseerumisega (Pantel & Alix-Panabières, 2016). Sellisena ilmnevad tsirkuleerivad lncRNA-d vedelbiopsias potentsiaalsete diagnostiliste ja prognostiliste biomarkeritena.

### **miRNA**

miRNA-d on väikesed mittekodeerivad RNA molekulid, mis moduleerivad geeniekspressiooni post-transkriptsiooniliselt, seondudes mRNA transkriptidega ja inhibeerides nende translatsiooni või soodustades nende lagunemist. Düsreguleeritud miRNA ekspressioonist

on laialdaselt teatatud mitmesuguste vähivormide puhul ning see on seotud kasvaja arengu, progresseerumise ja metastaasidega (Wan et al., 2017). Ringlevad miRNA-d kujutavad endast paljulubavat minimaalselt invasiivsete biomarkerite klassi vähi tuvastamiseks ja prognoosimiseks.

### **snoRNA**

snoRNA-d on väikesed mittekodeerivad RNA molekulid, mis osalevad teiste RNA liikide muutmises ja töötlemises. Uued tõendid viitavad sellele, et teatud snoRNA-del võivad olla onkogeensed või kasvajat pärssivad funktsioonid ning nende düsregulatsiooni on täheldatud erinevate vähivormide puhul (Pantel & Alix-Panabières, 2016). Ehkki vähem uuritud kui teisi RNA liike, omavad snoRNA-d potentsiaali uudsete biomarkeritena vedelbiopsias.

#### RNA kliinilised rakendused vedelbiopsias

Ringlevad RNA liigid on näidanud potentsiaali vähi varajases tuvastamises, haiguse progresseerumise jälgimises, ravivastuse ennustamises ja võimalike terapeutiliste sihtmärkide tuvastamises. Näiteks on näidatud, et kasvajaspetsiifiliste mRNA või lncRNA signatuuride tuvastamine vereproovides eristab vähahaigeid tervetest inimestest, toetades nende kasutamist diagnostiliste biomarkeritena (Wan et al., 2017).

Lisaks on tsirkuleeriva miRNA taseme muutusi seostatud ravivastuse ja haiguse progresseerumisega. Spetsiifilised miRNA signatuurid võivad mõnikord ennustada tundlikkust või resistentsust teatud teraapiate suhtes, võimaldades isikupärastatud ravistrateegiaid (Pantel & Alix-Panabières, 2016).

Lisaks diagnostilisele ja prognostilisele potentsiaalile võivad tsirkuleerivad RNA-d anda ülevaate kasvaja arengut ja progresseerumist juhtivatest molekulaarsetest mehhanismidest. Vedelbiopsia proovide RNA muutuste iseloomustamine võib suunata sihipäraste ravimeetodite valikut ja anda teavet uute ravistrateegiate väljatöötamiseks.

Vedelbiopsia RNA liikidel on vähktõve ravis diagnostiliste, prognostiliste ja terapeutiliste biomarkeritena tohutu potentsiaal. Täiustatud RNA tuvastamise ja analüüsi tehnoloogiate jätkuv arendamine suurendab veelgi ringlevate RNA molekulide kliinilist kasulikkust, silmutades teed personaalsele vähiravile.

## 1.8 KASVAJAGA SEOTUD TROMBOTSÜÜDID

Kasvajaga seotud trombotsüüdid (*tumor-educated platelets* - TEP) on muutunud paljutöötavateks biomarkeriteks vähi tuvastamiseks ja jälgimiseks vedelbiopsias. Trombotsüüdid on väikesed nukleaarsed rakufragmendid, mis on hemostaasi ja tromboosi jaoks kriitilised. Nad võivad suhelda ka vähirakkudega, moodustades TEP-sid (Ding et al., 2023).

Arvatakse, et TEP-de moodustumine toimub siis, kui trombotsüüdid puutuvad kokku kasvajakude või nende sekreteeritud teguritega, nagu tsütokiinid ja kasvufaktorid (Best et al., 2015). See interaktsioon viib kasvajast pärinevate molekulide, sealhulgas RNA ja valkude sisestamiseni trombotsüütide poolt. Järelikult on TEP-idel muutunud molekulaarsed signatuurid, mida saab tuvastada ja analüüsida vähi diagnoosimiseks ja jälgimiseks (Best et al., 2015).

TEP-sid saab vereproovidest eraldada erinevate meetoditega, nagu tihedusgradienttsentrifuugimine ja immunomagnetiline eraldamine (Ding et al., 2023). Järgmise põlvkonna sekveneerimine (NGS) ja kvantitatiivne polümeraasi ahelreaktsioon (*Quantitative Polymerase Chain Reaction* - qPCR) on tavaliselt kasutatavad meetodid TEP-de molekulaarsete signatuuride analüüsimiseks, sealhulgas kasvajaspetsiifilise RNA ja valkude olemasolu (Best et al., 2015).

TEP-de potentsiaalsed kliinilised rakendused vedelbiopsias on tohutud. Esiteks võivad TEP-ide olla minimaalselt invasiivsed diagnostikavahendid vähi varajaseks avastamiseks. Mitmed uuringud on näidanud TEP-de kasutamise teostatavust erinevate vähitüüpide, sealhulgas kopsu-, rinna- ja kõhunäärmevähi tuvastamiseks (Best et al., 2015). TEP-e saab kasutada ka vähi prognoosimiseks, kuna nende molekulaarseid signatuure on seostatud kasvaja progressiooniga ja metastaasidega (Ding et al., 2023).

Teiseks võivad TEP-d mängida vähiravi jälgimisel olulist rolli. Muutused TEP-de molekulaarsetes signatuurides võivad viidata konkreetse teraapia efektiivsusele, võimaldades isikupärastatud ravistrateegiaid (Ding et al., 2023). Lisaks võivad TEP-d tuvastada resistentsuse kujunemist sihipäraste ravimeetodite suhtes, aidates kaasa raviplaanide õigeaegsele muutmisele (Tjon-Kon-Fat et al., 2018).

Lõpuks saab TEP-e kasutada haiguste jälgimiseks ja retsidiivide ennustamiseks. TEP-de analüüs võib anda kasvajakoomuse reaajas hinnangu ja võib aidata ennustada pärast ravi retsidiivi riski (Tjon-Kon-Fat et al., 2018).

