

BÖLÜM 2

DOLAŞAN TÜMÖR HÜCRELERİ VE SIVI BİYOPSİ İLE TANI VE TEDAVİ YAKLAŞIMLARI

Gizem AYNA DURAN¹

GİRİŞ

Kanser, dünyanın birçok ülkesinde erken ölüme sıklıkla neden olan hastalıklardan sadece bir tanesidir ve kanserli hastaların sayısının önümüzdeki yıllarda artış göstermesi beklenmektedir (1,2). Böylesine yaygın ve toplumu tehdit eden bir hastalığın tanı ve tedavisinde geliştirilen yaklaşımlar ve bu yaklaşımların etkinliği giderek artan sayıları bir nebze olsun azaltmak açısından önemlidir. Bu tanı ve dolayısıyla tedaviye direkt katkısı olacağı düşünülen yöntemlerden birisi de sıvı biyopsisi aracılığıyla toplanıp karakterize edilebilen kanda serbest dolaşan tümör hücrelerinin tespit edildiği yöntemlerdir.

Dolaşan tümör hücreleri (Circulating tumor cells-CTC) katı bir tümör lezyonundan ayrılan ya da hali hazırda metastatik özellikte olup kan dolaşımına karışan kanser hücreleri olarak tanımlanmaktadır. CTC'lerin kanser prognozundaki rolü birçok kanser çeşidinde gösterilmiştir. Buna karşılık tanı ve tedavideki etkinliği henüz araştırma aşamasındadır. Bu kitap bölümünde CTC'lerin biyolojik özellikleri, toplanma ve analiz yöntemlerinden, klinik uygulamalardan ve geliştirilen bir alan olarak yeni benimsenen araştırma yöntemlerinden bahsedilecektir.

KANDA SERBEST DOLAŞAN TÜMÖR HÜCRELERİ (CTC'LER)

Kanda serbest dolaşan tümör hücreleri 1869 yılında ilk kez Thomas Ashworth tarafından gözlenmiştir (3). Çoğu durumda, ölüme neden olan birincil tümör değildir fakat metastazlardır. Metastatik tümörler tüm insan vücuduna yayılmaktadır ve çıkarılması veya tedavisi birincil tümöre göre çok daha zor olan durumlar olarak karşımıza çıkmaktadır. Dolaşımdaki tümör hücrelerinin analizi metastatik kanserlerin biyolojisi hakkında bilgi sağlamak ve kanserlerin prognozunu izlemek açısından önem arz etmektedir. Ayrıca kanda dolaşan tümör hücreleri bir-

¹ Dr. Öğr. Üyesi, İzmir Ekonomi Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomedikal Mühendisliği Bölümü, gizem.duran@ieu.edu.tr

çok organda metastazı da başlatabilmektedir (4). Birincil tümörden köken aldığı düşünülen CTC'ler bir süre sonra kanda birincil tümörden oldukça uzak organ ve bölgelere göç ederken farklılaşmaktadırlar ve değişen epitelyal-mezenkimal geçiş (EMT) özellikleri sayesinde metastatik özellik kazanmaları kolaylaşmaktadır (5).

Kan dolaşımında taşındıklarında, CTC'lerin büyük bir kısmı maruz kaldıkları kesme gerilmesinden dolayı (shear stress) zarar görür veya belirli bir yüzey ile bağlantıları kesilip sirküle eden hücre formuna dönüştükleri için programlanmış bir hücre ölüm mekanizması olan anoikik hücre ölümünden dolayı ölürler (5, 6). CTC'lerin kan dolaşımında sağ kalımlarını engelleyen bir diğer neden de bağışıklık sistemi tarafından yok edilmeleridir. Bunun yanı sıra, CTC'lerin küçük bir kısmı kanda immün sistemi baskılayıcı sitokinler salgılayan plateletler, nötrofil hücreleri, makrofajlar ya da tümör başlangıcı, anjiyogenez, metastaz ve ilaç direnci gibi süreçlerde büyük rol oynayan kanser-ilişkili fibroblastlar (CAFs) ile etkileşime girerek bağışıklık sisteminden kaçmaya ve sağ kalımlarını sürdürmeye çalışmaktadırlar (7, 8). CTC'ler kan akışında immün sistemden kaçmak için hipoksi ilişkili genleri (HIF-1 α , BNIP3, CA-IX and GLUT1), EMT ilişkili genleri (Snail, Twist, EpCam, Vimentin and E-cadherin) ve kanser kök hücreleri (Nanog, OCT4, SOX2 and CD133) ilişkili genleri yukarı regüle ettiği bilinmektedir (9).

