

## زیست‌نشانگرهای متابولومیکی پلازما در کارسینوم پاپیلاری تیروئید: مطالعه مورد شاهده‌ی و مقایسه نظام‌مند

دکتر راضیه ابوشهاب<sup>۱</sup>، دکتر صفورا پاکیزه کار<sup>۲</sup>، دکتر سمانه حسین‌زاده<sup>۲</sup>، لاله حقوقی‌راد<sup>۲</sup>، هدی گلاب قدکسان<sup>۲</sup>، دکتر مهدی هدایتی<sup>۲</sup>

۱) دانشکده پزشکی کرتین، دانشگاه کرتین، بنتلی، استرالیا، ۲) مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی غدد درون‌ریز، پژوهشکده علوم غدد درون‌ریز و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران، نشانی مکاتبه با نویسنده مسئول: تهران، ولنجک، خیابان شهید اعرابی، پلاک ۲۳، پژوهشکده علوم غدد درون‌ریز و متابولیسم مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی غدد درون‌ریز، دکتر مهدی هدایتی؛ e-mail: [hedayati@endocrine.ac.ir](mailto:hedayati@endocrine.ac.ir)

### چکیده

**مقدمه:** کارسینوم پاپیلاری تیروئید (PTC) دارای سریع‌ترین میزان رشد در میان سایر انواع سرطان‌های تیروئید در سطح جهانی است. لذا، یافتن نشانگرهای زیستی کارآمد برای غربالگری اولیه PTC ضروری است. هدف ما بررسی متابولیت‌های پلاسمایی PTC با استفاده از رویکرد متابولومیک غیرهدفمند مبتنی بر رزونانس مغناطیسی هسته‌ای پروتون (<sup>1</sup>H-NMR) بود. مروری نظام‌مند نیز برای مقایسه نتایج ما با مطالعات مربوط به اختلال متابولیک PTC با استفاده از متابولومیک مبتنی بر NMR انجام شد. مواد و روش‌ها: از <sup>1</sup>H-NMR برای ارزیابی تغییرات متابولیکی در پلاسمای بیماران مبتلا به PTC در مقایسه با افراد سالم استفاده شد. برای شناسایی متابولیت‌های تغییر یافته، تجزیه و تحلیل‌های تک و چند متغیره از جمله OPLS-DA، تجزیه و تحلیل مسیرهای متابولیکی و آزمون‌های t-test به کار گرفته شد. جستجوی مقالات منتشر شده در فاصله سال ۲۰۱۴ تا ۲۰۲۴ انجام شد. پس از حذف موارد تکراری، مقالات نامرتب و مطالعات مروری، ۱۰ مطالعه واجد معیارهای لازم شناخته شدند. یافته‌ها: طبق تحلیل آماری تک و چند متغیره، سه متابولیت گلوتامین، کولین و سوکسینیک اسید بین گروه PTC و گروه سالم تفاوت معنی‌دار داشتند. کاهش سطح گلوتامین احتمالاً با خطر بالای تومورزایی PTC مرتبط بود (نسبت شانس ۰/۹۰؛ فاصله اطمینان ۹۵٪ (CI): ۰/۸۳-۰/۹۷؛ P= ۰/۰۱۱). همچنین تحلیل ROC نشان داد که اندازه‌گیری مقادیر گلوتامین می‌تواند مبتلایان به PTC را از افراد سالم متمایز کند (AUC=۰/۹۸). نتیجه‌گیری: این مطالعه نشان داد که رویکرد نیم‌رخ متابولومیک مبتنی بر NMR دارای توانایی ارائه داده‌های قابل توجه در شناسایی نشانگرهای زیستی تشخیصی برای تشخیص زودهنگام بیماران مبتلا به PTC است.

**واژگان کلیدی:** نشانگرهای زیستی، <sup>1</sup>H-NMR، متابولومیکس، متابولیت‌ها، سرطان پاپیلاری تیروئید

دریافت مقاله: ۱۴۰۲/۲/۱۶ - دریافت اصلاحیه: ۱۴۰۲/۷/۲۵ - پذیرش مقاله: ۱۴۰۲/۸/۱۲

### مقدمه

تهاجمی داشته باشد.<sup>۲</sup> کارآمدترین روش برای تشخیص ضایعات تیروئید از طریق سونوگرافی و بیرون کشیدن نمونه زیستی با سوزن ظریف<sup>۳</sup> (FNAB) است.<sup>۴</sup> با این حال، این روش‌ها دارای محدودیت‌های قابل توجهی هستند که منجر به نرخ بالای تشخیص‌های غیرقطعی می‌شود، که شامل نتایج غیرتشخیصی با درصد ۲۱-۵٪ و ضایعات آتیپیک/فولیکولی با اهمیت نامشخص با نرخ ۲۷-۱٪ هستند.

افزایش شیوع سرطان تیروئید در سراسر جهان، آن را به هفتمین علت سرطان در بین زنان تبدیل کرده است.<sup>۱</sup> به طور کلی، کارسینوم پاپیلاری تیروئید (PTC) پیش‌آگهی مطلوب‌تری نسبت به انواع دیگر سرطان‌های تیروئید دارد، اما اگر به شکل چند کانونی ظاهر شود، می‌تواند ویژگی‌های

مالونیک اسید<sup>viii</sup>، فنیل آلانین<sup>ix</sup> و L-گلوتامیک اسید<sup>x</sup> می‌توانند بیماران مبتلا به PTC را از افراد سالم متمایز کنند.<sup>۱۸</sup> اگرچه رویکردهای مبتنی بر متابولومیکس در مطالعات سرطان تیروئید به کار گرفته شده است، فرآیندهای متابولیک پایه، که منجر به PTC می‌شوند هنوز در سطح مولکولی بخوبی شناخته نشده‌اند. ما قبلاً تجزیه و تحلیل دقیق متابولومیک را در نمونه‌های پلاسمای بیماران مبتلا به PTC در مقایسه با گروه شاهد با استفاده از کروماتوگرافی گازی - طیف‌سنجی جرمی<sup>xi</sup> انجام دادیم تا نشانه‌های متابولیکی گروه‌های تیروئید را شناسایی کنیم.<sup>۲۰</sup> با این حال، برای کسب دانش مناسب از وضعیت متابولیک PTC، ارزیابی تغییرات متابولیک بیماران با استفاده از رویکرد متابولومیکس دیگری، مانند متابولومیک مبتنی بر NMR غیر هدفمند، ضروری است. بنابراین، متابولومیک غیر هدفمند مبتنی بر رزونانس مغناطیسی هسته‌ای پروتون (<sup>1</sup>H-NMR) به عنوان یک مطالعه تکمیلی برای بررسی مشخصات متابولیک پلاسمای بیماران مبتلا به PTC در مقایسه با شاهد سالم اعمال شد. علاوه بر این، ما به طور نظام‌مند منابع موجود را برای ادغام تحقیقات در مورد <sup>1</sup>H-NMR مرور کردیم. هدف از این کار، نتیجه‌گیری کلی در مورد اختلالات متابولیک در PTC است که توسط متابولومیک مبتنی بر NMR شناسایی شده است و این یافته‌ها را با نتایج ما ادغام می‌کند.

## مواد و روش‌ها

### معرف‌های شیمیایی

آب سنگین D<sub>2</sub>O<sup>xii</sup> از آزمایشگاه ایزوتوپ انرژی مصباح (اراک، ایران) خریداری شد. نمک سدیم ۲ و ۲-دی متیل-۲-سیلاپنتان-۵-سولفونات (DSS)<sup>xiii</sup>، متانول (MeOH)<sup>xiv</sup>، دی هیدروژن فسفات سدیم (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)<sup>xv</sup>، و هیدروژن فسفات سدیم (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)<sup>xvi</sup> مورد استفاده محصول شرکت سیگما آلدریج<sup>xvii</sup> (آمریکا) بود.

در این موارد، طبق شیوه گزارش‌دهی بیماری‌شناسی سلولی بتسدا<sup>i</sup>، نمونه‌گیری از غده تیروئید باید تکرار شود تا نتایج مثبت و منفی کاذب حذف شود.<sup>۱</sup> با این وجود، در برخی موارد مشکوک، جراحی تنها راه برای رسیدن به تشخیص قطعی درباره گره تیروئید است.<sup>۷</sup> از این رو، جستجو برای سایر رویکردهای غیرتهاجمی با دقت بالا از جمله نشانگرهای زیستی جدید، برای تشخیص زودهنگام PTC ضروری است.

در دهه‌های گذشته، متابولومیکس<sup>ii</sup> به عنوان یک رویکرد قدرتمند در تحقیقات سرطان شناسی مولکولی ظاهر شده است. این روش بینش دقیقی را برای شناسایی فنوتیپ‌های متمایز تومور بر اساس الگوی ویژه متابولیت‌ها که امضای متابولیک نیز خوانده می‌شود، ارائه می‌کند.<sup>۸</sup> "متابولیت" به مولکول‌های کوچکی اطلاق می‌شود که یا محصولات نهایی و یا سوبستراهای مسیرهای متابولیک هستند.<sup>۹</sup> در سال‌های اخیر، چندین آزمایش در مورد تجزیه و تحلیل متابولومیک بیماران مبتلا به سرطان تیروئید، کارآیی بالقوه رویکردهای متابولومیکس را برای درک بهتر تفسیر پاتوفیزیولوژیک گره‌های تیروئید در سطوح مولکولی نشان داده است.<sup>۱۰-۱۲</sup> متابولومیک مبتنی بر رزونانس مغناطیسی هسته‌ای (NMR) یک روش تحلیلی قوی برای مطالعات متابولومیک با کاربرد بالقوه در تحقیقات زیست پزشکی و بالینی به دلیل تجزیه و تحلیل سریع و تکرارپذیری بالا است.<sup>۱۴</sup> روش‌های مبتنی بر NMR برای تشخیص گره‌های تیروئید استفاده شده است که در آن اختلال در مسیرهای متابولیک بیماران مبتلا به سرطان تیروئید از افراد سالم قابل تشخیص است.<sup>۱۵-۱۷</sup> علاوه بر این، برخی از مطالعات با انجام رویکردهای مبتنی بر متابولومیکس نشان داده‌اند که متابولیت‌های مختلف می‌توانند افراد با PTC را از افراد سالم متمایز کنند.<sup>۱۸،۱۹</sup> به عنوان نمونه، یانگ<sup>iii</sup> و همکاران با انجام کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا - طیف‌سنجی جرمی زمان پرواز چهارقطبی (MS/MS-TOF-Q-HPLC)<sup>iv</sup>، نشان دادند که متابولیت‌های مختلف از جمله ۳-هیدروکسی-سیس-۵-تترادسنوئیل کارنیتین<sup>v</sup>، آسپارتیل فنیل آلانین<sup>vi</sup>، ال-کینورنن<sup>vii</sup>، متیل

vii-l-kynurenine  
viii-Methylmalonic acid  
ix-Phenylalanine  
x-L-glutamic Acid  
xi-Gas Chromatography/mass Spectrometry  
xii-Deuterium Oxide  
xiii-2,2-Dimethyl-2-silapentane-5-sulfonate Sodium Salt  
xiv-Methanol  
xv-Sodium Dihydrogen Phosphate  
xvi-Sodium Hydrogenphosphate  
xvii-Sigma-Aldrich

i-Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology  
ii-Metabolomic  
iii-Yang  
iv-High-performance Liquid Chromatography of Quadrupole Time of Flight Mass Spectrometry  
v-3-hydroxy-cis-5-tetradecenoylcarnitine  
vi-Aspartylphenylalanine

## بیماران

در این پژوهش، ما یک مطالعه مورد-شاهدی آزمایشی را برای شناسایی تغییرات متابولیک پلاسما در بیماران مبتلا به PTC انجام دادیم که از نوامبر ۲۰۱۵ تا آگوست ۲۰۱۶ تحت لوکتومی یا تیروئیدکتومی قرار گرفتند. فقط بیمارانی که تشخیص‌های آسیب شناختی بافتی PTC داشتند (اما بدون میکرو-PTC) در ابتدا بر اساس گزارش‌های آسیب‌شناسی جراحی نهایی تیروئید وارد مطالعه شدند. بیماران مبتلا به انواع دیگر سرطان یا مبتلایان به سندرم متابولیک و دیابت از مطالعه خارج شدند. شدت و Stage بیماران مبتلا به PTC بر اساس ویرایش هشتم سیستم مرحله‌بندی تومور-گره-متاستاز (TNM)<sup>i</sup> کمیته مشترک سرطان آمریکا (AJCC)<sup>ii</sup> مرحله‌بندی شدند.<sup>۲۱</sup> شرکت‌کنندگان سالم در این مطالعه، داوطلبانی بودند که برای انجام معاینات معمول بهداشتی به آزمایشگاه آسیب‌شناسی و ژنتیک سعید، تهران، ایران مراجعه کردند. در مجموع، ۱۲ بیمار PTC (۹ زن و ۳ مرد) با میانگین سنی و انحراف معیار  $42/83 \pm 13/07$  سال و ۹ فرد سالم (۶ زن و ۳ مرد) با میانگین سنی و انحراف معیار  $42/78 \pm 13/47$  سال وارد مطالعه شدند.

