

Nikoła Zmarzły^{1,2}, Ewelina Hermyt³, Andrzej Witek³, Joanna Gola², Urszula Mazurek⁴

Płynna biopsja w raku endometrium

Liquid biopsies in endometrial cancer

¹ Wyższa Szkoła Techniczna w Katowicach, Katowice, Polska

² Zakład Biologii Molekularnej, Katedra Biologii Molekularnej, Wydział Nauk Farmaceutycznych w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, Sosnowiec, Polska

³ Katedra i Klinika Ginekologii i Położnictwa, Wydział Nauk Medycznych w Katowicach, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, Katowice, Polska

⁴ Bielska Wyższa Szkoła im. J. Tyszkiewicza, Bielsko-Biała, Polska

Adres do korespondencji: Ewelina Hermyt, Katedra i Klinika Ginekologii i Położnictwa, ul. Medyków 14, 40-752 Katowice, tel.: +48 32 789 47 31, e-mail: ewelina.hermyt@gmail.com

¹ Katowice School of Technology, Katowice, Poland

² Department of Molecular Biology, Faculty of Pharmaceutical Sciences in Sosnowiec, Medical University of Silesia in Katowice, Sosnowiec, Poland

³ Department of Gynecology and Obstetrics, Faculty of Medical Sciences in Katowice, Medical University of Silesia in Katowice, Katowice, Poland

⁴ Jozef Tyszkiewicz Higher School in Bielsko-Biała, Bielsko-Biała, Poland

Correspondence: Ewelina Hermyt, Department of Gynecology and Obstetrics, Medyków 14, 40-752 Katowice, Poland, tel.: +48 32 789 47 31, e-mail: ewelina.hermyt@gmail.com

Streszczenie

Płynna biopsja polega na molekularnej analizie płynnego materiału biologicznego uzyskanego metodą nieinwazyjną lub minimalnie inwazyjną. Ta nowatorska metoda jest wykorzystywana w różnych dziedzinach medycyny, a szczególnie często w onkologii, w tym w diagnostyce raka endometrium, który jest jednym z najczęściej diagnozowanych nowotworów ginekologicznych na świecie. Rak endometrium stanowi poważny problem medyczny i społeczny, co skłania badaczy do poszukiwania nowych metod diagnostycznych, a także obiecujących celów dla terapii ukierunkowanej molekularnie. W przypadku tego nowotworu materiałem służącym do badań mogą być m.in. krążące komórki nowotworowe, krążące DNA guza, egzosomy, pozakomórkowe RNA, pozakomórkowe mikroRNA oraz nowotworowo przekształcone płytki krwi. Potencjalne wykorzystanie kliniczne materiałów pochodzących z płynnej biopsji obejmuje najczęściej ustalenie rozpoznania choroby nowotworowej, wybór terapii, prognozę wyników leczenia, monitorowanie przebiegu odpowiedzi na terapię, obserwację ewolucji guza, wykrywanie choroby resztkowej oraz wykrywanie oporności na leczenie. Przeprowadzenie płynnej biopsji w raku endometrium jest możliwe z wykorzystaniem różnorodnego materiału biologicznego, w tym krwi (osocze, surowica), popłuczyn z jamy macicy, moczu i popłuczyn z jamy otrzewnej. Płynna biopsja może się okazać wielką rewolucją w diagnostyce raka endometrium i jest uważana za potencjalną ścieżkę do wprowadzenia medycyny spersonalizowanej.

Słowa kluczowe: płynna biopsja, rak endometrium, pozakomórkowe kwasy nukleinowe, egzosomy, mikroRNA

Abstract

Liquid biopsy involves molecular analysis of liquid biological material obtained by non-invasive or minimally invasive methods. This innovative method has been used in various fields of medicine, especially in oncology, including the diagnosis of endometrial cancer which is one of the most commonly diagnosed gynecologic cancers across the world. Since endometrial cancer is a serious medical and social problem, researchers are on the lookout for new diagnostic methods as well as novel targets for molecularly targeted therapy. Materials with potential applications in analyses include circulating tumor cells, circulating tumor DNA, exosomes, cell-free RNA, cell-free microRNAs and tumor-educated platelets. Materials obtained by liquid biopsy may have a variety of clinical uses in cancer diagnosis, selection of therapy, prediction of treatment prognosis, monitoring of therapeutic response, tracing the pattern of tumor evolution, detection of minimal residual disease, and determination of resistance to treatment. Liquid biopsy in endometrial cancer can be performed using different biological materials including blood (plasma, serum), uterine lavage fluid, urine, and peritoneal lavage fluid. Liquid biopsy may prove to be a truly revolutionary method in the diagnostic work-up for endometrial cancer, and it is considered to be a step forward on the path towards personalized medicine.

Keywords: liquid biopsy, endometrial cancer, cell-free nucleic acids, exosomes, microRNA

WSTĘP

Płynna biopsja (*liquid biopsy*) polega na pobraniu płynnego materiału biologicznego w celu przeprowadzenia analizy molekularnej uzyskanego materiału. Jest to metoda nieinwazyjna lub minimalnie inwazyjna, uznawana za przyszłość nowoczesnej onkologii. W przypadku chorób nowotworowych do krwiobiegu zostają uwolnione m.in. komórki nowotworowe i fragmenty kwasów nukleinowych, które następnie mogą zostać poddane analizie molekularnej. Elementy płynnej biopsji są wykorzystywane nie tylko w onkologii, ale także w innych dziedzinach medycyny, np. w kardiologii (oznaczanie krążących komórek śródbłonna) i w diagnostyce prenatalnej (poza-komórkowe płodowe DNA, *cell-free fetal DNA*, *cffDNA*). Wraz z rozwojem technologii płynna biopsja zaczęła umożliwiać również badanie wszystkich innych niż krew płynów ustrojowych, w tym m.in. moczu, płynu mózgowo-rdzeniowego, płynu pobranego z jam ciała w przypadkach wodobrzusza lub wysięku opłucnowego, a także stolca, śliny czy popłuczyn z jamy macicy^(1,2).

Potencjalne wykorzystanie kliniczne materiałów pochodzących z płynnej biopsji obejmuje najczęściej: ustalenie rozpoznania choroby nowotworowej, wybór terapii, prognozę wyników leczenia, monitorowanie przebiegu odpowiedzi na terapię, obserwację ewolucji guza, wykrywanie choroby resztkowej oraz wykrywanie oporności na leczenie⁽²⁻⁴⁾. Opisano wiele chorób nowotworowych, w których przebiegu wykorzystywano płynną biopsję, m.in. nowotwory piersi, jajnika, płuc, wątroby, prostaty, głowy i szyi, dróg żółciowych, jelita grubego, pęcherza moczowego czy mięsaki⁽⁵⁾. Płynna biopsja może w przyszłości zastąpić biopsje tradycyjne, które są badaniami inwazyjnymi, kosztownymi, czasochłonnymi, obciążonymi ryzykiem wystąpienia powikłań i trudnymi do wielokrotnego wykonania w czasie prowadzonej terapii⁽⁶⁾.

PLYNNA BIOPSJA W RAKU ENDOMETRIUM

Rak endometrium jest jednym z najczęściej diagnozowanych nowotworów ginekologicznych na świecie^(7,8). Zgodnie z danymi z Krajowego Rejestru Nowotworów w 2016 roku w Polsce nowotwory złośliwe trzonu macicy odnotowano u 6266 pacjentek, co stanowiło 7,7% ogólnej liczby nowotworów złośliwych u kobiet w Polsce (4. miejsce pod względem częstości występowania u kobiet). Liczba zgonów z powodu tego typu nowotworu wyniosła w tym roku 1600, co odpowiadało 3,6% ogółu zgonów z powodu nowotworów złośliwych (7. miejsce pod względem częstości zgonów wśród kobiet)⁽⁹⁾. Jednym z najczęstszych objawów raka endometrium są nieprawidłowe krwawienia z dróg rodnych. Właściwym postępowaniem w przypadku ich występowania jest niezwłoczne uzyskanie materiału do oceny histopatologicznej, co zapewnia weryfikację natury krwawienia⁽¹⁰⁾. Większość pacjentek, u których obserwuje się nieprawidłowe krwawienie z dróg rodnych, nie choruje na

INTRODUCTION

Liquid biopsy is a procedure which involves taking a sample of biological material to conduct a molecular analysis that helps with cancer diagnosis and treatment. This non-invasive or minimally invasive method has already been heralded as the future of modern oncology. In patients with cancer, cancerous cells and fragments of nucleic acids are released into the bloodstream. These materials can be subjected to molecular analysis. Elements of liquid biopsy are used not only in oncology, but also in other areas of medicine, e.g. in cardiology (determination of circulating endothelial cells) and prenatal diagnostics (cell-free fetal DNA, *cffDNA*). Based on advancements in technology, liquid biopsy has also created a possibility to examine all body fluids other than blood – urine, cerebrospinal fluid, fluid sampled from body cavities in patients with ascites or pleural effusion as well as stool, saliva or uterine lavage fluid^(1,2).

Materials obtained by liquid biopsy may have a variety of clinical uses in cancer diagnosis, selection of therapy, prediction of treatment prognosis, monitoring of therapeutic response, tracing the pattern of tumor evolution, detection of minimal residual disease, and determination of resistance to treatment⁽²⁻⁴⁾. There are reports on the application of liquid biopsy in a number of neoplastic diseases including cancers of the breast, ovary, lungs, liver, prostate, head and neck, bile ducts, large bowel, urinary bladder, or sarcomas⁽⁵⁾.

In the future, liquid biopsy may replace traditional biopsies which are not only invasive, but also costly, time-consuming, associated with the risk of complications, and difficult to perform multiple times during therapy⁽⁶⁾.

LIQUID BIOPSY IN ENDOMETRIAL CANCER

Endometrial cancer is one of the most commonly diagnosed gynecologic cancers throughout the world^(7,8). According to the Polish National Cancer Registry data, endometrial malignancies were diagnosed in a total of 6,266 patients in 2016, which represented 7.7% of the total number of malignant tumors diagnosed in women in Poland (4th most prevalent cancer type in women). The number of deaths from this type of cancer in that year reached 1,600, which accounts for 3.6% of all deaths from malignant neoplasms (7th most fatal cancer in women)⁽⁹⁾. One of the most common symptoms of endometrial cancer is abnormal vaginal bleeding. Appropriate management in patients presenting with this symptom involves immediate collection of material for histopathological examination to determine the nature of bleeding⁽¹⁰⁾. Most women with abnormal vaginal bleeding do not have endometrial cancer, but nevertheless undergo an invasive diagnostic procedure associated with the risk of various complications. Liquid biopsy, on the other hand, offers an opportunity to avoid uterine curettage, which is an invasive procedure.

