



Kandidaatintutkielma

Kiertävien syöpäsolujen kiinniotto verinäytteestä
immunoaffiniteetin avulla ja tekniikan hyödyntäminen
syövän kliinisessä tutkimuksessa

Venla Karvonen

Sisällysluettelo

| | | |
|--------|---|----|
| 1. | Johdanto..... | 4 |
| 2. | Kiertävien syöpäsolujen hyödyntäminen syövän kliinisessä tutkimuksessa..... | 5 |
| 2.1. | Kiertävien syöpäsolujen kiinniotto..... | 7 |
| 2.2. | Syöpäsolujen enumeraatio..... | 8 |
| 2.3. | Molekylaarinen karakterisointi..... | 9 |
| 2.4. | Kliininen hyödyllisyys..... | 10 |
| 3. | Kiertävien syöpäsolujen immunoaffiniteetti-kiinnioton toimintaperiaate..... | 13 |
| 3.2. | Positiivisen rikastuttamisen tekniikat..... | 13 |
| 3.2.1. | Kiinniotettujen kiertävien syöpäsolujen irrottaminen alustasta..... | 14 |
| 3.2.2. | Immunomagnetismi..... | 15 |
| 3.2.3. | Mikrofluidistiikka..... | 16 |
| 3.2.4. | Hydrogeelit..... | 17 |
| 3.2.5. | Kaksoismodaaliset alustat..... | 18 |
| 3.3. | Negatiivinen rikastuttaminen..... | 18 |
| 4. | Immunoaffiniteetti-tekniikassa hyödynnetyt ligandit..... | 19 |
| 4.1. | Luonnolliset vasta-aineet..... | 19 |
| 4.2. | Aptameerit..... | 21 |
| 5. | Immunoaffiniteetti-tekniikan kohteena toimivat antigeenit..... | 22 |
| 5.1. | Negatiivisen rikastuttamisen antigeenit..... | 22 |
| 5.2. | Epiteeliset antigeenit..... | 23 |
| 5.3. | Mesenkymaaliset antigeenit..... | 24 |
| 5.4. | Kantasolu-spesifiset antigeenit..... | 25 |
| 5.5. | Syöpätyypille spesifiset antigeenit..... | 26 |
| 6. | Yhteenveto..... | 27 |
| 7. | Kirjallisuusviitteet..... | 28 |

Käytetyt lyhenteet

| | |
|---------|--|
| BRAF | B-raf proto-onkogeeni (Proto-oncogene B-raf) |
| CCND1/3 | Sykliini D1 tai D3 -koodaava geeni (Cyclin D1/3 gene) |
| CD45 | Erilaistumisluokaltaan 45-antigeeni (Cluster of differentiation) |
| CTC | Kiertävä syöpäsolu (Circulating tumour cell) |
| DAPI | 4', 6-diamidino-2-fenyyli-indoli (4', 6-diamidino-2-phenylindole) |
| EGFR | Epidermaalisen kasvutekijän reseptori (Epidermal growth factor receptor) |
| EMT | Epiteeli-mesenkyymi-muutos (Epithelial-mesenchymal transition) |
| EpCAM | Epiteelisolun adheesiomolekyylä (Epithelial cellular adhesion molecule) |
| FDA | Yhdysvaltain elintarvike- ja lääkevirasto (U.S. Food and Drug Administration) |
| FISH | Fluoresenssi <i>in situ</i> hybridisaatio (Fluorescence <i>in situ</i> hybridization) |
| HER-2 | Ihmisen epidermaalisen kasvutekijän reseptori 2 (Human epidermal growth factor receptor 2) |
| MMP1/12 | Matriksimetalloproteaasi 1 tai 12 (Matrix metalloproteinase 1/12) |
| MUC-1 | Musiini 1 (Mucin 1) |
| PCA | Pääkomponenttianalyysi (Principal component analysis) |
| qRT-PCR | Kvantitatiivinen käänteiskopioijapolymeraasiketjureaktio (Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction) |
| RNA-ISH | Ribonukleiinihappo <i>in situ</i> hybridisaatio (RNA <i>in situ</i> hybridization) |
| RNA-seq | Ribonukleiinihapposekvensointi (RNA sequencing) |
| SELEX | Ligandien systemaattinen evoluutio eksponentiaalisella rikastuksella (Systematic evolution of ligands by exponential enrichment) |

1. Johdanto

Syöpä-nimikkeellä voidaan kuvata joukkoa tauteja, joiden tyypillisiä piirteitä ovat solujen hallitsemattoman jakautuminen ja metastaattisten ominaisuuksien saaminen. Taudin puhkeamiseen on monia vaikuttavia tekijöitä, mutta useimmiten voidaan sanoa taudin johtuvan onkogeneenien aktivaatiosta tai kasvun rajoitegeenien deaktivoinnista (Sarkar *et al.*, 2013). Syöpäsolujen hallitsemattomasti jakautuessa syntyy kasvaimia, jotka voivat erilaisten tekijöiden seurauksena saada metastaattisia ominaisuuksia. Metastaasin aikana kasvaimen syöpäsoluja irtoaa kasvaimesta ja intravasoituu verenkiertoon tai imunestekiertoon, jossa niiden täytyy selviytyä, kunnes ne ekstravasoituvat kierrosta uuteen kudokseen ja muodostavat siellä sekundäärisen kasvaimen (Hapach *et al.*, 2019).

Vuonna 2019 Suomessa todettiin 35 327 uutta syöpää, mikä jatkaa trendiä kasvavista diagnoosimääristä. 2017–2019 aikavälillä seurattujen syöpäpotilaiden suhteellinen elossaololuku viiden vuoden ajalla oli kuitenkin noussut huomattavasti jo 70 prosenttiin, mikä kertoo syöpätutkimuksen kehityksestä (Pitkäniemi *et al.*, 2021). Syöpätutkimus on huomattavasti edistynyt maailmanlaajuisesti viimeisten vuosikymmenten aikana, mikä on johtanut Suomessa syöpäkuolemissa määrän vähenemiseen, uusien syöpädiagnoosien määrän selvästä kasvusta huolimatta. Syöpä on kuitenkin edelleen toiseksi yleisin kuolinsyy Suomessa (THL 2021). Uusia tutkimusmenetelmiä kehitellään jatkuvasti, jotta tämä kehitys pääsisi jatkumaan ja syöpäepidemiaan saataisiin viimein helpotusta.

Yksi mahdollisista, suhteellisen uusista, tekniikoista syöpätutkimuksen tehostamisessa on veressä kiertävien syöpäsolujen kiinniotto ja näiden solujen hyödyntäminen syöpädiagnostiikassa ja -proгноosisissa. Tätä ideaa on tutkittu paljon ja useita erilaisia tekniikoita on kehitetty syöpäsolujen kiinniottoa varten (Ferreira *et al.*, 2016). Tämä tutkielma perehtyy erityisesti immunoaffiniteetin hyödyntämisen eri menetelmiin kiertävien syöpäsolujen kiinniotossa ja pohtii tekniikan mahdollisia hyötyjä syövän kliinisessä tutkimuksessa.

2. Kiertävien syöpäsolujen hyödyntäminen syövän kliinisessä tutkimuksessa

Syöpäkasvaimen solujen irtoaminen ja pääsy verenkiertoon vaatii osittaisen tai kokonaan läpikäydyn EMT:n, jossa epitaaliset solut muuttuvat fenotyypiltään mesenkymaaliksi. Epitaalisilla soluilla on vahvat vuorovaikutukset viereisten solujen kanssa, eivätkä ne pääse irtoamaan toisistaan luonnostaan, kun taas mesenkymaalilla soluilla solujenväliset kiinnityskompleksit ovat polaarittomia ja liitokset sallivat solujen liikkuvuuden. EMT tapahtuu, kun E-cadherinin ja cytotektiin ekspressiota rajoitetaan ja puolestaan vimentinin ja N-cadherinin ekspressiota kasvatetaan (Acloque *et al.*, 2009; Weis & Cheresch, 2011). Usein verenkierrossa olevat CTC:t eivät ole fenotyypiltään täysin mesenkymaalisia, vaan niissä ilmenee myös epiteelisiä piirteitä (Tiffon, 2018). Tämä ilmenee muun muassa EpCAM-antigeenin ekspressiona useimmissa kiinniotetuissa CTC:issä.

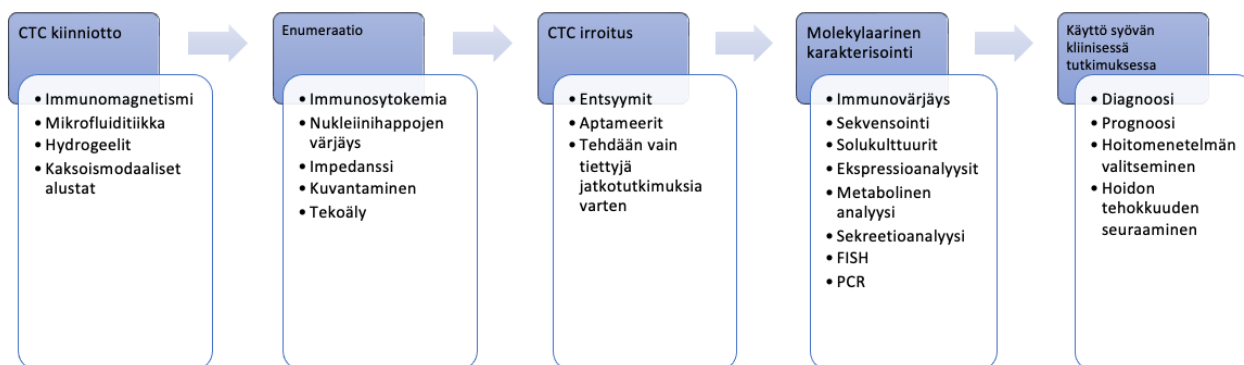
Solut voivat irrota yksittäisinä kappaleina tai klustereina. CTC-klustereilla on todettu olevan luonteeltaan jopa sata kertaa suurempi metastoiva potentiaali verrattuna yksittäisiin CTC:hin, mikä tekee niistä tärkeän kohteen jatkotutkimuksia varten. Niiden määrä kiertossa on kuitenkin huomattavasti pienempi kuin yksittäisten CTC:en (Cheung *et al.*, 2016; X. Liu *et al.*, 2019).

On arvioitu, että syöpäkasvaimesta irtoaa noin 3,2 miljoonaa CTC:a grammaa kasvainta kohden päivässä (Bultler & Gullino 1975). Niistä suurin osa ei kuitenkaan selviä elossa verenkierrossa, vaan kuolevat joko solun ja matriksin välisen vuorovaikutuksen vähäisyyden aiheuttamasta apoptoosista, immuunijärjestelmän solujen tai verenkierron voimien vaikutuksesta. Yksi suurimmista haasteista CTC:en tutkimisessa onkin niiden harvinaisuus verinäytteissä. Tyypillisesti löytyy vain muutama CTC jokaisesta millilitrasta verinäytettä, kun taas normaaleja verisoluja näytteestä löytyy miljardeja. Tämä pieni osa CTC:ista selviää näiltä puolustusmekanismeilta ja käy läpi transition takaisin fenotyypiltään epitaaliseksi ja muodostaa sekundäärisiä kasvainpesäkkeitä (Cristofanilli *et al.*, 2009; Douma *et al.*, 2004).

Metastaasien on yleisesti kerrottu olevan vastuussa 90 % syöpäkuolemista. Tämä väite vaikuttaisi nykytutkimusten perusteella olevan hieman liioiteltu, sillä 2005–2015 väliseltä ajalta tehdystä tilastollisesta tutkimuksesta selvisi, että vain 66,7 % syöpäkuolemista metastaasi oli vaikuttavana tekijänä. Tutkimuksen perusteella metastaasit ovat kuitenkin syynä suurimpaan osaan kiinteisiin syöpäkasvaimiin liittyvistä kuolemista (Dillekås *et al.*, 2019). Tämän perusteella syövän kliinisessä tutkimuksessa siis kannattaa keskittyä erityisesti metastaasien tutkimiseen.

Perinteisten kasvainbiopsioiden rinnalle syövän kliinisessä tutkimuksessa on teorioitu nestemäisten biopsioiden tekeminen vähemmän invasiivisena vaihtoehtona. Primäärisen kasvaimen biopsioissa on ollut ongelmana syöpäsolujen nopea geneettinen mutaatio, mikä johtaa siihen, että biopsiasta saadut tiedot syövästä eivät todellisuudessa kerro metastaattisten kasvainten käyttäytymisestä juurikaan. Kiinteät kasvaimet ovatkin luonteeltaan erittäin heterogeenisiä, joten yksittäisten syöpäsolujen geeniekspressio, metabolia ja metastaattinen potentiaali vaihtelee huomattavasti. Tämän vuoksi verenkierrosta otetut näytteet voivat kertoa tarkempaa tietoa kasvaimesta CTC:en kiinniuton ja tutkimisen kautta, niiden ollessa mahdollisia metastaasien esiasteita (Haber & Velculescu, 2014; Kavan *et al.*, 2022; J. Liu *et al.*, 2021).

On pitkään ollut tiedossa, että CTC:en kiinniotolla, enumeraatiolla ja tunnistamisella voi tulevaisuudessa olla tärkeä rooli syöpien aikaisessa löytämisessä, diagnosoinnissa ja prognoosissa (Habli *et al.*, 2020; Woo & Yu, 2018). Immunoaffiniteettiin pohjautuvan CTC-kiinniuton ja eristettyjen CTC:jen hyödyntämisen eri menetelmät on esitelty työvaihekaaviossa (Kuva 1)..



Kuva 1: Kuvantaminen immunoaffiniteetti-tekniikalla kiinniotettujen CTC:jen käytön mahdollisista käyttömenetelmistä nestemäisenä biopsiana syövän kliinisessä tutkimuksessa (Venla Karvonen, 2022)

2.1. Kiertävien syöpäsolujen kiinniotto

CTC:n kiinniotto potilaan verinäytteestä voidaan tehdä monella eri tavalla. Kiinniotossa on ideana saada erotettua CTC:t veren normaaleista soluista. Tämä voi tapahtua esimerkiksi geeni- ja proteiiniekspression eroavaisuuksien, kokoeron tai muiden biofysikaalisten eroavaisuuksien kautta. Pääosin nämä kiinniotonmenetelmät voidaan jakaa tekniikoihin, jotka laajasti perustuvat affiniteettiin ja muihin biologisiin ominaisuuksiin ja niihin, jotka perustuvat pääosin fysikaalisiin ominaisuuksiin. Nämä pääkategoriat voidaan edelleen jakaa tarkempiin ryhmiin tekniikan toimintaperiaatteiden perusteella.

Eri solutyypin kokojen samankaltaisuuksien vuoksi erottelu koon perusteella on haastavaa. CTC:jen ominaisuudet vaihtelevat erittäin paljon eri syöpäsolutyypin välillä ja jopa niiden sisäinen vaihtelu on huomattavaa. Kooltaan niiden on todettu vaihtelevan halkaisijaltaan 4–30 µm välillä jopa samasta potilaasta otettujen näytteiden perusteella (Allard *et al.*, 2004). Leukosyytit ovat puolestaan tyypillisesti halkaisijaltaan 7–20 µm (Sun, 2009, s. 3–31), joten näiden ryhmien välillä on syöpätyypistä riippuen huomattava päällekkäisyys. Erytrosyytit ja veren muut solut ovat useimmiten kooltaan pienempiä, trombosyyttien ollessa vain 2–3 µm (Paulus, 1975) ja erytrosyyttien 7,5–8,7 µm halkaisijaltaan (Diez-Silva *et al.*, 2010). Erytrosyyttien suuren muodonmuutoskyvyn ansiosta ne voivat kuitenkin kulkea pienimpienkin, jopa halkaisijaltaan 2–3 µm olevien hiussuonien läpi verenkierrossa (J. Li *et al.*, 2007). Tämän vuoksi filtraatio toimii kooltaan keskiarvoisille soluille hyvin, mutta se ei aina pysty ottamaan huomioon kooltaan keskiarvosta poikkeavia soluja.