Dolaşan Tümör Hücrelerinin Karakterizasyonu

Kanda CTC'lerin sayıları büyük kan hücreleri ile karşılaştırıldığında oldukça azdır ve kanda bulunan diğer hücre ve moleküllerin arasında CTC'lerin tespit edilmesi oldukça zordur. Bununla birlikte, CTC'lerin tespiti için ortaya çıkan teknolojiler ve kan hücrelerinden tümör hücrelerini ayırmaya yarayan zenginleştirme metotları (enrichment methods), CTC'lerin biyolojisine yönelik araştırmaların derinleştirilmesine katkıda bulunmuş ve klinik uygulamaları kolaylaştırmıştır.

CTC'lerin saptanmasında genellikle moleküler belirteçler (epitel, mezankimal ve spesifik belirteçler) kullanılmaktadır. Moleküler belirteçler farklı kanser türleri arasında değişiklik gösterse de çoğu kanser türü (meme, prostat, pankreas, kolorektal, hepatoselüler kanserler) epitel hücre kökenli olduğundan dolayı epitel hücre adezyon molekülü (EpCAM) en yaygın olarak kullanılan belirteçtir (10, 5). EpCAM ilk olarak 1979 yılında farelerde kolorektal karsinom çalışmalarında elde edilen monoklonal antikorlar tarafından tanınan hümorale bir antijen olarak tanımlanmıştır (11). Örneğin, EpCAM molekülü başta meme ve prostat kanserine ait CTC'lerde erken veya metastatik süreçle ilgili hastalığın prognozu hakkında ciddi fikir verdiği bilinmektedir (12,13). Bunun yanı sıra pankreas, kolorektal, hepatoselüler kanserlerde de bir belirteç olarak kabul görmektedir (5, 14, 15).

EpCAM molekülünün kanser belirteci olarak kullanılması normalde EpCAM molekülünü az eksprese eden ya da EpCAM molekülüne sahip olmayan nörojenik kanserlerde uygun değildir (16, 17). Bunun yanı sıra küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (NSCLC) gibi bazı kanser türlerinde ise EpCAM negatif CTC'lerin miktarının EpCAM pozitif CTC'lerden önemli ölçüde daha çok olduğu saptanmıştır (18, 19). EpCAM molekülü epitel kökenli olan ve kanser belirteci olarak en sık rastlanan metastatik meme kanserlerinde bile tüm CTC'lerde pozitif olmayabilir. Metastatik meme kanseri CTC'lerinde EpCAM negatif hücreler tayin sırasında göz ardı edilebilmektedir (20, 21).

