

KLİNİK BİYOKİMYADA MOLEKÜLER TANI: SIVI BİYOPSİ

MOLECULAR DIAGNOSIS IN CLINICAL BIOCHEMISTRY: LIQUID BIOPSY

Hamit Yaşar ELLİDAĞ

Antalya Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Biyokimya Bölümü

ÖZET

İster tek hücreli, ister çok hücreli olsun, canlılığın en temel dürtüsü varlığını sürdürmek ve hayatta kalmaktır. Bu durum kanser hücreleri içinde geçerlidir. İnsanoğlunun kanserle amansız savaşı devam etmektedir. Bu savaş sırasında düşmanın konumunu ve gücünü tespit etmek temel stratejidir. Bu amaçla günümüzde doku biyopsisi tümör teşhisi için altın standart olmaya devam etmektedir. Bununla birlikte, sıvı biyopsi, tümör hücrelerinden salgılanan dolaşımdaki serbest DNA (cell-free tumor DNA : cftDNA), RNA (circulating cell-free RNA : cfrRNA), mikrovezikül (ekzosomlar, ekstrasellüler veziküller :EVs), dolaşımdaki tümör hücreleri (circulating tumor cells (CTCs) ve tümör etkileşimli trombositlerin (tumor-educated platelets (TEPs) tespiti için başta kan, tükürük, idrar gibi vücut salgılarına odaklanan yöntemlerdir. Kanser tanısında sıvı biyopsi, hastalığın erken evrede belirlenmesi, tedavi yanıtının izlenmesi ve tümör genetiğindeki değişikliklerin takip edilmesi açısından büyük önem taşır. Yeni nesil dizileme (NGS), kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (qPCR) ve dijital damlacık PCR (ddPCR) gibi ileri teknolojiler sayesinde sıvı biyopsiden elde edilen verilerin duyarlılığı ve özgüllüğü artırılmaktadır. Kanser dışında sıvı biyopsi, nörodejeneratif hastalıklar, kardiyovasküler hastalıklar, enfeksiyonlar ve genetik bozuklukların teşhisinde de kullanılmaktadır. Kardiyovasküler hastalıklarda ise dolaşımdaki mikroRNA profilleri, hastalığın progresyonu hakkında önemli bilgiler sunmaktadır. Bununla birlikte, sıvı biyopsinin klinik uygulamalara tam anlamıyla entegre edilebilmesi için bazı zorluklar mevcuttur. Bu zorluklar arasında yöntemlerin standardizasyonunun sağlanması, biyobelirteçlerin duyarlılığının artırılması ve klinik doğrulama süreçlerinin tamamlanması bulunmaktadır. Sıvı biyopsiden elde edilen verilerin yorumlanması ve klinik pratiğe aktarılması için ileri biyoinformatik analiz yöntemlerinin geliştirilmesi gerekmektedir. Gelecekte sıvı biyopsi, kanser başta olmak üzere birçok hastalığın yönetiminde standart bir tanı yöntemi haline gelebilir. Özellikle yapay zeka ve makine öğrenmesi tabanlı veri analiz yöntemleri ile sıvı biyopsiden elde edilen bilgilerin daha hassas şekilde değerlendirilmesi mümkün olacaktır. Bu derlemede, şu an oldukça güncel olan sıvı biyopsi yöntemlerinin temel prensipleri, avantajları, sınırlamaları ve klinik uygulama alanları ele alınacaktır.

ANAHTAR KELİMELEER: Serbest DNA, Serbest RNA, Ekstrasellüler vezikül, Serbest tümör hücreleri.

ABSTRACT

Whether unicellular or multicellular, the fundamental drive of life is to survive and persist. This principle also applies to cancer cells. Humanity's relentless battle against cancer continues, and a crucial strategy in this fight is to determine the enemy's position and strength. Currently, tissue biopsy remains the gold standard for tumor diagnosis. However, liquid biopsy has emerged as a promising alternative, focusing on detecting tumor-derived circulating free DNA (cfDNA), circulating free RNA (cfrRNA), microvesicles (exosomes, extracellular vesicles: EVs), circulating tumor cells (CTCs), and tumor-educated platelets (TEPs) in bodily fluids such as blood, saliva, and urine. In cancer diagnosis, liquid biopsy plays a crucial role in early detection, monitoring treatment response, and tracking genetic changes in tumors. Advances in next-generation sequencing (NGS), quantitative polymerase chain reaction (qPCR), and digital droplet PCR (ddPCR) have significantly improved the sensitivity and specificity of data obtained through liquid biopsy. Beyond cancer, liquid biopsy is also being utilized in the diagnosis of neurodegenerative diseases, cardiovascular diseases, infections, and genetic disorders. In cardiovascular diseases, circulating microRNA profiles provide valuable insights into disease progression. However, several challenges must be addressed before liquid biopsy can be fully integrated into clinical practice. These challenges include standardizing methodologies, enhancing the sensitivity of biomarkers, and completing clinical validation processes. Additionally, advanced bioinformatics analysis techniques are needed to interpret the data obtained from liquid biopsy and translate it into clinical applications. In the future, liquid biopsy has the potential to become a standard diagnostic tool for managing various diseases, particularly cancer. The incorporation of artificial intelligence and machine learning-based data analysis methods is expected to further refine the accuracy and reliability of liquid biopsy results. This review will discuss the fundamental principles, advantages, limitations, and clinical applications of liquid biopsy, a rapidly evolving and highly relevant diagnostic approach.

KEYWORDS: Cell free DNA, Cell free RNA, Extracellular vesicles, Circulating tumor cells.

Geliş Tarihi / Received: 28.01.2025

Kabul Tarihi / Accepted: 27.05.2025

Yazışma Adresi / Correspondence: Doç. Dr. Hamit Yaşar ELLİDAĞ
Antalya Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Biyokimya Bölümü

E-mail: hayael1980@hotmail.com

Orcid No: 0000-0002-7511-2547

GİRİŞ

Sağlık alanında gerek tedavi ve gerekse tanı bakımından birçok teknolojik gelişmeler yaşanmasına rağmen, kanser küresel sağlık sorununa olmaya devam ediyor. Maalasef kanser en yaygın ölüm nedenlerinden biridir ve yeni vakalar dünya çapında artmaktadır. Erken tanı ve uygun tedavi, kanser hastalarının prognozlarını iyileştirmek ve hayatta kalma şanslarını artırmak için çok önemlidir (1).

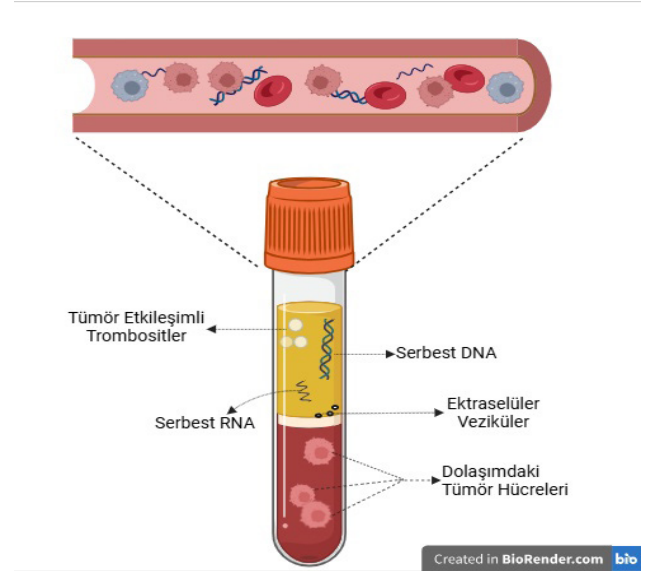
Günümüzde, kanser tanısı için altın standart hala doku biyopsisidir. Doku biyopsisi kanserleri ve alt tiplerini kesin olarak teşhis edebilmesine rağmen, doku biyopsisi almak zordur. Girişimsel bir işlem olduğu için komplikasyon riski yüksektir ve hastalığın progresyonunu takip etmek için sürekli yapılması uygun değildir. Kanserleri erken evrede tespit etmek bazı durumlarda zor olduğundan, her ne kadar altın standart olsa da klasik doku biyopsileri erken evre kanser tanısını gözden kaçırabilir (2).