Verinäytteestä CTC:ja eristettäessä näiden kaupallisten laitteiden avulla usein on tarkoituksena erotella CTC juurikin veren leukosyyteistä. Tavallisin käytössä oleva tekniikka CTC:jen eristykseen on edelleen immunoaffiniteettiin pohjautuva kiinniotto, jossa leukosyyttien ja syöpäsolujen erilainen proteiiniekspressio on erottavana tekijänä. Erytrosyyttien ja trombosyyttien erottaminen näytteestä usein tehdään erikseen solujen tiheyksien eroavaisuuksien perusteella sentrifugoimalla näyte tai tekemällä erytrosyyteille lyysi ennen itse kiinniottoprosessin tekemistä. Tämän kuitenkin on todettu aiheuttavan CTC kiinnioton tehokkuuden heikkenemistä ja CTC:jen menetyksiä (Ferreira *et al.*, 2016). Tämä ongelma onkin johtanut tarpeeseen kehittää menetelmiä, jotka mahdollistavat erytrosyyttien eristämisen näytteestä samanaikaisesti CTC:jen kiinnioton kanssa.

Kiinnioton tekniikat on tyypillisesti suunniteltu yksittäisten CTC:jen kiinniottoon tai eristämiseen. Suurien fysikaalisten eroavaisuuksien vuoksi on vaikea kehittää laite, jolla sekä yksittäisten CTC:jen

ja CTC-klustereiden kiinniotto onnistuu samanaikaisesti. Tämän vuoksi tällä hetkellä onkin luotettavampaa tulosten kannalta käyttää erillisiä eristysalustoja klustereille, jos niitä erityisesti halutaan tutkia. Kehitteillä on kuitenkin monenlaisia tekniikoita, joiden avulla molempien kiinniotto onnistuisi samalla laitteella (Schuster *et al.*, 2021).

2.2. Syöpäsolujen enumeraatio

Tyypillisesti CTC-kiinnioton jälkeen tuloksena on liuos, jossa on jäljellä veren muitakin soluja niiden samanlaisten piirteiden vuoksi. Tämän vuoksi tarvitaan usein muita menetelmiä CTC:ien määrän selvittämiseen rikastetusta seerumista. Pääasiallisesti tällaisia ovat nukleiinihappoihin, impedanssiin ja sytometriaan perustuvat tekniikat, joiden tuloksia tyypillisesti kuvantamisen ja tekoälyn avulla analysoidaan.

Kaikista yleisin tutkimusmenetelmä CTC:ien enumeraatiossa on perinteinen immunosytokemia. Siinä rikastettuun näytteeseen lisätään syöpäsoluille spesifisiä primaarisia antigeenejä ja niille spesifisiä sekundaarisia, tietyillä aallonpituuksilla fluoresoivia, antigeenejä. Erottelu verisoluista siis pohjautuu niiden pintaproteiinien eroavaisuuksiin. Tyypillisesti primaarisina antigeeneinä käytetään CD45 ja muutamia epiteelisten solujen markkereita, kuten sytokreatiinit ja EpCAM. Kun halutaan ottaa huomioon CTC:en plastinen EMT-luonne, usein käytetään myös mesenkymaalisten solujen markkereita, kuten N-cadherin ja vimentin. Näytteet värjätään myös DAPI:lla, joka sitoutuu DNA:han ja siten värjää solujen tumat (Drucker *et al.*, 2020; Jie *et al.*, 2017). Näytteet kuvataan värjäysten jälkeen fluoresenssimikroskoopin ja siihen liitetyn sopivan kameran avulla. Perinteisesti tutkimuksissa CTC on määritelty olevan tumallinen solu, joka ekspressoii EpCAM-molekyyliä ja sytokeraatiineja 8, 18 tai 19, mutta ei ekspressoii CD45-molekyyliä. Tyypillisesti sen täytyy olla myös kooltaan ainakin $4 \times 4 \mu\text{m}^2$, ja omaksua muita tiettyjä morfologisia ja immunologisia piirteitä, joita operaattorit tunnistavat (Allard *et al.*, 2004; Kagan *et al.*, 2002). On kuitenkin todettu, että CTC:den heterogeeninen luonne veressä voi johtaa interoperatiivisiin virheisiin CTC:den määrää selvittäessä tätä CTC:n määritelmää hyödyntämällä (Allard *et al.*, 2004). Eri menetelmät, jotka hyödyntävät vähemmän tarkkoja rajoja CTC:n luonteelle saavat eristettyä huomattavasti suuremman määrän CTC:tä näytteestä (Coumans *et al.*, 2010; Pachmann *et al.*, 2008). Tämän vuoksi on tulevaisuudessa erityisen tärkeää määrittää kliinisesti relevantit rajat CTC:n luonteelle.

Tällä hetkellä aktiivisesti syövän etenemisen prognoosissa käytössä olevien CTC-kiinniottolaitteiden pääasiallinen tarkoitus on ollut verenkierrossa olevien syöpäsolujen määrän selvittäminen.

2.3. Molekylaarinen karakterisointi

Eristettyjen CTC:en karakterisointi on tärkeää syövän prognoosin kannalta. Niiden tutkimisen kautta saadaan muodostettua kuva tietyllä hetkellä kasvaimesta. Tämä antaa myös tietoa mahdollisista metastaattisista kasvaimista. Kiinteiden kasvainten heterogeeninen luonne vaikeuttaa mahdollisten etäpesäkkeiden geeniekspressioiden ja prognoosien arviointia (Kavan *et al.*, 2022; Tirosh *et al.*, 2016). Nestemäinen biopsia on tässä hyödyksi, sillä sen avulla saadaan yksittäisten verenkierrossa olevien syöpäsolujen genomia tutkittua tarkemmin (Lohr *et al.*, 2016; Miyamoto *et al.*, 2015).

Kiinniottotekniikasta riippuu myös se, kuinka näiden CTC:en jatkotutkimus onnistuu. Usein vanhemmat menetelmät, jotka perustuvat CTC:n kiinnittymiseen toiseen molekyyliin vaativat solujen fiksaation niiden stabilisoinniksi, mikä estää solujen hyödyntämisen jatkotutkimuksissa. Tätä ongelmaa on kuitenkin pyritty ratkaisemaan ja nykyisin on saatavilla useita kaupallisia malleja myös affiniteettiin perustuvista menetelmistä, jotka mahdollistavat solujen hyödyntämisen (Habli *et al.*, 2020).

Erilaisia tekniikoita, joita hyödynnetään CTC:jen molekylaarisessa karakterisoinnissa on muun muassa immunovärjäys, sekvensointi, solukulttuurit, ekspressioanalyysi, FISH ja PCR (Habli *et al.*, 2020). Immunovärjäysten avulla saadaan vähällä työllä selvitettyä mitä pintaproteiineja syöpäsolulla on, jolloin sen laatua saadaan selvitettyä. Tätä tekniikkaa hyödynnetään usein myös CTC:n eri reseptorimutaatioiden tunnistamiseen (Ferreira *et al.*, 2016). Solujen genomien ja sen spesifisten osien sekvensointia käytetään syövän tarkemmassa karakterisoinnissa. Verinäytteiden sekvensointiin on olemassa myös useita eri kaupallisia alustoja, jotka tyypillisesti hyödyntävät erilaisia PCR-tekniikoita (Hench *et al.*, 2018). Usein tarkkailun kohteena koko solun genomien sijasta on vain tietyt osat genomia, esimerkiksi mRNA:n transkriptioanalyysin ja kohdennetun geeniekspression profiloinnin kautta voidaan potilaan syöpä luokitella (Lim, Yeo, *et al.*, 2019; Ramalingam *et al.*, 2017). Erityisesti yksittäisten CTC:n mRNA:n sekvensointi on tutkimusten perusteella todettu antavan hyödyllisiä tietoja kasvaimen heterogeenisyyden ja metastaattisten prosessien karakterisoinnissa (Ramalingam *et al.*, 2017). FISH ja muita vastaavanlaisia prosesseja käytetään myöskin solujen geeniekspression selvittämisessä, esimerkiksi RNA-ISH tekniikkaa on käytetty CTC:n fenotyyppien tutkimiseen eri syöpätyypeissä, erityisesti syöpäsolujen EMT:n plastisuuden tutkimiseen verinäytteissä (Cheng *et al.*, 2019). Niissä tekniikoissa hyödynnetään erilaisia fluoresoivilla markkereilla merkattuja ligandeja, tyypillisesti leukosyyttisiä, mesenkymaalaisia ja epiteelisiä biomarkkereita vastaan (Wu *et al.*, 2015). Muita tyypillisiä menetelmiä, joita hyödynnetään CTC:n karakterisoinnissa ovat esimerkiksi solun

metabolinen analyysi PCA:lla, ja solun sekreetti- ja proteiiniekspressioanalyysit (Lim, di Lee, *et al.*, 2019).

Kiinteiden kasvainten ja myös CTC:jen suuren heterogeenisyyden vuoksi on tärkeä tietää, mitä variantteja CTC:t kantavat ja ekspressoivat, sillä se voi jopa vaikuttaa lääkkeen valintaan. Kuitenkin, jotta karakterisoinnin tekniikoita voidaan hyödyntää käytännössä, täytyy olla tiedossa spesifit geenit, joiden ekspressiota tutkitaan (Lim, di Lee, *et al.*, 2019). Tämä ei ole vielä kaikissa syöpätyypeissä selvillä ja eri varianttien signalointikaskadit ovatkin edelleen tutkimuksen alla. Useille syöville on kuitenkin tiedossa spesifiset tunnistetut markkerit, joiden ekspression perusteella saadaan solut jaoteltua alapopulaatioihin (Lohr *et al.*, 2016).

2.4. Kliininen hyödyllisyys

Nestemäisen biopsian on todettu tuottavan kliinistä hyötyä verrattuna perinteistä kasvainbiopsiaan, sillä verenkierrosta eristettyjen yksittäisten solujen ekspressioprofiilien on todettu tuottavan paremman diagnostisen tarkkuuden. Tämä ilmenee tarkempien syntyperien identiteettien määrittelyn ja kliinisesti eri pesäkkeiden määrittämisessä useissa syöpämuodoissa (Lohr *et al.*, 2016; Miyamoto *et al.*, 2015).

Tällä hetkellä CTC:jen hyödyntäminen syöpädiagnostiikassa on keskittynyt pääosin syövän etenemisen seurantaan CTC enumeraation kautta. Sitä on jo pitkään tutkittu yhteydessä potilaan selviytymistodennäköisyyteen. Useimmissa tutkimuksissa on todettu, CTC:n määrä verenkierrossa on vahvin prognostinen biomarkkeri potilaan selviytymiselle. Tämä trendi on nähtävissä jopa, kun otetaan multivariantti analyysi käyttöön (Bork *et al.*, 2015; Chou *et al.*, 2018; Khan *et al.*, 2016; Reeh *et al.*, 2015).

Hoitoa edeltävän syövän tilanteen selvittäminen on tärkeää monilla tavoin, jotta hoito olisi mahdollisimman tehokasta ja spesifiä pelkkiä syöpäsoluja vastaan. Tutkimusten perusteella on todettu, että CTC:jen tunnistaminen ja enumeraatio voi parantaa syövän tilan arvioinnin tarkkuutta tässä preoperatiivisessa vaiheessa (Judson *et al.*, 2003). CTC:jen määrä veressä ei pelkästään kerro mahdollisista metastaattisista pesäkkeistä, vaan niiden ilmeneminen myös ei-metastaattisissa syövässä on vahva merkki huonolle prognoosille. Tietystä tutkimuksessa eri vaiheissa olevien ei-metastaattisten suolistosyöpäpotilaiden verinäytteitä tutkittiin CTC:jen varalta. Kun ei-metastaattisessa syövässä oli veressä todettu vähintään yksi CTC per 7,5 ml verta, heidän odotettu

kokonaiselossaolonsa oli vain 38,4 kuukautta, kun taas CTC-negatiivisilla potilailla tämä oli 49,8 kuukautta. Tässä tutkimuksessa todettiin, että CTC:jen löytäminen verinäytteestä oli vahvin prognostinen biomarkkeri kokonaiselossaololle muista kliinispatologisista parametreista riippumatta (Bork *et al.*, 2015). Vastaavanlaisia tuloksia nähdään myös muissa tutkimuksissa. Esimerkiksi tyypillisen huonon prognoosin markkerina käytetyn syövän histopatologisen vaiheen potilaisiin verrattuna CTC-positiivisille potilaille todettiin sekä huonompi kokonaiselosaolo että pienempi elossaoloaika ennen taudin uusiutumista ruokatorvensyöpäpotilaissa (Reeh *et al.*, 2015). Tämän perusteella CTC-tunnistamisella voisi olla kliinistä hyödyllisyyttä syövän preoperatiivisessa prognoosissa verrattuna tähänhetkisiin menetelmiin. On kuitenkin tärkeää huomioida, että molemmat tutkimukset hyödyntävät CTC kiinniotossa samaa CellSearch®-systeemiä, joka perustuu epiteelisiin markkereihin ja siten ottaa kiinni vain tietyn CTC-osapopulaation.

Toinen mahdollinen kliininen hyöty CTC-kiinniotolle prognoosissa on hoidon vaikutuksen seuranta. Neuroendokriinisten kasvainten omaaviin potilaisiin kohdistuneessa tutkimuksessa CTC:n määrien muutokset hoidon aikana korreloituivat huomattavasti hoidon vasteeseen ja kokonaiselosaoloon. Tutkimuksen mukaan paras prognoosi oli potilailla, joilla ei löydetty missään vaiheessa CTC:itä. Sen jälkeen paras prognoosi oli potilailla, joiden CTC:jen määrä laski yli 50 % ja selvästi huonoin prognoosi oli potilailla, joiden CTC:jen määrä väheni vain alle 50 %. Todettiin myös, että niissä tapauksissa joissa CTC:itä ei todettu lainkaan ja tapauksissa, joissa niiden määrä laski yli 50 %, syövän etenemisen riski oli vain 8 %. Tähän verrattuna tapauksissa, joissa CTC:jen määrä laski tätä heikommin, oli syövän etenemisen riski jo 60 %. Yleisin tämän syövän yhteydessä mitattava kiertävä biomarkkeri on kromograniniini A. Sen määrän muutokset verenkierrossa eivät kuitenkaan tutkimuksen perusteella korreloidu selviytymisen kanssa (Khan *et al.*, 2016). Tämän perusteella CTC-enumeratio voisi toimia sopivana biomarkkerina hoidon prognoosille. Muissa tutkimuksissa samoin on todettu, että CTC:n korkea määrä on kliinisesti merkittävä markkeri, joka osoittaa huonoa vastetta kasvaimen hoidolle (Bork *et al.*, 2015; Chou *et al.*, 2018; Khan *et al.*, 2016; Reeh *et al.*, 2015). Metastaattisilla rintasyöpäpotilailla on kuitenkin todettu, että CTC-määrän perusteella vasteeltaan huonon ensimmäisen linjan kemoterapian vaihtaminen toisen linjan kemoterapiaan ei vaikuta CTC-määrään, eikä kokonaiselosaoloon (Smerage *et al.*, 2014). Tämän vuoksi on edelleen kyseenalaista, onko CTC-enumeration perusteella kannattavaa vaihtaa hoitomenetelmää, vai toimiiko menetelmä pelkästään syövän prognoosissa.

