

SO SÁNH KIỂU ĐỘT BIẾN GEN GIỮA MẪU SINH THIẾT LỎNG VÀ SINH THIẾT MÔ Ở BỆNH NHÂN UNG THƯ ĐẠI TRỰC TRÀNG GIAI ĐOẠN SỚM

Lương Bắc An¹, Nguyễn Phúc Hằng¹, Lê Gia Hoàng Linh¹, Hồ Quốc Chương¹, Giang Hoa²,
Trần Đức Huy¹, Nguyễn Thị Quỳnh Thơ¹, Nguyễn Hoài Nghĩa¹, Ngô Quốc Đạt¹,
Nguyễn Hoàng Bắc¹, Đỗ Thị Thanh Thủy², Trần Diệp Tuấn¹

TÓM TẮT

Mục tiêu: Ung thư đại trực tràng là dạng thư ung thường gặp hiện nay và đang có xu hướng trẻ hoá. Các đột biến gen liên quan đến ung thư đại trực tràng sử dụng mô khối u để phân tích di truyền nhằm phục vụ cho theo dõi điều trị và thường gặp hạn chế trong nhiều trường hợp, đặc biệt là trường hợp bệnh nhân không đủ sức khoẻ để lấy mẫu sinh thiết hoặc đã di căn. Sử dụng phương pháp giải trình tự thế hệ mới trên mẫu sinh thiết lỏng giúp tìm ra các đột biến trực tiếp trong dòng máu của bệnh nhân là một hướng đi đầy hứa hẹn. Tuy nhiên, tỉ lệ tương đồng giữa các đột biến gen trên mẫu máu và mẫu mô u vẫn chưa rõ ràng, đặc biệt là ở giai đoạn sớm của ung thư.

Đối tượng - Phương pháp: Phương pháp giải trình tự thế hệ mới tìm các đột biến trên 20 gen có tần suất đột biến cao ở ung thư đại trực tràng. Mẫu máu và mô tương ứng được thu nhận từ 18 bệnh nhân ung thư đại trực tràng giai đoạn giai đoạn I, II và III được tuyển chọn từ 10/2019 đến 10/2020.

Kết quả: Kết quả giải trình tự của 18 mẫu máu và mô u tương ứng, ghi nhận có 14/18 trường hợp có kết quả tương đồng, đạt tỉ lệ 77,8%. Trong đó, 9 ca tương đồng về kiểu đột biến gen và 5 ca không ghi nhận thấy đột biến ở cả mẫu máu và mô u. Số ca bất tương đồng về kết quả đột biến là 4 trường hợp.

Kết luận: So sánh kết quả đột biến gen giữa mẫu máu và mô u cho thấy là các ctDNA được phóng thích từ trong khối u vào dòng máu. Kết quả nghiên cứu củng cố vai trò của phương pháp sinh thiết lỏng có thể được mở rộng để phát hiện sớm ung thư đại trực tràng nói riêng và các loại ung thư nói chung, giúp bệnh nhân có thêm lựa chọn khi thực hiện các xét nghiệm về đặc điểm di truyền của khối u phục vụ cho công tác theo dõi điều trị.

Từ khóa: cfDNA, FFPE, sinh thiết lỏng, UTĐTT

ABSTRACT

COMPARISON OF GENETIC MUTATION TYPES BETWEEN LIQUID BIOPSY AND TISSUE BIOPSY SAMPLES IN PATIENTS WITH EARLY STAGES OF COLORECTAL CANCER
Luong Bac An, Nguyen Phuc Hang, Le Gia Hoang Linh, Ho Quoc Chuong, Giang Hoa, Tran Duc Huy,
Nguyen Thi Quynh Tho, Nguyen Hoai Nghia, Ngo Quoc Dat, Nguyen Hoang Bac,
Do Thi Thanh Thuy, Tran Diep Tuan

* Ho Chi Minh City Journal of Medicine * Vol. 25 - No 1 - 2021: 112-117

Background: Nowadays, colorectal cancer is considered to be one of the more common cancers and has the tendency to be found in younger people. Currently, genetic mutation associated with colorectal cancer tumor tissues are genetically analysed to monitor treatment. However, the method is limited in many circumstances, such as when the patient's health is not sufficient for a tissue biopsy, or metastasis had occurred. Using next generation sequencing on liquid biopsies to find genetic mutations in patients' blood is a promising alternative

¹Trường Đại học Y Dược TP. Hồ Chí Minh
Tác giả liên lạc: PGS.TS.BS. Trần Diệp Tuấn

²Viện Di Truyền Y học TP. Hồ Chí Minh
ĐT: 0985.598.528 Email: dieptuan@ump.edu.vn

path. Nonetheless, the similarity rates of genetic mutations between blood and tissue samples are still unclear, especially in the early stages of cancer.

