



Sıvı Biyopsi: Dolaşımdaki Tümör Hücreleri Kavramı ve Prostat Kanseri Hastalarının Takip/Tedavisindeki Önemi

Liquid Biopsy: Circulating Tumor Cells and its Impact on Follow-up/Treatment of Prostate Cancer Patients

Dr. İbrahim Kulaç

Johns Hopkins Üniversitesi Tıp Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı, Baltimore, ABD

Özet

Kanser hastalarında tanıya, izleme, prognoza ve tedaviye dair hemen her yaklaşım kanser hücrelerinin fenotipik ve/veya genotipik özelliklerinin belirlenmesi ile gerçekleşir. Bu durumda biyopsi yapılması kaçınılmazdır. Kanser en temel özelliklerinden birisi de metastaz yapmasıdır. Kanser hücreleri primer odakta ayrılarak dolaşıma geçer ve kan yoluyla potansiyel metastatik odaklara taşınırlar. Kan içerisinde transfer halindeki hücreler, bir başka deyişle dolaşımdaki tümör hücreleri (DTH) sahip oldukları tanısız, prediktif ve prognostik önemleri nedeniyle, özellikle biyopsiye alternatif bir yöntem olabilmesi düşüncesi ile de araştırmacıların dikkatini çekmiştir. 1990'lerden günümüze kadar çok sayıda DTH saptama yöntemi geliştirilmiştir. Hücreler fiziksel özellikleri ya da sahip oldukları özgün yüzey antijenleri (örneğin EpCAM) kullanılarak saflaştırılabilir. Yapılan çalışmalar meme, kolorektal ve prostat kanseri ile birlikte diğer birçok kanser türünde hastaların kan DTH sayıları ile hastalısız ve/veya genel sağ kalım süreleri arasında belirgin bir ilişki olduğunu göstermiştir. DTH ayrıca meme kanserinde yüksek Her2 ekspresyonu veya akciğer kanserinde EGFR mutasyonu belirlenmesi için güvenilir bir kaynak niteliğindedir. PSA'nın düşük özgünlüğe sahip olması ve hasta hakkında kısıtlı bilgi vermesi nedeniyle DTH'nin bu boşluğu doldurabileceği düşünülmüş ve prostat kanseri özelinde çok sayıda DTH çalışması yapılmıştır. Bu çalışmalar DTH'nin prostat kanserinde prognostik önemi yanı sıra hastanın ilaç direnci belirlemede iyi bir kaynak olabileceğini göstermiştir. DTH'ler her ne kadar klinik kullanıma dair önemli bir potansiyele sahip olsalar da hücrelerin elde edilmesi hala oldukça zordur ve yüksek hacimde kan gerektirmektedir. Ayrıca hastalarda ne zaman ve kaç defa bu testin gerçekleştirileceği de belirsizliğini korumaktadır. Ancak ileride yapılacak geniş ve kapsamlı çalışmalar ile bu belirsizliklere ışık tutulacağı düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Dolaşımdaki tümör hücreleri, prostat kanseri, prognoz

Summary

For a cancer patient, almost all approaches regarding diagnosis, follow-up, prognosis and treatment rely on the phenotypic or genotypic features of the cancer cells. Biopsy should be definitely performed. One of the main characteristics of malign neoplasms is the ability of metastasis. Cancer cells from a primary focus get into circulation and are transferred to possible metastatic sites via blood. Cells that are in transfer in blood, circulating tumor cells (CTC), got much attention by researchers as a replacement of biopsy due to the fact that they have diagnostic, predictive and prognostic features. Several methods for detecting CTC have been developed till today since 90s. Cells can be purified either by their physical properties or their specific antigens on their cell membrane (i.e. EpCAM). Studies showed the correlation between the number of detected CTC and progression free survival and/or overall survival time in breast, colorectal and prostate cancers, as well as some other cancer types. CTC is a reliable source for patient selection for targeted therapy, by detecting Her2 expression for breast cancer or EGFR mutation for lung cancer. Since PSA has a low specificity and it gives limited information about prostate cancer, CTCs are thought to be a promising tool for prostate cancer and many studies were conducted on the role of CTCs in prostate cancer. Studies have shown that CTCs have prognostic impact in prostate cancer and also that they may be utilized as a source to detect drug resistance of cancer cells. Although CTCs have a great potential in their clinical use, obtaining them is still highly laborious and the test requires a high volume of blood. Moreover, the time of the test and how many repetitions of tests required for each patient are still unclear. But these issues expected to be clarified in the light of future studies.