Kuigi TEP-id omavad vedelbiopsia biomarkerina suurt perspektiivi, tuleb siiski lahendada rida väljakutseid. Nende hulka kuuluvad TEP-i eraldamise ja analüüsimeetodite standardiseerimine, TEP-põhiste analüüsides tundlikkuse ja spetsiifilisuse parandamine ning TEP-i moodustumise aluseks olevate mehhanismide selgitamine (Joosse S & Pantel K, 2015). Lisaks on vaja suuremahulisi kliinilisi uuringuid, et kinnitada TEP-de kliinilist kasulikkust erinevates vähitüüpides ja -olukordades.

## **1.9 ANALÜÜTILINE TÖÖ VEDELBIOPSIA PUHUL**

Vedelbiopsia käigus saadud materjal sõltub patsiendi seisundist ja konkreetsest analüüsitava biomarkerist. Vedelbiopsia proovide analüüs võib olla keeruline materjali heterogeensuse, kasvajast mittetulenevate molekulide olemasolu ja sihtmärk-biomarkerite madalate kontsentratsioonide tõttu (tabel 4).

**Tabel 4.** Vedelbiopsia analüütiliste materjalide võrdlustabel (Antunes-Ferreira et al., 2021; Arisi et al., 2022; J. W. C. Chang et al., 2020; L. Chen et al., 2017; Kustanovich et al., 2019; Min et al., 2021) järgi

Analüütiline materjal	Eelised	Puudused	Esinemine
CTC	Võib anda teavet kasvajakude fenotüübi kohta	Madal tundlikkus, madal arvukus	Umbes 10 rakku ml vere kohta
ctDNA	Kõrge tundlikkus ja spetsiifilisus mutatsioonide suhtes	Piiratud teave kasvajakude fenotüübi kohta, lagunemistundlik	võib ületada 10% cfDNA kogusest
cfDNA	Võib anda teavet geeniekspressiooni profiilide kohta	Madal arvukus, lagunemistundlik	CfDNA kontsentratsioon tervetel inimestel on vahemikus 0 kuni 100 ng/ml, samas kui vähihaigetel võib see olla kõrgem kuni 1000 ng/ml
EV	Võib anda teavet kasvaja mikrokeskkonna kohta	Vastuvõtlik lagunemisele	$10^7$ kuni $10^{13}$ osakest $\text{mL}^{-1}$ kohta
mRNA	Väheinvasiivne, funktsionaalne teave	Vastuvõtlik lagunemisele, madal spetsiifilisus	Harv
TEP	Võib anda teavet kasvajast pärinevate valkude kohta	Raske eristada tavalistest trombotsüütidest	Tavaliselt ringleb veres vahemikus $150\text{--}450 \times 10^9/\text{L}$

Nendest väljakutsetest ülesaamiseks kasutatakse sageli täiustatud tehnikaid, nagu NGS ja ddPCR (Wan et al., 2017). Analüüsi keerukus võib aga kaasa tuua ka valenegatiivsete või -positiivsete tulemuste suurema tõenäosuse, mistõttu on vaja täiendavat valideerimist lisatestide kaudu.

Vedelbiopsia proovide analüüsimiseks kasutatakse mitmeid meetodeid, sealhulgas:

CellSearch System®: laialdaselt kasutatav FDA poolt heaks kiidetud platvorm CTC loendamiseks, mis põhineb immunomagnetilisel rikastamisel ja fluorestsentsipõhisel tuvastamisel (Millner et al., 2013).

Mikrofluidika: need seadmed võimaldavad CTC-de ja muude biomarkerite eraldamist ja analüüsimist suure läbilaskevõimega minimaalse prooviga manipuleerimisega (Millner et al., 2013).

Voolutsütomeetria on võimas meetod CTC tuvastamiseks ja kvantifitseerimiseks vedelates biopsiates (Lopresti et al., 2019). See meetod võimaldab kiirelt ja tõhusalt analüüsida rakupopulatsioone proovis, pakkudes väärtuslikku teavet CTC-de olemasolu ja omaduste kohta.

Vedelbiopsiate CTC-de visualiseerimiseks ja analüüsimiseks on kasutatud mikroskoopiapõhiseid tehnikaid, nagu konfokaalne ja elektronmikroskoopia. Need lähenemisviisid võimaldavad CTC-de kõrge eraldusvõimega pildistamist ja morfoloogilist analüüsi, pakkudes ülevaadet nende fenotüübilistest ja genotüüpsetest omadustest (Vidlarova et al., 2023).

Järgmise põlvkonna sekveneerimine (NGS) on muutunud parimaks tehnoloogiaks cfDNA analüüsimiseks vedelbiopsiates. NGS pakub suure läbilaskevõimega erapooletuid genoomiandmeid, mida saab kasutada kasvajaspetsiifiliste mutatsioonide, koopiade arvu variatsioonide ja muude genoomiliste muutuste tuvastamiseks ja iseloomustamiseks (Ma et al., 2023).

Geenikiibid, tuntud ka kui DNA mikrokiibid, on kasutatud vedelbiopsiate jaoks. See suure läbilaskevõimega tehnoloogia võimaldab samaaegselt hinnata tuhandeid gene, pakkudes terviklikku ülevaadet vähirakkude molekulaarsest maastikust (Galbiati et al., 2019).

Digital Droplet PCR (ddPCR) on meetod cfDNA ja CTC tuvastamiseks ja kvantifitseerimiseks vedelbiopsia proovides (Wan et al., 2017). See tehnoloogia võimaldab sihtmolekulide absoluutset kvantifitseerimist, võimaldades madala arvukusega biomarkerite täpset mõõtmist, mis on vähktõve varajaseks avastamiseks kriitilise tähtsusega.

Valgu ekspressiooni ja translatsioonijärgsete modifikatsioonide analüüsimiseks vedelates biopsiaproovides on kasutatud Western blot ja valgu analüüse (Lone et al., 2022)

Massispektromeetriat, mis on võimas valguanalüüsi tööriist, on kasutatud CTC-de ja teiste vähiga seotud molekulide proteoomiliste profiilide uurimiseks vedelates biopsiates. See tehnoloogia võimaldab tuvastada ja kvantifitseerida valke ja, pakkudes ülevaadet vähi progresseerumise olevatest molekulaarsetest mehhanismidest (Donato et al., 2021).

## **1.10 VÄHI TÜÜBI JA ASUKOHA TUVASTAMINE VEDELBIOPSIA ABIL**

Veres ringleva kasvaja DNA (ctDNA) ja teiste biomarkerite analüüs on näidanud märkimisväärset potentsiaali konkreetse vähitüübi ja selle asukoha määramisel, pakkudes väärtuslikku teavet isikupärastatud ravistrateegiate jaoks.

