



**TURUN
YLIOPISTO**

Matemaattis-luonnontieteellinen
tiedekunta

Kiertävien syöpäsolujen analyysiteknologiat nestebiopsiassa

Laura Laine

Detektioteknologian tutkimusryhmä

LuK-tutkielma

Laajuus: 6 op

1.3.2026

Turku

Turun yliopiston laatujärjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu
Turnitin OriginalityCheck -järjestelmällä.

LuK-tutkielma

Pääaine: Kemia

Tekijä: Laura Laine

Otsikko: Kiertävien syöpäsolujen analyysitekniikat nestebiopsiassa

Ohjaaja(t): Kari Kopra

Sivumäärä: 22 sivua

Päivämäärä: 1.3.2026

Syöpä on merkittävä maailmanlaajuinen terveyshaaste, jonka hoidossa varhainen diagnostiikka ja taudin dynaaminen seuranta ovat ratkaisevassa asemassa. Vaikka perinteinen kudoksiopsia on edelleen diagnostiikan standardi, sen kajoavuus ja staattisuus rajoittavat hoidon optimointia. Nestebiopsia tarjoaa minimaalisesti kajoavan tavan analysoida kasvaimesta irronneita biomarkkereita suoraan kehon nesteistä, mikä mahdollistaa taudin etenemisen reaaliaikaisen seurannan.

Nestebiopsian keskiössä ovat kiertävät syöpäsolut (*engl.* circulating tumor cell, CTC), jotka edustavat verenkierrossa esiintyviä ehjiä syöpäsoluja. Toisin kuin solunulkoiset DNA-fragmentit, CTC:t kantavat ainutlaatuisia tietoja kasvaimen genomista ja fenotyypistä, toimien suorana biologisena linkkinä primaarikasvaimen ja etäpesäkkeiden välillä. CTC:t irtoavat kasvaimesta ja selviytyvät verenkierrossa osana leviämisprosessia ja niiden määrä korreloi suoraan taudin etenemisen sekä etäpesäkkeiden muodostumisen kanssa. Kliinisesti CTC-analyysi tarjoaa mahdollisuuksia ennusteen arviointiin, ja hoidon tehokkuuden sekä kasvaimen uusiutumisen seurantaan. Solujen määrän dynaaminen seuranta mahdollistaa hoitovasteen arvioinnin ja mahdollisten resistenssimekanismien havaitsemisen huomattavasti perinteisiä kuvantamismenetelmiä aikaisemmin. Tämä auttaa siirtymään kohti yksilöllisempää syövän hoitoa ja lopulta laskee kustannuksia.

CTC:iden tunnistamiseksi ja karakterisoimiseksi on kehitetty erilaisia teknisiä lähestymistapoja, jotka käsittävät tyypillisesti rikastus- ja tunnistusvaiheen. Immunologiset menetelmät, kuten CellSearch-järjestelmät, hyödyntävät spesifisiä pintaproteiineja, kuten EpCAM-molekyylejä solujen rikastamiseen. Molekyylibiologiset menetelmät, kuten digitaalinen PCR (*engl.* digital polymerase chain reaction, dPCR) ja seuraavan sukupolven sekvensointi (*engl.* next-generation sequencing, NGS), mahdollistavat puolestaan CTC:iden yksityiskohtaisen geneettisen profiloinnin. Kehittyvät teknologiat, kuten pisaramikro fluidistiikka ja tekoälyavusteinen kuvantaminen pyrkivät ratkaisemaan solujen harvinaisuuteen liittyviä haasteita mahdollistamalla tarkan yksisoluanalyysin ja automaattisen tunnistuksen.

Vaikka teknologinen edistys on parantanut havaitsemisherkkyyttä, laboratoriostandardoinnin puute ja biologinen vaihtelu vaikuttavat edelleen tulosten vertailtavuuteen. Tällä hetkellä nestebiopsia ei korvaa kudoksiopsiaa kokonaan, vaan menetelmät täydentävät toisiaan tarjoten kattavamman kuvan kasvaimen biologiasta läpi koko hoitopolun. Tutkielmassa käydään läpi keskeisimmät CTC-solujen rikastus- ja tunnistusmenetelmät, tarkastellaan kehittyvien teknologioiden mahdollisuuksia ylittää nykyiset analyttiset rajoitteet sekä arvioidaan nestebiopsian kliinistä merkitystä ja haasteita osana yksilöllistä syövän hoitoa.

Avainsanat: nestebiopsia, kiertävät syöpäsolut, yksilöllinen lääketiede, yksisoluanalyysi

Tutkielman valmistelussa on hyödynnetty Google Gemini 3 Pro -kielimallia. Tekoälyä on käytetty kirjoitusprosessin tukena tekstin rakenteen suunnittelussa, hakusanojen ideoinnissa sekä kieliasun viimeistelyssä.

1	JOHDANTO.....	6
2	NESTEBIOPSIA SYÖVÄN DIAGNOSTIIKASSA	7
2.1	Kiertävät syöpäsolut.....	8
2.2	CTC-analytiikan kliininen merkitys ja soveltaminen.....	9
3	CTC:IDEN ANALYTIikka JA HAVAITSEMIS-MENETELMÄT	11
3.1	Immunologiset menetelmät CTC:iden tunnistuksessa ja eristyksessä.....	12
3.2	Molekyylibiologiset analyysit	14
3.3	Kehittyvät analyysiteknologiat.....	16
4	CTC-PERUSTAISEN NESTEBIOPSIAN HAASTEET JA TULEVAISUUS	18
5	YHTEENVETO JA JOHTOPÄÄTÖKSET.....	19
6	VIITTEET	21

Lyhenteet

AI	Tekoäly (<i>engl.</i> Artificial intelligence)
ALDH1	Aldehydidehydrogenaasi 1 (<i>engl.</i> Aldehyde dehydrogenase 1)
cfDNA	Kiertävä vapaa DNA (<i>engl.</i> Circulating cell-free DNA)
circRNA	Sirkulaarinen RNA (<i>engl.</i> Circular RNA)
cRNA	Kiertävä-RNA (<i>engl.</i> Circulating RNA)
CTC	Kiertävä syöpäsolu (<i>engl.</i> Circulating tumor cell)
ctDNA	Kiertävä kasvain-DNA (<i>engl.</i> Circulating tumor DNA)
dPCR	Digitaalinen polymeerasiketjureaktio (<i>engl.</i> Digital polymerase chain reaction)
EpCAM	Epiteelisolujen adheesiomolekyyli (<i>engl.</i> Epithelial cell adhesion molecule)
FDA	Yhdysvaltain elintarvike- ja lääkevirasto (<i>engl.</i> Food and drug administration)
HER2	Ihmisen epidermaalinen kasvutekijäreseptori 2 (<i>engl.</i> Human epidermal growth factor receptor 2)
LAMP	Silmukka välitteinen isoterminen monistus (<i>engl.</i> Loop-mediated isothermal amplification)
lncRNA	Pitkä ei-koodaava RNA (<i>engl.</i> Long non-coding RNA)
MDA	Moninkertainen syrjäytysmonistus (<i>engl.</i> Multiple displacement amplification)
miRNA	Mikro-RNA (<i>engl.</i> microRNA)
MRD	Minimaalinen jäännöstauti (<i>engl.</i> Minimal residual disease)

mRNA	Lähettilä-RNA (<i>engl.</i> Messenger RNA)
ncRNA	Ei-koodaava RNA (<i>engl.</i> Non-coding RNA)
NGS	Seuraavan sukupolven sekvensointi (<i>engl.</i> Next-generation sequencing)
PCR	Polymeraasiketjureaktio (<i>engl.</i> Polymerase chain reaction)
PFS	Etenemisvapaa elinaika (<i>engl.</i> Progression-free survival)
PSMA	Prostataspesifinen kalvoantigeeni (<i>engl.</i> Prostate-specific membrane antigen)
RT-qPCR	Reaaliaikainen kvantitatiivinen polymeraasiketjureaktio (<i>engl.</i> Real-time quantitative polymerase chain reaction)
WGA	Koko genomin monistaminen (<i>engl.</i> Whole genome amplification)

1 JOHDANTO

Syöpä on edelleen yksi maailman yleisimmistä kuolinsyistä. Perinteinen koepalan otto eli biopsia on kasvaindiagnoosiin standardimenetelmä, mutta se on kajoava, voi aiheuttaa potilaalle komplikaatioita ja on toisinaan vaikea toteuttaa kasvaimen sijainnin vuoksi.¹ Syövän diagnosointi tapahtuu usein vasta oireiden ilmetessä, jolloin etäpesäkkeitä on saattanut jo muodostua. Koska kasvain ei ole staattinen tai biologisesti yhtenäinen, yksittäinen kudoksenäyte tarjoaa vain paikallisen tilannekuvan kasvaimesta.^{2,3} Näiden rajoitteiden vuoksi nestebiopsia on noussut lupaavaksi, vähemmän kajoavaksi vaihtoehdoksi.