Key Words: Circulating tumor cells, prostate cancer, prognosis

Giriş

Malign neoplazmların en temel belirleyici unsurlarından biri de metastaz yetenekleridir. Kanser hücreleri lenfatik ya da venöz dolaşım yolu ile uzak organlara taşınmaktadır, hücreler uygun "toprak" bulunduğu takdirde yeni tümör odakları oluşturacaklardır (1). İdealize modellerde 1 gr tümör için dolaşıma her gün 10^6 tümör hücresinin döküldüğü/girdiği gözlenmiştir (2). Her ne kadar on milyon hücre kulağa çok yüksek gelse de bu idealize bir modelde elde edilen sayıdır, gerçekte hastalığın aşamasına ve kanserin tipine göre sayı büyük değişkenlik gösterir. Daha da önemlisi bu hücrelerin tamamının dolaşımdaki süre boyunca hayatta kalması ve gittikleri bölgelerde metastatik odak yaratmaları hiç de kolay değildir (3). Bir çoğu başta apoptoza olan yatkınlıkları ve aniokize direnememeleri nedeniyle daha damar içindeyken elimine olurlar (4,5). Hayatta kalan az sayıda hücre grubu ise hedef bölgeye ulaşır, ancak bu hücrelerin de büyük kısmı gerekli çoğalma başarısını gösteremez. Ancak kan, kanser hücrelerine kısa süreli ev sahipliği yapmayı hastalık boyunca sürdürür.

Kanser tanısı, tedaviye yanıtın takibi, kişiselleştirilmiş terapi seçeneklerinin değerlendirilmesi ve daha pek çok uygulama hemen her zaman neoplastik hücrelerin morfolojik ve/veya genetik/epigenetik özelliklerinin tayini ile şekillenmektedir. Neoplastik hücrelerin temini ise ulaşımı kolay bazı neoplazmlar (hematopoietik sistem kanserleri, cilt tümörleri...) dışında çoğu kez invaziv, çeşitli komplikasyon riskleri taşıyan ve başarı oranları hiçbir zaman %100 olmayan yöntemleri gerektirir. İşte bu noktada kanser hücrelerinin invaziv olmayan, komplikasyon riski düşük yöntemlerle temini hem hasta hem de hekim için çok cazip bir seçenektir.

Temel kitaplarda yer alan ve artık genel kabul görmüş kanser modelleri akılda bulundurulduğunda primer bir kanser odağından dolaşıma hücre taşınması ileri evrede görülmesi beklenen bir hadise olarak düşünülebilir, ancak kanserlerin henüz metastatik aşamaya gelmeden ve hatta sanıldandan daha erken evrede kan dolaşımına neoplastik hücre salmaya başladıkları gösterilmiştir (6,7). Kanser odaklarından dolaşıma hem erken evrede (erken tanı), hem de ileri evrede (hastalık takibi, tedavi yanıtı), yani hastalığın hemen her aşamasında malign hücreler salınması bu hücrelerin basit bir kan örneği ile elde edilmesi fikrini doğurmuş ve dolaşımdaki tümör hücreleri (DTH) özellikle 90'lı yılların başından itibaren araştırmacıların ilgi odağı olmuştur.

Dolaşımdaki Tümör Hücreleri (DTH) Tarihiçesi

Dolaşımdaki tümör hücreleri sanıldığı kadar aksine yeni bir kavram olmayıp bundan yaklaşık yüz elli yıl önce Thomas Ashworth tarafından primer kanseri oluşturan hücreler ile aynı morfolojiye sahip hücrelerin safen venden alınan kan örneğinde saptanmasıyla tıp tarihindeki yerini almıştır (8). Yıllar içerisinde invazyon ve metastaz kavramlarının daha net bir biçimde anlaşılması ile birlikte tümör hücrelerinin primer bölgesinden ayrılıp damar içerisine girerek uzak organlara dolaşım yolu ile taşınması metastaz biyolojisinin temeli olarak kabul görmüştür. Konu üzerine yapılan ilk araştırmalar 1970'leri işaret etmektedir (9,10). Daha sonra yapılan araştırmaların büyük kısmı bu hücrelerin temini üzerine metodik araştırmalardır. Bunlar arasında en dikkat çeken 1998 yılında yayınlanan LW Terstappen ve ark.'na ait olan çalışmadır (11). Terstappen ve ekibinin geliştirdiği epitelyal kanser hücresi zenginleştirme/

saflaştırma tekniği daha sonraki yıllarda Amerikan "Food and Drug Administration" tarafından klinik kullanım onayı alan ilk sistem olacaktır.

2010 ve sonrasında çalışmalar hem hız kazanmış hem de bir miktar yön değiştirmiştir. İntakt kanser hücresi eldesi üzerine geliştirilen sayısız teknik mevcut olup hepsinin birbirlerine göre artıları ve eksileri mevcuttur. Ancak son yıllarda bilim dünyası intakt kanser hücresi yanı sıra dolaşımdaki serbest tümör DNA/RNA'sı ile de yakından ilgilenmeye başlamıştır (12).