Sıvı biyopsi veya moleküler tanı, tümör hücrelerinden salgılanan dolaşımdaki serbest DNA (cell-free tumor DNA (cftDNA)), dolaşımdaki serbest RNA (circulating cell-free RNA (cfrRNA)), ekstrasellüler veziküller (extracellular vesicles (EVs)) ve metabolitlerin yanında dolaşımdaki tümör hücreleri (circulating tumor cells (CTCs)), tümör ile etkileşimli trombositlerin (tumor-educated platelets (TEPs)) tespiti için başta kan, tükürük, idrar gibi vücut salgılarına odaklanan yöntemlerdir (3,4). Doku biyopsileriyle karşılaştırıldığında, sıvı biyopsiler erken tarama veya hastalığın takibinde rol oynar (**Tablo 1**).

Tablo 1: Sıvı Biyopsi ve Doku Biyopsisi Karşılaştırması

Özellik	Sıvı Biyopsi	Doku Biyopsisi
Girişimsel işlem	Hayır	Evet
Örnekleme sıklığı	Yüksek (tekrarlanabilir)	Düşük (riskli olabilir)
Tümör heterojenliği	Daha kapsamlı yansıtılabilir	Tek bölgeye bağlı
Histolojik bilgi	Sağlamaz	Sağlar
Analiz süresi	Hızlı	Daha uzun

Sıvı biyopsi için yaygın örnekler minimal invaziv gerektiren kan numunleridir (5–7) (**Şekil 1**).



Şekil 1: Sıvı Biyopsi Bileşenleri: Dolaşımdaki serbest DNA, dolaşımdaki serbest RNA, ekstrasellüler veziküller, dolaşımdaki tümör hücreleri, tümör ile etkileşimli trombositler.

Bu derlemede sıvı biyopsinin moleküler belirteçleri ve analiz yöntemlerinden bahsedilecektir.

SIVI BİYOPSİ TARİHİ

1869 yılında Thomas Ashworth, bir kanser hastasının kanında dolaşan tümör hücrelerini (CTC) tanımlayarak bu hücrelerin metastaz süreciyle ilişkili olabileceği yönünde bir hipotezin temelini atmıştır (8). DNA'nın keşfiyle birlikte kanserin genetik ve moleküler temellerinin anlaşılmasına yönelik araştırmalar hız kazanmış, kanser hücrelerinde belirli mutasyonların saptanmasıyla biyobelirteç geliştirme çalışmaları ivme kazanmıştır (9,10). 1970'ler ve 1980'lerde, tümör kaynaklı DNA ve hücreleri kandan izole etmeye yönelik çalışmalar, teknolojik kısıtlamalar nedeniyle immünohistokimya ve polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemleriyle sınırlı kalmıştır (11). 1990'lı yıllarda, araştırmalar dolaşımdaki tümör DNA'sı (dtDNA)'nı potansiyel bir biyobelirteç olarak tanımlamaya yönelmiştir. Aynı dönemde, tümöre özgü nükleik asitler ve protein taşıyan hücre dışı veziküller (eksozomlar) üzerine çalışmalar derinleşmiş, izolasyon ve analiz yöntemlerindeki gelişmelerle tümöre ait biyobelirteçlerin kapsamı genişletilmiştir (12).

2000'li yıllarda, yeni nesil dizileme (NGS) ve PCR teknolojilerindeki ilerlemeler, dtDNA izolasyonunu ve tümöre özgü mutasyonların tespit edilmesini yüksek duyarlılık ve kesinlikle mümkün hale getirmiştir (13). Sonraki yıllarda, sıvı biyopsi yalnızca ctDNA ve CTC'lerle sınırlı kalmamış; RNA (mikroRNA'lar), dolaşımdaki serbest mitokondriyal DNA, protein bazlı biyobelirteçler gibi diğer biyolojik bileşenler, tümör biyolojisini anlamada değerli araçlar haline gelmiştir. Bugün, sıvı biyopsi, kanser tanı ve tedavi süreçlerinde oldukça günceldir. Tek hücre dizileme, çoklu omik entegrasyonu ve yapay zeka (AI) destekli analizler gibi yeni teknolojiler, sıvı biyopsinin duyarlılığını ve özgüllüğünü daha da artırmıştır (11).

DOLAŞIMDAKİ TÜMÖR HÜCRELERİ (CTC'LER)

Daha önce de belirttiğimiz gibi, dolaşımdaki tümör hücreleri (CTC) üzerine yapılan araştırmaların temeli, 1869 yılında Thomas Ashworth ve çalışma arkadaşlarının bir kanser hastasının kanında bu hücreleri tanımlamasıyla atılmıştır. CTC'ler, birincil veya metastatik tümörlerden koparak kan ya da lenf sistemi aracılığıyla dolaşıma katılan hücrelerdir (5,13).

Son yıllarda yapılan çok sayıda çalışma, CTC düzeyinin kanser gelişimi ile güçlü bir ilişki gösterdiğini ve özellikle metastatik süreçte kritik bir rol oynadığını ortaya koymuştur (5,14). Bu bulgular, CTC'lerin önemli bir biyobelirteç olduğunu doğrulamakta ve bu hücrelerin kanser teşhisi, prognoz takibi ve klinik karar süreçlerinde etkili bir araç olma potansiyelini vurgulamıştır. Araştırmalar, yüksek CTC düzeylerinin genel sağ kalım süresinde azalma ile doğrudan ilişkili olduğunu göstermektedir (15–17). Özellikle meme kanseri hastalarının kan örneklerinde, artan CTC sayısının sağ kalım oranlarını önemli ölçüde düşürdüğü saptanmıştır. Bu nedenle CTC'lerin tespiti, sıvı biyopsi çalışmalarında giderek daha fazla önem kazanmakta ve kanserin biyolojik seyrine dair değerli bilgiler sağlamaktadır (18).