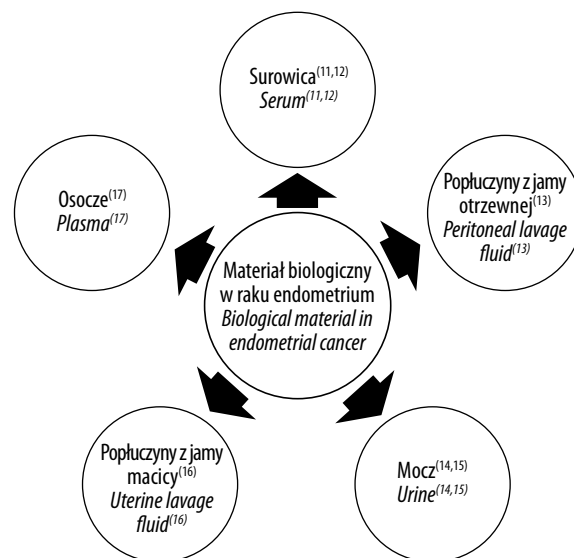
raka endometrium, przechodzi jednak inwazyjny zabieg diagnostyczny, obarczony ryzykiem różnych powikłań. W wypadku wykonania płynnej biopsji możliwe jest uniknięcie inwazyjnego zabiegu wyłuszczenia jamy macicy. Wyzwaniem klinicznym w odniesieniu do płynnej biopsji w raku endometrium jest identyfikacja nowych celów molekularnych i biomarkerów. Z tego powodu wysiłki badaczy koncentrują się na odkryciu nowych, nieinwazyjnych metod zrozumienia architektury molekularnej guza. W raku endometrium płynna biopsja obejmuje takie aspekty kliniczne, jak wczesne ustalenie rozpoznania choroby nowotworowej, fenotypowanie, dobór terapii i monitorowanie choroby w czasie rzeczywistym. Klasyczna postać płynnej biopsji obejmuje analizę materiału pozyskanego z krwi obwodowej, natomiast w raku endometrium badacze wykorzystują również m.in. popłuczyny pobrane z jamy macicy, co stanowi alternatywną formę przeprowadzania płynnej biopsji. Płyn pobrany z jamy macicy zawiera wiele białek charakterystycznych dla różnych funkcji endometrium oraz wskazujących na jego stan. Analiza popłuczyn z jamy macicy obejmuje również ocenę heterogenności genetycznej raka endometrium, co rozwiązuje potencjalny problem niepełnej charakterystyki genetycznej^(2,3). Oprócz krwi i popłuczyn z jamy macicy do przeprowadzenia płynnej biopsji w raku endometrium badacze wykorzystują również mocz i popłuczyny z jamy otrzewnej. Natomiast do wykonania badań z krwi używa się zarówno osocza, jak i surowicy⁽¹¹⁻¹⁷⁾ (ryc. 1).

Dynamiczny rozwój aparatury oraz metod diagnostycznych umożliwił znaczne pogłębienie wiedzy na temat etiopatogenezy raka endometrium, wskazując na heterogenność molekularną związaną z histologiczną różnorodnością tego typu raka, a tym samym pozwalając na wprowadzenie nowych, spersonalizowanych strategii diagnostycznych i terapeutycznych stosowanych w przypadku tego nowotworu. Coraz częściej w diagnostyce klinicznej analiza cytologiczna jest łączona z analizą molekularną. Duże nadzieje wiąże się z płynną biopsją.

Wśród potencjalnych celów oznaczeń w płynnej biopsji w raku endometrium wymienia się m.in.: krążące komórki nowotworowe (*circulating tumor cells*, CTCs), krążące DNA guza (*circulating tumor DNA*, ctDNA), pozakomórkowe DNA (*cell-free DNA*, cfDNA), egzosomy (*exosomes*), pozakomórkowe RNA (*cell-free RNA*, cfRNA), pozakomórkowe mikroRNA (*cell-free miRNA*, cfmiRNA) oraz nowotworowo przekształcone płytki krwi (*tumor-educated platelets*, TEPs)^(2,4,11,18,19) (ryc. 2). W niniejszym opracowaniu omówiono elementy molekularne najczęściej opisywane w literaturze przedmiotu jako cele oznaczeń molekularnych w płynnej biopsji w raku endometrium.

KRAŻĄCE KOMÓRKI NOWOTWOROWE (CTCs)

Krążące komórki nowotworowe są pojedynczymi komórkami guza, które krążą we krwi obwodowej po odłączeniu się od ogniska pierwotnego. Komórki te uważane są za źródło



Ryc. 1. Źródła materiału biologicznego wykorzystywanego dotychczas do przeprowadzania płynnej biopsji w raku endometrium⁽¹¹⁻¹⁷⁾

Fig. 1. Sources of biological material used to date for performing liquid biopsy in endometrial cancer⁽¹¹⁻¹⁷⁾

A clinical challenge related to the application of liquid biopsy in endometrial cancer is the identification of new molecular targets and biomarkers. Consequently, the efforts of researchers are aimed at developing novel non-invasive methods of understanding the molecular architecture of tumors. In endometrial cancer, liquid biopsy involves a number of clinical aspects such as early cancer diagnosis, phenotyping, choice of therapy, and real-time monitoring of the disease. Conventional liquid biopsy relies on the analysis of material obtained from peripheral blood. In endometrial cancer, researchers also use uterine lavage fluid, which is an alternative form of liquid biopsy. Fluid sampled from the uterine cavity contains a number of proteins that are specific to different functions of the endometrium and indicate its condition. The analysis of uterine lavage fluid also comprises an assessment of genetic heterogeneity associated with endometrial cancer, thus resolving the potential problem of incomplete genetic characterization^(2,3). In addition to blood and uterine lavage fluid, other materials used for conducting liquid biopsy in endometrial cancer include urine and peritoneal lavage fluid. Blood tests are performed both with plasma and serum⁽¹¹⁻¹⁷⁾ (Fig. 1). Rapid development of equipment and diagnostic methods has significantly expanded the knowledge of etiopathogenesis of endometrial cancer, revealing molecular heterogeneity associated with the histological diversity of this type of cancer, and thus allowing the launch of new, personalized diagnostic and therapeutic strategies for the treatment of this cancer type. Increasingly, cytological analysis is combined with molecular analysis in clinical diagnostic work-up, and high hopes are being pinned on liquid biopsy. Potential targets in liquid biopsy analysis in patients with

Płynna biopsja Liquid biopsy

Potencjalne cele oznaczeń molekularnych^(2,4,11,18,19) Potential targets for molecular assays^(2,4,11,18,19)

Krążące komórki nowotworowe (*circulating tumor cells, CTCs*)
Circulating tumor cells (CTCs)

Pozakomórkowe DNA (*cell-free DNA, cfDNA*), mitochondrialne pozakomórkowe DNA (*mitochondrial cell-free DNA, cfmtDNA*), krążące DNA guza (*circulating tumor DNA, ctDNA*)
Cell-free DNA (cfDNA), mitochondrial cell-free DNA (cfmtDNA), circulating tumor DNA (ctDNA)

Egzosomy, zwane również pęcherzykami pozakomórkowymi (*extracellular vesicles, EVs*), krążącymi egzosomami (*circulating exosomes*), onkosomami (*oncosomes*), krążącymi mikropecherzykami (*circulating microvesicles, cMV*)
Exosomes, also referred to as extracellular vesicles (EVs), circulating exosomes, oncosomes, circulating microvesicles (cMV)

Nowotworowo przekształcone płytki krwi (*tumor-educated platelets, TEPs*)
Tumor-educated platelets (TEPs)

Pozakomórkowe mikroRNA (*cell-free miRNA, cfmiRNA*)
Cell-free miRNA (cfmiRNA)

Pozakomórkowe RNA (*cell-free RNA, cfRNA*)
Cell-free RNA (cfRNA)

Potencjalne wykorzystanie kliniczne^(2,4) Potential clinical application^(2,4)

DIAGNOZA
DIAGNOSIS

PROGNOZA
PROGNOSIS

WYBÓR TERAPII
SELECTION OF THERAPY

MONITOROWANIE TERAPII
MONITORING OF THERAPY

WYKRYWANIE CHOROBY RESZTKOWEJ
DETECTION OF MINIMAL RESIDUAL DISEASE

Ryc. 2. Schemat ukazujący wybrane potencjalne cele molekularne i potencjalne wykorzystanie kliniczne materiału pobranego w czasie płynnej biopsji w raku endometrium^(2,4,11,18,19)

Fig. 2. Diagram presenting selected potential molecular targets and potential clinical applications of material collected by liquid biopsy in endometrial cancer^(2,4,11,18,19)

dło odległych przerzutów⁽²⁰⁾. CTCs zostały po raz pierwszy opisane w 1869 roku przez Ashwortha, a wraz z rozwojem techniki zostały przebadane pod kątem przydatności jako biomarkery diagnostyczne, prognostyczne i predykcyjne w wielu typach nowotworów. CTCs są wydzielane zarówno przez pierwotne, jak i wtórne guzy nowotworowe. Podkreśla się, że ich oznaczanie ma przewagę nad wykonywaniem tradycyjnej biopsji tkankowej ze względu na łatwość pobrania materiału, możliwość wielokrotnego przeprowadzenia badań oraz badanie całości materiału pochodzącego z guza, a nie tylko jego wybranej części. Tradycyjna biopsja jest również niekomfortowa dla pacjenta i nie zawsze możliwa do przeprowadzenia. W porównaniu z liczbą elementów morfotycznych występujących we krwi CTCs są rzadko występującymi znaleziskami, a ich izolacja, określenie liczby, a także charakterystyka stanowią techniczne wyzwania. Oczekiwana użyteczność kliniczna CTCs wymaga przeprowadzenia dalszych badań, które mogą pomóc rozwinąć w przyszłości nowe strategie antynowotworowe^(6,21).

endometrial cancer include circulating tumor cells (CTCs), circulating tumor DNA (ctDNA), cell-free DNA (cfDNA), exosomes, cell-free RNA (cfRNA), cell-free miRNA (cfmiRNA), and tumor-educated platelets (TEPs)^(2,4,11,18,19) (Fig. 2). This paper presents the molecular elements which are most commonly described in the literature as targets for molecular testing in fluid biopsy in endometrial cancer.

CIRCULATING TUMOR CELLS (CTCs)

Circulating tumor cells are individual cells shed from the primary tumor which circulate in the peripheral blood of patients with cancer. CTCs are considered to be a source of distant metastases⁽²⁰⁾. CTCs were first described in 1869 by Ashworth, and as technology advanced, they were investigated for their utility as diagnostic, prognostic and predictive biomarkers in many types of cancer. CTCs are released both by primary and secondary tumors. It is stressed that the analysis of CTCs is superior to traditional tissue biopsy,

Uważa się, że stwierdzenie CTCs we krwi obwodowej w nowotworach litych wiąże się ze złą prognozą. Kiss i wsp. przeprowadzili analizę obecności CTCs we krwi chorych z rakiem endometrium poddanych zabiegowi operacyjnemu przy użyciu narzędzia do separacji komórek MetaCell®. Badanie wykazało, że aż w 75% przypadków raka endometrium wykryto CTCs. Może to wskazywać, że wykorzystanie tej technologii pozwoli na wydajne wychwytywanie CTCs, co w dalszej kolejności umożliwi ich hodowlę przy zachowaniu oryginalnego fenotypu. W efekcie możliwe będzie dalsze badanie charakterystyki funkcjonalnej i molekularnej tych komórek⁽²²⁾.

Z kolei Bogani i wsp. oceniali obecność CTCs we krwi pobranej od 28 pacjentek z 3. stopniem zróżnicowania raka endometrium według FIGO (Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique) przy użyciu narzędzia CellSearch CTC®. Obecność CTCs stwierdzono jedynie u 7% chorych (jako wynik pozytywny przyjęto wykrycie co najmniej 2 CTCs), co korelowało z naciekaniami miometriu i zajęciem węzłów chłonnych. Co więcej, występowanie CTCs wykazano jedynie u pacjentek z typem endometrioidalnym raka endometrium⁽²³⁾. Wydaje się, że tak duże rozbieżności w wykrywaniu CTCs mogą wynikać z zastosowania różnych metod badawczych.

Alonso-Alconada i wsp. określili profil ekspresji genów związanych z przejściem nabłonkowo-mezenchymalnym (*epithelial-mesenchymal transition*, EMT) oraz komórkami macierzystymi w CTCs wyizolowanych z krwi obwodowej 34 pacjentek z rakiem endometrium w stadiach od IB do IV w porównaniu z grupą kontrolną, którą stanowiło 27 zdrowych osób. Eksperyment pozwolił na wykrycie CTCs wśród chorych wysokiego ryzyka cechujących się niekorzystnym rokowaniem. Wskazano również potencjalne markery CTCs, takie jak: *ETV5*, *NOTCH1*, *SNAI1*, *TGFBI*, *ZEB1* i *ZEB2*. Natomiast ekspresja *CTNNB1*, *STS*, *GDF15*, *RELA*, *RUNX1*, *BRAF* oraz *PIK3CA* może być celem terapeutycznym w raku endometrium⁽²⁴⁾.