Dolaşımdaki Tümör Hücreleri (DTH) Eldesi ve Saflaştırılması

Kanser hastalarında DTH'nin sayısı kanın doğal elemanları olan hematopoietik hücrelere göre eser miktardadır. Bu nedenle DTH saptanması için yüksek hacimde kana ihtiyaç vardır. Hastalığın şiddetine göre saflaştırılan hücre sayısı 1-2'den binlerce hücreye kadar değişim gösterebilir (13). Özellikle erken evre kanser hastalarında beklenen DTH sayısı çok düşük olacağından bu hücrelerin saptanması için ileri derecede hassas tekniklere ihtiyaç duyulmaktadır. Bütün bu zorlukların yanı sıra hücrelerin yapısal olarak bozulma göstermeden ve intakt olarak elde edilmesi de büyük bir önem teşkil etmektedir. Henüz tüm dünya tarafından yaygın olarak kullanılan, kabul görmüş standart bir yöntem bulunmamakla birlikte yıllar içerisinde geliştirilmiş ve birbirlerine göre farklı üstünlüklere sahip çok sayıda yaklaşım mevcuttur. Bu yöntemler iki ana başlık altında incelenebilir:

1- Hücrelerin fiziksel özellikleri temel alınan yöntemler (Parantez içerisinde özelliği temel alan yöntemlerden birine yer verilmiştir).

- Boyut (Filtreleme)
- Yoğunluk (Santrifüj)
- Deformasyon özelliği (Filtreleme)
- Elektrik yük (Dielektroforez)

Kanser hücrelerin yukarıda sıralanan özelliklerine göre ayrıştırılmasını sağlayan çok sayıda farklı platform bulunmaktadır (14,15). Bu platformların önemli bir kısmı çeşitli filtreler yardımıyla kanser hücrelerini onlardan boyut olarak küçük lökositlerden ayırmaktadır. Ancak yine de büyük boyuttaki bazı hematopoietik hücrelerin bu filtreleme işlemiyle elimine edilememesi veyahut küçük boyuttaki kanser hücrelerinin filtreleme sonrası kaybedilebilmesi ihtimali mevcuttur. Küçük boyuttaki kanser hücrelerinin mikropartiküllerle sarılarak boyutunun büyütülmesi ile bu ihtimal en aza indirilebilmektedir (16). Filtreleme işlemiyle uzaklaştırılmayan hematopoietik hücreler ise anti-CD45 antikor kullanılması sureti ile karışımdan uzaklaştırılabilir (17). Ayrıca kanser hücreleri diğer kan elemanlarına göre daha yüksek yoğunluğa sahip olduğundan çeşitli santrifüj yöntemleri ile de zenginleştirilebilirler. Filtrasyon ve santrifüj yanı sıra kanser hücrelerinin, hücre zarlarının elektriksel yük farklılığı nedeniyle özel bir çeşit elektroforez yardımıyla da izole edilmesi mümkündür.

2- Hücrelerin biyolojik özellikleri temel alınan yöntemler (Antikor aracılı yöntemler)

- EpCAM
- CD138
- HER2
- MUC1

Bu yöntemlerin tamamı kanser hücrelerinin sitoplazmik membranlarında eksprese ettikleri antijenleri hedefleyen antikorlar kullanılması prensibine dayanmaktadır. Hastadan

alınan kan bu antikolar ve antikora bağlı manyetik özelliğe sahip partiküllerle muamele edildikten sonra, oluşan antikor-antijen kompleksleri manyetik kuvvet kullanılarak ayrıştırılır. Kullanılan yüzey antijeni yöntemden yonteme değişiklik göstermekle birlikte en sık kullanılanı, ortak epitelyal yüzey antijeni olan EpCAM'dır. Ancak bazı epitelyal kanser hücreleri epitelyal mezenkimal dönüşüm (epithelial mesenchymal transition-EMT) dolayısıyla yüzey epitelyal antijenlerini kaybederler (18). Bu nedenle daha özgün olabilmek adına EpCAM yanı sıra Her2, MUC1 gibi çeşitli antijenlerin kullanıldığı yaklaşımlar da mevcuttur.

Yukarıda da sözü geçtiği gibi dolaşımdaki tümör hücrelerinin izole edilmesi için kullanılan metotlar arasından sadece bir tanesi Amerikan "Food and Drug Administration (FDA)" onayını almıştır. Bu yöntem anti-EpCAM antikoru ve manyetik partiküllerin kullanımı ve daha sonrasında anti-CD45 antikoru kullanılarak kalan hematopoietik hücrelerin tamamıyla ortamdaki uzaklaştırılması temeline dayanmaktadır (19).

Unutulmamalıdır ki yukarıda bahsedilen yöntemler kandan yalnızca dolaşımdaki kanser hücrelerini ayrıştırmazlar. Kanser hücreleri yanı sıra başka hücreler de bu yöntemler sonunda elde edilen karışımın içerisinde bulunur. En temel örnek EpCAM pozitif benign epitelyal hücrelerdir (20).