Metastaz, kansere bağlı ölümlerin başlıca nedenlerinden en önemlisidir ve bu nedenle metastazın önlenmesi ve tedavisi klinik sonuçların iyileştirilmesi için esastır. Evrimsel olarak korunan bir süreç olan epitelyal mezenkimal geçiş (EMT), karsinogeneze metastatik süreçler devreye girdiğinde gözlenen bir olgudur. EMT ile kanserli hücre artan hareketlilik, damar ve başka dokulara göç ve apoptotik uyarılara karşı direnç kazanma gibi özellikle edinerek metastatik özellikler kazanmaktadır. EMT sürecinde kanser hücreleri bir takım moleküler değişimler geçirirler. Örneğin hücrelerde bu süreçte epitel belirteçlerin (E-kadherin, ZO-1, claudinler ve okludinler) ekspresyonu azalırken, mezankimal belirteçlerin (vimentin, N-cadherin, fibroblast-spesifik protein ve fibronektin) ekspresyonları artış göstermektedir (22, 5). Örneğin epitel hücre kökenli olan meme ve prostat kanseri CTC'lerinde, kolorektal kanserler, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri, pankreatik kanserler, hepatoselüler kanserler, gastrik kanserlerde ortak olarak en sıklıkla tayin edilen mezankimal belirteçler vimentin ve twist olarak karşımıza çıkmaktadır (5). N-kadherin sıklıkla meme kanseri ve küçük hücreli olmayan akciğer kanseri ve gastrik kanserlerde belirteç olarak kullanılırken KLF8 (23) sadece pankreatik kanserlerde, SNAI1 (24, 25), AKT2 (24, 25) ve LOXL3 (26) mezankimal belirteçleri de kolorektal kanserlerde kullanılmaktadır (5, 24, 27, 28, 29, 30, 31, 32). Bunun yanı sıra böbrek kanseri, mesane kanseri, özafagus kanseri, servikal kanserler, melanoma gibi kanser türlerinde tespit edilmiş mezankimal belirteçler mevcut değildir (5).

CTC'lerde kanserlere spesifik belirteçlerin taranması da kanser prognozu ve tanısında sıklıkla kullanılan yöntemlerdendir. Kanser spesifik belirteçler genellikle primer kanserli dokuyu temsil ettiğinden dolayı CTC'lerde eksprese edilme oranları zaman zaman daha düşük seyredebilmektedir. Örneğin meme kanserlerinde insan epidermal büyüme faktörü reseptörü-2 (HER2) gen amplifikasyonu primer meme kanserli dokuda çok önemli bir tanı belirteci iken CTC'lerde eksprese oranları daha düşük olabilmektedir (%15 kadar) (33). Bunun yanı sıra östrojen reseptörü, prostata özgü membran antijeni, folat reseptörü ve survivin gibi diğer biyobelirteçler, farklı kanserlerde CTC belirteçleri olarak tanımlanmıştır (5, 34, 35, 36, 37).

Dolaşan Tümör Hücrelerinin Toplanma ve Analiz Yöntemleri

Kanser hastalarından metastatik dolaşımdaki tümör hücrelerinin (CTC'ler) izolasyonu ve karakterizasyonu hastalık izleme ve moleküler karakterizasyon için oldukça önemlidir. Son yıllarda birçok yeni CTC izolasyon yöntemi geliştirilmesine rağmen kanserli dokuların heterojenitesinden ve koşullara göre dinamik bir şekilde değişime uğramalarından dolayı spesifik ve hassas belirteçlerin tayin edilmesi zorlaşmaktadır. Bu nedenle de CTC'lerin izolasyonu ve tespiti zaman zaman oldukça zor olmaktadır.

CTC'lerin izolasyon yöntemleri fiziksel özelliklere göre izolasyon (boyut ve membran kapasitansı gibi), fonksiyon bazlı izolasyon, immünoboncuk (immuno-bead) ile zenginleştirme, mikro cihazlar ve mikroakışkan platformların kullanıldığı yöntemler olarak sınıflandırılmaktadır (38). Bunun yanı sıra CTC'lerin toplanma yöntemleri genel olarak belirli bir antijeni tayin edebilen yöntemlerdir. Bu bağlamda bilinen yöntemlerden biri CellResearch sistemidir ve bu yöntem **ABD Gıda ve İlaç İdaresi (Food and Drug Administration-FDA)** tarafından onaylanmış pozitif CTC zenginleştirme (enrichment) yöntemi olarak bilinmektedir (39).

