

Kanser Yönetiminde Yeni Yöntemler: Likid Biyopsi Tekniği ve Biyobelirteçleri

New Methods in Cancer Management: Liquid Biopsy Technique and Biomarkers

Arta FEJZULLAHU^a, A. İltter GÜNEY^b

^aMarmara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik ABD, İstanbul, TÜRKİYE

^bMarmara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik ABD, İstanbul, TÜRKİYE

ÖZET Günümüzde kanser tanısı için gerekli yöntem, cerrahi işlem gerektiren doku biyopsi tekniğinin uygulanmasıdır. Yöntemin cerrahi işlem gerektirmesi, tümör heterojenite ve mekânsal gibi sınırlamaları olması nedeni ile kanserin erken tanısı, takibi ve hedefe yönelik tedavi ile birlikte bireysel tıp alanındaki ilerlemelere yönelik hastaya kolaylık sağlayan noninvaziv tekniklere ihtiyaç vardır. Bu doğrultuda, son yıllarda noninvaziv bir yöntem olan “likid biyopsi (LB)” tekniği hızla gelişmeye başlamış ve kanser tanısı, tedavi planlaması, kanserin gerçek zamanlı takibi ilaç direnci tespiti için alternatif bir yöntem olabileceğine inanılmaktadır. LB tekniği, kanda dolaşan tümör hücrelerini veya tümör hücrelerinin DNA parçalarını tespit etmek amacıyla kan örneği üzerinde yapılan test olarak tanımlanmaktadır. Bu durumda dolaşımdaki kan kullanılıp klinik açıdan önemli olan genetik biyobelirteçler tespit edilebilir ve moleküler analizlerde detaylı olarak incelenebilir. Dahası tüm hastalık bölgelerinden gelen genetik materyal dolaşımda serbest olarak bulunduğu için, kan örnekleme vücutta gelişen kanserin gerçek zamanlı, temsili bir görüntüsünü sağlayabilir. Teknik kanda apoptoz veya nekroz yoluyla kana salınan CTC, ctDNA ve hücre dışı veziküller bileşenlerin analizini kapsamaktadır. Bu derlemede, kanser tedavilerine yardımcı olacağına inandığımız, LB tekniğinin yeteneğine ve bileşenlerine odaklanılacaktır.

ABSTRACT The traditional method necessary for the diagnosis of cancer is the application of tissue biopsy technique that requires surgical procedure. However, due to surgical procedures and tumor heterogeneity and spatial limitations, there is a need for noninvasive techniques that facilitate the patient for early diagnosis, follow-up and targeted treatment together with advances in personalized medicine. In this respect, liquid biopsy (LB) technique, which is a noninvasive method, has started to develop rapidly in recent years and it is believed that it can be used as an alternative method for cancer diagnosis, treatment planning, real time monitoring of cancer and drug resistance detection. LB is defined as a test performed on a blood sample to detect circulating tumor cells or DNA fragments of tumor cells. In this case, circulating blood can be used for detection of clinically important genetic biomarkers and analyzed in details for molecular analysis. Moreover, since genetic material from all disease sites is freely available in the circulation, blood sampling can provide a real time, representative image of cancer developing in the body. The technique involves the analysis of CTC, ctDNA and extracellular vesicles compounds that are released into the blood via apoptosis or necrosis in the blood. In this review, we will focus on the capability and components of the LB technique that we believe will help cancer treatments in more advance.

Anahtar Kelimeler: Kanser; likid biyopsi; CTC; ctDNA; eksozomlar; miRNA

Keywords: Cancer; liquid biopsy; CTCs; ctDNA; exosomes; miRNA

Likid biyopsi (LB) tekniği, “kanda dolaşan bir tümörden kanser hücrelerini veya kanda dolaşan tümör hücrelerinin DNA parçalarını tespit etmek amacıyla bir kan örneği üzerinde yapılan bir test olarak tanımlanmaktadır”.¹ LB tekniğini özel kılan önemli noktalardan birisi, cerrahi bir işlem gerektiren doku biyopsisinden farklı olarak, sadece hastanın kanından

alınan küçük miktarda bir kan örneği ile gerçekleştirilen invaziv olmayan bir yöntem olmasıdır.

LB tekniği üzerindeki çalışmalar çok eskiye dayansa da başlangıçta LB'nin uygulanması bilim topluluğu tarafından çok fazla ilgi ve dikkat çekmemiştir. Ancak PubMed (NCBI) veri tabanında, 1980'den itibaren LB dolaşımında tümör hücresi, dolaşımda tümör

Correspondence: Arta FEJZULLAHU

Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik ABD, İstanbul, TÜRKİYE/TURKEY

E-mail: artafejzullahu@marun.edu.tr



Peer review under responsibility of Türkiye Klinikleri Journal of Internal Medicine.

Received: 20 Oct 2019 **Accepted:** 21 Mar 2020 **Available online:** 15 Apr 2020

2458-8733 / Copyright © 2020 by Türkiye Klinikleri. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

DNA'sı, dolaşımda serbest DNA, eksozomlar ve miRNA arama terimlerini kullanan makaleler araştırıldığında, LB'ye hızla artan ilgi görülüyor (Şekil 1). Bu derlemede, kanser yönetiminde önemli rol oynadığı gözlemlenen, kanser hücrelerine ait kanda tespit edilebilen biyobelirteçlere (CTCs, ctDNA, eksozomlar, miRNA) odaklanılacaktır.

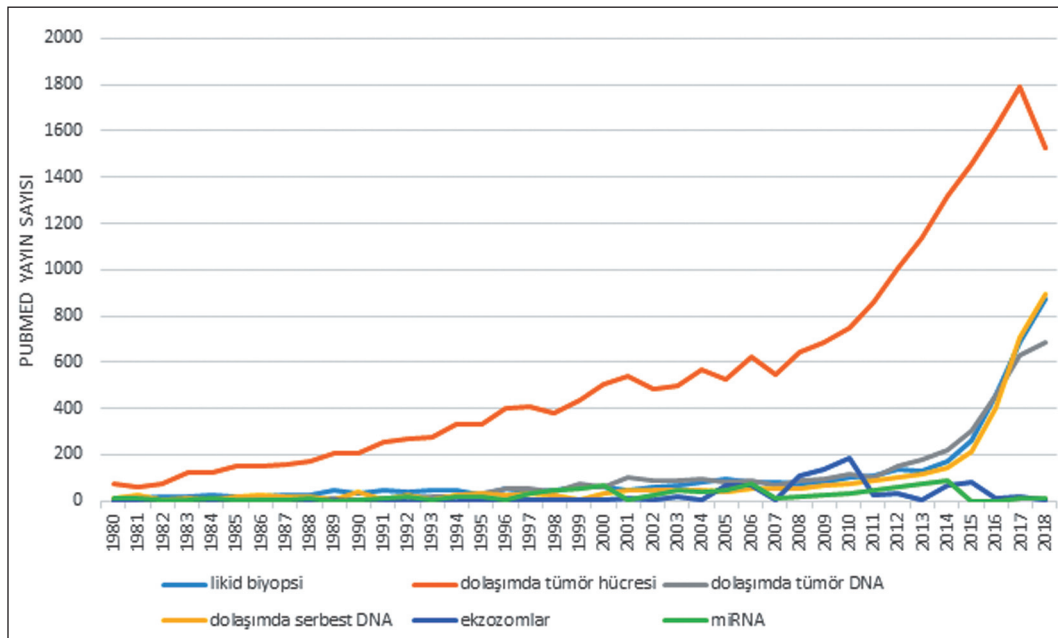
KANSER VE LİKİD BİYOPSİ TEKNİĞİ

Kanser normal doku sınırlarının dışına saldırabilen ve uzak organlara metastaz yapabilen, apoptoz (programlanmış hücre ölümü) mekanizmasından kaçma eğilimi gösteren nispeten kontrolsüz bir hücre çoğalması (proliferasyonu) ile karakterize edilir.² Kanser ayırt edici özelliği, genomdaki değişikliklerdir. Bu değişiklikler tek nükleotid varyantları (SNV'ler), promoter metilasyonu, kopya sayısı varyasyonları (CNV'ler), kromozomal yapısal düzensizlikler, alternatif kırılma (alternative splicing), RNA olgunlaşması veya transkripsiyonel verimlilik ile ilgili bölgelerdeki değişiklikler olabilmektedir.³ Bu değişikliklerin noninvaziv olmayan teknikler ile tespit edilmesi, kanserin erkenden tanımlanmasına ve önlenmesine yardımcı olabilir.

Günümüzde kanser tanısı için gerekli yöntem, cerrahi bir işlem gerektiren doku biyopsi tekniğinin

uygulanmasıdır. Geleneksel olarak hekimler ve araştırmacılar, doku biyopsisini çeşitli kanserli hastalar için tanı ve tedavi seçiminde "altın standart" olarak kabul etmektedir.^{4,5} Tümör biyopsileri, tedavi planı yaparken sağlıklı ve zengin bilgiler sunarlar. Biyopsilerin yararları arasında alınan örneklerde kanserin histolojik tanısı, tipi, evresi, agresifliği, yayılma yolu, immünolojik ve moleküler karakterizasyonu yönlerinden bilgi verebilmesi sayılabilir.^{4,5} Ancak biyopsilerin sınırlamaları vardır.