EpCAM gibi genel bir epitelyal belirleyici ile hücreleri ayrıştırma metodu tek başına kanser hücrelerinin saflaştırılması için yeterli olmayacaktır. Bu nedenle hücrelerin zenginleştirilmesi sonrasında tespit edilmesi ya da başka bir deyişle saflaştırılması için ikinci bir aşamaya ihtiyaç vardır. Bu aşamada temel amaç kandan ayrıştırılan hücrelerin içerisinde malign hücrelerin neredeyse 100% doğrulukla saptanmasıdır. Bunun için hücrelerin morfolojik özelliklerine ek olarak immünohistokimya yöntemleri (immünohistokimya, immünofloresan) kullanılabileceği gibi çeşitli moleküler yöntemler de (floresan in-situ hibridizasyon, PCR, sekanslama...) tercih edilebilmektedir. İmmünohistokimya ya da immünofloresan ile üzerinde çalışılan neoplazma özgün antikolar kullanılarak hücrelerin doğası netleştirilebileceği gibi yine o neoplazma özgü çeşitli genetik alterasyonların saptanması ile bu basamak gerçekleştirilebilir.

Dolaşımdaki Tümör Hücreleri (DTH) Teknolojisinin Klinik Uygulamaları: İlk Adımlar

DTH ağırlıklı olarak kolorektal kanserler, akciğer, meme, pankreas ve prostat kanseri gibi sık görülen epitelyal malign neoplazmlar ve melanom üzerinde çalışılmakta olup jinekolojik malignansiler, baş boyun kanserleri ve hatta Hodgkin lenfoma üzerine de çalışmalar da mevcuttur (21,22). Elde edilen sonuçlar ise bu teknolojinin klinik kullanımı için umut vericidir.

DTH henüz rutin bir klinik uygulama olarak pratiğe girmemiş olsa da ileride kendisine yer bulma potansiyeli olan alanlar iki ana başlık altında incelenebilir:

1- *Hastalık şiddeti ve prognozun belirlenmesi, tedaviye yanıtın takibi ve kişiselleştirilmiş tedavi modaliteleri:* Yapılan çok sayıda çalışma gerek tanı anında, gerek tedavi öncesi, sonrası veya sonrasında yapılan DTH analizinin sağ kalım ile ilişkisinin güçlü olduğunu göstermiştir (13,23,24,25,26). Örneğin metastatik meme kanseri üzerinde yapılan çalışmada 5 veya daha az hücre saptanan ve 5'ten fazla hücre saptanan grupların progresyonsuz sağ kalım süreleri 4,9 aya 9,5 ay olup fark dikkat çekicidir (27). Metastatik meme kanseri üzerine yapılan diğer çalışmalarda da benzer sonuçlar alınmıştır (28). Yapılan bir metanaliz sonucuna göre ise kolorektal kanserli hastalarda saptanan DTH ile kötü

prognozun ilişkisi net bir şekilde gösterilmiştir (29). Ayrıca akciğer gibi ulaşımı zor bir organın malign tümörlerinde biyopsi alınması yerine kandan DTH saptanması yoluyla tedaviye yanıt takip edilebilmekte ve prognoza dair çıkarımlar yapılabilmektedir (30,31,32,33). Kısaca, yapılacak DTH sayımı ile tanı anında hastanın prognozu hakkında fikir sahibi olunabilir ve tedavi sırası ya da sonrasında yanıt değerlendirmesi gerçekleştirilebilir.

2- *Hedefe yönelik tedavi uygulamaları:* Günümüzde akciğer kanserinde ve kolorektal kanserlerde anti-EGFR tedavi yaygın olarak kullanılmakta olup bu tedaviye aday hasta belirlemesi için kolorektal kanserlerde KRAS ve BRAF, akciğer kanserlerinde ise EGFR mutasyonunun tespiti gerekmektedir. Yanı sıra meme kanserlerinde HER2 amplifikasyonu saptanması da ciddi bir prediktif öneme sahip olup bu yolak önemli bir tedavi hedefidir. Bu nedenle özellikle akciğer kanseri gibi ilk aşamada cerrahi müdahalenin düşünülmediği ve de biyopsi işleminin oldukça zorlu olduğu tümörlerde DTH kullanılması cazip bir alternatif imkan sunmaktadır. Yapılan çalışmalarda, elde edilen DTH'de saptanan biyobelirteçler ile primer ya da metastatik odaktan alınan biyopsi örneğindeki biyobelirteç ekspresyonunun yüksek oranda benzer olduğu gösterilmiştir (34). Bu bulgu mutasyon analizi için DTH'nin kullanılabileceğine işaret etmektedir.

