

Potenciál volné cirkulující DNA v diagnostice nádorových onemocnění

Potential of Cell-free Circulating DNA in Diagnosis of Cancer

Kubacková V.^{1,2}, Sedlaříková L.^{1,2}, Bešše L.¹, Almáši M.^{1,2}, Hájek R.¹⁻³, Ševčíková S.^{1,2}

¹Babákova myelomová skupina, Ústav patologické fyziologie, LF MU, Brno

²Oddělení klinické hematologie, FN Brno

³Klinika hematonekologie LF OU a FN Ostrava

Souhrn

Volná cirkulující DNA (cf-DNA) je charakterizována jako extracelulární DNA, která může být přítomna v nízkých koncentracích v krvi zdravých jedinců. Cf-DNA je do krevního řečiště uvolňována apoptózou, ale i nekrotizací. Zvýšené hladiny se vyskytují u patologických stavů, jako je zánět, stres či autoimunitní onemocnění. Výrazně zvýšené hodnoty cf-DNA jsou patrné zejména u pacientů s malignitami, a to především v pokročilých stádiích nemoci. V takovémto případě je nádorově specifická cf-DNA uvolňována nekrotizací z buněk primárního nádoru a metastáz. V poslední době se hodně studií zabývá tzv. liquid biopsy (tekutou biopsií), která umožňuje poměrně snadnou detekci cirkulujících nádorových buněk i cirkulujících molekul nukleových kyselin z periferní krve k diagnostice nádorových onemocnění. Kvantitativní stanovení a detekce genetických a epigenetických změn v cf-DNA u pacientů s různými malignitami má potenciální využití v molekulární diagnostice, prognóze, monitorování průběhu nemoci a odpovědi na léčbu. Tento článek je zaměřen na potenciální využití cf-DNA jako krevního biomarkeru u vybraných solidních nádorů a hematologických malignit.

Klíčová slova

volná cirkulující DNA – nádorový marker – solidní nádory – hematologické malignity

Summary

Circulating cell-free DNA (cf-DNA) is characterized as extracellular DNA that may be present in the blood of healthy individuals in low concentrations. Cf-DNA is released by apoptosis or necrosis into the bloodstream. Increased levels are found in pathological conditions, such as inflammation, autoimmune diseases, or stress. Significant increase of cf-DNA is particularly evident in patients with malignancies, especially in the advanced stages of the disease. In this case, the tumor specific cf-DNA is released by necrosis from the cells of primary tumor and metastases. Recently, many studies concentrate on the so-called 'liquid biopsies' that allow detection of circulating tumor cells and circulating nucleic acids from peripheral blood for tumor diagnostics. Quantitative methods and detection of genetic and epigenetic alternations of cf-DNA in patients with different malignancies have potential applications in molecular diagnosis, prognosis, monitoring of disease progression and response to treatment. This review focuses on potential utility of cf-DNA as a blood biomarker in selected solid tumors and hematologic malignancies.

Key words

circulating cell-free DNA – tumor marker – solid tumors – hematological malignancies

Práce byla podpořena grantem IGA MZ ČR NT14575.

This study was supported by grant of Internal Grant Agency of the Czech Ministry of Health NT14575.

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.

The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE "uniform requirements" for biomedical papers.



RNDr. Sabina Ševčíková, Ph.D.
Babákova myelomová skupina
Ústav patologické fyziologie
LF MU
Kamenice 5, A3
625 00 Brno
e-mail: sevcik@med.muni.cz

Obdrženo/Submitted: 13. 3. 2015

Přijato/Accepted: 18. 5. 2015

<http://dx.doi.org/10.14735/amko2015251>

Úvod a historie

Volná cirkulující DNA, z anglického výrazu cell-free DNA (cf-DNA), představuje extracelulární krátké fragmenty dvouřetězcových molekul DNA o délce 180 bp vyskytující se v krevním oběhu a jiných tělních tekutinách člověka [1].

Cf-DNA v krevní plazmě zdravých jedinců byla poprvé popsána v roce 1948 [2]. V roce 1977 Leon et al popsali výskyt cf-DNA v souvislosti s nádory. Pomocí radio-imuno-analýzy bylo otestováno celkem 173 vzorků sér pacientů s maligními nádory (plic, střev, ledvin, prostaty, dělohy, vaječníků, prsu aj.) a 55 vzorků sér zdravých osob. Zjistili, že pacienti s nádorovým onemocněním vykazovali v plazmě významně vyšší hladiny cf-DNA oproti zdravým kontrolám. V případě zdravých dárců se průměrná koncentrace cf-DNA pohybovala kolem 13 ng/ml, zatímco u pacientů s maligními nádory naměřené hodnoty dosahovaly rozmezí 0–5 000 ng/ml s průměrnou koncentrací cf-DNA 180 ng/ml. Výrazně vyšší koncentrace cf-DNA byly zjištěny v séru pacientů s metastázami ve srovnání s pacienty s lokalizovaným nádorem. Dále po radioterapii byl prokázán pokles hladiny cf-DNA přibližně u 66–90 % pacientů s několika různými malignitami, jako např. nádory plic, vaječníků, dělohy či lymfomy. Snížení hladiny cf-DNA korelovalo se zlepšením stavu pacienta (snížení velikosti nádoru a bolesti). Přetrvávající vysoké koncentrace cf-DNA pak byly asociovány s rezistencí k léčbě a špatnou prognózou [3].

Vlastnosti a biologie cf-DNA

V periferní krvi zdravých jedinců se cf-DNA vyskytuje ve velmi nízkých koncentracích (10–100 ng/ml). K uvolnění fragmentů molekul DNA z buněk dochází apoptózou, tedy programovanou buněčnou smrtí [4]. V takovémto případě fragmenty DNA dosahují délky kolem 180 bp a v periferní krvi jsou navázány na erythrocyty [5]. Fragmenty cf-DNA v krevním oběhu mají krátký poločas rozpadu, zhruba za 10–15 min jsou zejména činnostmi jater odstraněny z krevního řečiště [6].

Některé studie ukázaly, že buňky mohou cf-DNA uvolňovat aktivně. Tato frakce DNA může být zodpovědná za některé buněčné funkce, jako je transkripce, případně se může podílet na komunikaci mezi buňkami a tkáněmi [5].

Ke změnám v kvalitě a také v množství cf-DNA v oběhu dochází v souvislosti s patologickým stavem jedince. Vyšší koncentrace cf-DNA nacházíme u stavů, jako je zánět, trauma, operační zákrok, infarkt či autoimunitní onemocnění [7–10]. Zvýšené hladiny cf-DNA v krevním řečišti jsou výsledkem nadměrného uvolnění fragmentů molekul DNA, které byly způsobeny masivním úmrtím buněk či nedostatečným odstraněním uvolněné DNA z mrtvých buněk činnostmi jater [6].