Birincisi, bir tümör büyüdükçe zamanla değişebilir, yayılır (metastaz) ve kanser önleyici ilaçlara maruz kalır. Hastalık ilk teşhis edildiğinde, alınan tümör biyopsileri kanserin daha sonraki durumunu yansıtmayabilir; çünkü tümörler heterojendir ve sürekli poliklonal genişleme gösterirler. Böylece tanıyı, tedaviyi ve kazanılmış direncin değerlendirilmesini zorlaştırırlar. Ayrıca tümör dokuları biyopsi yapılan bölgede statik ve mekânsal olarak sınırlı bir temsil sağladığından, kanserin gerçek zamanlı temsilini ve takibini sağlayamamaktadır. Bu nedenle doku biyopsileri, primer bir tümörün kompleks moleküler profilini uygun şekilde yansıtmayabilir. Bu durum sadece farklı tümör bölgelerinden biyopsi alarak ele alınabilir. Ancak kanser hakkında güncel bilgi almak için tekrarlanan biyopsiler ağrı, enfeksiyon ve kanama



ŞEKİL 1: PubMed'de likid biyopsi ile ilgili yıllık yayın sayısı.

gibi olası komplikasyonlara neden olabileceğinden sık sık uygulanması elverişli değildir. Bu bakımdan karşılaştırma yaptığımızda noninaviz bir yöntem olan LB tekniğın uygulanması, heterojen hastalıkların daha kapsamlı bir kesitini sunabilir ve gerçek zamanlı olarak kanseri izleme ve takip olanağı sunabilir.⁶⁻⁹

İkinci olarak LB, doku biyopsisinden daha kolaydır; çünkü kan, tükürük veya idrar gibi vücut sıvılarına erişmek çok zor değildir. Örneğın akciğér kanseri gibi bazı hastalıklar için yüksek kanama riski, sinir hasarı veya hastalığın yayılması nedeni ile doku biyopsisi almak klinik olarak çoğú zaman mümkün değildir. Ek olarak tümör hücrelerinin genomu, genellikle oldukça kararsız ve farklı seçici baskılar (örneğin tedavi) altındaki değişikliklere karşı duyarlı olduğundan, LB, uzunlamasına hastalık sürveyansının gelişen tümör heterojenitesini gözlemlenmesine izin verebilir. Bu doğrultuda LB, kanseri zaman içinde gözlemlmek için daha uygun olabilir. Daha ucuz ve daha az invaziv olduğundan tekrarlanması kolaydır ve alternatif veya yardımcı bir yöntem sayılabilir (Şekil 2).⁶⁻⁹

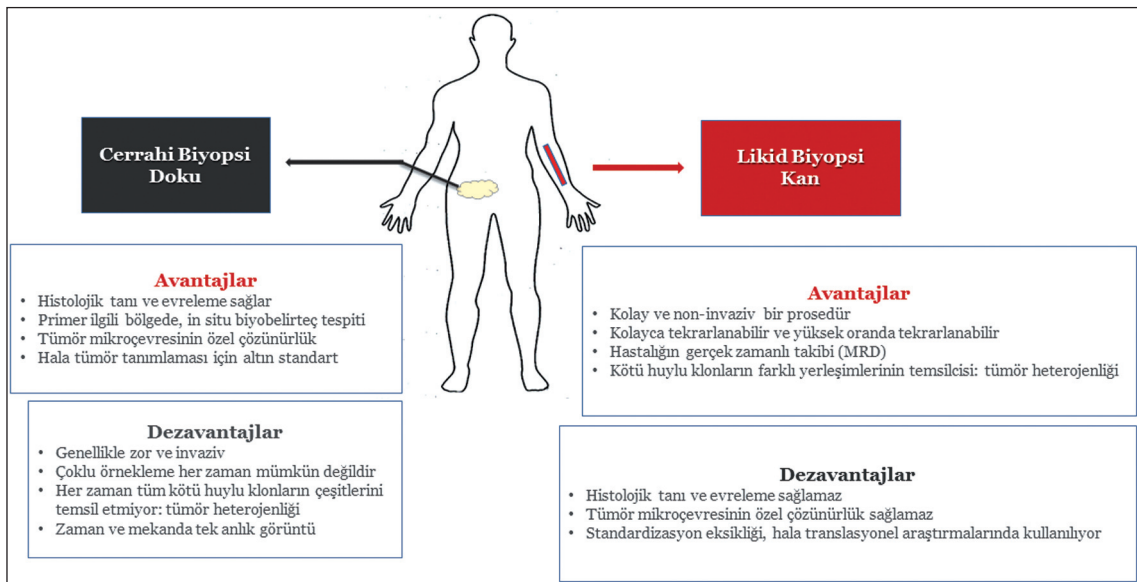
LİKİD BİYOPSİ BİYOBELİRTEÇLERİ

Kanda, kanserle ilgili 3 tip bileşen bulunabilir. Bunlar kanda serbest dolaşan tümör hücreleri [circulating tumor cells (CTCs)], serbest dolaşan tümör DNA'sı

(cfDNA) ve hücre dışı veziküllerdir [extracellular vesicles (EVs)] (eksozomlar, miRNA vb.).⁹ Tümörler hacim olarak büyüdükçe ve sayıları arttıkça, bu tip bileşenler apoptoz veya nekroz yoluyla kan dolaşımına salınır. Bu durumda bu analizler doğrudan kanserli hücrelerden geldiğinden, dolaşımdaki kan kullanılıp klinik açıdan önemli olan genetik biyobelirteçler tespit edilebilir ve moleküler analizlerde detaylı olarak incelenebilir. Dahası tüm hastalık bölgelerinden gelen genetik materyal dolaşımda serbest olarak bulunduğundan, kan örnekleme si vücutta gelişen kanserin gerçek zamanlı, temsili bir görüntüsünü sağlayabilir. Bu teknik CTC'leri, ctDNA'yı, eksozomlar ve miRNA biyobelirteçlerin analizini kapsamaktadır. Kanda bulunan CTC'ler ve ctDNA, olası terapötik hedefler ve direnç mekanizmalarına karşılık gelen bilgileri sunma potansiyeli olduğunu gösterirken; kan dâhil birçok vücut sıvısında (idrar, tükürük, anne sütü, beyin omurilik sıvısı vb.) bulunan EV'lerin, genetik haberciler olduğuna ve alternatif bir kanser ilerlemesi tarzı olduğuna inanılmaktadır.^{9,10}

SERBEST DOLAŞAN TÜMÖR HÜCRELERİNİN KEŞFİ VE ÖNEMİ

CTC'lerin, primer ve metastatik tümör kitlelerinden kan dolaşımına salınan hücreler olduğu gözlemlen-

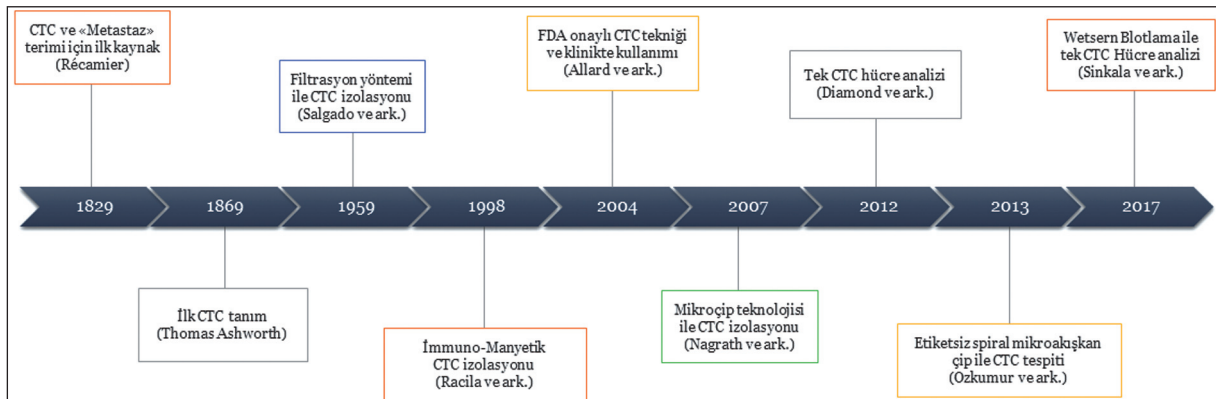


ŞEKİL 2: Cerrahi Biyopsi&Likid Biyopsi farkı.

miştir. Aynı zamanda CTC'lerin, metastatik hücre popülasyonu içerdiğine ve intratümör heterojenliği ve klonal evrimi içeren tümör özelliklerini temsil ettiğine de inanılmaktadır.^{11,12} Şekil 3, potansiyonel kanser biyobelirteçleri olarak CTC'lerin keşfinden son teknolojik gelişmelere kadarki önemli dönüm olaylarını ve çalışmalarını göstermektedir.

CTC'lerin prognostik potansiyellerinin son birkaç on yılda yoğun bir şekilde araştırılmasıyla, en erken gözlemleri, 1829'da Fransız cerrah Récamier tarafından kana salınan tümör hücrelerinin ilk gözlemlerinin ve metastaz teriminin ilk defa rapor edildiği XIX. yüzyılın başlarına dayanmaktadır.¹³ Bunu takiben, 1869'da Thomas Ashworth, metastatik kanserli bir hastanın otopsi sırasında kanser hücrelerine benzer primer veya metastatik tümör bölgesinden ayrılan ve dolaşımda bulunan kanser hücrelerin varlığını bildirmiş ve bu gözlemlerin aynı birey içindeki çoklu tümörlerin kökenini anlamaya yardımcı olabileceğini öne sürmüştür.¹⁴ Ayrıca potansiyel olarak tümör kütlelerinden kaynaklanan bu hücrelerin, dolaşım sistemine geçme kabiliyetine sahip olduğunu da eklemiştir. Elde edilen bulgular, kana salınan kanser hücrelerinin metastazlardaki rolünü araştırmak amacıyla gelecek 100 yıl boyunca kanser araştırmalarını hızlandırdı. Ancak bu nadir hücrelerin teşhis ve prognostik potansiyeli, sadece gerekli hassasiyet ve seçiciliği olan teknolojilerin geliştirilmesi sonucu gerçekleşti. Bu bağlamda daha önceki CTC izolasyon yaklaşımları, basit filtrasyon ve sedimentasyon tekniklerinin kullanılmasını ge-