نمونه‌های خون (۵ میلی‌لیتر) از همه افراد بیمار قبل از عمل جراحی جمع‌آوری (بیماران قبل از خونگیری هیچ‌گونه درمان دارویی یا درمان با ید رادیواکتیو دریافت نکردند) و از افراد شاهد در شرایط ناشتا، جمع‌آوری و در لوله‌های حاوی ضدانعقاد<sup>iii</sup> EDTA نگهداری شد. بلافاصله پس از خونگیری، نمونه‌ها روی یخ قرار گرفتند و ظرف ۳۰ دقیقه پلاسما با سانتریفیوژ در ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه در ۴ درجه سانتی‌گراد از خون کامل جدا شد. نمونه‌های پلاسما به میکروتیوپ‌های ۱/۵ میلی‌لیتری منتقل و قبل از تجزیه و تحلیل NMR در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره شد.

## آماده‌سازی نمونه

به منظور استخراج متابولیت‌ها و رسوب دادن پروتئین‌ها، ۱ میلی‌لیتر متانول به هر نمونه (۳۰۰ میکرولیتر پلاسما) اضافه شد. پس از مخلوط کردن، لوله‌ها در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه نگهداری شدند، سپس با ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند. مواد رویی به سری جدیدی از لوله‌ها

منتقل و با استفاده از سانتریفیوژ خلاء (اپندورف<sup>iv</sup>) ساخت کشور آلمان) به مدت ۱۰ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد، تا خشکی کامل تبخیر شدند. در نهایت، نمونه‌های خشک شده در ۶۰۰ میکرولیتر از محلول بافر فسفات (۰/۲ مولار  $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ، ۱۰٪  $\text{D}_2\text{O}$ ،  $\text{pH}=7/4$ )، حاوی ۵ میلی‌مولار DSS به عنوان مرجع تغییر شیمیایی ۰/۰۸ حل شدند. پس از سانتریفیوژ (۱۳۰۰۰ دور در دقیقه، ۳۰ دقیقه، ۴ درجه سانتی‌گراد)، محلول همگن به یک لوله NMR ۵ میلی‌متری برای طیف‌سنجی NMR منتقل شد. انجام آزمون NMR به صورت تصادفی بر روی تمام نمونه‌ها انجام شد.

## تجزیه و تحلیل طیف‌سنجی NMR

تمام نمونه‌های پلاسما با استفاده از طیف‌سنجی  $^1\text{H-NMR}$  دانشگاه صنعتی شریف در فرکانس  $^1\text{H}$  ۵۰۰/۱۳ مگاهرتز با استفاده از طیف‌سنج AV-۵۰۰ (بروکر بایواسپین<sup>v</sup>، آلمان) تجزیه و تحلیل شدند. یک طیف یک بعدی<sup>vi</sup> با استفاده از یک توالی پالس استاندارد (30zg) با تاخیر بازگشت<sup>vii</sup> ۱۸ ثانیه به دست آمد. میانگین ۲۵۶ پالس گذرا<sup>viii</sup> با نقاط داده ۶۵ هزار<sup>ix</sup>، عرض طیفی<sup>x</sup> ۸۵ppm، زمان جمع‌آوری<sup>xi</sup> ۱/۷۰ ثانیه و تاخیر تکرار<sup>xii</sup> ۱ ثانیه بین پالس‌های گذرا به دست آمد. نرم‌افزار Mnova نسخه ۸/۰/۱ (ماستر لب<sup>xiii</sup>، اسپانیا) و سامانه تحت وب بیزیل<sup>xiv</sup> برای پردازش طیف استفاده شد. ابتدا، تنظیم فاز و اصلاح پایه انجام شد.

سپس، داده‌های NMR به رزونانس DSS در ۰/۰۸ ارجاع داده شد. منطقه فرعی  $\delta$  ppm ۶/۰۵-۴/۵۵ حذف شد تا اثر مزاحمت آب حذف شود. شناسایی متابولیت‌ها با استفاده از سامانه تحت وب بیزیل به دست آمد. این سامانه دارای یک کتابخانه مرجع طیفی حاوی بیش از ۵۰ متابولیت برای محاسبه غلظت نسبی ( $\mu\text{M}$ ) متابولیت‌ها می‌باشد.<sup>۲۲</sup> علاوه بر این، شناسایی متابولیت‌های انتخاب شده با پایگاه داده متابولوم انسانی<sup>۲۳</sup> و منابع موجود<sup>۲۴،۲۵</sup> مورد انطباق و بررسی قرار گرفتند.

iv-Eppendorf  
v-Bruker BioSpin  
vi-D1  
vii-Relaxation Delay  
viii-Transients  
ix-Data points 65 K  
x-Spectral Width  
xi-Acquisition Time  
xii-Repetition Delay  
xiii-Mestrelab  
xiv-Bayesil

i-Tumor-Node-Metastasis  
ii-American Joint Committee on Cancer  
iii-Ethylenediaminetetraacetic Acid

## تجزیه و تحلیل داده‌های آماری

نیم‌رخ متابولیک پلازما بین گروه مورد (PTC) و شاهد (سال) با استفاده از تجزیه و تحلیل آماری چند متغیره و تک متغیره مقایسه شد. متغیرها با استفاده از روش محاسبه میانه و مقیاس‌گذاری خودکار<sup>i</sup> توسط متابوآنالیست<sup>ii</sup> (نسخه ۶/۰)، نرمال و مقیاس شدند. نرم‌افزار SIMCA-P ۱۴/۰ (یومتريکس<sup>iii</sup>، سوئد) برای ایجاد نمودارهای آماری چند متغیره (PCA<sup>iv</sup> و OPLS-DA<sup>v</sup>) برای بررسی اجمالی داده‌ها، شناسایی مقادیر خارج از محدوده، و شناسایی تفاوت‌های متابولیکی بین PTC و گروه‌های سالم استفاده شد. کیفیت مدل‌ها با تغییرات تجمعی مدل‌سازی شد<sup>vi</sup>  $Y$  و  $X$  ( $R^2X$ ) و  $R^2Y$  (cross-validated predictive ability  $Q^2$  (cum) ارزیابی شد. از مقادیر Variable importance values (VIP)  $\leq 0.1$  از مدل OPLS-DA برای افتراق بین PTC و افراد سالم کمک گرفته شد. برای شناسایی متابولیت‌های افتراقی بین دو گروه از آزمون آماری ( $P < 0.05$ ) و نمودار آتشفشانی<sup>vii</sup> استفاده شد. نمودار جعبه‌ای با استفاده از بسته ترسیمی ggplots<sup>viii</sup> در زبان آماری R ترسیم شد (نسخه ۳/۵/۳).<sup>ix</sup> تجزیه و تحلیل منحنی ROC<sup>viii</sup> با استفاده از MetaboAnalyst (نسخه ۶/۰) برای ارزیابی ناحیه زیر منحنی<sup>ix</sup> (AUC) و مقایسه توانایی پیش‌بینی متابولیت‌های قابل توجه بین دو گروه انجام شد.

## جستجوی نظام‌مند متون علمی

یک جستجوی جامع از متون با استفاده از عبارات کلیدی مانند «کارسینوم پاپیلاری تیروئید»، یا «سرطان پاپیلاری تیروئید»، یا «PTC»، و «متابولومیکس»، یا «متابولومیک مبتنی بر  $^1H-NMR$ » انجام شد. پایگاه‌های داده مورد استفاده برای این منظور پابمد<sup>x</sup> مدلاین<sup>xi</sup> و اسکپوس<sup>xii</sup> بودند. دامنه زمانی جستجو محدود به انتشارات از سال ۲۰۱۴ تا ۲۰۲۴ بود. نتایج جستجوی بازایی شده به طور نظام‌مند با استفاده از

i-Sample Median and Autoscaling

ii-MetaboAnalyst

iii-Umetrics

iv-Principal Component Analysis

v-Orthogonal Partial Least Squares Discriminant Analysis

vi-Cumulative Modeled Variation

vii-Volcano Plot

viii-Receiver Operating Characteristic Curve

ix-Area under the curve

x-PubMed

xi-MEDLINE

xii-Scopus

اندنوت<sup>xiii</sup> نسخه XV سازماندهی شد - غربالگری اولیه شامل ارزیابی عناوین و چکیده‌ها و انتخاب مطالعات مرتبط با معیارهای بررسی بود. بر اساس معیارهای ورود مطالعاتی که متابولومیک‌های مبتنی بر  $^1H-NMR$  را در نمونه‌های انسانی PTC بررسی کرده بودند مد نظر بود. پس از این انتخاب، متن کامل مقالات برای بررسی دقیق به دست آمد. نتایج مطالعات غیرمرتبط، مروری، فراتحلیل و تحقیقات انجام شده در شرایط آزمایشگاهی و حیوانی از مطالعه خارج شدند. داده‌های استخراج شده از مطالعات انتخابی شامل اسامی نویسندگان، سال انتشار، انواع نمونه‌ها، اندازه‌های گروه، روش‌های مورد استفاده و متابولیت‌های مورد بررسی بود.

## یافته‌ها

## ویژگی‌های بالینی افراد

جدول ۱ ویژگی‌های بالینی و آسیب‌شناختی شرکت‌کنندگان در مطالعه را ارائه می‌دهد. این تجزیه و تحلیل شامل ۲۱ نفر بود که به دو گروه تقسیم شدند: PTC (۱۲ نفر) و داوطلبان سالم (۹ نفر). میانگین سنی و انحراف معیار (SD) بیماران مبتلا به PTC و افراد سالم به ترتیب  $42/83 \pm 13/07$  و  $42/78 \pm 13/47$  بود (جدول ۱).

نیم‌رخ‌های متابولومیک مبتنی بر طیف  $^1H-NMR$  نمونه‌های پلازما بین دو گروه

تجزیه و تحلیل طیف  $^1H-NMR$  اجازه انتساب و تعیین کمیت ۲۳ متابولیت را در هر نمونه پلاسمای خون داد. شکل S1، طیف مشخص شده پلاسمای انسانی از بیماران مبتلا به PTC و افراد سالم را نمایش می‌دهد. نمودار PCA نشان داد که دو گروه از هم جدا نیستند (شکل S2). بنابراین، یک تجزیه و تحلیل طبقه‌بندی چند متغیره نظارت شده با استفاده از OPLS-DA برای شناسایی متابولیت‌های تمایزی بین PTC و گروه‌های سالم ایجاد شد. همان‌طور که با خوشه‌بندی متمایز در نمودار امتیاز مشهود است (شکل A1) تجزیه و تحلیل OPLS-DA تمایز واضحی را بین بیماران مبتلا به PTC و افراد سالم نشان داد. واریانس توضیح داده شده مدل ( $R^2Y = 0.87$ ) قدرت توضیحی قوی آن را برجسته می‌کند. با این حال، توانایی پیش‌بینی، که با نمره  $Q^2 = 0.44$  نشان داده شده است، قابلیت اطمینان متوسط را نشان می‌دهد.