Bu teknoloji ile CTC'ler EpCAM konjuge manyetik ferroakışkanlar ile yakalanmaktadır. İlk adımda, yöntem plazma bileşenlerini ortadan kaldırmak için santrifügasyondan oluşan iki aşamalı bir prosedüre dayanmaktadır. İkinci adımda, varsayılan CTC'ler boyanmaktadır ve anti-sitokeratin antikoları kullanılarak tanımlanmaktadır. Bu sırada kontaminant beyaz kan hücreleri (WBC'ler) CD45 boyaması yoluyla tanımlanıp CTC'lerden ayrılmaktadır. (39, 40).

CTC'lerin izolasyonunda kullanılan bir diğer yöntem ise Agerbæk ve ark. tarafından geliştirilen EpCAM bağımsız bir seçilimin olduğu bir yöntemdir. Bu yöntem sitma rVAR2 proteininin EMT sürecinde epitelyal ve mezenkimal kanser hücrelerinde eksprese edilen onkofetal kondroitin sülfata (ofCS) spesifik bağlanmasına dayanan CTC izolasyonudur. Bu çalışmada rVAR2'nin CTC'leri periferik kan mononükleer hücrelerinin minimum kontaminasyonu ile hepatik, pankreas ve prostat kanserli hastalardan verimli bir şekilde izole edebildiği gösterilmiştir (41).

CTC'lerin izolasyonu için *in vivo* yöntemler de geliştirilmiştir. Bu yöntemde CTC'ler doğrudan periferik damardan sürekli olarak toplanmaktadır. Geliştirilen sistem CTC zenginleştirmeden sonra kalan kan ürünlerini damara geri vererek uzun bir süre boyunca klasik flebotomi örneklerinden daha büyük kan hacimlerinin kullanılmasına izin vermektedir (42).

Pozitif CTC seçimi genellikle antijen eksprese eden CTC'lerin yüksek oranda izole edilmesini ve periferik kan hücresi kontaminasyonu oranlarının düşük olmasını sağlasa da CTC'ler belirli koşullar altında belirli bir antijenin ekspresyonunu dinamik olarak değiştirebilmektedir ve bu da belirli bir numunedeki toplam

CTC popülasyonunun eksik tahmin edilmesine neden olabilmektedir. Bu nedenle tek-hücre izolasyon metodu olarak bilinen CTC'lerin boyuta dayalı filtrasyonunu (kan hücrelerine kıyasla daha büyük çaplarından yararlanarak) baz alan yeni yöntemler geliştirilmektedir. Örneğin; mikroakışkan yöntemlerin kullanıldığı CTC izolasyon metodlarının kullanılmasının yanı sıra nanoteknolojinin kullanıldığı ve manyetik nanopartikül temelli yöntemler de geliştirilmektedir (43, 44, 45, 46). Mikroakışkanlar temelli yöntemlerin yanı sıra altın nanopatiküllerin de kullanıldığı CTC izolasyon yöntemleri mevcuttur (47).

CTC'lerin mutasyonel analizi için, şu anda mevcut olan en gelişmiş biyoteknolojik yöntem tüm genom amplifikasyonunun (WGA) ve ardından yeni nesil dizilemenin (NGS) kombinasyonunu şeklindedir. Fakat, WGA yöntemi hem uzmanlık gerektiren hem de zaman harcanması gereken bir basamaktır. Bu nedenle WGA sürecini devreden çıkartacak yeni bir yöntem geliştirilmiştir. Bu yöntemde WGA yöntemi devre dışı bırakılıp NGS ile CTC zenginleştirilmesi yapılmaktadır. Söz konusu bu yöntem sıvı biyopsinin analitik doğruluğunu artırabilen ve klinik çalışmalar için kanser hastalarından alınan CTC'lerin ve hatta dolaşan tümör DNA'sının (ctDNA) incelenmesinde umut verici görünen maliyet etkin, zaman kazandıran ve güvenilir bir metodolojik yaklaşım olarak benimsenmiştir (48,49).