Genoomne analüüs võimaldab vedelbiopsia abil hinnata ctDNA-d, andes ülevaate erinevate vähitüüpide geneetilistest mutatsioonidest ja muutustest. See võimaldab tuvastada vähitüüpi selle molekulaarse profiili alusel, nagu mutatsioonid spetsiifilistes onkogeenides või kasvaja supressorgeenides (Siravegna et al., 2017). Metülatsioonimustrid ctDNA-s võivad samuti aidata kindlaks teha vähi tüüpi, kuna erinevatel vähitüüpidel on erinevad DNA metüülimise mustrid, mis võimaldavad eristada erinevaid pahaloomulisi kasvajaid (Yi Shen et al., 2018). Vedelbiopsia võib anda vihjeid vähi päritolukoe kohta, andes ülevaate konkreetsest organist või koest, kust pahaloomuline kasvaja tekkis (Phallen et al., 2017). Teatud ctDNA-s esinevad vähispetsiifilised biomarkerid võivad näidata vähi esmast asukohta, aidates kaasa kasvaja lokaliseerimisele kehas.

Kasutades konkreetsete vähitüüpide jaoks suunatud paneele, saab vedelbiopsia abil tõhusalt määrata asukoha metastaatiliste kahjustuste kohta ja tuvastada primaarse kasvaja asukoht, aidates kaasa täpsemale diagnoosimisele ja ravi planeerimisele (Cohen et al., 2018).

Spetsiifilised geneetilised markerid on kopsu- ja ajuvähi eristamisel kriitilised. Kopsuvähi puhul viitab EGFR-i mutatsioonide või ALK ümberkorralduste esinemine ctDNA-s hai-

gusele väga ja aitab selle diagnoosimisel (Arbour & Riely, 2019). Seda täiendab kopsuspetsiifiliste biomarkerite, nagu TTF-1, tuvastamine, mida sageli kasutatakse kopsu adenokartsinoomi immunohistokeemilise markerina (Gurda et al., 2015). Ajuvähi korral on IDH1 geeni mutatsioonid või EGFRvIII esinemine ctDNA-s iseloomulikud teatud tüüpi ajukasvajatele, näiteks glioomidele. Need markerid hõlbustavad ajukasvajate täpset diagnoosimist ja klassifitseerimist ning on kriitilise tähtsusega raviotsuste ja prognoostiliste hinnangute tegemisel (Escudero et al., 2021).

Täiustatud tehnikad, nagu NGS ja ddPCR, on suurendanud nende molekulaarsete markerite tuvastamist ctDNA-s. See on viinud isikupärastatud ravistrateegiate väljatöötamiseni ja parandanud haiguste jälgimist (Diaz & Bardelli, 2014; Murtaza et al., 2013). Näiteks TTF-1 olemasolu ctDNA-s aitab kinnitada kopsuvähi päritolu. Samamoodi annab astrotsüütidega seotud markeri GFAP tuvastamine ctDNA-s olulist teavet ajuvähi esinemise ja lokaliseerimise kohta (Gurda et al., 2015; Jelski & Mroczko, 2021).

See terviklik lähenemisviis vähianalüüsile, mis hindab ctDNA-d ja vere biomarkereid vedela biopsia abil, muudab vähi diagnoosimise ja ravi printsiipe. See võimaldab üksikasjalikult iseloomustada vähi geneetilist ülesehitust, pakkudes praktilisi teadmisi isikupärastatud ravirežiimide kohta ja hõlbustades pidevat haiguse jälgimist. CtDNA analüüsist kogutud teabe sügavus on hindamatu, kuna see kajastab vähi dünaamilist olemust, võimaldades ravis kohandada haiguse arenedes.

## 2 UURIMUS

### 2.1 TÖÖ EESMÄRGID

Selle töö käigus on läbi viidud uuringuid olemasolevate vedelbiopsia meetodite kohta, püüdes anda üldist ettekujutust selle kasutamisest ja arengust praegusel ajal. Käesoleva uurimistöö põhieesmärk on põhjalikult uurida praegu kasutatavaid meetodeid ning hinnata nende väljavaateid genoomikas ja vähidiagnostikas. Lisaks anda ülevaade vedelbiopsias kasutatavatest kaasaegsetest tehnoloogiatest ja nende rakendamisest kliinilises praktikas ning võrreldakse vedelbiopsia efektiivsust traditsiooniliste diagnostikameetoditega. Seega teine töö eesmärk oli hinnata vedelbiopsiamarkerite potentsiaali vähi varaseks diagnoosimiseks ja jälgimiseks ning kaaluda selle edasiarendamise võimalust genoomika valdkonnas.

### 2.2 MATERJAL JA METOODIKA

Referatiivse töö kirjutamiseks kasutati PubMed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>) andmebaasi. Sobiliku artikli valimiseks arvestati publikatsiooniga, mis oli vahemikus 2016-2023, aga hiljem mõnede aspektide süvenemiseks ja originaalinformatsiooni otsimiseks kasutati ka neid artikleid mis olid publitseeritud aastates 1948-2016. Samuti lisaks publikatsiooniga oli kasutatud võtmesõnade olemasolu artiklites, näiteks: “CTC”, “cfDNA”, “cfRNA”, “ctDNA”, “EV”, “exDNA”, “NIPT”, “TEP”, “Liquid biopsy“, “Cancer cell“, “Tumor“, “RNA“, “mRNA“, “Benign tumor“ ja mõned teised. Lisaks sobiliku artikli valimiseks kasutati võtmesõnade kombinatsioone. Töö kirjutamiseks kasutati avaldatud või inglise keelde tõlgitud artikleid, välja arvatud artikkel (Mandel & Métails, 1948).