Enumeraation lisäksi CTC:n molekylaarisella karakterisoinnilla voisi tulevaisuudessa olla suuri rooli syövän hoidossa. On nimittäin ollut tapauksia, joissa CTC:n molekylaarinen karakterisointi on vaikuttanut hoidon valintaan. Kun CTC:n sisäisiä signaalintiketjuja saadaan selvitettyä, on mahdollista kohdentaa syöpähoito spesifisten signaalintiketjujen inhibointiin, jotka löytyvät vain näiltä syöpäsoluilta. Yksittäisten CTC:jen RNA-seq on tässä hyödyllistä, sillä sen perusteella saadaan luokiteltua CTC:ille kliinisesti eroteltavat osapopulaatiot niiden geeniekspression avulla, mikä ei tavallisen diagnostiikan avulla selviä. Esimerkiksi multipppelin myelooman potilaiden verinäytteistä eristettyjen CTC:jen transkriptio vaihteli merkittävästi potilaasta toiseen. Kromosomitranslokaatiot toimivat usein kliinisen riskin markkereina. Tätä tutkittiin RNA-seq menetelmällä, jonka perusteella todettiin CCND1 ja CCND3 yliekspressoituvan, jotka toimivat merkinä tiettyjen kromosomitranslokaatioiden tapahtumisille (Lohr *et al.*, 2016). CCND1:n yliekspression on todettu olevan yhteyksissä useisiin tyypillisiin terapian kohteisiin, kuten BRAF ja EGFR, perustuvien lääkkeiden resistenssiin (Musgrove *et al.*, 2011). Vastaavanlaisia tapauksia, joissa tietyn geenin yliekspressio vaikuttaa syövän prognoosiin ja sen metastaattiseen kykyyn on todettu useita, kuten tietty kokoelma genejä, joihin kuuluu MMP1 ja MMP12. Niiden yliekspressio toimi merkinä metastaattisesta levittymisestä ja aikaisesta ei-pienisoluisen keuhkosyövän uusiutumisesta (Yeo *et al.*, 2016). Nämä CTC:jen sekvensointiin perustuvat tutkimukset tukevat siis mahdollisuutta sille, että kiinteän kasvaimen käyttäytymistä voitaisi seurata nestemäisen biopsian avulla, eristettyjä CTC:itä tutkimalla.

On kuitenkin huomattava, että CTC:jen tutkimisen kliininen hyödyllisyys on edelleen kyseenalaista, minkä vuoksi tämänhetkinen käyttö syöpädiagnostiikassa on vähäistä. Tutkimusten tuloksia ei ole vielä testattu satunnaistetuissa kliinisissä tutkimuksissa, joissa päätökset hoitomenetelmistä tehtäisiin CTC-analyysin perusteella ja joiden perusteella saataisiin selkeitä tuloksia. Eri kliinisten tutkimusten keskinäinen vertailu on myös tässä haastavaa, sillä niissä käytetään eri potilaspopulaatioita, eri CTC-kiinniottotekniikoita, eri määritelmiä CTC-positiivisuudelle, eri statistisia menetelmiä tiedon analysoinnille ja tutkimusten lopputilat ja tarkoitukset ovat usein myös poikkeavia. Jotta saataisiin tarkempaa analyysiä kliiniselle hyödyllisyydelle, täytyy ensin saada nämä tekijät standardisoitua. Tämä ei kuitenkaan ole mahdollista lähitulevaisuudessa, sillä CTC-kiinniottoon ja eristämiseen ei ole löytynyt universaalista toimivaa tapaa, vaan eri tekniikat toimivat vain tiettyjen CTC-osapopulaatioiden piirteiden kanssa.

3. Kiertävien syöpäsolujen immunoaffiniteetti-kiinnioton toimintaperiaate

Erilaisia ei-merkkiaineisiin perustuvia tekniikoita on viime vuosien aikoina kehitetty helpomman jatkotutkimusten varalta, mutta edelleen kaikista käytetyin CTC:jen eristämisen tekniikka on immunoaffiniteetin perustuva kiinniotto (Gorges *et al.*, 2012; Sharma *et al.*, 2018). Immunoaffiniteetilla tarkoitetaan spesifistä kemikaalista affiniteettia, vasta-aineen tai vasta-aine domeenin ja antigeenin välillä (Wiktionary, 2019).

Immunoaffiniteetti kiinnioton menetelmänä perustuu solujen pintakalvon antigeenien affiniteettiin niille sopivien vasta-aineiden kanssa (Gorges *et al.*, 2012). Kuten aiemmin mainittiin, erottelu veren muista soluista, pääasiassa leukosyyteistä, perustuu solutyypin pintaproteiinien eroavaisuuksiin. Menetelmä on ollut käytössä lähes muuttumattomana jo vuodesta 1998 lähtien, kun Racila *et al.* raportoi CTC:n rikastuttamisesta verinäytteestä EpCAM ja CD45 vasta-ainemolekyyleihin perustuvalla tekniikalla. Siinä positiivisesti rikastutetaan verinäyte EpCAM:n suhteen ja sen jälkeen tehdään negatiivinen rikastuttaminen CD45:n suhteen (Racila *et al.*, 1998). Tekniikkaa on kuitenkin pyritty kehittämään siten, että eri vasta-ainemolekyylejä hyödynnetään näiden perinteisten molekyylin lisäksi, sillä tekniikka ottaa huomioon vain tietyt CTC-osapopulaatioita. Vasta-ainemolekyylit tyypillisesti kiinnitetään stationäärisiksi eri rakenteisiin, kuten laitteen pinnalle tai magneettisiin aineisiin. Tällä hetkellä käytössä ja kehitteillä olevia tekniikoita ovat immunomagnetismi, mikrofluidistiikka, hydrogeelit ja erilaiset kaksoismodaaliset alustat (Bankó *et al.*, 2019; Habli *et al.*, 2020).

3.1. Positiivisen rikastuttamisen tekniikat

Positiivisella rikastuttamisella tarkoitetaan kohdesolupopulaation tunnistamista ja eristämistä alkuperäisestä sekanäytteestä siten, että immunoaffiniteetin kohteena on eristettävän solun pintamembraanin spesifit antigeenit. Positiivinen rikastuttaminen mahdollistaa eri syöpäsolupopulaatioiden tutkimisen verinäytteestä hyödyntämällä eri vasta-aineita CTC-kiinniotossa (Yeo *et al.*, 2016). Tyypillisesti antigeeninä toimivat solukalvon proteiinit ja niiden luonnollinen vasta-aine toimii kiinniotossa solua puoleensa vetävänä tekijänä. Immunoaffiniteettitekniikassa voidaan myös vastaavanlaisena ligandina käyttää vasta-aineiden sijasta keinotekoisia peptidejä ja aptameerejä (Y. Liu *et al.*, 2022).

3.1.1. Kiinniotettujen kiertävien syöpäsolujen irrottaminen alustasta

Koska CTC:t ovat tässä tekniikassa sitoutuneet vasta-aineisiin kiinnioton jälkeen, on usein tarpeen jatkotutkimuksia varten saada CTC:t vapautettua, mikä voi osoittautua usein haastavaksi. Tähän on myös olemassa useita eri menetelmiä, riippuen kiinniottotekniikasta ja kyseisestä vasta-aineesta. Tällä hetkellä käytetyimmät tekniikat tässä ovat aptameerit, entsyymit ja polymeerit (Sharma *et al.*, 2018). Irrottamisen tulisi tapahtua siten, että CTC pysyy vaurioitumattomana. Jotta CTC saadaan irtoamaan, täytyy reseptorin ja ligandin välinen vuorovaikutus ja mahdolliset fokaaliset adheesiot poistaa vaikuttamasta (Zheng *et al.*, 2013). Leikkausjännitteen avulla tapahtuva CTC:n vapautus tutkimusten mukaan voi vähentää solujen elinkelpoisuutta ja muuten vaikuttaa näiden herkkien solujen toimintaan (Albuquerque *et al.*, 2000; Born *et al.*, 1992; Chowdhury *et al.*, 2010). Tämän vuoksi on täytynyt kehitellä vähemmän invasiivisiä menetelmiä solujen irroittamiseen.

Tällä hetkellä irroituksessa on standardiprotokollana käyttää trypsiini-entsyymiä. Se on yksi ainoita mekanismeja, joilla luonnolliset vasta-aineet saadaan irrotettua soluista (Zheng *et al.*, 2013). Tämän menetelmän kuitenkin tiedetään voivan vahingoittaa solujen membraanien proteiinirakenteita, jos käyttö ei ole täysin optimaalista (Kushida *et al.*, 2005). Se on kuitenkin todettu erottavan CTC:t vasta-aineita hyödyntävästä alustasta noin 100 % hyötysuhteella, käyttäen 0,25 massaprosenttia trypsiiniä, näiden solujen mahdollista proteiinien degradoitumista trypsinaation seurauksena ei kuitenkaan osata arvioida (Adams *et al.*, 2008; Dharmasiri *et al.*, 2011).

Nukleiinihapoista koostuvien aptameeristen koettimien irroittaminen puolestaan toimii endonukleaasientsyymien avulla. Se toimii samalla hyötysuhteella trypsiinin kanssa, mutta on nopeampi ja tuottaa vähemmän vahinkoa solureseptoreille (S. Li *et al.*, 2013). Aptameerien irrottaminen CTC:sta onnistuu usein myös ympäristökijöitä, kuten lämpötilaa tai pH:ta muuttamalla. Tämä johtuu siitä, että aptameerien kolmiulotteinen konformaatio on usein herkkä näille tekijöille, jolloin ne menettävät affiniteetin niiden kohdemolekyylillä vasten (Zheng *et al.*, 2013). Koska aptameerit ovat keinotekoisia molekyylejä, ne voidaan myös suunnitella siten, että kun siihen kiinnittyy komplimentaarinen oligonukleotidisekvenssi, sen konformaatio muuttuu ja se irtoaa solusta (Zhang *et al.*, 2012). Polymeerit toimivat samalla tavoin aptameerien kanssa, jolloin niiden vaste ympäristön muutoksiin saa aikaan irtoamisen reseptorista (de las Heras Alarcón *et al.*, 2005).

3.1.2. Immunomagnetismi

Immunomagnetismi on pitkään ollut suosittu tekniikka CTC:jen eristyksessä, sillä se ei vaadi erillistä trypsinointia solujen irrottamiseen vasta-aineista, mikä on muissa tapauksissa tuottanut usein haasteita (Sheng *et al.*, 2014). Tekniikassa antigeenille spesifinen vasta-aine konjugoidaan kiinni magneettisten helmen pintaan, jolloin nämä antigeeni-vasta-ainekompleksit saadaan eroteltua magneettikentän avulla muista soluista (Allard *et al.*, 2004). Vasta-aineiden kiinnittäminen helmien pintaan voi tapahtua kovalenttisesti tai ei-kovalenttisesti. Ei-kovalenttisissä sidoksissa käytetyin menetelmä on streptavidini-biotiini tekniikka, jossa kiinnitettävä vasta-aine täytyy ensin olla konjugoitu biotiiniin, jonka jälkeen biotiini voi muodostaa vuorovaikutuksen helmen pinnalle kovalenttisesti konjugoidun streptavidinin kanssa. Tällöin käytetään sellaista amfiifilisille partikkeleille bioyhteensopivaa helmeä, jonka pinnan reaktiivisen karboksyyli-ryhmät pystyvät konjugoitumaan streptavidiniin (F. Li *et al.*, 2019). Kun halutaan irreversiibeli kovalenttinen sidos, päällystetään magneettiset helmet useilla eri kerroksilla molekyyliä, jotka sitoutuvat toisiinsa kovalenttisesti. Tyypillimmät vasta-aineiden kiinnityskohdat ovat sen amiini-, karboksyyli- ja tioliryhmät, jotka konjugoituvat helmen pinnan molekyylien kanssa eri olosuhteissa (Siiman *et al.*, 2001). Immunomagnetismiin perustuva CellSearch® on edelleen ainoa FDA:n hyväksymä CTC isolaation alusta (Allard *et al.*, 2004; Vasseur *et al.*, 2021). Se on pitkään toiminut yleisimpänä tekniikkana CTC:n kiinniotossa erilaisissa kliinisissä tutkimuksissa. CellSearch® menetelmä perustuu magneettisen helmen pintaan konjugoitujen EpCAM-antigeenin vasta-aineiden affiniteettiin EpCAM antigeeniä ekspressoivien syöpäsolujen kanssa (Kagan *et al.*, 2002).

Magneettikentän avulla solujen erottelu on siitä hyvä menetelmä, että se ei vahingoita CTC:tä ja on erittäin nopea prosessina. Immunomagnetismi on myös kaikista tutkituin ja käytetyin menetelmä ja rikastuttamisen hyötysuhde on korkea. Helmet voivat kuitenkin mahdollisesti vaikuttaa solujen elinkelpoisuuteen, kun niitä ei eroteta kompleksista. Menetelmä on myös kallis ja se on vaikea automatisoida sen useiden vaiheiden vuoksi (Z. Shen *et al.*, 2017). Rikastuttamisen jälkeen kompleksit tyypillisesti myös fiksoidaan alustaan kiinni niiden stabiiliuden ylläpitämiseksi, mikä estää CTC:jen jatkotutkimukset elinkelpoisissa solukulttuureissa (L. Wang *et al.*, 2016).

3.1.3. Mikrofluidistiikka

Mikrofluidistiset laitteet ovat käytöltään erittäin monipuolisia, sillä niihin saadaan sisällytettyä useita perinteisiä biokemiallisia analyysijä, jolloin CTC:jen tunnistaminen, eristäminen ja jopa solukulttuurit voivat onnistua samalla laitteella. Menetelmällä on siis hyvä potentiaali kiinnioton jälkeisen molekylaarisen karakterisoinnin mahdollistamiseen (Zou & Cui, 2018). Mikrofluidistiikan avulla saadaan erittäin tarkkaan hallittua näytteen virtausnopeutta eri osissa laitetta, mikä on erityisen tärkeää, sillä se vaikuttaa solun ja vasta-aineen välisen kontaktin kestoon ja siten CTC:jen kiinniottotehokkuuteen. (Ferreira *et al.*, 2016). Toinen tärkeä huomioitava asia laitteissa on leikkausrasituksen suuruus, joka täytyy pitää matalana, jotta CTC:n kiinnittyminen vasta-aineeseen on mahdollista (Nagrath *et al.*, 2007). Onkin olemassa useita eri menetelmiä vasta-aineiden sijoittamiseen mikrofluidistisen laitteen sisälle. Suurimmat muuttujat eri mallien välillä ovat kanavien rakenteet ja erilaiset substraattipinnoitteet. Yhdessä mallissa vasta-aineet kiinnitetään mikropylväisiin ja toisessa vasta-aineet konjugoidaan kiinni erilaisiin nanolevyihin. Vasta-aineiden konjugointi näihin rakenteisiin tapahtuu pitkälti samoilla tavoin, kuin magneettisiin helmiin kiinnittymisessä. Eikovalenttinen sitoutuminen biotinyloitujen vasta-aineiden kanssa on yleistä helpomman vapauttamisen vuoksi. Pinta käsitellään erilaisilla aineilla metodista riippuen, mahdollistaen avidiinin kovalenttisen sitoutumisen pinnalle useiden molekyylien sidosten kautta (Yoon *et al.*, 2013).

Mikrofluidistisessa laitteessa vain CTC:t jäävät kiinni ja muut veren solut poistuvat virtauksen mukana. Tämä mekanismi mahdollistaa kiinniotettujen solujen huuhtelun, jonka jälkeen solut voidaan irroittaa alustasta ja johtaa virran mukana toisiin osioihin, joissa jatkotutkimus tapahtuu. Mikrofluidistisilla laitteilla onkin suurempi spesifisyys ja selektiivisyys verrattuna immunomagnetismiin, jonka vuoksi sen käyttöä voisi jopa hyödyntää myös syövän diagnosoinnissa, ei vain prognoosissa (Hong & Zu, 2013). Toinen hyöty mikrofluidistisilla laitteilla on se, että potilaiden perifeerinen veri voidaan sellaisenaan käsitellä laitteella ilman ylimääräisiä toimenpiteitä. Mikrofluidistisen alustan valmistaminen on myös suhteellisen halpaa. Laitteen hitaan virtausnopeuden vuoksi prosessi on kuitenkin hidasta, varsinkin kun laite pystyy kerralla hyödyntämään vain hyvin pieniä tilavuuksia verta. Solujen elinkelpoisuus leikkausjännitteen johdosta myös vielä epäselvää (Z. Shen *et al.*, 2017).