POZAKOMÓRKOWE DNA (cfDNA), KRAŻĄCE DNA GUZA (ctDNA)

Opracowanie nieinwazyjnej metody płynnej biopsji na podstawie analizy pozakomórkowego DNA stwarza możliwość rozwoju nowych metod diagnostycznych w chorobach nowotworowych. cfDNA zostało po raz pierwszy opisane ponad 50 lat temu, a w następnych latach zauważono, że występuje ono w zwiększonej ilości u osób z chorobą nowotworową w porównaniu z grupą kontrolną. Część cfDNA, która pochodzi z guza, nazywana jest krążącym DNA guza (ctDNA). Jego analiza pozwala na identyfikację zmian specyficznych dla danego typu nowotworu⁽²⁵⁾. Wykrywanie i charakterystyka ctDNA na poziomie molekularnym stanowią duże wyzwanie ze względu na jego ograniczone występowanie i niewystarczającą liczbę próbek pobranych w czasie pojedynczej, klasycznej biopsji. W konsekwencji uzyskanie szczegółowych informacji odnośnie do hetero-

for material can be collected easily, tests can be performed repeatedly, and the entire tumor-derived material – rather than just a selected part – can be analyzed. Another important aspect to consider is that traditional biopsy causes patient discomfort, and it is not always possible or practical. Compared to the number of morphotic elements found in human blood, CTCs are rare to find, and their isolation, determination of count, and characterization pose a technical challenge. The expected clinical benefits of CTCs require further studies which may contribute to the development of new anticancer strategies in the future^(6,21). The detection of CTCs in peripheral blood in patients with solid tumors is believed to be associated with poor prognosis. Kiss et al. evaluated the presence of CTCs in the blood of patients with endometrial cancer who underwent a surgical procedure, using MetaCell® separation technology for CTCs. The study found that 75% of endometrial cancer cases were associated with the presence of CTCs. The findings may suggest that the technology applied in the study is capable of efficiently capturing CTCs. As the next step, they can be cultured while maintaining their original phenotype. As a result, it will be possible to conduct further studies on the functional and molecular characteristics of these cells⁽²²⁾. Bogani et al. evaluated the presence of CTCs in blood collected from 28 patients diagnosed with grade 3 endometrial cancer according to the FIGO (Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique) classification. The study was conducted using CellSearch CTC® kit. Only 7% of study patients were found to be positive for CTCs (a positive result was the detection of at least 2 CTCs). The presence of CTCs was significantly correlated with myometrial invasion and lymph node involvement. Also, CTCs were detected only in patients with endometrioid endometrial cancer⁽²³⁾. It appears that such large discrepancies in the detection of CTCs may be due to the application of different study methods.

Alonso-Alconada et al. determined the expression profile of genes associated with the epithelial-mesenchymal transition (EMT) and stem cells in CTCs isolated from the peripheral blood of 34 patients with endometrial cancer ranging from grade 3 stage IB to stage IV, compared to 27 healthy controls. The study detected CTCs in a group of high-risk patients with unfavorable prognosis. Also, potential CTC markers were identified, including *ETV5*, *NOTCH1*, *SNAI1*, *TGFBI*, *ZEB1* and *ZEB2*, while the expression of *CTNNB1*, *STS*, *GDF15*, *RELA*, *RUNX1*, *BRAF* and *PIK3CA* suggested potential therapeutic targets in endometrial cancer⁽²⁴⁾.

CELL-FREE DNA (cfDNA), CIRCULATING TUMOR DNA (ctDNA)

The elaboration of a non-invasive method of liquid biopsy based on cell-free DNA analysis provides an opportunity for the development of new diagnostic methods for cancer. cfDNA was first described more than 50 years ago, and

genności guza i genomu nowotworu może nie być możliwe. Obiecujące wydaje się natomiast wykorzystanie cfDNA jako biomarkera zmian zachodzących w obrębie DNA guza, takich jak mutacje punktowe, niestabilność mikrosatelitarna, hipermetylacja DNA, a także utrata heterozygotyczności⁽²⁶⁾.

Dobrzycka i wsp. oznaczali cfDNA w grupie 109 pacjentek z rakiem endometrium (87 z typem I i 22 z typem II), poddanych brzusznej histerektomii z obustronnym wycięciem przydatków metodą polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (*polymerase chain reaction – restriction fragments length polymorphism*, PCR-RFLP). Materiał badany stanowiła krew obwodowa (osocze) pobrana od każdej chorej na dzień przed przeprowadzeniem operacji. Zaobserwowano, że cfDNA było stosunkowo często wykrywane u pacjentek we wczesnym stadium raka endometrium typu II. Autorzy wskazują, że oznaczenie cfDNA może zostać wykorzystane jako nowa metoda diagnostyczna w tym typie nowotworu, a także służyć jako marker w prognozowaniu rokowania i umożliwiać indywidualizację schematu leczenia w typie II raka endometrium. Dodatkowo wyniki mogą sugerować, że obecność cfDNA może być obiecującym, niezależnym markerem prognostycznym opartym na DNA dla raka endometrium typu II przed postawieniem diagnozy, choć podkreśla się, iż obecnie pochodzenie cfDNA nie jest jeszcze w pełni zrozumiałe⁽²⁷⁾.

Cicchillitti i wsp. oznaczali stężenie cfDNA surowicy u 59 pacjentek z rozpoznaniem rakiem endometrium, od których pobrano krew obwodową przed zabiegiem oraz przed włączeniem leczenia. W grupach G2 i G3 raka endometrium wykazano znacznie zwiększony poziom cfDNA w porównaniu z grupą G1. Podwyższone stężenie cfDNA zaobserwowano również u chorych powyżej 65. roku życia w porównaniu z młodszymi kobietami, co jednak nie korelowało ze stopniem złośliwości histologicznej (*grading*). W grupie młodszych pacjentek odnotowano korelacje pomiędzy uwalnianiem cfDNA i stopniem raka endometrium, największe w G2 i G3 w porównaniu z grupą G1. W surowicy pacjentek oznaczono również stężenie cfmtDNA (*mitochondrial cell-free DNA*), czyli mitochondrialnej frakcji cfDNA, nie wykazano jednak różnic w jego poziomie zarówno w raku endometrium w porównaniu z grupą kontrolną, jak i pomiędzy poszczególnymi stopniami złośliwości histologicznej i zaawansowania anatomicznego choroby (*staging*). Niektóre z dotychczas przeprowadzonych badań wykazały potencjalny związek pomiędzy krążącym cfmtDNA a chorobami nowotworowymi, jednak praca Cicchillitti i wsp. jest prawdopodobnie jedyną, w której badano jego występowanie w raku endometrium⁽¹¹⁾.

Vizza i wsp. oznaczali cfDNA metodą ilościowej reakcji łańcuchowej polimerazy (*quantitative polymerase chain reaction*, qPCR) w surowicy 60 pacjentek z rozpoznaniem rakiem endometrium oraz 22 pacjentek bez schorzeń ginekologicznych. Wykazano, że zawartość cfDNA w grupie G1 raka endometrium i w grupie kontrolnej była podobna, istotny wzrost zawartości całkowitego cfDNA zaobserwo-

in the course of time it was shown to occur in increased amounts in cancer patients compared to control groups. Circulating tumor DNA (ctDNA) is tumor-derived fragmented DNA in the bloodstream. ctDNA analysis is a method to identify changes that are specific to particular tumor types⁽²⁵⁾. The detection and characterization of ctDNA at the molecular level represent a major challenge because of its limited occurrence and insufficient number of samples taken during a single conventional biopsy. Consequently, it may not be possible to obtain appropriately detailed information about tumor heterogeneity and cancer genome. However, a potentially promising strategy is to use cfDNA as a biomarker of changes occurring within tumor DNA, such as point mutations, microsatellite instability, DNA hypermethylation and loss of heterozygosity⁽²⁶⁾. Dobrzycka et al. conducted a study in a group of 109 patients with endometrial cancer (87 with type I and 22 with type II) who underwent abdominal hysterectomy with bilateral adnexectomy. The researchers evaluated cfDNA by PCR-RFLP (*polymerase chain reaction – restriction fragment length polymorphism analysis*). The study material was peripheral blood (plasma) collected from each patient one day prior to surgery. cfDNA was detected relatively frequently in patients with early-stage type II endometrial cancer. The authors concluded that cfDNA analysis could be used as a novel diagnostic method in this cancer type, and might serve as a marker to predict patient prognosis and allow personalized treatment in type II endometrial cancer. In addition, the findings suggest that the presence of cfDNA may be a promising, independent DNA-based prognostic marker for type II endometrial cancer prior to diagnosis, even though it is stressed that the origin of cfDNA is not yet fully understood⁽²⁷⁾.

Cicchillitti et al. measured the blood serum concentration of cfDNA in a total of 59 patients diagnosed with endometrial cancer, based on peripheral blood samples collected before surgery and prior to the start of treatment. cfDNA levels were considerably higher in patients with G2 and G3 endometrial cancer than in the G1 group. Elevated cfDNA levels were also noted in patients over 65 years of age compared to younger women, however, no correlation was found with histological malignancy grade. Correlations between cfDNA release and endometrial cancer grade were observed in younger patients: the highest in G2 and G3 compared to G1. Also, the content of mitochondrial cell-free DNA (cfmtDNA) was assessed in the patients' serum, but there were no differences in cfmtDNA level either in endometrial cancer in comparison to the control group or between different histological malignancy grades and the anatomical extent of the disease (cancer staging). Some of the studies to date have shown a potential relationship between circulating cfmtDNA and cancer, however, the study by Cicchillitti et al. is probably the only one where cfmtDNA was investigated in the context of endometrial cancer⁽¹¹⁾.

Vizza et al. evaluated cfDNA by quantitative polymerase chain reaction (qPCR) in serum samples collected from

wano natomiast w grupach G2 i G3, co może wskazywać na przydatność cfDNA jako markera prognostycznego w tym nowotworze⁽¹²⁾.

Bolivar i wsp. wykonali sekwencjonowanie cfDNA wyizolowanego z osocza krwi obwodowej oraz DNA guza uzyskanego od 48 pacjentek z rozpoznaniem rakiem endometrium w celu identyfikacji występujących mutacji. Na podstawie literatury przedmiotu ocenia się, że około 90% raków endometrium charakteryzuje się co najmniej jedną mutacją w genach *CTNNB1*, *KRAS*, *PTEN* lub *PIK3CA*. Badanie wykazało, że u 94% chorych wykryto co najmniej jedną mutację w analizowanych genach, a u 33% pacjentek co najmniej jedną mutację w guzie, która odpowiadała mutacji wykrytej w osoczu. Odnotowano, iż obecność mutacji w osoczu była istotnie związana z zaawansowanym stadium choroby, głęboką inwazją miometrium, inwazją naczyń limfatycznych i krwionośnych oraz pierwotnym rozmiarem guza. Ogółem mutację w osoczu wykryto u 18% chorych we wczesnym stadium raka endometrium. Autorzy podkreślają, że przyszłe badania mogą być pomocne w określeniu czasu, jaki musi upłynąć po operacji, aby nie można było wykryć mutacji we krwi obwodowej, i w uzyskaniu odpowiedzi na pytanie, czy ich ponowne pojawienie się wskazuje na nawrót choroby⁽²⁸⁾.