## جدول ۱- مشخصات جمعیت‌شناختی و آسیب‌شناسی شرکت‌کنندگان در مطالعه

متغیر	PTC	سالم
تعداد بیمار	۱۲	۹
جنسیت		
نر	۳	۳
زن	۹	۶
سن (میانگین±انحراف معیار؛ سال)	۴۲/۸۳ ± ۱۳/۵۷	۴۲/۷۸ ± ۱۳/۴۷
آزمون‌های بیوشیمی بالینی (میانگین ± انحراف معیار)		
TSH (واحد بین‌المللی میکرو در میلی‌لیتر)	---	۱/۸ ± ۰/۸۷
T <sub>4</sub> (نانومول در لیتر)	---	۱۰۲/۶۷ ± ۱۴/۱۳
T <sub>3</sub> (نانومول در لیتر)	---	۱/۴۷ ± ۰/۲۹
FBS (میلی‌گرم در دسی‌لیتر)	---	۹۰/۵۵ ± ۸/۵۸
اندازه تومور (میانگین ± انحراف معیار؛ سانتی‌متر)	۲/۰۹ ± ۱/۱۶	---
آسیب شناختی بافتی		
گواتر چند گرهی	---	---
PTC کلاسیک	۱۰	---
نوع فولیکولی PTC	۲	---
کانونی بودن		
تک کانونی	۱۰	---
چند کانونی	۲	---
تهاجم		
منفی	۷	---
مثبت <sup>o</sup>	۵	---
متاستاز به غده لنفاوی <sup>†</sup>		
منفی	۴	---
مثبت	۸	---
مرحله TNM <sup>‡</sup>		
من	۷	---
II	---	---
III	۲	---
AVI	۳	---

PTC: کارسینوم پاپیلاری تیروئید، \*شامل تهاجم خارج کپسولی و/یا لنفواسکولار است، †شامل N1a و/یا N1b می‌شود، ‡سیستم مرحله‌بندی تومور-گره-متاستاز (TNM) کمیته مشترک آمریکایی سرطان (AJCC)

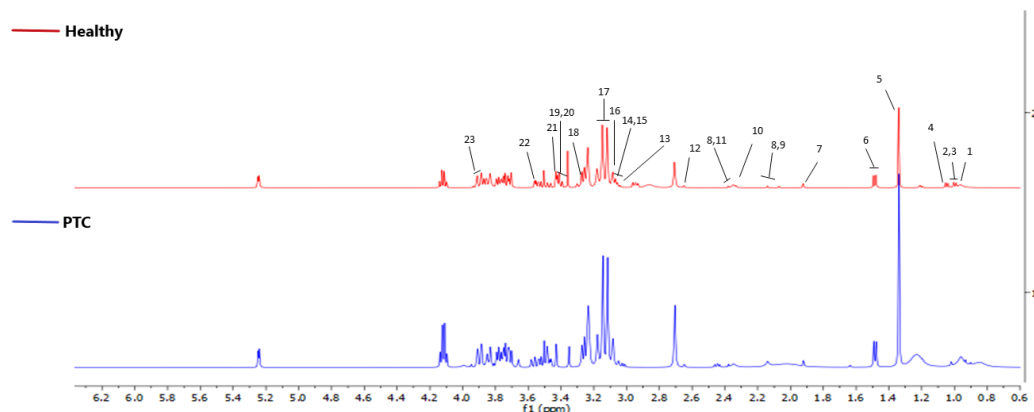
شد. نتایج ما نشان داد که از ۲۳ متابولیت، گلوتامین<sup>i</sup>، اسید سوکسینیک<sup>ii</sup> و کولین<sup>iii</sup> به طور قابل توجهی بین دو گروه تفاوت داشتند. پس از کنترل تأثیر جنسیت با انجام آزمون ANCOVA، اثر متقابل معنی‌داری بین گروه‌ها و جنسیت بر میانگین اختلاف گلوتامین مشاهده نشد.  $F(1/18) = 0/102$ ،  $p = 0/508$ ،  $F(1/18) = 0/355$ ،  $p = 0/753$ ، و اسید سوکسینیک  $F(1/18) = 0/355$ ،  $p = 0/753$

یک آزمون جایگشت ( $n=200$ ) توانایی پیش‌بینی مدل را تعیین کرد، که نشان داد مقادیر R<sub>2</sub> و Q<sub>2</sub> مدل اصلی بهتر از مدل جایگشت شده بودند، که نشان می‌دهد مدل OPLS-DA معتبر است (شکل B۱). علاوه بر این، تجزیه و تحلیل آزمون t-test ( $p\text{-values} < 0/05$ ) همراه با تجزیه و تحلیل چند متغیره، با نمره VIP با محدوده بالاتر از ۱ (داده‌ها در جدول ۲ نشان داده شده است)، برای تعیین متابولیت‌هایی که به طور قابل توجهی بین PTC و گروه سالم تغییر کرده بودند، انجام

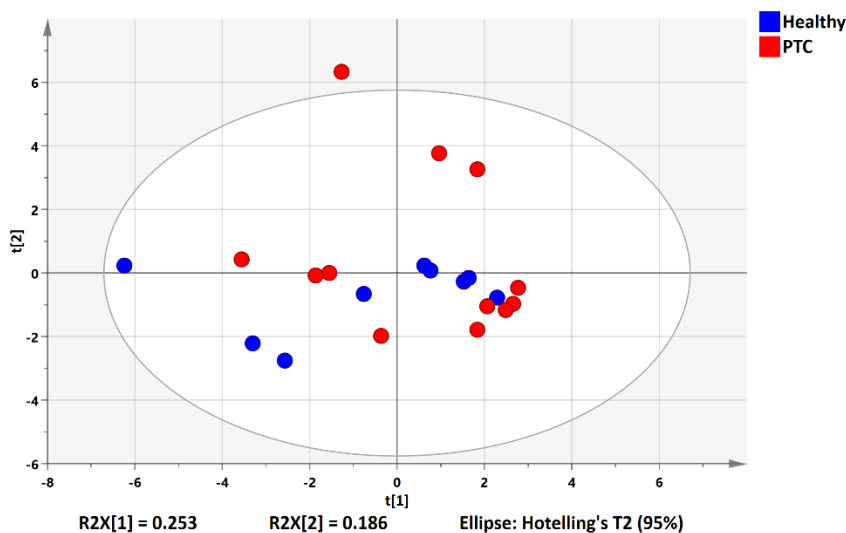
i-Glutamine  
ii-Succinic acid  
iii-Choline

داد کولین و اسید سوکسینیک متابولیت‌ها با تنظیم بالا در PTC نسبت به شاهد بودند، در حالی‌که گلوتامین با تنظیم پایین بود (شکل C۱).

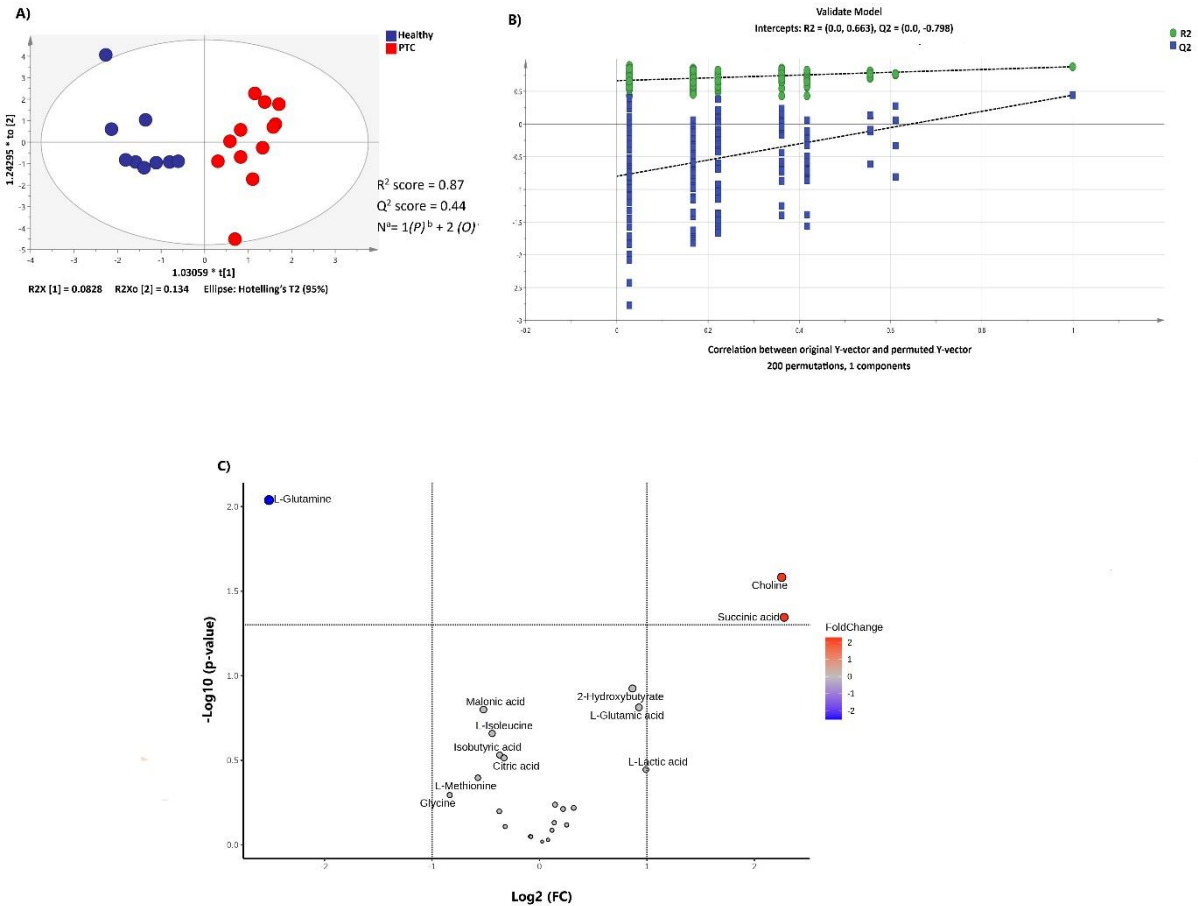
اما تأثیر جنسیت بر میانگین تفاوت کولین  $F(۱/۱۸) = ۵/۱۳$ ،  $p = ۰/۰۳۷$  معنی‌دار بود. علاوه بر این، رسم نمودار آتشفشانی برای انتخاب ویژگی با آستانه تغییر برابری  $(X)۲$  و  $p$ -value کمتر از  $۰/۰۵$  مورد استفاده قرار گرفت، که نشان



شکل S1) طیف‌سنجی  $1H-NMR$  از نمونه‌های پلاسمایی PTC و افراد سالم. ترکیبات اختصاص داده شده به شرح زیر است: 1: ۲-هیدروکسی بوتیریک اسید، ۲: ال-ایزولوسین، ۳: ال-لوسین، ۴: ۳-هیدروکسی بوتیریک اسید، ۵: لاکتات، ۶: ال-آلانین، ۷: اسید استیک، ۸: ال-گلوتامین، ۹: ال-گلوتامات، ۱۰: سوکسینیک اسید، ۱۱: ال-متیونین، ۱۲: سترات، ۱۳: ال-آسپارژین، ۱۴: کراتینین، ۱۵: کراتین، ۱۶: کولین، ۱۷: دی-گلوکز، ۱۸: مالونیک اسید، ۱۹: ال-ترئونین، ۲۰: گلیسرول، ۲۱: گلايسين، ۲۲: پیروویک اسید، ۲۳: ایزوبوتیریک اسید



شکل S2) نمودار امتیاز تجزیه و تحلیل مؤلفه‌های اصلی بین دو گروه: سالم (آبی) و سرطان پاپیلاری تیروئید (PTC، قرمز)



شکل ۱) (A) نمودارهای پراکنندگی امتیاز تجزیه و تحلیل OPLS-DA برای نیمرخ‌های متابولیک گروه‌های PTC (نقاط قرمز) و سالم (نقاط آبی) که تمایز واضحی را بین سه گروه نشان می‌دهد. (B) استحکام مدل OPLS-DA برای نمونه‌های پلازما بین دو گروه با آزمایش جایگشت (با ۲۰۰ نفر) تعیین شد. مقادیر  $R^2Y$  و  $Q^2$  بالاتری برای مدل‌های اصلی در مقایسه با مدل‌های جایگشت شده مشاهده شد که نشان‌دهنده معتبر بودن مدل است. (C) نمودار آتشفشانی متابولیت‌های حاشیه‌نویسی که PTC را در مقابل سالم مقایسه می‌کند. متابولیت نقطه آبی در سمت چپ به طور قابل توجهی در بیماران مبتلا به PTC نسبت به افراد سالم کاهش یافت (تغییر برابری  $< 2$  و  $P\text{-value} < 0.05$ ) در حالی که متابولیت‌های نقطه قرمز در سمت راست در بیماران مبتلا به PTC نسبت به افراد سالم به طور قابل توجهی تنظیم مثبت شد (تغییر برابری  $< 2$  و  $P\text{-value} < 0.05$ ); نقاط خاکستری متابولیت‌ها را با تغییر برابر  $\geq 2$  و/یا  $P\text{-value} \geq 0.05$  نشان می‌دهد.