3.1.4. Hydrogeelit

Hydrogeelit CTC:jen eristämässä ovat yleistyneet tutkimuksissa viime vuosina. Tekniikan yksi suurista eduista on sen suuri bioyhteensopivuus veren kanssa, mikä johtuu niiden polymeerisen verkoston huokoisesta rakenteesta, joka mahdollistaa veden sisäistämisen (Peppas *et al.*, 2006). Hydrogeelien degradaatiokyky tuo suuren potentiaalin elinkelpoisten, eristettyjen CTC:jen hyödyntämiseen jatkotutkimuksissa. Hydrogeeliä on myös käytetty magneettisten nanopartikkelien päällystämiseen, minkä on todettu vähentävän ei-kohdesolujen kiinnittymistä partikkeleihin (Z. Wang *et al.*, 2021). Hydrogeelit tyypillisesti jaetaan kahteen eri kategoriaan niiden kemiallisten ominaisuuksien perusteella: reversiibelit, usein biohajoavat luonnolliset hydrogeelit ja pysyvät, usein kemiallisesti stabiilit keinotekoiset hydrogeelit. Näiden erityyppisten hydrogeelien sekoituksia voidaan hyödyntää sopivien materiaalien valmistuksessa (Golafshan *et al.*, 2017; Palmese *et al.*, 2019).

Hydrogeelejä on hyödynnetty eri tutkimuksissa muuan muassa hydrogeelipartikkelien ja pintojen päällysteiden muodossa, stationäärisissä mallinuksissa. Molemmat rakenteet toimivat pääosin samalla periaatteella kuin muutkin erotusmenetelmät, eli ne pinnoitetaan vastaavanlaisilla kemikaaleilla, jolloin niiden konjugaatio vasta-aineisiin ja CTC:n kiinnitto mahdollistuu (Peppas *et al.*, 2006). Toisenlainen, hydrogeelin erityisiä ominaisuuksia hyödyntävä mekanismi vasta-aineiden konjugointiin, on geeliä polymerisoidessa sekoittaa mukaan aptameerille komplimentaaraisia oligonukleotidisekvenssi-molekyylejä, joihin aptameeri voi sitoutua pelkän inkubaation avulla. Tämä tekniikka mahdollistaa solujen irrotuksen endonukleaasien avulla, jotka voivat sekvenssispesifisti katkaista nukleotidien väliset sidokset. Tämä mahdollistaa eri CTC-populaatioiden kiinniton ja erottelun samalla alustalla (S. Li *et al.*, 2013). Hydrogeelit ovat myös erittäin halpoja valmistaa, joten niiden hyödyntäminen tulee todennäköisesti kasvamaan entisestään, kun tekniikoita päästään kehittämään pidemmälle.

3.1.5. Kaksoismodaaliset alustat

Kaksoismodaalisten alustojen ideana on yhdistää useiden eri tekniikoiden periaatteita yhteen laitteeseen, jolloin rikastuttamisen hyötysuhde on hyvin korkea ja eristyksestä saadaan erittäin puhtaita CTC:ja muihin mekanismeihin verrattuna. Useat alustat käyttävät tässä immunomagneettisia helmiä ja hyödyntävät samalla mikrofluidistiikan parhaita puolia (Kim *et al.*, 2016; Z. Shen *et al.*, 2017). Tyypillisesti tämä toteutuu siten, että CTC:t otetaan immunomagneettisten helmien avulla kiinni ja sen jälkeen kuljetetaan mikrofluidististen alustojen läpi, missä ne erotetaan veren muista soluista esimerkiksi koon perusteella (Zou & Cui, 2018). Näiden laitteiden valmistaminen on kuitenkin kallista niiden monimutkaisuuksien vuoksi. Useiden kaksoismodaalisten alustojen toimintaperiaatteet ja teknologia on pitkälti vielä testausten alla, joten ei voida olla varmoja niiden todellisista vaikutuksista soluihin. Erityisesti useiden tekniikoiden sensitiivisyys on kyseenalaista ja voi olla alhaista muihin mekanismeihin verrattuna (Habli *et al.*, 2020).

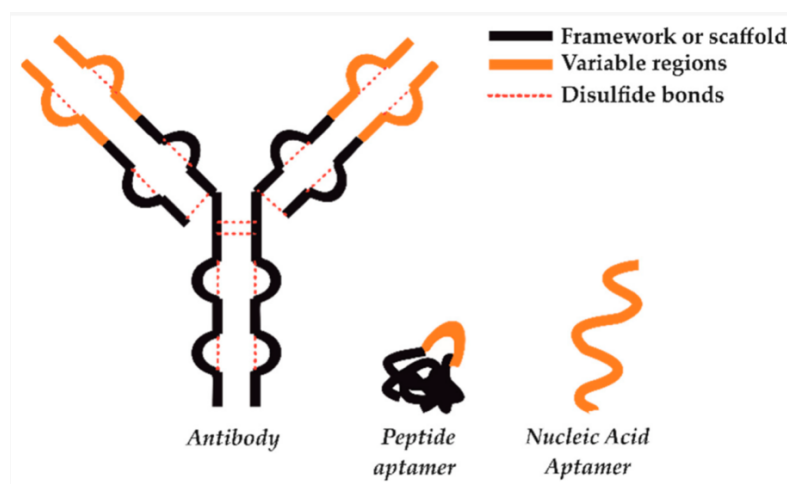
3.3. Negatiivinen rikastuttaminen

Negatiivisessa rikastuttamisessa ei kiinnioton kohteena ole itse syöpäsolut, vaan muut veren solut, jolloin teorian mukaan vain CTC:t jäävät seerumiin. Tästä syystä negatiivinen ehtyminen on hyödyksi, kun näytteestä halutaan eristää leukosyytit pois, jättäen CTC:t vapaaksi jatkotutkimuksia varten (Yeo *et al.*, 2016). Tämän kiinniottotavan seurauksena saatavassa liuoksessa on heterogeeninen populaatio CTC:ja, toisin kuin positiivisen rikastuttamisen kautta kiinniottotutetut tiettyjä antigeenejä ekspressoivat alapopulaatiot (Bankó *et al.*, 2019). On kuitenkin huomattava, että tämän seurauksena ne CTC:t, jotka ovat leukosyyttien ympäröimiä, kuten klusterit, voivat myös jäädä pois lopputuloksesta, kuten käy usein muillakin immunoaffiniteettipohjaisilla eristysmenetelmillä (X. Li *et al.*, 2020). Positiiviseen rikastuttamiseen verrattuna kuitenkin tällä tekniikalla saadaan tyypillisesti huonompi puhtaus (Bacelli *et al.*, 2013; Lara *et al.*, 2004). Negatiivisessa rikastuttamisessa käytetään pääosin samoja tekniikoita kuin positiivisessa rikastuttamisessa, vain niissä käytetyt vasta-aineet muuttuvat.

Tyypilliset negatiivisen rikastuttamisen työvaiheet ovat: punasolujen lyysi, leukosyyttien immunomagneettinen kiinniotto ja värjäys, jota seuraa magneettinen erottelu läpivirtaussysteemin yli olevassa magneetikentässä. Läpivirtaavan seerumin CTC:jen analyysi voidaan suorittaa esimerkiksi automaattisen solujen laskijan tai visuaalisen laskennan kautta (Lara *et al.*, 2004).

4. Immunoaffiniteetti-tekniikassa hyödynnetyt ligandit

Immunoaffiniteetti-tekniikassa hyödynnetään tyypillisesti luonnollisia vasta-aineita, mutta myös aptameerejä hyödynnetään yhä kasvavissa määrin (Y. Liu *et al.*, 2022). Vasta-aineet ovat määritelmän mukaan immuunijärjestelmän solujen tuottamia proteiineja, jotka valmistetaan vasteena antigeeniärsykkeelle. Ne ovat tälle tietylle antigeenille spesifisiä, eivätkä voi sitoa muita antigeenejä (Holodick *et al.*, 2017). Aptameerit puolestaan ovat joko nukleiinihappoista tai peptideistä rakennettuja kemikaalisia, keinotekoisia jäljitelmiä vasta-aineista. Ne eivät rakenteellisesti muistuta vasta-aineita, varsinkaan koon ja avaruudellisten rakenteiden suhteen (Kuva 2) (Ziółkowski *et al.*, 2021).

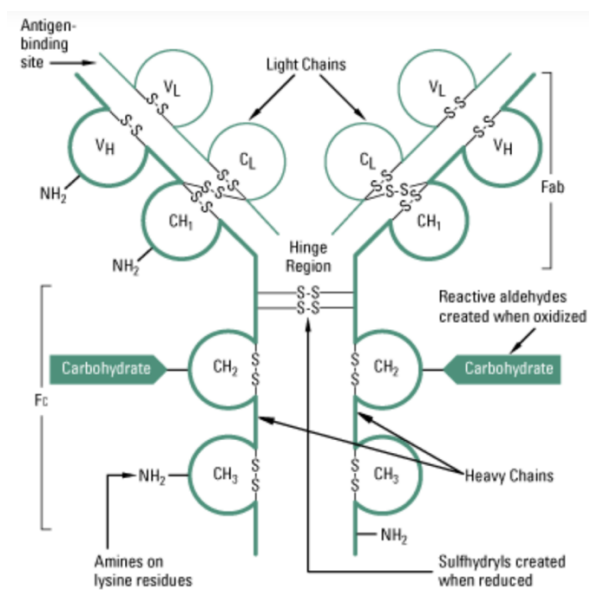


Kuva 2: Kaavamainen esitys vasta-aineen, peptidi- ja nukleiinihappoaptameerien suhteellisista ko'oisista ja niiden avaruudellisista muodoista, sekä molekyylien variaabiliteetistä (Ziółkowski *et al.*, 2021).

4.1. Luonnolliset vasta-aineet

Immunoaffiniteetin eri tekniikoissa käytetyt monoklonaaliset vasta-aineet ovat perinteisesti valmistettu injektoimalla koe-eläimiin puhdistettua antigeeniä, aiheuttaen vasta-aineen korkean ekspresion sen verenkierrossa, josta se saadaan eristettyä (Alberts *et al.*, 1983; Harlow & Lane, 1988; Sites *et al.*, 1976). Niiden tuotantokustannuksia on kuitenkin pyritty alentamaan hyödyntämällä yhdistelmä-DNA-tekniologiaa niiden tuottamiseen hiivoissa ja kasveissa (Diamos *et al.*, 2020). Usein tutkimuksissa käytetyt vasta-aineet muokataan sopivaan tarkoitukseen esimerkiksi merkkäämällä se fluoresoivilla markkereilla tai kuten useissa immunoaffiniteettisissä eristysmenetelmissä vaaditaan, biotinyloimalla vasta-aine. Näiden leimojen sitoutumiskohta vasta-aineeseen voidaan määrittellä käyttämällä hieman muutettuja versioita molekyylistä (Haugland & You, 2008). Vasta-aineen

kovalenttinen sidos biotiiniin halutaan tyypillisesti muodostaa raskaiden ketjujen päissä olevien primaaristen amiiniryhmien kanssa (Kuva 3), jolloin vasta-aine saadaan orientoitua pinnalle siten, että antigeenejä sitovat alueet ovat mahdollisimman hyvin antigeenien saavutettavissa, kaukana pariutumiskohdasta (S. Gao *et al.*, 2022). Vasta-aineiden kovalenttisissa sidoksissa tyypillisimmät kiinnityskohdat ovat sen amiini-, karboksyyli- ja tioliryhmät. (Siiman *et al.*, 2001). Karboksyyli-ryhmä sijaitsee vasta-aineen peptidien C-päässä ja tioliryhmät kysteiinien sivuketjuissa (Kuva 3), joten myös niiden avulla on vasta-aineen orientaatio tyypillisesti sopiva. Vasta-aineiden antigeenejä sitovien alueiden peptidit muuttuvat sen mukaan, mitä antigeeniä se sitoo, mutta antigeenin muu rakenne pysyy samana (Kuva 2) (Ziółkowski *et al.*, 2021).



Kuva 3: Vasta-ainemolekyylin rakenne ja sen leimauskohdat (Thermo Fisher Scientific, 2022).

Vasta-aineiden toimintaa immunoaffiniteetisessä solujen kiinniotossa on tutkittu pitkään, ja ne on todettu erittäin hyvin selektiivisiksi ja niillä on hyvä affiniteetti antigeenin kanssa. Tämä on mahdollista sen kokoon suhteutettuna suuren sitoutumispinta-alan ansiosta (Ritz *et al.*, 1981). Niiden käyttöä vaikeuttavia tekijöitä on kuitenkin molekyylien heikko stabiilisuus ja sen potentiaalinen ristireaktiivisuus, kalliiden hintojen lisäksi (Thiviyanathan & Gorenstein, 2012).

4.2. Aptameerit

Peptidiaptameerit ovat pienempiä kemiallisesti syntetisoituja versioita vasta-aineista. Ne ovat rakennettu pienen, erittäin stabiilin peptidiselkärangan avulla. Niiden käyttö solujen eristämisen tutkimuksissa on kuitenkin erittäin rajallista, sillä niiden tuoma hyöty stabiilisuudelle ja pienelle koolle toteutuu myös muuten monikäyttöisimmillä ja tehokkaammilla nukleiinihappoaptameereillä (*Colas et al.*, 1996; *Hou et al.*, 2021). Aptameerien käyttö immunoaffiniteetisessä solujen erottelussa on paljon uudempaa ja siis vähemmän tutkittua vasta-aineisiin verrattuna. Niiden spesifisyys ja affiniteetti antigeenejä vastaan kuitenkin tutkimusten perusteella vaikuttaa olevan samaa tasoa vasta-aineiden kanssa (*Ulrich et al.*, 2006).

Nukleiinihapoista valmistetut yksijuosteiset, molekyylipainoltaan pienet aptameerit muodostavat keskinäisten vuorovaikutusten ansiosta kolmiulotteisia rakenteita, jotka pystyvät affiniteetin avulla muodostamaan sidoksen antigeenin kanssa (*J. Wang et al.*, 2019). Niiden valmistus tapahtuu SELEX-menetelmällä, jossa halutun antigeenin kanssa korkea-affiniteettisimman spesifin sekvenssin muodostus tapahtuu automaattisesti. Tämän teknologian hyödyntäminen myös mahdollistaa harvinaisten pintaproteiinien perusteella CTC-osapopulaatioiden selvittämisen, kun useat aptameerit leimataan eri merkkiaineilla (*Ellington & Szostak*, 1990; *Tuerk & Gold*, 1990).