Methods: Next generation sequencing was used to identify over 20 genes with a high mutation rate in colorectal cancer. Blood samples and their corresponding tissues were taken from 18 patients at stages I, II and III of colorectal cancer, selected from October 2019 to October 2020.

Results: Next generation sequencing revealed that 14 out of 18 samples had similar results, with a similarity rate at 77.8%. Of these samples, 9 cases showed similarities in the type of genetic mutations, whereas no mutations were observed in both blood samples and tissues samples of 5 cases. The lack of similarities in genetic mutation results was seen in four cases.

Conclusion: Comparisons on genetic mutations between blood samples and tissue samples demonstrated that ctDNA has been released from the tumours into the blood. Findings from this study support the wider use of liquid biopsy for early detection of colorectal cancer in particular and different types of cancer in general, to provide patients with more options for tumour genetic characteristics testing for treatment monitoring.

Keywords: cfDNA, FFPE, liquid biopsy, colorectal cancer

ĐẶT VẤN ĐỀ

Ung thư đại trực tràng (UTĐTT) là một trong những bệnh ung thư thường gặp. Theo GLOBOCAN 2018, tỉ lệ mắc ung thư đại trực tràng đứng hàng thứ 3 trong 5 loại ung thư hàng đầu, sau ung thư phổi và ung thư vú. UTĐTT đứng hàng thứ 4 ở nam giới và thứ 2 ở nữ giới trên toàn cầu với khoảng 1,8 triệu trường hợp mắc mới (10,2%) và 881.000 trường hợp tử vong (9,2%) chỉ trong năm 2018⁽¹⁾. Các chuyên gia cũng tiên đoán tỉ suất mắc bệnh UTĐTT sẽ tăng lên đến 2,2 triệu ca mắc mới và 1,1 triệu ca tử vong vào năm 2030. Tỉ lệ nam giới mắc UTĐTT cao hơn nữ giới.

Sinh thiết lỏng (Liquid Biopsy) là phương pháp mới được sử dụng trong chẩn đoán, theo dõi điều trị ung thư và khắc phục được những yếu điểm của việc sinh thiết mô. Sinh thiết lỏng được phát triển dựa trên nguyên tắc phát hiện sự hiện diện của những phân mảnh DNA ngoại bào (cell free DNA - cfDNA) được phóng thích từ tế bào ung thư vào máu ngoại biên. Thay vì dựa trên các phương pháp sinh thiết mô u gây đau đớn và ảnh hưởng đến sức khỏe bệnh nhân, việc phát hiện các đột biến của khối u có thể được phát hiện dựa trên việc lấy 5-10 ml máu ngoại biên của bệnh nhân. Sinh thiết lỏng cho phép thu mẫu nhanh chóng, ít ảnh hưởng đến sức khỏe của bệnh nhân. Nhờ đó có thể phát

hiện, theo dõi được sự xuất hiện và phát triển của các loại đột biến xảy ra trong quá trình điều trị của bệnh nhân.

DNA ngoại bào mang đột biến ung thư (circulating tumor DNA-ctDNA) là cfDNA được phóng thích từ tế bào ung thư. Các ctDNA thường được phân biệt với các cfDNA từ tế bào bình thường dựa trên các đột biến sinh dưỡng (somatic mutation) hoặc epigenetics (thường là sự methyl hóa trên DNA) gây ung thư. Hàm lượng ctDNA trên tổng số cfDNA trong bệnh nhân ung thư rất biến động, có thể trên 25% nhưng cũng có thể xuống thấp đến 0,01% (nghĩa là cứ mỗi 10.000 phân tử cfDNA trong máu, chỉ có 1 phân tử ctDNA được phóng thích từ tế bào ung thư)^(2,3). Tỉ lệ này cũng được gọi là tần suất đột biến (MAF: mutation allele fraction). MAF biến động phụ thuộc vào dạng ung thư và giai đoạn bệnh. Giai đoạn bệnh càng muộn, khối u càng lớn, ctDNA được phóng thích vào máu càng tăng. ctDNA được phát hiện ở 100% bệnh nhân ung thư buồng trứng và đại trực tràng, tuy nhiên ở bệnh nhân u não, chỉ khoảng 10% bệnh nhân là phát hiện được ctDNA⁽⁴⁾. Nguyên nhân là do hàng rào máu não hạn chế sự khuếch tán của ctDNA vào tuần hoàn máu.