۰/۸۴ تا ۱/۰۷۶ و  $P=0.045$ . متاستاز غدد لنفاوی (نسبت شانس ۱/۰۲۵؛ فاصله اطمینان ۰/۹۵، ۰/۹۱۱ تا ۱/۱۵۴ و  $P=0.067$ ) و مرحله‌بندی تومور-گره-متاستاز (نسبت شانس ۱/۰۹۳؛ فاصله اطمینان ۰/۹۵، ۰/۹۶ تا ۱/۲۴ و  $P=0.016$ ) نیز مشابه بود. علاوه بر این، تغییرات سطح اسید سوکسینیک و کولین با ویژگی‌های آسیب‌شناختی مرتبط نبود (جدول S۱)

ارتباط ویژگی‌های دموگرافیک/آسیب‌شناختی مقیاسی

یا ترتیبی با متابولیت‌های مهم

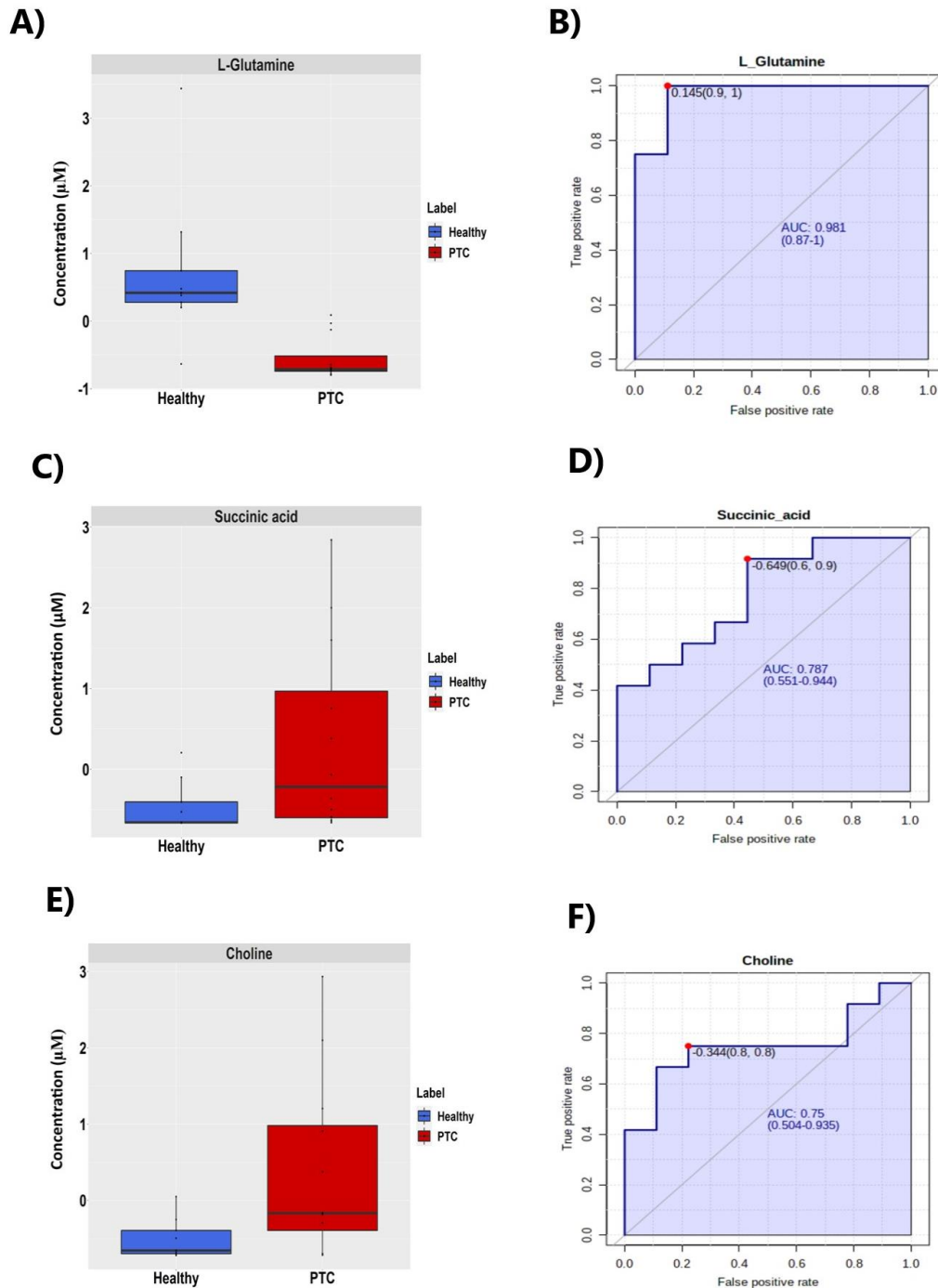
تحلیل رگرسیون لجستیک دودویی نشان داد که کاهش

سطح گلوتامین با خطر بالای تومورزایی PTC مرتبط است

(نسبت شانس ۰/۹۰؛ فاصله اطمینان ۰/۹۵، ۰/۸۳ تا ۰/۹۷ و

$P=0.011$ )، در حالی که تغییرات سطح گلوتامین با خطر نفوذ

بی‌ارتباط بود (نسبت شانس ۰/۹۵؛ فاصله اطمینان ۰/۹۵،



شکل ۲) (A, C, E) نمودارهای جعبه‌ای غلظت نسبی برای برخی از متابولیت‌های تغییر یافته قابل توجه ( $P\text{-value} < 0.05$ ) در PTC و پلاسمای سالم. در نتیجه فرآیند عادی‌سازی، برخی از bins دارای مقیاس‌های منفی در محور Y بودند (MetaboAnalyst v 6/0). (B, D, F) منحنی توانایی سه متابولیت برای پیش‌بینی PTC در مقابل سالم را تجزیه و تحلیل می‌کند. برش بهینه روی منحنی با یک نقطه قرمز نشان داده شد.



جدول ۲- غلظت نسبی متابولیت‌ها در PTC و بیماران سالم

آزمون تی	میانگین $\pm$ SD		VIP	شناسه KEGG	جابجایی شیمیایی (قسمت در میلیون <sup>۱</sup> )	متابولیت
	PTC	سالم				
۰/۱۹۳	۲۷/۸۰ $\pm$ ۱۸/۱۳	۱۷/۷۴ $\pm$ ۱۵/۰۸	۱/۲۵	۰۰۹۸۴C	۰/۹۰۳	۲-هیدروکسی بوتیرات
۰/۶۸۰	۹/۹۵ $\pm$ ۹/۶۱	۸/۴۴ $\pm$ ۵/۶۳	۰/۵۵	۰۰۰۲۳C	۱/۹۲۴	استیک اسید
۰/۲۵۶	۶۹۵/۹۶ $\pm$ ۵۳۴/۹۳	۴۷۰/۲۰ $\pm$ ۲۴۶/۷۵	۰/۵۲	۰۰۳۱۸C	۳/۰۴	کراتینین
۰/۷۲۲	۱۷/۹۴ $\pm$ ۱۳/۴۵	۱۲/۷۵ $\pm$ ۱۰/۹۱	۰/۱۶	۰۰۳۰۰C	۳/۰۵۱	کراتین
۰/۹۲۹	۷۹۴/۴۶ $\pm$ ۲۸۳/۴۶	۸۰۴/۴۷ $\pm$ ۱۹۶/۸۶	۰/۹۳	۰۰۱۵۸C	۲/۱۷۲	اسید سیتریک
۰/۰۲۴	۷۳/۵۶ $\pm$ ۷۲/۰۲	۱۵/۶۷ $\pm$ ۱۳/۲۳	۱/۱۵	۰۰۱۱۴C	۳/۱۰۹	کولین
۰/۸۱۸	۲۰۲۷/۴۳ $\pm$ ۱۶۵۳/۴۱	۱۵۹۵/۵۴ $\pm$ ۱۴۶۲/۱۵	۰/۷۶	۰۰۰۲۱C	۳/۱۵۱	دی-گلوکز
۰/۹۲۸	۴۵/۶۲ $\pm$ ۳۸/۴۹	۷۵/۱۷ $\pm$ ۴۰/۹۱	۰/۷۶	۰۰۰۲۷C	۳/۵۰۴	گلیسین
۰/۰۷۸	۶۷۸۷/۰۳ $\pm$ ۴۰۲۲/۰۶	۴۰۳۶/۵۶ $\pm$ ۲۱۰۲/۷۳	۱/۱۱	۰۰۱۱۶C	۳/۴۲	گلیسرول
۰/۱۹۱	۴۵/۶۳ $\pm$ ۳۴/۰۶	۲۸/۶۷ $\pm$ ۲۶/۵۶	۱/۰۰	۰۰۰۲۵C	۲/۳۵۷	ال-گلوتامیک اسید
۰/۲۱۸	۵۶/۷۹ $\pm$ ۱۸/۸۰	۴۶/۵۷ $\pm$ ۱۷/۲۳	۱/۰۰	۰۰۰۴۱C	۱/۴۸۵	ال-آلانین
۰/۵۵۲	۶۷۵/۸۵ $\pm$ ۳۳۳/۶۳	۵۹۰/۹۸ $\pm$ ۲۹۴/۹۵	۰/۹۶۶	۰۰۱۸۸C	۳/۵۹۶	ال-ترئونین
۰/۸۰۷	۱۲۵/۸۳ $\pm$ ۱۱۹/۳۴	۱۵۷/۷۶ $\pm$ ۱۰۴/۰۵	۰/۴۷	۰۰۱۵۲C	۳/۰۱۲	ال-آسپاراژین
۰/۸۶۸	۲۵/۰۸ $\pm$ ۱۴/۲۶	۲۶/۰۱ $\pm$ ۹/۴۷	۱/۲۲	۰۰۴۰۷C	۰/۹۴	ال-ایزولوسین
۰/۳۴۶	۱۲۶/۱۱ $\pm$ ۹۷/۹۵	۷۵/۰۶ $\pm$ ۵۲/۰۸	۰/۶۹	۰۰۲۵۶C	۱/۳۳۲	ال-لاکتیک اسید
۰/۳۵۹	۷/۶۱ $\pm$ ۶/۸۳	۵/۲ $\pm$ ۴/۰۴	۰/۹۳	۰۰۰۲۲C	۲/۴۸۹	اسید پیروویک
۰/۰۲۲	۴/۰۲ $\pm$ ۳/۸۸	۰/۹۶ $\pm$ ۰/۶۸	۱/۳۲	۰۰۰۴۲C	۲/۳۹۱	سوکسینیک اسید
۰/۷۹۱	۲۵/۳۰ $\pm$ ۲۲/۶۵	۱۹/۹۶ $\pm$ ۱۸/۵۸	۰/۷	۰۰۱۸۹C	۰/۹۰۲	۳-هیدروکسی بوتیریک اسید
۰/۰۰۰۳۳۴	۱۱/۴۳ $\pm$ ۹/۰۰	۲۸/۶۶ $\pm$ ۱۹/۶۱	۲/۱۹	۰۰۰۶۴C	۲/۴۵	ال-گلوتامین
۰/۷۴۲	۱۹/۸۸ $\pm$ ۱۵/۸۸	۱۷/۷۴ $\pm$ ۱۲/۴۴	۰/۶۲	۰۰۱۲۳C	۰/۹۶	ال-لوسین
۰/۶۸۶	۸۸۴/۳۰ $\pm$ ۳۳۳/۹۹	۹۳۷/۷۳ $\pm$ ۲۲۹/۹۲	۱/۲۵	۰۰۴۰۲C	۳/۲۳۱	مالونیک اسید
۰/۴۵۰	۶/۵۸ $\pm$ ۵/۲۹	۸/۳۹ $\pm$ ۵/۳۷	۰/۷	۰۰۰۷۳C	۲/۱۴۰	ال-متیونین
۰/۷۷۰	۲۲/۷۸ $\pm$ ۶/۹۸	۲۳/۷۸ $\pm$ ۸/۵۳	۰/۸	۰۰۲۶۲C	۳/۹۱	اسید ایزوبوتیریک

PTC: کارسینوم پاپیلاری تیروئید، جابجایی شیمیایی: KEGG\_Chemical shift. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes: مقادیر P از آزمون t دانشجویی هستند. P-Value < ۰/۰۵ از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد. مقادیر نشان‌دهنده میانگین تکرارهای بیولوژیکی PTC (n=۱۲) و سالم (n=۹)  $\pm$  انحراف معیار (SD) است. <sup>۱</sup> قسمت در میلیون: ppm

### نتایج جستجوی نظام‌مند متون علمی

جستجوی ادبیات ۳۱۸۵ مقاله را نشان داد که پس از حذف موارد تکراری، ۱۴۵۳ مورد باقی ماند. ۱۴۴۳ مطالعه بر اساس معیارهای ورود به فرآیند غربالگری حذف شدند و بقیه مقالات مرتبط برای بررسی مقاله کامل انتخاب شدند. در نهایت، ۱۳ مطالعه دارای معیارهای ورود به مطالعه بودند و برای ارزیابی انتخاب شدند (شکل ۳). ذکر این نکته ضروری است که سه مقاله از تجزیه و تحلیل حذف شدند و در مجموع ۱۰ مطالعه باقی ماندند که مورد ارزیابی قرار گرفتند. در واقع، این سه مطالعه تفاوتی بین سرطان تیروئید و سایر ضایعات بدخیم قائل نشدند، بنابراین ما نمی‌توانیم آن‌ها را هنگام بررسی به عنوان PTC لحاظ کنیم.