rektiriyordu.^{15,16} Bunu takiben, Racila ve ark.nın geliştirdiği epitelyal hücre adezyon molekülü [Epithelial cell adhesion molecule (EPCAM)], bazlı immünomagnetik (EPCAM) ayırma yaklaşımı ile kanserin ilerlemesinde CTC'lerin varlığının ve ilişkisinin tespit edilmesi 30 yıldan fazla sürdü.¹⁷ Bu dönüm noktası, bu ilk tekniğin Amerikan Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından onaylanmasına ve CTC'nin klinik tespiti için kullanılmasına yol açtı.¹⁸ Eş zamanlı olarak mikroakışkanlar, hücre-antikor etkileşimlerini en üst düzeye çıkarabilen ve böylece verimi de en üst seviyeye çıkarabilen düşük kesme ve kontrollü sıvı akışı nedeni ile alternatif bir platform yaklaşımı olarak görülüyordu. Bu bağlamda Nagrath ve ark., CTC'lerin kan örneklerinden izole edilmesi için antikor kaplı mikrokolonlar içeren CTC-çip olarak bilinen bir mikroakışkan yaklaşımı geliştirmiştir.¹⁹ Yeni izolasyon teknolojilerinin geliştirilmesinde devam eden çabalara rağmen, birçok araştırma, artmış CTC sayımları ile ilgili kötü prognoz, hasta sağkalım oranları ile ilişkisini aydınlatmak amacıyla geliştirilmiş kanser hücresi analizlerine ihtiyaç duyulduğunu ortaya koydu.^{20,21} Bu nedenle kanser tedavi süreci yönünü, CTC sayımından ziyade, potansiyel klinik faydalarını belirlemek için alınan hücrelerin karakterizasyonuna doğru yönlendirdi. Bu yeni yön, EPCAM tabanlı izolasyon dışında, yeni hücre sayımı stratejilerinin oluşturulması ve aynı zamanda hem morfolojik hem de moleküler düzeyde CTC'lerin önemli heterojenliğini hesaba katmak anlamına geliyordu.²²



ŞEKİL 3: CTC zaman çizelgesi ve gelişim dönüm noktaları.

CTC: "Circulating tumor cell", FDA: "Food and Drug Administration".

Bu bağlamda nötr fiziksel özelliklere dayanan CTC, zenginleştirme teknolojileri ve hassasiyet açısından antikora bağlı yakalama sistemlerine kıyasla daha iyi bir performans göstermiştir. Özellikle CTC'lerin ataletsel mikroakışkanlar kullanılarak, kandan izole edilmesi için mikroakışkanlara dayalı ayırma tekniğinin daha basit çalışması ve akış aşağı analiz için fizibilitesi çok daha büyük ilgi topladı.²³ Bu teknoloji, etkili CTC'lerin kandan ayrılmasını sağlamak için belirli kanser tiplerindeki CTC'ler ve hematolojik hücreler (CTC'ler, 10-20 µm; kırmızı kan hücreleri (RBC'ler), 8 µm diskoid; lökositler, 7-12 µm) arasındaki doğal boyut farkını kullanmaktadır. Ayrıca CTC sayımından moleküler karakterizasyona geçiş, uygun aşağı akış süreci için yüksek geri kazanım oranlarıyla, teknoloji gelişimi daha yüksek oranda zenginleştirilmiş CTC popülasyonu (yani, minimum kan hücresi geçmişi olan) elde etmeye odaklanmıştır.^{24,25} Tümör biyobelirteç ekspresyonuna göre hücreleri profileyebilmenin yanı sıra hücreleri elde etmek için çoklu fiziksel, biyomekanik ve immünoaffinite yaklaşımlarının entegrasyonunu içeren çok çeşitli teknolojiler geliştirilmiştir. Bu tekniklerin ileri ustalığına rağmen progresif marker ekspresyonu kaybı ve genotipik bilgi kaybıyla birlikte tek hücre seviyesinde CTC'ler arasındaki heterojenlik, daha hassas izolasyon tekniklerine ihtiyaç duyulduğunu göstermektedir.²⁶ Hücre içi ve hücreler arası heterojenliğin daha derin anlaşılması, CTC araştırmasının mevcut ihtiyacıdır ve teknoloji gelişimi tek hücreli profilemeye doğru yönlendirilir.

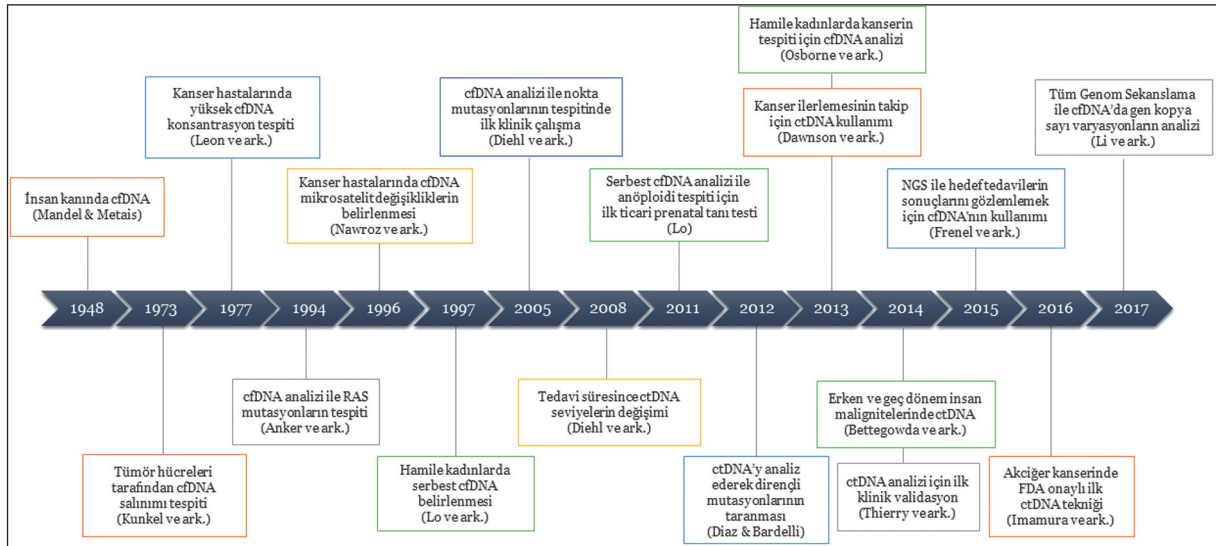
Krebs ve ark.na göre tümör hücrelerinin moleküler karakterizasyonu, invaziv bir biyopsi gerektirmeden herhangi bir kanserin fenotipik ve genotipik özelliklerini değerlendirmek ve gözlemlemek için benzersiz bir yöntem sağladığını vurgulamaktadır.²⁷ Klinik kanıtlar, metastazlı hastaların mL başına 1-10 CTC'lere sahip olduğunu ve klinik olarak sağlıklı kişilerde veya habis olmayan tümörlere sahip kişilerde CTC'lerin nadiren bulunduğunu göstermektedir. CTC'ler meme, yumurtalık, prostat, akciğer, kolorektal, hepatoselüler, pankreas, baş ve boyun, mesane ve melanom gibi farklı kanser türlerinde saptanmıştır.²⁸ CTC'ler kötü prognoz ile ilişkilidir ve sırasıyla CTC sayısı hastalığın seyri sırasında herhangi bir zamanda 7,5 mL kan başına 5, ≥ 3 veya ≥ 5 olan meta-

statik meme, kolorektal veya prostat kanserli hastalarda daha kısa progresyonsuz sağkalım ve genel sağkalımın tahminidir.²⁹⁻³¹ Ancak CTC'ler, displastik veya erken malign lezyonları olan hastalarda sıklıkla tespit edilemez, bu nedenle erken tanı veya sürveyans için faydaları sınırlıdır.³² Tespit ve izolasyonların yanı sıra CTC'ler in vitro olarak kültür ortamında analiz edilebilir ve daha ileri analizler için ex vivo olarak genişletilebilir.³³⁻³⁶

SERBEST TÜMÖR DNA'SININ KEŞFİ VE ÖNEMİ

DNA, normal ve kanserli hücreler tarafından apoptoz ve nekroz yoluyla parçalar hâlinde dolaşımında sürekli olarak salınır ve serbest hâlde dolaşır. Köken aldığı hücrelerinden bağımsız olarak serbest bırakıldığında, tipik olarak cfDNA (hücre içermeyen DNA); fakat kanser hücreleri tarafından salgılandığında, çoğunlukla ctDNA (dolaşan tümör DNA) olarak adlandırılır.⁹ Bu nedenle CTC'lere benzer şekilde, ctDNA olarak bilinen bazı DNA fragmanları kan dolaşımına döküldüğüne, apoptotik veya nekrotik hücrelerden türetildiğine inanılmaktadır. ctDNA'nın kana salınım mekanizması tam olarak anlaşılmasına rağmen tümör biyobelirteçleri olarak önemli bir potansiyele sahip olduğuna inanılmaktadır. ctDNA'nın moleküler özellikleri arasında mutasyonları, CNV'leri, metilasyon değişikliklerini veya tümörle ilişkili entegre viral dizileri barındırabilmesi yer almaktadır.⁹ cfDNA araştırmalarına yaygın ilgi, 1948 yılında Mandel ve Metais'in hücre dışında, plazma içinde serbestçe dolaşan DNA varlığını tanımladığında başladı (Şekil 4).³⁷ Bununla birlikte cfDNA'nın tümör hücreleri tarafından salınması, ilk olarak 1973'te Kunkel tarafından kemoterapi gören hastalarda, cfDNA seviyelerinde bir düşüş gözlemlendiğinde tanımlandı.³⁸ Yıllar geçtikçe birçok çalışma, özellikle örnek bir tümör bölgesine yakın alınmışsa, kanser hastalarında sağlıklı bireylere göre daha yüksek ctDNA seviyeleri gözlemlendiğini göstermiştir.³⁹⁻⁴¹

Daha sonra yapılan diğer çalışmalar, ctDNA seviyeleri ve tümör yükü arasında kantitatif bir ilişki olduğunu göstermiştir. Ayrıca ctDNA'nın, kanserle ilgili belirgin mutasyonlar içerdiğine de inanılmaktadır.⁴²⁻⁴⁸ Bununla birlikte ctDNA'nın klinik potansiyeli, ilk olarak plazmalarında cfDNA'dan Y



ŞEKİL 4: ctDNA zaman çizelgesi ve dönüm noktaları.