### 2.3 TULEMUSED JA ARUTELU

Vedelbiopsia on hiljuti läbi teinud märkimisväärseid arenguid mitteinvasiivse alternatiivina traditsioonilistele koebiopsiatele vähi tuvastamiseks ja jälgimiseks. Kiiresti areneva uurimisvaldkonnana on sellel tohutu potentsiaal patsientide ravi ja tulemuste parandamiseks. Kuid lisaks vähiuuringutele on vedelbiopsial ka juba üks edukas näide, NIPT, mida praegu kasutatakse peaaegu universaalselt täiendava skriinimismeetodina (Schobers et al., 2021). Selle peamine eesmärk on varakult avastada loote kromosoomide kõrvalekaldeid ning see on viimastel aastatel leidnud kasutuse kliinilises praktikas. Just selle meetodi näitel võime kindlalt

väita, et vedelbiopsia uuringutes on vaja jätkata vähiga seotud suuna arendamist, sest meetodite arenedes võimaldab tehnoloogia seda kasutada sama aktiivselt kui praegu kasutatakse NIPT-i. Vedelabiopsia uuringute üks kriitilisi vaatenurki on selle potentsiaal tõhustada vähi varajast avastamist. Vähi varajane avastamine võib oluliselt parandada patsiendi prognoosi ja mõnikord viia ravini (Heitzer et al., 2019). ctDNA analüüsi kasutamine vedelbiopsia proovides võivad hõlbustada vähi kiiret ja mitteinvasiivset tuvastamist enne sümptomite ilmnemist. See lähenemisviis võib pakkuda täpsemaid ja isikupärasemaid ravivõimalusi, mis lõppkokkuvõttes aitaks kaasa patsientide ellujäämismääradele. Lisaks annab vedelbiopsia võimaluse jälgida ravivastust ja resistentsust reaalselt. Traditsioonilised koebiopsiad nõuavad sageli invasiivseid protseduure ja ei pruugi anda terviklikku ülevaadet kasvaja moleklaarsest maastikust (Alix-Panabières & Pantel, 2016). Vedelbiopsia võib anda ülevaate kasvajas toimuvatest dünaamilistest muutustest, võimaldades arstidel kohandada raviplaane, mis põhinevad vähi areneval genoomsel profiilil. See isikupärastatud lähenemine võib viia tõhusamate ravimeetoditeni ja raviga seotud kõrvaltoimete parema ohjamiseni.

Vedelbiopsial on ka potentsiaal tuvastada minimaalset jääkhaigust (MRD) ja ennustada vähi kordumist pärast ravi (Tie et al., 2016). Avastades ja kvantifitseerides ctDNA tasemeid vereringes, saavad teadlased jälgida MRD-d ja hinnata haiguse kordumise ohtu. Need andmed võivad anda teavet ravijärgsete jälgimisstrateegiate kohta, võimaldades varasemaid sekkumisi ja parandades pikaajalist ellujäämist. Vedelbiopsia uuringute edenedes võib see avastada uusi biomarkereid ja terapeutilisi sihtmärke. Analüüsides ctDNA-d ja teisi ringlevaid biomolekule, saavad teadlased sügavama ülevaate kasvajabioloogiast ja tuvastada potentsiaalsed sihtmärgid ravimite väljatöötamiseks (Wan et al., 2017). Need leiud võivad viia uudsete ja tõhusamate ravimeetodite väljatöötamiseni, parandades veelgi patsientide tulemusi. Vedelbiopsia meetodite kasutuselevõtt kliinilises praktikas võib vähendada teravishoiukulusid ja parandada patsientide ravi kvaliteeti. Vedelbiopsia on traditsioonilise biopsiaga võrreldes üldiselt vähem invasiivne ja paremini ligipääsetav, mis võib vähendada kulukate ja aeganõudvate kirurgiliste protseduuride vajadust (Siravegna et al., 2017).

Lisaks võib vedelbiopsiate mitteinvasiivne olemus parandada patsientide rahulolu ning vähi sõeluuringute ja jälgimisprotokollide järgimist. Vedelbiopsia uuringute perspektiividel on tohutu potentsiaal parandada vähahaigete elu. Vähi varase avastamise, ravi jälgimise, MRD ja biomarkerite avastamise edusammud võivad muuta patsiendi ravi ja tulemusi. Kuigi vedelbiopsia tehnikate valideerimise ja standardiseerimisega seotud väljakutsed on endiselt

olemas, on selle valdkonna tulevik kahtlemata paljulubav. Vedelbiopsia tulemuste tuvastamise tehnoloogiate edusammud on muutnud vähi diagnostikat, pakkudes mitteinvasiivseid, tundlikke ja kõikehõlmavaid meetodeid vähi ringlevate biomarkerite analüüsimiseks. Need arenevad tehnoloogiad võivad potentsiaalselt parandada vähi varajast avastamist, jälgimist ja ravi.

## KOKKUVÕTE

Vedelbiopsia kui traditsioonilise biopsia mitteinvasiivse alternatiivi kasutuselevõtt on täppis-onkoloogia edendamisel paljutõotav. See käsitleb kasvajate olemuse ja asukohaga seotud probleeme, pakkudes võimalust kirjeldada kasvajaspetsiifilist heterogeensust ja omadusi. Vedelbiopsia annab teavet vähi varajase avastamise kohta ja võimaldab korduvat testimist kogu haiguse vältel, võimaldades jälgida ravivastust ja laiendada meie arusaama vähi arengust, analüüsides spetsiifilisi biomarkereid.

Tsirkuleerivate kasvajarakkude (CTC) analüüsimine vedelbiopsiates annab väärtuslikku teavet kasvaja metastaaside, ravimiresistentsuse mehhanismide ja haiguse üldise prognoosi kohta. Kuid mikrofluidika, mis mängib olulist rolli CTC-de eraldamisel ja analüüsimisel, seisab silmitsi väljakutsetega paljude elujõuliste rakkude tõhusal identifitseerimisel ja isoleerimisel. Nende väljakutsete ületamiseks on vaja kasutada tuvastamistehnoloogiate kombinatsiooni.

Vedelbiopsia on näidanud oma kliinilist kasulikkust erinevate vähitüüpide, sealhulgas kopsu-, rinna-, kolorektaalse ja eesnäärmevähi puhul. ctDNA tuvastamine ja analüüsimine võib tuvastada kasvaja kasvuga seotud spetsiifilisi geneetilisi muutusi ja mutatsioone, pakkudes väärtuslikku teavet kasvaja iseloomustamiseks, raviotsuste tegemiseks ja ravi efektiivsuse jälgimiseks. Lisaks omab vedelbiopsia perspektiivi vähi varajasel avastamisel, muutes potentsiaalselt vähi sõeluuringuid ja parandades patsiendi ravi tulemusi.

Tulemuste reprodutseeritavuse ja usaldusväärsuse tagamiseks on otsustava tähtsusega lahendada küsimused proovide kogumise, töötlemise ja analüüsimeetodite standardiseerimise valdas. Lisaks lihtsustab bioinformaatika tööriistade ja algoritmide väljatöötamine ja värskendamine vedelbiopsiatest saadud keerukate molekulaarsete andmete töötlemist.