Nukleiinihappoaptameerien yksi tärkeimmistä hyödyistä tulee sen irrottamisen helppoudesta, sen ulkoisilla tekijöillä stimuloitavien konformaationmuutosten ja endonukleaasin käytön vuoksi (*Zheng et al.*, 2013). Koska nukleiinihappoaptameerit valmistetaan kemikaalisesti syntetisoimalla, niitä voidaan nopeasti ja huomattavasti pienemmällä tuotantokustannuksella tuottaa suuria määriä ja niiden rakennetta voidaan modifioida eri kemiallisilla ryhmillä (*J. Wang et al.*, 2019). Tämä mahdollistaa myös alustaan konjugaation, sillä rakenteeseen voidaan sisällyttää siihen sopivia kemiallisia ryhmiä haluttuihin kohtiin. Tämän toinen hyöty on aptameerin orientaation suhteellinen vakaus ilman ylimääräisiä toimenpiteitä (*Hou et al.*, 2021). Aptameerien tärkein hyöty vasta-aineisiin verrattuna on niiden stabiilisuus. Erityisesti mikrofluidististen laitteiden ongelmana on usein ollut vasta-aineiden degradoituminen virtauksen ja muiden ympäristöolosuhteiden vaikutuksesta, mitkä nukleiinihappoihin vaikuttavat eri tavalla (*Q. Shen et al.*, 2013). Aptameerien käyttö tulee sen etujen ansiosta todennäköisesti yleistymään huomattavasti tulevaisuudessa ja korvaamaan osittain perinteiden vasta-aineiden käytön.

5. Immunoaffiniteetti-tekniikan kohteena toimivat antigeenit

Immunoaffiniteetti-tekniikan yksi suurimmista haasteista on CTC:jen heterogeeninen luonne. Tiedetään, että CTC:t voivat suuresti vaihdella ekspressiossa epiteelisten ja mesenkymaalisten pintaproteiinien välillä ja usein molempia ilmenee solukalvolla samanaikaisesti (Tiffon, 2018). Ei ole löydetty yhtä universaalista antigeeniä, joka erottaisi syöpäsolut veren muusta soluista. Tämän vuoksi erottelu tapahtuu tiettyjen CTC-osapopulaatioiden ekspressoitujen antigeenien avulla, jolloin vain tietynlaiset CTC:t saadaan eristettyä tiettyjen vasta-aineiden avulla (Balcik-Ercin *et al.*, 2021). CTC:jen EMT-plastisuuden vuoksi usein eristyksessä käytetään myös kantasoluille ja tietyille syöpätyypeille spesifisiä antigeenejä, kun halutaan niitä ominaisuuksia kantavien kokonaisten osapopulaatioiden kiinniotto (Lin *et al.*, 2021).

5.1. Negatiivisen rikastuttamisen antigeenit

Negatiivisessa rikastuttamisessa immunoaffiniteetin kohteena on leukosyyteille spesifit pintaproteiinit. Yleisin tähän tarkoitukseen valittu antigeeni on CD45. Se ilmenee kaikissa ihmisen leukosyyteissä, mutta sen ekspresio kalvolla on matalaa granulosityeillä verrattuna monosyyttien ja lymfosyyttien korkeaan ekspresioon. Tästä seuraa granulositytien osalta heikko kiinniotto tehokkuus. Usein tämän korjaamiseksi CD45 antigeenin lisäksi valitaan kohteeksi myös CD16 antigeeni, joka ilmenee granulosityeillä ja luonnollisilla tappajasoluilla. Näitä kahta antigeeniä hyödyntäen eristyksen jälkeisessä enumeraatiossa saadaan mahdollisten CTC:jen määrää rajattua tumallisista soluista pelkän CD45:jen $82 \% \pm 21 \%$:sta vain $20 \% \pm 13 \%$:iin (de Wit *et al.*, 2018). Tämä kuvaa kuinka tärkeää myös negatiivisessa rikastuttamisessa on käyttää CD45:n lisäksi muitakin antigeenejä. Esimerkkinä tällaisesta multimarkkerisekoituksesta toimii MINDEC, joka sisältää CD45:n ja CD16:n lisäksi myös CD19 (B-solut), CD163 (monosyytit ja makrofaagit) ja CD235a (punasolut) vasta-aineita, jolloin rikastuttamisen jälkeinen puhtaus CTC:jen suhteen paranee. Tällä vasta-aineseoksella immunomagneettisella negatiivisella rikastuttamisella löydettiin 71 %:sta metastaatista haimasyövän potilaista CTC:ja sekä saatiin eristettyä $82 \% \pm 10 \%$ veren muista soluista pois seerumista (Lapin *et al.*, 2016).

5.2. Epiteeliset antigeenit

Koska useimmat syövät ovat alkuperältään epiteelisiä, ensimmäinen periaate CTC:den erottamiseen miljoonista fenotyypiltään mesenkymaalisisista, normaaleista verisolusta oli niiden epiteelisten antigeenien kohdentaminen (Eslami-S *et al.*, 2020). Epiteelisten solujen tärkeimmäksi antigeeniksi kohdentamisessa nousi EpCAM, jonka ajateltiin ilmenevän lähes universaalisesti epiteeliperäisten syöpäsolujen pinnalla (Baeuerle & Gires, 2007). EpCAM on tällä hetkellä ainoa FDA:n hyväksymä pintamarkkeri CTC:jen tunnistamiselle, ja sen käyttö on vakiintunut pitkälti standardiksi (Kagan *et al.*, 2002; Vasseur *et al.*, 2021). Tämä suurimmaksi osaksi johtuu sen käytöstä CellSearch® -systeemissä, joka on pitkään ollut ainoa kliiniseen käyttöön hyväksytty CTC-erotusmenetelmä (Allard *et al.*, 2004; Vasseur *et al.*, 2021).

EpCAM ei kuitenkaan ilmene läheskään kaiken tyyppisillä syöpäsoluilla. Sitä tyypillisesti vahvasti ekspressoidaan rinta-, keuhko-, suolisto- ja eturauhansyövissä, mutta sitä ei tunnisteta lymfoomassa, sarkoomassa sekä neurogeenisissä kasvaimissa (Went *et al.*, 2004). Sen ekspression korkeus voi myös vaihdella samaa alkuperääkin olevien syöpäsolujen välillä. Esimerkiksi tutkimuksessa CellSearch® -laitteella vain 41 % metastaattisen keuhkosyövän potilaista löydettiin ainakin 1 CTC per 7,5 ml verta, kun taas CTC laitteen jättämästä liuoksesta filtraatiolla ja CK-identifikaatiolla löydettiin 81 % (de Wit *et al.*, 2015). Tämä johtuu CTC:jen läpikäymästä EMT:stä ja sen aiheuttamasta epiteelisten markkereiden ekspression laskusta. Tyypillisesti EpCAM -kiinniotto vaatii sen korkean ekspression solukalvolla, joten CTC:jen epiteelisten ja mesekymaalisten antigeenien ekspression plastisuus heikentää CTC:jen kiinniottoprosenttia (Gorges *et al.*, 2012).

EpCAM:n ekspressio muuttuu myös syövän eri vaiheissa, esimerkiksi primaaristen ja metastaattisten kasvainten välillä (Spizzo *et al.*, 2011). Tämä selittää myös miksi tällä tekniikalla myöhäisen vaiheen metastaattisen rinta- ja eturauhassyövän potilailla vain 50 % löydettiin enemmän kuin 5 CTC:tä ja suolistosyövässä vain 26 % löydettiin yli 3 CTC:tä 7,5 ml verta, kun tämän luvun pitäisi olla paljon suurempi (Gorges *et al.*, 2012).

EpCAM antigeenin on kuitenkin todettu toimivan hyödyllisenä markerina syövän kliinisessä tutkimuksessa, sillä EpCAM-positiivisten CTC:jen korkea määrä korreloituu tutkimusten mukaan alhaisempaan kokonaiselossaoloon. Suurin osa kliinisestä tutkimuksista CTC:den käyttöön

markkerina pohjautuu nimenomaan EpCAM-positiivisiin CTC:hin, sillä kliinisessä CTC-kiinniotossa käytetään pitkälti CellSearch® -laitetta (Bork *et al.*, 2015; Reeh *et al.*, 2015).

Muiden epiteelisten antigeenien, kuten CK8, CK18 ja CK19, käyttö tutkimuksissa ei niinkään pohjaudu niiden käyttöön itse kiinniottoprosessissa, vaan niitä hyödynnetään tyypillisesti CTC:jen enumeraatiossa. Pelkkä EpCAM ekspressio ei ole riittävä todistamaan solun olevan CTC. Perinteisen menetelmän mukaisesti, jotta solu voidaan määritellä CTC:ksi, sen täytyy olla tumallinen solu, joka ekspressoii EpCAM-molekyyliä ja sytokeratiineja 8, 18 tai 19, mutta ei CD45-molekyyliä (Allard *et al.*, 2004; Kagan *et al.*, 2002).

5.3. Mesenkymaaliset antigeenit

Syöpäsolujen EMT-plastisuuden selvittämisen jälkeen on myös mesenkymaalisten antigeenien käyttö CTC-kiinniotossa yleistynyt. EMT:n aikana muun muassa N-cadherin, vimentin ja twist -antigeenien ekspressiot solukalvolla kasvavat, kun taas epiteelisten markkerien ekspressio laskee (Zhao *et al.*, 2019). Tämän vuoksi näiden solujen kiinniotto ei usein onnistu anti-EpCAM:n avulla. Solunkalvon vimentiniä on käytetty muutamissa tutkimuksissa immunoaffiniteetin kohteena ja sen on todettu toimivan rinta-, eturauhas-, paksusuolen- ja haiman syövässä EMT-tyyppisten CTC:jen kiinniotossa (Satelli *et al.*, 2015, 2016, 2017; Wei *et al.*, 2019). Kuten aiemmin todettiin, EpCAM-riippuvaisessa kiinniotossa suuri osa veren CTC:stä jää vapaaksi. Rinta- ja haimasyövän tutkimuksessa todettiin vimentinin olevan EpCAM:a tehokkaampi CTC:jen kiinniotossa (Satelli *et al.*, 2015; Wei *et al.*, 2019). Sen käyttö voi kuitenkin johtaa vääriin positiivisiin tuloksiin, sillä vimentin ilmenee myös apoptoottisissa ja virusten infektoimissa soluissa. Tutkimuksen mukaan se silti voi toimia useimpien kiinteiden kasvaimien CTC:ja hyväksyttävällä yli 60 % kiinniotto-osuudella (Y. Gao *et al.*, 2021).

Toinen EMT-tilan antigeeni, jota on hyödynnetty immunoaffiniteetisessä kiinniotossa on N-cadheriini. Sen on osoitettu eristävän jopa 2,1 kertaa enemmän CTC:ja verestä EpCAM:iin verrattuna ja tekniikka on kolme kertaa tehokkaampi kun yhdistetään N-cadherin ja EpCAM -kiinniotto. Vasta-aineiden yhdistämisen samoihin immunomagneettisiin partikkeleihin kuitenkin todennäköisesti aiheutti interferenssiä kiinniotossa, jos vain toinen antigeeneistä oli pääasiallisesti näytteessä ekspressoituna. Tämä johti siihen, että osa molempia antigeenejä kohdentavista kiinniottoista tuotti huonompia tuloksia pelkän N-cadheriinin kiinniottoon verrattuna. Näissä näytteissä suurin osa CTC:stä oli EMT fenotyypisiä. Eri tyyppisten CTC:jen samanaikainen kiinniotto voi tämän vuoksi

olla haastavaa, joten voi olla hyödyllisempää suorittaa eristykset eriaikaisesti tai eri tekniikalla (Po *et al.*, 2018).

EMT:lle tyypillisten markkerien on myös todettu toimivan epiteelisesten antigeenien ekspressiota vahvempana merkkinä syövän etenemisestä (Gradilone *et al.*, 2011). Mesenkymaalisten antigeenien, kuten twistin ja vimentinin ilmeneminen CTC:ssä onkin huomattu olevan yhteyksissä syövän metastatitiseen potentiaaliin ja toimii merkkinä huonosta prognoosista (Y. M. Li *et al.*, 2013). Esimerkiksi rintasyöpää tutkiessa metastaattisen vaiheen potilailla mesenkymaalisten CTC:jen ilmeneminen nousi 73 %:sta 100 %:iin syövän alkuvaiheeseen verrattuna (Kallergi *et al.*, 2011). EMT-tyyppisten CTC:jen kiinnioton kliinistä hyödyllisyyttä tulee kuitenkin tutkia vielä lisää. Muilla tavoilla kiinniotettujen CTC:jen EMT-piirteitä on tutkittu ja niiden on todettu tuovan mahdollisesti kliinisesti hyödyllistä tietoa metastaaseista, mutta kiinniottoa mesenkymaalisten antigeenien avulla ei ole tutkittu juurikaan, joten ei tiedetä vielä varmaa tietoa, miten niiden enumeraatio korreloituu prognoosiin. On kuitenkin todettu, että rintasyöpäpotilailla suuri EMT-tyyppisten CTC:jen osuus veren koko CTC määrästä on parempi markkeri syövän etenemiselle verrattuna CTC:n kokonaismäärään ja seerumin kasvainmarkkereiden määrään verrattuna (Guan *et al.*, 2019).

5.4. Kantasolu-spesifiset antigeenit

Yksi CTC osapopulaatioista ovat niin sanotut kantasolupiiirteitä omaavat CTC:t. Tämä tyypillisesti kantasoluille spesifit piirteet tyypillisesti ilmenevät CTC:issa EMT:n indusoimana (Mani *et al.*, 2008; Morel *et al.*, 2008). Tällaisia antigeenejä, jotka usein ilmenevät kanonisten EMT markkerien kanssa ovat CD44 ja CD133. Kantasolumaisten piirteiden, erityisesti CD44:n korkean ekspression, on todettu vaikuttavan kasvainten etenemisen regulaatioon, invaasioon ja metastaasiin (Todoroki *et al.*, 2016; Zargarani *et al.*, 2018). CD44-antigeenin käyttämistä immunoaffiniteetisessä kiinniotossa on tutkittu muun muassa suun okasolusyöpäpotilailla, joiden CD44-positiiviset solut eristettiin immunomagnetismilla. Nämä CD44+ CTC:t ekspressoivat korkeita määriä kantasolumarkkereita ja EMT:hen liittyviä geenejä. Niiden proliferaatio on myös nopeampaa ja ne erittävät suurempia määriä anti-inflammatorisia sytokiinejä ja angiogeenisiä kasvutekijöitä CTC-kokonaispopulaation verrattuna (Patil, 2021). Tämän perusteella kantasolujen spesifisille antigeeneille positiivisten CTC:jen kiinniotto ja enumeraatio voisivat olla hyödyksi syövän prognoosissa. CD44 on kuitenkin vaikea kohde yhdelle vasta-aineelle, sillä siitä ilmenee useita eri versioita. Esimerkiksi vatsasyöpäpotilailla 10,6 %:lla löydettiin CD44s varianttia, 64,2 %:lla CD44v6 varianttia ja 38,2 %:lla CD44v9 varianttia. Näillä kaikilla mahdollisesti on eri rooli CTC:ssä. Tutkimuksessa kuitenkin todettiin, sekä CD44:n

ekspressiolla, että CD44:n ekspressoitujen varanttien määrällä olevan korrelaatio huonoon prognoosiin potilaalle (Kodama *et al.*, 2016).

5.5. Syöpätyypille spesifiset antigeenit

Syöpätyypille spesifien antigeenien käyttö immunoaffiniteetti-tekniikassa on yleistynyt viime vuosina. Tällaisia antigeenejä ovat esimerkiksi EGFR, HER-2, HER-3 ja MUC-1 (X. Li *et al.*, 2020). Eri EGFR-ryhmän reseptoreiden ekspressioiden muutokset ovat erittäin yleisiä CTC:illä ja sen variantti potilaalla vaikuttaa syöpälääkityksen valintaan, sillä EGFR ja sen eri variantit toimivat usein lääkkeiden kohteena (Scharpenseel *et al.*, 2019). Esimerkiksi HER-2 yliekspressio ilmenee vain 20–30 %:ssa rinta- ja munasarjan syövässä, mutta sen ilmeneminen tyypillisesti on merkinä aggressiivisemmasta syövän etenemisestä ja huonosta kokonaiselossaolosta (Ménard *et al.*, 2003; Moasser, 2007). HER-2 esiintyy yliekspressoituneena myös monissa muissa syöpätyypeissä, joissa se myös toimii huonon prognoosin markkerina. Sen laajan esiintymisen ja selvän prognoottisen hyödyn johdosta on HER-2 antigeeniin pohjautuvalla immunoaffiniteettisellä erottelulla mahdollisesti hyödyllisyyttä verrattuna EpCAM-erotteltujen CTC:jen ekspression tutkintaan (Singh *et al.*, 2021).