NGS: "Next generation sequencing", FDA: "Food and Drug Administration".

kromozomal DNA'sı içeren erkek fetüsleri olan kadınlar üzerinde yapılan doğum öncesi araştırmalar yoluyla belirlenmiştir.⁴⁹ Bu çalışma, hamilelik sırasında fetal cinsiyet ve herhangi bir kromozomal anormallik belirlemek için kan testi ve diğer çalışmaların kullanımını başlatmıştır.^{50,51} Çalışma aynı zamanda ctDNA analiz çalışmalarını klinik onkolojide başlatarak, direnç mutasyonlarının tespiti ve diğer genotiplendirme çalışmalarını geliştirmiştir.⁵²⁻⁵⁵ Ayrıca ctDNA'nın, tanısal bir araç olarak CTC'ler gibi daha geniş kapsamlı araştırılmış biyobelirteçlerden daha iyi performans gösterme potansiyeli, bir teşhis aracı olarak ctDNA'nın kullanımı hakkında çeşitli araştırmalara ön ayak olmuştur. Hem CTC hem de ctDNA seviyelerinin artması, hastalarda kötü prognoz olduğunu gösterirken; ctDNA, tümör yükünün belirlenmesinde CTC'ye karşı duyarlılıkta belirgin bir artış göstermiştir.⁵⁰ Kandaki ctDNA'nın canlılığının 15 dk ile 2,5 saat arasında değişen değişken dolaşım yarı ömürlere sahip olması, ctDNA'nın kanser tanısı için gerçek zamanlı bir biyobelirteç olarak kullanılabilmesi inancına yol açmıştır.⁴⁴ Herhangi bir biyobelirteçte olduğu gibi ilk aşama, herhangi bir analiz yapılmadan önce ctDNA'yı izole etmektir. Özellikle ctDNA için mL başına mevcut olan miktarlar dk'dır. Bunun nedeni sağlıklı bireylerde ve kanser hastalarında, ctDNA konsantrasyonlarının, mL'nin plazma başına 1-10 ng ve plazma tipine bağlı olarak sırasıyla

plazma başına 1-100 ng arasında olduğu bulunmuştur.⁵⁶ Referans olarak 100g tümör yükü olan bir hasta dolaşıma %3,3 ctDNA salmaktadır.⁴² Yüksek verimlilikte dizileme ve karmaşık hesaplama yöntemlerinde son gelişmeler, ctDNA'yı tespit etme ve karakterize etme yeteneğini geliştirmiştir.⁵⁷ Ayrıca son zamanlardaki ileri teknikler, tek nokta mutasyonlarını tanımlayabilmiş ve artan duyarlılıkla ilgili çoklu genleri takip edebilmiştir.⁵⁸ Roche'un ctDNA tabanlı, akciğer kanseri hastalarında erlotinib için tamamlayıcı tanı olan epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) mutasyonlarının tespiti, FDA onayını alan ilk LB olmuştur.⁵⁹ Bu tamamlayıcı tanısal LB'lerin, tümörlerin güvenli bir şekilde erişilmesinin zor olduğu hastalar için hedefe yönelik tedavinin uygulanabilirliğini önemli ölçüde artırabileceğine inanılmaktadır.

EKSOZOMLARIN KEŞFİ VE ÖNEMİ

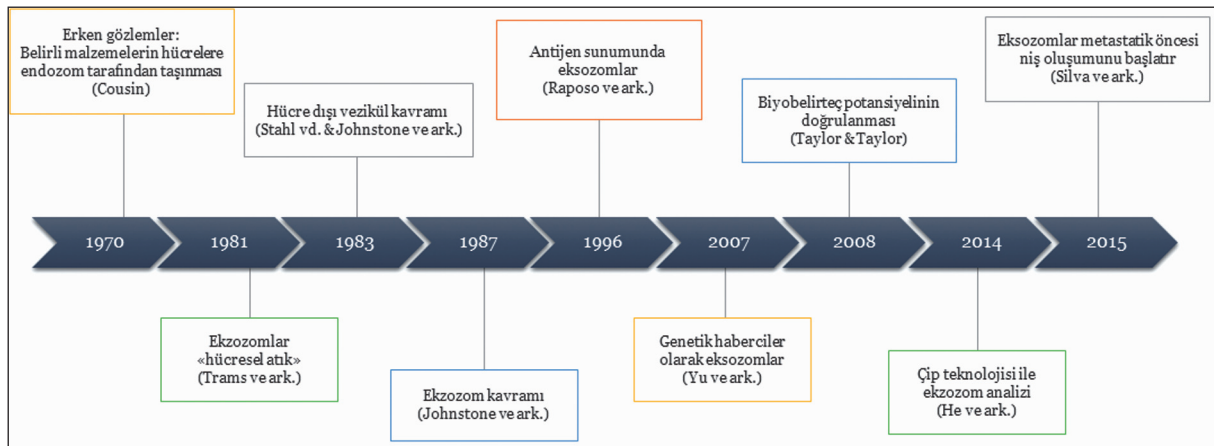
CTC'lere ve ctDNA'ya ek olarak, çoğu hücre tarafından vücut sıvılarına (örneğin kan, tükürük, idrar vb.) salınan ve ana hücre veya tümörü temsil eden hayati bilgileri (örneğin, mRNA'lar, mikroRNA'lar ve proteinler) içerdiğine inanılan nano boyutlu veziküllere ilişkin kanıtlar mevcuttur.⁶⁰ Genel olarak eksozomlar olarak bilinen bu veziküller, tümör hücrelerinden türetilir, örneğin primer tümör ve kemik iliği hücreleri arasında lokal ve sistemik hücre

iletişimini kolaylaştırarak kanserin ilerlemesine katkıda bulunur.⁶¹ 1970'lerde endozom benzeri yapıların, belirli malzemeleri hücrelere taşıdığı ve aynı anda vezikül şeklindeki yapıları serbest bıraktığı gibi erken gözlemler yapılmıştır.⁶² Birkaç yıl boyunca "hücre-sel atık" olarak kabul edilen bu gizemli moleküllerin spesifik bir işlevi olmadığı düşünülüyordu.⁶³ Ancak daha sonra birçok çalışma, bu küçük yapıların oldukça önemli olduğunu ve immün yanıtlara aracılık etmedeki rolleriyle ilgili bazı önemli gözlemler, çeşitli biyolojik mekanizmalardaki rollerini anlama konusundaki ilgiyi yeniden ortaya çıkarmıştır.⁶⁴⁻⁶⁷ O zamandan beri, endositik kökenli bu nano boyutlu hücre dışı veziküllerin araştırılması yaygın ilgi kazanmaya başlamıştır (Şekil 5).

Bu EV'lerin biyogenezini hâlâ belirsiz kalsa da multiveziküler cisimlerin intraluminal tomurcuklanmasından geç endozomal membranla kaynaklandığına inanılmaktadır. EV'lerin salınımı, plazma membranı ile füzyon üzerine meydana gelen membran inversiyon olayları ile ilişkilidir ve membran tomurcuklanması, sitoplazmik RNA, protein ve hatta DNA'nın kapsüllemesine neden olmaktadır.⁶⁰ Muhtemelen ana hücreden türetilen bir biyomolekül yükü taşıyan bu veziküller, herhangi bir alıcı hücrenin biyokimyasal kompozisyonunu, sinyal yollarını ve genomik durumunu değiştirme kabiliyetine sahiptir. Benzer şekilde tümör hücrelerinden salınan EV'lerin, ana hücreden türetilen moleküler içeriğin aktarılması yoluyla birincil tümör ve kemik iliği hücreleri arasındaki iletişime aracılık ettiği düşünülmektedir.⁶⁸ EV

analizinin, CTC'ler (kan başına 1-100 hücre) gibi diğer kan bazlı belirteçlere göre en büyük avantajı, EV'lerde daha büyük bir biyobelirteç popülasyonuna erişimdir (serum, kan, plazma vb. gibi biyolojik sıvılarda μL başına $8,0 \times 10^3$ ile $5,0 \times 10^5$ EV).⁶⁹ Bu nedenle ana tümör veya hücre tipini profileyebilmenin basit ve invazif olmayan bir kaynağını temsil eden yeni hastalık biyobelirteçleri olarak kabul edilebilirler.

Kısacası eksozom olarak da adlandırılan EV'ler, küçük yuvarlak veziküllerdir, çapı 30-120 nm'dir ve hücre dışı ortama çoklu hücre tipleri (tümör hücreleri dâhil) tarafından salınan RNA, miRNA, DNA ve protein taşıyan endozomal kökenlidir. Eksozomların, diğer hücreler tarafından içselleştirilen hücreler arasında bir tür iletişim formuna aracılık ettiği düşünülmektedir. Kan, idrar, tükürük, plevral efüzyon, amniyon sıvısı, burun salgıları, bronkoalveolar lavajlar, beyin omurilik sıvısı, anne sütü ve asit gibi biyolojik sıvılarda buldukları için ekzomal DNA da LB ile analiz edilebilir. Son çalışmalar, eksozomların ana hücrelerinin çift sarmallı DNA içerdiğini göstermiştir. Bu keşif, spesifik dokulardan ve tümörlerden kaynaklanan eksozomları izole etme olasılığı ile birleştiğinde, eksozomal DNA'nın akciğer, meme ve prostat kanseri gibi çeşitli karsinomlardaki tümör heterojenitesini değerlendirmek için kullanılabileceğini göstermektedir. Ayrıca birçok çalışma eksozomal DNA analizinin, kemoterapi gibi tedavilerin kanser hücresi popülasyonları üzerindeki seçici etkilerini de-



ŞEKİL 5: Eksozomlar zaman çizelgesi ve dönüm noktaları.