Nestebiopsia mahdollistaa taudin dynaamisen seurannan ja hoidon tehokkuuden tarkkailun reaaliajassa. Kliinisesti se tarjoaa mahdollisuuden havaita hoidon epäonnistuminen tai syövän uusiutuminen huomattavasti perinteisiä menetelmiä aikaisemmin.^{1,3}

Nestebiopsia on menetelmä, jolla analysoidaan kasvaimesta peräisin olevaa materiaalia kehon nesteistä. Se käsittää useita komponentteja, kuten kiertävät syöpäsolut (*engl.* circulating tumor cell, CTC), kiertävä kasvain-DNA (*engl.* circulating tumor DNA, ctDNA), eksosomit, mikro-RNA (*engl.* microRNA, miRNA), kiertävä-RNA (*engl.* circulating RNA, cRNA), kasvainverihiutaleet ja kasvaimen endoteelisolut.² Toisin kuin ctDNA, joka koostuu solunulkoisista fragmenteista, CTC:t ovat ehjiä biologisia yksiköitä. Nämä solut edustavat suoraa linkkiä primaarikasvaimen ja metastaasien välillä, tarjoten tietoa sekä syövän genomiikasta että fenotyypistä.^{2,4} Eri komponenttien monipuolisuus tekee nestebiopsiasta tehokkaan työkalun kasvaimen heterogeenisyyden kartoittamiseen.

Vaikka nestebiopsian potentiaali on tunnistettu jo vuosikymmeniä sitten, sen laajamittainen kliininen soveltaminen on vaatinut merkittäviä teknologisia harppauksia. Suurin haaste CTC:iden analytiikassa on niiden äärimmäisen vähäinen määrä verenkierrossa.^{2,4} Ensimmäinen kriittinen vaihe on rikastus, jossa CTC:t erotetaan verinäytteen miljardeista taustasoluista hyödyntämällä joko niiden fysikaalisia ominaisuuksia, kuten kokoa ja sähkövarausta, tai biologisia ominaisuuksia. Rikastus on välttämätöntä, sillä CTC-solujen äärimmäinen harvinaisuus estää niiden suoran analysoinnin tavanomaisilla testimenetelmillä.

Toinen vaihe on solujen tunnistus ja karakterisointi, jossa varmistetaan eristettyjen solujen syöpäperäisyys ja analysoidaan niiden biologinen profiili. Tämä vaihe on kehittynyt perinteisestä immunovärijäyksestä ja fluoresenssimikroskopiasta kohti tarkkoja molekyyli-tason analyysejä, kuten yksisolusekvensointia ja epigenetiikan profilointia. Viimeaikainen kehitys mikrofluidistiikassa mahdollistaa näiden kahden vaiheen integroinnin yhdelle alustalle, mikä parantaa havaitsemisherkkyyttä ja mahdollistaa solujen dynaamisen tutkimisen niiden natiivitulassa.⁴ Samaan

aikaan tekoälyn ja koneoppimisen integraatio datan analysointiin tarjoaa uusia työkaluja monimutkaisten biomarkkeriprofiilien ja morfologisten piirteiden automaattiseen ja tarkempaan tulkintaan.²

Tämän tutkielman tavoitteena on muodostaa kokonaisvaltainen kuva nestebiopsian nykytilasta keskittyen erityisesti CTC:ihin ja kehittyviin analyysiteknologioihin. Tutkielmassa tarkastellaan, kuinka uudet menetelmät pyrkivät ylittämään CTC-analytiikan perinteiset rajoitteet ja miten nämä innovaatiot voidaan siirtää laboratoriosta osaksi potilaiden yksilöllistä hoitopolkua.

2 NESTEBIOPSIA SYÖVÄN DIAGNOSTIIKASSA

Kudosbiopsia on edelleen kasvainten diagnostiikassa standardimenetelmä, sillä sen etuina ovat korkea laboratoriostandardointi, hyvä toistettavuus, näytteiden vakaus ja suuri diagnostinen tarkkuus. Perinteisen kudosbiopsian ongelmana kuitenkin on, että se tarjoaa tietoa pääasiassa primaarikasvaimesta, ja sen ottaminen on kajoava toimenpide, joka voi aiheuttaa potilaalle kudosvaurioita. Lisäksi kudoksenäyte ei välttämättä kuvaa kasvaimen geneettistä heterogeenisuutta tai etäpesäkkeiden ominaisuuksia.⁵ Viimeaikaiset tutkimukset ovat osoittaneet, että 90% kiinteiden kasvainten aiheuttamista kuolemista johtuu etäpesäkkeistä.⁸ Nestebiopsian kehitys on kuitenkin tuonut uusia mahdollisuuksia kasvainten varhaiseen havaitsemiseen ja taudin etenemisen seurantaan. Nestebiopsiassa analysoidaan verenkierrossa kiertäviä biomarkkereita, kuten CTC:ita ja ctDNA:ta, jotka mahdollistavat kasvainten ei-invasiiviseen havaitsemisen ja taudin etenemisen seurannan.⁴

Nestebiopsiassa hyödynnetään myös ei-koodaavia RNA-molekyylejä (engl. non-coding RNA, ncRNA), jotka muodostavat laajan ja monimuotoisen ryhmän RNA:ita, joilla on muita solunsisäisiä tehtäviä kuin proteiinien koodaus. Mikro-RNA:t (engl. micro-RNA, miRNA) ovat pieniä yksijuosteisia RNA molekyylejä, jotka säätelevät geenien ilmentymistä transkription jälkeisellä tasolla. Ne sitoutuvat lähetti-RNA:han (engl. messenger-RNA, mRNA), heikentävät sen stabiilisuutta ja estävät siten proteiinisynteesiä. Pitkät ei-koodaavat RNA:t (engl. long non-coding RNA, lncRNA) säätelevät useita syövän kannalta keskeisiä transkriptiotekijöitä ja voivat osallistua kasvaimen kehittymiseen ja etenemiseen.⁷ Sirkulaariset RNA:t (engl. circular RNA, circRNA) muodostavat suljetun, rengasmaisesti sitoutuneen RNA-rakenteen, joka tekee niistä poikkeuksellisen stabiileja, koska niiltä puuttuvat vapaat 5'- ja 3'-päät. Näiden ominaisuuksien ansiosta circRNA:t kestävät hyvin entsyymaattista hajoamista ja voivat toimia joko onkogeneina tai kasvaimen estäjinä riippuen niiden säätelyreiteistä.¹

Biomarkkereiden yhdistäminen tarjoaa nestebiopsialle huomattavan potentiaalisen syövän varhaisdiagnostiikassa, ennusteen arvioinnissa, hoitovasteen seurannassa ja tekee siitä lupaavan

täydennyksen perinteiselle kudoksiopsialle. Tämä työ keskittyy erityisesti CTC:ihin, jotka ovat nousseet keskeisimpään rooliin nestebiopsian kehityksessä. Kasvainsolut vapautuvat syöpäpotilaiden vereen ja imusuoniin, ja niiden määrä korreloi etäpesäkkeiden määrän ja taudin etenemisen kanssa.⁶ CTC:iden heterogeenisuus selittää osaltaan potilaiden erilaisia hoitovasteita.