CTC'ler, kanda son derece düşük oranlarda bulunur; yaklaşık 1 milyon lökosit içinde 1 adet veya 10 mL kanda 1-10 hücre arasında değişen sayılarda tespit edilir. Ayrıca çoğu CTC, dolaşıma katıldıktan sonra 1-2,5 saat içerisinde ölür. Bu nedenle, CTC'leri verimli bir şekilde yakalamak ve tespit etmek için son derece hassas

teknikler gereklidir. Şu anda, CTC izolasyonu ve tespiti için kullanılan yöntemler sürekli olarak geliştirilmekte, özellikle hassasiyet açısından önemli ilerlemeler kaydedilmektedir (19,20). Boyut, şekil değiştirilebilirlik vb. gibi biyofiziksel özelliklere dayalı yoğunluk gradyan santrifüjleme, ataletsel odaklama (Inertial Focusing) ve filtrasyon gibi geleneksel yöntemler mevcuttur (21). Ayrıca, hücrelerin belirli belirteçlerin ekspresyonu yoluyla tespit edilmesine yönelik yöntemler de bulunmaktadır. Bu belirteçler arasında epitelyal hücre adezyon molekülü (EpCAM), vimentin ve N-kaderin yer alır. Bu yöntemler arasında EpCAM zenginleştirme, immünomanyetik ayrıştırma ve mikroakışkan cihazlar kullanılmaktadır (22). CellSearch® yöntemi şu anda FDA (U.S. Food and Drug Administration) tarafından kan örneklerindeki CTC sayısını izlemek için yetkilendirilmiş tek yöntemdir (23). Bu yöntemlerin çeşitli eksiklikleri olmasına rağmen, CTC'lerin tespiti ve klinik değeri üzerine araştırmaların teşvik edilmesinde önemli bir rol oynamışlardır. Neredeyse invaziv olmayan bir test olan CTC'ler, gelecekte tümörlerin teşhisi, tespiti ve prognozunda giderek daha önemli bir değere sahip olacaktır (8,11).

DOLAŞIMDAKİ HÜCRESİZ TÜMÖR DNA'SI (CTDNA)

Dolaşımdaki hücresiz tümör DNA'sı (ctDNA), aktif olarak salgılanan veya apoptotik ya da nekrotik kanser hücrelerinden köken alarak doğrudan kan dolaşımına (veya diğer biyolojik sıvılara) salınan DNA'dır. Bu DNA, toplam dolaşımdaki serbest DNA (cfDNA)'nın yalnızca sınırlı bir kısmını oluşturur ve normal hücrelerden fizyolojik koşullarda ortaya çıkan cfDNA'nın başlıca kaynağıdır (20,24,25). cfDNA parçalarının büyük çoğunluğu genellikle 143 ila 180 baz çifti uzunluğundadır ve bu uzunluk, nükleozom içindeki DNA boyutuna karşılık gelir. Bu parçaların kan dolaşımındaki yarı ömrü 16 dakika ile 2,5 saat arasında değişmektedir (26). cfDNA; kan, idrar, beyin omurilik sıvısı, plevral sıvı ve dışkı gibi vücut sıvılarında tespit edilebilir (24,27,28). Kan bazlı analizlerde, plazma genellikle ctDNA analizi için daha uygun bir kaynak olarak kabul edilir çünkü tümör dışı hücrelerden gelen cfDNA arka planı daha düşüktür. ctDNA, ayrıca dolaşımdaki tümör hücrelerinin parçalanmasından da kaynaklanabilir, ancak

bunun toplam ctDNA'ya olan kantitatif katkısı net değildir ve muhtemelen kanserin evresi ve tedaviye yanıt gibi faktörlere bağlıdır (29).

1948 yılında, Mandel ve Metais kanda nükleik asitleri tanımlayan öncüler olmuşlardır (10). ctDNA ise ilk olarak Stroun ve arkadaşları tarafından 1989 yılında tanımlanmıştır. ctDNA'nın dizilmesi, tümör mutasyonlarının tespit edilmesine olanak tanır ve böylece cfDNA'dan ayırt edilmesini sağlar (30). Araştırmalar, tümör seviyelerindeki değişimlerin sadece miktarla sınırlı olmadığını göstermektedir. Tümörden etkilenen hastaların plazmalarından elde edilen ctDNA örneklerinin dizileri, KRAS gibi onkogenlerdeki mutasyonları (V-Ki-ras2 Kirsten sıçan sarkoma viral onkogen homoloğu) işaret etmektedir (31). Ayrıca, plazmadaki ctDNA seviyeleri; tümör yükü, tümör evresi ve tedaviye yanıt gibi faktörlere bağlı olarak dalgalanmalar gösterir. ctDNA'nın klinik uygulamaları sadece kantifikasyonla sınırlı değildir; plazmada mevcut olan genetik varyantların analizini de kapsamaktadır (32).

cfDNA izolasyonu için birkaç yöntem mevcuttur. Bu yöntemler arasında: yüksek devirli santrifüj, immünomanyetik boncuklar, silika kolon temelli zenginleştirme, polimer aracılı zenginleştirme ve klasik fenol-kloroform bazlı ekstraksiyon yöntemleri bulunmaktadır (33).

Ancak bu yöntemlerin standartlaştırılması gerekmektedir. Yöntem seçimi, istenen DNA saflığı ve gerekli otomasyon düzeyine bağlı olarak değişebilir (34). Mevcut DNA ekstraksiyon yöntemlerinin ctDNA ve cfDNA arasında ayırım yapmadığı düşünüldüğünde, ctDNA'daki genomik varyasyonların tespiti için uygun DNA ekstraksiyon protokollerinin uygulanması önemlidir (35). ctDNA Analizinde iki temel yaklaşım vardır. Hedefe yönelik yöntemler; belirli tümör tipleriyle ilişkili olan gen veya genlerin yeniden düzenlemeleri veya mutasyonlar gibi spesifik bölgeler üzerine odaklanır. Hedefsiz yöntemler; tüm tümör genomunu kapsamlı bir şekilde analiz ederek nükleotid değişimleri, kopya sayısı değişiklikleri, kromozomal anomaliler gibi verileri ortaya çıkarır. Bu analiz yönteminde tüm genom taranır (8,11,20).

Teknolojideki ilerlemeler, damlacık tabanlı dijital PCR (ddPCR), yeni nesil dizileme (NGS),

gerçek zamanlı PCR (rt-qPCR) ve hipermetilasyon analizi ile biyolojik örneklerde, özellikle vücut sıvılarında, kanserle ilişkili genetik ve epigenetik değişimler yüksek hassasiyet ve doğrulukla tespit edilebilmektedir(36–38).

DOLAŞIMDAKİ HÜCRESİZ RNA (CFRNA)

Dolaşımdaki hücresiz RNA (cfRNA), kan gibi vücut sıvılarında bulunan ve hücreler kompleksleri içinde kapalı olmayan RNA moleküllerini ifade eder. cfRNA'lar hem kanserli hem de kanserli olmayan hücrelerden salınır. cfRNA analizi, yalnızca belirli genlerin bolluğunu değerlendirmekle kalmaz; aynı zamanda patolojik alternatif birleştirme (splicing) veya RNA düzenleme (editing) gibi faktörleri de inceler. Bu tür değişiklikler yalnızca transkriptom düzeyinde tespit edilebilir, genom düzeyinde tespit edilemez (39,40). Bu nedenle, son yıllarda cfRNA'lara olan ilgi ctDNA'ya kıyasla artmıştır. cfRNA'lar, dış hücre zarı vezikülleri içinde kapsüllenir veya ribonükleoprotein kompleksleri oluşturarak nükleaz aktivitesinden korunurlar (41). cfRNA parçaları; serum, plazma, idrar, safra ve beyin omurilik sıvısı (BOS) gibi çeşitli vücut sıvılarından elde edilebilir (42). cfRNA'ların RNaz aktivitesine karşı dayanıklılık göstermesi, onları vücut sıvılarında stabil hale getirir (43). Bu stabilite, cfRNA'yı sıvı biyopsi tabanlı tanı yaklaşımları için umut verici bir aday haline getirmektedir (44).