Zhang i wsp. w swoim badaniu oceniali wartość predykcyjną CTCs wykazujących ekspresję tarczycowego czynnika transkrypcyjnego typu 1 (*thyroid transcription factor-1*, TTF-1) na występowanie nawrotów i wskaźnik przeżycia w grupie 78 pacjentek z rakiem endometrium przy użyciu metody cytometrii przepływowej, testu immunoenzymatycznego (*enzyme-linked immunosorbent assay*, ELISA) i ilościowej reakcji łańcuchowej polimerazy z odwrotną transkryptazą (*quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction*, RT-qPCR) we krwi i w tkankach. Chore zostały podzielone na dwie grupy: TTF-1-pozytywną i TTF-1-negatywną. Zaobserwowano, że do grupy TTF-1-pozytywnej należały głównie pacjentki z rozpoznaniem stadium II oraz III–IV według klasyfikacji TNM, a w grupie TTF-1-negatywnej dominowały stadia I i II raka endometrium. Odsetek naciekania naczyń i przerzutów do węzłów chłonnych był wyższy w grupie TTF-1-pozytywnej, stężenia antygenów nowotworowych CA-125 (*cancer antigen 125*), CA-15-3 (*cancer antigen 15-3*) i podfrakcji 4. ludzkiego białka z komórek nabłonkowych najądrza (*human epididymis protein 4*, HE4) również były wyższe w surowicy pacjentek z grupy TTF-1-pozytywnej. Dodatkowo poziom ekspresji surwiwiny (*survivin*) i β -kateniny (β -*catenin*) był wyższy, a miR-15a i *PTEN* niższy w porównaniu z grupą TTF-1-negatywną. Dalsza obserwacja, trwająca 25 miesięcy, wykazała, że czas przeżycia wolnego od progresji choroby i średni czas przeżycia były niższe w grupie TTF-1-pozytywnej, natomiast odsetek nawrotów w tej grupie był wyższy. Badacze wskazują, że ekspresja TTF-1 w CTCs może być dobrym wskaźnikiem w ocenie rokowania w raku endometrium⁽²⁹⁾.

60 patients with diagnosed endometrial cancer and 22 patients without gynecologic conditions. The content of cfDNA in patients with G1 endometrial cancer and in the control group was similar, but a significant increase in total cfDNA was shown in patients with G2 and G3 endometrial cancer, which may suggest that cfDNA could be a useful prognostic marker in this cancer type⁽¹²⁾.

Bolivar et al. performed the sequencing of cfDNA extracted from peripheral blood plasma and matching tumor DNA obtained from 48 patients diagnosed with endometrial cancer, in order to identify existing mutations. Based on the available literature, it is estimated that approximately 90% of endometrial cancers are characterized by at least one mutation in the *CTNNB1*, *KRAS*, *PTEN* or *PIK3CA* genes. At least one mutation in the analyzed genes was detected in 94% of patients. In addition, 33% of patients had at least one mutation in the tumor that matched the mutation detected in plasma. The presence of mutations in plasma was found to be significantly correlated with advanced disease stage, deep myometrial invasion, lymphatic and vascular invasion, and primary tumor size. Overall, 18% of patients with early-stage endometrial cancer had a mutation detected in plasma. The authors stress that future studies may be helpful in determining the postoperative period required for mutation clearance from the peripheral blood, and finding whether mutation re-emergence is a predictor of disease recurrence⁽²⁸⁾.

Zhang et al. evaluated the predictive value of CTCs expressing thyroid transcription factor-1 (TTF-1) on the recurrence and survival rates in 78 patients with endometrial carcinoma using flow cytometry, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-qPCR) in blood and tissues. The patients were divided into two groups: TTF-1-positive and TTF-1-negative. It was observed that patients in the TTF-1-positive group had mainly TNM stages II and III–IV, while TNM stages I and II predominated in the TTF-1-negative group. The rates of vascular infiltration and lymph node metastases were higher in the TTF-1-positive group than in the TTF-1-negative group. Also, the levels of cancer antigens CA-125 and CA-15-3, and human epididymis protein 4 (HE4), were higher in the blood serum of TTF-1-positive patients. Furthermore, the levels of survivin and β -catenin mRNA expression were found to be higher in the TTF-1-positive than in the TTF-1-negative group, and the levels of miR-15a and *PTEN* mRNA expression were lower in the TTF-1-positive group. After the follow-up of 25 months it was shown that the progression-free survival and median survival time had decreased – and the recurrence rate had increased – in the TTF-1-positive group compared to the TTF-1-negative patients. The researchers thus concluded that TTF-1 expression in CTCs might be a good predictor of prognosis in endometrial cancer⁽²⁹⁾.

Nair et al. analyzed uterine lavage fluid collected from patients without histopathologic evidence of cancer. Samples were obtained from a total of 107 patients undergoing hysteroscopy.

Nair i wsp. wykonali badanie płynu popłuczynowego z jamy macicy u pacjentek bez histopatologicznych cech choroby nowotworowej. Materiał pobrano od 107 pacjentek poddanych histeroskopii, a analizę komórkowego i pozakomórkowego DNA (cfDNA) przeprowadzono, wykorzystując metodę sekwencjonowania nowej generacji, PCR i metodę Sangera. Po zabiegu u 7 pacjentek zdiagnozowano raka endometrium (6 przypadków w stadium IA i 1 przypadek mikroskopijnego ogniska raka w polipie); u każdej z nich znaleziono związane z nowotworami mutacje genów zarówno w komórkowym DNA, jak i w cfDNA. Dodatkowo u 4 pacjentek, w przypadku których dostępne były próbki tkankowe, zaobserwowano występowanie tych samych mutacji co w popłuczynach. Autorzy wskazują, że ich odkrycia sugerują przyszłą możliwość ich zastosowania do wykonywania badań przesiewowych w kierunku wczesnego wykrywania raka endometrium⁽³⁰⁾.

EGZOSOMY

Egzosomy, nazywane również pęcherzykami pozakomórkowymi (*extracellular vesicles*, EVs), onkosomami (*oncosomes*) lub krążącymi mikropęcherzykami (*circulating microvesicles*, cMV), to małe pęcherzyki pochodzące z komórek, obecne prawdopodobnie we wszystkich płynach ustrojowych. Przenoszą różne komponenty molekularne ze swojej komórki macierzystej (takie jak np. lipidy, białka, mRNA, miRNA, a nawet DNA), mają zdolność do połączenia z komórkami i przekazania swojego ładunku. Pełnią ważną funkcję w komunikacji międzykomórkowej, wpływając na procesy zarówno fizjologiczne, jak i patologiczne. Są uwalniane przez wszystkie typy komórek, w warunkach prawidłowych, jak również patologicznych, jednak w przypadku komórek nowotworowych proces ten zachodzi w większym stopniu w porównaniu z komórkami prawidłowymi^(2,19,31,32). Krążące egzosomy po raz pierwszy zostały opisane w 1981 roku jako pozakomórkowe pęcherzyki uwalniane przez komórki nowotworowe. Uważa się, że biorą udział w powstawaniu i progresji choroby nowotworowej oraz oporności na chemioterapię poprzez ich transfer do komórek sąsiadujących lub oddalonych. Krążące egzosomy pochodzące z komórek nowotworowych prawdopodobnie pobudzają ich proliferację, angiogenezę i powstawanie przerzutów poprzez hamowanie antynowotworowej odpowiedzi immunologicznej. Potencjalnym celem leczenia jest terapia ukierunkowana przeciw tym molekułom. Oczekuje się, że wykrycie krążących egzosomów, w szczególności charakterystycznych dla danego rodzaju guza, wraz z analizą ich zawartości ułatwi również wczesne wykrycie guza, prognozowanie rokowania i monitorowanie terapii antynowotworowej⁽³³⁾.

Maida i wsp. oceniali, czy egzosomy pochodzące z komórek nowotworowych raka endometrium mogą transportować ładunek egzosomalny (w tym funkcjonalne małe RNA) do sąsiadujących fibroblastów. Badanie przeprowadzono na linii komórkowej ludzkiego raka endometrium Ishikawa oraz na linii fibroblastów endometrium, a także

Cellular and cell-free DNA (cfDNA) were analyzed by next-generation sequencing, PCR, and Sanger sequencing. After the procedure, 7 patients were diagnosed with endometrial cancer (6 cases of stage IA cancer, and 1 case of a microscopic focus within a polyp). All the patients were shown to have significant cancer-associated gene mutations both in cellular DNA and cfDNA. In addition, in 4 patients in whom tissue samples were available, the mutations were found to be the same as those detected in uterine lavage fluid. Based on their findings, the authors concluded that their approach could be used in the future in screening tests to detect early stages of endometrial cancer⁽³⁰⁾.

EXOSOMES

Exosomes, also referred to as extracellular vesicles (EVs), oncosomes or circulating microvesicles (cMV), are small cell-derived vesicles which are probably found in all bodily fluids. They carry various molecular components from their stem cells (lipids, proteins, mRNA, miRNA, and even DNA), and have the ability to connect to cells and transfer their cargo. Exosomes are involved in cell-to-cell signaling, and play a role in both physiological and pathological processes. Exosomes are released by all cell types, both under normal and pathological conditions, but in cancer cells the process is more pronounced compared to normal cells^(2,19,31,32). Circulating exosomes were first described in 1981 as extracellular vesicles released by cancer cells. They are believed to be involved in the development and progression of cancer, and resistance to chemotherapy via transfer to adjacent or distant cells. Circulating exosomes derived from tumor cells probably stimulate their proliferation, angiogenesis and metastasizing by inhibiting anti-tumor immune response. Consequently, therapy targeted against these molecules might be a potential therapeutic approach. It is expected that the detection of circulating exosomes, especially specific to a particular tumor type, combined with the analysis of their contents will contribute to early tumor detection, prediction of prognosis and monitoring of response in cancer treatment⁽³³⁾.

Maida et al. investigated whether exosomes derived from endometrial cancer cells were able to transport exosomal cargo (including functional small RNAs) to neighboring fibroblasts. The study was conducted on the human Ishikawa endometrial cancer cell line and endometrial fibroblast cell line as well as endometrial cancer specimens and normal endometrial samples obtained from patients undergoing hysterectomy. The study showed that exosomes could be transferred from the Ishikawa cells to most endometrial fibroblasts, both normal and cancer-derived, and also within the Ishikawa cells⁽³⁴⁾.

Xu et al. attempted to evaluate the role of circular RNA (circRNA) present in extracellular vesicles isolated from the blood serum of 3 patients with stage III endometrial adenocarcinoma compared to 3 healthy controls. The study, conducted by RNA sequencing (RNA-Seq), identified al-

na pobranych wycinkach raka endometrium oraz endometrium prawidłowego od chorych poddanych histerektomii. Eksperyment wykazał, że egzosomy mogą być przenoszone z linii Ishikawa do większości fibroblastów endometrium, zarówno prawidłowych, jak i pochodzących z raka, a także w obrębie komórek Ishikawa⁽³⁴⁾.

Xu i wsp. podjęli próbę oceny roli kolistego RNA (*circular RNA*, circRNA) obecnego w pęcherzykach pozakomórkowych wyizolowanych z surowicy 3 pacjentek z gruczolakorakiem endometrium w stadium III w porównaniu z grupą kontrolną, którą stanowiły 3 zdrowe pacjentki. Badanie z wykorzystaniem techniki sekwencjonowania RNA (*RNA sequencing*, RNA-Seq) wskazało odmienną ekspresję 275 circRNA (zwiększenie ekspresji 209 circRNA oraz zmniejszenie ekspresji 66 circRNA), a dalsza analiza wykazała ich potencjalne zaangażowanie w 5 szlaków sygnałowych. Dodatkowo poziom ekspresji 2 circRNA został potwierdzony z użyciem metody *real-time* PCR⁽¹⁸⁾.

Z kolei Mariscal i wsp. badali wpływ EVs na zdolność do tworzenia przerzutów poprzez CTCs w raku endometrium, związanych z przejściem nabłonkowo-mezenchymalnym m.in. na linii komórkowej raka endometrium Hec1A i w osoczu grupy badanej. Identyfikacja białek zaangażowanych w interakcje i połączenia występujące między komórkami, jak również między komórkami i macierzą pozakomórkową, a także zdolność CTCs do adhezji do śródbłonna mogą sugerować, że EVs uczestniczą w osiedlaniu się CTCs w miejscach przerzutowych. Autorzy wskazują, że ocena potencjalnej współpracy pomiędzy CTCs i EVs może stanowić źródło biomarkerów, dostarczając ważnych informacji klinicznych w przypadku wykonywania płynnej biopsji w raku endometrium⁽¹⁷⁾.