Quá trình cố định mô trong formalin (FFPE, formalin-fixed, paraffin embedded tissue) có thể gây tổn thương DNA như gây đứt gãy mạch

DNA, “cross-link” giữa DNA với DNA hay DNA với protein, gây biến đổi nucleotide (đặc biệt C thành T và G thành A) hay hiện tượng deamin hóa. Nghiên cứu trước đây cho thấy kết quả giải trình tự của DNA tách chiết từ mô u (FFPE) với tần suất đột biến dưới 10% có tín hiệu giả cao, trong khi trên 10% thì kết quả đột biến sẽ đáng tin cậy⁽⁵⁾. Do đó, nghiên cứu đánh giá độ tương đồng đột biến giữa mẫu máu và mẫu mô UTĐTT là cần thiết đặc biệt với bệnh nhân ở giai đoạn sớm.

ĐỐI TƯỢNG-PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Đối tượng nghiên cứu

Các bệnh nhân ung thư đại trực tràng (UTĐTT) giai đoạn I, II, III (theo tiêu chuẩn của AJCC VII) từ bệnh viện Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh từ tháng 09/2019 - 09/2020.

Tiêu chuẩn chọn

Bệnh nhân tham gia nghiên cứu thỏa mãn các điều kiện sau:

- (i) bệnh nhân đồng ý tự nguyện tham gia nghiên cứu sau khi được tư vấn rõ các điều kiện và nguy cơ khi tham gia nghiên cứu;
- (ii) bệnh nhân được chẩn đoán UTĐTT giai đoạn I – III;
- (iii) bệnh nhân chưa qua điều trị can thiệp;
- (iv) bệnh nhân không truyền máu trong vòng 3 tháng trước khi tham gia nghiên cứu.

Tiêu chí loại ra

Khi bệnh nhân không đáp ứng được tiêu chí chọn mẫu. Bệnh nhân được tuyển chọn.

Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp thực hiện

10 ml máu của bệnh nhân được thu giữ trong ống BD Vacumtainer, sau đó được quay ly tâm 2 lần (1600 x g trong 10 phút tại 4°C và 16.000 x g trong 10 phút tại 4°C).

Huyết thanh thu được được bảo quản ở - 80°C. CfDNA được tách chiết bằng bộ hoá chất MagMAX Cell-Free DNA Isolation kit (Thermo Fisher, USA) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. CfDNA tách chiết được chuẩn bị thư viện bằng

bộ hoá chất Accel-NGS 2S DNA Library Kit (Swift Biosciences, USA) theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Nồng độ của thư viện được định lượng bằng hệ thống QuantiFluor dsDNA (Promega, USA).

DNA từ mô u (FFPE) được tách chiết bằng bộ kit QiaAmp DNA FFPE kit (Qiagen), qui trình tách chiết được tiến hành theo hướng dẫn của bộ kit, quá trình tách chiết mẫu có xử lý với Uracil-N-Glycosylase để loại bỏ các gốc cytosine bị deamin hóa. DNA tách chiết từ mẫu FFPE được phân mảnh bằng enzyme fragmentase (NEBNext dsDNA Fragmentase). Phản ứng phân cắt được thực hiện tại 37°C trong 25 phút. Sản phẩm sau phân cắt được kiểm tra bằng điện di trên gel Agarose, kích thước sản phẩm tập trung 150bp-300bp. Sản phẩm DNA sau phân mảnh được tiến hành sửa đuôi (NEBNext FFPE DNA Repair Mix) và chuẩn bị thư viện (NEBNext Ultra II DNA Library Prep Kit for Illumina). Các bước tiến hành theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

200 ng sản phẩm từ bước tạo thư viện của mẫu sẽ được tiến hành lai với hỗn hợp mẫu dò đặc hiệu cho 20 gene mục tiêu (*APC, TP53, FAT4, LRP1B, TGFBR, FAT1, BRAF, KMT2C, KMT2D, ARID1A, TRRAP, ZFH3, TCF7L2, KRAS, PIK3CA, ACVR2A, FBXW7, RNF43, SMAD4, PREX2*) - qui trình theo bộ hoá chất xGen Lockdown Reagents. Việc giải trình tự được thực hiện trên hệ thống Illumina NextSeq 550 với NextSeq 500/550 Mid output kits v2 (150 cycles), có độ phủ trung bình 15.000 X với mẫu thư viện được chuẩn bị từ mẫu máu và 1000X với thư viện được chuẩn bị từ mẫu FFPE.