Kolorektal kanserli hastalarda anti-EGFR tedavi kullanımı için metastatik odaktan elde edilen dokuda mutasyon analizinin yapılması tavsiye edilmektedir. Hastaların hemen hepsinde primer tümör eksizye edilse de metastatik odağa müdahale her zaman kolay ve mümkün olmamaktadır. Bu nedenle mutasyon analizi için metastatik odak yerine DTH kullanımının gündeme gelmesi hiç de şaşırtıcı değildir. Ancak bir çalışmada bu düşüncenin mümkün fakat uygulamada zorlu olacağı belirtilmiştir (35). Benzer şekilde başka bir çalışmada kolorektal kanserli hastalardan elde edilen DTH'de HER2 protein ekspresyon düzeyleri yanı sıra HER2 geni kopya sayısı çalışılmıştır ve DTH aracılığı ile kanser hücrelerinin genotipi ve fenotipi hakkında bilgi edinilebileceği belirtilmiştir (36).

Bütün bu çalışmalar ve projektif yaklaşımlar hedefe yönelik tedavi seçenekleri değerlendirilirken DTH'ye başvurulabileceğini ancak bu konuda tekrar edilebilir klinik uygulanabilirlik aşamasına gelinceye kadar önümüzde uzun ve zorlu bir yol olduğunu göstermektedir.

Dolaşımdaki Tümör Hücreleri'nin (DTH) Prostat Kanserindeki Yeri ve Önemi

Prostat kanserinde DTH kullanımına girmeden, öncelikle bu kanser türünde "nerede" olduğumuza bakacak olursak; Amerika Birleşik Devletleri'nde her yıl yaklaşık olarak 250 bin erkek prostat kanseri tanısı almakta olup bu hastaların %10'u prostat kanseri nedeniyle hayatını kaybetmektedir (37). Kanser nedeni ölümlerin büyük çoğunluğunu ise kastrasyon dirençli olgular teşkil etmektedir. Günümüzde sahip olduğumuz prognostik ve prediktif belirteçler ne yazık ki agresif hastalık tayininde yetersiz kalmaktadır.

Yakın bir tarihe kadar prostat kanserine karşı sahip olduğumuz tek silah olan antiandrojen tedavi modaliteleri kısa dönemde çok başarılı sonuçlar sağlamış olsa da hastalar kaçınılmaz olarak androjen bağımsız (kastrasyon dirençli) evreye geçip hızlı ve ağır bir klinik sergilerler. Son yıllarda anti-androjen tedaviye dirençli bu hasta grubuna yönelik çalışmalar sürdürülmekte olup tedavi seçenekleri arasına şimdiden iki önemli ajanın girmesi sağlanmıştır; abiraterone ve enzalutamide (38,39,40,41,42).

Prostat kanseri, DTH çalışmalarının ilk zamanlarından beri belli

başlı araştırma kollarından biri olma özelliğini korumuştur. Prostat kanserine ağırlık verilmesinin en temel sebeplerinden biri hasta takibinde yüksek spesifiteye sahip biyobelirteç arayışlarıdır. On yıllardır kullanılan PSA'nın spesifitesi düşüktür ve PSA ile elde edilen bilgi oldukça sınırlıdır. PSA'ya alternatif olabilecek yeni tarama ve takip belirteçleri geliştirilmekte olup DTH özellikle takip sürecinde umut vadetmektedir.

Prostat kanseri kendine özgü birçok belirtece sahip olması sebebiyle, DTH ayrıştırılması nispeten kolay bir kanser grubunu oluşturmaktadır. Dolaşımdaki prostat kanseri hücreleri "DTH eldesi" başlığı altında söz edilen yöntemlerden birinin kullanılmasıyla ve son aşamada AMACR ekspresyonu, yüksek androjen reseptörü ve myc gen kopya sayısı, PTEN delesyonu ya da TMPRSS2-ERG translokasyonu varlığı gösterilmesiyle ayrıştırılabilir (43,44).

Birden fazla çalışma hormon refrakter prostat kanseri hastalarında DTH sayısı ile PSA düzeyi, tümör yükü, prognoz arasında kuvvetli korelasyon varlığına işaret etmektedir (45,46,47,48). Bu yıl içerisinde yapılan bir metaanalizin sonuçları çarpıcıdır. Xuelei Ma ve ekibinin yayınladığı bu metanaliz DTH'nin prostat kanserli hastalarda prognoza etkisini araştırarak 27 çalışmayı incelemiş ve toplam sağ kalım süresi ile dolaşımdaki tümör hücresi miktarının yüksek derecede korelasyon gösterdiğini tespit etmiştir (49). Bu çalışmada dikkat çeken ek bir sonuç ise RT-PCR'nin immünohistokimya'ya olan üstünlüğüdür.