### ارزش تشخیصی متابولیت‌های مهم

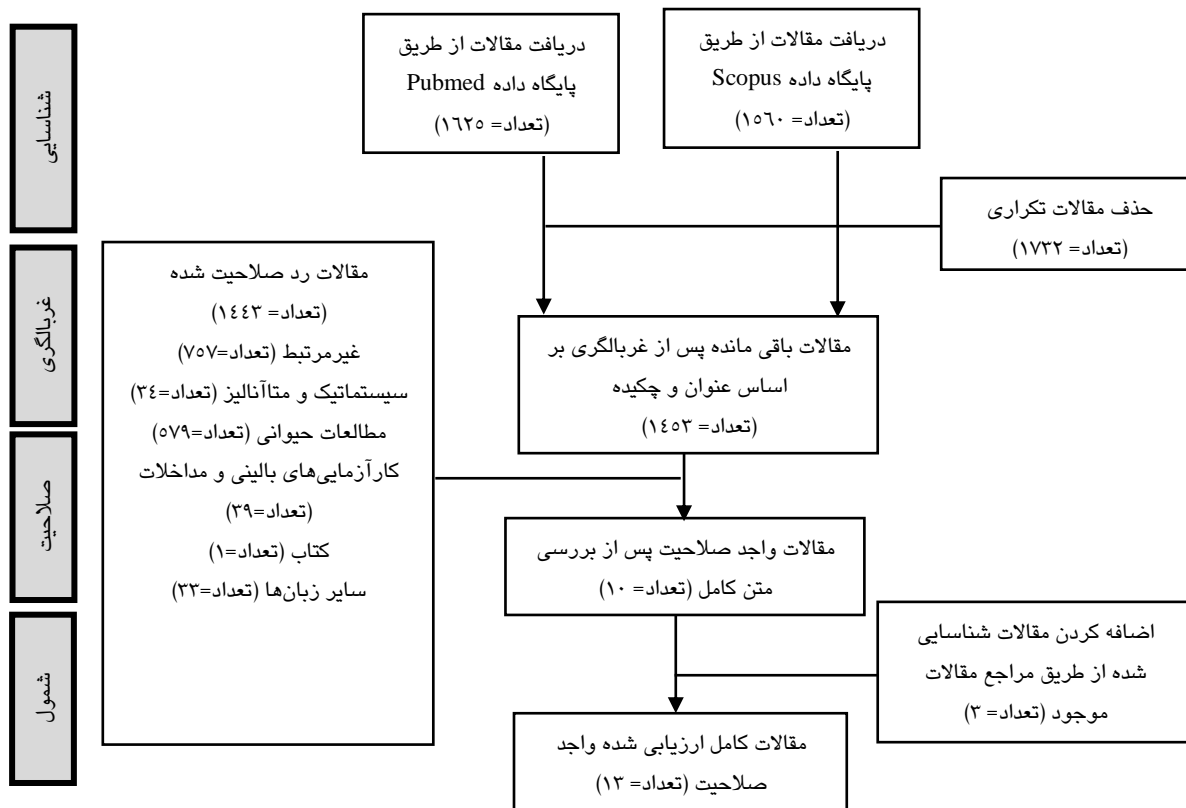
شکل‌های A، B، C، E و نمودارهای جعبه‌ای را نشان می‌دهند که میانگین غلظت‌ها را برای سه متابولیت تغییر یافته قابل توجه بین PTC و گروه‌های سالم مقایسه می‌کند. علاوه بر این، تجزیه و تحلیل منحنی ROC توانایی تشخیصی متابولیت‌های متمایز را به عنوان نشانگرهای زیستی غربالگری PTC ارزیابی کرد. نتایج نشان داد که AUC سه متابولیت شامل گلوتامین با (حساسیت ۱ و ویژگی ۰/۸۸)، اسید سوکسینیک (حساسیت ۰/۹۱، ویژگی ۰/۵۵) و کولین (حساسیت ۰/۷۵، ویژگی ۰/۷۷)، در گروه PTC در مقابل گروه سالم (شکل B، D، F) به ترتیب ۰/۹۸، ۰/۷۸ و ۰/۷۵ بودند.

جدول ۱S- تجزیه و تحلیل رگرسیون لجستیک متابولیت‌های تغییر یافته معنی‌دار در گروه PTC در مقایسه با افراد سالم

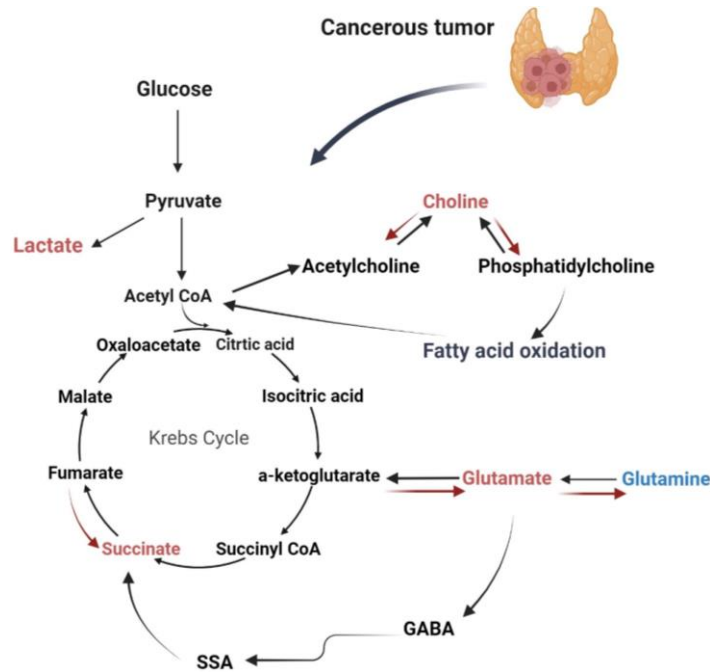
متابولیت‌ها	ضریب بتای استاندارد	خطای استاندارد	سطح معناداری	نسبت شانسیها	فاصله اطمینان %۹۵
ال-گلوتامین	-۰/۱۰۲	۰/۰۴۰	۰/۰۱۱	۰/۹۰۳	(۰/۸۳۵-۰/۹۷۶)
کولین	۰/۴۰	۰/۰۴	۰/۰۹۸	۱/۰۴۰	(۰/۹۹۳-۱/۰۹۰)
سوکسینیک اسید	-۰/۰۲۷	۰/۳۰۶	۰/۰۸۵	۱/۶۹۳	(۰/۹۳۰-۳/۰۸۳)
ال-گلوتامین	-۰/۰۴۶	۰/۰۶۱	۰/۴۵۱	۰/۹۵۵	(۰/۸۴۸-۱/۰۷۶)
کولین	۰/۰۰۴	۰/۰۰۹	۰/۶۲۳	۱/۰۰۴	(۰/۹۸۸-۱/۰۲۱)
سوکسینیک اسید	-۰/۰۸۱	۰/۱۶۱	۰/۶۱۴	۰/۹۲۲	(۰/۶۷۲-۱/۲۶۵)
ال-گلوتامین	۰/۰۲۵	۰/۶۰	۰/۶۷۸	۱/۰۲۵	(۰/۹۱۱-۱/۱۵۴)
کولین	۰/۰۰۲	۰/۰۰۹	۰/۷۹۹	۱/۰۰۲	(۰/۹۸۵-۱/۰۲۰)
سوکسینیک اسید	-۰/۰۱۹	۰/۱۶۴	۰/۹۰۸	۰/۹۸۱	(۰/۷۱۱-۱/۳۵۴)
ال-گلوتامین	۰/۰۸۹	۰/۰۶۴	۰/۱۶۵	۱/۰۹۳	(۰/۹۶۴-۱/۲۴۰)
کولین	-۰/۰۰۲	۰/۰۰۹	۰/۸۰۰	۰/۹۹۸	(۰/۹۸۱-۱/۰۱۵)
سوکسینیک اسید	۰/۱۰۴	۰/۱۶۰	۰/۵۱۵	۱/۱۱۰	(۰/۸۱۱-۱/۵۲۰)

PTC  
در مقابل سالمتهاجم\*  
منفی در مقابل مثبتمتاستاز<sup>†</sup> به غدد لنفاوی  
منفی در مقابل مثبتمرحله TNM\*  
I/III در مقابل IV

فاصله اطمینان: Confidence Interval, نسبت شانسیها: Odds ratio, سطح معناداری: p-value, خطای استاندارد: S.E.(Standard Error), ضریب بتای استاندارد: B, PTC; کارسینوم پاپیلاری تیروئید, \* شامل تهاجم خارج کپسولی و/یا لنفواسکولار است, <sup>†</sup> متاستاز به غدد لنفاوی شامل N1a و/یا N1b می‌شود, <sup>‡</sup> سیستم مرحله‌بندی تومور-گره-متاستاز (TNM) کمیته مشترک آمریکایی سرطان (AJCC)



شکل ۳- فلوچارت جزئیات فرآیند انتخاب مطالعات مربوطه را نشان می‌دهد.



شکل ۴- آشفتگی متابولیک در PTC. متابولیسم کولین، گلوتامین و سوکسینات حیاتی‌ترین برنامه‌ریزی مجدد متابولیک در تومورهای PTC هستند. PTC: کارسینوم پاپیلاری تیروئید، GABA: اسید گاما آمینوبوتیریک، SSA: نیمه آلدئید سوکسینیک رنگ‌های قرمز و آبی به ترتیب افزایش و کاهش متابولیت‌ها را نشان می‌دهند.

شناسایی شده دارای حساسیت یا نرخ ویژگی پایین و ارزش‌های پیش‌بینی مثبت ضعیف هستند.

پیشرفت‌های اخیر در دستیابی به نشانگرهای زیستی جدید در عرصه سرطان، علاقه گسترده‌ای به شناسایی تغییرات متابولیکی مرتبط با سرطان ایجاد کرده است.<sup>۷</sup> درک تغییرات نیم‌رخ متابولیک مرتبط با PTC می‌تواند در تصمیم‌گیری بالینی و تعیین راهبردهای درمانی کمک‌کننده باشد. تطبیق درمان‌ها بر اساس ویژگی‌های متابولیک خاص هر بیمار، که پزشکی شخصی نامیده می‌شود، می‌تواند نتایج درمانی را بهینه کند. در این مطالعه تجزیه و تحلیل نیم‌رخ متابولیک نمونه‌های پلاسمایی بیماران مبتلا به PTC و افراد سالم، با استفاده از  $^1\text{H-NMR}$  انجام گرفت. نتایج به دست آمده شواهدی مبنی بر ارتباط تغییرات سطوح متابولیت‌ها با متابولیسم اسید آمینه گلوتامین، اسید سوکسینیک در چرخه تری کربوکسیلیک اسید (TCA)<sup>۱</sup> و متابولیسم کولین ارائه می‌دهد. تغییرات مشابهی در متابولیسم سلولی بافت‌های سرطانی تیروئید و سرم در مطالعات قبلی در مقایسه با مطالعه ما مشاهده شد.<sup>۱۷-۱۴</sup> در مرحله بعد، ما ۱۰ سال تحقیق در مورد متابولیسم PTC را برای به دست آوردن درک

## بحث

سرطان تیروئید شایع‌ترین بدخیمی غدد درون‌ریز است و شیوع آن در دهه‌های اخیر به سرعت در سراسر جهان افزایش یافته است.<sup>۱۳</sup> PTC یک نئوپلازی متمایز و شایع‌ترین نوع بافت‌شناسی سرطان تیروئید است که تقریباً ۸۰ درصد از کل سرطان‌های تیروئید را تشکیل می‌دهد.<sup>۶</sup> FNAB با ارزیابی سیتولوژیک به عنوان یک ابزار برای تشخیص ضایعات تیروئید استفاده می‌شود. علی‌رغم موفقیت بالینی طولانی مدت آن، FNAB تهاجمی و دردناک است و نتایج سیتولوژیک مثبت یا منفی کاذب دارد.<sup>۵</sup> بنابراین، شناسایی نشانگرهای زیستی قابل دسترسی با روش‌های کمتر تهاجمی، که قادر به بهبود بازده غربالگری اولیه PTC باشند، ضروری است. مطالعات قبلی از روش‌های زیست‌شناختی مختلف، از جمله آزمون‌های ایمونوهیستوشیمی و ژنتیکی، برای یافتن نشانگرهای زیستی جدید و اصلاح محدودیت‌های تشخیص FNAB استفاده کرده‌اند.<sup>۲۷-۲۹</sup> با این حال، این ابزارها دارای محدودیت‌هایی هستند و نشانگرهای زیستی

نشان‌دهنده قابلیت مهار هدفمند عملکرد، GLS به عنوان یک رویکرد امیدوارکننده در توسعه داروهای ضد سرطان جدید، برای درمان سرطان تیروئید است.<sup>۱۴</sup>

علاوه بر این، افزایش قابل توجهی در غلظت سوکسینیک اسید در پلاسمای بیماران مبتلا به PTC نسبت به گروه شاهد مشاهده شد. اسید سوکسینیک که با عمل سوکسینات دهیدروژناز<sup>vii</sup> (SDH) به فومارات<sup>viii</sup> اکسید می‌شود، یکی از واسطه‌های اولیه چرخه TCA است. جدا از مشارکت مستقیم در چرخه TCA، اکسیداسیون اسید سوکسینیک به فومارات می‌تواند منجر به تولید الکترون شود که به تولید ATP در زنجیره انتقال الکترون در غشای میتوکندری داخلی کمک می‌کند. نشان داده شده است که اسید سوکسینیک نقش مهمی در واکنش‌های التهابی و تومورزایی دارد.<sup>۳۹</sup> علاوه بر این، جهش در ژن‌های کدکننده زیر واحدهای مختلف SDHx منجر به تجمع اسید سوکسینیک می‌شود که یک متابولیت مرتبط با سرطان یا انکومتابولیت<sup>ix</sup> معروف است<sup>۴۰</sup> که تجمع آن به شدت با پیشرفت و بدخیمی PTC مرتبط است.<sup>۴۱-۴۳</sup> از این رو، نتایج ما نشان می‌دهد که افزایش قابل توجه در گسترش اسید سوکسینیک در بیماران مبتلا به PTC را می‌توان به مهار عملکرد SDHx نسبت داد، که ممکن است تومورزایی تیروئید را تقویت کند.