Y đức

Nghiên cứu được tài trợ bởi Quỹ phát triển khoa học và công nghệ thành phố Hồ Chí Minh (52/2019/HĐ-QPTKHCN) và được thông qua bởi Hội đồng Đạo đức trong nghiên cứu Y sinh học Đại học Y Dược TP. HCM, số 383/ĐHYD-HĐĐĐ, ngày 30/7/2019.

KẾT QUẢ

Bảng 1: Đặc điểm thông tin lâm sàng

Đặc điểm lâm sàng		n=18	%
Giới tính	Nam	11	61,1%
	Nữ	7	38,9%
Tuổi (Trung vị (Tứ phân vị))		58,5 (51-65)	
Giai đoạn bệnh	0	1	5,6%
	I	1	5,6%
	II	7	38,9%
	III	6	33,3%
	Chưa phân loại	3	16,6%
Mô học	Carcinôm tuyến	18	100%
Vị trí khối u	Đại tràng	12	66,6%
	Trực tràng	5	27,8%
	Ống hậu môn	1	5,6%

Số lượng mẫu thu là được 18 mẫu máu có kèm mẫu FFPE của bệnh nhân UTĐTT giai đoạn I, II, III. Trong đó, bệnh nhân có độ tuổi trung bình là 59,1 tuổi với trung vị 58,5 tuổi (tứ phân

vị: 51-65). Nam giới mắc bệnh nhiều hơn nữ giới với tỉ lệ lần lượt là 61,1% và 38,9%. Về giai đoạn bệnh, tỉ lệ bệnh nhân ở giai đoạn sớm (giai đoạn 0, I và II) chiếm 50,1%, giai đoạn III là 33,3%, còn lại là chưa phân giai đoạn bệnh. Hầu hết các bệnh nhân tham gia nghiên cứu đều có kết quả mô học là carcinôm tế bào tuyến và vị trí của khối u nằm chủ yếu tại đại tràng (66,6%), 1 ca có khối u nằm tại ống hậu môn (5,6%), còn lại nằm tại trực tràng (27,8%).

Trong nghiên cứu này, chúng tôi giải trình tự tại độ sâu 15.000X đối với mẫu máu (sinh thiết lỏng) từ bệnh nhân ung thư đại trực tràng và độ sâu 1.000X cho đối với mẫu mô u tương ứng từ cùng bệnh nhân. Sau đó, chúng tôi so sánh 2 nhóm kết quả này để xác định sự tương đồng qui trình sinh thiết lỏng. Kết quả phân tích đột biến được trình bày trong *Bảng 2*.

Bảng 2: Kết quả phân tích đột biến giữa mẫu sinh thiết lỏng và mô u

Mã mẫu	Kết quả giải trình tự			
	Sinh thiết lỏng		Mô u (FFPE)	
	Đột biến	MAF (%)	Đột biến	MAF (%)
CRCB02	APC (R1432*)	1,5%	TP53 (R175H)	26,3%
CRCB03	PIK3CA (R88Q)	4,7%	PIK3CA (R88Q)	59,9%
	APC (S439*)	3,7%	APC(S439*)	25,6%
CRCB04	(-)		KRAS(G12V)	37,8%
CRCB05	FBXW7(R505C)	4,3%	(-)	
	APC(Ser375*)	2,5%	(-)	
CRCB06	APC (E1288*)	4,9%	APC (E1228*)	33,3%
CRCB09	KRAS (G12V)	0,13%	KRAS (G12V)	30%
CRCB14	APC (I1557*)	43,7%	APC (I1557*fs)	32,2%
	TP53 (R342*)	8,1%	TP53 (R342*)	25%
CRCB15	PIK3CA (Q546R)	4,4%	PIK3CA (Q546R)	22,9%
CRCB16	TP53 (R210*)	0,2%	TP53 (R210*)	32,4%
CRCB17	TP53 (R213*)	9,6%	TP53(R213*)	60,7%
CRCB18	TP53 (C176F)	4,8%	(-)	
	TP53 (C176W)	3,7%	(-)	
CRCB19	TP53 (R248Q)	5,6%	TP53 (R248Q)	15,4%
CRCB20	APC (R1432*)	0,19%	APC (R1432*)	4%
CRCB21	(-)		(-)	
CRCB22	(-)		(-)	
CRCB23	(-)		(-)	
CRCB25	(-)		(-)	
CRCB29	(-)		(-)	

So sánh kết quả giải trình tự giữa 18 mẫu máu và mô u tương ứng, chúng tôi ghi nhận được có 14/18 ca có kết quả tương đồng (đạt tỉ lệ

77,8%), trong đó có 9 ca tương đồng về kiểu đột biến và 5 ca không ghi nhận thấy đột biến ở cả mẫu máu và mô u. Số ca bất tương đồng là 4.