Prognoza olan katkısı oldukça dikkat çekici olsa da DTH'nin prostat kanseri üzerindeki prediktif değeri konusunda çalışmalar kısıtlıdır. Geçtiğimiz aylarda New England Journal of Medicine'de yayınlanan bir çalışmada prostat kanserli hastaların dolaşımdaki tümör hücrelerinde "androjen reseptörü-splise varyant 7 (ARV7)" saptanmasının "enzalutamide" ve "abiraterone" direnciyle ilişkilendirilebileceği öne sürülmüştür (50). Bu ve bunun gibi çalışmaların prostat kanserinde kişiselleştirilmiş tedavi seçeneklerinin değerlendirilmesinde yol gösterici olacağına inanılmaktadır.

Dolaşımdaki Tümör Hücreleri (DTH) ile İlgili Sorunlar

Yukarıda sıralanan (potansiyel) kullanım alanları gelecek için büyük önem arz etse de dolaşımdaki tümör hücrelerinin klinikteki yeri konusunda ciddi bir belirsizlik mevcuttur.

Yapılan çok sayıda çalışma dolaşımdaki tümör hücresi sayısının hastalık şiddeti (vücudun kanser yükü, ileri evre) ile ilişkisini göstermektedir. Ancak bu korelasyon, içerisinde çeşitli sorunları barındırmaktadır. Başlıca sorun testin yapılacağı zamanın (tanı anında, cerrahi öncesinde, tedavi sırasında...) belirlenmesidir. Burada da devreye testin hangi amaçla yapılacağı girmektedir ancak gözden kaçmaması gereken önemli bir nokta cerrahi müdahaledir. Çünkü cerrahi işlem sırasında kana çok sayıda kanser hücresi hızla geçiş yapmaktadır. Henüz literatürde bu sızıntının saptanacak hücre sayısına etkisi konusunda bir sonuç birliği bulunmasa da yeterli veriye sahip olana kadar cerrahi işlem sonrası yapılacak bir sayımda hücre sayısının olduğundan fazla tespit edilebilme ihtimali kafalarda bir soru işareti olarak kalmayı sürdürecektir.

Hastalarda gerçekleştirilecek test sayısı da netlik kazanmış bir konu değildir. Hastaların bir kere taranması ile müteakip tarama arasında elde edilen sonuçların sensitivitesi arasında fark olabileceği belirtilmektedir. Bunun nedeni her bir tekrarın hücre saptanma ihtimalini yükseltmesidir (51).

Dikkat çekici bir başka nokta ise dolaşımdaki tümör hücrelerinin heterojen bir popülasyon olması nedeniyle bu hücrelerin primer tümör ya da metastatik odağın genotipik ya da fenotipik

özelliklerini araştırmak için kullanılmasının güç olmasıdır.

Sıralanan bu çelişkilerin hepsinden önce akllara takılan nokta kullanılacak tekniğin hangisi olacağıdır. CellSearch© FDA onayı almayı başarmış tek yöntem olmasına rağmen gereksinim duyduğu en az 7,5 ml kan ve sonuç olarak elde edilen hücre sayısının azlığı gibi çeşitli problemlerli noktalar barındırmaktadır. Henüz FDA onayı almamış olsa da özellikle klinik araştırmalarda kullanılan çok sayıda teknik mevcut olup her birinin birbirine karşı çeşitli üstünlük ve zayıflıkları mevcuttur. Önümüzdeki yıllarda yapılacak çalışmaların bu konudaki belirsizliği aydınlatması beklenmektedir.

Son söz olarak, henüz DTH yeni bir kavram olarak klinik pratiğe doğru göz kırpmaya başlamışken adını günbegün daha sık duyduğumuz dolaşımdaki serbest tümör DNA/RNA'sı bilim dünyasında büyük heyecan yaratmaktadır. Morfolojik bir inceleme gerektirmemesi ve daha yüksek sensitiviteye sahip olması nedeniyle ölümcül bazı kanser tiplerinin erken tanısı başta olmak üzere birçok alanda klinik kullanımı gündemdedir (52).

Çıkar çatışması: Yazarlar bu makale ile ilgili olarak herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