Kuna käimasolevad edusammud ja uuringud suurendavad selle kliinilist kasulikkust, lubab vedelbiopsia isikupärastatud patsiendihooldust, optimeeritud ravi ja paremaid kliinilisi tulemusi.

# **Liquid biopsy and its perspectives in cancer diagnostics and genomics**

Vjacheslav Morozov

## Resümee

Liquid biopsy is an additional method for diagnosing and monitoring cancer. It identifies various cancer markers in the blood or other body fluids. At the same time, a classic biopsy requires taking a sample from the target organ or mass, which can be inconvenient and risky for the patient.

The accuracy of liquid biopsy is still controversial because disease-related DNA is extremely rare in blood plasma. Its amount may vary depending on the patient's characteristics, type of disease, and stage. However, as the tumor progresses and metastases form, the number of cells and DNA available for testing increases the likelihood of a successful study. The development of liquid biopsy will undoubtedly positively impact oncology, allowing the description of tumor heterogeneity and characteristics. The method has demonstrated its clinical application in a wide variety of cancer types, including lung, breast, colorectal, and brain cancer. Detection and analysis of certain markers can help identify specific genetic changes and mutations associated with tumor growth and spread, informing treatment decisions and monitoring.

Further development of this diagnostic method could make significant changes in the diagnosis and treatment of cancer, allowing cancer to be diagnosed and monitored more safely compared to classical biopsy. The closest example is NIPT, which, despite its initial complexity, is now widely used as a screening method for identifying chromosomal abnormalities and bigger aberrations. However, in the case of cancer detection, it is still important to overcome the challenges of sample collection, processing, and standardization of analysis to ensure the most reliable results. In addition, developing and updating analytical engines will facilitate the translation of complex biological profiles from liquid biopsies. The development and growth of liquid biopsy in tumor detection and monitoring promises personalized patient care, treatment optimization, and improved clinical outcomes.

## KIRJANDUSE LOETELU

- Abedalthagafi, M., Bawazeer, S., Fawaz, R. I., Heritage, A. M., Alajaji, N. M., & Faqeih, E. (2023). Non-invasive prenatal testing: a revolutionary journey in prenatal testing. In *Frontiers in Medicine* (Vol. 10). Frontiers Media SA. <https://doi.org/10.3389/fmed.2023.1265090>
- Alexander, S., & Mark, D. (2018, November 15). *Overcoming-Challenges-in-Liquid-Biopsy*.
- Alix-Panabières, C., & Pantel, K. (2016). Clinical applications of circulating tumor cells and circulating tumor DNA as liquid biopsy. In *Cancer Discovery* (Vol. 6, Issue 5, pp. 479–491). American Association for Cancer Research Inc. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-15-1483>
- Alix-Panabières, C., & Pantel, K. (2021). Liquid biopsy: From discovery to clinical application. *Cancer Discovery*, *11*(4), 858–873. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-20-1311>
- Antunes-Ferreira, M., Koppers-Lalic, D., & Würdinger, T. (2021). Circulating platelets as liquid biopsy sources for cancer detection. In *Molecular Oncology* (Vol. 15, Issue 6, pp. 1727–1743). John Wiley and Sons Ltd. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12859>
- Arbour, K. C., & Riely, G. J. (2019). Systemic therapy for locally advanced and metastatic non-small cell lung cancer: A review. *JAMA - Journal of the American Medical Association*, *322*(8), 764–774. <https://doi.org/10.1001/jama.2019.11058>
- Arisi, M. F., Dotan, E., & Fernandez, S. V. (2022). Circulating Tumor DNA in Precision Oncology and Its Applications in Colorectal Cancer. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 23, Issue 8). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms23084441>
- Barrett, A. N., Xiong, L., Tan, T. Z., Advani, H. V., Hua, R., Laureano-Asibal, C., Soong, R., Biswas, A., Nagarajan, N., & Choolani, M. (2017). Measurement of fetal fraction in cell-free DNA from maternal plasma using a panel of insertion/deletion polymorphisms. *PLoS ONE*, *12*(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186771>
- Becker, A., Thakur, B. K., Weiss, J. M., Kim, H. S., Peinado, H., & Lyden, D. (2016). Extracellular Vesicles in Cancer: Cell-to-Cell Mediators of Metastasis. In *Cancer Cell* (Vol. 30, Issue 6, pp. 836–848). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2016.10.009>

- Bedei, I., Wolter, A., Weber, A., Signore, F., & Axt-Flidner, R. (2021). Chances and challenges of new genetic screening technologies (Nipt) in prenatal medicine from a clinical perspective: A narrative review. *Genes*, *12*(4). <https://doi.org/10.3390/genes12040501>
- Best, M. G., Sol, N., Kooi, I., Tannous, J., Westerman, B. A., Rustenburg, F., Schellen, P., Verschueren, H., Post, E., Koster, J., Ylstra, B., Ameziane, N., Dorsman, J., Smit, E. F., Verheul, H. M., Noske, D. P., Reijneveld, J. C., Nilsson, R. J. A., Tannous, B. A., ... Wurdinger, T. (2015). RNA-Seq of Tumor-Educated Platelets Enables Blood-Based Pan-Cancer, Multiclass, and Molecular Pathway Cancer Diagnostics. *Cancer Cell*, *28*(5), 666–676. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2015.09.018>
- Bettegowda, 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>
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, *68*(6), 394–424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>
- Cabel, L., Proudhon, C., Gortais, H., Loirat, D., Coussy, F., Pierga, J. Y., & Bidard, F. C. (2017). Circulating tumor cells: clinical validity and utility. In *International Journal of Clinical Oncology* (Vol. 22, Issue 3, pp. 421–430). Springer Tokyo. <https://doi.org/10.1007/s10147-017-1105-2>
- Chang, J. W. C., Shih, C. L., Wang, C. L., Luo, J. D., Wang, C. W., Hsieh, J. J., Yu, C. J., & Chiou, C. C. (2020). Transcriptomic analysis in liquid biopsy identifies circulating PCTaire-1 mRNA as a biomarker in NSCLC. *Cancer Genomics and Proteomics*, *17*(1), 91–100. <https://doi.org/10.21873/cgp.20170>
- Chang, L., Li, J., & Zhang, R. (2022). Liquid biopsy for early diagnosis of non-small cell lung carcinoma: recent research and detection technologies. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*, *1877*(3). <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2022.188729>