Roman-Canal i wsp. badali ekspresję miRNA w EVs wyizolowanych z popłuczyn otrzewnowych uzyskanych od 25 pacjentek z rozpoznaniem rakiem endometrium (grupa badana) oraz płynu puchlinowego pobranego od 25 pacjentów ze zdekompenowaną marskością wątroby (grupa kontrolna). Przeprowadzona analiza umożliwiła identyfikację 114 miRNA, których ekspresja ulegała istotnej statystycznie zmianie u chorych z rakiem endometrium w porównaniu z grupą kontrolną. Spośród nich wytypowano 8 miRNA, które mogą stanowić obiecujący biomarker raka endometrium: miRNA-383-5p, miRNA-10b-5p, miRNA-34c-3p, miRNA-449b-5p, miRNA-34c-5p, miRNA-200b-3p, miRNA-2110 oraz miRNA-34b-3p. Prawdopodobnie jest to do tej pory jedyne badanie dotyczące miRNA w EVs w tym nowotworze, jednak niektóre z miRNA wskazanych jako różnicujące były opisywane w innych badaniach dotyczących raka endometrium. Badacze uważają, że płyn otrzewnowy stanowi potencjalne bogate źródło biomarkerów u pacjentek z rakiem endometrium⁽¹³⁾.

Egzosomy, a dokładnie obecne w nich miRNA, zostały również zbadane w pobranym w sterylnych warunkach moczu chorych z rakiem endometrium (22 pacjentki) w porównaniu z grupą kontrolną (5 pacjentek), do której zakwalifikowano kobiety z objawami zbliżonymi do

tered expression in 275 circRNAs (upregulated in 209 circRNAs, and downregulated in 66 circRNAs). Further analysis showed their potential involvement in 5 signaling pathways. In addition, the level of expression of 2 circRNAs was confirmed using *real-time* PCR⁽¹⁸⁾.

Mariscal et al. studied the effect of tumor EVs on the metastatic efficiency of CTCs in endometrial cancer, associated with the epithelial-to-mesenchymal transition. The study material consisted of Hec1A endometrial cell line and plasma collected from the study group. The identification of proteins involved in cell-cell and cell-extracellular matrix interaction and binding, coupled with evidence of CTC adhesion to functionalized endothelium, may suggest that EVs contribute to the homing of CTCs at metastatic sites. The authors indicate that the evaluation of potential associations between CTCs and EVs may be a source of biomarkers, providing relevant clinical information in liquid biopsy performed in patients with endometrial cancer⁽¹⁷⁾.

Roman-Canal et al. investigated the expression of miRNAs in EVs isolated from peritoneal lavage fluid obtained from a total of 25 patients diagnosed with endometrial cancer (study group) and ascitic fluid collected from 25 patients with decompensated cirrhosis (control group). The analysis identified 114 miRNAs which were statistically significantly dysregulated in patients with endometrial cancer compared to the control group. Among them, 8 miRNAs were found to have a promising diagnostic potential as biomarkers in endometrial cancer, including miRNA-383-5p, miRNA-10b-5p, miRNA-34c-3p, miRNA-449b-5p, miRNA-34c-5p, miRNA-200b-3p, miRNA-2110 and miRNA-34b-3p. It is probably the only study on miRNAs in EVs in this tumor type to date, but some of the miRNAs with a differentiating potential have also been investigated in other studies focused on endometrial cancer. Researchers believe that peritoneal fluid is a potentially rich source of biomarkers in patients with endometrial cancer⁽¹³⁾.

Exosomes, or more precisely miRNAs present in them, were also examined in urine collected in sterile conditions from 22 patients with endometrial cancer in comparison to 5 control patients presenting with symptoms similar to endometrial cancer (abnormal uterine bleeding, postmenopausal bleeding, thickened endometrium, lesions in the uterine cavity) but without cancer diagnosis. The study was conducted using Western blot and PCR. Based on the miRBase database, a panel of 84 miRNAs was selected. It was concluded that diversified miRNA expression within exosomes could be used to discover new biomarkers useful for the diagnosis of endometrial cancer, with miR-200c-3p identified as a candidate biomarker. The authors argue that urine has a number of advantages over blood as a source of biomarkers because, being an excretory product, it contains more abnormal molecules than blood serum which is controlled to maintain homeostasis and perform physiological functions⁽¹⁴⁾.

Wyciszkiewicz et al. were probably the first to study the presence of small heat shock proteins (sHsp) in exosomes obtained from the serum of 9 patients with endometrial

raka endometrium (nieprawidłowe krwawienia maciczne, krwawienia pomenopauzalne, pogrubiałe endometrium, zmiany w jamie macicy) bez rozpoznania choroby nowotworowej. Badanie przeprowadzono z użyciem metod Western blot i PCR, a na podstawie bazy danych miRBase wybrano panel 84 miRNA. Stwierdzono, że zróżnicowana ekspresja miRNA w obrębie egzosomów może zostać wykorzystana do odkrycia nowych biomarkerów w diagnostyce raka endometrium, wskazując miR-200c-3p jako potencjalnego kandydata do tej roli. Autorzy zwracają uwagę, że moc w porównaniu z krwią ma wiele zalet jako źródło biomarkerów, ponieważ jako produkt wydalniczy zawiera więcej nieprawidłowych molekuł niż surowica, która jest kontrolowana w celu utrzymania homeostazy i pełnienia funkcji fizjologicznych⁽¹⁴⁾.

Wyciszkiwicz i wsp. w swojej pracy prawdopodobnie po raz pierwszy badali obecność małych białek szoku ciepłego (*small heat shock proteins*, sHsp) w egzosomach uzyskanych z surowicy 9 pacjentek z rakiem endometrium, 14 z rakiem jajnika i 7 z endometriozą. Stężenie sHsp, a także markerów odpowiedzi immunologicznej zostało oznaczone w surowicy, płynie otrzewnowym i w egzosomach za pomocą metody ELISA. Badanie wykazało, że największą aktywność ATP-azy Na^+/K^+ , będącej markerem EVs, odnotowano u chorych z rakiem endometrium. Co więcej, u tych samych pacjentek zaobserwowano również najwyższą ekspresję αB -krystraliny. Przeprowadzona analiza nie wykazała natomiast istotnych statystycznie różnic w przypadku stężenia Hsp20 zarówno w egzosomach, surowicy, jak i w płynie otrzewnowym; z kolei w badaniach nad Hsp22 uzyskano istotność statystyczną jedynie w przypadku płynu otrzewnowego. Najniższe stężenie tego białka wykazano wśród chorych na raka endometrium w porównaniu z chorymi z rakiem jajnika i endometriozą. Autorzy planują przeprowadzenie badań obejmujących większą grupę pacjentek i zbadanie korelacji pomiędzy sHsp a danymi klinicznymi, co mogłoby być pomocne w opracowaniu nowych narzędzi diagnostycznych u pacjentek z chorobami ginekologicznymi⁽³⁵⁾.

Z kolei Dziechciowski i wsp. ocenili znaczenie diagnostyczne i prognostyczne mikrocząstek (*microparticles*, MPs) we krwi obwodowej i macicznej u 37 pacjentek z rakiem endometrium w porównaniu z grupą kontrolną (23 zdrowych ochotniczek). Celem badania było określenie liczby mikrocząstek CD144+, CD14+ oraz całkowitej ich liczby (TF+) metodą cytometrii przepływowej. Wykazano, że całkowita liczba mikrocząstek u chorych z rakiem endometrium była znacznie wyższa niż w grupie kontrolnej. Ponadto w grupie z rakiem endometrium liczba MPs we krwi macicznej okazała się wyższa niż we krwi obwodowej. Wykazano również, iż liczba MPs koreluje ze stopniem histologicznym i stadiem klinicznym guza. Badacze wywnioskowali, że MPs są potencjalnym kandydatem na marker w raku endometrium i być może bardzo istotnym elementem kancerogenezy, jednocześnie zaznaczając, że istnieje potrzeba przeprowadzenia dalszych badań w celu potwierdzenia ich

cancer, 14 with ovarian cancer and 7 with endometriosis. The levels of sHsps and immune response markers were analyzed in the serum, peritoneal fluid and exosomes by ELISA. The activity of Na^+/K^+ -ATPase, a marker of EVs, was found to be the highest in endometrial cancer patients. The same group of patients also had the highest expression of αB -crystallin. On the other hand, no statistically significant differences in Hsp20 levels were observed either in exosomes, serum or peritoneal fluid samples. With respect to Hsp22, statistical significance was achieved only for the peritoneal fluid. The lowest concentration of the protein was found in patients with endometrial cancer compared to patients with ovarian cancer and endometriosis. The authors plan to conduct studies in a larger group of patients, and to investigate the correlation between sHsp and clinical data, which might contribute to the development of new diagnostic tools for patients with gynecologic conditions⁽³⁵⁾. Dziechciowski et al. evaluated the diagnostic and prognostic significance of microparticles (MPs) in peripheral and uterine blood in 37 patients with endometrial cancer compared to the control group (23 healthy volunteers). The aim of the study was to determine the number of CD144+ and CD14+ microparticles as well as their total number (TF+), by flow cytometry. The total number of MPs was found to be considerably higher in patients with endometrial cancer than in the control group. In addition, the MP count in uterine blood was higher than in peripheral blood of patients with endometrial cancer. The number of MPs was also shown to correlate with the histological grade and clinical stage of the tumor. The authors concluded that MPs were potentially a candidate marker of endometrial cancer and perhaps a critical element of endometrial carcinogenesis. However, they also noted that further studies were needed to verify their clinical utility, and suggested they should be focused on the uterine cavity, where the proliferation of endometrial cancer begins⁽³²⁾.

TUMOR-EDUCATED PLATELETS (TEPs)

In addition to cancer cells and their products, normal cells present in the tumor microenvironment – containing potentially important information – are also released into the bloodstream. The new diagnostic role of tumor-educated platelets relies on interactions between blood platelets and cancer cells. This relationship has an impact on tumor growth and spread. It affects both the expression of important tumor cell genes and the RNA profile of blood platelets. It has been postulated that the tumor itself, as well as its accompanying cells, have the ability to “teach” or “educate” blood platelets. The resulting TEPs can be used in the detection of cancer and monitoring of therapeutic outcomes. Studies in this area are based on mRNA sequencing of TEPs. To date, this new research method has been used in a range of tumors including non-small cell lung cancer, colorectal cancer, breast, liver and bile duct cancer^(29,36).

użyteczności klinicznej; analizy te powinny być skoncentrowane na jamie macicy, gdzie rozpoczyna się proliferacja raka endometrium⁽³²⁾.

NOWOTWOROWO PRZEKSZTAŁCONE PŁYTKI KRWI (TEPs)

Oprócz komórek nowotworowych i ich produktów do krwioobiegu uwalniane są również prawidłowe komórki obecne w mikrośrodowisku nowotworu, potencjalnie zawierające ważne informacje. Nowa, diagnostyczna rola nowotworowo przekształconych płytek krwi (do tej pory w nomenklaturze polskiej brakuje odpowiednika tej nazwy) polega na wykorzystaniu interakcji pomiędzy płytkami krwi a komórkami nowotworowymi. Relacja ta oddziałuje na wzrost guza i jego rozprzestrzenianie. Ma ona wpływ zarówno na ekspresję istotnych genów komórek nowotworowych, jak i na profil RNA płytek krwi. Uważa się, że sam guz nowotworowy, a także towarzyszące mu komórki mogą „uczyć”, „edukować” płytki krwi, a powstałe w ten sposób TEPs mogą zostać wykorzystane m.in. w wykrywaniu choroby nowotworowej i w monitorowaniu efektów terapii. W badaniach wykonuje się sekwencjonowanie mRNA TEPs. Do tej pory tę nową metodę badawczą wykorzystano w nowotworach takich jak niedrobnokomórkowy rak płuc, rak jelita grubego, rak piersi oraz wątroby i dróg żółciowych^(29,36).