cfRNA'lar, farklı hücre ve dokulardan köken alan çeşitli RNA türlerini içerir. Bunlar: mikroRNA'lar (miRNA'lar), transfer RNA (tRNA), piwi ile etkileşen RNA'lar (piRNA'lar), uzun kodlamayan RNA'lar (lncRNA'lar), küçük nükleer RNA'lar (snRNA'lar), küçük nükleolar RNA'lar (snoRNA'lar) ve Y RNA'dır (45). cfRNA araştırmalarının büyük bir kısmı, dolaşımda potansiyel hastalık biyobelirteçleri olarak miRNA'lara odaklanmıştır. Bu durum, miRNA'ların kandaki stabilitesinin yüksek olmasıyla ilişkilidir (46). Ancak, son zamanlarda mRNA ve lncRNA gibi uzun RNA'lar (>200 nükleotid) üzerine artan bir ilgi bulunmaktadır (47). Uzun RNA'lar, sinyal molekülleri olarak işlev görerek hücreler arası iletişimde yer alabilir ve tümör mikroçevresini etkileyerek tümör progresyonu ve invazyonunu düzenleyebilir. Bu özellikleri sayesinde cfRNA'lar, sıvı biyopsi temelli tıp uygulamaları için güçlü

adaylardır. Çeşitli RNA türlerinin incelenmesi, kanser teşhisi, prognozu ve tedaviye yanıtın izlenmesinde önemli bir rol oynayabilir (48).

Biyosıvılarından RNA ekstraksiyonu için en yaygın kullanılan yöntem, özellikle plazma ve/veya serum için özelleştirilmiş RNA ekstraksiyon kitlerinin kullanılmasıdır. Ancak plazmadan RNA izolasyonu sırasında önemli bir endişe, DNA kontaminasyonu riskidir. Bunun nedeni, çoğu cfrRNA izolasyon kitinin biyosıvıdaki hücresiz DNA'nın bir kısmını da geri kazanmasıdır (49, 50). Bu tür interferansları hafifletmek için çeşitli teknikler uygulanabilir. Ekstraksiyon sırasında DNAaz kullanılması, ekstraksiyon kitlerinin seçiminde standardizasyon sağlanması, RNA ekstraksiyon verimliliğinin kontrollerinin sağlanması önlemlerin uygulanması gereklidir (50). Elde edilen veya serumdan ekstekte edilen RNA miktar ve kalite ölçümünde Qubit (51), Agilent Bioanalyzer (52) vb spektrofotometri temelli sistemler kullanılır. Ekstekte edilen RNA'nın hem 260 nm hem de absorbanı ölçülür. 260/280 oranının yaklaşık 2 veya 2'ye yakın olması RNA için kabul edilebilir saflık oranıdır (Bu oranın DNA için 1,8 olması istenir) (53).

cfrRNA analizi için ana yöntemler; gerçek zamanlı ters transkripsiyon (qRT-PCR): Spesifik genlerin ekspresyon seviyelerinin ölçümünde kullanılır. Mikrodizin (Microarray) Platformları: Transkriptom çapında RNA profillemesi sağlar. Yeni Nesil Dizileme (NGS): Genom çapında RNA dizilemesi yaparak transkriptomun kapsamlı analizini mümkün kılar (11,13,44).

EKSTRASELLÜLER VEZİKÜLLER (EXTRACELLULAR VESICLES (EVS)) VE EKSOZOMLAR

1987 yılında Johnstone, koyun retikülositleri tarafından salgılanan veziküllere ilk kez "eksozom" adını vermiştir. Eksozomlar, çok veziküllü cisimlerin zarlarından tomurcuklanarak oluşan ve çok veziküllü endozomların hücre zarıyla kaynaşmasının ardından hücre dışına salınan bir hücre dışı vezikül alt türüdür. Hücre dışı veziküllerin diğer iki ana alt türü ise, genellikle boyutlarına ve hücresel kökenlerine göre sınıflandırılan mikro veziküller ve apoptotik veziküllerdir (54). Son yıllarda, bu üç ana hücre dışı vezikül alt türü, özellikle eksozomlar, büyük bir ilgi odağı haline gelmiştir. Eksozomlar, kan, tükürük,

idrar ve diğer biyolojik sıvılarda tespit edilebilir ve molekül taşıma, hücreler arası iletişim ve bağışıklık tepkileri gibi çeşitli biyolojik süreçlerde önemli roller üstlenir. Ayrıca, eksozomların tümör mikroçevresinin temel bileşenlerinden biri olduğu ve kanser ilerlemesinde kritik bir rol oynadığı bulunmuştur (54,55).

Eksozomlar, sıvı biyopsi alanında bazı avantajlar sunmaktadır. Stabil yapıları sayesinde dayanıklıdırlar ve tümör hücrelerine dair bilgilerin temsilinde daha güvenilirlerdir (56).

Son yıllarda eksozomlardan elde edilen nükleik asitler, proteinler, lipitler ve metabolitler gibi ürünler, kanser araştırmalarında giderek artan bir ilgi görmektedir. Örneğin, eksozomal kodlamayan RNA'ların (ncRNA'lar) kanser hastalarının tanı ve tedavisinde önemli bir referans değeri sunduğu gösterilmiştir. Prostat kanseri hastalarında miR-1246, miR-4644, miR-3976 ve miR-4306 eksozomlarının yukarı regüle edilmesi, bu molekülleri oldukça hassas biyobelirteçler haline getirmiştir (57). Bunun yanı sıra, eksozomal lncRNA H19'un mesane kanseri hastalarının serumunda yukarı regüle edildiği ve bu nedenle tanı amaçlı önemli bir biyobelirteç olabileceği belirlenmiştir (58).

Eksozomlar, geniş çeşitlilikleri ve büyük sayıları nedeniyle protein düzeyinde de yoğun bir araştırma konusu olmuştur. Eksozomal proteinlerin, kanser mikroçevresinin oluşumu, tümör ilerlemesi ve metastaz gibi süreçlerde düzenleyici bir role sahip olduğu gösterilmiştir (59-61).

Ekstraselüler veziküllerin (EVs) izolasyonu ve karakterizasyonu, biyolojik ve klinik araştırmalarda önemli bir alan olarak öne çıkmaktadır. EVs izolasyonu için kullanılan yöntemlerden biri yoğunluk gradyanlı ultrasantrifüjasyondur. Bu yöntem, yüksek saflıkta EVs elde edilmesini sağlasa da laboratuvar tıbbında uygulanması zor olması, zaman alıcı bir süreç gerektirmesi ve düşük verim sunması gibi dezavantajlara sahiptir (62-64). Boyuta dayalı yöntemler de EVs izolasyonunda sıkça tercih edilmektedir. Ultrafiltrasyon, tanımlı moleküler ağırlık eşiklerine sahip membran filtreler kullanılarak yapılır. Ancak, uygulanan kuvvetin veziküllerde kırılma veya deformasyona yol açma riski, bu yöntemin sonraki analizlerde yanlışla-

ra neden olabileceğini göstermektedir (65). Benzer şekilde, boyut ayırım kromatografisi (Size-Exclusion Chromatography), protein kontaminasyonunu azaltmada etkili bir yöntem olarak öne çıkar. Polimer bazlı porlu bir sabit faz kullanılarak, parçacıklar boyutlarına göre yerçekimi akışı veya sıvı kromatografi sistemleri yardımıyla ayrılır (66). Bir diğer yöntem olan akış alanı-akış fraksiyonlaması (Flow Field-Flow Fractionation), numunenin parabolik akışla sisteme taşınması sırasında çapraz akış kullanılarak parçacıkların boyutlarına göre ayrılmasını sağlar. Bu teknikte, büyük parçacıklar yavaş akışlı duvar bölgelerine doğru hareket ederken küçük parçacıklar merkezde kalarak daha erken elüte edilmektedir (67).