علاوه بر این، افزایش قابل توجهی در غلظت کولین در پلاسمای بیماران مبتلا به PTC در مقایسه با شاهد سالم مشاهده شد. این نتایج با گزارش‌های قبلی مطابقت دارد که نشان‌دهنده افزایش کولین در بیماران مبتلا به PTC در مقایسه با گروه‌های سالم است.<sup>۴۴،۴۵</sup> کولین یک جزء ساختاری غالب غشای سلولی و میتوکندری و پیش‌ساز بیوسنتز استیل کولین انتقال‌دهنده عصبی است. کولین در چندین فرآیند در انسان نقش دارد، مانند متابولیسم لیپید و فسفولیپید<sup>۴۶</sup> تعدیل متیلاسیون و تنظیم توسعه مکانیسم‌های اپی‌ژنتیکی،<sup>۴۷</sup> به عنوان دهنده متیل عمل می‌کند<sup>۴۸</sup> و اصلاح سیگنال‌دهی سلولی که توسط متابولیت‌های فسفولیپید واسطه تسهیل می‌شود.<sup>۴۹</sup> مقدار زیادی از کولین مصرفی از مکمل‌های غذایی است.<sup>۵۰</sup> همچنین، کولین می‌تواند در سلول‌های پستانداران از طریق هیدرولیز فسفاتیدیل کولین<sup>x</sup> و

عمیقی از اختلال متابولیک PTC با استفاده از متابولومیک مبتنی بر <sup>1</sup>H-NMR ارزیابی کردیم. نتایج بررسی نشان داد که، سطوح گلوتامین کمتری در پلاسمای بیماران مبتلا به PTC در مقایسه با افراد سالم موجود است. علاوه بر این، غلظت اسید گلوتامیک در PTC نسبت به شاهد سالم به طور متوسط افزایش یافت. با این حال، این تغییرات قابل توجه نبود. مشابه مطالعه ما، ژائو<sup>i</sup> و همکاران (۲۰۱۵) افزایش اسید گلوتامیک در سطوح سرمی بیماران مبتلا به PTC را مشاهده کردند.<sup>۳۰</sup> در مقابل، وانگ<sup>ii</sup> و همکاران (۲۰۲۰) کاهش سطح اسید گلوتامیک در بیماران مبتلا به PTC را هنگام تجزیه و تحلیل نمونه‌های خون کامل گزارش کردند.<sup>۳۱</sup> این اختلاف به پیچیدگی پاسخ‌های متابولیک در PTC اشاره می‌کند و اهمیت زمینه زیست‌شناختی را در مطالعات متابولومیک نشان می‌دهد. گلوتامین یک آمینو اسید همه‌کاره و فراوان در پلاسماست و یک ماده مغذی ضروری برای بقا و رشد سلول‌های سرطانی در نظر گرفته می‌شود.<sup>۳۲،۳۳</sup> در مورد متابولیسم سرطان، گلوتامینولیز به عنوان یکی از ویژگی‌های مهم متابولیسم سرطان در نظر گرفته می‌شود که باعث تبدیل گلوتامین به گلوتمات<sup>iii</sup>، که برای حفظ عملکرد چرخه TCA و بقا و تکثیر سلول‌های تومور لازم است، می‌شود.<sup>۳۴،۳۵</sup> در واقع، انتقال‌دهنده اسید آمینه-۲ (ASCT2)<sup>iv</sup> جذب گلوتامین را تنظیم می‌کند و منجر به القای مسیر گلوتامینولیز می‌شود. در نتیجه، گلوتامین از طریق فعال‌سازی گلوتامیناز<sup>v</sup> (GLS) به گلوتمات تبدیل می‌شود. به دنبال آن، آلفا-کتوگلوتمارات<sup>vi</sup> از گلوتمات تشکیل و وارد چرخه کربس می‌شود.<sup>۳۶،۳۷</sup> علاوه بر این، گلوتمات می‌تواند به عنوان پیش ماده‌ای (سوبسترا) برای بیوسنتز گلوتماتینون، که با خاموش کردن گونه‌های اکسیژن فعال حاصل از تنفس میتوکندری نقش مهمی در تعادل ردوکس درون سلولی ایفا می‌کند، عمل کند.<sup>۳۸،۳۹</sup> از این رو، کاهش قابل توجه غلظت گلوتامین در پلاسمای بیماران مبتلا به PTC احتمالاً با فعالیت بالای فرآیند گلوتامینولیز و بیوسنتز گلوتماتینون مرتبط است. بنابراین ارتباط بین گلوتامین و تومورزایی تیروئید مورد انتظار است. به عبارت دیگر، کاهش گلوتامین باعث تومورزایی تیروئید و/یا شروع تومورزایی باعث کاهش گلوتامین می‌شود. این

i-Zhao

ii-Wang

iii-Glutamate

iv-Amino acid transporter-2

v-Glutaminase

vi- $\alpha$ -ketoglutarate

vii-Succinate Dehydrogenase

viii-Fumarate

ix-Oncometabolite

x-Phosphatidylcholine

مطالعه، از جمله مطالعات ویوتوویچ<sup>v</sup> و مِتر<sup>vi</sup> و همکاران<sup>vii</sup> افزایش سطح لاکتات را در نمونه‌های سرم و بافت بیماران مبتلا به PTC گزارش کرد که اهمیت لاکتات را به عنوان یک نشانگر زیستی بالقوه برای PTC نشان می‌دهد. علاوه بر این، نتایج مطالعه‌ای توسط سئو<sup>viii</sup> و همکاران؛ استفاده از لاکتات را به عنوان یک نشانگر زیستی برای پیش‌بینی متاستاز غدد لنفاوی در PTC برجسته کردند.<sup>ix</sup> لو<sup>x</sup> و همکاران و لی<sup>xi</sup> و همکاران،<sup>xii</sup> نشان دادند که سطوح اسیدهای آمینه مختلف از جمله فنیل آلانین، تیروزین و آمینو اسیدهای شاخه دار (لوسین، ایزولوسین و والین) در بیماران مبتلا به PTC افزایش یافته است. مطالعات بیشتر، اسیدهای آمینه مانند تیروزین، آلانین و گلیسین را به عنوان تمایز دهنده بین ضایعات بدخیم و خوش‌خیم تیروئید و بین بیماران مبتلا به PTC و افراد سالم شناسایی کردند.<sup>xiii</sup> تحقیقات انجام شده توسط لو و همکاران در زمینه اختلالات متابولیسم لیپید نشان می‌دهد که تغییرات در ترکیبات اسیدهای چرب اشباع و غیراشباع موجود در ضایعات تیروئید، می‌تواند نشان‌دهنده اختلال در متابولیسم لیپید در بیماری PTC باشد.<sup>xiv</sup> نیم‌رخ‌های متابولیسی نمونه‌های سرم/پلازما و بافت، بینش‌های تکمیلی را در مورد برنامه‌ریزی مجدد متابولیک PTC ارائه می‌دهد. در حالی‌که نمونه‌های بافت شواهد مستقیمی از تغییرات متابولیک در ریزمحیط تومور ارائه می‌دهند، متابولومیک سرم/پلازما می‌تواند ابزاری غیرتهاجمی برای تشخیص و پایش PTC باشد. در سراسر مطالعات، تغییرات متابولیک رایج؛ شامل افزایش گلیکولیز (که با افزایش سطح لاکتات مشهود است)، تغییرات متابولیسم اسید آمینه، و متابولیسم کولین است. با این وجود، غیرقابل انکار است که ما نیاز به جمع‌آوری اطلاعات گسترده‌تری در مورد نشانگرهای متابولیک داریم و تحقیقات بیشتری باید در مورد PTC انجام شود.

در حالی‌که مطالعه ما بینش‌های ارزشمندی را در مورد پتانسیل تشخیصی رویکردهای متابولومیک با استفاده از <sup>1</sup>H-NMR در زمینه PTC ارائه می‌دهد، ضروری است که محدودیت‌های خاصی را که در تحقیقات ما ذاتی است، بشناسیم. اولاً، ذکر این نکته ضروری است که حجم نمونه در

گلیسروفسفوکولین<sup>i</sup> توسط فسفولیپاز<sup>ii</sup> D و گلیسروفسفودی استراز<sup>iii</sup> تشکیل شود.<sup>1</sup> شواهد زیادی وجود دارد که نشان می‌دهد مصرف یا وضعیت کولین بیشتر در پلازما و رده‌های سلولی خطر ابتلا به سرطان را افزایش می‌دهد.<sup>2,3</sup> در واقع، نیازهای بالاتر کولین در سلول‌های سرطانی با افزایش فعالیت‌های انتقال کولین و افزایش تخریب فسفاتیدیل کولین توسط فسفولیپاز D پشتیبانی می‌شود<sup>4,5</sup> که می‌تواند باعث تکثیر و مهاجرت تومور شود. بر اساس یافته‌های ما، بنابراین این احتمال وجود دارد که چنین ارتباطی بین سطوح بالا کولین و تومورزایی تیروئید وجود داشته باشد که در آن تجمع کولین ممکن است باعث افزایش رشد و تکثیر سلول‌های تومور شود.

در مرور نظام‌مند مقالات موجود در مطالعه به دست آمد که وضعیت متابولیت‌ها را در بیماران مبتلا به PTC، با استفاده از متابولومیک مبتنی بر <sup>1</sup>H-NMR در طی ده سال بررسی کرده و تنوع در انواع نمونه و مسیرهای متابولیسی دخیل در بیماری‌زایی PTC را برجسته کرده بودند (جدول ۳).

تحقیقات مربوط به متابولومیک PTC شامل مطالعاتی بر پایه تفاوت در نوع نمونه بود. در این میان، سه مطالعه تنها بر روی نمونه‌های بافتی صورت گرفته بود،<sup>۱۷,۱۶,۱۷</sup> چهار مطالعه به بررسی نمونه‌های سرم یا پلازما پرداخته بودند.<sup>۲۰,۴۴,۵۸,۵۹</sup> یک مطالعه بر روی نمونه‌های FNA متمرکز بود،<sup>۶۰</sup> یک مطالعه بر روی نمونه‌های سرم/ادرار<sup>۶۱</sup> و یک مطالعه روی پلازما/بافت انجام شده بود.<sup>۱۵</sup> این تمایز بسیار مهم است زیرا اطلاعاتی درباره نمونه‌های زیستی مختلف ارائه می‌دهد. داده‌های متابولومیک با استفاده از ابزارهای آماری و بیوانفورماتیکی، از جمله CAP، PLS-DA و OPLS-DA، همراه با تجزیه و تحلیل مسیر با استفاده از پایگاه‌های داده مانند دایره‌المعارف ژن‌ها و ژنوم کیوتو<sup>iv</sup> و پایگاه داده‌های متابولوم انسانی تفسیر شدند. مطالعه‌ای توسط ریو و همکاران، از طریق تجزیه و تحلیل NMR نمونه‌های FNA، متابولیت‌هایی مانند لاکتات و کولین را شناسایی کرد که در ضایعات بدخیم در مقایسه با نمونه‌های خوش‌خیم به‌طور قابل توجهی افزایش یافته بودند و نشان‌دهنده پتانسیل آن‌ها به عنوان نشانگرهای زیستی برای PTC است.<sup>۶۰</sup> چندین

v-Wojtowicz  
vi-Metere  
vii-Seo  
viii-Lu  
ix-Li

i-Glycerophosphocholine  
ii-Phospholipase D  
iii-Glycerophosphodiesterase  
iv-Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes

متابولیکی را آشکار می‌کند که ممکن است تنها از طریق تجزیه و تحلیل پلاسما قابل تشخیص نباشند، بنابراین درک ما از چشم‌انداز متابولیک در PTC را غنی‌تر می‌کند. علاوه بر این، مهم است که پتانسیل سوگیری‌های جمع‌آوری نمونه را برای تأثیرگذاری بر یافته‌های ما در نظر بگیریم. به عنوان مثال، عادات غذایی و انتخاب سبک زندگی شرکت‌کنندگان ممکن است بر نیم‌رخ متابولیک آن‌ها تأثیر گذاشته باشد. مطالعات آینده باید این عوامل را به دقت در نظر بگیرند و پروتکل‌های استاندارد جمع‌آوری نمونه را برای به حداقل رساندن سوگیری‌ها پیاده‌سازی کنند.