Płytki krwi są znane z ich roli w hemostazie oraz z tego, że inicjują gojenie się ran, a od niedawna podkreśla się ich udział w systemowej i lokalnej odpowiedzi na wzrost guza. Best i wsp. wykazali, że sekwencjonowanie mRNA TEPs pozwoliło rozróżnić osoby zdrowe i chorych na nowotwory w 96%, natomiast wśród 6 badanych typów nowotworów pierwotnych lokalizację guza określono prawidłowo w 71%. Uważa się, że TEPs mogą być wykorzystywane jako biologiczne źródło wiedzy o ścieżkach molekularnych w chorobach nowotworowych i dostarczać informacji o typie nowotworów oraz ich podklasach⁽³⁷⁾.

Dotychczas w piśmiennictwie brakuje prac badających bezpośrednio występowanie i ewentualne znaczenie TEPs w raku endometrium, można jednak przypuszczać, biorąc pod uwagę ich wykorzystanie w płynnych biopsjach w innych typach nowotworów, że mogą być interesującym markerem molekularnym również w raku endometrium.

Dane literaturowe wskazują, że trombocytoza, a nawet poziom płytek krwi w górnej granicy normy wiąże się z zaawansowanym stadiem choroby nowotworowej, a często również z przerzutami, i jest negatywnym markerem prognostycznym w przypadku wielu nowotworów, w tym w raku endometrium⁽³⁸⁾.

Inne badania sugerują, że podawanie kwasu acetylosalicylowego, modulującego aktywność płytek krwi, może zmniejszyć ryzyko zachorowania na różne typy nowotworów, w tym między innymi raka endometrium, aczkolwiek podkreśla się, iż hipoteza ta wymaga dalszych badań⁽³⁹⁾.

Platelets are known to be implicated in hemostasis and initiation of the wound healing process. Recently, their role in systemic and local response to tumor growth has also been highlighted. Best et al. reported that mRNA sequencing of TEPs helped to differentiate between healthy individuals and cancer patients with 96% accuracy. Across 6 different tumor types under analysis, the location of the primary tumor was correctly determined in 71% of cases. It is argued that TEPs can be used as a biological source of knowledge on molecular pathways in neoplastic diseases, and provide information on cancer types and subclasses⁽³⁷⁾.

The literature only contains a limited number of studies investigating the presence and potential significance of TEPs in endometrial cancer. However, given the fact that they are useful in liquid biopsies in other types of cancer, it can be presumed that they may be an interesting molecular marker in endometrial cancer as well.

Literature reports indicate that thrombocytosis (and even blood platelet levels at the upper limit of normal) is associated with advanced-stage cancer, often with metastases, and represents a negative prognostic marker in many cancer types, including endometrial cancer⁽³⁸⁾.

Other studies suggest that the administration of acetylsalicylic acid, which modulates platelet activity, may reduce the risk of different types of cancers, including endometrial cancer. It needs to be stressed, though, that this hypothesis requires further investigation⁽³⁹⁾.

CELL-FREE microRNA (cfmiRNA), CELL-FREE RNA (cfrNA)

Cell-free microRNAs originate from plasma, blood cells and the endothelium. Both cfmiRNAs and circulating microRNAs have important diagnostic and prognostic implications in cancer therapy. However, cell-free miRNA still has not been studied in sufficient detail. miRNAs are known to be regulatory molecules for mRNA, and have a significant role in the regulation of biological processes such as differentiation and development, apoptosis, cell death, hematopoiesis and proliferation. miRNAs have been detected in various types of cancer, e.g. lymphoma, prostate cancer, hepatocellular carcinoma, gastric cancer, melanoma, and cervical cancer. The most commonly studied miRNAs include miR-20a, miR-21, miR-155, miR-218 and miR-210⁽⁴⁰⁾. miRNAs are implicated in the regulation of gene expression by binding to complementary mRNA molecules. miRNAs have an enormous potential as a diagnostic and prognostic biomarker in multiple types of pathologies occurring in humans⁽⁴¹⁾.

Studies are also underway to investigate cell-free RNA present in peripheral blood, with the overriding goal to use cfrNA as a potential biomarker to detect CTCs. Based on the findings of studies on other types of cancer, it can be concluded that cfrNA may also be used as a diagnostic marker in endometrial cancer, however targeted research is necessary to validate this claim. Yu et al. showed that the cfrNA levels in the blood of patients in relation to survival rates were in-

POZAKOMÓRKOWE mikroRNA (cfmiRNA), POZAKOMÓRKOWE RNA (cRNA)

Pozakomórkowe mikroRNA pierwotnie pochodzi z osocza, komórek krwi oraz ze śródbłonka. Zarówno cfmiRNA, jak i krążące mikroRNA odgrywają ważną rolę w diagnostyce i prognostyce terapii chorób nowotworowych. Wiedza na temat pozakomórkowego miRNA jest jednak nadal niewystarczająca. miRNA są cząsteczkami regulatorynymi dla mRNA i w znaczący sposób uczestniczą w regulacji procesów biologicznych, takich jak różnicowanie i rozwój, apoptoza, śmierć komórkowa, hematopoeza czy proliferacja. miRNA były oznaczane w różnych typach nowotworów, np. w chłoniaku, raku prostaty, raku wątrobowo-komórkowym, raku żołądka, czerniaku i raku szyjki macicy. Do miRNA najczęściej oznaczanych w badaniach naukowych zalicza się: miR-20a, miR-21, miR-155, miR-218 oraz miR-210⁽⁴⁰⁾. Rola miRNA polega na udziale w regulacji ekspresji genów poprzez wiązanie się z komplementarnymi cząsteczkami mRNA. miRNA cechuje się ogromnym potencjałem wykorzystania w charakterze biomarkera diagnostycznego i prognostycznego w wielu typach patologii obserwowanych u człowieka⁽⁴¹⁾.

Prowadzone są również badania nad pozakomórkowym RNA obecnym we krwi obwodowej. Ich celem jest wykorzystanie cRNA jako potencjalnego biomarkera wykrywającego CTCs. Biorąc pod uwagę badania nad innymi typami nowotworów, można przypuszczać, że cRNA może zostać wykorzystane jako marker diagnostyczny również w raku endometrium, wymaga to jednak przeprowadzenia ukierunkowanych badań. Yu i wsp. wykazali, że stężenie cRNA oznaczone we krwi pacjentów w powiązaniu ze wskaźnikiem przeżycia było niezależne od stadium niedrobnokomórkowego raka płuca⁽⁴²⁾. Kim i wsp. oznaczali cRNA w moczu chorych na raka pęcherza moczowego. Wykazali oni, iż pozakomórkowe RNA jest potencjalnym markerem diagnostycznym tego nowotworu, a także może służyć jako marker przesiewowy w kierunku raka pęcherza moczowego u pacjentów z krwimoczem⁽⁴³⁾.

Záveský i wsp. w swojej pracy po raz pierwszy podjęli próbę oceny ekspresji cfmiRNA w moczu pacjentek m.in. z rakiem endometrium, wykorzystując metodę RT-PCR (*reverse transcription-polymerase chain reaction*) z użyciem trzech odmiennych metod izolacji RNA. Grupę kontrolną stanowił mocz zdrowych kobiet w okresie pomenopauzalnym. Autorzy stwierdzili, że miRNA obecne w moczu, zwłaszcza jako część cRNA wydalane przez nerki, powinno ujawnić swój potencjał diagnostyczny również w nowotworach ginekologicznych. Spośród 11 miRNA zakwalifikowanych do badania jedynie ekspresja miR-106b była istotnie statystycznie obniżona w raku endometrium w porównaniu z grupą kontrolną. W przypadku oznaczania egzosomalnego RNA nie wykazano statystycznie istotnych różnic w ekspresji miRNA w tym nowotworze. Autorzy podkreślają, że niezbędne jest przeprowadzenie dalszych badań przy użyciu większej liczby próbek klinicz-

dependent of the stage of non-small cell lung cancer⁽⁴²⁾. Kim et al. evaluated cRNAs in the urine of patients with bladder cancer, demonstrating that it is a potential diagnostic marker for this cancer, and may also be used as a screening marker for bladder cancer in patients with hematuria⁽⁴³⁾.

Záveský et al. made the first attempt to study the expression of cfmiRNAs in patients with endometrial cancer by RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction) using three different RNA isolation methods. The control group was the urine of healthy postmenopausal women. The authors argued that miRNAs present in urine, especially as part of cRNAs excreted by the kidneys, should also prove its valuable diagnostic potential in gynecologic cancers. Among 11 miRNAs selected for the study, only miR-106b expression was found to be statistically significantly reduced in endometrial cancer compared to the control group. In exosomal RNA assays, no statistically significant differences in miRNA expression were shown in this type of tumor. The authors emphasize that further research is needed, with more clinical samples and more extensive application of expression profiling methods, in order to verify the diagnostic potential of urinary miRNAs in gynecologic cancers⁽¹⁵⁾. In their next study, the researchers showed that the diagnostic potential of urine-derived cfmiRNAs might be linked to the type of fraction used for isolation, highlighting that different urine fractions should be examined for their miRNA expression in order to identify new diagnostic markers⁽⁴⁴⁾.

OTHER MOLECULAR TARGETS

In addition to the biomolecules discussed above, other potential biomarkers have been studied to determine their usefulness in endometrial cancer diagnostics, including the profile of gene expression (e.g. *PTEN*, *p53*), degree of DNA methylation, protein markers (e.g. pRb2/p130, HE4), markers of angiogenesis (e.g. vascular endothelial growth factor, VEGF), cell proliferation (e.g. Ki-67), cell adhesion (e.g. L1CAM), apoptosis (e.g. pHH3), tumor suppression (e.g. ARID1A), hormones and their receptors (e.g. estrogen, progesterone, human epidermal growth factor receptor 2, HER2) or elements of the immune system (e.g. tumor-infiltrating lymphocytes, TILs, leukocytes), and plasma proteins (e.g. DKK-1) and their metabolites⁽⁴⁵⁾.

Notably, it has not been clearly defined which of the biomolecules and testing methods can be recognized as elements used in liquid biopsy in endometrial cancer, and which of them should rather be classified as conventional (i.e. immunological or serological) methods. They seem to be closely related and often impossible to assign to a particular category, while uncertainty tends to be caused by the lack of uniform nomenclature or a precise definition of the scope of liquid biopsy in endometrial cancer. Some authors conduct studies which potentially meet the criteria of liquid biopsy, but they do not include their methods explicitly in this group.

Martignetti et al. described the case of a 67-year-old female patient (body mass index, BMI >34) who was referred for

nych i zastosowaniu na większą skalę metod oceny profilu ekspresji, by móc potwierdzić potencjał diagnostyczny miRNA pochodzącego z moczu w nowotworach ginekologicznych⁽¹⁵⁾. W swojej kolejnej pracy zwrócili natomiast uwagę, że potencjał diagnostyczny cfmiRNA pochodzącego z moczu może być uzależniony od rodzaju frakcji użytej do izolacji, wskazując, że w przyszłości należy zbadać różne frakcje moczu pod kątem ekspresji miRNA w celu ustalenia nowych markerów diagnostycznych⁽⁴⁴⁾.