Trong 4 ca bất tương đồng có 1 ca không ghi nhận đột biến tại mẫu máu nhưng có đột biến tại mô u; 2 ca có đột biến tại mẫu máu nhưng không có đột biến tại mô u và 1 ca có kết quả đột biến không tương thích giữa mẫu mô máu và mô u.

BÀN LUẬN

Đến hiện nay, sinh thiết mô u vẫn được xem là tiêu chuẩn vàng cho giải phẫu bệnh và cho việc xác định đặc tính di truyền của khối u. Do vậy, để đánh giá được độ chính xác của qui trình sinh thiết lỏng, chúng tôi so sánh kết quả giải trình tự thu được từ mẫu sinh thiết lỏng với kết quả giải trình tự từ mẫu sinh thiết mô u.

Các phân tử ctDNA có nguồn gốc là những phân tử cfDNA có mang đột biến dòng sinh dưỡng (somatic mutations) được phóng thích từ các tế bào khối u vào trong dòng máu. Tuy nhiên, hàm lượng ctDNA có trong máu rất biến động, phụ thuộc vào nhiều yếu tố, nhưng chủ yếu là liên quan tới các yếu tố như: giai đoạn ung thư, kích thước khối u và vị trí của khối u⁽⁶⁾.

Đặc điểm nổi bật của kỹ thuật sinh thiết lỏng bằng công nghệ giải trình tự thế hệ mới cho phép phát hiện các đột biến có tần suất rất thấp, có thể đạt tới ngưỡng 0,01%. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy những đột biến có tần suất rất thấp như mẫu CRCB09 (0,13%), CRCB16 (0,2%) và CRCB20 (0,19%) (Bảng 2). Chứng minh được rằng, sinh thiết lỏng có khả năng phát hiện được ctDNA ở các giai đoạn bệnh sớm so với các kỹ thuật giải trình tự khác như Sanger.

Nhìn chung, so sánh kết quả giải trình tự của 18 ca UTĐTT, chúng tôi bước đầu ghi nhận độ tương đồng về kết quả đột biến gen giữa mẫu sinh thiết lỏng và sinh thiết mô đạt 77,8%. Tỷ lệ này tương đương với các nghiên cứu của Grasselli J⁽⁷⁾.

Các trường hợp không tương thích về kết quả giải trình tự, chúng tôi có đưa ra một số suy luận sau. Trường hợp 1 ca không có đột biến tại mẫu máu nhưng mang đột biến tại mẫu mô u (CRCB04) thuộc giai đoạn 0 (pTisNoMo), đây là giai đoạn rất sớm, do đó hàm lượng ctDNA

phóng thích vào máu không đủ để phát hiện trong 10 ml máu toàn phần được lấy từ bệnh nhân⁽⁸⁾. Bản chất của ctDNA là những phân tử cfDNA mang đột biến có nguồn gốc từ các tế bào ung thư⁽⁹⁾. Trong khi đó khối u là hỗn hợp không đồng nhất các loại tế bào ung thư, nên đối với những trường hợp giai đoạn quá sớm khi khối u có kích thước nhỏ hoặc vị trí các tế bào mang ctDNA nằm sâu bên trong khối u sẽ không thuận lợi phóng thích ctDNA vào máu. Khi đó, hàm lượng ctDNA được phóng thích vào trong máu có thể thấp và không đủ để phát hiện.

2 trường hợp được chúng tôi ghi nhận có phát hiện đột biến ở mẫu máu nhưng không ghi nhận tại mẫu mô u (CRCB05 và CRCB18). Kỹ thuật sinh thiết lỏng cho phép đánh giá tổng thể đặc điểm di truyền của khối u, do phân tích tích vật liệu di truyền là các ctDNA phóng thích từ khối u vào trong máu. Trong khi đó, đối với sinh thiết mô u thì đặc điểm di truyền được phân tích chỉ mang tính cục bộ tại vùng mô u được lấy (hoặc cắt lát khi giải trình tự). Chính vì vậy, các đột biến chúng tôi ghi nhận được ở mẫu máu có thể thuộc quần thể tế bào ung thư có vị trí khác trong khối u mà khi phân tích mẫu mô u chúng tôi không lấy được tại các vị trí này.