Vlastnosti cf-DNA u nádorových onemocnění

Výrazně vyšší hladiny cf-DNA, dosahující koncentrace až 1 000 ng/ml, jsou patrné především u různých druhů malignit

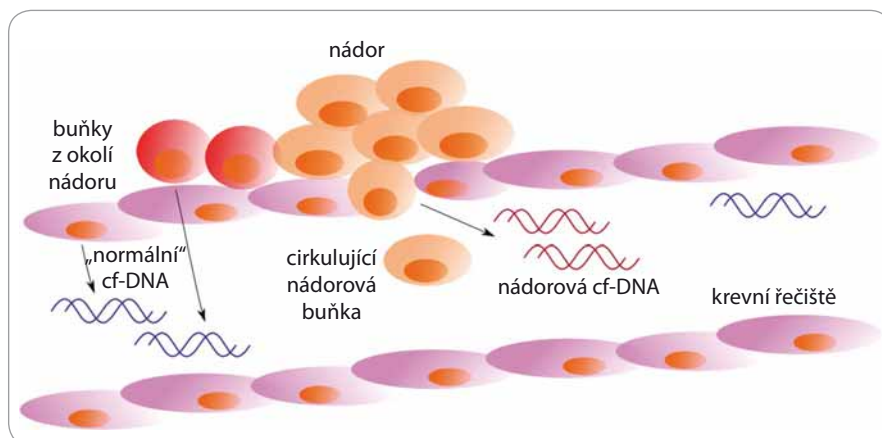
a zejména pak u pacientů s metastázami [11]. Nádorově specifická cf-DNA je do oběhu uvolňována nekrotizací nádorových buněk (obr. 1). Do krevního oběhu je DNA také uvolňována buňkami zdravé tkáně, které se nacházejí v blízkosti nádoru [1]. V krevním oběhu se obvykle vyskytuje ve formě velkých fragmentů delších než 180 bp, které s proteiny vytvářejí komplexy připomínající nukleozom [12].

Diehl et al zjistili, že u pacientů s nádorem o velikosti 100 g (který je přibližně tvořen 3×10^{10} nádorovými buňkami) se denně do krevního řečiště uvolní 3,3 % nádorové cf-DNA [13]. Nádorová DNA je z 10–90 % tvořena cf-DNA, tedy fragmenty molekul DNA, které jsou apoptózou uvolněny z buněk v okolí nádoru. Množství nádorové cf-DNA závisí na typu nádoru. Nízký podíl nádorové frakce může být způsoben tím, že nádorové buňky jsou oddělovány od nádoru a do krevního oběhu jsou uvolňovány až během procesu epiteliálně-mezenchymálního přechodu [14].

Praktické využití cf-DNA

Přestože byla cf-DNA poprvé identifikována před více než 60 lety, výzkum cf-DNA značně zaostal z důvodu chybějících citlivých a specifických analytických metod. V důsledku těchto laboratorních omezení došlo k přenesení poznatků základního výzkumu do klinické praxe s mnoholetým zpožděním. Teprve vývoj efektivních izolačních postupů a citlivých metod využívajících nová a specifická fluorescenční barviva a zdokonalené PCR techniky umožnil v průběhu posledních dvou desetiletí postup v oblasti výzkumu cf-DNA [15].

Kvantitativní a kvalitativní analýza cf-DNA se v poslední době stala jedním ze slibných diagnostických přístupů. Jedním ze zásadních faktorů, které ovlivňují hodnocení cf-DNA, je standardizace metodických postupů a definování optimálního typu analyzovaného vzorku (sérum nebo plazma) tak, aby bylo dosaženo konzistentních a srovnatelných dat mezi jednotlivými laboratořemi. V současné době se jednotlivé metodické postupy liší v preanalytické fázi, izolaci DNA, kvantifikaci a analýze, a tím i v interpretaci výsledků [16].



Obr. 1. Uvolňování cf-DNA nekrotizací z nádorových buněk do krevního řečiště. Do krevního oběhu je také uvolňována cf-DNA z buněk v okolí nádoru.

Tab. 1. Vybrané studie zabývající se kvantitativní a kvalitativní analýzou cf-DNA u kolorektálního karcinomu.

Změna v cf-DNA	Konkrétní gen	Počet pacientů	Senzitivita	Specifická	Reference
metylace DNA	APC	49	6 %	100 %	[21]
	<i>hMLH1</i>		43 %	98 %	
	<i>HLTF</i>		32 %	93 %	
	všechny geny společně		57 %	90 %	
metylace DNA	<i>HPP1/TPEF, HLTF, hMLH1</i>	38	–	–	[22]
metylace DNA	<i>TMEFF2, NGFR, SEPT9</i>	133	–	–	[23]
metylace DNA	<i>SEPT9</i>	100	67 %	89 %	[24]
metylace DNA	<i>RASSF2A</i>	31	–	–	[25]
mutace	<i>KRAS</i>				
mutace	<i>KRAS</i>	31	–	–	[26]
mutace	<i>KRAS</i>	206	87 %	99 %	[27]
mutace	<i>KRAS2</i>	86	–	–	[28]
mutace	<i>RAS, PIK3CA, BRAF</i>	35	–	–	[29]
mutace	<i>APC</i>	33	–	–	[30]
mutace	<i>p53</i>	46	–	–	[31]
mutace	<i>KRAS</i>	25	–	–	[32]
mutace	<i>KRAS</i>	52	–	–	[33]
mutace	<i>KRAS</i>	71	25 % (S)	100 % (S)	[34]
			31 % (P)	97 % (P)	
mutace	<i>KRAS</i>	229	–	–	[35]
mutace	<i>KRAS</i>	28	–	–	[36]
mutace	<i>KRAS, BRAF</i>	108	–	–	[37]
mutace	<i>KRAS, BRAF</i>	38	–	–	[38]
koncentrace cf-DNA	–	70	–	–	[39]
koncentrace cf-DNA	–	55	–	–	[40]

S – hodnoty vztažené pro vzorky séra, P – hodnoty vztažené ke vzorkům plazmy

Praktické využití u nádorových onemocnění

Vědci zjistili, že prakticky všechny druhy nádorů jsou zapříčiněny genetickými změnami v DNA, které u pacientů mohou být detekovány a dále sledovány. Přestože sám nádor je hlavním zdrojem nádorové DNA, získání DNA pomocí biopsie představuje pro pacienta invazivní a riskantní postup, který v některých případech není možné provést [16].

Detekce nádorově specifické cf-DNA, nazývaná také tekutá biopsie (liquid biopsy), se stává nadějným nástrojem pro minimálně invazivní monitoring pacientů s maligním onemocněním. Frakce DNA pocházející z nádorové tkáně se volně

vyskytují v periferní krvi těchto pacientů (zejména v pokročilých stádiích nemoci). Nedávné studie také ukázaly, že cf-DNA odvozená od nádorových buněk může být použita pro monitorování nádorové masy a odpovědi na léčbu u pacientů se solidními nádory, ale také u pacientů s hematologickými malignitami. Hladiny cf-DNA v plazmě pacientů korelují s progresí nemoci, umožňují kontinuálně sledovat minimální reziduální chorobu, určit molekulární relaps onemocnění a zahájit tak včasnou léčbu [17].

V cf-DNA můžeme detekovat nádorově specifické genetické a epigenetické změny, které jsou přítomny rovněž v buňkách primárního nádoru [18].

Těmito genetickými změnami jsou bodové mutace v důležitých genech, chromozomové přestavby, ztráta heterozygoty (loss of heterozygosity – LOH), změny v mikrosatelitech a v metylaci DNA. Detekce těchto charakteristických změn odliší specifickou nádorovou cf-DNA od pozadí „normální“ cf-DNA v krevním oběhu a tím umožňuje vyšší diagnostickou specifickou ve srovnání s pouhým kvantitativním stanovením celkového množství cf-DNA [19].