Kanser Tanısında Likit (Sıvı) Biyopsisi ve CTC Tabanlı Klinik Uygulamalar

Dolaşan tümör hücrelerinin belirlenmesi ve biyolojisinin analiz edilmesinin yanı sıra sıvı biyopsi tabanlı kişiselleştirilmiş kanser tanı ve tedavi yöntemleri de olağanüstü bir yöntem olarak karşımıza çıkmaktadır. Güncel sıvı biyopsisi uygulamaları ve CTC tabanlı tanı ve tedavi yöntemlerinin kullanıldığı teknikler günümüzde hemen hemen her kanser türü için klinik açıdan denenmektedir. Sıvı biyopsi yöntemlerinin geliştirildiği ve aktif kullanıldığı global düzeydeki şirketler CellMaxLife, Exosomedx, Cynvenio, Guardant 360, Grail gibi şirketlerdir. Her birinin uzmanlık alanı ve odaklandığı konular birbirinden farklıdır ve sıvı biyopsisini her biri birbirinden farklı ama ortak olarak kanser tanı ve tedavilerine hizmet vermek üzere gerçekleştirmektedirler (49). Örneğin, Grail şirketi akciğer kanseri de dahil olmak üzere birden fazla kanser türünü tespit etmek için tasarlanmış bir kan testi tasarlamıştır. (50). CellMaxLife şirketi kolorektal kanser, adenomlar ve kolorektal kanser taraması ve profili için dolaşımdaki tümör hücrelerini kullanarak tespit yöntemi geliştirmiştir (51). Exosomedx şirketi ekzozom temelli bir yöntem kullanarak küçük hücreli dışı akciğer kanseri ve prostat kanseri teşhisi kiti tasarlamıştır (52). Cynvenio şirketi NGS temelli teknikle mutasyon taraması gerçekleştirmektedir (53). Guardant 360 şirketi kanser için yüksek riskli fakat asemptomatik bireylerde erken kanser tayini kitleri üzerine çalışmaktadır (54). Bütün bunların

yanı sıra Personal Genome Diagnostics şirketi ise NGS yöntemi kullanarak 64 genin taranmasını içeren kişisel kanser tanı kiti geliştirmektedir (55, 49).

Aktif olarak klinikte meme kanseri, kolorektal kanserler, epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) pozitif akciğer kanseri, melanoma çeşitleri için CTC izolasyonu, karakterizasyonu ve sıvı biyopsisi uygulamaları gerçekleştirilmektedir (56).

SONUÇ

Sıvı biyopsisi son zamanlarda doku biyopsisi sırasında oluşan bazı sıkıntılar ve kanserli hücrelerin olası yayılması gibi sorunlar dolayısıyla popüler hale gelmiştir. Minimal düzeyde invaziv şekilde hücre/genetik materyal toplanarak gerçekleştirilen sıvı biyopsisi sayesinde primer kanserli doku ve metastaz süreci hakkında ciddi bilgiler edinilmektedir. Bu bilgiler hem tanı hem de tedavi süreçlerinde ciddi katkılar sağlamaktadır. Sıvı biyopsisi ile kandan CTC'ler, kanser hücreleri dolaşan tümör DNA'sı (ctDNA), RNA (mRNA ve mikroRNA), hücre dışı veziküller (EV) olarak adlandırılan, proteinler ve nükleik asitler içeren zarla kapsüllenmiş hücre altı yapılar olan eksozomlar dahil, dolaşan hücresiz DNA (cfDNA) fragmanları toplanabilmektedir. Bu kitap bölümünün ana konusu CTC'ler olduğundan dolayı daha çok dolaşan hücreler ve izolasyon/analiz ve klinik uygulamaları hakkında bilgi verilmiştir.