İmmünoafinite yakalama tabanlı teknikler, EVs izolasyonunda spesifik antijenlere bağlanabilen antikörlerin kullanımına dayanır. Bu antikörler, plakalara, manyetik boncuklara veya mikroakışkan cihazlara bağlanarak EVs'lerin seçici bir şekilde yakalanmasını sağlar. Yüksek verimli damlacık dijital ELISA yöntemi, yüksek hassasiyetli analizler sunan bir başka yaklaşımdır. Damlacık üretimi, işlenmesi ve analizi paralel bir şekilde gerçekleştirilmekte olup dakikada yaklaşık 20 milyon damlacığın analizi yapılabilir. Bu teknik, geleneksel mikroakışkan yöntemlere kıyasla 100 kat daha hızlıdır (68,69).

EVs'lerin karakterizasyonu ve miktar tespiti, çeşitli yöntemlerle gerçekleştirilmektedir. Elektron mikroskopu, nanoparçacık izleme analizi (NTA), Western blotting, proteomik analizler ve moleküler yöntemler (RT-PCR ve NGS), EV'lerin yapısal ve fonksiyonel özelliklerinin detaylı olarak incelenmesini sağlar. Bu yöntemler, EVs'lerin biyolojik işlevlerini anlamada ve potansiyel biyobelirteç olarak kullanılmasında önemli katkılar sunmaktadır (61).

TÜMÖR ETKİLEŞİMLİ TROMBOSİTLER

Trombositler, başlıca kemik iliğinde bulunan megakaryositlerin sitoplazmik parçalanması sonucu oluşur ve dolaşıma verilir. Çekirdeksiz yapıda olmalarına rağmen, megakaryositlerden miras aldıkları transkriptomları proteinlere çevirebilme yeteneğine sahiptirler. Bu proteinler, trombositlerin içinde bulunan granüller içerisinde depolanır. Normal koşul-

larda bu granüller hücre içinde tutulur; ancak aktivasyon sırasında ekzostoz mekanizmasıyla granül içerikleri serbest bırakılır (70–72).

Son yıllarda geliştirilen dizileme teknolojileri sayesinde trombositlerde farklı RNA türlerinin varlığı tespit edilmiştir. Bu RNA türleri arasında splislenmemiş pre-RNA, mRNA, miRNA, ribozomal RNA ve pre-RNA işleme süreçlerinde işlev gören spliceosome yer alır. Bu bulgular, trombositlerin transkriptom yapısı ve fonksiyonel özelliklerine dair önemli bilgiler sunmaktadır (73–75).

Trombositler, yaşam döngüleri boyunca kanser hücreleriyle hem doğrudan reseptörler aracılığıyla hem de dolaylı olarak sinyal molekülleri aracılığıyla etkileşim halindedir. Bu etkileşimler, trombositlerin aktivasyonuna yol açmakta ve pro-tümör metastatik mikroçevrenin oluşumunu desteklemektedir. Ayrıca, epitel-mezenkimal geçiş (EMT) gibi süreçleri indükleyebilir. Özellikle trombositler ile kanser hücreleri arasındaki doğrudan temas ve transforming growth factor beta (TGFβ) salınımı, NF-κB sinyal yollarını aktive ederek kanser hücrelerinde mezenkimal özelliklerin kazanılmasına ve metastatik potansiyelin artmasına neden olmaktadır (76–79). Trombositlerden türeyen partiküller ile ilgili çalışmalar, bu partiküllerin izolasyonu ve analizi sırasında trombosit aktivasyonunun önlenmesinin kritik bir öneme sahip olduğunu göstermektedir. Trombositlerin işlenmesi sırasında güçlü mekanik veya biyokimyasal kuvvetlerden kaçınılması gerekmektedir. Ayrıca, hastanın trombosit fonksiyonunu etkileyebilecek tüm tedavi süreçleri titizlikle kaydedilmelidir (80). Trombositlerden türeyen partiküller, kan örneklemeinden sonra 48 saat içinde izole edilebilir ve bu süreçte yüksek kaliteli RNA üretimi gerçekleştirilebilir. Yeni nesil dizileme (NGS) teknolojileri, Trombositlerden türeyen partiküller genomik analizinde devrim niteliğinde bir ilerleme sağlamış, hem kodlayan hem de kodlamayan RNA transkriptlerinin profillenmesini mümkün kılmıştır. Bu yöntemler sayesinde, tümör kaynaklı moleküler imzaların tespiti yapılabilir ve tümörün moleküler yapısına ilişkin detaylı bilgiler elde edilebilir (80).

Trombositlerin uyarılara verdikleri yanıtların incelenmesi, bu hücrelerin fonksiyonları-

nın anlaşılmasında büyük önem taşımaktadır. Bu bağlamda, agregasyon testleri ve akış sitometrisi gibi yöntemler, trombositlerin moleküler değişimlerinin fonksiyonel etkilerini analiz etmek için etkili araçlardır (80).

Sonuç olarak, trombositlerin kanser hücreleriyle doğrudan ve dolaylı etkileşimleri, tümör progresyonu ve metastaz süreçlerinde kritik bir role sahiptir. Trombositlerden türeyen partiküller moleküler analizleri, sıvı biyopsi tabanlı yaklaşımlar kapsamında tümör etkilerinin tespit edilmesi ve tümör süreçlerinin anlaşılması için güçlü bir araç olarak öne çıkmaktadır. Gelişmiş teknolojiler, bu süreçte yüksek hassasiyet ve etkinlik sağlamayabilmektedir.

SIVI BİYOPSİNİN SINIRLILIKLARI, KLİNİK ZORLUKLAR VE GELECEK PERSPEKTİFLER

Sıvı biyopsi, birçok avantajına rağmen bazı sınırlamalara da sahiptir. Bunlar arasında yanlış pozitif veya negatif sonuçlar yer almaktadır. Örneğin, cfDNA düzeyleri inflamasyon, gebelik, travma veya egzersiz gibi malign olmayan durumlarda da artabilir. Bu durum, yanlış pozitif sonuçlara yol açabilir. Benzer şekilde, ctDNA düzeylerinin düşük olması durumunda, özellikle erken evre kanserlerde yanlış negatif sonuçlar görülebilmektedir (20,44). Minimal rezidüel hastalık (MRD) tespiti açısından da sıvı biyopsi değerli bir araç olmakla birlikte, tümör yükünün düşük olduğu durumlarda doğruluk oranı sınırlı olabilir (16,20). Bu bağlamda, doku biyopsisi hâlen birçok kanser türü için klinik karar süreçlerinde tercih edilen yöntemdir. Sıvı biyopsi, tümör yükü ve genetik mutasyonların takibi gibi konularda avantajlı olsa da, doku biyopsisinin sağladığı histopatolojik sınıflandırma ve tümör mikroçevresi gibi önemli bilgileri sunmamaktadır.