مطالعه ما نسبتاً متوسط بود. اعتبارسنجی بیشتر در گروه‌های بزرگتر برای ایجاد قابلیت اطمینان و استحکام تغییرات متابولیک مشاهده شده ضروری است. ثانیاً، مطالعه ما عمدتاً بر روی نیم‌رخ متابولیکی نمونه‌های پلاسما متمرکز بود. در حالی‌که پلاسما یک سیال زیستی به راحتی در دسترس و پر استفاده برای مطالعات متابولیک است، مهم است که توجه داشته باشیم که ممکن است به طور کامل چشم‌انداز متابولیک بافت‌های PTC را منعکس نکند. گسترش تحقیقات ما به انواع نمونه‌های دیگر، مانند نمونه‌های بافتی و ادرار، به درک جامع‌تری از اختلالات متابولیک مرتبط با PTC کمک می‌کند. این تحقیقات گسترده‌تر به طور بالقوه نشانه‌های

### جدول ۳- خلاصه مطالعات متابولیک مبتنی بر NMR در PTC

مرجع	اختلالات متابولیت	روش‌شناسی‌ها	اندازه گروه	نوع نمونه‌ها	
(۳۰)	والین، لوسین، ایزولوسین، لاکتات، آلانین، اسید گلوتامیک، لیزین، آرژنین و گلیسین	$^1\text{H-NMR}$ ۵۰۰ مگاهرتز	PTC در مقابل سالم (n=۲۰)	PTC (سرم)	
	لیپیدها، کولین و تیروزین				PTC در مقابل خوش‌خیم (n=۲۰)
	والین، لوسین، ایزولوسین، لوسین اسید لاکتیک، آلانین، اسید گلوتامیک، تری متیل گلیسین، تیروزین و فنیل آلانین				
	لیپید و لیزین				
(۱۵)	فنیل آلانین، تیروزین، لاکتات، سرین، سیستین، لیزین، گلوتامین/گلوتامات، تورین، لوسین، آلانین، ایزولوسین، والین	$^1\text{H-NMR HRMAS}$ (۶۰۰ مگاهرتز بافت)	سالم (n=۱۱) PTMC (n=۱۶)	PTMC (پلاسما/بافت)	
	اسیدهای چرب اشباع و غیر اشباع				
	گلوکز، مانوز، پیروات و ۳-هیدروکسی بوتیرات، والین، تیروزین، پرولین، لیزین، لوسین				$^1\text{H-NMR HRMAS}$ (۶۰۰ مگاهرتز پلاسما)
(۶۰)	لاکتات، کولین، O-Phosphocholine و گلیسین	$^1\text{H-NMR}$ ۷۰۰/۱۹۳ مگاهرتز	PTC (n=۲۵) BTN (n=۶۹)	PTC (FNA)	
	سیترات، گلوتامین و گلوتامات				
(۶۱)	والین، آلانین، کراتین و تیروزین	$^1\text{H-NMR}$ ۶۰۰/۵۸ مگاهرتز (سرم)	PTC در مقابل سالم در مقابل NN در مقابل FA PTC (n=۱۷) سالم (n=۱۷)	PTC (سرم/ادرار)	
	والین و لاکتات				
	لاکتات				
	سیترات و استون	$^1\text{H-NMR}$ ۶۰۰/۵۸ مگاهرتز (ادرار)			
(۵۶)	تورین، گلیسین، اتانول آمین، کولین، گلیسروفسفوکولین، لاکتات، والین، لوسین، LDL، VLDL	$^1\text{H-NMR}$ ۴۰۰ مگاهرتز		PTC (بافت)	
	سیترات				
(۱۷)	لاکتات	$^1\text{H-NMR}$ ۷۰۰/۴۰ مگاهرتز	PTC (۵۲) LNM مرکزی (n=۳۲) LNM جانبی (n=۱۹)	LNM یا PTC (بافت)	
	میو اینوزیتول				

## ادامه جدول ۳-

(۴۴)	تریپتوفان، هیپوتورین، سیترات، کولین، هیپورات، متیونین، سیلا-اینوزیتول، استیل-کارنیتین، گلاتاتینون، تیروزین و ایزولوسین	<sup>1</sup> H-NMR ۴۰۰ مگاهرتز	PTC (n=۱۶) سالم (n=۱۶)	PTC (n=۱۷) MNG (n=۱۷) سالم (n=۲۰)	PTC (سرم)
	کینورنن		در مقابل PTC MNG		
	کینورنن، اسید نیکوتینیک، هیپورات و گزانتین، سیترات، استیل کارنیتین، گلاتامین، هموسرین، تریپتوفان، تیروزین، بتا آلانین و گلاتاتینون.				
(۵۷)	لاکتات و فنیل آلانین	<sup>1</sup> H-NMR ۴۰۰ مگاهرتز	PTC (n=۱۱) سالم (n=۱۰)	PTC (بافت)	
	سیترات، میو اینوزیتول و ترئونین				
(۵۸)	اسید ایزوبوتیریک، پرولین، ۱-متیل هیستیدین، کراتین، گلوکز، اورنیتین و ایزوپروپیل الکل	<sup>1</sup> H-NMR ۶۰۰/۸ مگاهرتز	PTC (n=۸۰) سالم (n=۴۷)	PTC (خون)	
	تیروزین، لاکتات، لیزین، اسید استیک، آرژنین، اسید گلاتامیک، متیونین، اسید هیدروکسی بوتیریک، آسپارات، تیروزین، استواسات، ترئونین، هیستیدین، هیپوگزانترین و فرمت				
(۵۹)	لوسین، آلانین، لیزین، استات و کولین	<sup>1</sup> H-NMR ۵۰۰ مگاهرتز	PTC (n=۴۱) BTN (n=۵۵) سالم (n=۴۰)	PTC (سرم)	
	گلوکز		در مقابل PTC BTN		
	لوسین، لاکتات، آلانین، گلیسین، استات، لیزین و کولین		در مقابل PTC سالم		
	گلوکز				

PTC: کارسینوم پاپیلاری تیروئید، FA: آدنوم فولیکولی، MNG: گواتر چند ندولار، NN: غیر نئوپلاستیک، PTMC: سرطان تیروئید میکروپاپیلاری، LNM: متاستاز غدد لنفاوی، NMR: رزونانس مغناطیسی هسته‌ای

## نتیجه‌گیری

ارائه می‌کند، که سرخ‌هایی از نیازهای متابولیکی تومور و آسیب‌پذیری‌های بالقوه ارائه می‌دهد. متابولومیک‌های مبتنی بر FNA پلی میان این دو می‌زنند و وسیله‌ای کمتر تهاجمی برای ارزیابی مستقیم نیمرخ متابولیک تومور ارائه می‌دهد. ادغام داده‌های متابولومیک با دیگر رویکردهای «امیکس»؛ مانند ژنومیکس و پروتئومیکس، می‌تواند درک جامع‌تری از پاتوژنز PTC ارائه دهد و به طور بالقوه اهداف درمانی را شناسایی کند. علاوه بر این، انتقال این یافته‌های متابولومیک به عمل بالینی از طریق توسعه پانل‌های تشخیصی استاندارد و گنجاندن آن‌ها در برنامه‌های غربالگری معمول، یک راه امیدوارکننده برای افزایش تشخیص زودهنگام و در نهایت بهبود نتایج بیمار در زمینه PTC است.

سپاس‌گزاری: از خانم دکتر عادلہ رضوی بابت جمع‌آوری نمونه تشکر می‌نماییم. نویسندگان صمیمانه از تمام بیمارانی که در این مطالعه شرکت کردند تشکر می‌کنند و برای آن‌ها آرزوی بهبودی سریع دارند.

منابع مالی: این تحقیق هیچ بودجه خارجی دریافت نکرد. بیانیه هیئت بررسی نهادی: این مطالعه بر اساس اعلامیه هلسینکی انجام شد و به تایید هیئت بازبینی نهادی و کمیته اخلاق پژوهشگاه علوم غدد درون‌ریز دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران (IR.SBMU.ENDOCRINE.REC. ۱۳۹۷/۱۲۴) رسید.

به طور خلاصه، پلت فرم متابولومیک مبتنی بر <sup>1</sup>H-NMR از الگوهای متفاوت بازآرایی متابولیکی در بیماران مبتلا به PTC پرده برداری کرده است. این الگوها نشان‌دهنده اختلالات بارزی را در مسیرهای متابولیکی کلیدی، از جمله متابولیسم گلاتامین، متابولیسم غیرطبیعی اسید سوکسینیک (واسطه چرخه TCA) و تغییرات در متابولیسم کولین هستند، همان‌طور که در شکل ۴ نشان داده شده است. بر اساس مطالعه ما، تحقیقات آینده باید اعتبار و کاربرد بالینی متابولیت‌های شناسایی شده، به ویژه گلاتامین، کولین و اسید سوکسینیک را به عنوان نشانگرهای زیستی بالقوه برای PTC بررسی کنند. مطالعات هدفمند می‌تواند تغییرات پویای متابولیت‌های موثر در توسعه و پیشرفت PTC را شناسایی کرده و کاربرد آن‌ها را در نظارت بر تکامل بیماری توضیح دهد. با مقایسه انواع نمونه در جستجوی نظام‌مند، هر نمونه زیستی بینش منحصر به فردی را در مورد تغییرات متابولیک مرتبط با PTC ارائه می‌دهد. متابولومیک پلاسما/سرم تغییرات سیستمیک را منعکس می‌کند و می‌تواند نشانگرهای زیستی را نشان دهد که به راحتی برای غربالگری و نظارت غیرتهاجمی قابل دسترسی هستند. در مقابل، متابولومیک بافت، نقشه دقیقی از تغییرات متابولیک در ریزمحیط تومور

بیانیه رضایت آگاهانه: رضایت آگاهانه از همه افراد درگیر در مطالعه اخذ شد.

بیانیه در دسترس بودن داده‌ها: تمامی داده‌های تولید شده یا تجزیه و تحلیل شده در این مطالعه در این مقاله و فایل‌های اطلاعات تکمیلی آن گنجانده شده است.

بیانیه رضایت آگاهانه: رضایت آگاهانه از همه افراد درگیر در مطالعه اخذ شد.