Kaynaklar

1. Sethi N, Kang Y. Unravelling the complexity of metastasis - molecular understanding and targeted therapies. *Nat Rev Cancer* 2011;11:735-748.
2. Chang YS, di Tomaso E, McDonald DM, et al. Mosaic blood vessels in tumors: frequency of cancer cells in contact with flowing blood. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:14608-14613.
3. Luzzi KJ, MacDonald IC, Schmidt EE, et al. Multistep nature of metastatic inefficiency: dormancy of solitary cells after successful extravasation and limited survival of early micrometastases. *Am J Pathol* 1998;153:865-873.
4. Glinsky VV, Glinsky GV, Glinskii OV, et al. Intravascular metastatic cancer cell homotypic aggregation at the sites of primary attachment to the endothelium. *Cancer Res* 2003;63:3805-3811.
5. Berezovskaya O, Schimmer AD, Glinskii AB, et al. Increased expression of apoptosis inhibitor protein XIAP contributes to anoikis resistance of circulating human prostate cancer metastasis precursor cells. *Cancer Res* 2005;65:2378-2386.
6. Mikulova V, Cabinakova M, Janatkova I, et al. Detection of circulating tumor cells during follow-up of patients with early breast cancer: Clinical utility for monitoring of therapy efficacy. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation* 2014;74:132-142.
7. Kohn EC, Liotta LA. Molecular insights into cancer invasion: strategies for prevention and intervention. *Cancer Res* 1995;55:1856-1862.
8. TR. A. A case of cancer in which cells similar to those in the tumors were seen in the blood after death. *Australian Med J* 1869;14.
9. Butler TP, Gullino PM. Quantitation of cell shedding into efferent blood of mammary adenocarcinoma. *Cancer Res* 1975;35:512-516.
10. Liotta LA, Kleinerman J, Saidel GM. Quantitative relationships of intravascular tumor cells, tumor vessels, and pulmonary metastases following tumor implantation. *Cancer Res* 1974;34:997-1004.
11. Racila E, Euhus D, Weiss AJ, et al. Detection and characterization of carcinoma cells in the blood. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:4589-4594.
12. Schwarzenbach H, Hoon DS, Pantel K. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nat Rev Cancer* 2011;11:426-437.
13. Hayes DF, Cristofanilli M, Budd GT, et al. Circulating tumor cells at each follow-up time point during therapy of metastatic breast cancer patients predict progression-free and overall survival. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2006;12:4218-4224.
14. Alix-Panabieres C, Pantel K. Circulating tumor cells: liquid biopsy of cancer. *Clin Chem* 2013;59:110-118.