**Solidní nádory
Kolorektální karcinom**

V ČR je kolorektální karcinom (colorectal cancer – CRC) u obou pohlaví dru-

hým nejčastějším nádorovým onemocněním. Ročně je nově diagnostikováno kolem 8 000 pacientů a zhruba polovina z nich na něj umírá. U mužů je incidence i mortalita tohoto karcinomu vyšší než u žen [20]. V tab. 1 jsou uvedeny vybrané studie zabývající se využitím cf-DNA u tohoto onemocnění [21–40].

Kvantifikace nádorově specifické cf-DNA může představovat užitečný nástroj pro monitorování pacientů s CRC a také může sloužit při rozpoznávání vysoce rizikových pacientů. Frattini a jeho výzkumný tým zjistili, že u pacientů s CRC byly hladiny cf-DNA v periferní krvi výrazně vyšší oproti zdravým jedincům. Dále zjistili, že hladiny cf-DNA po operačním zákroku postupně klesaly a naopak jejich zvyšování bylo zaznamenáno u pacientů s metastázemi či u relapsu onemocnění [39]. Tyto výsledky jsou v souladu s poznatky jiné studie, ve které Schwarzenbach a jeho výzkumný tým uvedli, že u pacientů ve IV. stadiu CRC byly hladiny cf-DNA výrazně vysoké a během 1. linie chemoterapie docházelo k jejich poklesu [40]. Toto potvrzuje i studie, ve které bylo zjištěno, že detekovatelné množství cf-DNA v periferní krvi koreluje se stadiem nádoru. Pouze u 47 % pacientů s CRC I. stupně byly měřitelné hodnoty cf-DNA. Se zvyšujícím se stupněm progresse nemoci se hladiny cf-DNA zvyšovaly, např. u II. stupně byly hladiny měřitelné u 55 % pacientů, u IV. stupně až u 82 % z nich. Toto zjištění tedy poukazuje na fakt, že pouze měření hladiny cf-DNA v krvi pacienta by mohlo být v budoucnu použito k určení stadia progresse rakoviny. Když byly měřeny koncentrace cf-DNA u 206 pacientů v pokročilém stadiu CRC s metastázemi, bylo zjištěno, že pacienti s nižšími krevními hladinami cf-DNA dosahovali delší doby přežití [27].

Významnou genetickou změnou, kterou můžeme u pacientů s CRC v cf-DNA sledovat, jsou somatické mutace v genu *KRAS*. Tento gen je charakteristický vysokou četností mutací, které přispívají k progresi nádoru [41]. Terapeutickou možností pro pacienty s CRC je cílená biologická léčba monoklonálními protilátkami (cetuximab a panitumumab) založená na inhibici *EGFR* a signálních drah navozujících nádory. Negativ-

ním prediktorem léčebné odpovědi na anti-*EGFR* terapii u pacientů s metastatickým kolorektálním karcinomem (metastatic colorectal cancer – mCRC) jsou aktivační somatické mutace v kodonech 12. a 13. genu *KRAS*, jenž se účastní signálních kaskád spouštěných *EGFR*. V současné době je podmínkou pro indikaci cílené anti-*EGFR* terapie průkaz nemutovaného genu *KRAS* [34,36].

Přítomnost aktivačních mutací v genu *KRAS* lze také detekovat v cf-DNA odvozené z primárního nádoru a metastáz. Významnou výhodou této metody je především v jejím minimálně invazivním přístupu, neboť získání vzorků nádorové tkáně biopsií pro účely genetické analýzy je obtížné [36]. V nedávné studii Bettgowda et al detekovali u 206 pacientů s mCRC přítomnost mutace v kodonu 12. nebo 13. genu *KRAS* v cf-DNA ze séra a tkání primárního nádoru. U 33 % pacientů byla v cf-DNA detekována mutovaná varianta genu, tyto mutace byly nalezeny i v primárním nádoru. Procentuální shoda mezi *KRAS* mutacemi v séru a nádorové tkáni byla 95%. U provedeného testování detekce mutací v klinicky důležitém genu *KRAS* byla stanovena 87% senzitivita a 99% specifita [27]. Dále bylo zjištěno, že u 24 pacientů, kteří nejprve vykazovali dobrou reakci na léčbu anti-*EGFR* monoklonálními protilátkami, došlo později k relapsu onemocnění. U 96 % z nich došlo k rozvinutí jedné nebo více mutací v genu *KRAS* [27].

Travisoli et al se ve své studii zabývali prognostickým významem stanovení mutace v kodonu 12. genu *KRAS2* v cf-DNA ze séra 86 pacientů s CRC, kteří podstoupili léčbu. Zjištěné údaje byly následně porovnány se stavem mutací v genu *KRAS2* u primárních nádorů [28]. Pacienti s pokročilou formou nemoci a detekovanou mutací v genu *KRAS2* v séru zemřeli do 24 měsíců od provedení chirurgického zákroku. U těchto pacientů byla po chirurgické resekci detekovatelná reziduální choroba. Doba přežití byla výrazně lepší u pacientů s pokročilou formou nemoci bez mutace v genu *KRAS2*, 56 % z nich vykazovalo dobu přežití více než 24 měsíců a jeden pacient byl naživu po uplynutí 44 měsíců [25].

Pomocí PCR bylo testováno 31 sér pacientů s pokročilou formou CRC a 24 sér zdravých osob. Bodová mutace v genu *KRAS* byla detekována v cf-DNA u 12 (39 %) pacientů s CRC a ani v jednom případě u zdravých jedinců. Výsledky ukazují, že mutace v genu *KRAS* jsou snadno zjištěitelné PCR technikami v plazmě/séru pacientů s pokročilým CRC. Toto testování může představovat možný způsob detekce a monitorování CRC [26].

Karcinom plic

Karcinom plic představuje významnou skupinu nádorů u mužů v české populaci [20]. Již Leon et al ve své práci zjistili, že vyšší hodnoty cf-DNA byly patrné u pacientů s metastázemi oproti pacientům s lokalizovaným nádorem plic. Po léčbě došlo k poklesu hladin cf-DNA u 75 % pacientů [3]. Také Sozzi et al uvedli, že po operačním zákroku došlo u pacientů k postupnému poklesu hladin cf-DNA, které pak byly srovnatelné se zdravými kontrolami. Kvantifikace cf-DNA může představovat nový postup monitorování úspěšnosti chirurgických zákroků a hodnocení účinnosti chemo/radioterapie [42].

Nejčastěji jsou u karcinomu plic v cf-DNA vyšetřovány mutace v genu pro *KRAS*, *EGFR* a *p53*. Gautschi et al analyzovali celkem 180 vzorků plazmy pacientů s plicním karcinomem a zjistili významnou korelaci mezi přítomností mutace v genu *KRAS* v cf-DNA a špatnou prognózou [43]. Mutace v genu pro *EGFR* hrají významnou roli u nemalobuněčného karcinomu plic (non-small cell lung cancer – NSCLC), který představuje až 80 % všech plicních malignit [44]. K prodloužení přežití pacientů s pokročilým stadiem NSCLC významně přispívá zavedení molekulárně cílené léčby tyrozinkinázovými inhibitory (TKI), které blokují aktivaci kaskády genu *EGFR*. Detekce aktivačních mutací genu *EGFR*, delece na 19. exonu a bodová mutace na 21. exonu jsou užitečné v předpovědi dobré odpovědi na léčbu TKI a progresse celkového přežití pacientů [45]. V léčbě NSCLC jsou běžně užívány TKI erlotinib a gefitinib.