Sıvı biyopsi yöntemlerinin klinik uygulamaya tam anlamıyla entegre edilememesinin en önemli nedenlerinden biri, analiz süreçlerinin henüz tam olarak standardize edilememiş olmasıdır. Pre-analitik faktörler (örneğin örnekleme zamanı, örnek saklama koşulları, plazma mı serum mu tercih edileceği gibi) sonuçların doğruluğunu ciddi ölçüde etkileyebilir (35). Düzenleyici otoriteler sıvı biyopsi testleri konusunda dikkatli bir yaklaşım sergilemektedir. FDA, bazı testlere (örneğin: Guardant360,

FoundationOne Liquid CDx) onay vermiştir. EMA ise CE işaretli bazı testlerin kullanımına izin vermektedir. Ancak henüz tüm parametreleri kapsayan, yaygın olarak onaylanmış bir test paneli bulunmamaktadır (8). Bu eksiklikler, klinik uygulamalarda sıvı biyopsi testlerinin rutin hale gelmesini geciktirmektedir.

Yapay zekâ ve makine öğrenimi algoritmaları, sıvı biyopsiden elde edilen büyük verilerin analizinde önemli avantajlar sunmaktadır. cfDNA analizinde yapay zekâ, EGFR, KRAS gibi mutasyonların belirlenmesinde duyarlılığı artırmaktadır (52). cfRNA profillemesinde ise lncRNA ve miRNA ifadelerinin sınıflandırılmasında Support Vector Machines (SVM), Random Forest gibi algoritmalar kullanılmaktadır (45). Eksozom analizlerinde ise yapay zekâ, görüntüleme verilerinin yorumlanmasında öne çıkmaktadır. Bu yöntemler sayesinde erken evre tanı başarısı artmakta, ayrıca tedaviye yanıt öngörülebilmektedir (80).

Gelecekte sıvı biyopsi teknolojilerinden beklentiler oldukça yüksektir. Artan teknik gelişmeler, analitik hassasiyetin artırılması, biyobelirteç çeşitliliğinin genişletilmesi ve veri analizinde yapay zekâ entegrasyonunun yaygınlaşması sayesinde sıvı biyopsinin tanı, prognoz belirleme ve tedavi takibinde daha yaygın ve güvenilir bir araç haline gelmesi beklenmektedir. Özellikle çoklu biyobelirteç paneline dayalı, standardize edilmiş ve regülasyonlarla uyumlu testlerin geliştirilmesi, klinik uygulamada sıvı biyopsinin daha etkin kullanılmasını sağlayacaktır. Ayrıca, sıvı biyopsi sayesinde kişiselleştirilmiş tıp uygulamaları daha erişilebilir hale gelecek; kanser tanı ve tedavisinde daha hızlı, non-invaziv ve hassas bir yaklaşım mümkün olacaktır.

SIVI BİYOPSİNİN KLİNİK BİYOKİMYA YERİ VE ÖNEMİ

Günümüzde sıvı biyopsi, yalnızca kanser hastalıklarında değil, birçok kronik ve hatta enfeksiyöz hastalıkta giderek önem kazanmaktadır. Ancak "sıvı biyopsi" terimi bilimsel açıdan tartışmaya açık bir ifade olarak görüyorum. Çünkü biyopsi terimi, genellikle bir organdan küçük bir doku örneği alınarak bu dokunun histolojik olarak incelenmesini ifade eder. Oysa sıvı biyopsi uygulamalarında herhangi bir dokuya doğrudan girişim yapılmaz ve incelenen materyal, doku değil; plazma, idrar veya diğer vücut sıvılarıdır.

Bu terim, onkologlar tarafından önerilmiş olabilir. İlk sıvı biyopsi çalışmalarında dolaşımdaki serbest tümör hücrelerinin analiz edilmesi nedeniyle sitolojinin bu alana ilgi göstermiş olması muhtemeldir. Ancak genel olarak bu yöntemin "moleküler tanı" olarak isimlendirilmesi daha uygun görmekteyim. Ayrıca sıvı biyopsilerle yapılan analizler, genellikle nükleer DNA'yı veya kalıtsal DNA'yı incelemekten ziyade, doku hasarı ve inflamasyonu sonucunda dolaşıma salınan nükleik asitlere odaklanmaktadır. Bu yönüyle, sıvı biyopsiler klasik biyokimyasal analizlere benzer bir çerçevede değerlendirilebilir. Sıvı biyopsi analizlerinin maliyetleri günümüzde oldukça yüksek olabilir. Ancak bu durum geçmişte hormon analizlerinde (örneğin immünoassay teknikleri) de benzer şekildeydi. Fakat günümüzde bu testler kolaylıkla ulaşılabilir hale gelmiş durumdadır. Teknolojik gelişmelerin hızla ilerlemesi ve sektördeki rekabetin artması sayesinde, sıvı biyopsi testlerinin maliyetlerinin de gelecekte daha makul seviyelere düşeceği öngörülebilir. Eğitimli personel ihtiyacı elbette önemlidir, ancak modern moleküler analiz cihazlarının artık büyük ölçüde otomatik hale gelmesi bu zorluğu önemli ölçüde azaltmaktadır.

Sıvı biyopsi yöntemleri, henüz tam anlamıyla standardize edilmemiş olsa da klinik biyokimya uzmanları testlerin validasyonu ve standardizasyonu konusunda deneyim sahibidir. Bu uzmanlar, tümör biyobelirteçleri, hücresiz DNA/RNA ve proteomik analizlerin yanı sıra klasik biyokimyasal parametreleri de değerlendirerek hastanın genel durumunu bütüncül bir yaklaşımla ele alabilir. Kan, plazma, idrar gibi biyosıvıların uygun koşullarda alınması, taşınması ve muhafaza edilmesi, klinik biyokimya laboratuvarlarının temel sorumluluk alanına girmektedir.

Bununla birlikte, örneklerin yanlış işlenmesi, trombosit aktivasyonu veya cfDNA/RNA kontaminasyonu gibi pre-analitik hatalar, sıvı biyopsi sonuçlarını doğrudan etkileyebilmektedir. Klinik biyokimya uzmanları, pre-analitik süreçlerin kontrolü konusunda deneyimli olup, bu hataların önlenmesinde kritik bir role sahiptir. Tüm bu süreçlerde klinik biyokimya uzmanlarının kendilerini geliştirmesi, özellikle moleküler analizlere daha fazla yoğunlaşması gerekmektedir.

Günümüzde hastalıkların tanı ve takibinde giderek daha derin moleküler düzeyde incelemeler yapılmaktadır. Bu bağlamda, klinik biyokimya uzmanlarının moleküler testlere yönelmesi, multidisipliner ekiplerin etkinliğini artıracak ve hasta yönetiminde önemli katkılar sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