POZOSTAŁE CELE MOLEKULARNE

Oprócz omówionych biomolekuł w charakterze biomarkera w przypadku raka endometrium próbuje się wykorzystywać profil ekspresji genów (np. *PTEN*, *p53*), stopień metylacji DNA, markery białkowe (np. pRb2/p130, HE4), markery angiogenezy (np. czynnik wzrostu śródbłonka naczyń – *vascular endothelial growth factor*, VEGF), proliferacji komórkowej (np. Ki-67), adhezji komórkowej (np. L1CAM), apoptozy (np. pHH3), supresji nowotworu (np. ARID1A), hormony i ich receptory (np. estrogenowe, progesteronowe, receptor ludzkiego naskórkowego czynnika wzrostu 2 – *human epidermal growth factor receptor 2*, HER2) czy elementy układu immunologicznego (np. limfocyty naciekające guz – *tumor-infiltrating lymphocytes*, TILs, leukocyty), białka osoczowe (np. DKK-1) i ich metabolity⁽⁴⁵⁾.

Warto zauważyć, że nie określono jednoznacznie, które z biomolekuł i metod ich oznaczania można zakwalifikować w raku endometrium jako elementy wykorzystywane w płynnej biopsji, a które zaliczyć do klasycznych metod, np. immunologicznych czy serologicznych. Wydaje się, że są one ze sobą ściśle powiązane i często niemożliwe do przyporządkowania, a wątpliwości dotyczą raczej nomenklatury i braku przyjęcia dotychczas jednoznacznej definicji zakresu płynnej biopsji w raku endometrium. Niektórzy autorzy przeprowadzają badania, które potencjalnie spełniają założenia płynnej biopsji, jednak nie zaliczają swoich metod bezpośrednio do tej grupy.

Martignetti i wsp. opisali przypadek 67-letniej pacjentki (wskaźnik masy ciała – *body mass index*, BMI >34), którą z powodu nieprawidłowego obrazu endometrium w badaniu ultrasonograficznym zakwalifikowano do zabiegu histeroskopii. Pobrano popłuczyny z jamy macicy w celu wykonania sekwencjonowania DNA oraz identyfikacji cfDNA; obraz jamy macicy w czasie histeroskopii nie wzbudził podejrzenia choroby rozrostowej. Analiza histopatologiczna wykazała prawidłowy obraz endometrium bez cech hiperplazji czy raka, jednak analiza molekularna popłuczyn wskazała na obecność pięciu mutacji w czterech genach (*PTEN* R130G oraz S338fs; *PIK3CA* N345I; *FBXW7* R505C i *FGFR2* S252W). Po dokonaniu przeglądu piśmiennictwa okazało się, że wszystkie powyższe mutacje mogą być związane z rakiem endometrium, z czego mutacja *PTEN* R130 jest wykazywana nawet w 48% guzów. Dziesięć miesięcy później pacjentka zgłosiła się z powodu krwawie-

hysteroscopy due to abnormal endometrial findings on the ultrasound examination. Uterine lavage fluid was collected to perform DNA sequencing and identify cfDNA. During hysteroscopy, the condition of the uterine cavity did not prompt the suspicion of a proliferative disease. Histopathologic analysis revealed normal endometrium with no evidence of hyperplasia or cancer, however, molecular analysis of the lavage fluid identified a total of five driver mutations in four genes (*PTEN* R130G and S338fs; *PIK3CA* N345I; *FBXW7* R505C and *FGFR2* S252W). A review of the literature showed that all of the above mutations might be associated with endometrial cancer, with the *PTEN* R130 mutation identified in up to 48% of tumors. Ten months later, the patient returned with postmenopausal bleeding. A biopsy was performed, revealing complex hyperplasia with atypia. The patient was referred for total laparoscopic hysterectomy. Postoperative histopathological examination showed a single focus of endometrioid endometrial adenocarcinoma (stage IA G1), without any evidence of myometrial invasion. A fragment of tumor tissue was collected and subjected to DNA analysis. Two oncogenic somatic *PTEN* mutations, R130G and Ser338fs, were detected. They were the same mutations which had been identified 10 months before in uterine lavage fluid. The frequency of mutated alleles was found to be higher than in the previous examination. Statistical analysis demonstrated that it would be highly unlikely for the two identical *PTEN* mutations identified in two different samples to occur by chance alone⁽¹⁶⁾. The study by Paprocka et al. investigated the widely held assumption that circulating endothelial cells (CECs) and endothelial progenitor cells (EPCs) reflected the condition of the endothelium, the extent of its damage and possibilities of endothelial repair. Various types of cancer were found to be associated with an elevated count of CECs and EPCs, which may link them to cancer angiogenesis. The aim of the study was to determine whether the CEC and EPC levels in the blood circulation of women with early endometrial cancer were different from those determined in healthy women of similar age. The study was conducted by flow cytometry, with labelling by anti-CD31, anti-CD45, anti-VEGFR2/KDR and anti-CD34 antibodies. It was found that the number of EPCs (CD34+, VEGFR2/KDR+) in the peripheral blood of patients with endometrial cancer was significantly elevated compared to the control group, while the number of CECs (CD31+, CD45-) was similar in both groups. A statistically significant increase in EPC count was demonstrated only in G1 and FIGO IA patients. Based on their findings, the authors suggested that new vessel formation from selected endothelial precursors might occur primarily at the early stages of tumor progression⁽⁴⁶⁾.

CONCLUSIONS

There is, as yet, no biomarker routinely used in endometrial cancer testing. However, as the prevalence of this type of cancer increases, there is a need to develop a screening tool

nia pomenopauzalnego, w wykonanej biopsji wykazano złożoną hiperplazję z atypią, a chorą zakwalifikowano do laparoskopowego zabiegu operacyjnego. Pooperacyjne badanie histopatologiczne ujawniło pojedyncze ognisko raka gruczołowego endometrialnego G1, stadium IA, bez cech inwazji miometrium. Następnie pobrano fragment tkanki guza i przeprowadzono analizę DNA, która wykazała dwie onkogenne somatyczne mutacje *PTEN* – R130G i Ser338fs, te same, które wykryto 10 miesięcy wcześniej w popłuczynach z jamy macicy. Zaobserwowano również zwiększoną częstość występowania zmutowanych alleli w porównaniu z pierwszym badaniem. Po wykonaniu analizy statystycznej stwierdzono, że przypadkowe wystąpienie identycznych mutacji *PTEN* w dwóch różnych próbkach jest bardzo mało prawdopodobne⁽¹⁶⁾.

Założeniem pracy Paprockiej i wsp. było powszechne przekonanie, że krążące komórki śródbłonna (*circulating endothelial cells*, CECs) i komórki progenitorowe śródbłonna (*endothelial progenitor cells*, EPCs) odzwierciedlają stan śródbłonna, jego uszkodzenia i możliwości naprawy. W różnych typach nowotworów stwierdzono zwiększoną liczbę CECs i EPCs, co może być powiązane z angiogenezą nowotworową. Celem analizy było ustalenie, czy we krwi krążącej u kobiet z wczesnym rakiem endometrium stężenia CECs i EPCs różnią się w porównaniu ze zdrowymi kobietami w podobnym wieku. Badanie wykonano za pomocą cytometrii przepływowej ze znakowaniem przeciwciałami anti-CD31, anti-CD45, anti-VEGFR2/KDR i anti-CD34. Zaobserwowano, że liczba EPCs (CD34+, VEGFR2/KDR+) we krwi obwodowej kobiet z rakiem endometrium była znacząco zwiększona w porównaniu z grupą kontrolną, a liczba CECs (CD31+, CD45–) była podobna w obu grupach. Po wykonaniu analizy statystycznie istotny wzrost liczby EPCs wykazano jedynie u chorych z G1 i FIGO IA. Autorzy sugerują, że formowanie nowych naczyń krwionośnych z wyselekcjonowanych prekursorów śródbłonna może zachodzić głównie we wczesnych stadiach progresji nowotworu⁽⁴⁶⁾.

PODSUMOWANIE

Obecnie brak jest rutynowo stosowanego biomarkera dla raka endometrium, jednak wraz ze wzrostem częstości występowania tego typu nowotworu istnieje potrzeba opracowania narzędzia do badań przesiewowych zarówno dla populacji ogólnej, jak i dla populacji podwyższonego ryzyka. Płynna biopsja szybko staje się ważnym narzędziem precyzyjnej, nowoczesnej onkologii. Przeprowadzane badania wskazują, iż zarówno płynna biopsja wykonana z próbki krwi obwodowej, jak i materiał pobrany z jamy macicy, moczu czy popłuczyn z jamy otrzewnej mogą być czułymi i specyficznymi testami diagnostycznymi w raku endometrium. Szczególnie obiecujące są badania świadczące o potencjale wykorzystania płynnej biopsji do identyfikacji pacjentek asymptomatycznych, bez klinicznych objawów choroby nowotworowej; na przykład u jednej z chorych obecność

to be used both in the general and high-risk populations. Liquid biopsy is fast becoming an important step towards the development of modern precision oncology. Studies conducted to date show that both liquid biopsy using a peripheral blood sample and biological material collected from the uterine cavity, urine or peritoneal lavage fluid can serve as sensitive and specific diagnostic tests in endometrial cancer.

Studies demonstrating the potential of liquid biopsy to be used as a tool for identifying asymptomatic patients, without any clinical signs of cancer, are particularly promising. For example, in one patient, genetic mutations were detected 10 months before the onset of symptoms. Currently available diagnostic methods can be beneficial in detecting small microscopic tumors or even individual cells containing cancer-specific mutations before morphological tissue changes appear⁽¹⁶⁾.

Conventional surgical biopsies of tissues are the diagnostic “gold standard” in oncology, providing histopathological information to determine whether a suspicious lesion is malignant or benign. However, they are invasive methods and, depending on the stage of the disease and the size of tissue sample, the quality of genetic analysis of the tumor may be limited⁽⁴⁷⁾. Even though collecting biological material for liquid biopsy is less invasive than in conventional tissue biopsy, both methods are associated with certain limitations. Nonetheless, it is argued that liquid biopsy and traditional tissue biopsy can serve as complementary methods for detecting genetic changes in cancerous tumors⁽⁴⁸⁾. It needs to be stressed that the studies of liquid biopsy reviewed above involved diverse patient groups, and they were conducted using different research methodologies and in different conditions.

The studies published so far should be regarded as pilot projects, while reliable evidence for the utility of molecular analysis in everyday practice in cases of endometrial cancer is yet to emerge. Also, attention should be given to numerous limitations associated with the presented methods, such as relatively short duration of experiments, and hence short follow-up periods, which does not warrant far-reaching conclusions. It must also be noted that the majority of studies were carried out in small groups, and even in individual patients (which could be motivated by economic factors, given the relatively high cost of analyses). Consequently, the reliability of results might be unfavorably affected. Most analyses were conducted on the basis of fundamentally different criteria, which makes them essentially incomparable. Another factor to consider is that the potential molecular targets in liquid biopsy for endometrial cancer, as discussed in this review, do not exhaust the currently available and possible future methods for the determination of various other molecular elements.

Liquid biopsy in endometrial cancer seems to be an interesting direction in the search for new molecular markers, but more research is needed before the method finds applications in daily clinical practice.

mutacji genetycznych wykryto 10 miesięcy przed wystąpieniem objawów. Dostępne obecnie metody diagnostyczne mogą być pomocne w wykrywaniu bardzo małych, mikroskopijnych guzów, a nawet komórek zawierających mutacje specyficzne dla nowotworu, jeszcze przed pojawieniem się morfologicznych zmian tkankowych⁽¹⁶⁾.

Klasyczne chirurgiczne biopsje tkankowe są złotym standardem onkologii, zapewniają informację histopatologiczną, czy podejrzewana zmiana ma złośliwy charakter. Są to z natury metody inwazyjne, a w zależności od stadium choroby i ilości pobranej tkanki jakość analizy genetycznej guza może być ograniczona⁽⁴⁷⁾. Uzyskanie materiału biologicznego do przeprowadzenia płynnej biopsji jest postępowaniem mniej inwazyjnym niż w przypadku klasycznej biopsji tkankowej, obie metody posiadają jednak ograniczenia. Uważa się, że płynna biopsja i biopsja tkankowa mogą zostać komplementarnymi metodami wykrywania zmian genetycznych w guzach nowotworowych⁽⁴⁸⁾.