ğ erlendirmek için kullanılabileceğini göstermektedir.⁴

Eksozomal DNA analizleri dışında, eksozomal miRNA çalışmaları da yoğun ilgi görmektedir. miRNA'lar, kodlayıcı olmayan RNA'nın uzunluğu 19-24 nükleotit arasında olan, gen ekspresyonunun düzenleyici molekülleri olarak görev yapan, hedef genlerinin mRNA'larının translasyonunu inhibe etmek için hibridizasyon işlevi yapan küçük moleküllerdir. Kanseri hastalarda miRNA'ların farklı ekspresyon seviyeleri olduğu gösterilmiştir. Tek bir miRNA, insan vücudundaki birkaç genin ekspresyonunu etkileyebilir. Ayrıca miRNA'lar tipik olarak insan genomu boyunca dağılmış olsa da çoğu miRNA'lar farklı kanser türleri tarafından hızla silinen kırılğan bölgelerde bulunur. Bu nedenle miRNA değişiklikleri, kanserin ilerlemesini ve gelişimini yansıtabilir. Kolorektal, akciğer, meme ve cilt kanseri olan hastalarda miRNA değişikliklerini gösteren en yaygın belirteçler miR-21, miR-320a, miR-423-5p ve miR-24'tür.^{4,70}

LIKİD BİYOPSİ ARAŞTIRMALARINDAKİ ZORLUKLAR

Periferik kan, primer tümörden ve farklı metastatik bölgelerden türetilen bir hücre ve/veya DNA fragmanları havuzunu içeren en yaygın LB kaynağıdır.⁷¹ Bu hücresel ve moleküler materyallerin analizi, LB tanısının temel taşıdır. LB'den elde edilen bilgilerdeki doğruluk derecesi tartışılabilir olmakla birlikte, yine de tümörle ilgili bilgi edinmenin en güçlü şeklidir. Ayrıca LB teşhisi, sağlık risklerini büyük ölçüde azaltacak olan, daha yüksek risk altındaki popülasyonlara odaklanarak taranmasını sağlayabilir. Ancak umut verici sonuçlara rağmen erken hastalık teşhisi, yüksek hassasiyet ve özgüllük ile tanı teknikleri gerektirir. Örneğin ctDNA analiz koşulları, tam kandaki CTC'lere kıyasla, serum örneklerinden ctDNA'yı elde etmenin kolaylığına rağmen standartlaştırılmalıdır.⁷² Bu örneklerdeki ctDNA seviyeleri genellikle normal DNA'ların ölmekte olan kan hücrelerinden seyreltilmesinden etkilenir. Öte yandan CTC biyolojisindeki son gelişmeler, CTC'lerin klinik tanılamaya sokulmasından ziyade, CTC tespiti için yeni teknolojik gelişmelere odaklanmasını sağlamıştır.

Geçtiğimiz 10 yılda, makul bir süre zarfında sınırlı veya hiç kan hücresi kirliliği olmayan, farklı olmayan hasta kan örneğinden CTC elde etmeye odaklanan bir CTC teknolojisi bolluğu geliştirilmiştir. Bununla birlikte aşırı miktarda kan hücresi ve kanın viskozitesi, bu cihazlarda ayrılma verimini sınırlar ve bu da yüksek saflıkta CTC'lerin elde edilmesini zorlaştırır. Çoğu yöntem, EpCAM gibi epitelyal markerler kullanılarak izole edilmiş CTC'ler geliştirmiş ve mezenkimal fenotip hücrelerinde bulunmayan sitokeratin markerleri kullanarak aday CTC'leri tanımlamıştır. Epitelden-mezenkimal bir geçişe maruz kalan CTC'lerde, epitel işaretlerinin azalmış ifadesi, artan plastisite ve göç kapasitesi, CTC'lerin izolasyonunu daha da zorlaştırır. Ayrıca epitel belirteçlerine dayanan geleneksel sayım yöntemleri, yalnızca sınırlı sayıda CTC alt tipine erişebilir; bu da tüm kanser hastaları için standart bir değerlendirme prosedürü oluşturmayı zorlaştırır. Örneğin FDA onaylı ilk CTC izolasyon tekniği olarak CellSearch®, kanser prognozu için referans olarak periferik kanda CTC sayımını sağlamakla birlikte, CTC'lerin kanser ilerlemesi ile klinik ilişkisini kurmak için yaygın olarak kullanılan bir yaklaşımdır.⁷³ Metastatik kanser hastalarında CTC sayımı; meme, prostat ve akciğer kanserlerinde hastanın sağkalımı ile doğrudan ilişkilidir ve cerrahi prognoz ve kanser tedavisinin prognozunun güvenilir bir göstergesidir. Ancak CTC sayımı sınırlı bilgi verir ve okuma bireysel farklılık ve kanser hücresi heterojenliği nedeni ile değişebilir.

Son 10 yılda, CTC'ler üzerinde yapılan çalışmalar basit hücre sayımlarından çok daha ileriye doğru yol almıştır. Mevcut teknikler ve platformlar, araştırmacıların CTC'leri tek bir hücre gen seviyesinden karakterize etmelerini sağlamıştır. CTC'lerde DNA ve RNA ekspresyon düzeyi, kanser tedavisinin, özellikle başarısızlıklarının değerlendirilmesini ve anlaşılmasını kolaylaştırmak için kullanılabilir. Bu özel amaç için CTC sayımları araştırılmıştır, CTC'lerin farklı kanser koşullarındaki ilişkisinin anlaşılmasını nedeni ile başka bilgilerin de kullanılması mümkündür. Hasta durumunun izlenmesi için yeni referans olarak RNA ve DNA ekspresyonu kullanılabilir. Kastrasyona dirençli prostat kanserinde (CRPC) yapılan araştırma, CTC'lerde AR-V7

mRNA'nın ekspresyonunun enzalutamid ve abirateron tedavilerine dirençle ilişkili olduğunu ve bu tedavilerin başarısızlığının androjen sinyalleme ile ilişkili olduğunu göstermiştir.⁷⁴ Klinik CTC örneklerinin RNA sekansı üzerinde yapılan bir takip çalışması, AR-V7'nin tespit edilmesinin, AR-V7 tarafından kodlanan proteinin ligand bağlama alanının eksikliği nedeni ile androjen reseptörünü hedef alan tedaviler ile ilişkili olduğunu göstermiştir.⁷⁵ Sonuç klinisyenlere kanser hastalarından elde edilen CTC'lerin RNA seviyelerinin potansiyel olarak tedavi tabakalaşması için kullanılabileceğine dair yeni bir bakış açısı sunmaktadır. Ayrıca DNA/RNA protein ekspresyonu seviyeleri, kanser tedavisinin dinamik izlenmesi için iyi nicel parametrelerdir. CTC'lerin ayrılması, CTC ile bağlantılı LB'nin yalnızca bir başlangıç noktasıdır; çünkü mevcut araştırmanın nihai amacı, bir hastanın CTC'lerden fizyolojik durumu hakkında bilgi edinmek ve hasta için daha etkili bir tedavi sağlamak için bilgiyi kullanmaktır.

Bu bilgilerin yanı sıra, ctDNA'nın veya EV'lerin biyolojisi ve klinik önemi ile ilgili birkaç ana sorunun daha iyi anlaşılması gerekir. Birkaç hipotez, ctDNA'nın tümör hücreleri veya apoptoz geçiren hücreler tarafından potansiyel olarak salınması dâhil daha fazla araştırmayı gerektirir.⁷¹ ctDNA için daha önceki yaklaşımlar, yalnızca yaygın olarak değiştirilmiş genlerdeki değişikliklere odaklanmış ve böylece analiz edilen mutasyon sayısını sınırlamıştır. Bununla birlikte son zamanlarda yapılan çalışmalar, çok sayıda ekzonda ya da genom çapında analizlerde tarafsız analizler yoluyla de novo mutasyonlara odaklanmaktadır. Ayrıca yeni nesil dizileme tekniğinin hassasiyetindeki gelişmelerle, yabancı tip moleküller arasındaki tek değişikliklerin tespit edilmesinde sadece yeteneklerimizi geliştirmemiz beklenmektedir. Bu ctDNA'nın uygulamalarını, hastalık izlemesinden ameliyat sonrası rezidüel hastalığın tespitine ve erken tespite kadar genişletebilir.

Öte yandan EV araştırması, hastalığın teşhisinde rolünün yavaş yavaş hücre atık olarak kabul edilmesinden ana tümörün biyolojik ayak izi olarak tanınmasına kadar yavaş yavaş ilerlemeye başlamasıyla 10 yıldan kısa bir sürede önemli ilerleme kaydetmiş-

tir. Özel ilgi konusu EV'lerin atasal hücrelerinin, fizyolojik durumları ile ilişkili paha biçilmez bilgi sağlayabilen yüzey protein ifadesidir.⁷⁶ Her ne kadar EV'ler hücre tipine bakmaksızın büyük ölçüde birkaç protein belirteçini paylaşıyorlar da hücreye spesifik olan ve salgılayan hücrelerin tipine ve patofizyolojik koşullarını yansıtan küçük bir protein fraksiyonu da taşırlar. Yüzey protein belirteçlerinin üst üste gelmesi ve çoklu hücre tiplerinden türetilen eksozomlar arasındaki ilişkili heterojenite, izolasyonlarını daha da zorlaştırır. Bu nedenle, arzu edilen EV popülasyonlarının yüksek saflıkta izolasyonu için daha iyi eksozom belirteçlerinin tespit edilmesine hâlâ ihtiyaç vardır.⁷⁷ Sahada yapılan etkileyici ilerlemelere rağmen mikroakışkan cihazların çoğu ölçeklenebilirlik, standardizasyon ve validasyon nedeni ile klinik analiz için hâlâ uyumlu değildir.⁷⁸ Ayrıca birkaç yaklaşım zaman alıcıdır, kapsamlı ön işlem adımları gerektirir ve protein ya da nükleik asit analizi için yeterli miktarda EV elde etmez. Bu nedenle EV'leri, uygun maliyetli ve hızlı bir şekilde seçici bir şekilde alan izolasyon tekniklerine ihtiyaç vardır. Tekniğin aşağı akım proteomik veya dizilim analizi ile entegrasyona duyarlı olması da önemlidir.