- Chen, L., Bode, A. M., & Dong, Z. (2017). Circulating tumor cells: Moving biological insights into detection. In *Theranostics* (Vol. 7, Issue 10, pp. 2606–2619). Ivyspring International Publisher. <https://doi.org/10.7150/thno.18588>
- Chen, M., Hou, L., Hu, L., Tan, C., Wang, X., Bao, P., Ran, Q., Chen, L., & Li, Z. (2022). Platelet detection as a new liquid biopsy tool for human cancers. In *Frontiers in Oncology* (Vol. 12). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.983724>
- Chitty, L. S., & Lo, Y. M. D. (2015). Noninvasive prenatal screening for genetic diseases using massively parallel sequencing of maternal plasma DNA. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 5(9). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a023085>
- 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), 926–930. <https://doi.org/10.1126/science.aar3247>
- Cristofanilli, M., Budd, G. T., Ellis, M. J., Stopeck, A., Matera, J., Miller, M. C., Reuben, J. M., Doyle, G. V., Allard, W. J., Terstappen, L. W. M. M., & Hayes, D. F. (2004). Circulating Tumor Cells, Disease Progression, and Survival in Metastatic Breast Cancer. In *n engl j med* (Vol. 8). [www.nejm.org](http://www.nejm.org)
- Dao, J., Conway, P. J., Subramani, B., Meyyappan, D., Russell, S., & Mahadevan, D. (2023). Using cfDNA and ctDNA as Oncologic Markers: A Path to Clinical Validation. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 24, Issue 17). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/ijms241713219>
- Dawson, S.-J., Tsui, D. W. Y., Murtaza, M., Biggs, H., Rueda, O. M., Chin, S.-F., Dunning, M. J., Gale, D., Forshe, T., Mahler-Araujo, B., Rajan, S., Humphray, S., Becq, J., Halsall, D., Wallis, M., Bentley, D., Caldas, C., & Rosenfeld, N. (2013). Analysis of Circulating Tumor DNA to Monitor Metastatic Breast Cancer. *New England Journal of Medicine*, 368(13), 1199–1209. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1213261>
- Diaz, L. A., & Bardelli, A. (2014). Liquid biopsies: Genotyping circulating tumor DNA. In *Journal of Clinical Oncology* (Vol. 32, Issue 6, pp. 579–586). American Society of Clinical Oncology. <https://doi.org/10.1200/JCO.2012.45.2011>
- Dilsiz, N. (2022). Hallmarks of exosomes. In *Future Science OA* (Vol. 8, Issue 1). Future Medicine Ltd. <https://doi.org/10.2144/fsoa-2021-0102>

- Ding, S., Dong, X., & Song, X. (2023). Tumor educated platelet: the novel BioSource for cancer detection. In *Cancer Cell International* (Vol. 23, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s12935-023-02927-5>
- Donato, C., Buczak, K., Schmidt, A., & Aceto, N. (2021). Mass spectrometry analysis of circulating breast cancer cells from a Xenograft mouse model. *STAR Protocols*, 2(2). <https://doi.org/10.1016/j.xpro.2021.100480>
- Escudero, L., Martínez-Ricarte, F., & Seoane, J. (2021). Ctdna-based liquid biopsy of cerebrospinal fluid in brain cancer. In *Cancers* (Vol. 13, Issue 9). MDPI. <https://doi.org/10.3390/cancers13091989>
- Fernández-Domínguez, I. J., Manzo-Merino, J., Taja-Chayeb, L., Dueñas-González, A., Pérez-Cárdenas, E., & Trejo-Becerril, C. (2021). The role of extracellular DNA (exDNA) in cellular processes. In *Cancer Biology and Therapy* (Vol. 22, Issue 4, pp. 267–278). Bellwether Publishing, Ltd. <https://doi.org/10.1080/15384047.2021.1890319>
- Galbiati, S., Damin, F., Ferraro, L., Soriani, N., Burgio, V., Ronzoni, M., Gianni, L., Ferrari, M., & Chiari, M. (2019). Microarray approach combined with ddPCR: An useful pipeline for the detection and quantification of circulating tumour DNA mutations. *Cells*, 8(8). <https://doi.org/10.3390/cells8080769>
- Gurda, G. T., Zhang, L., Wang, Y., Chen, L., Geddes, S., Cho, W. C., Askin, F., Gabrielson, E., & Li, Q. K. (2015). Utility of five commonly used immunohistochemical markers TTF-1, Napsin A, CK7, CK5/6 and P63 in primary and metastatic adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the lung: a retrospective study of 246 fine needle aspiration cases. *Clinical and Translational Medicine*, 4(1). <https://doi.org/10.1186/s40169-015-0057-2>
- Heitzer, E., Haque, I. S., Roberts, C. E. S., & Speicher, M. R. (2019). Current and future perspectives of liquid biopsies in genomics-driven oncology. In *Nature Reviews Genetics* (Vol. 20, Issue 2, pp. 71–88). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41576-018-0071-5>
- Irmer, B., Chandrabalan, S., Maas, L., Bleckmann, A., & Menck, K. (2023). Extracellular Vesicles in Liquid Biopsies as Biomarkers for Solid Tumors. In *Cancers* (Vol. 15, Issue 4). MDPI. <https://doi.org/10.3390/cancers15041307>