KAYNAKÇA

1. Ferlay J., Colombet M., Soerjomataram I., et al. Cancer statistics for the year 2020: An overview. 2021; *Int. J. Cancer*.2021;149:778–789 <https://doi.org/10.1002/ijc.33588>.
2. Soerjomataram I., Bray F. Planning for tomorrow: global cancer incidence and the role of prevention 2020–2070. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 2021; 18:663–672.
3. Ashworth, T.R., A case of Cancer in which cells similar to those in the tumours were seen in the blood after death. *Australian Medical Journal*. 1869; 14: p. 146-147.
4. Dalum G., Holland L., Terstappen L.W. Metastasis and Circulating Tumor Cells. *EJIFCC* 2012; 12;23(3):87-97.
5. Lin D., Shen L., Luo M., et al. Circulating tumor cells: biology and clinical significance. *Signal Transduction and Targeted Therapy* 2021; 6:404. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00817-8>
6. Follain G., Herrmann D., Harlepp S., et al. Fluids and their mechanics in tumour transit: shaping metastasis. *Nat. Rev. Cancer*. 2020; 20, 107–124. doi: 10.1038/s41568-019-0221-x.
7. Garrido-Navas, C., Miguel-Pérez D., Exposito-Hernandez J., et al. Cooperative and escaping mechanisms between circulating tumor cells and blood constituents. *Cells*. 2019; 8, 1382–1391. doi:10.3390/cells8111382
8. Chen, X., Song, E. Turning foes to friends: targeting cancer-associated fibroblasts. *Nat. Rev. Drug Discov*. 2019; 18, 99–115. Doi:10.1038/s41573-018-0004-1
9. Noman M.Z., Messai Y., Muret J. Crosstalk between CTC, Immune System and Hypoxic Tumor Microenvironment. *Cancer Microenvironment*. 2014; 7:153–160. DOI 10.1007/s12307-014-0157-3
10. Vasseur A., Kiavue N., Bidard F.C., et al. Clinical utility of circulating tumor cells: an update. *Molecular Oncology* 2021; 15:1647–1666.
11. Herlyn, M., Steplewski, Z., Herlyn, D. et al. (1979). Colorectal carcinoma-specific antigen: detection by means of monoclonal antibodies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1979; 76(3), 1438–1442.
12. Spizzo, G., Fong, D., Wurm, M., et al. (2011). EpCAM expression in primary tumour tissues