Detekce mutací v genu *EGFR* v primárním nádoru vyžaduje biopsii nádoro-

Tab. 2. Vybrané studie zabývající se kvantitativní a kvalitativní analýzou cf-DNA u karcinomu plic.

Změna v cf-DNA	Konkrétní gen	Počet pacientů	Senzitivita	Specifická	Reference
mutace	<i>KRAS</i>	180	–	–	[43]
mutace	<i>KRAS</i>	308	–	–	[50]
mutace	<i>KRAS</i>	246	–	–	[51]
mutace	<i>p53</i>	35	–	–	[52]
mutace	<i>EGFR</i>	49	–	–	[48]
mutace	<i>EGFR</i>	35	92 %	100 %	[49]
mutace	<i>EGFR</i>	230	–	–	[46]
mutace	<i>EGFR</i>	31	–	–	[53]
mutace	<i>EGFR</i>	54	–	–	[47]
metylace DNA	<i>APC</i>	78	–	–	[54]
metylace DNA	<i>SEPT9</i>	70	44 %	92 %	[55]
metylace DNA	<i>RASSF1A, RARB2</i>	60	87 %	75 %	[56]
metylace DNA	<i>DAPK, MGMT, GSTP</i>	76	–	–	[57]
metylace DNA	<i>p16, DAP, GSTP1, MGMT</i>	22	–	–	[58]
koncentrace cf-DNA	<i>β-actin</i>	84	75 %	86 %	[42]
koncentrace cf-DNA	<i>hTERT</i>	100	90 %	86 %	[59]
koncentrace cf-DNA	<i>hTERT</i>	151	86 %	47 %	[60]
koncentrace cf-DNA	<i>β-actin</i>	30	86 %	75 %	[61]
koncentrace cf-DNA	<i>β-actin</i>	25	48 %	100 %	[62]
LOH a MI	–	38	–	–	[42]

LOH – ztráta heterozygoty, MI – instabilita mikrosatelitů

rové tkáně, což v mnohých případech není proveditelné. Z těchto důvodů se do popředí zájmu dostává využití tekuté biopsie, detekce mutací v genu *EGFR* v cf-DNA z periferní krve, jenž představuje minimálně invazivní přístup [46]. Využitím cf-DNA se ve své studii zabývali Bai et al, kteří u 81 z 230 pacientů ve III. a IV. stadiu NSCLC detekovali přítomnost mutací v genu *EGFR*. Pacienti, u nichž byly přítomny mutace, na léčbu inhibitory gefitinib reagovali mnohem lépe a vykazovali delší dobu přežití oproti pacientům, u kterých mutace v genu *EGFR* nebyly přítomny [46]. Toto zjištění potvrzuje Kuang et al, kteří prováděli studie u pacientů léčených gefitinibem a erlotinibem [47]. Mack et al se zabývali účinností léčby erlotinibem a docetaxelem u pacientů s aktivačními mutacemi v genu *EGFR* a zjistili, že docetaxel nesnižoval účinnost erlotinibu [48]. V další studii bylo uvedeno, že hladiny mutant-

ních sekvencí v genu *EGFR* korelují s klinickou odpovědí pacienta. Vymizení mutace bylo detekováno u všech pacientů s částečnou nebo kompletní klinickou remisí, zatímco přetrvání mutace bylo zaznamenáno u pacientů s progresí nemoci [49]. Z uvedených poznatků tedy vyplývá, že přesná kvantifikace a citlivá detekce mutací v genu *EGFR* v cf-DNA z periferní krve by byla užitečná pro predikci léčebné odpovědi, monitorování progresu nemoci a pro včasné odhalení selhání léčby spojené se získanou rezistencí. Přehled vybraných studií zabývajících se kvantitativní a kvalitativní analýzou cf-DNA u karcinomu plic je uveden v tab. 2 [42,43,46–49,50–62].

Karcinom prsu

V ČR je karcinom prsu nejčastějším zhoubným nádorem žen, jehož četnost se za posledních 20 let zdvojnásobila [20]. Přehled vybraných studií za-

bývajících se využitím cf-DNA u tohoto onemocnění je uveden v tab. 3 [63–83].

Kohler et al ve své studii uvedli, že hladiny cf-DNA u pacientek s maligním nádorem prsu dosahovaly výrazně vyšších hodnot oproti pacientkám s benigním nádorem a zdravým ženám. Tento kvantitativní přístup by mohl sloužit k odlišení pacientek s maligním nádorem [82]. Catarino et al kvantifikovali cf-DNA pomocí PCR v reálném čase a zjistili, že naměřené koncentrace byly vyšší před operací oproti naměřeným hodnotám po operačním zákroku. Tyto výsledky prokazují, že cf-DNA by byla vhodným markerem monitorování nemoci. Hladiny navíc korelovaly se stadiem nemoci, velikostí nádoru a metastázami do lymfatických uzlin [81].

Uvádí se, že onkogen *PIK3CA* je nejčastěji mutován u karcinomu prsu a nachází se u 40 % pacientek s touto diagnózou [84]. Ve své studii Board et al

Tab. 3. Vybrané studie zabývající se kvantitativní a kvalitativní analýzou cf-DNA u karcinomu prsu.

Změna v cf-DNA	Konkrétní gen	Počet pacientů	Senzitivita	Specifická	Reference
metylace DNA	<i>RASSF1, GPX7, RASGRF2...</i>	33	91 %	96 %	[63]
metylace DNA	<i>RASSF1A</i>	148	–	–	[64]
metylace DNA	<i>RASSF1A, APC</i>	86	–	–	[65]
metylace DNA	<i>RASSF1A, MAL, SFRP</i>	39	–	–	[66]
metylace DNA	<i>RASSF1A</i>	61	–	–	[67]
metylace DNA	<i>MDGI, PAX 5, RARβ2...</i>	20	–	–	[68]
metylace DNA	<i>BRCA1</i>	50	25 %	100 %	[69]
	<i>Era</i>		44 %	100 %	
	<i>PRB</i>		44 %	100 %	
	<i>TMS1</i>		11 %	100 %	
metylace DNA	<i>Erβ, RARβ2</i>	100	–	–	[70]
metylace DNA	<i>BRCA1, MDR1, Stratifin...</i>	30	–	–	[71]
metylace DNA	<i>APC</i>	93	17 %	100 %	[72]
	<i>GSTP1</i>		26 %	100 %	
	<i>RARB2</i>		26 %	92 %	
	<i>RASSF1A</i>		32 %	95 %	
	všechny geny společně		62 %	87 %	
mutace	<i>PIK3CA</i>	76	–	–	[73]
mutace	<i>PIK3CA</i>	109	–	–	[74]
mutace	<i>p53</i>	46	–	–	[75]
amplifikace	<i>HER2</i>	130	–	–	[76]
amplifikace	<i>HER2</i>	50	–	–	[77]
LOH a MI	–	71	–	–	[78]
LOH	–	388	–	–	[79]
koncentrace cf-DNA	–	94	93 %	67 %	[80]
koncentrace cf-DNA	–	175	–	–	[81]
koncentrace cf-DNA	–	52	81 %	69 %	[82]
koncentrace cf-DNA	–	65	–	–	[83]

LOH – ztráta heterozygoty, MI – instabilita mikrosatelitů

srovnávali přítomnost této mutace v cf-DNA u 46 pacientek s metastázemi a u 30 pacientek s lokalizovaným nádorem. Zjistili, že tato mutace byla nalezena v 13 ze 46 vzorků plazmy (28%) a v 10 ze 46 vzorků séra (21%) pacientek s metastázemi, ale ani v jednom případě u pacientek s lokalizovaným operabilním nádorem [73]. V jiné studii byla tato mutace v cf-DNA detekována téměř u 30% pacientek v pokročilém stadiu karcinomu prsu [74]. Tyto poznatky jasně ukazují, že detekce mutace v genu

pro *PIK3CA* v cf-DNA je podstatně vyšší u pokročilejších forem nemoci.