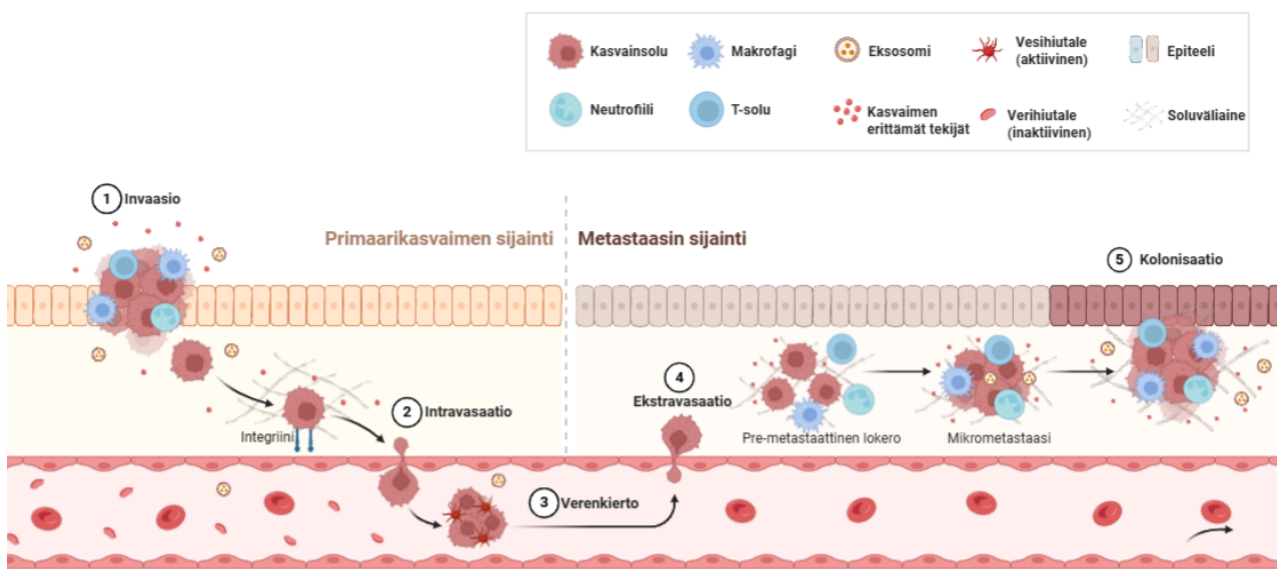
2.1 Kiertävät syöpäsolut

CTC:illä on keskeinen merkitys syövän varhaisessa diagnostiikassa, etäpesäkkeiden seurannassa, täsmälääketieteessä ja ennusteiden arvioinnissa. Ne ovat verenkierrossa kiertäviä kasvaimesta irronneita soluja, jotka säilyttävät ehjän tumen, nukleiinihapot ja proteiinit, ja edustavat siten metastaattisen kasvaimen klooneja. CTC:iden määrä korreloi usein taudin etenemisen ja etäpesäkkeiden määrän kanssa, ja niiden molekulaarinen heterogeenisuus selittää osaltaan eroja potilaiden hoitovasteissa.⁴

Tämän työn keskiössä olevat CTC:t eroavat ratkaisevasti muista nestebiopsian biomarkkereista siinä, että ne ovat kokonaisia, eläviä soluja. Siinä missä useimmat muut biomarkkerit, kuten ctDNA, ovat vain solujen vapauttamia molekyyliä tai niiden osia, CTC:t säilyttävät ehjät solurakenteet. Ne edustavat siten suoraan metastaattisen kasvaimen eläviä klooneja.¹

CTC:t mahdollistavat solutason analyysin, jota pelkkä DNA-analyysi ei mahdollista. CTC:itä pidetään yhtenä nestebiopsian informatiivisimmista biomarkkereista, sillä ne yhdistävät kasvaimen geneettisiä ja fenotyypisiä ominaisuuksia samanaikaisesti, mikä tekee niistä arvokkaan työkalun eikajoavassa syövän seurannassa ja hoidon kohdentamisessa.

CTC:iden määrällä ja heterogeenisyydellä on keskeinen rooli syövän diagnostiikassa ja yksilöllisessä lääketieteessä.⁴ CTC:t edustavat etäpesäkkeiden siemeniä ja syövän eteneminen primaarikasvaimesta etäpesäkkeiksi on monivaiheinen prosessi, jota kutsutaan etäpesäkekaskadiksi.¹ Tämä kaskadi sisältää solujen irtautumisen, tunkeutumisen verenkiertoon, selviytymisen siellä, sekä lopulta verenkierrosta poistumisen ja uuden pesäkkeen muodostamisen kohde-elimessä (Kuva 1).



Kuva 1. Metastaasikaskadin vaiheet. Prosessi alkaa primaarikasvaimen solujen invaasiolla (1) ja intravasaatiolla (2), jonka jälkeen CTC:t ovat verenkierrossa (3). Lopulta solut poistuvat verenkierrosta (4) ja muodostavat etäpesäkkeen (5). Kuva 1 on muokattu lähteestä [1]: julkaistu CC By-NC 4.0 -lisenssillä artikkelista *Liquid biopsy in cancer: current status, challenges and future prospects*, Ma, L., Guo, H., Zhao, Y. et al. *Signal Transduction and Targeted Therapy* 2024, (9), 336, doi.org/10.1038/s41392-024-02021-w. Copyright © 2024 The Author(s).

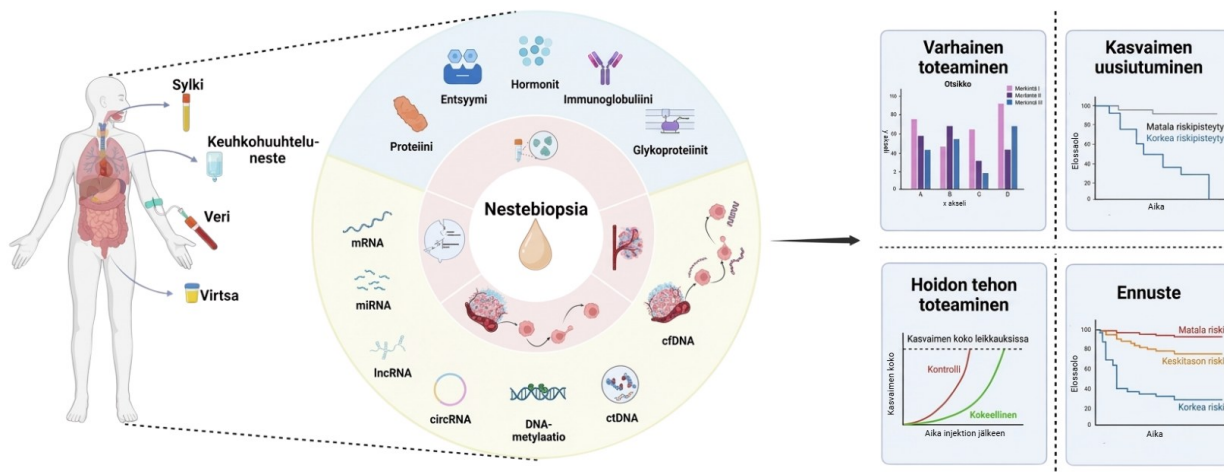
CTC:t heijastavat primaarikasvaimen ja etäpesäkkeiden heterogeenisyyttä ja tarjoavat siten kattavan kuvan taudin tilasta. Tämän vuoksi CTC:iden määrä on usein suoraan korrelaatiossa huonompaan ennusteeseen ja on tunnustettu riippumattomaksi prognostiseksi biomarkeriksi monissa syöväissä, kuten rinta-, eturauhas- ja paksusuolensyövässä.¹ CTC:iden analysointi mahdollistaa myös kasvaimen molekyyliprofiilin selvittämisen, mikä on tärkeää yksilöllisen hoidon valinnan kannalta. Toisin kuin pelkät DNA-fragmentit, CTC:t tarjoavat kattavan näkymän kasvaimen tilaan, sillä ne sisältävät tiedon solun genomista, transkriptomista sekä epigeneettisistä variaatioista. Tämä solutason tieto mahdollistaa paitsi herkemmin tehoavien lääkeaineiden valinnan, myös lääkeresistenssin kehittymisen seurannan reaaliajassa. CTC-klustereilla on huomattavasti suurempi etäpesäkepotentiaali verrattuna yksittäisiin CTC:ihin, mikä korreloi usein potilaan huonomman ennusteen kanssa. Nämä klusterit kykenevät selviytymään verenkierron haastavissa olosuhteissa yksittäisiä soluja tehokkaammin.¹