1. Crosby D, Bhatia S, Brindle KM, et al. Early detection of cancer. *Science*. 2022;375(6586):eaay9040.
2. Vaidyanathan R, Soon RH, Zhang P, Jiang K, Lim CT. Cancer diagnosis: from tumor to liquid biopsy and beyond. *Lab Chip*. 2018;19(1):11–34.
3. Li W, Liu JB, Hou LK, et al. Liquid biopsy in lung cancer: significance in diagnostics, prediction, and treatment monitoring. *Mol Cancer*. 2022;21(1):25.
4. Casagrande GMS, Silva M de O, Reis RM, Leal LF. Liquid Biopsy for Lung Cancer: Up-to-Date and Perspectives for Screening Programs. *Int J Mol Sci*. 2023;24(3):2505.
5. Pantel K, Alix-Panabières C. Circulating tumour cells in cancer patients: challenges and perspectives. *Trends Mol Med*. 2010;16(9):398–406.
6. Fu Y, Zhang Y, Khoo BL. Liquid biopsy technologies for hematological diseases. *Med Res Rev*. 2021;41(1):246–74.
7. Lone SN, Nisar S, Masoodi T, et al. Liquid biopsy: a step closer to transform diagnosis, prognosis and future of cancer treatments. *Mol Cancer*. 2022;21(1):79.
8. Alix-Panabières C, Pantel K. Liquid Biopsy: From Discovery to Clinical Application. *Cancer Discov*. 2021;11(4):858–73.
9. Galvis MM, Romero CS, Bueno TO, Teng Y. Toward a New Era for the Management of Circulating Tumor Cells. *Adv Exp Med Biol*. 2021;1286:125–34.
10. Mandel P, Metais P. [Nuclear Acids In Human Blood Plasma]. *C R Seances Soc Biol Fil*. 1948;142(3–4):241–3.
11. Ma L, Guo H, Zhao Y, et al. Liquid biopsy in cancer current: status, challenges and future prospects. *Signal Transduct Target Ther*. 2024;9(1):336.
12. Sorenson GD, Pribish DM, Valone FH, Memoli VA, Bzik DJ, Yao SL. Soluble normal and mutated DNA sequences from single-copy genes in human blood. *Cancer Epidemiol Biomark Prev Publ Am Assoc Cancer Res Cosponsored Am Soc Prev Oncol*. 1994;3(1):67–71.
13. Alix-Panabières C, Pantel K. Liquid Biopsy: From Discovery to Clinical Application. *Cancer Discov*. 2021;11(4):858–73.
14. Salu P, Reindl KM. Advancements in Circulating Tumor Cell Research: Bridging Biology and Clinical Applications. *Cancers*. 2024;16(6):1213.

- 15.** Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, et al. Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *N Engl J Med.* 2004;351(8):781–91.
- 16.** Diehl F, Schmidt K, Choti MA, et al. Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. *Nat Med.* 2008;14(9):985–90.
- 17.** Smirnov DA, Zweitzig DR, Foulk BW, et al. Global gene expression profiling of circulating tumor cells. *Cancer Res.* 2005;65(12):4993–7.
- 18.** Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, et al. Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *N Engl J Med.* 2004;351(8):781–91.
- 19.** Soda N, Rehm BHA, Sonar P, et al. Advanced liquid biopsy technologies for circulating biomarker detection. *J Mater Chem B.* 2019;7(43):6670–704.
- 20.** Pantel K, Alix-Panabières C. Liquid biopsy and minimal residual disease - latest advances and implications for cure. *Nat Rev Clin Oncol.* 2019;16(7):409–24.
- 21.** Russo GI, Musso N, Romano A, et al. The Role of Dielectrophoresis for Cancer Diagnosis and Prognosis. *Cancers.* 2021;14(1):198.
- 22.** Lozar T, Jesenko T, Kloboves Prevodnik V, et al. Preclinical and Clinical Evaluation of Magnetic-Activated Cell Separation Technology for CTC Isolation in Breast Cancer. *Front Oncol.* 2020;10:554554.
- 23.** Petrik J, Verbanac D, Fabijanec M, et al. Circulating Tumor Cells in Colorectal Cancer: Detection Systems and Clinical Utility. *Int J Mol Sci.* 2022;23(21):13582.
- 24.** Chen Z, Li C, Zhou Y, et al. Liquid biopsies for cancer: From bench to clinic. *MedComm.* 2023;4(4):e329.
- 25.** Malapelle U, Buono M, Pisapia P, et al. Circulating tumor DNA in cancer: Predictive molecular pathology meets mathematics. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2021;163:103394.
- 26.** Stejskal P, Goodarzi H, Srovnal J, et al. Circulating tumor nucleic acids: biology, release mechanisms, and clinical relevance. *Mol Cancer.* 2023;22(1):15.
- 27.** Underhill HR, Kitzman JO, Hellwig S, et al. Fragment Length of Circulating Tumor DNA. *PLoS Genet.* 2016;12(7):e1006162.
- 28.** Ponti G, Manfredini M, Tomasi A. Non-blood sources of cell-free DNA for cancer molecular profiling in clinical pathology and oncology. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2019;141:36–42.
- 29.** Stewart CM, Kothari PD, Mouliere F, et al. The value of cell-free DNA for molecular pathology. *J Pathol.* 2018;244(5):616–27.
- 30.** Stroun M, Anker P, Maurice P, et al. Neoplastic characteristics of the DNA found in the plasma of cancer patients. *Oncology.* 1989;46(5):318–22.
- 31.** Holm M, Andersson E, Osterlund E, et al. Detection of KRAS mutations in liquid biopsies from metastatic colorectal cancer patients using droplet digital PCR, Idylla, and next generation sequencing. *PLoS One.* 2020;15(11):e0239819.
- 32.** Diehl F, Schmidt K, Choti MA, et al. Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. *Nat Med.* 2008;14(9):985–90.
- 33.** Pandoh PK, Corbett RD, McDonald H, et al. A high-throughput protocol for isolating cell-free circulating tumor DNA from peripheral blood. *BioTechniques.* 2019;66(2):85–92.
- 34.** Kang Q, Henry NL, Paoletti C, Jiang H, et al. Comparative analysis of circulating tumor DNA stability In K3ED-TA, Streck, and CellSave blood collection tubes. *Clin Biochem.* 2016;49(18):1354–60.
- 35.** Meddeb R, Pisareva E, Thierry AR. Guidelines for the Preanalytical Conditions for Analyzing Circulating Cell-Free DNA. *Clin Chem.* 2019;65(5):623–33.
- 36.** Hannigan B, Ye W, Mehrotra M, et al. Liquid biopsy assay for lung carcinoma using centrifuged supernatants from fine-needle aspiration specimens. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol.* 2019;30(6):963–9.
- 37.** Olmedillas-López S, Olivera-Salazar R, García-Arranz M, García-Olmo D. Current and Emerging Applications of Droplet Digital PCR in Oncology: An Updated Review. *Mol Diagn Ther.* 2022;26(1):61–87.
- 38.** Ståhlberg A, Krzyzanowski PM, Egyud M, et al. Simple multiplexed PCR-based barcoding of DNA for ultrasensitive mutation detection by next-generation sequencing. *Nat Protoc.* 2017;12(4):664–82.
- 39.** El Marabti E, Younis I. The Cancer Spliceome: Reprogramming of Alternative Splicing in Cancer. *Front Mol Biosci.* 2018;5:80.
- 40.** Cabús L, Lagarde J, Curado J, et al. Current challenges and best practices for cell-free long RNA biomarker discovery. *Biomark Res.* 2022;10(1):62.
- 41.** Tzimagiorgis G, Michailidou EZ, Kritis A, et al. Recovering circulating extracellular or cell-free RNA from bodily fluids. *Cancer Epidemiol.* 2011;35(6):580–9.
- 42.** Pös O, Biró O, Szemes T, Nagy B. Circulating cell-free nucleic acids: characteristics and applications. *Eur J Hum Genet EJHG.* 2018;26(7):937–45.
- 43.** Drula R, Ott LF, Berindan-Neagoe I, Pantel K, Calin GA. MicroRNAs from Liquid Biopsy Derived Extracellular Vesicles: Recent Advances in Detection and Characterization Methods. *Cancers.* 2020;12(8):2009.
- 44.** Heitzer E, Haque IS, Roberts CES, Speicher MR. Current and future perspectives of liquid biopsies in genomics-driven oncology. *Nat Rev Genet.* 2019;20(2):71–88.