K dalším genetickým změnám s potenciálním uplatněním při vyšetřování karcinomu prsu patří nestabilita mikrosatelitů a ztráta heterozygotnosti DNA [78,79]. V nedávné studii bylo prokázáno, že změny v nádorově supresorových genech *TIG1*, *PTEN*, *CCND2*, *RB1* a *BRCA1* v cf-DNA jsou spojovány s agresivnější formou karcinomu. Zejména LOH markeru D12S1725 v genu *CCND2* se může stát významným indiká-

torem nepříznivé prognózy [79]. Dehan et al ve své práci uvedli, že epigenetické změny jsou v nádorových buňkách změnami konstantními a mají podstatný vliv na časnou kancerogenezi a progresi nemoci [85]. Nejvíce zkoumanou epigenetickou změnou je metylace DNA, např. hypermetylace v genu *RASSF1A* a *APC* jsou spojovány s horší prognózou [41]. Detekce metylovaných míst v cf-DNA představuje potenciální možnost posouzení stupně rizika pacientek s karcinomem prsu.

Tab. 4. Vybrané studie zabývající se analýzou cf-DNA u pacientů s hematologickými malignitami.

Malignita	Stanovení	Počet pacientů	Senzitivita	Specifická	Reference
HL	koncentrace cf-DNA	45	73 %	71 %	[86]
HL	mutace v genu <i>POLR2</i>	43	–	–	[87]
non-HL	přestavba v genu <i>IGH</i>	110	–	–	[88]
non-HL	koncentrace cf-DNA	97	70 %	71 %	[86]
non-HL	mutace v genu <i>p53</i>	20	–	–	[89]
non-HL	přestavba v genu <i>IgH</i> a <i>TCRγ</i>	360	–	–	[90]
non-HL	přestavba v genu <i>IGH</i> a <i>IGK</i>	17	–	–	[91]
non-HL	fúze genů <i>NPM-ALK</i> mutace v genu <i>POLR2</i>	158	–	–	[87]
non-HL	přestavba v genu <i>IGH</i>	14	–	–	[92]
MM	přestavba v genu <i>IGH</i>	9	–	–	[93]
MM	přestavba v genu <i>IGH</i>	17	–	–	[94]
ALL	přestavba v genu <i>IGH</i> a <i>TCR</i>	21	–	–	[95]
AL	koncentrace cf-DNA	60	–	–	[96]
AML	koncentrace cf-DNA	66	–	–	[97]
AML	mutace v genu <i>NPM</i>	100	–	–	[98]

HL – Hodgkinův lymfom, non-HL – non-Hodgkinův lymfom, MM – mnohočetný myelom, ALL – akutní lymfoblastická leukemie, AL – akutní leukemie, AML – akutní myeloidní leukemie

Hematologické malignity

V případě hematologických malignit jsou poznatky ohledně využití cf-DNA na experimentální úrovni. Přehled studií zabývajících se využitím cf-DNA u vybraných hematologických malignit je uveden v tab. 4 [86–98].

Několik studií bylo provedeno např. u B buněčných malignit. U pacientů s non-Hodgkinovým lymfomem a akutní lymfoblastickou leukémií byla v cf-DNA detekována přestavba těžkého imunoglobulinového řetězce. Nádorově odvozený klon DNA CDRIII byl nalezen v periferní krvi 52 (47%) ze 110 pacientů. Z následně provedených odběrů byla patrná korelace mezi přetrvávajícím nádorově specifickým klonem DNA v séru/plazmě a rezistencí k léčbě nebo brzkým relapsem nemoci. Výsledky ukazují, že nádorově specifická cf-DNA může být detekována z periferní krve většiny pacientů s B buněčnými malignitami a může sloužit jako nový marker monitorování odpovědi na léčbu [88].

Také v jiné studii byla stanovena nádorová cf-DNA u pacientů s agresivním B bu-

něčným non-Hodgkinovým lymfomem. U všech pacientů byl nalezen alespoň jeden dominantní nádorový klon v době diagnózy. S využitím nové techniky sekvenování byli autoři schopni identifikovat nádorový klon u 94% pacientů s velkým difúzním B buněčným lymfomem a velkým mediastinálním B buněčným lymfomem. U 81% těchto pacientů byla detekovatelná hladina cf-DNA nádorového klonu v séru či mononukleárních buňkách periferní krve [91].

Další hematologickou malignitou, u které bylo testováno využití cf-DNA, je mnohočetný myelom (multiple myeloma – MM). O tomto onemocnění byl na konferenci American Society of Hematology (ASH) prezentován abstrakt, který pojednával o cf-DNA nesoucí specifickou sekvenci IgH klonu odvozeného od plazmatických buněk kostní dřeně. U pacientů byly detekovány přestavby v cf-DNA v periferní krvi. Bylo zjištěno, že po nasazení kombinované chemoterapie hladiny cf-DNA klesaly, hodnoty byly však v krvi tak nízké, že výsledky byly limitované citlivostí testu [93].

I přes významné pokroky v léčebných postupech dochází u nejméně 50% pacientů s MM k relapsu onemocnění. Z těchto důvodů je hledán vhodný minimálně invazivní marker z periferní krve umožňující časnou detekci molekulárního relapsu, a tím i zahájení léčby. I na našem pracovišti probíhá výzkum klinického využití cf-DNA v monitorování minimální reziduální choroby u pacientů s MM. Výsledky studie byly prezentovány na mezinárodní konferenci ASH v roce 2014. Kromě jiného se ukázalo, že nejpočetněji byly v séru zastoupeny DNA frakce o délce 180–220 bp, zatímco delší fragmenty byly častěji přítomny ve vzorcích odebraných v různých časových bodech léčby [94].

Závěr

Detekce cf-DNA neboli tzv. tekutá biopsie (liquid biopsy) představuje nový, minimálně invazivní nástroj nabízející nové možnosti v diagnostice různých druhů maligních nádorů. Cf-DNA skýtá obrovský potenciál v časném rozpoznání nádorů, v prognóze a monitorování ne-

moci. Představuje zejména možnost vytvoření personalizované medicíny, a tím zlepšení kvality života pacientů. Stále je však nutné provedení dalších studií s větší kohortou pacientů, které povedou ke zlepšení klinického využití cf-DNA.