- Jang, J., Gardner, J. M., & Ro, J. Y. (2011). *Diagnostic Approach and Prognostic Factors of Cancers*. <http://journals.lww.com/anatomicpathology>
- Jelski, W., & Mroczko, B. (2021). Molecular and circulating biomarkers of brain tumors. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 22, Issue 13). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms22137039>
- Josse S, & Pantel K. (2015). Tumor-Educated Platelets as Liquid Biopsy in Cancer Patients Metastasis. In *Cancer Cell* (Vol. 28, Issue 5, pp. 554–556). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2015.10.010>
- Kalluri, R., & LeBleu, V. S. (2020). The biology, function, and biomedical applications of exosomes. In *Science* (Vol. 367, Issue 6478). American Association for the Advancement of Science. <https://doi.org/10.1126/science.aau6977>
- Kustanovich, A., Schwartz, R., Peretz, T., & Grinshpun, A. (2019). Life and death of circulating cell-free DNA. In *Cancer Biology and Therapy* (Vol. 20, Issue 8, pp. 1057–1067). Taylor and Francis Inc. <https://doi.org/10.1080/15384047.2019.1598759>
- Lee, S. Y., Ju, M. K., Jeon, H. M., Jeong, E. K., Lee, Y. J., Kim, C. H., Park, H. G., Han, S. I., & Kang, H. S. (2018). Regulation of Tumor Progression by Programmed Necrosis. In *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* (Vol. 2018). Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2018/3537471>
- Lener, T., Gimona, M., Aigner, L., Börger, V., Buzas, E., Camussi, G., Chaput, N., Chatterjee, D., Court, F. A., del Portillo, H. A., O’Driscoll, L., Fais, S., Falcon-Perez, J. M., Felderhoff-Mueser, U., Fraile, L., Gho, Y. S., Görgens, A., Gupta, R. C., Hendrix, A., ... Giebel, B. (2015). Applying extracellular vesicles based therapeutics in clinical trials - An ISEV position paper. *Journal of Extracellular Vesicles*, 4(1). <https://doi.org/10.3402/jev.v4.30087>
- 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. In *Molecular Cancer* (Vol. 21, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s12943-022-01543-7>
- Lopresti, A., Malergue, F., Bertucci, F., Liberatoscioli, M. L., Garnier, S., DaCosta, Q., Finetti, P., Gilabert, M., Raoul, J. L., Birnbaum, D., Acquaviva, C., & Mamessier, E.

- (2019). Sensitive and easy screening for circulating tumor cells by flow cytometry. *JCI Insight*, 4(14). <https://doi.org/10.1172/jci.insight.128180>
- Ma, S., Zhou, M., Xu, Y., Gu, X., Zou, M., Abudushalamu, G., Yao, Y., Fan, X., & Wu, G. (2023). Clinical application and detection techniques of liquid biopsy in gastric cancer. In *Molecular Cancer* (Vol. 22, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s12943-023-01715-z>
- Malapelle, U., Pisapia, P., Pepe, F., Russo, G., Buono, M., Russo, A., Gomez, J., Khorshid, O., Mack, P. C., Rolfo, C., & Troncone, G. (2022). The evolving role of liquid biopsy in lung cancer. *Lung Cancer*, 172, 53–64. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2022.08.004>
- Mandel, P., & Métais, P. (1948). Les acides nucléiques du plasma sanguin chez l'Homme. *Comptes Rendus Des Seances de La Societe de Biologie et de Ses Filiales*, 142, 241–243.
- Mateescu, B., Kowal, E. J. K., van Balkom, B. W. M., Bartel, S., Bhattacharyya, S. N., Buzás, E. I., Buck, A. H., de Candia, P., Chow, F. W. N., Das, S., Driedonks, T. A. P., Fernández-Messina, L., Haderk, F., Hill, A. F., Jones, J. C., Van Keuren-Jensen, K. R., Lai, C. P., Lässer, C., di Liegro, I., ... Nolte-'t Hoen, E. N. M. (2017). Obstacles and opportunities in the functional analysis of extracellular vesicle RNA - An ISEV position paper. *Journal of Extracellular Vesicles*, 6(1). <https://doi.org/10.1080/20013078.2017.1286095>
- Merker, J. D., Oxnard, G. R., Compton, C., Diehn, M., Hurley, P., Lazar, A. J., Lindeman, N., Lockwood, C. M., Rai, A. J., Schilsky, R. L., Tsimberidou, A. M., Vasalos, P., Billman, B. L., Oliver, T. K., Bruinooge, S. S., Hayes, D. F., & Turner, N. C. (2018). JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY Circulating Tumor DNA Analysis in Patients With Cancer: American Society of Clinical Oncology and College of American Pathologists Joint Review. *J Clin Oncol*, 36, 1631–1641. <https://doi.org/10.1200/JCO>
- Millner, L. M., Linder, M. W., & Valdes, R. (2013). Circulating Tumor Cells: A Review of Present Methods and the Need to Identify Heterogeneous Phenotypes. *Ann Clin Lab Sci*, 43(3).
- Min, L., Wang, B., Bao, H., Li, X., Zhao, L., Meng, J., & Wang, S. (2021). Advanced Nanotechnologies for Extracellular Vesicle-Based Liquid Biopsy. In *Advanced Science* (Vol. 8, Issue 20). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/advs.202102789>

- Mohamadi, R. M., Besant, J. D., Mephram, A., Green, B., Mahmoudian, L., Gibbs, T., Ivanov, I., Malvea, A., Stojcic, J., Allan, A. L., Lowes, L. E., Sargent, E. H., Nam, R. K., & Kelley, S. O. (2015). Nanoparticle-mediated binning and profiling of heterogeneous circulating tumor cell subpopulations. *Angewandte Chemie - International Edition*, *54*(1), 139–143. <https://doi.org/10.1002/anie.201409376>
- Mouliere, F., Chandrananda, D., Piskorz, A. M., Moore, E. K., Morris, J., Ahlborn, L. B., Mair, R., Goranova, T., Marass, F., Heider, K., Wan, J. C. M., Supernat, A., Hudcová, I., Gounaris, I., Ros, S., Jimenez-Linan, M., Garcia-Corbacho, J., Patel, K., Østrup, O., ... Rosenfeld, N. (2018). Enhanced detection of circulating tumor DNA by fragment size analysis. *Science Translational Medicine*, *10*(466). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aat4921>
- Murtaza, M., Dawson, S. J., Tsui, D. W. Y., Gale, D., Forshe, T., Piskorz, A. M., Parkinson, C., Chin, S. F., Kingsbury, Z., Wong, A. S. C., Marass, F., Humphray, S., Hadfield, J., Bentley, D., Chin, T. M., Brenton, J. D., Caldas, C., & Rosenfeld, N. (2013). Non-invasive analysis of acquired resistance to cancer therapy by sequencing of plasma DNA. *Nature*, *497*(7447), 108–112. <https://doi.org/10.1038/nature12065>
- Newman, A. M., Bratman, S. V., To, J., Wynne, J. F., Eclov, N. C. W., Modlin, L. A., Liu, C. L., Neal, J. W., Wakelee, H. A., Merritt, R. E., Shrager, J. B., Loo, B. W., Alizadeh, A. A., & Diehn, M. (2014). An ultrasensitive method for quantitating circulating tumor DNA with broad patient coverage. *Nature Medicine*, *20*(5), 548–554. <https://doi.org/10.1038/nm.3519>
- Pallari, E., & Lewison, G. (2022). Cardiovascular and cancer risk factors analysis for 2001–2020 from the global research output and European newspapers. *Scientometrics*, *127*(9), 5159–5174. <https://doi.org/10.1007/s11192-022-04465-9>
- Pantel, K., & Alix-Panabières, C. (2016). Liquid biopsy: Potential and challenges. In *Molecular Oncology* (Vol. 10, Issue 3, pp. 371–373). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2016.01.009>
- Phallen, J., Sausen, M., Adleff, V., Leal, A., Hruban, C., White, J., Anagnostou, V., Fiksel, J., Cristiano, S., Papp, E., Speir, S., Reinert, T., Orntoft, M. B. W., Woodward, B. D., Murphy, D., Parpart-Li, S., Riley, D., Nesselbush, M., Sengamalay, N., ... Velculescu, V. E. (2017). Direct detection of early-stage cancers using circulating tumor DNA. *Science Translational Medicine*, *9*(403). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aan2415>