LİKİD BİYOPSİ TEKNİĞİNİN UYGULANMASI

Globocan verilerine göre 2018'de tahmini 18,1 milyon yeni kanser vakası ve 9,6 milyon kanser ölümü olacağı vurgulanmaktadır. Bu nedenle kanserin erken tanısı ve hedefe yönelik tedavi ile bireysel tıp alanındaki ilerlemelere yönelik çalışmalara ihtiyaç vardır. Buradan yola çıkarak, yukarıda bahsedilen analitler ve bulgular, nihayetinde gelişmiş kanser teşhisi, tedavi rehberliği ve hastalık sürveyansına dönüşen altta yatan hastalık (örneğin tümör yükü ve heterojenite) hakkındaki bilgilerimizi artırarak kanser tümörlerinin genetik durumunu değerlendirmek amacıyla kullanılabilir. Tüm bunları gerçekleştirebilmek amacıyla bazı biyolojik ve teknolojik zorlukların üstesinden gelinmesi gerekir. Özellikle standartlaştırılmış analitik ön numune alma prosedürlerinin yanı sıra LB örneklerinin moleküler analizi için henüz mevcut olmayan sağlam ve tekrar üretilebilir iş akışlarına ihtiyaç duyulmaktadır. Genel olarak LB kavramı, kişiselleştirilmiş tıp yaklaşımını tamamlar ve klinik çalışmalarda hasta seçimi için yenilikçi bir yol sunar;

burada genom analizi, hastanın hedefe yönelik tedavi için uygunluğunu destekler niteliktedir.

LB'lerden elde edilen bilgiler, metastatik hastalığın belirli bir evresinde hekimin en iyi tedaviyi seçmesine yardımcı olabilir. Kan bazlı izleme, ayrıca bir görüntüleme muayenesinde değişiklikler görünmeden önce farklı bir tedavi rejimine geçme gerekliliğini de gösterebilir. Erken evre kanserlerde, tedavi sonrası, kanın kanser sinyalleri için periyodik olarak kontrol edilmesi, nüks (tekrar) riski olan hastaları tanımlayabilir. Bazı araştırmalar, sıvı biyopsilerin tümörün yeniden ortaya çıkmasından çok önce kanserin ne zaman ortaya çıktığını tespit edebileceğini öne sürüyor. Erken müdahale sayesinde sağ kalım iyileştirilebilir (Şekil 6).⁷⁹ Sıvı biyopsi ve benzeri yeni yöntemler, bugün ekonomik olarak yaygın kullanılacak duruma gelmektedir. Klinik olarak tanı ve tedavideki yararlarının kanıtlanmasıyla birlikte geleneksel yöntemlerin yanı sıra hastalar için ucuz, zahmetsiz ve yeni bilgiler sağlayan teknikler olarak kullanıma girmeleri bekleniyor.

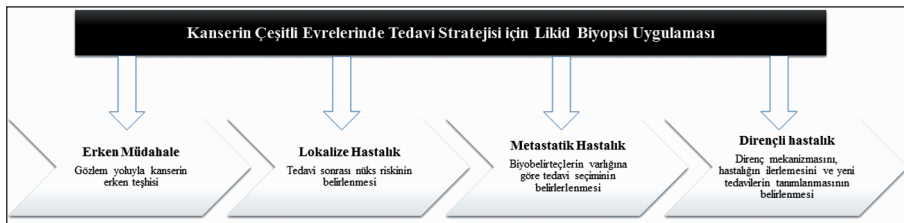
SONUÇ VE BEKLENTİLER

Kanser yönetimindeki stratejiler gelişmeye devam ederken; tanı, prognoz ve tedavi direncinin öngörülmesi ile ilgili zorluklar ve talepler de artmaya devam ediyor. Bununla birlikte tümör heterojenliği, spesifik genomik değişiklikleri hedefleyen moleküler ajanların mevcut olmasına rağmen bireysel genom analizine dayanan terapi rejimlerinin geliştirilmesinde önemli bir engeldir. Bu bakımdan CTC'ler ve ctDNA, LB tanısının çekirdeğini oluşturur ve kanser tedavisi ve yönetiminde yeni yol stratejilerini oluşturur. LB'ler, primer tümörlerin biyopsi yapmasının zor olduğu durumlarda etkili alternatifler olabilirler. Dahası LB, hastaları sınıflandırmaya ve yüksek riskli

popülasyon için tarama yöntemlerine odaklanmaya yardımcı olarak yan etkileri (örneğin mamografide radyasyon) ve sağlık maliyetlerini azaltabilir.

Ancak sistematik tedavi sırasında CTC'lerin ve ctDNA'nın, engellerin duyarlılık ve seçicilik olduğu erken teşhis belirteçleri yerine kullanılması daha uygun olabilir. Bu bağlamda ctDNA ve CTC'lerin, hedefe yönelik tedavilere yanıt analizleri klinik uygulamaya yönelik uygulanabilirliği artırabilir. Ek yönler, terapötik hedefleri kodlayan genlerdeki mutasyonlar için testler ve/veya küçük bir hasta grubuyla (cohort) kolayca test edilebilen benzer dirençli genler içerebilir. Daha önceki çalışmalar ctDNA mutasyonlarının tespitinde tutarsızlıklar gözlemlemiş ve eşleştirilmiş ctDNA ile tümör doku örneklerinde yüksek hassasiyetli nadir mutasyonları tanımlayabilen yaklaşımlarla iyileştirilebilmiştir.

Yukarıda belirtilen bu kritik kaygılar, LB araştırmalarında EV'ler veya ctDNA'nın CTC'lerde tercih edilen belirteçler olmasıyla paradigma kaymasına neden olmuştur. Ancak tüm bu belirteçlerin nihai klinik faydası hâlâ daha fazla validasyona ihtiyaç duyulmaktadır. Her ne kadar EV'ler ve ctDNA'lar, CTC'lerden daha bol ve her ne kadar analiz için daha uygun görünse de teknik zorluklar ile kaygılar mevcuttur. Daha fazla bilgi edinmek için daha fazla araştırma yapılması gerekirken, EV'lerin alanının ve LB potansiyellerinin hâlâ tomurcuklanma aşamalarında olduğunu not etmek önemlidir. Bununla birlikte EV'lerin içsel özellikleri onları araştırma, hastalık teşhisi ve tedavi için ideal biyobelirteçler yapmaktadır. EV'lerin izolasyonu ve tespit stratejileri konusunda önemli ilerlemeler kaydedilmesine rağmen EV teknolojilerinin klinik entegrasyonunu kolaylaştırmak için EV'lerin alt popülasyonu veya hastalığa özgü nanoveziküllerin izolasyonu ile ilgili temel zorlukların



ŞEKİL 6: Kanser'in çeşitli evrelerinde tedavi stratejisi için likid biyopsi kullanımı.

ele alınması zorunludur. Ayrıca hastalığın ilerlemedeki klinik potansiyellerini ve rollerini anlamak için hastalığa özgü EV'lerin kapsamlı analizi ile daha fazla klinik doğrulama gerekebilir. EV'lerin tümör modüle edici potansiyelinin gerçekleştirilmesi ile ilgili olarak, EV'lerin onkojenik eksozom sinyalizasyonundaki rolünü anlamak önemlidir.⁸⁰ Muhtemel yaklaşım, metastazı ve tümör oluşumunu önleyebilecek bu nanoveziküllerden yoksun modelleri test etmek olacaktır. Bununla birlikte bu yaklaşımın uygulanması, EV'lerin uzaklaştırılmasıyla ilgili teknik zorluklarla sınırlıdır.

Bunlara ek olarak sahadaki bazı zorlukların, LB'lerinin hastalık yönetimi için gerçek bir teşhis olarak tam potansiyelini gerçekleştirmeden önce ele alınması gerekir. Özellikle EV'lerin, ctDNA'nın ve CTC'lerin arkasındaki biyolojiyle ilgili daha derin içgörü, moleküler profiller ve hastanın fizyolojik hastalık durumu arasında ilişki kurabilir. Bazı vakalarda, CTC sayıları ve ctDNA seviyeleri arasında karşılıklı bir ilişki olduğu belirtilmiş olsa da bu korelasyonla ilişkili temel biyoloji hâlâ tam olarak anlaşılmamıştır.⁸¹ Klinik ortamlarda LB'nin uygulanmasıyla ilişkili diğer bazı zorluklar şunlardır: (i) ctDNA'nın kanser aşamasının tam bir temsili olarak kabul edilme potansiyeli, (ii) ctDNA, CTC'ler ve EV'ler yaygın olarak bilinen dolaşımdaki biyobelirteçler olduğu göz önüne alındığında, tüm metastazların bu biyobelirteçlerin kan dolaşımında serbest bırakılmasına katkıda bulunup bulunmadığını bilmek merak uyandırıcıdır. Bu zorluklara ek olarak, alan aynı zamanda LB tanısı olarak birkaç yeni DNA ve CTC tabanlı yaklaşımın yükselişine de tanık olmuştur. Bu, plazma DNA'sının dokusunu izlemek için plazma DNA'sının genom çapında bisülfid dizilimini ve dizilim verilerinin metilasyon dekonvolüsyonunu içeren plazma DNA doku eşlemesini içerir. Plazma DNA nükleozom korumalı olduğundan, plazma DNA fragmanlarının genomik sekans kapsamının analizini içeren nükleozom haritalaması, nükleozomların po-

zisionunu ortaya çıkarabilir. Nükleozom sonlanmış bölgedeki daha kısa okuma derinliği nedeni ile yüksek ve düşük eksprese edilmiş genlerin ayırt edilmesine yardımcı olabilir. Ayrıca CTC hücre kültürü çalışmalarının gelişimi, umut verici beklentiler göstermektedir.^{82,83} Kültür ortamında büyütülen ve farelere enjekte edilen hastadan türetilmiş CTC'ler, orijinal tümörün özelliklerinin korunduğunu doğrulamıştır.⁸⁴ Ayrıca CTC'den türetilen hücre hatlarının terapi seçimlerini desteklediğine ve potansiyel olarak ilaç testine veya gelişimine yardımcı olduğuna inanılmaktadır. Bu incelemeden, 3 LB biyobelirteçinin her birinin, sınırlamaların yanı sıra avantajları olduğu sonucuna varabiliriz. İleriye doğru, etkili kanser teşhisi ve yönetimi, tüm bu LB biyobelirteçlerinin, farklı bireylerde ve içindeki biyobelirteç seviyelerindeki heterojenlik ve değişkenlik nedeni ile sonuçsuz kaldığı kanıtlanmış, tek bir biyobelirteç temelli analize dayanmak yerine, aynı anda ve tek bir hasta örneğindeki eşzamanlı analize doğru ilerleyebilir.