Literatura

- Jahr S, Hentze H, Englisch S et al. DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer Res* 2001; 61(4): 1659–1665.
- Mandel P, Metais P. Les acides nucleiques du plasma sanguin chez l'homme. *C R Seances Soc Biol Fil* 1948; 142(3–4): 241–243.
- Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM et al. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res* 1977; 37(3): 646–650.
- Anker P, Stroun M. Circulating DNA in plasma or serum. *Medicina (B Aires)* 2000; 60(5 Pt 2): 699–702.
- Stroun M, Lyautey J, Lederrey C et al. About the possible origin and mechanism of circulating DNA: apoptosis and active DNA release. *Clin Chim Acta* 2001; 313(1–2): 139–142.
- Zeerleder S. The struggle to detect circulating DNA. *Crit Care* 2006; 10(3): 142.
- Rumore PM, Steinman CR. Endogenous circulating DNA in systemic lupus erythematosus. Occurrence as multimeric complexes bound to histone. *J Clin Invest* 1990; 86(1): 69–74.
- Zeerleder S, Zwart B, Wuillemin WA et al. Elevated nucleosome levels in systemic inflammation and sepsis. *Crit Care Med* 2003; 31(7): 1947–5191.
- Lo YMD, Rainer TH, Chan LYS et al. Plasma DNA as a prognostic marker in trauma patients. *Clin Chem* 2000; 46(3): 319–323.
- Rainer TH, Wong LK, Lam W et al. Prognostic use of circulating plasma nucleic acid concentrations in patients with acute stroke. *Clin Chem* 2003; 49(4): 562–569.
- Shapiro B, Chakrabarty M, Cohn EM et al. Determination of circulating DNA levels in patients with benign or malignant gastrointestinal disease. *Cancer* 1983; 51(11): 2116–2120.
- Holdenrieder S, Stieber P, Chan LY et al. Cell-free DNA in serum and plasma: comparison of ELISA and quantitative PCR. *Clin Chem* 2005; 51(8): 1544–1546.
- Diehl F, Li M, Dressman D et al. Detection and quantification of mutations in the plasma of patients with colorectal tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102(45): 16368–16373.
- Stroun M, Maurice P, Vasioukhin V et al. The origin and mechanism of circulating DNA. *Ann NY Acad Sci* 2000; 906: 161–168.
- Jung K, Fleischhacker M, Rabien A. Cell-free DNA in the blood as a solid tumor biomarker – a critical appraisal of the literature. *Clin Chim Acta* 2010; 411(21–22): 1611–1624.
- Esposito A, Bardelli A, Criscitiello C et al. Monitoring tumor-derived cell-free DNA in patients with solid tumors: clinical perspectives and research opportunities. *Cancer Treat Rev* 2014; 40(5): 648–655. doi: 10.1016/j.ctrv.2013.10.003.
- Fiegl H, Millinger S, Mueller-Holzner E et al. Circulating tumor-specific DNA: a marker for monitoring efficacy of adjuvant therapy in cancer patients. *Cancer Res* 2005; 65(4): 1141–1145.
- Gall TM, Frampton AE, Krell J et al. Cell-free DNA for the detection of pancreatic, liver and upper gastrointestinal cancers: has progress been made? *Future Oncol* 2013; 9(12): 1861–1869. doi: 10.2217/fon.13.152.
- Diehl F, Schmidt K, Choti MA et al. Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. *Nat Med* 2008; 14(9): 985–990. doi: 10.1038/nm.1789.
- Dušek L, Mužík J, Kubásek M et al (eds). *Epidemiologie zhoubných nádorů v České republice* [monografie na Internetu]. Brno: Masarykova univerzita; 2005 [citováno 1. března 2015]. Dostupný z: <http://www.svod.cz>.
- Leung WK, To KF, Man EP et al. Quantitative detection of promoter hypermethylation in multiple genes in the serum of patients with colorectal cancer. *Am J Gastroenterol* 2005; 100(10): 2274–2279.
- Wallner M, Herbst A, Behrens A et al. Methylation of serum DNA is an independent prognostic marker in colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2006; 12(24): 7347–7352.
- Lofton-Day C, Model F, Devos T et al. DNA methylation biomarkers for blood-based colorectal cancer screening. *Clin Chem* 2008; 54(2): 414–423.
- deVos T, Tetzner R, Model F et al. Circulating methylated SEPT9 DNA in plasma is a biomarker for colorectal cancer. *Clin Chem* 2009; 55(7): 1337–1346. doi: 10.1373/clinchem.2008.115808.
- Lefebvre B, Charbonnier F, Di Fiore F et al. Prognostic value of circulating mutant DNA in unresectable metastatic colorectal cancer. *Ann Surg* 2010; 251(2): 275–280. doi: 10.1097/SLA.0b013e3181c35c87.
- Kopreski MS, Benko FA, Kwee C et al. Detection of mutant K-ras DNA in plasma or serum of patients with colorectal cancer. *Br J Cancer* 1997; 76(10): 1293–1299.
- Bettegowda C, Sausen M, Leary RJ et al. Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Sci Transl Med* 2014; 6(224): 224ra24. doi: 10.1126/scitranslmed.3007094.
- Trevisiol C, Di Fabio F, Nascimben R et al. Prognostic value of circulating KRAS2 gene mutations in colorectal cancer with distant metastases. *Int J Biol Markers* 2006; 21(4): 223–228.
- Wong AL, Lim JS, Sinha A et al. Tumour pharmacodynamics and circulating cell free DNA in patients with refractory colorectal carcinoma treated with regorafenib. *J Transl Med* 2015; 13(1): 57. doi: 10.1186/s12967-015-0405-4.
- Diehl F, Li M, Dressman D et al. Detection and quantification of mutations in the plasma of patients with colorectal tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102(45): 16368–16373.
- Ito T, Kaneko K, Makino R et al. Clinical significance in molecular detection of p53 mutation in serum of patients with colorectal carcinoma. *Oncol Rep* 2003; 10(6): 1937–1942.