2.2 CTC-analytiikan kliininen merkitys ja soveltaminen

Toisin kuin staattinen kudosisiopia, CTC-analyysi mahdollistaa taudin seurannan reaaliajassa, mikä avaa uusia mahdollisuuksia potilaan hoitoon. Kliininen merkitys voidaan jakaa ennusteen arviointiin,

hoidon seurantaan ja yksilöllistettyyn lääketieteeseen. Nykyisessä kliinisessä rutiinissa nestebiopsiaa hyödynnetään erityisesti silloin, kun perinteistä kudossiopsiaa ei voida ottaa. Esimerkiksi verestä eristettävää ctDNA:ta käytetään jo rutiininomaisesti tiettyjen täsmälääkkeiden valinnassa ja resistenssin seurannassa.¹ Sen sijaan suurimmat lupaukset, kuten oireettomien henkilöiden varhainen syöpäseulonta ja leikkauksen jälkeinen minimaalisen jäännöstaudin (*engl.* Minimal Residual Disease, MRD) tunnistaminen rutiinina, ovat vielä pääosin laajoissa kliinisissä kokeissa validoitavana. Vahvin kliininen näyttö CTC:iden hyödyllisyydestä liittyy niiden määrään, sillä korkea CTC:iden määrä korreloi huonoon ennusteeseen.¹ Korkea CTC:iden lähtötaso ennen hoidon aloittamista liittyy merkittävästi lyhyempään etenemisvapaaseen elinaikaan (*engl.* progression free-survival, PFS). Koska CTC:t ovat dynaaminen merkkiaine, niiden määrän muutos hoidon aikana antaa tietoa hoidon tehokkuudesta. Jos CTC:iden määrä laskee merkittävästi hoidon aloittamisen jälkeen, se viittaa vahvasti hyvään hoitovasteeseen. Jos CTC:iden määrä pysyy korkeana tai nousee hoidon aikana, se on merkki hoitoresistenssistä tai taudin etenemisestä.⁹

Molekyyli-tason analyysimenetelmät mahdollistavat CTC:iden yksityiskohtaisen karakterisoinnin.² CTC:istä voidaan tunnistaa spesifisiä geneettisiä mutaatioita, jotka aiheuttavat lääkeresistenssiä. CTC-analyysi voi paljastaa sellaisia terapeuttisia kohteita, kuten spesifisiä pistemutaatioita tai proteiini-ekspressoita, joita ei havaita alkuperäisestä kudossiopsiasta.² Vaikka CTC:t ovat harvinaisia syövän varhaisessa vaiheessa, mikä rajoittaa niiden käyttöä seulonnassa, ne ovat erittäin hyödyllisiä MRD:n havaitsemisessa.¹ CTC:iden löytyminen osoittaa, että tauti on edelleen läsnä, mikä ennustaa uusiutumisen riskiä. Nestebiopsia kattaa koko potilaan hoitopolun aina varhaisesta seulonnasta ja diagnostiikasta hoidon reaaliaikaiseen seurantaan sekä resistenssimekanismien tunnistamiseen (kuva 2).^{1,3} Yleisin nestebiopsiassa käytetty matriisi on veri-plasma, sillä se on helposti saatavilla ja sisältää verenkierron kautta tietoa koko elimistön syöpätaakasta. Muita käytössä olevia tai tutkittavia näytetyyppejä ovat virtsa, aivoselkäydinneste, sylki ja pleuraneste. CTC-määrän mittaaminen verestä auttaa ennustamaan kokonaiselinaikaa, PFS:ää ja taudin etenemistä. Yhdysvaltain elintarvike- ja lääkevirasto (*engl.* food and drug administration) on hyväksynyt CellSearch-menetelmän CTC:iden määrän mittaamiseen potilailla, joilla on metastaatinen rinta-, eturauhas- tai paksusuolensyöpä, ja menetelmä sisältyy useisiin hoitosuosituksiin. Lääkevasteen ja resistenssin tunnistamiseksi tutkitaan yksittäisten solujen pinnan merkkiaineita ja menetelmiä validoidaan parhaillaan lääkevalintojen tueksi. Toiminnallinen diagnostiikka ja varhaisseulonta ovat tutkimusvaiheessa. Haasteena CTC:iden äärimmäinen harvinaisuus veressä etenkin varhaisvaiheessa ja eristystekniikoiden standardointi.^{1,3}



Kuva 2. Nesteopsian kliiniset sovelluskohteet ja biomarkkerityypit syövän hoidossa. Nesteopsiassa analysoidaan verestä ja muista ruumiinnesteistä eristettyä ctDNA:ta, CTC:itä ja eksosomeja hyödyntäen herkkiä menetelmiä, kuten NGS ja dPCR:ää. Näiden avulla tunnistetaan syöpäspesifisiä pistemutaatioita, metylaatiomuutoksia sekä proteiiniekspressiota, jotka mahdollistavat varhaisen seulonnan, täsmälääkevalinnan, hoidon vasteen reaaliaikaisen seurannan sekä MRD:n tunnistamisen ennen taudin kliinistä uusiutumista. Kuva 2 on muokattu lähteestä [1]: julkaistu CC By-NC 4.0 -lisenssillä artikkelista *Liquid biopsy in cancer: current status, challenges and future prospects*, Ma, L., Guo, H., Zhao, Y. et al. *Signal Transduction and Targeted Therapy* 2024, (9), 336, doi.org/10.1038/s41392-024-02021-w. Copyright © 2024 The Author(s).

3 CTC:IDEN ANALYTIKKA JA HAVAITSEMIS-MENETELMÄT

CTC:iden hyödyntäminen kliinisessä diagnostiikassa edellyttää erittäin herkkiä ja spesifisiä analyysimenetelmiä. Suurin tekninen haaste on solujen harvinaisuus, sillä millilitrassa verta voi olla miljardien punasolujen ja miljoonien valkosolujen joukossa vain muutama CTC.⁴ Tämän vuoksi analytiikka jaetaan tyypillisesti solujen rikastamiseen ja varsinaiseen tunnistamiseen eli karakterisointiin.¹ Nykyiset menetelmät hyödyntävät CTC:iden ainutlaatuisia ominaisuuksia, kuten niiden pintaproteiineja, kokoa tai geneettistä koodia. Menetelmien kehitys on edennyt perinteisistä vasta-ainepohjaisista ja geneettisistä analyyseistä kohti kehittyneitä teknologioita, kuten pisaramikrofluidistiikkaa ja tekoälyavusteista analytiikkaa. Seuraavaksi käsitellän CTC-analytiikan keskeisimpiä menetelmiä ja teknologioita edeten vakiintuneista immunologisista ja molekyylibiologisista periaatteista kohti uusia, kehittyviä teknologisia ratkaisuja, kuten mikrofluidistiikkaa ja tekoälyavusteista analytiikkaa. Kirjoitelmassa keskitytään nimenomaan äärisverestä eristettyjen CTC:iden tunnistamiseen, rikastamiseen ja karakterisointiin. Vaikka fysikaaliset erottelumenetelmät

mainitaan osana prosessia, painopiste on teknologioissa, jotka mahdollistavat solujen spesifisen tunnistamisen ja niiden biologisen profiilin selvittämisen. Rajaan tarkastelun ulkopuolelle muut nestebiopsian muodot, kuten eksosomit tai ctDNA:n, siltä osin, kun ne eivät liity suoraan CTC-solujen analyysiprosessiin tai niiden validointiin.

3.1 Immunologiset menetelmät CTC:iden tunnistuksessa ja eristyksessä

CTC:iden havaitseminen edellyttää niiden erottamista ja rikastamista muista verisoluista. Vaikka fysikaaliset menetelmät erottavat soluja ominaisuuksien, kuten koon, tiheyden tai sähkövarauksen perusteella käytetään nykyään yhä useammin immunologisia rikastusmenetelmiä, koska ne tarjoavat fysikaalisia menetelmiä korkeamman spesifisyyden ja vähentävät sellaisten valkosolujen aiheuttamaa kontaminaatiota, joiden koko on päällekkäinen CTC-solujen kanssa.¹⁰ Koska CTC:t ovat ääreisveressä äärimmäisen harvinaisia, pelkkä fysikaalinen tai immunomagneettinen erottelu ei yleensä tuota puhdasta lopputulosta.¹ Jotta CTC:t voidaan luotettavasti erottaa muista näytteeseen jääneistä soluista ja visualisoida ne analyysiä varten, ne on merkittävä spesifisillä vasta-aineilla tai fluoresoivilla väriaineilla. Nämä merkit sitoutuvat CTC:iden pinnalle tai sisällä oleviin antigeeneihin ja tuottavat havaittavan fluoresenssisignaalin. Tämä vaihe on kriittinen, sillä se mahdollistaa solujen automaattisen skannauksen ja varmistaa, että analysoitava solu todella on epiteeliperäinen syöpäsolu eikä esimerkiksi kontaminoiva valkosolu.¹ Immunologisissa rikastus- ja analyysimenetelmissä hyödynnetään vasta-aineita, jotka tunnistavat useimmin epiteelisolujen adheesiomolekyylejä (*engl.* epithelial cell adhesion molecule, EpCAM), kasvaimille tyypillisiä solupintamolekyylejä, kuten ihmisen epidermaalinen kasvutekijäreseptori 2:ta (*engl.* human epidermal growth factor receptor 2, HER2) tai prostataspesifistä kalvoantigeeniä (*engl.* prostate-specific membrane antigen, PSMA), sytokeratiineja sekä muita syövän kantasoluille tyypillisiä markkereita, kuten aldehydidehydrogenaasi 1:tä (*engl.* aldehyde dehydrogenase 1, ALDH1).¹¹