- 45.** Kolenda T, Guglas K, Baranowski D, et al. cfRNAs as biomarkers in oncology - still experimental or applied tool for personalized medicine already? *Rep Pract Oncol Radiother J Gt Cancer Cent Poznan Pol Soc Radiat Oncol*. 2020;25(5):783–92.
- 46.** Glinge C, Clauss S, Boddum K, J et al. Stability of Circulating Blood-Based MicroRNAs - Pre-Analytic Methodological Considerations. *PLoS One*. 2017;12(2):e0167969.
- 47.** Lin Y, Leng Q, Zhan M, Jiang F. A Plasma Long Noncoding RNA Signature for Early Detection of Lung Cancer. *Transl Oncol*. 2018;11(5):1225–31.
- 48.** Umu SU, Langseth H, Bucher-Johannessen C, et al. A comprehensive profile of circulating RNAs in human serum. *RNA Biol*. 2018;15(2):242–50.
- 49.** Li X, Mauro M, Williams Z. Comparison of plasma extracellular RNA isolation kits reveals kit-dependent biases. *BioTechniques*. 2015;59(1):13–7.
- 50.** Verwilt J, Trypsteen W, Van Paemel R, et al. When DNA gets in the way: A cautionary note for DNA contamination in extracellular RNA-seq studies. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2020;117(32):18934–6.
- 51.** Chen K, Hu Z, Xia Z, et al. The Overlooked Fact: Fundamental Need for Spike-In Control for Virtually All Genome-Wide Analyses. *Mol Cell Biol*. 2015;36(5):662–7.
- 52.** Yuan T, Huang X, Woodcock M, et al. Plasma extracellular RNA profiles in healthy and cancer patients. *Sci Rep*. 2016;6:19413.
- 53.** Ward Gahlawat A, Lenhardt J, Witte T, et al. Evaluation of Storage Tubes for Combined Analysis of Circulating Nucleic Acids in Liquid Biopsies. *Int J Mol Sci*. 2019;20(3):704.
- 54.** van Niel G, Carter DRF, Clayton A, et al. Challenges and directions in studying cell-cell communication by extracellular vesicles. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2022;23(5):369–82.
- 55.** Zhou Y, Zhang Y, Gong H, Luo S, Cui Y. The Role of Exosomes and Their Applications in Cancer. *Int J Mol Sci*. 2021;22(22):12204.
- 56.** Han QF, Li WJ, Hu KS, et al. Exosome biogenesis: machinery, regulation, and therapeutic implications in cancer. *Mol Cancer*. 2022;21(1):207.
- 57.** Wang J, Ni J, Beretov J, Thompson J, Graham P, Li Y. Exosomal microRNAs as liquid biopsy biomarkers in prostate cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2020;145:102860.
- 58.** Wang J, Yang K, Yuan W, Gao Z. Determination of Serum Exosomal H19 as a Noninvasive Biomarker for Bladder Cancer Diagnosis and Prognosis. *Med Sci Monit Int Med J Exp Clin Res*. 2018;24:9307–16.
- 59.** Keerthikumar S, Chisanga D, Ariyaratne D, et al. ExoCarta: A Web-Based Compendium of Exosomal Cargo. *J Mol Biol*. 2016;428(4):688–92.
- 60.** Wu X, Zhou Z, Xu S, et al. Extracellular vesicle packaged LMP1-activated fibroblasts promote tumor progression via autophagy and stroma-tumor metabolism coupling. *Cancer Lett*. 2020;478:93–106.
- 61.** Kalluri R, LeBleu VS. The biology, function, and biomedical applications of exosomes. *Science*. 2020;367(6478):eaau6977.
- 62.** Li P, Kaslan M, Lee SH, Yao J, Gao Z. Progress in Exosome Isolation Techniques. *Theranostics*. 2017;7(3):789–804.
- 63.** Tauro BJ, Greening DW, Mathias RA, et al. Comparison of ultracentrifugation, density gradient separation, and immunoaffinity capture methods for isolating human colon cancer cell line LIM1863-derived exosomes. *Methods San Diego Calif*. 2012;56(2):293–304.
- 64.** Tian Y, Gong M, Hu Y, et al. Quality and efficiency assessment of six extracellular vesicle isolation methods by nano-flow cytometry. *J Extracell Vesicles*. 2020;9(1):1697028.
- 65.** Yakubovich EI, Polischouk AG, Evtushenko VI. Principles and Problems of Exosome Isolation from Biological Fluids. *Biochem Mosc Suppl Ser Membr Cell Biol*. 2022;16(2):115–26.
- 66.** Baranyai T, Herczeg K, Onódi Z, et al. Isolation of Exosomes from Blood Plasma: Qualitative and Quantitative Comparison of Ultracentrifugation and Size Exclusion Chromatography Methods. *PLoS One*. 2015;10(12):e0145686.
- 67.** Kang D, Oh S, Ahn SM, Lee BH, Moon MH. Proteomic analysis of exosomes from human neural stem cells by flow field-flow fractionation and nanoflow liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Proteome Res*. 2008;7(8):3475–80.
- 68.** Pan W, Miao Q, Yin W, et al. The role and clinical applications of exosomes in cancer drug resistance. *Cancer Drug Resist*. 2024;7:43.
- 69.** Yang Z, Atiyas Y, Shen H, Siedlik MJ, Wu J, Beard K, et al. Ultrasensitive Single Extracellular Vesicle Detection Using High Throughput Droplet Digital Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Nano Lett*. 2022;22(11):4315–24.
- 70.** Thon JN, Italiano JE. Platelet formation. *Semin Hematol*. 2010;47(3):220–6.
- 71.** Scurfield G, Radley JM. Aspects of platelet formation and release. *Am J Hematol*. 1981;10(3):285–96.
- 72.** Lefrançois E, Ortiz-Muñoz G, Caudrillier A, et al. The lung is a site of platelet biogenesis and a reservoir for haematopoietic progenitors. *Nature*. 2017;544(7648):105–9.
- 73.** Schubert S, Weyrich AS, Rowley JW. A tour through the transcriptional landscape of platelets. *Blood*. 2014;124(4):493–502.

- 74.** Nagalla S, Shaw C, Kong X, et al. Platelet microRNA-mRNA coexpression profiles correlate with platelet reactivity. *Blood*. 2011;117(19):5189–97.
- 75.** Alhasan AA, Izuogu OG, Al-Balool HH, et al. Circular RNA enrichment in platelets is a signature of transcriptome degradation. *Blood*. 2016;127(9):e1–11.
- 76.** Schlesinger M. Role of platelets and platelet receptors in cancer metastasis. *J Hematol Oncol J Hematol Oncol*. 2018;11(1):125.
- 77.** Plantureux L, Mège D, Crescence L, et al. The Interaction of Platelets with Colorectal Cancer Cells Inhibits Tumor Growth but Promotes Metastasis. *Cancer Res*. 2020;80(2):291–303.
- 78.** Eslami-S Z, Cortés-Hernández LE, Glogovitis I, et al. In vitro cross-talk between metastasis-competent circulating tumor cells and platelets in colon cancer: a malicious association during the harsh journey in the blood. *Front Cell Dev Biol*. 2023;11:1209846.
- 79.** Wang X, Zhao S, Wang Z, Gao T. Platelets involved tumor cell EMT during circulation: communications and interventions. *Cell Commun Signal CCS*. 2022;20(1):82.
- 80.** Best MG, Sol N, Kooi I, et al. RNA-Seq of Tumor-Educated Platelets Enables Blood-Based Pan-Cancer, Multiclass, and Molecular Pathway Cancer Diagnostics. *Cancer Cell*. 2015;28(5):666–76.