- Lindfors U, Zetterquist H, Papadogiannakis N et al. Persistence of K-ras mutations in plasma after colorectal tumor resection. *Anticancer Res* 2005; 25(1B): 657–661.
- Kuo YB, Chen JS, Fan CW et al. Comparison of KRAS mutation analysis of primary tumors and matched circulating cell-free DNA in plasmas of patients with colorectal cancer. *Clin Chim Acta* 2014; 433: 284–289.
- Morgan SR, Whiteley J, Donald E et al. Comparison of KRAS mutation assessment in tumor DNA and circulating free DNA in plasma and serum samples. *Clin Med Insights Pathol* 2012; 5: 15–22. doi: 10.4137/CPath.58798.
- Spindler KL, Pallisgaard N, Andersen RF et al. Circulating free DNA as biomarker and source for station detection in metastatic colorectal cancer. *PLoS One* 2015; 10(4): e0108247. doi: 10.1371/journal.pone.0108247.
- Diaz LA Jr, Williams RT, Wu J et al. The molecular evolution of acquired resistance to targeted EGFR blockade in colorectal cancers. *Nature* 2012; 486(7404): 537–540. doi: 10.1038/nature11219.
- Spindler KL, Pallisgaard N, Vogelius I et al. Quantitative cell-free DNA, KRAS, and BRAF mutations in plasma from patients with metastatic colorectal cancer during treatment with cetuximab and irinotecan. *Clin Cancer Res* 2012; 18(4): 1177–1185. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-11-0564.
- Mouliere F, El Messaoudi S, Gongora C et al. Circulating cell-free DNA from colorectal cancer patients may reveal high KRAS or BRAF mutation load. *Transl Oncol* 2013; 6(3): 319–328.
- Frattini M, Gallino G, Signoroni S. Quantitative analysis of plasma DNA in colorectal cancer patients: a novel prognostic tool. *Ann NY Acad Sci* 2006; 1075: 185–190.
- Schwarzenbach H, Stoehlmacher J, Pantel K et al. Detection and monitoring of cell-free DNA in blood of patients with colorectal cancer. *Ann NY Acad Sci* 2008; 1137: 190–196. doi: 10.1196/annals.1448.025.
- De Rook W, Biesmans B, De Schutter J et al. Clinical biomarkers in oncology: focus on colorectal cancer. *Mol Diagn Ther* 2009; 13(2): 103–114. doi: 10.2165/01250444-200913020-00004.
- Sozzi G, Conte D, Mariani L et al. Analysis of circulating tumor DNA in plasma at diagnosis and during follow-up of lung cancer patients. *Cancer Res* 2001; 61(12): 4675–4678.
- Gautschi O, Huegli B, Ziegler A et al. Origin and prognostic value of circulating KRAS mutations in lung cancer patients. *Cancer Lett* 2007; 254(2): 265–273.
- Govindan R, Page N, Morgensztern D et al. Changing epidemiology of small-cell lung cancer in the United States over the last 30 years: analysis of the surveillance, epidemiologic, and end results database. *J Clin Oncol* 2006; 24(28): 4539–4544.
- Gazdar AF. Activating and resistance mutations of EGFR in non-small-cell lung cancer: role in clinical response to EGFR tyrosine kinase inhibitors. *Oncogene* 2009; 28 (Suppl 1): S24–S31. doi: 10.1038/onc.2009.198.
- Bai H, Mao L, Wang HS et al. Epidermal growth factor receptor mutations in plasma DNA samples predict tumor response in Chinese patients with stages IIIB to IV non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2009; 27(16): 2653–2659. doi: 10.1200/JCO.2008.17.3930.
- Kuang Y, Rogers A, Yeap BY et al. Noninvasive detection of EGFR T790M in gefitinib or erlotinib resistant non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2009; 15(8): 2630–2636. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-08-2592.
- Mack PC, Holland WS, Burich RA et al. EGFR mutations detected in plasma are associated with patient outcomes in erlotinib plus docetaxel-treated non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 2009; 4(12): 1466–1472. doi: 10.1097/JTO.0b013e3181bbf239.
- Young TK, Chan KC, Mok TS et al. Single-molecule detection of epidermal growth factor receptor mutations in plasma by microfluidics digital PCR in non-small cell lung cancer patients. *Clin Cancer Res* 2009; 15(6): 2076–2084. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-08-2622.
- Camps C, Jantus-Lewintre E, Cabrera A et al. The identification of KRAS mutations at codon 12 in plasma DNA is not a prognostic factor in advanced non-small cell lung cancer patients. *Lung Cancer* 2011; 72(3): 365–369. doi: 10.1016/j.lungcan.2010.09.005.
- Nygaard AD, Garm Spindler KL, Pallisgaard N et al. The prognostic value of KRAS mutated plasma DNA in advanced non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2013; 79(3): 312–317. doi: 10.1016/j.lungcan.2012.11.016.
- Gonzalez R, Silva JM, Sanchez A et al. Microsatellite alterations and TP53 mutations in plasma DNA of small-cell lung cancer patients: follow-up study and prognostic significance. *Ann Oncol* 2000; 11(9): 1097–1104.
- Brevet M, Johnson ML, Azzoli CG et al. Detection of EGFR mutations in plasma DNA from lung cancer patients by mass spectrometry genotyping is predictive of tumor EGFR status and response to EGFR inhibitors. *Lung Cancer* 2011; 73(1): 96–102. doi: 10.1016/j.lungcan.2010.10.014.
- Pan SY, Xie EF, Shu YQ et al. Methylation quantification of adenomatous polyposis coli (APC) gene promoter in plasma of lung cancer patients. *Ai Zheng* 2009; 28(4): 384–389.
- Powrózek T, Krawczyk P, Kucharczyk T et al. Septin 9 promoter region methylation in free circulating