Nhận xét về trường hợp bất tương đồng kết quả đột biến gen của mẫu CRCB02. Kết quả từ mẫu máu cho kết quả mang đột biến gen APC trong khi đó ở mẫu mô là mang đột biến TP53. Có thể biện luận cho trường hợp này là đột biến gen APC có thể không xuất phát từ khối u mà có thể có nguồn gốc từ các tế bào gốc dòng mầm tạo máu. Do qui trình sinh thiết lỏng phát hiện ctDNA trên nền mẫu máu, nên sẽ không thể tránh khỏi tình trạng có đột biến sinh dưỡng thể khảm có nguồn gốc từ các tế bào máu. Một trong các đột biến thể khảm đó là những đột biến từ dòng tế bào tạo máu (clonal hematopoiesis). Đây là những đột biến sinh dưỡng được tích lũy trong các tế bào gốc hoặc tế bào tiền thân tạo máu. Các đột biến này giúp các tế bào gốc và tế bào tiền thân tạo máu duy trì tính "gốc"^(10,11).

KẾT LUẬN

Kĩ thuật sinh thiết lỏng ứng dụng công nghệ giải trình tự thế hệ mới trên 18 mẫu bệnh nhân UTĐTT giai đoạn sớm cho thấy độ tương đồng phát hiện các đột biến giữa mẫu máu và mẫu mô tương ứng đạt 77,8%. Nghiên cứu đã cho thấy tiềm năng ứng dụng công nghệ giải trình tự thế hệ mới phát hiện các ctDNA ở giai đoạn sớm của UTĐTT, đóng góp ý nghĩa quan trọng trong thực hành lâm sàng ở bệnh nhân UTĐTT nói riêng và các bệnh lý về ung thư nói chung. Mở ra một triển vọng mới trong lĩnh vực phát hiện sớm cũng như theo dõi điều trị ung thư.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*, 68:394–424.
2. Bettgowda C, Sausen M, Leary RJ, Kinde I, Wang Y, Agrawal N, Bartlett BR, Wang H, Lubner B, Alani RM (2014). Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Sci Transl Med*, 6:224ra24–224ra24.
3. Diehl F, Li M, Dressman D, et al (2005). Detection and quantification of mutations in the plasma of patients with colorectal tumors. *Proc Natl Acad Sci*, 102:16368–16373.
4. Pessoa LS, Heringer M, Ferrer VP (2020). ctDNA as a cancer biomarker: a broad overview. *Crit Rev Oncol Hematol*, 155:103109.
5. Wong SQ, Li J, Tan AY-C, et al (2014). Sequence artefacts in a prospective series of formalin-fixed tumours tested for mutations in hotspot regions by massively parallel sequencing. *BMC Med Genomics*, 13:7-23.
6. Stroun M, Lyautey J, Lederrey C, Olson-Sand A, Anker P (2001). About the possible origin and mechanism of circulating DNA: Apoptosis and active DNA release. *Clin Chim Acta*, 313:139–142.
7. Grasselli J, Elez E, Caratù G, et al (2017). Concordance of blood- and tumor-based detection of RAS mutations to guide anti-EGFR therapy in metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*, 28:1294–1301.
8. Fiala C, Diamandis EP (2018). Utility of circulating tumor DNA in cancer diagnostics with emphasis on early detection. *BMC Med*, doi: 10.1186/s12916-018-1157-9.
9. Hundt S, Haug U, Brenner H (2007). Blood markers for early detection of colorectal cancer: a systematic review. *Cancer Epidemiol Prev Biomark*, 16:1935–1953.
10. Li BT, Janku F, Jung B, et al (2019). Ultra-deep next-generation sequencing of plasma cell-free DNA in patients with advanced lung cancers: results from the Actionable Genome Consortium. *Ann Oncol*, 30:597–603.
11. Razavi P, Li BT, Brown DN, et al (2019). High-intensity sequencing reveals the sources of plasma circulating cell-free DNA variants. *Nat Med*, 25:1928–1937.

Ngày nhận bài báo:	30/11/2020
Ngày nhận phản biện nhận xét bài báo:	20/02/2021
Ngày bài báo được đăng:	10/03/2021