- and metastases: an immunohistochemical analysis. *Journal of Clinical Pathology*. 2011; 64(5), 415–420. <https://doi.org/10.1136/jcp>.
13. Went, P. T., Lugli, A., Meier, S., et al. Frequent EpCam protein expression in human carcinomas. *Human Pathology*. 2004; 35(1), 122–128.
 14. Criscitiello, C., Sotiriou, C., Ignatiadis, M. Circulating tumor cells and emerging blood biomarkers in breast cancer. *Curr. Opin. Oncol.* 2010; 22, 552–558. DOI: 10.1097/cco.0b013e32833de186
 15. Gorin M.A., Verdone J.E., Toom E., et al. Circulating tumour cells as biomarkers of prostate, bladder, and kidney cancer. *Nat. Rev. Urol.* 2017; 14, 90–97. doi: 10.1038/nrurol.2016.224.
 16. Khan M.S., Tsigani T., Rashid M. Circulating Tumor Cells and EpCAM Expression in Neuroendocrine Tumors. *Clin Cancer Res.* 2011; 17(2).
 17. Lukasz A. Adamczyk L.A., Williams H., Frankow A. Current understanding of circulating tumor cells –potential value in malignancies of the central nervous system. *Front. Neurol.* 2015; 6(174). <https://doi.org/10.3389/fneur.2015.00174>
 18. Hanssen A., Loges S., Pantel K. Detection of circulating tumor cells in non-small cell lung cancer. *Frontiers in Oncology*, 2015; 5:207. doi: 10.3389/fonc.2015.00207
 19. Wang J, Lu w., Tang C. et al. Label-free isolation and mRNA detection of circulating tumor cells from patients with metastatic lung cancer for disease diagnosis and monitoring therapeutic efficacy. *Anal. Chem.* 2015; 87, 11893–11900.
 20. Königsberg R., Obermayr E., Bises G. Detection of EpCAM positive and negative circulating tumor cells in metastatic breast cancer patients. *Acta Oncol.* 2011; 50(5):700-10. doi: 10.3109/0284186X.2010.549151.
 21. Schneck H., Gierke B., Uppenkamp F. EpCAM-Independent Enrichment of Circulating Tumor Cells in Metastatic Breast Cancer. *PLOS ONE*. 10(12): 1-23 DOI:10.1371/journal.pone.0144535
 22. Mittal, V. Epithelial mesenchymal transition in tumor metastasis. *Annu. Rev. Pathol.* 13, 395–412 (2018).
 23. Zhu P, Liu H.Y., Liu F.C. et al. Circulating tumor cells expressing Kruppel-like factor 8 and vimentin as predictors of poor prognosis in pancreatic cancer patients. *Cancer Control* 2021; 28, 10732748211027163.
 24. Wang W., Wan L., Wu S. et al. Mesenchymal marker and LGR5 expression levels in circulating tumor cells correlate with colorectal cancer prognosis. *Cell Oncol.* 2018; 41, 495–504.
 25. Zhao R., Cai Z., Li S. et al. Expression and clinical relevance of epithelial and mesenchymal markers in circulating tumor cells from colorectal cancer. *Oncotarget* 2017; 8, 9293–9302.
 26. Barbazán J., Romay L.M., Vieito M. et al. A multimarker panel for circulating tumor cells detection predicts patient AQ5 outcome and therapy response in metastatic colorectal cancer. *Int. J. Cancer* 2014; 135, 2633–2643.
 27. Zhang, S., Wu T., Peng X. R. et al. Mesenchymal phenotype of circulating tumor cells is associated with distant metastasis in breast cancer patients. *Cancer Manag. Res.* 2017; 9, 691–700.
 28. Chen J., Cao S., Situ B. et al. Metabolic reprogramming-based characterization of circulating tumor cells in prostate cancer. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 2018; 37, 127.
 29. Dong J., Zhu D., Tanget X. al. Detection of circulating tumor cell molecular subtype in pulmonary vein predicting prognosis of stage I-III non-small cell lung cancer patients. *Front Oncol.* 2019; 9, 1139.
 30. Messaritakis, I., Nikolaou M., Koinis F. et al. Characterization of DLL3-positive circulating tumor cells (CTCs) in patients with small cell lung cancer (SCLC) and evaluation of their clinical relevance during front-line treatment. *Lung Cancer*. 2019; 135, 33–39.
 31. Zhao, X. H., Wang Z.R., Chen C.L. et al. Molecular detection of epithelial-mesenchymal transition markers in circulating tumor cells from pancreatic cancer patients: Potential role in clinical practice. *World J. Gastroenterol.* 2019; 25, 138–150.
 32. Wang, Z., Luo L., Cheng Y. et al. Correlation between postoperative early recurrence of hepatocellular carcinoma and mesenchymal circulating tumor cells in peripheral blood. *J. Gastrointest. Surg.* 2018; 22, 633–639.
 33. Krishnamurthy, Bischoff F. S., Mayeret J.A. al. Discordance in HER2 gene amplification in circulating and disseminated tumor cells in patients with operable breast cancer. *Cancer Med.* 2013; 2, 226–233.