Należy podkreślić, że przedstawione badania dotyczące płynnych biopsji obejmowały zróżnicowane grupy pacjentek, zastosowano zarówno odmienne metody badawcze, jak i warunki ich przeprowadzania.

Opublikowane dotychczas badania należy uważać za pilotażowe, a na dostarczenie wiarygodnych dowodów na przydatność analizy molekularnej w codziennej praktyce w przypadkach raka endometrium trzeba jeszcze poczekać. Zwrócić trzeba uwagę na liczne ograniczenia przedstawionych metod, w tym m.in. stosunkowo krótki czas wykonywania eksperymentów, a co za tym idzie – krótki okres obserwacji, który nie pozwala na wyciągnięcie daleko idących wniosków. Większość badań została również przeprowadzona w niewielkich grupach, a nawet dotyczyła pojedynczych pacjentek (na co mógł mieć także wpływ aspekt ekonomiczny, jeśli weźmie się pod uwagę stosunkowo wysoki koszt wykonywania badań), co mogło wpłynąć na wiarygodność uzyskanych wyników. W większości analiz przyjęto zupełnie odmienne kryteria ich przeprowadzenia, co czyni je w zasadzie niemożliwymi do porównania pomiędzy sobą. Należy również zaznaczyć, że omówione w niniejszej pracy potencjalne cele oznaczeń molekularnych w płynnej biopsji w raku endometrium, zaczerpnięte z literatury przedmiotu, nie wyczerpują całkowicie dostępnych zarówno obecnie, jak i w przyszłości możliwości oznaczeń różnych pozostałych elementów molekularnych. Wykonywanie płynnej biopsji w raku endometrium wydaje się interesującym kierunkiem poszukiwań nowych markerów molekularnych, jednak potrzeba jeszcze wielu badań, zanim znajdzie ona zastosowanie w codziennej praktyce klinicznej.

Konflikt interesów

Autorzy nie zgłaszają żadnych finansowych ani osobistych powiązań z innymi osobami lub organizacjami, które mogłyby negatywnie wpłynąć na treść publikacji oraz rościć sobie prawo do tej publikacji

Conflict of interest

The authors do not declare any financial or personal links with other persons or organizations that might adversely affect the content of the publication or claim any right to the publication.

Piśmiennictwo / References

1. Neoh KH, Hassan AA, Chen A et al.: Rethinking liquid biopsy: microfluidic assays for mobile tumor cells in human body fluids. *Biomaterials* 2018; 150: 112–124.
2. Muínelo-Romay L, Casas-Arozamena C, Abal M: Liquid biopsy in endometrial cancer: new opportunities for personalized oncology. *Int J Mol Sci* 2018; 19: E2311.
3. von Bubnoff N: Liquid biopsy: approaches to dynamic genotyping in cancer. *Oncol Res Treat* 2017; 40: 409–416.
4. Mader S, Pantel K: Liquid biopsy: current status and future perspectives. *Oncol Res Treat* 2017; 40: 404–408.
5. Koeppel F, Blanchard S, Jovelet C et al.: Whole exome sequencing for determination of tumor mutation load in liquid biopsy from advanced cancer patients. *PLoS One* 2017; 12: e0188174.
6. Cabel L, Proud'hon C, Gortais H et al.: Circulating tumor cells: clinical validity and utility. *Int J Clin Oncol* 2017; 22: 421–430.
7. Trimble CL, Method M, Leitao M et al.: Society of Gynecologic Oncology Clinical Practice Committee: Management of endometrial precancers. *Obstet Gynecol* 2012; 120: 1160–1175.
8. Kölbl AC, Birk AE, Kuhn C et al.: Influence of VEGFR and LHCGR on endometrial adenocarcinoma. *Oncol Lett* 2016; 12: 2092–2098.
9. Wojciechowska U, Czaderny K, Ciuba A et al.: Nowotwory złośliwe w Polsce w 2016 roku. Krajowy Rejestr Nowotworów, Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie, Warszawa 2018.
10. Tupacz-Mosakowska E, Piaskowska-Ćała J, Wydra D: Nowotwór przynon macy – trudności diagnostyczne ilustrowane opisem przypadków. *Ann Acad Med Gedan* 2015; 45: 55–58.
11. Cicchillitti L, Corrado G, De Angeli M et al.: Circulating cell-free DNA content as blood based biomarker in endometrial cancer. *Oncotarget* 2017; 8:115230–115243.
12. Vizza E, Corrado G, De Angeli M et al.: Serum DNA integrity index as a potential molecular biomarker in endometrial cancer. *J Exp Clin Cancer Res* 2018; 37: 16.
13. Roman-Canal B, Moiola CP, Gatiús S et al.: EV-associated miRNAs from peritoneal lavage are a source of biomarkers in endometrial cancer. *Cancers (Basel)* 2019; 11: E839.
14. Srivastava A, Moxley K, Ruskin R et al.: A non-invasive liquid biopsy screening of urine-derived exosomes for miRNAs as biomarkers in endometrial cancer patients. *AAPS J* 2018; 20: 82.
15. Závěský L, Jandáková E, Turyna R et al.: Evaluation of cell-free urine microRNAs expression for the use in diagnosis of ovarian and endometrial cancers. A pilot study. *Pathol Oncol Res* 2015; 21: 1027–1035.
16. Martignetti JA, Pandya D, Nagarsheth N et al.: Detection of endometrial precancer by a targeted gynecologic cancer liquid biopsy. *Cold Spring Harb Mol Case Stud* 2018; 4: a003269.
17. Mariscal J, Fernandez-Puente P, Calamia V et al.: Proteomic characterization of epithelial-like extracellular vesicles in advanced endometrial cancer. *J Proteome Res* 2019; 18: 1043–1053.
18. Xu H, Gong Z, Shen Y et al.: Circular RNA expression in extracellular vesicles isolated from serum of patients with endometrial cancer. *Epigenomics* 2018; 10: 187–197.
19. In 't Veld SGJG, Wurdinger T: Tumor-educated platelets. *Blood* 2019; 133: 2359–2364.
20. Kölbl AC, Wellens R, Koch J et al.: Endometrial adenocarcinoma: analysis of circulating tumour cells by RT-qPCR. *Anticancer Res* 2016; 36: 3205–3209.
21. Paoletti C, Hayes DF: Circulating tumor cells. *Adv Exp Med Biol* 2016; 882: 235–258.

22. Kiss I, Kolostova K, Matkowski R et al.: Correlation between disease stage and the presence of viable circulating tumor cells in endometrial cancer. *Anticancer Res* 2018; 38: 2983–2987.
23. Bogani G, Liu MC, Dowdy SC et al.: Detection of circulating tumor cells in high-risk endometrial cancer. *Anticancer Res* 2015; 35: 683–687.
24. Alonso-Alconada L, Muinelo-Romay L, Madisoo K et al.; ENITEC Consortium: Molecular profiling of circulating tumor cells links plasticity to the metastatic process in endometrial cancer. *Mol Cancer* 2014; 13: 223.
25. Phallen J, Sausen M, Adleff V et al.: Direct detection of early-stage cancers using circulating tumor DNA. *Sci Transl Med* 2017; 9: eaan2415.
26. Cheng X, Zhang L, Chen Y et al.: Circulating cell-free DNA and circulating tumor cells, the “liquid biopsies” in ovarian cancer. *J Ovarian Res* 2017; 10: 75.
27. Dobrzycka B, Terlikowski SJ, Mazurek A et al.: Circulating free DNA, p53 antibody and mutations of KRAS gene in endometrial cancer. *Int J Cancer* 2010; 127: 612–621.
28. Bolivar AM, Luthra R, Mehrotra M et al.: Targeted next-generation sequencing of endometrial cancer and matched circulating tumor DNA: identification of plasma-based, tumor-associated mutations in early stage patients. *Mod Pathol* 2019; 32: 405–414.
29. Zhang Y, Qu X, Qu PP: Value of circulating tumor cells positive for thyroid transcription factor-1 (TTF-1) to predict recurrence and survival rates for endometrial carcinoma. *J BUON* 2016; 21: 1491–1495.
30. Nair N, Camacho-Vanegas O, Rykunov D et al.: Genomic analysis of uterine lavage fluid detects early endometrial cancers and reveals a prevalent landscape of driver mutations in women without histopathologic evidence of cancer: a prospective cross-sectional study. *PLoS Med* 2016; 13: e1002206.
31. Fang S, Tian H, Li X et al.: Clinical application of a microfluidic chip for immunocapture and quantification of circulating exosomes to assist breast cancer diagnosis and molecular classification. *PLoS One* 2017; 12: e0175050.
32. Dziechciowski M, Zapala B, Skotniczny K et al.: Diagnostic and prognostic relevance of microparticles in peripheral and uterine blood of patients with endometrial cancer. *Ginekol Pol* 2018; 89: 682–687.
33. Meng X, Pan J, Sun S et al.: Circulating exosomes and their cargos in blood as novel biomarkers for cancer. *Transl Cancer Res* 2018; 7 Suppl 2: S226–S242.
34. Maida Y, Takakura M, Nishiuchi T et al.: Exosomal transfer of functional small RNAs mediates cancer-stroma communication in human endometrium. *Cancer Med* 2016; 5: 304–314.
35. Wyciszkievicz A, Kalinowska-Lyszczarz A, Nowakowski B et al.: Expression of small heat shock proteins in exosomes from patients with gynecologic cancers. *Sci Rep* 2019; 9: 9817.
36. Joosse SA, Pantel K: Tumor-educated platelets as liquid biopsy in cancer patients. *Cancer Cell* 2015; 28: 552–554.
37. Best MG, Sol N, Kooi I et al.: RNA-Seq of tumor-educated platelets enables blood-based pan-cancer, multiclass, and molecular pathway cancer diagnostics. *Cancer Cell* 2015; 28: 666–676.
38. Erpenbeck L, Schön MP: Deadly allies: the fatal interplay between platelets and metastasizing cancer cells. *Blood* 2010; 115: 3427–3436.
39. Xu XR, Yousef GM, Ni H: Cancer and platelet crosstalk: opportunities and challenges for aspirin and other antiplatelet agents. *Blood* 2018; 131: 1777–1789.
40. Chakraborty C, Das S: Profiling cell-free and circulating miRNA: a clinical diagnostic tool for different cancers. *Tumour Biol* 2016; 37: 5705–5714.
41. Vishnoi A, Rani S: MiRNA biogenesis and regulation of diseases: an overview. In: Rani S (ed.): *MicroRNA Profiling. Methods and Protocols*. Humana Press, New York 2016: 1–10.
42. Yu XM, Wu YC, Liu X et al.: Cell-free RNA content in peripheral blood as potential biomarkers for detecting circulating tumor cells in non-small cell lung carcinoma. *Int J Mol Sci* 2016; 17: E1845.
43. Kim WT, Jeong P, Yan C et al.: UBE2C cell-free RNA in urine can discriminate between bladder cancer and hematuria. *Oncotarget* 2016; 7: 58193–58202.
44. Závaský L, Jandakova E, Turyna R et al.: Supernatant versus exosomal urinary microRNAs. Two fractions with different outcomes in gynaecological cancers. *Neoplasma* 2016; 63: 121–132.
45. Hutt S, Taylor A, Ellis P et al.: The role of biomarkers in endometrial cancer and hyperplasia: a literature review. *Acta Oncol* 2019; 58: 342–352.
46. Paprocka M, Kieda C, Kantor A et al.: Increased endothelial progenitor cell number in early stage of endometrial cancer. *Int J Gynecol Cancer* 2017; 27: 947–952.
47. Chu D, Park BH: Liquid biopsy: unlocking the potentials of cell-free DNA. *Virchows Arch* 2017; 471: 147–154.
48. Jung A, Kirchner T: Liquid biopsy in tumor genetic diagnosis. *Dtsch Arztebl Int* 2018; 115: 169–174.