Immunologisissa menetelmissä tehdään negatiivinen valinta, jossa valkosolut poistetaan näytteestä CD45-vasta-aineita hyödyntäen, mikä mahdollistaa CTC:iden välillisen rikastamisen.¹¹ CD45-vasta-aineet tunnistavat valkosolujen pintamarkkereita. Esimerkiksi Cytel- ja RosetteSep-järjestelmät hyödyntävät negatiivista valintaa, mikä mahdollistaa sellaistenkin CTC:iden rikastamisen, joiden pinnalla epiteelimerkit eivät ilmene voimakkaasti.¹¹

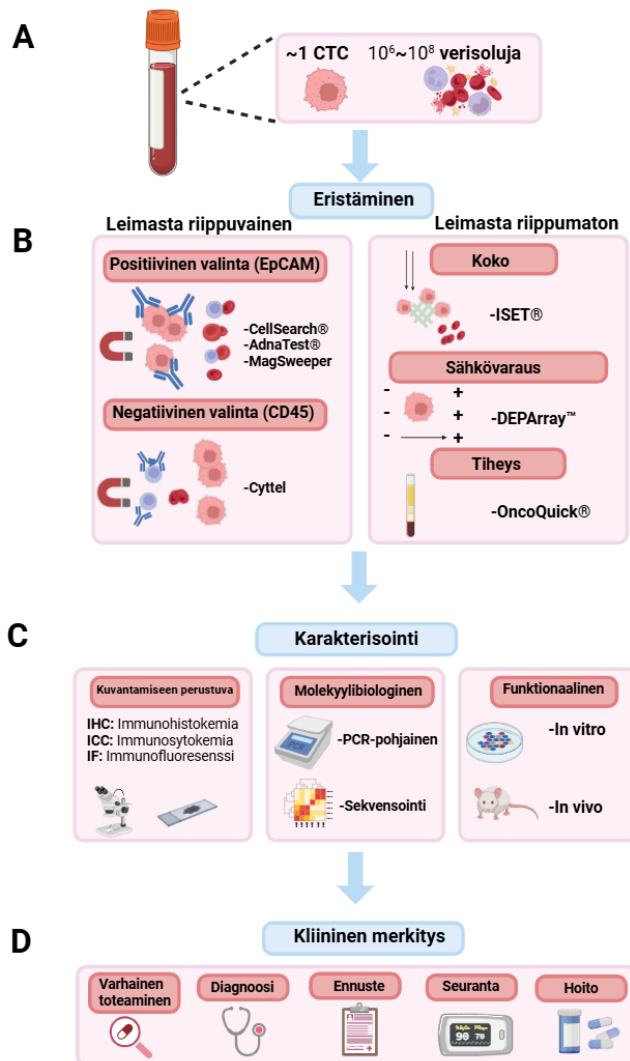
Immunologisiin markkereihin perustuvista tekniikoista SE-iFISH (*engl.* Subtraction Enrichment and Immunostaining-Fluorescence In Situ Hybridization) havaitsee CTC:itä kaksivaiheisesti.¹² Punasolut poistetaan näytteestä sentrifugoimalla ilman hypotonista vauriota. Jäljelle jääneestä tumallisten solujen kerroksesta poistetaan valkosolut hyödyntämällä immunomagneettisia helmiä. Helmet on päällystetty vasta-aineseoksella, joka tunnistaa useita valkosolujen pintamarkkereita. Jäljelle jääneet

solut analysoidaan yhdistelmällä, jossa immunovärjäys tunnistaa useita kasvaimille tyypillisiä proteiineja ja FISH-tekniikka paljastaa kromosomipoikkeavuuksia, kuten aneuploidia. Menetelmä ei perustu solujen kokoon tai yksittäiseen pintamarkkeriin, kuten EpCAM-proteiiniin, joten se mahdollistaa laajemman harvinaisten solujen havaitsemisen. SE-iFISH yhdistää siten proteiini- ja kromosomitasoisen analyysin, mikä parantaa CTC:iden tunnistusta ja karakterisointia.¹²

Nykyisin on kehitetty useita kaupallisia menetelmiä, joista jokaisella on omat erityispiirteensä solujen herkkään tunnistamiseen. Tunnetuin näistä on CellSearch, joka on toistaiseksi ainoa FDA:n hyväksymä järjestelmä kliiniseen käyttöön.¹¹ CellSearch toiminta perustuu positiiviseen immunomagneettiseen rikastamiseen, jossa käytetään EpCAM-proteiiniin kohdentuvia vasta-aineita, jotka on kiinnitetty magneettisiin ferrofluidi-nanopartikkeleihin. Magneetikenttä vetää puoleensa nämä merkityt solut, jolloin ne erottuvat muista verisoluista. Muita immunomagneettiseen erotukseen perustuvia positiivisen valinnan menetelmiä ovat esimerkiksi AdnaTest ja MagSweeper. Myös näissä menetelmissä hyödynnetään EpCAM-vasta-aineilla pinnoitettuja magneettisia helmiä tai nanopartikkeleita CTC:iden suoraan eristämiseen. AdnaTest eroaa perinteisestä CellSearch-menetelmästä siinä, että se hyödyntää immunomagneettisten helmien pinnalla useiden vasta-aineiden seosta. Pelkän EpCAM-vasta-aineen sijasta se käyttää yhdistelmää, joka kohdentuu eri pintamarkkereihin syöpätyypin mukaan. Usean vasta-aineen käyttö parantaa rikastamisen herkkyyttä eli solujen saantoa ja auttaa kattamaan syöpäsolujen heterogeenisuutta. MagSweeper on puolestaan suunniteltu tuottamaan erittäin puhdas CTC-populaatio. Se hyödyntää magneettisesti leimattuja helmiä, jotka kohdentuvat esimerkiksi CD133+ markkeriin. Menetelmän etuna on sen kyky eristää soluja siten, että ne säilyvät korkealaatuisina jatkotutkimuksia varten. Toisin kuin AdnaTest, MagSweeper soveltuu hyvin vaativiin molekyyli-tason analyyseihin, kuten koko transkriptomin sekvensointiin.¹¹

CTC:iden harvinaisuus verinäytteessä asettaa kuitenkin haasteita niiden luotettavalle havaitsemiselle.⁴ Tämän takia immunologisiin markkereihin perustuvat rikastusmenetelmät, erityisesti immunomagneettinen erotus, ovat edelleen keskeisessä asemassa CTC-analytiikassa.¹¹

Rikastamisen jälkeen CTC:t analysoidaan hyödyntäen syöpäproteiineja tunnistavaa immunovärjäystä, syöpäspesifisiä geenisekvenssejä kohdentavia PCR-menetelmiä, kuten reaaliaikaista kvantitatiivista polymeerasiketjureaktiota (*engl.* Real-time quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR), tai funktionaalisia testejä, kuten soluviljelyä.¹¹ Menetelmät mahdollistavat paitsi CTC:iden kvantifioinnin, myös niiden biologisen aggressioon ja potilaan ennusteen arvioinnin. Kuvassa 3 esitetään yleiskatsaus CTC-eristysmenetelmistä, jotka jaotellaan leimasta riippuvaisiin immunologisiin, että leimasta riippumattomiin fysikaalisiin menetelmiin.



Kuva 3. Yleiskuva CTC:iden eristys-, rikastus- ja karakterisointiprosessista. **(A)** Ääreisveressä CTC:t ovat erittäin harvinaisia suhteessa muiden verisolujen määrään. **(B)** CTC:iden eristys- ja rikastusmenetelmät jaotellaan leimariippuvaiseen (positiivinen/negatiivinen valinta) ja leimasta riippumattomaan (koko, sähkövaraus, tiheys) eristykseen. **(C)** Eristetyt solut karakterisoidaan käyttämällä kuvantamiseen perustuvia menetelmiä, kuten immunovärjäystä, tai syöpägenejä amplifioivaa PCR:ää. **(D)** Näillä tutkimuksilla on useita klinisiä sovellusalueita, kuten syövän varhainen toteaminen ja ennusteen arviointi. Kuva 3 on muokattu lähteestä [11]: julkaistu CC BY 4.0 -lisenssillä artikkelista *Circulating tumor cells in the early detection of human cancers*, Feng, Z., Wu, J., Lu, Y. et al. Int. J. Biol. Sci. 2022, 18(8), 3251–3265, doi.org/10.7150/ijbs.71768. Copyright © 2022 The Author(s).