34. Forsare, C. Bendahl P.O., Moberg E. et al. Evolution of estrogen receptor status from primary tumors to metastasis and serially collected circulating tumor cells. *Int. J. Mol. Sci.* 2020; 21, 2885–2897.
35. Yin, C. Wang Y., Ji J. et al. Molecular profiling of pooled circulating tumor cells from prostate cancer patients using a dual-antibodyfunctionalizedmicrofluidic device. *Anal. Chem.* 2018; 90, 3744–3751.
36. Chen, X., Zhou F., Li X. et al. Folate receptor-positive circulating tumor cells as a predictive biomarker for the efficacy of first-linepemetrexed-based chemotherapy in patients with non-squamous non-small cell lung cancer. *Ann. Transl. Med.* 2020; 8, 631.
37. Cao, W., Yang W., Li H. et al. Using detection of survivin-expressing circulating tumor cells in peripheral blood to predict tumor recurrencefollowing curative resection of gastric cancer. *J. Surg. Oncol.* 2011; 103, 110–115.
38. Sharma S., Zhuang R., Long M. Circulating Tumor Cell Isolation, Culture, and Downstream Molecular Analysis. *Biotechnol Adv.* 2018 ; 36(4): 1063–1078. doi:10.1016/j.biotechadv.2018.03.007.
39. 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. *Clin Cancer Res.* 2007; 13:920–8.
40. Castro-Giner F, Aceto N. Tracking cancer progression: from circulating tumor cells to metastasis. *Genome Medicine.* 2020; 12:31. <https://doi.org/10.1186/s13073-020-00728-3>
41. Agerbæk M.Ø., Bang-Christensen S.R., Yang M.H., et al. The VAR2CSA malaria protein efficiently retrieves circulating tumor cells in an EpCAM-independent manner. *Nat Commun.* 2018; 9:3279.
42. Kim T.H., Wang Y., Oliver C.R., Thamm D.H., et al. A temporary indwelling intravascular ap-haeretic system for in vivo enrichment of circulating tumor cells. *Nat Commun.* 2019; 10:1478.
43. Cho H., Kim J., Song H., et al. Microfluidic technologies for circulating tumor cell isolation. *Analyst.* 2018; 143:2936–70.
44. Cheng J., Liu Y., Zhao Y. Nanotechnology-Assisted Isolation and Analysis of Circulating Tumor Cells on Microfluidic Devices. *Micromachines.* 2020; 11(8):774. DOI:10.3390/mi11080774
45. Farschi F, Hasanzadeh M. Microfluidic biosensing of circulating tumor cells (CTCs): Recent progress and challenges in efficient diagnosis of cancer. *Biomed Pharmacother.* 2021; 134:111153. DOI:10.1016/j.biopha.2020.111153
46. Jia, F., Wang Y., Fang Z., et al. Novel peptide-based magnetic nanoparticle for mesenchymal circulating tumor cells detection. *Anal. Chem.* 2021; 93, 5670–5675.
47. Yang, W., Fun L., Gou Z., et al. Reversible capturing and voltammetric determination of circulating tumor cells using two-dimensionalnanozyme based on PdMo decorated with gold nanoparticles and aptamer. *Mikrochim. Acta* 2021; 188, 319.
48. Palmirotta R., Lovero D., Silvestris E. Next-generation Sequencing (NGS) Analysis on Single Circulating Tumor Cells (CTCs) with No Need of Whole-genome Amplification (WGA). *Cancer Genomics & Proteomics.* 2017; 14: 173-179. doi:10.21873/cgp.20029
49. Chen M., Zhao H. Next-generation sequencing in liquid biopsy: cancer screening and early detection. *Human Genomics.* 2019; 13:34 <https://doi.org/10.1186/s40246-019-0220-8>
50. Inc. Grail. ESUMMIT Study. 2018. <https://grail.com/clinical-studies/summitstudy/>, [Accessed 21 Feb 2019].
51. CellMax Life. FirstSightCRC. 2019. <https://cellmaxlife.com/test-firstsight-crc/>, [Accessed 21 Feb 2019].
52. Exosome Diagnostics. Our diagnostics: for patients. 2019. <http://www.exosomedx.com/patients>, [Accessed 21 Feb 2019].
53. Inc. Cynvenio Biosystems. The LiquidBiopsy® Platform. 2019. <https://www.cynvenio.com/instrumentation>, [Accessed 21 Feb 2019]
54. Inc. Guardant Health. Early detection LUNAR-2. 2018. <https://guardanthealth.com/solutions/#lunar-2>, [Accessed 21 Feb 2019].
55. Inc. Personal Genome Diagnostics. Liquid biopsy. 2019. <https://www.personalgenome.com/cap-clia>, [Accessed 21 Feb 2019].
56. Pinzani P, D'Argenio V, Re M.D. Updates on liquid biopsy: current trends and future perspectives for clinical application in solid tumors. *Clin Chem Lab Med* 2021; 59(7): 1181–1200