EGFR ja HER-3 antigeenien avulla CTC:jen erottamista on myös tutkittu. Molempien proteiinien ekspression on todettu ei-pienisoluisen keuhkosyövän potilailla kasvavan huomattavasti primaarisesta kasvaimesta metastaattiseen aivokasvaimeen verrattuna. Scharpenseel *et al.* tekemässä tutkimuksessa ei-pienisoluisien keuhkosyöpäpotilaiden HER-3 ja EGFR proteiiniekspressiot tutkittiin metastaattisista aivokasvaimista ja todettiin, että vain 3 % näytteistä ei ekspressoineut HER-3:a tai EGFR:a verrattuna 20,9 % osuuteen EpCAM-molekyylille (Hanssen *et al.*, 2016; Scharpenseel *et al.*, 2019). Tämän tuloksen perusteella voisi olla hyödyllistä eristää potilailta HER-3 ja EGFR positiivisia osapopulaatioita EpCAM positiivisten lisäksi. Samassa tutkimuksessa CellSearch® -systeemillä eristettyjen CTC:den todettiin ottavan kiinni yli 1 CTC:n vain 33,7 % potilaista ja näistä aivometastaattisilla potilailla tämä arvo oli vain 12,8 %. EGFR/HER-3 kiinniotolla puolestaan nämä samat arvot olivat 37,8 % ja 44 %. Kun tekniikat yhdistettiin, saatiin kokonaiskiinniottoprosentiksi jopa 66,7 % (Scharpenseel *et al.*, 2019). Syöpäspesifisten antigeenien hyödyntäminen CTC:jen immunoaffiniteettisessä yhdessä EpCAM-menetelmän kanssa voisi siis olla hyödyllistä sellaisten CTC-osapopulaatioiden kiinniotossa, joiden EpCAM ekspressio on heikkoa.

6. Yhteenveto

Immunoaffiniteettiin perustuvalla kiertävien syöpäsolujen kiinniotolla voi olla suuri hyöty erityisesti syövän prognoosissa ja syöpälääkityksen tehokkuuden seuraamisessa. Potilaan verinäytteestä eristettyjen CTC:jen määrän on todettu olevan vahvin prognostinen biomarkkeri kokonaisuudessaan muista kliinispatologisista parametreista riippumatta. Kiinniotettujen CTC:jen molekylaarinen karakterisointi voi myös olla hyödyllinen CTC:jen spesifien kliinisesti eroteltavat osapopulaatioiden luokittelussa niiden geeniekspression avulla, mikä ei tavallisen kasvainbiopsian avulla selviä. Molekylaarinen karakterisointi on myös vaikuttanut syöpähoidon menetelmän valintaan, sillä useat lääkkeet ovat tietyille proteiinimutaatioille spesifisiä. Immunoaffiniteettisella kiinniotolla on kuitenkin muutamia suuria haasteita: CTC:jen heterogeeninen luonne ja kiinniotettujen solujen irrotus alustasta. Solujen heterogeenisyys on ongelma, sillä ei ole löydetty universaalia antigeeniä, jolla syöpäsolut saataisiin erotettua leukosyyteistä. Perinteisen EpCAM-antigeenin sijasta eri antigeenien kohdentaminen mahdollistaa eri CTC-osapopulaatioiden kiinnioton, mutta näiden hyödyllisyyttä syövän kliinisessä tutkimuksessa ei ole pystytty varmistamaan EpCAM:n ollessa ainoa FDA-hyväksytty CTC-eristyksessä käytetty antigeeni. Eri immunoaffiniteettiin perustuvien kiinniotto-tekniikoiden ja eri tyyppisten ligandien käyttö tutkimuksessa voi myös vaikuttaa saataviin tuloksiin. Uusien tutkimusten ja kiinniottolaitteiden ilmetessä yhä tiheämmissä määrin, on tulevaisuudessa hyvinkin mahdollista, että immunoaffiniteettisen CTC-kiinnioton hyödyntäminen kliinisessä syöpätutkimuksessa kasvaa, varsinkin potentiaalisen yksilöllistetyn syöpähoidon parissa.

7. Kirjallisuusviitteet

- Acloque, H., Adams, M. S., Fishwick, K., Bronner-Fraser, M., & Nieto, M. A. (2009). Epithelial-mesenchymal transitions: the importance of changing cell state in development and disease. *The Journal of Clinical Investigation*, *119*(6), 1438–1449. <https://doi.org/10.1172/JCI38019>
- Adams, A. A., Okagbare, P. I., Feng, J., Hupert, M. L., Patterson, D., Götten, J., McCarley, R. L., Nikitopoulos, D., Murphy, M. C., & Soper, S. A. (2008). Highly efficient circulating tumor cell isolation from whole blood and label-free enumeration using polymer-based microfluidics with an integrated conductivity sensor. *Journal of the American Chemical Society*, *130*(27), 8633–8641. <https://doi.org/10.1021/JA8015022>
- Alberts, B., et al. (1983). *Molecular Biology of the Cell*. Garland Publishing, Inc., New York, NY.
- Albuquerque, M. L. C., Waters, C. M., Savla, U., Schnaper, H. W., & Flozak, A. S. (2000). Shear stress enhances human endothelial cell wound closure in vitro. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, *279*(1). <https://doi.org/10.1152/AJPHEART.2000.279.1.H293>
- Allard, W. J., Matera, J., Miller, M. C., Repollet, M., Connelly, M. C., Rao, C., Tibbe, A. G. J., Uhr, J. W., & Terstappen, L. W. M. M. (2004). Tumor cells circulate in the peripheral blood of all major carcinomas but not in healthy subjects or patients with nonmalignant diseases. *Clinical Cancer Research*, *10*(20), 6897–6904. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-0378>
- Bacelli, I., Schneeweiss, A., Riethdorf, S., Stenzinger, A., Schillert, A., Vogel, V., Klein, C., Saini, M., Bäuerle, T., Wallwiener, M., Holland-Letz, T., Höfner, T., Sprick, M., Scharpf, M., Marmé, F., Sinn, H. P., Pantel, K., Weichert, W., & Trumpp, A. (2013). Identification of a population of blood circulating tumor cells from breast cancer patients that initiates metastasis in a xenograft assay. *Nature Biotechnology*, *31*(6), 539–544. <https://doi.org/10.1038/NBT.2576>
- Baeuerle, P. A., & Gires, O. (2007). EpCAM (CD326) finding its role in cancer. *British Journal of Cancer*, *96*(3), 417. <https://doi.org/10.1038/SJ.BJC.6603494>
- Balcik-Ercin, P., Cayrefourcq, L., Soundararajan, R., Mani, S. A., & Alix-Panabières, C. (2021). Epithelial-to-mesenchymal plasticity in circulating tumor cell lines sequentially derived from a patient with colorectal cancer. *Cancers*, *13*(21). <https://doi.org/10.3390/CANCERS13215408/S1>
- Bankó, P., Lee, S. Y., Nagygyörgy, V., Zrínyi, M., Chae, C. H., Cho, D. H., & Telekes, A. (2019). Technologies for circulating tumor cell separation from whole blood. *Journal of Hematology & Oncology 2019 12:1*, *12*(1), 1–20. <https://doi.org/10.1186/S13045-019-0735-4>

- Bork, U., Rahbari, N. N., Schölch, S., Reissfelder, C., Kahlert, C., Büchler, M. W., Weitz, J., & Koch, M. (2015). Circulating tumour cells and outcome in non-metastatic colorectal cancer: a prospective study. *British Journal of Cancer*, *112*(8), 1306–1313. <https://doi.org/10.1038/BJC.2015.88>
- Born, C., Zhang, Z., Al-Rubeai, M., & Thomas, C. R. (1992). Estimation of disruption of animal cells by laminar shear stress. *Biotechnology and Bioengineering*, *40*(9), 1004–1010. <https://doi.org/10.1002/BIT.260400903>
- Butler, T. P., & Gullino, P. M. (1975). Quantitation of cell shedding into efferent blood of mammary adenocarcinoma. *Cancer research*, *35*(3), 512–516.
- Cheng, B., Tong, G., Wu, X., Cai, W., Li, Z., Tong, Z., He, L., Yu, S., & Wang, S. (2019). Enumeration And Characterization Of Circulating Tumor Cells And Its Application In Advanced Gastric Cancer. *OncoTargets and Therapy*, *12*, 7887. <https://doi.org/10.2147/OTT.S223222>
- Cheung, K. J., Padmanaban, V., Silvestri, V., Schipper, K., Cohen, J. D., Fairchild, A. N., Gorin, M. A., Verdone, J. E., Pienta, K. J., Bader, J. S., & Ewald, A. J. (2016). Polyclonal breast cancer metastases arise from collective dissemination of keratin 14-expressing tumor cell clusters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *113*(7), E854–E863. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1508541113>
- Chou, W. C., Wu, M. H., Chang, P. H., Hsu, H. C., Chang, G. J., Huang, W. K., Wu, C. E., & Hsieh, J. C. H. (2018). A Prognostic Model Based on Circulating Tumour Cells is Useful for Identifying the Poorest Survival Outcome in Patients with Metastatic Colorectal Cancer. *International Journal of Biological Sciences*, *14*(2), 137–146. <https://doi.org/10.7150/IJBS.23182>
- Chowdhury, F., Na, S., Li, D., Poh, Y. C., Tanaka, T. S., Wang, F., & Wang, N. (2010). Material properties of the cell dictate stress-induced spreading and differentiation in embryonic stem cells. *Nature Materials*, *9*(1), 82–88. <https://doi.org/10.1038/NMAT2563>
- Colas, P., Cohen, B., Jessen, T., Grishina, I., McCoy, J., & Brent, R. (1996). Genetic selection of peptide aptamers that recognize and inhibit cyclin-dependent kinase 2. *Nature*, *380*(6574), 548–550. <https://doi.org/10.1038/380548A0>
- Coumans, F. A. W., Doggen, C. J. M., Attard, G., de Bono, J. S., & Terstappen, L. W. M. M. (2010). All circulating EpCAM+CK+CD45- objects predict overall survival in castration-resistant prostate cancer. *Annals of Oncology*, *21*(9), 1851–1857. <https://doi.org/10.1093/ANNONC/MDQ030>
- 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. (2009). Circulating Tumor Cells, Disease

Progression, and Survival in Metastatic Breast Cancer. [http://Dx.Doi.Org/10.1056/NEJMoa040766](http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa040766), 351(8), 781–791. <https://doi.org/10.1056/NEJMOA040766>

- de las Heras Alarcón, C., Pennadam, S., & Alexander, C. (2005). Stimuli responsive polymers for biomedical applications. *Chemical Society Reviews*, 34(3), 276–285. <https://doi.org/10.1039/B406727D>
- de Wit, S., van Dalum, G., Lenferink, A. T. M., Tibbe, A. G. J., Hiltermann, T. J. N., Groen, H. J. M., van Rijn, C. J. M., & Terstappen, L. W. M. M. (2015). The detection of EpCAM+ and EpCAM– circulating tumor cells. *Scientific Reports 2015 5:1*, 5(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/srep12270>
- de Wit, S., Zeune, L. L., Hiltermann, T. J. N., Groen, H. J. M., van Dalum, G., & Terstappen, L. W. M. M. (2018). Classification of Cells in CTC-Enriched Samples by Advanced Image Analysis. *Cancers*, 10(10). <https://doi.org/10.3390/CANCERS10100377>
- Dharmasiri, U., Njoroge, S. K., Witek, M. A., Adebiyi, M. G., Kamande, J. W., Hupert, M. L., Barany, F., & Soper, S. A. (2011). High-throughput selection, enumeration, electrokinetic manipulation, and molecular profiling of low-abundance circulating tumor cells using a microfluidic system. *Analytical Chemistry*, 83(6), 2301–2309. <https://doi.org/10.1021/AC103172Y>
- Diamos, A. G., Hunter, J. G. L., Pardhe, M. D., Rosenthal, S. H., Sun, H., Foster, B. C., DiPalma, M. P., Chen, Q., & Mason, H. S. (2020). High Level Production of Monoclonal Antibodies Using an Optimized Plant Expression System. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 7, 472. <https://doi.org/10.3389/FBIOE.2019.00472/BIBTEX>
- Diez-Silva, M., Dao, M., Han, J., Lim, C. T., & Suresh, S. (2010). Shape and Biomechanical Characteristics of Human Red Blood Cells in Health and Disease. *MRS Bulletin / Materials Research Society*, 35(5), 382. <https://doi.org/10.1557/MRS2010.571>
- Dillekås, H., Rogers, M. S., & Straume, O. (2019). Are 90% of deaths from cancer caused by metastases? *Cancer Medicine*, 8(12), 5574. <https://doi.org/10.1002/CAM4.2474>
- Douma, S., van Laar, T., Zevenhoven, J., Meuwissen, R., van Garderen, E., & Peeper, D. S. (2004). Suppression of anoikis and induction of metastasis by the neurotrophic receptor TrkB. *Nature 2004 430:7003*, 430(7003), 1034–1039. <https://doi.org/10.1038/nature02765>
- Drucker, A., Teh, E. M., Kostyleva, R., Rayson, D., Douglas, S., & Pinto, D. M. (2020). Comparative performance of different methods for circulating tumor cell enrichment in metastatic breast cancer patients. *PLOS ONE*, 15(8), e0237308. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0237308>
- Ellington, A. D., & Szostak, J. W. (1990). In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature 1990 346:6287*, 346(6287), 818–822. <https://doi.org/10.1038/346818a0>

- Eslami-S, Z., Cortés-Hernández, L. E., & Alix-Panabières, C. (2020). Epithelial Cell Adhesion Molecule: An Anchor to Isolate Clinically Relevant Circulating Tumor Cells. *Cells*, *9*(8).
<https://doi.org/10.3390/CELLS9081836>
- Ferreira, M. M., Ramani, V. C., & Jeffrey, S. S. (2016). Circulating tumor cell technologies. *Molecular Oncology*, *10*(3), 374–394. <https://doi.org/10.1016/J.MOLONC.2016.01.007>
- Gao, S., Guisán, J. M., & Rocha-Martin, J. (2022). Oriented immobilization of antibodies onto sensing platforms - A critical review. *Analytica Chimica Acta*, *1189*, 338907.
<https://doi.org/10.1016/J.ACA.2021.338907>
- Gao, Y., Fan, W. H., Song, Z., Lou, H., & Kang, X. (2021). Comparison of circulating tumor cell (CTC) detection rates with epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) and cell surface vimentin (CSV) antibodies in different solid tumors: a retrospective study. *PeerJ*, *9*. <https://doi.org/10.7717/PEERJ.10777>
- Golafshan, N., RezaHasani, R., Tarkesh Esfahani, M., Kharaziha, M., & Khorasani, S. N. (2017). Nanohybrid hydrogels of laponite: PVA-Alginate as a potential wound healing material. *Carbohydrate Polymers*, *176*, 392–401. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2017.08.070>
- Gorges, T. M., Tinhofer, I., Drosch, M., Röse, L., Zollner, T. M., Krahn, T., & von Ahsen, O. (2012). Circulating tumour cells escape from EpCAM-based detection due to epithelial-to-mesenchymal transition. *BMC Cancer*, *12*, 178. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-12-178>
- Gradilone, A., Naso, G., Raimondi, C., Cortesi, E., Gandini, O., Vincenzi, B., Saltarelli, R., Chiapparino, E., Spremberg, F., Cristofanilli, M., Frati, L., Aglianò, A. M., & Gazzaniga, P. (2011). Circulating tumor cells (CTCs) in metastatic breast cancer (MBC): prognosis, drug resistance and phenotypic characterization. *Annals of Oncology : Official Journal of the European Society for Medical Oncology*, *22*(1), 86–92.
<https://doi.org/10.1093/ANNONC/MDQ323>
- Guan, X., Ma, F., Li, C., Wu, S., Hu, S., Huang, J., Sun, X., Wang, J., Luo, Y., Cai, R., Fan, Y., Li, Q., Chen, S., Zhang, P., Li, Q., & Xu, B. (2019). The prognostic and therapeutic implications of circulating tumor cell phenotype detection based on epithelial-mesenchymal transition markers in the first-line chemotherapy of HER2-negative metastatic breast cancer. *Cancer Communications*, *39*(1), 1–10.
<https://doi.org/10.1186/S40880-018-0346-4/FIGURES/4>
- Haber, D. A., & Velculescu, V. E. (2014). Blood-based analyses of cancer: Circulating tumor cells and circulating tumor DNA. *Cancer Discovery*, *4*(6), 650–661. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-13-1014/43038/P/BLOOD-BASED-ANALYSES-OF-CANCER-CIRCULATING-TUMOR>