3.2 Molekyylibiologiset analyysit

Molekyylibiologiset menetelmät keskittyvät CTC:iden ja muiden nestebiopsian biomarkkereiden geneettiseen- ja molekulaariseen analyysiin. Niiden avulla voidaan tunnistaa geeniekspression

muutoksia, mutaatioita, DNA:n kopioluvun poikkeamia ja RNA-profiileja, jotka tarjoavat tarkempaa tietoa kasvaimen biologisista mekanismeista ja mahdollistavat yksilöllisen hoitovasteen arvioinnin.² CTC-iChip-teknologia yhdistää mikrofluidistiikan, immunomagneettisen erottelun ja negatiivisen poistostrategian, mahdollistaen CTC:iden tunnistuksen ilman epiteliaalisia merkkiaineita.¹³ Tämä mahdollistaa sellaisten syöpäsolujen tunnistamisen, jotka eivät ilmennä perinteisiä merkkiaineita, kuten EpCAM-proteiinia, mikä on erityisen tärkeää esimerkiksi aivokasvaimissa. CTC-iChip-menetelmässä verinäytteestä erotetaan punasolut ja plasma, jolloin kaikki tumalliset solut, mukaan lukien mahdolliset CTC:t, saadaan pienempään tilavuuteen. Seuraavassa vaiheessa, valkosolut poistetaan immunomagneettisesti CD45-vasta-aineilla päällystettyjen magneettisten helmien avulla. Lopuksi inertiaalisen järjestelyn vaiheessa jäljelle jääneet solut ohjataan mikrokanaviin, joissa hydrodynaamiset voimat erottelevat ne koon perusteella ja keskittävät CTC:t puhtaampaan fraktioon ennen lopullista analyysiä, kuten RNA-sekvensointia tai FISH-testausta. Sullivanin ym. (2014) tutkimuksessa havaittiin, että 13:lla (39%) 33 glioblastoomapotilaasta tunnistettiin CTC:itä vähintään yhdestä verinäytteestä CTC-iChip-laitetta hyödyntäen. Kaikkiaan syöpäsoluja löydettiin 26:sta analysoidusta 87 verinäytteestä (30%), mikä osoitti harvinaisten aivosyöpäsolujen pääsyn verenkiertoon.¹³

Yksittäisten CTC-solujen perimän tutkiminen on haastavaa DNA:n pienen määrän vuoksi, vaatien koko genomien monistamista (*engl.* Whole genome amplification, WGA), joka on noussut keskeiseksi tekniikaksi mahdollistaen yksittäisten solujen molekyylianalyysin.¹⁴ Yleisimmin käytetty menetelmä on moninkertainen syrjäytysmonistus (*engl.* multiple displacement amplification, MDA), joka toimii tasalämpöisissä olosuhteissa ja tarjoaa eksponentiaalisen monistumisen. Monistus on kuitenkin epätasaista, eivätkä tulokset ole toistettavissa solusta toiseen. Viime aikoina on tehty merkittäviä ponnisteluja MDA-menetelmien parantamiseksi skaalautuvuuden, tasaisuuden ja kattavuuden osalta sekä kontaminaation vähentämiseksi. Tämä on johtanut mikrokanava-MDA:n, yhden pisaran MDA:n ja keskipakovoimalla toimivan pisara-MDA:n kehittämiseen. MDA-menetelmä, on välttämätön esivaihe, jotta yksittäisestä CTC-solusta saadaan riittävästi geneettistä materiaalia jatkoanalyysijä varten. Tämän monistuksen jälkeen voidaan tutkia solukohtaisia mutaatioita, mikä paljastaa syövän sisäisen heterogeenisyyden.¹⁴

Fluoresenssipohjainen automaattinen fluoresenssimikroskopia (*engl.* Automatic scanning in fluorescence microscopy) on menetelmä, jossa hyödynnetään telomeraasi-välitteistä adenovirusta, joka ilmentää vihreää fluoresoivaa proteiinia (GFP) vain telomeraasiaktiivisissa, elävissä syöpäsoluissa.¹⁵ Tämä mahdollistaa elävien CTC:iden visuaalisen tunnistamisen ja laskennan. Menetelmän etuna on sen keskittyminen eläviin, telomeraasiaktiivisiin soluihin, jolloin epiteliaalisten merkkiaineiden menetys ei estä solujen tunnistamista. Tämä tekee menetelmästä herkemmän kuin

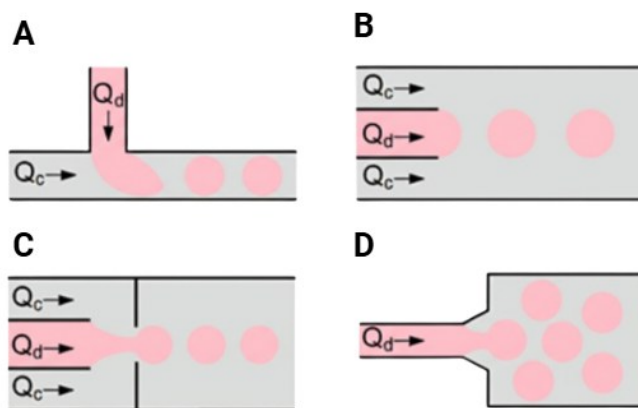
perinteiset PCR- tai virtausytometriapohjaiset tekniikat, jotka saattavat antaa virheellisiä tuloksia merkkiaineiden heterogeenisuuden vuoksi. Tämä teknologia tarjoaa lupaavan työkalun erityisesti syöpähoidon tehon reaaliaikaiseen seurantaan, sillä CTC-solujen määrän on havaittu laskevan merkittävästi onnistuneen leikkauksen tai kemoterapian seurauksena.¹⁵

3.3 Kehittyvät analyysitekniikat

Tavanomaiset analyysimenetelmät, kuten perinteinen PCR ja sekvensointi, kykenevät tyypillisesti havaitsemaan CTC:itä vain populaatiotasolla. CTC:iden harvinaisuus ja runsas taustaverisolujen määrä ovat edelleen suurimmat haasteet. CTC:iden määrä 1 ml:ssä verta on 0–50, kun taas verisoluja on 10^9 (kuva 3).⁴ Lisäksi yksittäisen CTC-solun sisältämän geneettisen materiaalin määrä on noin 6–10 pg DNA:ta, joka on usein liian pieni suoraan analysoitavaksi ilman monistusvaiheita, estäen solujen välisen heterogeensyyden havaitsemisen. Tämä voidaan ratkaista joko laimentamalla solususpensiota tai pienentämällä pisaroiden kokoa. Tärkeänä mikrofluidistiikan haarana on pisaramikro-fluidistiikka, joka on herkkä yksittäisten solujen analyysialusta CTC:iden kvantitatiiviseen havaitsemiseen ja heterogeensyyden analysointiin. Pisaramikro fluidistiikka on korkean läpimenon analyysi menetelmä, jossa CTC:t kapseloidaan tasakokoisiksi pisaroiksi. Nämä pisarat toimivat yksittäisinä reaktioastioina, joiden hallittu ja yhtenäinen tilavuus mahdollistaa erittäin herkän ja tarkan solukohtaisen nukleinihappoanalyysin. Toisin kuin kiinteätilavuuksiset ja lukumäärältään rajoitetut mikrokuopat ja -loukut, monodispersinen pisara voidaan säätää femto- ja nanolitra alueella. Pisaramikro fluidistiikan ominaisuudet, kuten kapselointi monodispersiksi pisaroiksi, mikroskooppinen reaktioutilavuus ja kohdemolekyylien paikallinen rikastaminen, estävät ristikontaminaation eri CTC:iden välillä, vähentävät reagenssien kulutusta, parantavat CTC:iden havaitsemisherkkyyttä ja mahdollistavat CTC:iden suuren läpimenon yksisoluanalyysissä. Pintaaktiivisten aineiden, kuten parafiiniöljyn käytön ansiosta pisarat pysyvät vakaina pitkään ilman koalesenssia. Käytännössä tämä tarkoittaa, että pisarat eivät sulaudu yhteen, vaan kukin pisara pysyy omana erillisenä yksikkönään eikä yhdisty toiseen edes kuumennettaessa.⁴