- DNA-potential role in noninvasive diagnosis of lung cancer: preliminary report. *Med Oncol* 2014; 31(4): 917. doi: 10.1007/s12032-014-0917-4.
56. Ponomaryova AA, Rykova EY, Cherdynseva NV et al. Potentialities of aberrantly methylated circulating DNA for diagnostics and post-treatment follow-up of lung cancer patients. *Lung Cancer* 2013; 81(3): 397–403. doi: 10.1016/j.lungcan.2013.05.016.
57. Hoffmann AC, Kaifi JT, Vallböhmer D et al. Lack of prognostic significance of serum DNA methylation of DAPK, MGMT, and GSTP1 in patients with non-small cell lung cancer. *J Surg Oncol* 2009; 100(5): 414–417. doi: 10.1002/jso.21348.
58. Esteller M, Sanchez-Cespedes M, Rosell R et al. Detection of aberrant promoter hypermethylation of tumor suppressor genes in serum DNA from non-small cell lung cancer patients. *Cancer Res* 1999; 59(1): 67–70.
59. Sozzi G, Conte D, Leon M et al. Quantification of free circulating DNA as a diagnostic marker in lung cancer. *J Clin Oncol* 2003; 21(21): 3902–3908.
60. Paci M, Maramotti S, Bellesia E et al. Circulating plasma DNA as diagnostic biomarker in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2009; 64(1): 92–97. doi: 10.1016/j.lungcan.2008.07.012.
61. Szpechcinski A, Dancewicz M, Kopinski P et al. Real-time PCR quantification of plasma DNA in non-small cell lung cancer patients and healthy controls. *Eur J Med Res* 2009; 14 (Suppl 4): 237–240.
62. Herrera LJ, Raja S, Gooding WE et al. Quantitative analysis of circulating plasma DNA as a tumor marker in thoracic malignancies. *Clin Chem* 2005; 51(1): 113–118.
63. Fackler MJ, Lopez Bujanda Z, Umbricht C et al. Novel methylated biomarkers and a robust assay to detect circulating tumor DNA in metastatic breast. *Cancer Res* 2014; 74(8): 2160–2170.
64. Fiegl H, Millinger S, Mueller-Holzner E et al. Circulating tumor-specific DNA: a marker for monitoring efficacy of adjuvant therapy in cancer patients. *Cancer Res* 2005; 65(4): 1141–1145.
65. Muller HM, Widschwendter A, Fiegl H et al. DNA methylation in serum of breast cancer patients: an independent prognostic marker. *Cancer Res* 2003; 63(22): 7641–7645.
66. Agostini M, Enzo MV, Bedin C et al. Circulating cell-free DNA: a promising marker of regional lymphonode metastasis in breast cancer patients. *Cancer Biomark* 2012; 11(2–3): 89–98.
67. Yazici H, Terry MB, Cho YH et al. Aberrant methylation of RASSF1A in plasma DNA before breast cancer diagnosis in the Breast Cancer Family Registry. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2009; 18(10): 2723–2725. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-08-1237.
68. Liggett TE, Melnikov AA, Marks JR et al. Methylation patterns in cell-free plasma DNA reflect removal of the primary tumor and drug treatment of breast cancer patients. *Int J Cancer* 2011; 128(2): 492–499. doi: 10.1002/ijc.25363.
69. Mirza S, Sharma G, Prasad CP et al. Promoter hypermethylation of TMS1, BRCA1, ERalpha and PRB in serum and tumor DNA of invasive ductal breast carcinoma patients. *Life Sci* 2007; 81(4): 280–287.
70. Mirza S, Sharma G, Parshad R et al. Clinical significance of promoter hypermethylation of ERβ and RARβ2 in tumor and serum DNA in Indian breast cancer patients. *Ann Surg Oncol* 2012; 19(9): 3107–3115. doi: 10.1245/s10434-012-2323-5.
71. Sharma G, Mirza S, Parshad R et al. DNA methylation of circulating DNA: a marker for monitoring efficacy of neoadjuvant chemotherapy in breast cancer patients. *Tumour Biol* 2012; 33(6): 1837–1843. doi: 10.1007/s13277-012-0443-y.
72. Hoque MO, Feng Q, Toure P et al. Detection of aberrant methylation of four genes in plasma DNA for the detection of breast cancer. *J Clin Oncol* 2006; 24(26): 4262–4269.
73. Board RE, Wardley AM, Dixon JM et al. Detection of PIK3CA mutations in circulating free DNA in patients with breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2010; 120(2): 461–467. doi: 10.1007/s10549-010-0747-9.
74. Higgins MJ, Jelovac D, Barnathan E et al. Detection of tumor PIK3CA status in metastatic breast cancer using peripheral blood. *Clin Cancer Res* 2012; 18(12): 3462–3469.
75. Shao ZM, Wu J, Shen ZZ et al. p53 mutation in plasma DNA and its prognostic value in breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 2001; 7(8): 2222–2227.
76. Page K, Hava N, Ward B et al. Detection of HER2 amplification in circulating free DNA in patients with breast cancer. *Br J Cancer* 2011; 104(8): 1342–1348. doi: 10.1038/bjc.2011.89.
77. Bechmann T, Andersen RF, Pallisgaard N et al. Plasma HER2 amplification in cell-free DNA during neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 2013; 139(6): 995–1003. doi: 10.1007/s00432-013-1413-5.
78. Shaw JA, Smith BM, Walsh T et al. Microsatellite alterations plasma DNA of primary breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 2000; 6(3): 1119–1124.
79. Schwarzenbach H, Eichelsler C, Kropidowski J et al. Loss of heterozygosity at tumor suppressor genes detectable on fractionated circulating cell-free tumor DNA as indicator of breast cancer progression. *Clin Cancer Res* 2012; 18(20): 5719–5730. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-0142.
80. Huang ZH, Li LH, Hua D. Quantitative analysis of plasma circulating DNA at diagnosis and during follow-up of breast cancer patients. *Cancer Lett* 2006; 243(1): 64–70.
81. Catarino R, Ferreira MM, Rodrigues H et al. Quantification of free circulating tumor DNA as a diagnostic marker for breast cancer. *DNA Cell Biol* 2008; 27(8): 415–421. doi: 10.1089/dna.2008.0744.
82. Kohler C, Radpour R, Barekati Z et al. Levels of plasma circulating cell free nuclear and mitochondrial DNA as potential biomarkers for breast tumors. *Mol Cancer* 2009; 8: 105. doi: 10.1186/1476-4598-8-105.
83. Nicolini C, Ens C, Cerutti T et al. Elevated level of cell free plasma DNA is associated with advanced stage breast cancer and metastasi. *Clin Chem Lab Med* 2013; 51(11): 277–278. doi: 10.1515/cclm-2013-0120.
84. Campbell IG, Russell SE, Choong DY et al. Mutation of the PIK3CA gene in ovarian and breast cancer. *Cancer Res* 2004; 64(21): 7678–7681.
85. Dehan P, Kustermans G, Guenin S et al. DNA methylation and cancer diagnosis: new methods and applications. *Expert Rev Mol Diagn* 2009; 9(7): 651–657. doi: 10.1586/erm.09.53.
86. Hohaus S, Giachelia M, Massini G et al. Cell-free circulating DNA in Hodgkin's and non-Hodgkin's lymphomas. *Ann Oncol* 2009; 20(8): 1408–1413. doi: 10.1093/annonc/mdp006.
87. Mussolin L, Burnelli R, Pillon M et al. Plasma cell-free DNA in paediatric lymphomas. *J Cancer* 2013; 4(4): 323–329. doi: 10.7150/jca.6226.
88. Frickhofen N, Müller E, Sandherr M et al. Rearranged Ig heavy chain DNA is detectable in cell-free blood samples of patients with B-cell neoplasia. *Blood* 1997; 90(12): 4953–4960.
89. Hosny G, Farahat N, Hainaut P. TP53 mutations in circulating free DNA from Egyptian patients with non-Hodgkin's lymphoma. *Cancer Lett* 2009; 275(2): 234–239. doi: 10.1016/j.canlet.2008.10.029.
90. Zhong L, Huang WF. Better detection of Ig heavy chain and TCRγ gene rearrangement in plasma cell-free DNA from patients with non-Hodgkin lymphoma. *Neoplasma* 2010; 57(6): 507–511.
91. Armand P, Oki Y, Neuberg DS et al. Detection of circulating tumour DNA in patients with aggressive B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Br J Haematol* 2013; 163(1): 123–126. doi: 10.1111/bjh.12439.
92. He J, Wu J, Jiao Y et al. IgH gene rearrangements as plasma biomarkers in non-Hodgkin's lymphoma patients. *Oncotarget* 2011; 2(3): 178–185.
93. Kurlander R, Li Y, Stetler-Stevenson M et al. Evaluation of circulating cell-free VDJ DNA as a marker for monitoring patients with multiple myeloma (MM) during treatment with carfilzomib, lenalidomide and dexamethasone. In: American Society of Hematology 2013 Annual Meeting. Abstr. 1868 (Poster Presentation).
94. Kubiczкова-Besse L, Drandi D, Sedlarikova L et al. Cell-free DNA for minimal residual disease monitoring in multiple myeloma. In: American Society of Hematology 2014 Annual Meeting. Abstract 3423 (Poster Presentation).
95. Schwarz AK, Stanulla M, Cario G et al. Quantification of free total plasma DNA and minimal residual disease detection in the plasma of children with acute lymphoblastic leukemia. *Ann Hematol* 2009; 88(9): 897–905. doi: 10.1007/s00277-009-0698-6.
96. Gao YJ, He YJ, Yang ZL et al. Increased integrity of circulating cell-free DNA in plasma of patients with acute leukemia. *Clin Chem Lab Med* 2010; 48(11): 1651–1656. doi: 10.1515/CCLM.2010.311.
97. Jiang Y, Pan SY, Xia WY et al. Dynamic monitoring of plasma circulating DNA in patients with acute myeloid leukemia and its clinical significance. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi* 2012; 20(1): 53–56.
98. Quan J, Gao YJ, Yang ZL et al. Quantitative detection of circulating nucleophosmin mutations DNA in the plasma of patients with acute myeloid leukemia. *Int J Med Sci* 2015; 12(1): 17–22. doi: 10.7150/ijms.10144.