Finansal Kaynak

Bu çalışma sırasında, yapılan araştırma konusu ile ilgili doğrudan bağlantısı bulunan herhangi bir ilaç firmasından, tıbbi alet, gereç ve malzeme sağlayan ve/veya üreten bir firma veya herhangi bir ticari firmadan, çalışmanın değerlendirme sürecinde, çalışma ile ilgili verilecek kararı olumsuz etkileyebilecek maddi ve/veya manevi herhangi bir destek alınmamıştır.

Çıkar Çatışması

Bu çalışma ile ilgili olarak yazarların ve/veya aile bireylerinin çıkar çatışması potansiyeli olabilecek bilimsel ve tıbbi komite üyeliği veya üyeleri ile ilişkisi, danışmanlık, bilirkişilik, herhangi bir firmada çalışma durumu, hissedarlık ve benzer durumları yoktur.

Yazar Katkıları

Fikir/Kavram: Arta Fejzullahu, A. İlter Güney; **Tasarım:** Arta Fejzullahu; **Denetleme/Danışmanlık:** Arta Fejzullahu, A. İlter Güney; **Veri Toplama ve/veya İşleme:** Arta Fejzullahu; **Analiz ve/veya Yorum:** Arta Fejzullahu, A. İlter Güney; **Kaynak Taraması:** Arta Fejzullahu; **Makalenin Yazımı:** Arta Fejzullahu; **Eleştirel İnceleme:** Arta Fejzullahu, A. İlter Güney.

KAYNAKLAR

1. National Cancer Institute. NCI Dictionary of Cancer Terms. The NCI Dictionary of Cancer, that are in the blood. Accessed October 10, 2019. [Link]
2. Stratton MR, Campbell PJ, Futreal PA. The cancer genome. *Nature*. 2009;458(7239):719-24. [Crossref] [PubMed] [PMC]
3. Russo A, Rolfo C, Passiglia F, Rosell R. Current clinical pathology targeted therapies for solid tumors. 1st ed. Targeted Therapies for Non-Small Cell Lung Cancer. New York: Humana; 2015. p.89-101. [Crossref]
4. Arneth B. Update on the types and usage of liquid biopsies in the clinical setting: a systematic review. *BMC Cancer*. 2018;18(1):527. [Crossref] [PubMed] [PMC]
5. Rorke LB. Pathologic diagnosis as the gold standard. *Cancer*. 1997;79(4):665-7. [Crossref] [PubMed]
6. McLarty JL, Yeh CH. Circulating cell-free DNA: the blood biopsy in cancer management. *Cell Sci Rep*. 2015;2(2):27-9. [Crossref]
7. Pantel K and Alix-Panabières C. Circulating tumour cells in cancer patients: challenges and perspectives. *Trends Mol Med*. 2010;16(9):398-406. [Crossref] [PubMed]
8. Riva F, Dronov OI, Khomenko DI, Huguet F, Louvet C, Mariani P, et al. Clinical applications of circulating tumor DNA and circulating tumor cells in pancreatic cancer. *Mol Oncol*. 2016;10(3):481-93. [Crossref] [PubMed] [PMC]
9. Neumann MHD, Bender S, Krahn T, Schlange T. ctDNA and CTCs in liquid biopsy - current status and where we need to progress. *Comput Struct Biotechnol J*. 2018;16:190-5. [Crossref] [PubMed] [PMC]
10. Elazezy M. and Joosse SA. Techniques of using circulating tumor DNA as a liquid biopsy component in cancer management. *Comput Struct Biotechnol J*. 2018;16:370-8. [Crossref] [PubMed] [PMC]
11. Yu M, Stott S, Toner M, Maheswaran S, Haber DA. Circulating tumor cells: approaches to isolation and characterization. *J. Cell Biol*. 2011;192(3):373-82. [Crossref] [PubMed] [PMC]
12. Alix-Panabières C, Pantel K. Circulating tumor cells: liquid biopsy of cancer. *Clin Chem*. 2013;59(1):110-8. [Crossref] [PubMed]
13. Récamier JCA. Recherches Sur Le Traitement Du Cancer Sur La Compression Méthodique Simple Ou Combinée Et Sur l'histoire Générale De La Même Maladie. 2nd ed. Paris: Gabon; 1829. p.716.
14. Ashworth TR. A case of cancer in which cells similar to those in the tumors were seen in the blood after death. *The Medical Journal of Australia*. 1869;14:146-7.
15. Salgado I, Hopkirk JF, Long RC, Ritchie AC, Ritchie S, Webster DR. Tumour cells in the blood. *Can Med Assoc J*. 1959;81(8):619-22. [PubMed]
16. Alexander RF, Spriggs AI. The differential diagnosis of tumour cells in circulating blood. *J Clin Pathol*. 1960;13(5):414-24. [Crossref] [PubMed] [PMC]
17. Racila E, Euhus D, Weiss AJ, Rao C, McConnell J, Terstappen LW, et al. Detection and characterization of carcinoma cells in the blood. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998;95(8):4589-94. [Crossref] [PubMed] [PMC]
18. Allard WJ, Matera J, Miller MC, Repollet M, Connelly MC, Rao C, et al. Tumor cells circulate in the peripheral blood of all major carcinomas but not in healthy subjects or patients with nonmalignant diseases. *Clin Cancer Res*. 2004;10(20):6897-904. [Crossref] [PubMed]
19. Nagrath S, Sequist LV, Maheswaran S, Bell DW, Irimia D, Ullkus L, et al. Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology. *Nature*. 2007;450(7173):1235-9. [Crossref] [PubMed] [PMC]
20. Danila DC, Heller G, Gignac GA, Gonzales-Espinoza R, Anans A, Tanaka E, et al. Circulating tumor cell number and prognosis in progressive castration-resistant prostate cancer. *Clin Cancer Res*. 2007;13(23):7053-8. [Crossref] [PubMed]
21. Cristofanilli M, Hayes DF, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Reuben JM, et al. Circulating tumor cells: a novel prognostic factor for newly diagnosed metastatic breast cancer. *J Clin Oncol*. 2005;23(7):1420-30. [Crossref] [PubMed]
22. Nelson NJ. Circulating tumor cells: will they be clinically useful? *J Natl Cancer Inst*. 2010;102(3):146-8. [Crossref] [PubMed]
23. Hou HW, Warkiani ME, Khoo BL, Li ZR, Soo RA, Tan DSW, et al. Isolation and retrieval of circulating tumor cells using centrifugal forces. *Sci Rep*. 2013;3:1259. [Crossref] [PubMed] [PMC]
24. Ozkumur E, Shah AM, Ciciliano JC, Emmink BL, Miyamoto DT, Brachtel E, et al. Inertial focusing for tumor antigen-dependent and -independent sorting of rare circulating tumor cells. *Sci Transl Med*. 2013;5(179):179ra47. [Crossref] [PubMed] [PMC]
25. Tian F, Cai L, Chang J, Li S, Liu C, Li T, et al. Label-free isolation of rare tumor cells from untreated whole blood by interfacial viscoelastic microfluidics. *Lab Chip*. 2018;18(22):3436-45. [Crossref] [PubMed]
26. Chen XX, Bai F. Single-cell analyses of circulating tumor cells. *Cancer Biol Med*. 2015;12(3):184-92. [PubMed]
27. Krebs MG, Metcalf RL, Carter L, et al. Molecular analysis of circulating tumour cells-biology and biomarkers. *Nat Rev Clin Oncol*. 2014;11:129-44. [Crossref] [PubMed]
28. Lianidou ES, Strati A, Markou A. Circulating tumor cells as promising novel biomarkers in solid cancers. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2014;51(3):160-71. [Crossref] [PubMed]
29. Pantel K, Alix-Panabières C. Detection methods of circulating tumor cells. *J Thorac Dis*. 2012;4(5):446-7. [PubMed]
30. Park Y, Kitahara T, Urita T, Yoshida Y, Kato R. Expected clinical applications of circulating tumor cells in breast cancer. *World J Clin Oncol*. 2011;2(8):303-10. [Crossref] [PubMed] [PMC]
31. What is the CELLSEARCH® System? (n.d.). Retrieved Sep 20, 2019. [Link]
32. Brock G, Castellanos-Rizaldos E, Hu L, Cotichia C, Skog J. Liquid biopsy for cancer screening, patient stratification and monitoring. *TCR*. 2015;4(3):280-90.
33. Pantel K, Alix-Panabières C. Cell lines from circulating tumor cells. *Oncoscience*. 2015;2(10):815-6. [Crossref] [PubMed] [PMC]
34. Kolostova K, Spicka J, Matkowski R, Bobek V. Isolation, primary culture, morphological and molecular characterization of circulating tumor cells in gynecological cancers. *Am J Transl Res*. 2015;7(7):1203-13. [PubMed]
35. Kolostova K, Zhang Y, Hoffman RM, Bobek V. In vitro culture and characterization of human lung cancer circulating tumor cells isolated by size exclusion from an orthotopic nude-mouse model expressing fluorescent protein. *J Fluoresc*. 2014;24(5):1531-6. [Crossref] [PubMed] [PMC]
36. Maheswaran S, Haber DA. Ex vivo culture of CTCs: An emerging resource to guide cancer therapy. *Cancer Res*. 2015;75(12):2411-5. [Crossref] [PubMed] [PMC]
37. Mandel P, Metais P. Les acides nucléiques du plasma sanguin chez l'homme. Article in French. *C R Seances Soc Biol Fil*. 1948;142(3-4):241-3. [PubMed]
38. Koffler D, Agnello V, Winchester R, Kunkel HG. The occurrence of single-stranded DNA in the serum of patients with systemic lupus erythematosus and other diseases. *J Clin Invest*. 1973;52(1):198-204. [Crossref] [PubMed] [PMC]
39. Anker P, Stroun M and Maurice PA. Spontaneous release of DNA by human blood lymphocytes as shown in an in vitro system. *Cancer Res*. 1975;35(9):2375-82. [PubMed]

40. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987;162(1):156-9. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
41. Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, Yaros MJ. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res.* 1977;37(3):646-50. [[PubMed](#)]
42. Diehl F, Li M, Dressman D, He Y, Shen D, Szabo S, et al. Detection and quantification of mutations in the plasma of patients with colorectal tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(45):16368-73. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
43. Cheng H, Liu C, Jiang J, Luo G, Lu Y, Jin K, et al. Analysis of ctDNA to predict prognosis and monitor treatment responses in metastatic pancreatic cancer patients. *Int J Cancer.* 2017;140(10):2344-50. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
44. Diehl F, Schmidt K, Choti MA, Romans K, Googman S, Li M, et al. Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. *Nat Med.* 2008;14(9):985-90. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
45. Newman AM, Bratman SV, To J, Wynne JF, Eclov NCW, Modlin LA, et al. An ultrasensitive method for quantitating circulating tumor DNA with broad patient coverage. *Nat Med.* 2014;20(5):548-54. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
46. Roschewski M, Dunleavy K, Pittaluga S, Moorhead M, Pepin F, Kong K, et al. Circulating tumour DNA and CT monitoring in patients with untreated diffuse large B-cell lymphoma: a correlative biomarker study. *Lancet Oncol.* 2015;16(5):541-9. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
47. Stroun M, Maurice P, Vasioukhin V, Lyautey J, Lederrey C, Lefort F, et al. The origin and mechanism of circulating DNA. *Ann N Y Acad Sci.* 2000;906:161-8. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
48. Nawroz H, Koch W, Anker P, Stroun M, Sidransky D. Microsatellite alterations in serum DNA of head and neck cancer patients. *Nat Med.* 1996;2(9):1035-7. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
49. Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF, Rai V, Sargent IL, Redman CW, et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet.* 1997;350(9067):485-7. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
50. Chiu RWK, Lo YMD. Noninvasive prenatal diagnosis empowered by high-throughput sequencing. *Prenat Diagn.* 2012;32(4):401-6. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
51. Osborne CM, Hardisty E, Devers P, Kaiser-Rogers K, Hayden MA, Goodnight W, et al. Discordant noninvasive prenatal testing results in a patient subsequently diagnosed with metastatic disease. *Prenat Diagn.* 2013;33(6):609-11. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
52. Diaz LA, Bardelli A. Liquid biopsies: Genotyping circulating tumor DNA. *J Clin Oncol.* 2014;32(6):579-86. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
53. Dawson SJ, Tsui DWY, Murtaza M, Biggs H, Rueda OM, Chin SF, et al. Analysis of circulating tumor DNA to monitor metastatic breast cancer. *N Engl J Med.* 2013;368(13):1199-209. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
54. Bettegowda C, Sausen M, Leary RJ, Kinde I, Wang Y, Agrawal N, et al. Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Sci Transl Med.* 2014;6(224):224ra24. [[PubMed](#)]
55. Messaoudi SE, Rolet F, Moulire F, Thierry AR. Circulating cell free DNA: Preanalytical considerations. *Clin Chim Acta.* 2013;424:222-30. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
56. Gormally E, Hainaut P, Caboux E, et al. Amount of DNA in plasma and cancer risk: a prospective study. *Int J Cancer.* 2004;111(5):746-9. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
57. Frenel JS, Carreira S, Goodall J, Roda D, Perez-Lopez R, Tunariu N, et al. Serial next-generation sequencing of circulating cell-free DNA evaluating tumor clone response to molecularly targeted drug administration. *Clin Cancer Res.* 2015;21(20):4586-96. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
58. Li J, Dittmar RL, Xia S, Zhang H, Du M, Huang CC, et al. Cell-free DNA copy number variations in plasma from colorectal cancer patients. *Mol Oncol.* 2017;11(8):1099-111. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
59. Uchida J, Kato K, Kukita Y, Kumagai T, Nishino K, Daga H, et al. Diagnostic accuracy of noninvasive genotyping of EGFR in lung cancer patients by deep sequencing of plasma cell-free DNA. *Clin Chem.* 2015;61(9):1191-6. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
60. Théry C, Ostrowski M, Segura E. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat Rev Immunol.* 2009;9(8):581-93. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
61. Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ, Lötvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol.* 2007;9(6):654-9. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
62. Couzin J. Cell biology: The ins and outs of exosomes. *Science.* 2005;308(5730):1862-3. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
63. Trams EG, Lauter CJ, Salem Jr N, Heine U. Exfoliation of membrane ecto-enzymes in the form of micro-vesicles. *Biochim Biophys Acta.* 1981;645(1):63-70. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
64. Harding C, Heuser J, Stahl P. Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes. *J Cell Biol.* 1983;97(2):329-39. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
65. Pan BT, Johnstone RM. Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: selective externalization of the receptor. *Cell.* 1983;33(3):967-78. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
66. Johnstone RM, Adam M, Hammond JR, Orr L, Turbide C. Vesicle formation during reticulocyte maturation. association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *J Biol Chem.* 1987;262(19):9412-20. [[PubMed](#)]
67. Raposo G, Nijman HW, Stoorvogel W, Liejendekker R, Harding CV, Melief CJ, et al. B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J Exp Med.* 1996;183(3):1161-72. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
68. Taylor DD, Gercel-Taylor C. MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer. *Gynecol Oncol.* 2008;110(1):13-21. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
69. De Vrij J, Maas SLN, Van Nispen M, Sena-Esteves M, Limpens RWA, Koster AJ, et al. Quantification of nanosized extracellular membrane vesicles with scanning ion occlusion sensing. *Nanomedicine (Lond).* 2013;8(9):1443-58. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
70. Domínguez-Vigil IG, Moreno-Martínez AK, Wang JY, Roehrl MHA, Barrera-Saldaña HA. The dawn of the liquid biopsy in the fight against cancer. *Oncotarget.* 2017;9(2):2912-22. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
71. Pantel K, Alix-Panabières C. Real-time liquid biopsy in cancer patients: fact or fiction? *Cancer Res.* 2013;73(21):6384-8. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
72. Schwarzenbach H, Hoon DSB, Pantel K. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nat Rev Cancer.* 2011;11(6):426-37. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
73. Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Matera J, Miller MC, et al. Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *N Engl J Med.* 2004;351(8):781-91. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
74. Antonarakis ES, Lu C, Wang H, Luber B, Nakazawa M, Roeser JC, et al. AR-V7 and resistance to enzalutamide and abiraterone in prostate cancer. *N Engl J Med.* 2014;371(11):1028-38. [[PubMed](#)]
75. Miyamoto DT, Zheng Y, Wittner BS, Lee RJ, Zhu H, Broderick KT, et al. RNA-Seq of single prostate CTCs implicates noncanonical Wnt signaling in antiandrogen resistance. *Science.* 2015;349(6254):1351-6. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
76. Keller S, Sanderson MP, Stoeck A, Altevogt P. Exosomes: from biogenesis and secretion to biological function. *Immunol Lett.* 2006;107(2):102-8. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
77. Zeringer E, Barta T, Li M, Vlassov AV. Strategies for isolation of exosomes. *Cold Spring Harb Protoc.* 2015;(4):319-23. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]

78. Li P, Kaslan M, Lee SH, Yao J, Gao Z. Progress in exosome isolation techniques. *Theranostics*. 2017;7(3):789-804. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
79. McDowell S. Liquid biopsies: past, present, and future. American Cancer Society. Shared on June 27, 2019. [[Link](#)]
80. Syn NL, Wang L, Chow EKH, Lim CT, Goh BC. Exosomes in cancer nanomedicine and immunotherapy: prospects and challenges. *Trends Biotechnol*. 2017;35(7):665-76. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
81. Heidary M, Auer M, Ulz P, Heitzer E, Petru E, Gasch C, et al. The dynamic range of circulating tumor DNA in metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2014;16(4):421. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
82. Khoo BL, Greci G, Lim YB, Lee SC, Han J, Lim CT. Expansion of patient-derived circulating tumor cells from liquid biopsies using a CTC microfluidic culture device. *Nat Protoc*. 2017;13(1):34-58. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
83. Khoo BL, Greci G, Jing T, Lim YB, Lee SC, Thiery JP, et al. Liquid biopsy and therapeutic response: circulating tumor cell cultures for evaluation of anticancer treatment. *Sci Adv*. 2016;2(7):e1600274. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
84. Hodgkinson CL, Morrow CJ, Li Y, Metcalf RL, Rothwell DG, Trapani F, et al. Tumorigenicity and genetic profiling of circulating tumor cells in small-cell lung cancer. *Nat Med*. 2014;20(8):897-903. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]