- Salu, P., & Reindl, K. M. (2024). Advancements in Circulating Tumor Cell Research: Bridging Biology and Clinical Applications. In *Cancers* (Vol. 16, Issue 6). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/cancers16061213>
- Sánchez-Herrero, E., Serna-Blasco, R., Robado de Lope, L., González-Rumayor, V., Romero, A., & Provencio, M. (2022). Circulating Tumor DNA as a Cancer Biomarker: An Overview of Biological Features and Factors That may Impact on ctDNA Analysis. In *Frontiers in Oncology* (Vol. 12). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.943253>
- Schobers, G., Koeck, R., Pellaers, D., Stevens, S. J. C., Macville, M. V. E., Paulussen, A. D. C., Coonen, E., van den Wijngaard, A., de Die-Smulders, C., de Wert, G., Brunner, H. G., & Esteki, M. Z. (2021). Liquid biopsy: state of reproductive medicine and beyond. In *Human Reproduction* (Vol. 36, Issue 11, pp. 2824–2839). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/humrep/deab206>
- Schwarzenbach, H., Hoon, D. S. B., & Pantel, K. (2011). Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. In *Nature Reviews Cancer* (Vol. 11, Issue 6, pp. 426–437). <https://doi.org/10.1038/nrc3066>
- Siravegna, G., Marsoni, S., Siena, S., & Bardelli, A. (2017). Integrating liquid biopsies into the management of cancer. In *Nature Reviews Clinical Oncology* (Vol. 14, Issue 9, pp. 531–548). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2017.14>
- Snyder, M. W., Kircher, M., Hill, A. J., Daza, R. M., & Shendure, J. (2016). Cell-free DNA Comprises an in Vivo Nucleosome Footprint that Informs Its Tissues-Of-Origin. *Cell*, *164*(1–2), 57–68. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.11.050>
- Tie, J., Wang, Y., Tomasetti, C., Li, L., Springer, S., Kinde, I., Silliman, N., Tacey, M., Wong, H. L., Christie, M., Kosmider, S., Skinner, I., Wong, R., Steel, M., Tran, B., Desai, J., Jones, I., Haydon, A., Hayes, T., ... Gibbs, P. (2016). Circulating tumor DNA analysis detects minimal residual disease and predicts recurrence in patients with stage II colon cancer. *Science Translational Medicine*, *8*(346). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaf6219>
- Tjon-Kon-Fat, L. A., Lundholm, M., Schröder, M., Wurdinger, T., Thellenberg-Karlsson, C., Widmark, A., Wikström, P., & Nilsson, R. J. A. (2018). Platelets harbor prostate

- cancer biomarkers and the ability to predict therapeutic response to abiraterone in castration resistant patients. *Prostate*, 78(1), 48–53. <https://doi.org/10.1002/pros.23443>
- Tkach, M., & Théry, C. (2016). Communication by Extracellular Vesicles: Where We Are and Where We Need to Go. In *Cell* (Vol. 164, Issue 6, pp. 1226–1232). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.01.043>
- Van Niel, G., D'Angelo, G., & Raposo, G. (2018). Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 19, Issue 4, pp. 213–228). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.125>
- Vidlarova, M., Rehulkova, A., Stejskal, P., Prokopova, A., Slavik, H., Hajduch, M., & Srovnal, J. (2023). Recent Advances in Methods for Circulating Tumor Cell Detection. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 24, Issue 4). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms24043902>
- Wan, J. C. M., Massie, C., Garcia-Corbacho, J., Mouliere, F., Brenton, J. D., Caldas, C., Pacey, S., Baird, R., & Rosenfeld, N. (2017). Liquid biopsies come of age: Towards implementation of circulating tumour DNA. In *Nature Reviews Cancer* (Vol. 17, Issue 4, pp. 223–238). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrc.2017.7>
- Xue, H., Yu, A., Lin, M., Chen, X., Guo, Q., Xu, L., & Huang, H. (2022). Efficiency of expanded noninvasive prenatal testing in the detection of fetal subchromosomal microdeletion and microduplication in a cohort of 31,256 single pregnancies. *Scientific Reports*, 12(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-24337-9>
- Yáñez-Mó, M., Siljander, P. R. M., Andreu, Z., Zavec, A. B., Borràs, F. E., Buzas, E. I., Buzas, K., Casal, E., Cappello, F., Carvalho, J., Colás, E., Cordeiro-Da Silva, A., Fais, S., Falcon-Perez, J. M., Ghobrial, I. M., Giebel, B., Gimona, M., Graner, M., Gursel, I., ... De Wever, O. (2015). Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. In *Journal of Extracellular Vesicles* (Vol. 4, Issue 2015, pp. 1–60). Co-Action Publishing. <https://doi.org/10.3402/jev.v4.27066>
- Yi Shen, S., Singhanian, R., Fehringer, G., Chakravarthy, A., A Roehrl, M. H., Chadwick, D., Zuzarte, P. C., Borgida, A., Ting Wang, T., & Li, T. (2018). Sensitive tumour detection and classification using plasma cell-free DNA methylomes. *Nature*, 563(7732), 579–583. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0703-0i>

## LIHTLITSENTS

### Lihlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Vjacheslav Morozov,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihlitsentsi) minu loodud teose

**“Vedelbiopsia ja selle perspektiivid vähi diagnostikas ning genoomikas”**, mille juhendaja on Ants Kurg PhD, reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.

2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 4.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.

3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

4. Kinnitan, et lihlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Vjacheslav Morozov

24.05.2024