- Habli, Z., Alchamaa, W., Saab, R., Kadara, H., & Khraiche, M. L. (2020). Circulating Tumor Cell Detection Technologies and Clinical Utility: Challenges and Opportunities. *Cancers*, *12*(7), 1–30. <https://doi.org/10.3390/CANCERS12071930>
- Hanssen, A., Wagner, J., Gorges, T. M., Taenzer, A., Uzunoglu, F. G., Driemel, C., Stoecklein, N. H., Knoefel, W. T., Angenendt, S., Hauch, S., Atanackovic, D., Loges, S., Riethdorf, S., Pantel, K., & Wikman, H. (2016). Characterization of different CTC subpopulations in non-small cell lung cancer. *Scientific Reports*, *6*. <https://doi.org/10.1038/SREP28010>
- Hapach, L. A., Mosier, J. A., Wang, W., & Reinhart-King, C. A. (2019). Engineered models to parse apart the metastatic cascade. *Npj Precision Oncology* *2019 3:1*, *3*(1), 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41698-019-0092-3>
- Harlow, E. and Lane, D. (1988). *Antibodies: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Haugland, R. P., & You, W. W. (2008). Coupling of antibodies with biotin. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, *418*, 13–23. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-579-4_2
- Hench, I. B., Hench, J., & Tolnay, M. (2018). Liquid biopsy in clinical management of breast, lung, and colorectal cancer. *Frontiers in Medicine*, *5*(JAN), 9. <https://doi.org/10.3389/FMED.2018.00009/BIBTEX>
- Holodick, N. E., Rodríguez-Zhurbenko, N., & Hernández, A. M. (2017). Defining natural antibodies. *Frontiers in Immunology*, *8*(JUL), 872. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2017.00872/BIBTEX>
- Hong, B., & Zu, Y. (2013). Detecting circulating tumor cells: current challenges and new trends. *Theranostics*, *3*(6), 377–394. <https://doi.org/10.7150/THNO.5195>
- Hou, J., Liu, X., & Zhou, S. (2021). Programmable materials for efficient CTCs isolation: From micro/nanotechnology to biomimicry. *View*, *2*(6), 20200023. <https://doi.org/10.1002/VIW.20200023>
- Jie, X. X., Zhang, X. Y., & Xu, C. J. (2017). Epithelial-to-mesenchymal transition, circulating tumor cells and cancer metastasis: Mechanisms and clinical applications. *Oncotarget*, *8*(46), 81558–81571. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.18277>
- Judson, P. L., Geller, M. A., Bliss, R. L., Boente, M. P., Downs, L. S., Argenta, P. A., & Carson, L. F. (2003). Preoperative detection of peripherally circulating cancer cells and its prognostic significance in ovarian cancer. *Gynecologic Oncology*, *91*(2), 389–394. <https://doi.org/10.1016/J.YGYNO.2003.08.004>
- Kagan, M., Howard, D., Bendele, T., Mayes, J., Silvia, J., Repollet, M., Doyle, J., Allard, J., Tu, N., Bui, T., Russell, T., Rao, C., Hermann, M., Rutner, H., & Terstappen, L. W. M. M. (2002). A sample preparation

and analysis system for identification of circulating tumor cells. *Journal of Clinical Ligand Assay*, 25(1), 104–110.

- Kallergi, G., Papadaki, M. A., Politaki, E., Mavroudis, D., Georgoulas, V., & Agelaki, S. (2011). Epithelial to mesenchymal transition markers expressed in circulating tumour cells of early and metastatic breast cancer patients. *Breast Cancer Research : BCR*, 13(3). <https://doi.org/10.1186/BCR2896>
- Kavan, S., Kruse, T. A., Vogsen, M., Hildebrandt, M. G., & Thomassen, M. (2022). Heterogeneity and tumor evolution reflected in liquid biopsy in metastatic breast cancer patients: a review. *Cancer and Metastasis Reviews* 2022, 1–14. <https://doi.org/10.1007/S10555-022-10023-9>
- Khan, M. S., Kirkwood, A. A., Tsigani, T., Lowe, H., Goldstein, R., Hartley, J. A., Caplin, M. E., & Meyer, T. (2016). Early Changes in Circulating Tumor Cells Are Associated with Response and Survival Following Treatment of Metastatic Neuroendocrine Neoplasms. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 22(1), 79–85. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-1008>
- Kim, J., Cho, H., Han, S. I., & Han, K. H. (2016). Single-Cell Isolation of Circulating Tumor Cells from Whole Blood by Lateral Magnetophoretic Microseparation and Microfluidic Dispensing. *Analytical Chemistry*, 88(9), 4857–4863. https://doi.org/10.1021/ACS.ANALCHEM.6B00570/SUPPL_FILE/AC6B00570_SI_002.AVI
- Kodama, H., Murata, S., Ishida, M., Yamamoto, H., Yamaguchi, T., Kaida, S., Miyake, T., Takebayashi, K., Kushima, R., & Tani, M. (2016). Prognostic impact of CD44-positive cancer stem-like cells at the invasive front of gastric cancer. *British Journal of Cancer* 2017 116:2, 116(2), 186–194. <https://doi.org/10.1038/bjc.2016.401>
- Kushida, A., Yamato, M., Isoi, Y., Kikuchi, A., & Okano, T. (2005). A noninvasive transfer system for polarized renal tubule epithelial cell sheets using temperature-responsive culture dishes. *European Cells & Materials*, 10, 23–30. <https://doi.org/10.22203/ECM.V010A03>
- Lapin, M., Tjensvoll, K., Oltedal, S., Buhl, T., Gilje, B., Smaaland, R., & Nordgård, O. (2016). MINDEC-An Enhanced Negative Depletion Strategy for Circulating Tumour Cell Enrichment. *Scientific Reports* 2016 6:1, 6(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/srep28929>
- Lara, O., Tong, X., Zborowski, M., & Chalmers, J. J. (2004). Enrichment of rare cancer cells through depletion of normal cells using density and flow-through, immunomagnetic cell separation. *Experimental Hematology*, 32(10), 891–904. <https://doi.org/10.1016/J.EXPHEM.2004.07.007>

- Li, F., Xu, H., Sun, P., Hu, Z., & Aguilar, Z. P. (2019). Size effects of magnetic beads in circulating tumour cells magnetic capture based on streptavidin–biotin complexation. *IET Nanobiotechnology*, *13*(1), 6–11. <https://doi.org/10.1049/IET-NBT.2018.5104>
- Li, J., Lykotrafitis, G., Dao, M., & Suresh, S. (2007). Cytoskeletal dynamics of human erythrocyte. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*(12), 4937–4942. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0700257104>
- Li, S., Chen, N., Zhang, Z., & Wang, Y. (2013). Endonuclease-responsive aptamer-functionalized hydrogel coating for sequential catch and release of cancer cells. *Biomaterials*, *34*(2), 460–469. <https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2012.09.040>
- Li, X., Li, Y., Shao, W., Li, Z., Zhao, R., & Ye, Z. (2020). Strategies for enrichment of circulating tumor cells. *Translational Cancer Research*, *9*(3), 2012–2025. <https://doi.org/10.21037/TCR.2020.01.17>
- Li, Y. M., Xu, S. C., Li, J., Han, K. Q., Pi, H. F., Zheng, L., Zuo, G. H., Huang, X. B., Li, H. Y., Zhao, H. Z., Yu, Z. P., Zhou, Z., & Liang, P. (2013). Epithelial–mesenchymal transition markers expressed in circulating tumor cells in hepatocellular carcinoma patients with different stages of disease. *Cell Death & Disease* *2013* *4:10*, *4*(10), e831–e831. <https://doi.org/10.1038/cddis.2013.347>
- Lim, S. bin, di Lee, W., Vasudevan, J., Lim, W. T., & Lim, C. T. (2019). Liquid biopsy: one cell at a time. *Npj Precision Oncology*, *3*(1). <https://doi.org/10.1038/S41698-019-0095-0>
- Lim, S. bin, Yeo, T., Lee, W. di, Bhagat, A. A. S., Tan, S. J., Tan, D. S. W., Lim, W. T., & Lim, C. T. (2019). Addressing cellular heterogeneity in tumor and circulation for refined prognostication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *116*(36), 17957–17962. https://doi.org/10.1073/PNAS.1907904116/SUPPL_FILE/PNAS.1907904116.SAPP.PDF
- Lin, D., Shen, L., Luo, M., Zhang, K., Li, J., Yang, Q., Zhu, F., Zhou, D., Zheng, S., Chen, Y., & Zhou, J. (2021). Circulating tumor cells: biology and clinical significance. *Signal Transduction and Targeted Therapy* *2021* *6:1*, *6*(1), 1–24. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00817-8>
- Liu, J., Lian, J., Chen, Y., Zhao, X., Du, C. Z., Xu, Y., Hu, H., Rao, H., & Hong, X. (2021). Circulating Tumor Cells (CTCs): A Unique Model of Cancer Metastases and Non-invasive Biomarkers of Therapeutic Response. *Frontiers in Genetics*, *12*, 1552. <https://doi.org/10.3389/FGENE.2021.734595/BIBTEX>
- Liu, X., Taftaf, R., Kawaguchi, M., Chang, Y. F., Chen, W., Entenberg, D., Zhang, Y., Gerratana, L., Huang, S., Patel, D. B., Tsui, E., Adorno-Cruz, V., Chirieleison, S. M., Cao, Y., Harney, A. S., Patel, S., Patsialou, A., Shen, Y., Avril, S., ... Liu, H. (2019). Homophilic CD44 interactions mediate tumor cell aggregation and polyclonal metastasis in patient-derived breast cancer models. *Cancer Discovery*, *9*(1), 96–113.

<https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-18-0065/333338/AM/HOMOPHILIC-CD44-INTERACTIONS-MEDIATE-TUMOR-CELL>

- Liu, Y., Li, R., Zhang, L., & Guo, S. (2022). Nanomaterial-Based Immunocapture Platforms for the Recognition, Isolation, and Detection of Circulating Tumor Cells. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, *10*, 329. <https://doi.org/10.3389/FBIOE.2022.850241/BIBTEX>
- Lohr, J. G., Kim, S., Gould, J., Knoechel, B., Drier, Y., Cotton, M. J., Gray, D., Birrer, N., Wong, B., Ha, G., Zhang, C. Z., Guo, G., Meyerson, M., Yee, A. J., Boehm, J. S., Raje, N., & Golub, T. R. (2016). Genetic interrogation of circulating multiple myeloma cells at single-cell resolution. *Science Translational Medicine*, *8*(363). <https://doi.org/10.1126/SCITRANSLMED.AAC7037>
- Mani, S. A., Guo, W., Liao, M. J., Eaton, E. N., Ayyanan, A., Zhou, A. Y., Brooks, M., Reinhard, F., Zhang, C. C., Shipitsin, M., Campbell, L. L., Polyak, K., Brisken, C., Yang, J., & Weinberg, R. A. (2008). The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell*, *133*(4), 704–715. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2008.03.027>
- Ménard, S., Pupa, S. M., Campiglio M., ja Tagliabue E. (2003) *Oncogene*, *22*, 6570-6578
- Miyamoto, D. T., Zheng, Y., Wittner, B. S., Lee, R. J., Zhu, H., Broderick, K. T., Desai, R., Fox, D. B., Brannigan, B. W., Trautwein, J., Arora, K. S., Desai, N., Dahl, D. M., Sequist, L. v., Smith, M. R., Kapur, R., Wu, C. L., Shioda, T., Ramaswamy, S., ... Haber, D. A. (2015). RNA-Seq of single prostate CTCs implicates noncanonical Wnt signaling in antiandrogen resistance. *Science (New York, N.Y.)*, *349*(6254), 1351–1356. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAB0917>
- Moasser, M. M. (2007) *Oncogene*, *26*, 6469-6487
- Morel, A. P., Lièvre, M., Thomas, C., Hinkal, G., Ansieau, S., & Puisieux, A. (2008). Generation of breast cancer stem cells through epithelial-mesenchymal transition. *PLoS One*, *3*(8). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0002888>
- Musgrove, E. A., Caldon, C. E., Barraclough, J., Stone, A., & Sutherland, R. L. (2011). Cyclin D as a therapeutic target in cancer. *Nature Reviews. Cancer*, *11*(8), 558–572. <https://doi.org/10.1038/NRC3090>
- Nagrath, S., Sequist, L. v., Maheswaran, S., Bell, D. W., Irimia, D., Utkus, L., Smith, M. R., Kwak, E. L., Digumarthy, S., Muzikansky, A., Ryan, P., Balis, U. J., Tompkins, R. G., Haber, D. A., & Toner, M. (2007). Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology. *Nature*, *450*(7173), 1235–1239. <https://doi.org/10.1038/NATURE06385>
- Pachmann, K., Camara, O., Kavallaris, A., Krauspe, S., Malarski, N., Gajda, M., Kroll, T., Jörke, C., Hammer, U., Altendorf-Hofmann, A., Rabenstein, C., Pachmann, U., Runnebaum, I., & Höffken, K. (2008). Monitoring the response of circulating epithelial tumor cells to adjuvant chemotherapy in breast cancer allows