Nukleinihappo-, proteiini- ja metabolia-analyyseissä on kriittistä välttää CTC:iden ja valkosolujen samanaikaista kapseloitumista yhteen pisaraan, jotta analyysi kohdistuu vain syöpäsoluun. Pisaroiden muodostumisgeometriat luovat rajapinnan jatkuvan ja dispergoituneen faasin välille. Rajapinta määrittää virtausolosuhteen ja siten pisaroiden muodostumisen.⁴ Tyypillisesti muodostumisgeometrioita on kahta päätyyppiä. Ensimmäiseen kuuluvat ristivirtaus (engl. cross-flow), virtausfokusoiva (engl. flow-focusing) ja yhteisvirtaus (engl. co-flow) -geometria, missä pisaroiden synty perustuu leikkausvoimaan.^{17,18} Toiseen kuuluu step-emulsio-geometria, jossa pisaroiden muodostuminen perustuu pintajännityksen hyödyntämiseen. Pisaroiden muodostuksessa

hyödynnetään joko leikkausvoimaa tai pintajännitystä (Kuva 4). Ristivirtauksen geometriassa (kuva 4A) dispersiofaasi kohtaa jatkuvan faasin θ -kulmassa ($0^\circ < \theta \leq 180^\circ$). Pisarat muodostuvat kahden sekoittumattoman faasin rajapinnassa silloin, kun leikkausvoima ylittää pintajännitysvoiman.¹⁷ Eri kulmien perusteella ristivirtauksen geometria voidaan jakaa alatyyppeihin: T-liitos ($\theta = 90^\circ$), vastakkainvirtauslaite ($\theta = 180^\circ$) ja Y-liitos ($0^\circ < \theta < 180^\circ$). T-liitos on yleisimmin käytetty ristivirtausgeometria.¹⁷ Virtausfokusoivassa geometriassa (kuva 4C) sekoittumaton dispergoituva faasi ja jatkuva faasi kulkevat samanaikaisesti supistuvan kuristuksen läpi.¹⁸ Pisarat muodostuvat kuristuksen kohdalla tai sen jälkeen, kun virtauksen fokusoituminen aiheuttaa dispergoituvan faasin katkeamisen pisaroiksi.¹⁸ Yhteisvirtaus geometriassa (kuva 4B) sisempi dispergoituva faasi ja ulompi jatkuva faasi virtaavat samansuuntaisesti kahdessa koaksiaalisessa kanavassa.⁴ Sisempi faasi puristuu ulomman faasin vaikutuksesta sisäkanavan kärjessä pisaroiksi. Step-emulsio geometriassa (kuva 4D) dispergoituva faasi virtaa suuttimen läpi syvempään säiliöön, joka on täytetty jatkuvalla faasilla. Pisarat muodostuvat, kun faasi katkeaa suuttimen kohdalla. Pisaroiden muodostuminen perustuu pintajännitykseen (kuva 4).⁴



Kuva 4. Pisaramikro fluidistiikassa käytetyt muodostumisgeometriat perustuvat mekaaniseen leikkausvoimaan. Tällöin jatkuvan vaiheen voimakas virtaus leikkaa hitaammin liikkuvan dispersiovaiheen tasakokoisiksi pisaroiksi nesteiden rajapinnassa (A) ristivirtauksessa dispersiovaihe kohtaa jatkuvan vaiheen tietyssä kulmassa, jolloin rajapinnan epästabiilisuus aiheuttaa pisan irtoamisen, (B) yhteisvirtauksessa sisempi dispergoituva faasi ja sitä ympäröivä jatkuva faasi kulkevat samansuuntaisesti koaksiaalisissa kanavissa. Jatkuvan faasin aiheuttama puristus sisäkanavan suulla saa sisemmän faasin katkeamaan tasakokoisiksi pisaroiksi, (C) virtausfokusoivassa geometriassa molemmat faasit pakotetaan supistuvan kuristuksen läpi, mikä mahdollistaa erittäin hallitun ja nopean pisanmuodostuksen, ja (D) step-emulsion-geometriassa pisanmuodostuminen perustuu leikkausvoiman sijasta pintajännitykseen nesteen virratessa suuttimesta syvempään säiliöön. Kuva 4 on muokattu lähteestä [4]: julkaistu CC BY 3.0 -lisenssillä

artikkelista *Droplet microfluidics for CTC-based liquid biopsy: a review*, Jiang, L., Yang, H., Cheng, W. et al. *Analyst* 2023, 148(2), 203–221, doi.org/10.1039/d2an01747d. Copyright © 2023 The Author(s)

Pisaramikrofluidiikka soveltuu hyvin yksittäisten solujen tutkimukseen, mikä tekee siitä arvokkaan työkalun CTC-populaation heterogeenisyyden tutkimiseen.⁴ Menetelmässä voidaan hallitusti toteuttaa pisaroiden yhdistämistä, lajittelua ja sekoittamista, mikä mahdollistaa reaaliaikaisen ja monipuolisen soluanalyysin. Menetelmän merkittävin etu CTC-analytiikassa on sen kyky tarkastella soluja yksilötasolla ja tarjota siten tietoa, jota perinteiset populaatiotasoiset analyysit eivät paljasta. Pisaramikrofluidiikka vähentää ristikontaminaatioiden riskiä ja säästää reagensseja, mikä parantaa mittausten toistettavuutta ja soveltuvuutta kliiniseen käyttöön. Menetelmä mahdollistaa reaaliaikaisen seurannan ja on-chip-inkuboinnin, jolloin solujen käsittely, värjäys ja analyysi voivat tapahtua samassa mikrosirussa ilman näytteen siirtoja.⁴

Pisaramikrofluidiikan ohella yksisoluanalytiikka ja multi-omics lähestymistavat ovat keskeisiä uusia teknologioita CTC:iden tutkimuksessa.¹⁹ Yksisoluanalyysitekniikat tarjoavat yksityiskohtaista tietoa CTC:iden heterogeenisyydestä. Tämä lähestymistapa mahdollistaa yksittäisten CTC:iden tarkastelun ja antaa tietoa molekyyllisistä ominaisuuksista sekä kasvaimen geneettisestä monimuotoisuudesta. Tällainen tieto on ratkaisevan tärkeää yksilöllisten hoitostrategioiden kehittämisessä ja lääkeresistenssin mekanismien ymmärtämisessä.¹⁹

Tekoälyn (engl. Artificial intelligence, AI) ja koneoppimisen odotetaan mullistavan CTC:iden analyysi mahdollistamalla monimutkaisten aineistojen ja kaavojen käsittely biomarkkereiden tunnistamiseksi.⁵ AI-algoritmit voivat prosessoida ja analysoida valtavia määriä CTC:istä saatua dataa ja löytää biomarkkereita, jotka perinteisillä menetelmillä jäisivät huomaamatta. Koneoppimismalleilla voidaan opettaa tunnistamaan CTC:ille ominaisia piirteitä, kuten morfologisia ominaisuuksia ja geneettisiä mutaatioita, mikä parantaa CTC:iden havaitsemisen ja karakterisoinnin tarkkuutta ja tehokkuutta. Lisäksi niitä voidaan käyttää CTC:iden analysointiin yhdessä muiden biomarkkereiden, kuten cfDNA:n kanssa, jolloin saadaan kasvaimista kattavia profiileja.⁵

4 CTC-PERUSTAISEN NESTEBIOPSIAN HAASTEET JA TULEVAISUUS

CTC:iden hyödyntäminen ennusteen arvioinnissa kohtaa edelleen useita haasteita. Tunnistusmenetelmien vaihtelu sekä solujen biologinen heterogeenisuus voivat heikentää mittausten tarkkuutta ja johdonmukaisuutta. Lisäksi vakiintuneiden raja-arvojen puute eri syöpätyypeissä

hankaloittaa CTC-määrien tulkintaa kliinisessä käytössä.²⁰ Merkittävänä rajoitteena on myös laboratoriostandardoinnin puute, mikä heikentää eri laboratorioden välisten tulosten vertailtavuutta. Preanalyttisessä vaiheessa näyttemateriaalin laatuun vaikuttavat solujen biologinen hajoaminen sekä tekniset tekijät, kuten näytteen fiksaatio ja käsittelyviiveet. Tällaisia tekijöitä ovat muun muassa potilaan vuorokausirytmii, paasto ja mahdollinen raskaus. Nämä voivat aiheuttaa vaihtelua biomolekyylien pitoisuuksissa tai koostumuksessa, mikä heikentää tulosten vertailtavuutta ja toistettavuutta. Tällä hetkellä biologista vaihtelua sekä yksittäisten näytteiden sisäistä että potilaiden biologisten nesteiden ajallista vaihtelua sairauden etenemisen aikana ymmärretään kuitenkin rajallisesti.³

Jotta CTC:itä voidaan käyttää dynaamisina biomarkkereina taudin etenemisen seurannassa, on ratkaistava niiden tunnistamiseen ja talteenottoon liittyvät tekniset haasteet, kuten menetelmien riittävä herkkyys ja spesifisyys. CTC-datan tulkinta edellyttää syvällistä ymmärrystä kasvaimen biologiasta sekä kasvaimen, sen mikroympäristön ja solunulkoisten vesikkeleiden välisistä monimutkaisista vuorovaikutuksista.² Tällä hetkellä nestebiopsia pystyy antamaan tietoa vain tietyistä molekyyleistä tai biomarkkereista, eikä se kykene täysin kuvaamaan syövän koko monimuotoisuutta. Nestebiopsian kliinisen käytön suurimpana esteenä on edelleen prospektiivisten, pitkittäisten potilaskohorttien puute, joita tarvitaan menetelmien validointiin.