15. De Mattos-Arruda L, Cortes J, Santarpia L, et al. Circulating tumour cells and cell-free DNA as tools for managing breast cancer. *Nat Rev Clin Oncol* 2013;10:377-789.
16. Lin MX, Hyun KA, Moon HS, et al. Continuous labeling of circulating tumor cells with microbeads using a vortex micromixer for highly selective isolation. *Biosensors & bioelectronics* 2013;40:63-67.
17. Riethdorf S, Fritsche H, Müller V, et al. Detection of circulating tumor cells in peripheral blood of patients with metastatic breast cancer: a validation study of the CellSearch system. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2007;13:920-928.
18. Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer* 2002;2:442-454.
19. CellSearch™ Epithelial Cell Kit / CellSpotter™ Analyzer - K0315882004.
20. Pantel K, Deneve E, Nocca D, et al. Circulating epithelial cells in patients with benign colon diseases. *Clin Chem* 2012;58:936-940.
21. Gharbaran R, Park J, Kim C, et al. Circulating tumor cells in Hodgkin's lymphoma - a review of the spread of HL tumor cells or their putative precursors by lymphatic and hematogenous means, and their prognostic significance. *Crit Rev Oncol Hematol* 2014;89:404-417.
22. Mocellin S, Keilholz U, Rossi CR, et al. Circulating tumor cells: the 'leukemic phase' of solid cancers. *Trends Mol Med* 2006;12:130-139.
23. Bao H, Burke PA, Huang J, et al. Circulating tumor cells: application as a biomarker for molecular characterization and predictor of survival in an all-comer solid tumor phase I clinical study. *PLoS One* 2013;8:58557.
24. Hoshimoto S, Shingai T, Morton DL, et al. Association between circulating tumor cells and prognosis in patients with stage III melanoma with sentinel lymph node metastasis in a phase III international multicenter trial. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2012;30:3819-3826.
25. Miller MC, Doyle GV, Terstappen LW. Significance of Circulating Tumor Cells Detected by the CellSearch System in Patients with Metastatic Breast Colorectal and Prostate Cancer. *J Oncol* 2010;2010:617421.
26. Dawood S, Broglio K, Valero V, et al. Circulating tumor cells in metastatic breast cancer: from prognostic stratification to modification of the staging system? *Cancer* 2008;113:2422-2430.
27. Cristofanilli M, Hayes DF, Budd GT, et al. Circulating tumor cells: a novel prognostic factor for newly diagnosed metastatic breast cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2005;23:1420-1430.
28. Giuliano M, Giordano A, Jackson S, et al. Circulating tumor cells as early predictors of metastatic spread in breast cancer patients with limited metastatic dissemination. *Breast Cancer Res* 2014;16:440.
29. Rahbari NN, Aigner M, Thorlund K, et al. Meta-analysis shows that detection of circulating tumor cells indicates poor prognosis in patients with colorectal cancer. *Gastroenterology* 2010;138:1714-1726.
30. Igawa S, Gohda K, Fukui T, et al. Circulating tumor cells as a prognostic factor in patients with small cell lung cancer. *Oncology letters* 2014;7:1469-1473.
31. Zhu WF, Li J, Yu LC, et al. Prognostic value of EpCAM/MUC1 mRNA-positive cells in non-small cell lung cancer patients. *Tumour biology: the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 2014;35:1211-1219.
32. Punnoose EA, Atwal S, Liu W, et al. Evaluation of circulating tumor cells and circulating tumor DNA in non-small cell lung cancer: association with clinical endpoints in a phase II clinical trial of pertuzumab and erlotinib. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2012;18:2391-2401.
33. Tanaka F, Yoneda K, Kondo N, et al. Circulating tumor cell as a diagnostic marker in primary lung cancer. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* 2009;15:6980-6986.
34. Punnoose EA, Atwal SK, Spoerke JM, et al. Molecular biomarker analyses using circulating tumor cells. *PLoS One* 2010;5:12517.
35. Mostert B, Jiang Y, Sieuwerts AM, et al. KRAS and BRAF mutation status in circulating colorectal tumor cells and their correlation with primary and metastatic tumor tissue. *Int J Cancer* 2013;133:130-141.
36. Campos M, Luque R, Jimenez J, et al. Simultaneous phenotypic and genetic characterization of single circulating tumor cells from colon cancer patients. *Histology and histopathology* 2013;28:1439-1450.
37. American Cancer Society. *Cancer Facts & Figures 2013*. Atlanta: American Cancer Society; 2013:2013.
38. Ning YM, Pierce W, Maher VE, et al. Enzalutamide for treatment of patients with metastatic castration-resistant prostate cancer who have previously received docetaxel: U.S. Food and Drug Administration drug approval summary. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2013;19:6067-6073.
39. Scher HI, Fizazi K, Saad F, et al. Increased survival with enzalutamide in prostate cancer after chemotherapy. *The New England journal of medicine* 2012;367:1187-1197.
40. Badrising S, van der Noort V, van Oort IM, et al. Clinical activity and tolerability of enzalutamide (MDV3100) in patients with metastatic, castration-resistant prostate cancer who progress after docetaxel and abiraterone treatment. *Cancer* 2014;120:968-975.
41. Beer TM, Armstrong AJ, Rathkopf DE, et al. Enzalutamide in metastatic prostate cancer before chemotherapy. *The New England journal of medicine* 2014;371:424-433.
42. Sternberg CN, Castellano D, Daugaard G, et al. Abiraterone acetate for patients with metastatic castration-resistant prostate cancer progressing after chemotherapy: final analysis of a multicentre, open-label, early-access protocol trial. *Lancet Oncol* 2014;15:1263-1268.
43. Leversha MA, Han J, Asgari Z, et al. Fluorescence in situ hybridization analysis of circulating tumor cells in metastatic prostate cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2009;15:2091-2097.
44. Attard G, Swennenhuis JF, Olmos D, et al. Characterization of ERG, AR and PTEN gene status in circulating tumor cells from patients with castration-resistant prostate cancer. *Cancer Res* 2009;69:2912-2918.
45. Danila DC, Heller G, Gignac GA, et al. Circulating tumor cell number and prognosis in progressive castration-resistant prostate cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2007;13:7053-7058.
46. Garcia JA, Rosenberg JE, Weinberg V, et al. Evaluation and significance of circulating epithelial cells in patients with hormone-refractory prostate cancer. *BJU Int* 2007;99:519-524.
47. Scher HI, Jia X, de Bono JS, et al. Circulating tumour cells as prognostic markers in progressive, castration-resistant prostate cancer: a reanalysis of IMMC38 trial data. *Lancet Oncol* 2009;10:233-239.
48. de Bono JS, Scher HI, Montgomery RB, et al. Circulating tumor cells predict survival benefit from treatment in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2008;14:6302-6309.
49. Ma X, Xiao Z, Li X, et al. Prognostic role of circulating tumor cells and disseminated tumor cells in patients with prostate cancer: a systematic review and meta-analysis. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 2014;35:5551-5560.
50. Antonarakis ES, Lu C, Wang H, et al. AR-V7 and resistance to enzalutamide and abiraterone in prostate cancer. *The New England journal of medicine* 2014;371:1028-1038.
51. Brownbridge GG, Gold J, Edward M, et al. Evaluation of the use of tyrosinase-specific and melanA/MART-1-specific reverse transcriptase-coupled-polymerase chain reaction to detect melanoma cells in peripheral blood samples from 299 patients with malignant melanoma. *Br J Dermatol* 2001;144:279-287.
52. Bettgowda C, Sausen M, Leary RJ, et al. Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Science translational medicine* 2014;6:224-224.