- detection of patients at risk of early relapse. *Journal of Clinical Oncology*, 26(8), 1208–1215.
<https://doi.org/10.1200/JCO.2007.13.6523>
- Palmese, L. L., Thapa, R. K., Sullivan, M. O., & Kiick, K. L. (2019). Hybrid hydrogels for biomedical applications. *Current Opinion in Chemical Engineering*, 24, 143–157. <https://doi.org/10.1016/J.COACHE.2019.02.010>
- Patil, S. (2021). CD44 Sorted Cells Have an Augmented Potential for Proliferation, Epithelial-Mesenchymal Transition, Stemness, and a Predominantly Inflammatory Cytokine and Angiogenic Secretome. *Current Issues in Molecular Biology*, 43(1), 423–433. <https://doi.org/10.3390/CIMB43010034>
- Paulus, J. M. (1975). Platelet size in man. *Blood*, 46(3), 321–336.
<https://doi.org/10.1182/BLOOD.V46.3.321.321>
- Peppas, N. A., Hilt, J. Z., Khademhosseini, A., & Langer, R. (2006). Hydrogels in Biology and Medicine: From Molecular Principles to Bionanotechnology. *Advanced Materials*, 18(11), 1345–1360.
<https://doi.org/10.1002/ADMA.200501612>
- Pitkaniemi, J., Malila, N., Tanskanen, T., Degerlund, H., Heikkinen, S., & Seppä, K. (2021). *Syöpä 2019 Tilastoraportti Suomen syöpätilanteesta Syöpäjärjestöjen epidemiologinen tutkimuslaitos*.
- Po, J. W., Roohullah, A., Lynch, D., DeFazio, A., Harrison, M., Harnett, P. R., Kennedy, C., de Souza, P., & Becker, T. M. (2018). Improved ovarian cancer EMT-CTC isolation by immunomagnetic targeting of epithelial EpCAM and mesenchymal N-cadherin. *Journal of Circulating Biomarkers*, 7.
<https://doi.org/10.1177/1849454418782617>
- Racila, E., Euhus, D., Weiss, A. J., Rao, C., McConnell, J., Terstappen, L. W. M. M., & Uhr, J. W. (1998). Detection and characterization of carcinoma cells in the blood. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(8), 4589. <https://doi.org/10.1073/PNAS.95.8.4589>
- Ramalingam, N., Lee, Y. F., Szpankowski, L., Leyrat, A., Fowler, B., Tan, J., Lu, C. T., Angeles, N. D., Sanada, C., Greene, C., Hukari, K., Wu, A., Yap, Y.-S., West, J., & Bhagat, A. A. (2017). Abstract 2923: Label-free enrichment and integrated full-length mRNA transcriptome analysis of single live circulating tumor cells from breast cancer patients. *Cancer Research*, 77(13_Supplement), 2923–2923.
<https://doi.org/10.1158/1538-7445.AM2017-2923>
- Reeh, M., Effenberger, K. E., Koenig, A. M., Riethdorf, S., Eichstädt, D., Vettorazzi, E., Uzunoglu, F. G., Vashist, Y. K., Izbicki, J. R., Pantel, K., & Bockhorn, M. (2015). Circulating Tumor Cells as a Biomarker for Preoperative Prognostic Staging in Patients With Esophageal Cancer. *Annals of Surgery*, 261(6), 1124–1130. <https://doi.org/10.1097/SLA.0000000000001130>

- Ritz, J., Pesando, J. M., Notis-McConarty, J., Clavell, L. A., Sallan, S. E., & Schlossman, S. F. (1981). Use of monoclonal antibodies as diagnostic and therapeutic reagents in acute lymphoblastic leukemia. *Cancer research*, 41(11 Pt 2), 4771–4775.
- Sarkar, S., Horn, G., Moulton, K., Oza, A., Byler, S., Kokolus, S., & Longacre, M. (2013). Cancer Development, Progression, and Therapy: An Epigenetic Overview. *OPEN ACCESS Int. J. Mol. Sci*, 14, 14. <https://doi.org/10.3390/ijms141021087>
- Satelli, A., Batth, I., Brownlee, Z., Mitra, A., Zhou, S., Noh, H., Rojas, C. R., Li, H., Meng, Q. H., & Li, S. (2017). EMT circulating tumor cells detected by cell-surface vimentin are associated with prostate cancer progression. *Oncotarget*, 8(30), 49329–49337. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.17632>
- Satelli, A., Batth, I. S., Brownlee, Z., Rojas, C., Meng, Q. H., Kopetz, S., & Li, S. (2016). Potential role of nuclear PD-L1 expression in cell-surface vimentin positive circulating tumor cells as a prognostic marker in cancer patients. *Scientific Reports*, 6. <https://doi.org/10.1038/SREP28910>
- Satelli, A., Brownlee, Z., Mitra, A., Meng, Q. H., & Li, S. (2015). Circulating tumor cell enumeration using a combination of EpCAM and Cell-surface vimentin based methods for monitoring breast cancer therapeutic response. *Clinical Chemistry*, 61(1), 259. <https://doi.org/10.1373/CLINCHEM.2014.228122>
- Scharpenseel, H., Hanssen, A., Loges, S., Mohme, M., Bernreuther, C., Peine, S., Lamszus, K., Goy, Y., Petersen, C., Westphal, M., Glatzel, M., Riethdorf, S., Pantel, K., & Wikman, H. (2019). EGFR and HER3 expression in circulating tumor cells and tumor tissue from non-small cell lung cancer patients. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/S41598-019-43678-6>
- Schuster, E., Taftaf, R., Reduzzi, C., Albert, M. K., Romero-Calvo, I., & Liu, H. (2021). Better together: circulating tumor cell clustering in metastatic cancer. *Trends in Cancer*, 7(11), 1020–1032. <https://doi.org/10.1016/J.TRECAN.2021.07.001>
- Sharma, S., Zhuang, R., Long, M., Pavlovic, M., Kang, Y., Ilyas, A., & Asghar, W. (2018). Circulating Tumor Cell Isolation, Culture, and Downstream Molecular Analysis. *Biotechnology Advances*, 36(4), 1063. <https://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2018.03.007>
- Shen, Q., Xu, L., Zhao, L., Wu, D., Fan, Y., Zhou, Y., Ouyang, W. H., Xu, X., Zhang, Z., Song, M., Lee, T., Garcia, M. A., Xiong, B., Hou, S., Tseng, H. R., & Fang, X. (2013). Specific Capture and Release of Circulating Tumor Cells Using Aptamer-Modified Nanosubstrates. *Advanced Materials*, 25(16), 2368–2373. <https://doi.org/10.1002/ADMA.201300082>
- Shen, Z., Wu, A., & Chen, X. (2017). Current Detection Technologies of Circulating Tumor Cells. *Chemical Society Reviews*, 46(8), 2038. <https://doi.org/10.1039/C6CS00803H>

- Sheng, W., Ogunwobi, O. O., Chen, T., Zhang, J., George, T. J., Liu, C., & Fan, Z. H. (2014). Capture, release and culture of circulating tumor cells from pancreatic cancer patients using an enhanced mixing chip. *Lab on a Chip*, 14(1), 89–98. <https://doi.org/10.1039/C3LC51017D>
- Siiman, O., Burshteyn, A., & Insausti, M. E. (2001). Covalently Bound Antibody on Polystyrene Latex Beads: Formation, Stability, and Use in Analyses of White Blood Cell Populations. *Journal of Colloid and Interface Science*, 234(1), 44–58. <https://doi.org/10.1006/JCIS.2000.7279>
- Singh, B., Arora, S., D'Souza, A., Kale, N., Aland, G., Bharde, A., Quadir, M., Calderón, M., Chaturvedi, P., & Khandare, J. (2021). Chemo-specific designs for the enumeration of circulating tumor cells: advances in liquid biopsy. *Journal of Materials Chemistry. B*, 9(13), 2946–2978. <https://doi.org/10.1039/D0TB02574G>
- Sites, D.P., et al. (1976). *Basic & Clinical Immunology*. Lange Medical Publication, Los Altos, CA.
- Smerage, J. B., Barlow, W. E., Hortobagyi, G. N., Winer, E. P., Leyland-Jones, B., Srkalovic, G., Tejwani, S., Schott, A. F., O'Rourke, M. A., Lew, D. L., Doyle, G. v., Gralow, J. R., Livingston, R. B., & Hayes, D. F. (2014). Circulating tumor cells and response to chemotherapy in metastatic breast cancer: SWOG S0500. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 32(31), 3483–3489. <https://doi.org/10.1200/JCO.2014.56.2561>
- Spizzo, G., Fong, D., Wurm, M., Ensinger, C., Obrist, P., Hofer, C., Mazzoleni, G., Gastl, G., & Went, P. (2011). EpCAM expression in primary tumour tissues and metastases: an immunohistochemical analysis. *Journal of Clinical Pathology*, 64(5), 415–420. <https://doi.org/10.1136/JCP.2011.090274>
- Sun, T. (2009) *Atlas of Hematologic Neoplasms*. USA: Springer s. 3-31
- Syövän yleisyys - THL. (n.d.). Retrieved March 25, 2022, from <https://thl.fi/fi/web/kansantaudit/syopa/syovan-yleisyys>
- ThermoFisher Scientific. Antibody Labeling and Immunization Sites. [Verkkodokumentti] Thermo Fisher Scientific -verkkosivut. Päivitetty 29.5.2022 klo 10.34. [Viitattu 29.5.2022] Saatavilla: <https://www.thermofisher.com/fi/en/home/life-science/antibodies/antibodies-learning-center/antibodies-resource-library/antibody-methods/antibody-labeling-immobilization-sites.html>
- Thiviyanathan, V., & Gorenstein, D. G. (2012). Aptamers and the Next Generation of Diagnostic Reagents. *Proteomics. Clinical Applications*, 6(0), 563. <https://doi.org/10.1002/PRCA.201200042>
- Tiffon, C. (2018). The Impact of Nutrition and Environmental Epigenetics on Human Health and Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(11). <https://doi.org/10.3390/IJMS19113425>

- Tirosh, I., Izar, B., Prakadan, S. M., Wadsworth, M. H., Treacy, D., Trombetta, J. J., Rotem, A., Rodman, C., Lian, C., Murphy, G., Fallahi-Sichani, M., Dutton-Regester, K., Lin, J. R., Cohen, O., Shah, P., Lu, D., Genshaft, A. S., Hughes, T. K., Ziegler, C. G. K., ... Garraway, L. A. (2016). Dissecting the multicellular ecosystem of metastatic melanoma by single-cell RNA-seq. *Science (New York, N.Y.)*, *352*(6282), 189. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAD0501>
- Todoroki, K., Ogasawara, S., Akiba, J., Nakayama, M., Naito, Y., Seki, N., Kusakawa, J., & Yano, H. (2016). CD44v3+/CD24- cells possess cancer stem cell-like properties in human oral squamous cell carcinoma. *International Journal of Oncology*, *48*(1), 99–109. <https://doi.org/10.3892/IJO.2015.3261>
- Tuerk, C., & Gold, L. (1990). Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment: RNA Ligands to Bacteriophage T4 DNA Polymerase. *Science*, *249*(4968), 505–510. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.2200121>
- Ulrich, H., Trujillo, C., Nery, A., Alves, J., Majumder, P., Resende, R., & Martins, A. (2006). DNA and RNA Aptamers: From Tools for Basic Research Towards Therapeutic Applications. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, *9*(8), 619–632. <https://doi.org/10.2174/138620706778249695>
- Vasseur, A., Kiavue, N., Bidard, F. C., Pierga, J. Y., & Cabel, L. (2021). Clinical utility of circulating tumor cells: an update. *Molecular Oncology*, *15*(6), 1647. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12869>
- Wang, J., Wang, Q., Luo, Y., Gao, T., Zhao, Y., & Pei, R. (2019). In vitro selection of ssDNA aptamers that can specifically recognize and differentiate riboflavin and its derivative FAD. *Talanta*, *204*, 424–430. <https://doi.org/10.1016/J.TALANTA.2019.06.039>
- Wang, L., Balasubramanian, P., Chen, A. P., Kummar, S., Evrard, Y. A., & Kinders, R. J. (2016). Promise and limits of the CellSearch platform for evaluating pharmacodynamics in circulating tumor cells. *Seminars in Oncology*, *43*(4), 464–475. <https://doi.org/10.1053/J.SEMINONCOL.2016.06.004>
- Wang, Z., Wu, Z., Sun, N., Cao, Y., Cai, X., Yuan, F., Zou, H., Xing, C., & Pei, R. (2021). Antifouling hydrogel-coated magnetic nanoparticles for selective isolation and recovery of circulating tumor cells. *Journal of Materials Chemistry B*, *9*(3), 677–682. <https://doi.org/10.1039/D0TB02380A>
- Wei, T., Zhang, X., Zhang, Q., Yang, J., Chen, Q., Wang, J., Li, X., Chen, J., Ma, T., Li, G., Gao, S., Lou, J., Que, R., Wang, Y., Dang, X., Zheng, L., Liang, T., & Bai, X. (2019). Vimentin-positive circulating tumor cells as a biomarker for diagnosis and treatment monitoring in patients with pancreatic cancer. *Cancer Letters*, *452*, 237–243. <https://doi.org/10.1016/J.CANLET.2019.03.009>
- Weis, S. M., & Cheresch, D. A. (2011). Tumor angiogenesis: molecular pathways and therapeutic targets. *Nature Medicine*, *17*(11), 1359–1370. <https://doi.org/10.1038/NM.2537>

- Went, P. T., Lugli, A., Meier, S., Bundi, M., Mirlacher, M., Sauter, G., & Dirnhofer, S. (2004). Frequent EpCam protein expression in human carcinomas. *Human Pathology*, *35*(1), 122–128.
<https://doi.org/10.1016/J.HUMPATH.2003.08.026>
- Wiktionary, The Free Dictionary. Immunoaffinity. [Verkkodokumentti] Wiktionary, The Free Dictionary. Päivitetty 28.9.2019. [Viitattu 27.5.2022]
 Saatavilla: <https://en.wiktionary.org/w/index.php?title=immunoaffinity&oldid=54353574>.
- Woo, D., & Yu, M. (2018). Circulating tumor cells as “liquid biopsies” to understand cancer metastasis. *Translational Research : The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, *201*, 128–135.
<https://doi.org/10.1016/J.TRSL.2018.07.003>
- Wu, S., Liu, S., Liu, Z., Huang, J., Pu, X., Li, J., Yang, D., Deng, H., Yang, N., & Xu, J. (2015). Classification of Circulating Tumor Cells by Epithelial-Mesenchymal Transition Markers. *PLoS ONE*, *10*(4), 123976.
<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0123976>
- Yeo, T., Tan, S. J., Lim, C. L., Lau, D. P. X., Chua, Y. W., Krisna, S. S., Iyer, G., Tan, G. S., Lim, T. K. H., Tan, D. S. W., Lim, W. T., & Lim, C. T. (2016). Microfluidic enrichment for the single cell analysis of circulating tumor cells. *Scientific Reports* *2016 6:1*, *6*(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/srep22076>
- Yoon, H. J., Kim, T. H., Zhang, Z., Azizi, E., Pham, T. M., Paoletti, C., Lin, J., Ramnath, N., Wicha, M. S., Hayes, D. F., Simeone, D. M., & Nagrath, S. (2013). Sensitive capture of circulating tumour cells by functionalised graphene oxide nanosheets. *Nature Nanotechnology*, *8*(10), 735.
<https://doi.org/10.1038/NNANO.2013.194>
- Zargaran, M., Baghaei, F., & Moghimbeigi, A. (2018). Comparative study of β -catenin and CD44 immunoexpression in oral lichen planus and squamous cell carcinoma. *International Journal of Dermatology*, *57*(7), 794–798. <https://doi.org/10.1111/IJD.14007>
- Zhang, Z., Chen, N., Li, S., Battig, M. R., & Wang, Y. (2012). Programmable hydrogels for controlled cell catch and release using hybridized aptamers and complementary sequences. *Journal of the American Chemical Society*, *134*(38), 15716–15719. <https://doi.org/10.1021/JA307717W>
- Zhao, X. H., Wang, Z. R., Chen, C. L., Di, L., Bi, Z. F., Li, Z. H., & Liu, Y. M. (2019). Molecular detection of epithelial-mesenchymal transition markers in circulating tumor cells from pancreatic cancer patients: Potential role in clinical practice. *World Journal of Gastroenterology*, *25*(1), 138–150.
<https://doi.org/10.3748/WJG.V25.I1.138>
- Zheng, Q., Iqbal, S. M., & Wan, Y. (2013). Cell detachment: Post-isolation challenges. *Biotechnology Advances*, *31*(8), 1664–1675. <https://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2013.08.013>

Ziółkowski, R., Jarczevska, M., Górski, Ł., & Malinowska, E. (2021). From Small Molecules toward Whole Cells Detection: Application of Electrochemical Aptasensors in Modern Medical Diagnostics. *Sensors 2021*, Vol. 21, Page 724, 21(3), 724. <https://doi.org/10.3390/S21030724>

Zou, D., & Cui, D. (2018). Advances in isolation and detection of circulating tumor cells based on microfluidics. *Cancer Biology & Medicine*, 15(4), 335. <https://doi.org/10.20892/J.ISSN.2095-3941.2018.0256>