Tulevaisuudessa on tarpeen kehittää ja yhdistää uusia teknologioita olemassa oleviin menetelmiin, jotta näytteenottoa voidaan tehostaa ja havaintokykyä parantaa myös pienemmissä näytemäärissä. Tausta-kohinasuhteen optimointi ja uusien analyysialustojen integrointi ovat avainasemassa, jotta nestebiopsiasta saadaan luotettava työkalu osaksi rutiininomaista syövän hoitoa.

5 YHTEENVETO JA JOHTOPÄÄTÖKSET

Nestebiopsia ja erityisesti CTC:iden analysointi edustavat merkittävää edistysaskelta nykyaikaisessa onkologiassa. Vaikka perinteinen kudossiopsia säilyttää asemansa diagnostiikan kultaisena standardina sen vakiintuneisuuden ja tarkkuuden vuoksi, nestebiopsia tarjoaa ratkaisuja niihin rajoitteisiin, joita staattinen kudosi näyte ei kykene täyttämään.^{1,3} Erityisesti kyky seurata kasvaimen geneettistä ja fenotyypistä evoluutiota reaaliajassa tekee CTC-analytiikasta korvaamattoman työkalun yksilöllisessä lääketieteessä.²

Biologisesti CTC:t ovat keskeisessä asemassa, sillä ne toimivat linkkerinä primäärikasvaimen ja etäpesäkkeiden välillä.² Niiden analysointi mahdollistaa metastaasikaskadin dynaamisen ymmärtämisen ja tarjoaa tietoa taudin etenemisestä jo ennen kuin etäpesäkkeet ovat havaittavissa perinteisillä kuvantamismenetelmillä. Kliinisesti CTC:iden määrä ja niistä eristettävä molekyyli tieto

auttavat ennusteen arvioinnissa, hoidontehokkuuden seurannassa sekä MRD:n havaitsemisessa, mikä on kriittistä uusiutumiseriskin minimoimiseksi.

Teknologinen kehitys on ollut avainasemassa CTC:iden kliinisessä soveltamisessa. Siirtyminen perinteisistä immunomagneettisista rikastusmenetelmistä kohti pisaramikro fluidistiikkaa ja yksisoluanalyysiä on mahdollistanut harvinaisten syöpäsolujen tarkan havaitsemisen valtavan verisolu määrän joukosta.⁴ Uudet menetelmät kuten CTC-iChip ja tekoälyavusteinen kuvantaminen, parantavat havaitsemisherkkyyttä ja vähentävät riippuvuutta yksittäisistä pintamarkkereista, kuten EpCAM-proteiinista.^{1,2,13} Tämä laajentaa nestebiopsian käyttömahdollisuuksia myös syöpätyyppeihin, joita on aiemmin ollut vaikea seurata verinäytteestä.

Huolimatta valtavasta potentiaalista, nestebiopsian laaja kliininen käyttö vaatii vielä merkittävää työtä laboratoriostandardoinnin ja preanalyttisten tekijöiden hallinnassa.^{1,3} Biologinen vaihtelu ja standardoitujen raja-arvojen puute ovat haasteita, jotka on ratkaistava laajojen prospektiivisten tutkimusten avulla.³ Tulevaisuudessa nestebiopsia ei todennäköisesti korvaa kudosbiopsiaa kokonaan, vaan nämä kaksi menetelmää täydentävät toisiaan. Kudosbiopsia antaa tarkan lähtötilanteen diagnosoinnissa, kun taas nestebiopsia toimii dynaamisena seurantaikkunana läpi koko potilaan hoitopolun.¹

6 VIITTEET

- [1] Ma, L.; Guo, H.; Zhao, Y.; Liu, Z.; Wang, C.; Bu, J.; Sun, T.; Wei, J. Liquid biopsy in cancer: current status, challenges and future prospects. *Signal Transduct. Target. Ther.* 2024, 9, 336.
- [2] Allen, T. A. The Role of Circulating Tumor Cells as a Liquid Biopsy for Cancer: Advances, Biology, Technical Challenges, and Clinical Relevance. *Cancers* 2024, 16, 1377.
- [3] Batool, M.; et al. The Liquid Biopsy Consortium: Challenges and opportunities for early cancer detection and monitoring. *Front. Oncol.* 2023, 13, 1184323.
- [4] Jiang, L.; Yang, H.; Cheng, W.; Ni, Z.; Xiang, N. Droplet microfluidics for CTC-based liquid biopsy: a review. *Analyst* 2023, 148, 203–221.
- [5] Heidrich, I.; Ackar, L.; Mossahebi Mohammadi, P.; Pantel, K. Liquid biopsies: Potential and challenges. *Int. J. Cancer* 2021, 148, 528–545.
- [6] Yu, M.; Stott, S.; Toner, M.; Maheswaran, S.; Haber, D. A. Circulating tumor cells: approaches to isolation and characterization. *J. Cell Biol.* 2011, 192, 373–382.
- [7] Schmitt, A. M.; Chang, H. Y. Long noncoding RNAs in cancer pathways. *Cancer Cell* 2016, 29, 452–463.
- [8] Gupta, G. P.; Massagué, J. Cancer Metastasis: Building a Framework. *Cell* 2006, 127, 679–695.
- [9] Lin, D.; Shen, L.; Luo, M.; Zhang, K.; Li, J.; Yang, Q.; et al. Circulating tumor cells: Biology and clinical significance. *Signal Transduct. Target. Ther.* 2021, 6, 404.
- [10] Bankó, P.; et al. Technologies for circulating tumor cell separation from whole blood. *J. Hematol. Oncol.* 2019, 12, 48.
- [11] Feng, Z.; et al. Circulating tumor cells in the early detection of human cancers. *Int. J. Biol. Sci.* 2022, 18, 3251–3265.
- [12] Hu, B.; et al. Comprehensive atlas of circulating rare cells detected by SE-iFISH and image scanning platform in patients with various diseases. *Front. Oncol.* 2022, 12, 821454.
- [13] Sullivan, J. P.; Nahed, B. V.; Madden, M. W.; Oliveira, S. M.; Springer, S.; et al. Brain tumor cells in circulation are enriched for mesenchymal gene expression. *Cancer Discovery* 2014, 4, 1299–1309.
- [14] Khan, T.; Becker, T. M.; Po, J. W.; Chua, W.; Ma, Y. Single-Circulating Tumor Cell Whole Genome Amplification to Unravel Cancer Heterogeneity and Actionable Biomarkers. *International Journal of Molecular Sciences* 2022, 23, 8386.
- [15] Kojima, T.; et al. A simple biological imaging system for detecting viable human circulating tumor cells. *J. Clin. Invest.* 2009, 119, 3172–3181.
- [16] Mandlik, J. S.; Patil, A. S.; Singh, S. Next-generation sequencing (NGS): platforms and applications. *J. Pharm. Bioallied Sci.* 2024, 16, S41–S45.

- [17] Shui, L.; van den Berg, A.; Eijkel, J. C. T. Scalable formation of double emulsions in a microfluidic device. *J. Appl. Phys.* 2009, *106*, 124305.
- [18] Anna, S. L.; Mayer, H. C. Microfluidic tip-streaming for forming ultra-fine droplets. *Phys. Fluids* 2006, *18*, 121512.
- [19] Navin, N. E. Cancer genomics: One cell at a time. *Genome Biol.* 2014, *15*, 452.
- [20] Alix-Panabières, C.; Pantel, K. Clinical Applications of Circulating Tumor Cells and Circulating Tumor DNA as Liquid Biopsy. *Cancer Discovery* 2016, *6*, 479–491.