## References

1. Aschebrook-Kilfoy B, Schechter R.B, Shih Y-C.T, Kaplan E. L, Chiu B. C-H, Angelos P, et al. The Clinical and Economic Burden of a Sustained Increase in Thyroid Cancer Incidence. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2013; 22: 1252-9.
2. LiVolsi V.A, Papillary thyroid carcinoma: an update. *Modern Pathology* 2011; 24: S1-S9.
3. Baloch Z. W, LiVolsi V. A, Asa S. L, Rosai J, Merino M. J, Randolph G. W, et al. Diagnostic terminology and morphologic criteria for cytologic diagnosis of thyroid lesions: a synopsis of the National Cancer Institute Thyroid Fine-Needle Aspiration State of the Science Conference. *Diagnostic Cytopathology* 2008; 36: 425-437
4. Ho A.S, Sarti E.E, Jain K.S, Wang H, Nixon I.J, SH-AHA A.R, et al. Malignancy rate in thyroid nodules classified as Bethesda category III (AUS/FLUS). *Thyroid*, 2014; 24: 832-9.
5. Bongiovanni M, Spitale A, Faquin W.C, Mazzucchelli L, Baloch Z.W. The Bethesda system for reporting thyroid cytopathology: a meta-analysis. *Acta cytologica* 2012; 56: 333-9.
6. Zarkesh M, Zadeh-Vakili A, Azizi F, Fanaei S.A, Foroughi F, Hedayati M. The association of BRAF V600E mutation with tissue inhibitor of metalloproteinase-3 expression and clinicopathological features in papillary thyroid cancer. *Int J Endocrinol Metab* 2018; 16: e56120.
7. Claudino W.M, Goncalves P.H, Di leo A, Philip P.A, Sarkar F.H. Metabolomics in cancer: a bench-to-bedside intersection. *Crit Rev Oncol Hematol* 2012; 84: 1-7.
8. Nicholson J.K, Lindon J.C, Holmes E. 'Metabonomics': understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. *Xenobiotica* 1999; 29: 1181-9.
9. Abooshahab R, Ardalani H, Zarkesh M, Hooshmand K, Bakhshi A, Dass C.R, et al. Metabolomics—a tool to find metabolism of endocrine cancer. *Metabolites* 2022; 12: 1154.
10. Emwas A-H, Salek R.M, Griffin J.L, Merzaban J. NMR-based metabolomics in human disease diagnosis: applications, limitations, and recommendations. *Metabolomics* 2013; 9: 1048-72.
11. Tian Y, Nie X, Xu Sh, Li Y, Huang T, Tang H, et al. Integrative metabonomics as potential method for diagnosis of thyroid malignancy. *Sci Rep* 2015; 5: 14869.
12. Hellmann A, Turyn J, Zwara A, Korczynska J, Taciak A, Mika A. Alterations in the amino acid profile in patients with papillary thyroid carcinoma with and without Hashimoto's thyroiditis. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2023; 14: 1199291.
13. Jajin M.G, Abooshahab R, Hooshmand K, Moradi A, Siyadat S.AD, Mirzazadeh R. et al. Gas chromatography-mass spectrometry-based untargeted metabolomics reveals metabolic perturbations in medullary thyroid carcinoma. *Sci Rep* 2022; 12: 8397.
14. Ryoo I, Kwon H, Kim S.Ch, Jung S.Ch, Yeom J.A, Shin H.S, et al. Metabolomic analysis of percutaneous fine-needle aspiration specimens of thyroid nodules: Potential application for the preoperative diagnosis of thyroid cancer. *Sci Rep* 2016; 6: 1-9.
15. Lu J, Hu S, Miccoli P, Zend Q, Liu Sh, Ran L, et al. Non-invasive diagnosis of papillary thyroid microcarcinoma: a NMR-based metabolomics approach. *Oncotarget* 2016; 7: 81768.
16. Wojtowicz W, Zabek A, Deja S, Dawiskiba T, Pawelka D, Glod M, et al. Serum and urine <sup>1</sup>H NMR-based metabolomics in the diagnosis of selected thyroid diseases. *Sci Rep* 2017; 7: 1-13.
17. Seo J.W, Kyunghwa H, Lee J, Kim E.K, Moon H.J, Yoon J.H, et al. Application of metabolomics in prediction of lymph node metastasis in papillary thyroid carcinoma. *PLoS One* 2018; 13: e0193883.
18. Du Y, Fan P, Zou L, Jiang Y, Gu X, Yu J, et al. Serum metabolomics study of papillary thyroid carcinoma based on HPLC-Q-TOF-MS/MS. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 2021; 9: 593510.
19. Yu S, Liu Ch, Hou Y, Li J, Guo Zh, Chen X, et al. Integrative metabolomic characterization identifies plasma metabolomic signature in the diagnosis of papillary thyroid cancer. *Oncogene* 2022; 41: 2422-2430.
20. Abooshahab R, Hooshmand K, Razavi S.A, Gholami M, Sanoie M, Hedayati M. Plasma metabolic profiling of human thyroid nodules by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)-based untargeted metabolomics. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 2020; 8: 385.
21. Amin M.B, Greene F.L, Edge S.B, Compton C.C, Gershengwald J.E, Brookland R.K, et al. The eighth edition AJCC cancer staging manual: continuing to build a bridge from a population-based to a more "personalized" approach to cancer staging. *CA Cancer J Clin* 2017; 67: 93-9.
22. Ravanbakhsh S, Liu Ph, Bjordahi T.C, Mandal R, Grant J.R, Wilson M, et al. Accurate, fully-automated NMR spectral profiling for metabolomics. *PloS One* 2015; 10: e0124219.
23. Wishart D.S, Feunang Y.D, Marcu A, Guo A.Ch, Liang K, Vazquez-Fresno R, et al. HMDB 0/4: the human metabolome database for 2018. *Nucleic Acids Res* 2018; 46(D1): D608-D617.
24. Du Z, Shen A, Huang Y, Su L, Lai W, Wang P, et al. <sup>1</sup>H-NMR-based metabolic analysis of human serum reveals novel markers of myocardial energy expenditure in heart failure patients. *PloS One* 2014; 9: e88102.
25. McKnight T.R, Yoshihara H.A.I, Sitole L.J, Martin J.N, Steffens F, Meyer D. A combined chemometric and quantitative NMR analysis of HIV/AIDS serum discloses metabolic alterations associated with disease status. *Molecular BioSystems* 2014; 10: 2889-97.
26. Team R.C. R. A language and environment for statistical computing. 2013, Vienna, Austria.
27. Eszlinger M, Krogdahl A, Munz S, Rehfeld Ch, Jensen E.M.P, Ferraz C, et al. Impact of molecular screening for point mutations and rearrangements in routine air-dried fine-needle aspiration samples of thyroid nodules. *Thyroid* 2014; 24: 305-13.
28. Yu S, Liu Y, Wang J, Guo Zh, Zhang Q, Yu F, et al. Circulating microRNA profiles as potential biomarkers for diagnosis of papillary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 2012; 97: 2084-92.



29. Fischer S, Asa S.L. Application of immunohistochemistry to thyroid neoplasms. *Arch Pathol Lab Med* 2008; 132: 359-72.
30. Zhao W-X, Wang Bo, Zhang L.Y, Yan Sh.Y, Yang Y.H. Analysis on the metabolite composition of serum samples from patients with papillary thyroid carcinoma using nuclear magnetic resonance. *Int J Clin Exp Med* 2015; 8: 18013.
31. Wang T, Sun Zh, Wang Y, Li F, Zhou X, Tian X, et al. Diagnosis of papillary thyroid carcinoma by (1)H NMR spectroscopy-based metabolomic analysis of whole blood. *Drug Discov Ther* 2020; 14: 187-96.
32. Hensley C.T, Wasti A.T, DeBerardinis R.J. Glutamine and cancer: cell biology, physiology, and clinical opportunities. *J Clin Invest* 2013; 123: 3678-84.
33. Abooshahab R, Hooshmand K, Razavi F, Dass C.R, Hedayati M. A glance at the actual role of glutamine metabolism in thyroid tumorigenesis. *EXCLI journal* 2021; 20: 1170.
34. Mullen A.R, Wheaton W.W, Jin E.S, Chen P.H, Sullivan L.B, Cheng T, et al. Reductive carboxylation supports growth in tumour cells with defective mitochondria. *Nature* 2012; 481: 385-8.
35. Abooshahab R, Gholami M, Sanoie M, Azizi F, Hedayati M. Advances in metabolomics of thyroid cancer diagnosis and metabolic regulation. *Endocrine* 2019; 1-14.
36. Collins C.L, Wasa M, Souba W.W, Abcouwer S.F. Regulation of glutamine synthetase in human breast carcinoma cells and experimental tumors. *Surgery* 1997; 122: 451-64.
37. Friday E, Oliver 3rd R, Welbourne T, Turturro F. Glutaminolysis and glycolysis regulation by troglitazone in breast cancer cells: Relationship to mitochondrial membrane potential. *J Cell Physiol* 2011; 226: 511-9.
38. Bansal A, Simon M.C. Glutathione metabolism in cancer progression and treatment resistance. *Journal of Cell Biology* 2018; 217: 2291-8.
39. Treter L, Patocs A, Chinopoulos C. Succinate, an intermediate in metabolism, signal transduction, ROS, hypoxia, and tumorigenesis. *Biochim Biophys Acta* 2016; 1857: 1086-101.
40. Astuti D, Latif F, Dahia P.L, Douglas F, George E, Skoldberg F, et al. Gene mutations in the succinate dehydrogenase subunit SDHB cause susceptibility to familial pheochromocytoma and to familial paraganglioma. *Am J Hum Genet* 2001; 69: 49-54.
41. Neumann H.P, Pawlu Ch, Peczkowska M, Bausch B, McWhinney S.R, Muressan M, et al. Distinct clinical features of paraganglioma syndromes associated with SDHB and SDHD gene mutations. *JAMA* 2004; 292: 943-51.
42. Ricketts C.J, Forman J.R, Rattenberry E, Bradshaw N, Lalloo F, Izatt L, et al. Tumor risks and genotype-phenotype-proteotype analysis in 358 patients with germline mutations in SDHB and SDHD. *Human Mutat* 2010; 31: 41-51.
43. Zantour B, Guilhaume B, Tissier F, Louvel A, Jeune maitre X, Gimenez-Roqueplo A.P, et al. A thyroid nodule revealing a paraganglioma in a patient with a new germline mutation in the succinate dehydrogenase B gene. *Eur J Endocrinol* 2004; 151: 433-8.
44. Yekta R.F, Tavirani M.R, Oskouie A.A, Mohajeri-The rani M.R, Soroush A.R, Baghban A.A. Serum-based metabolic alterations in patients with papillary thyroid carcinoma unveiled by non-targeted 1H-NMR metabolomics approach. *Iran J Basic Med Sci* 2018; 21: 1140-7.
45. Zhou Q, Zhang L.Y, Xie Ch, Zhang M.L, Wang Y.J, Liu G.H. Metabolomics as a potential method for predicting thyroid malignancy in children and adolescents. *Pediatr Surg Int* 2020; 36: 145-53.
46. Zeisel S.H. Choline: critical role during fetal development and dietary requirements in adults. *Annu Rev Nutr* 2006; 26: 229-50.
47. Mehedint M.G, Niculescu M.D, Craciunescu C.N, Zeisel S.H. Choline deficiency alters global histone methylation and epigenetic marking at the Rel site of the calbindin 1 gene. *FASEB J* 2010; 24: 184-95.
48. Niculescu M.D, Yamamuro Y, Zeisel S.H. Choline availability modulates human neuroblastoma cell proliferation and alters the methylation of the promoter region of the cyclin-dependent kinase inhibitor 3 gene. *J Neurochem* 2004; 89: 1252-9.
49. Lee J.M, Lee Y.K, Mamrosh J.L, Busby S.A, Griffin P.R, Pathak M.C, et al. A nuclear-receptor-dependent phosphatidylcholine pathway with antidiabetic effects. *Nature* 2011; 474: 506-10.
50. Pitkin R.M, Allen L.H, Bailey L.B, Bernfield M, Wals Ph,d, Green R, et al. Dietary Reference Intakes for Thiamin, riboflavin, niacin, vitamin B6, folate, vitamin B12, Pantothenic acid, biotin and choline. Washington, DC, 2000.
51. Fagone P, Jackowski S. Phosphatidylcholine and the CDP-choline cycle. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1831: 523-32.
52. Johansson M, Guelpen B.V, Vollset S.E, Hultdin J, Bergh A, Key T, et al. One-carbon metabolism and prostate cancer risk: prospective investigation of seven circulating B vitamins and metabolites. *Cancer Epidemiol Biomarker Prev* 2009; 18: 1538-43.
53. Ackerstaff E, Pflug B.R, Nelson J.B, Bhujwala Z.M. Detection of increased choline compounds with proton nuclear magnetic resonance spectroscopy subsequent to malignant transformation of human prostatic epithelial cells. *Cancer Research* 2001; 61: 3599-603.
54. Huang C, Freter C. Lipid metabolism, apoptosis and cancer therapy. *Int J Mol Sci* 2015; 16: 924-49.
55. Glunde K, Bhujwala Z.M, Ronen S.M. Choline metabolism in malignant transformation. *Nat Rev Cancer* 2011; 11: 835-48.
56. Li Y, Chen M, Liu C, Xia Y, Xu B, Hu Y, et al. Metabolic changes associated with papillary thyroid carcinoma: A nuclear magnetic resonance-based metabolomics study. *International Journal of Molecular Medicine* 2018; 41: 3006-14.
57. Metere A, Graves C.E, Chirico M, Caramujo M.J, Pisano M.E, Iorio E. Metabolomic reprogramming detected by 1H-NMR spectroscopy in human thyroid cancer tissues. *Biology* 2020; 9: 112.
58. Wang T, Sun Zh, Wang Y, Li F, Zhou X, Tian X, et al. Diagnosis of papillary thyroid carcinoma by 1H NMR spectroscopy-based metabolomic analysis of whole blood. *Drug Discoveries & Therapeutics* 2020; 14: 187-96.
59. Zhou Q, Zhang L.Y, Chao X, Zhang M.L, Wang Y.J, Liu G.H. Metabolomics as a potential method for predicting thyroid malignancy in children and adolescents. *Pediatric Surgery International* 2020; 36: 145-53.
60. Ryoo I, kwon H, Kim S.Ch, Jung S.Ch, Yeom J.A, Shin H.S, et al. Metabolomic analysis of percutaneous fine-needle aspiration specimens of thyroid nodules: Potential application for the preoperative diagnosis of thyroid cancer. *Sci Rep* 2016; 6: 30075.
61. Wojtowicz W, Zabek A, Deja S, Dawiskiba T, Pawelka D, Glod M, et al. Serum and urine 1H NMR-based metabolomics in the diagnosis of selected thyroid diseases. *Sci Rep* 2017; 7: 9108.

## Original Article

# Plasma Metabolomic Biomarkers in Papillary Thyroid Carcinoma: a Case-control Study and Systematic Comparison

Abooshahab R<sup>1</sup>, Pakizehkar S<sup>2</sup>, Hosseinzadeh S<sup>2</sup>, Hoghooghi Rad L<sup>2</sup>, Golab Ghadaksaz H<sup>2</sup>, Hedayati M<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Curtin Medical School, Curtin University, Bentley, Australia. <sup>2</sup>Cellular and Molecular Endocrine Research Center, Research Institute for Endocrine Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, I.R. Iran.

e-mail: [hedayati@endocrine.ac.ir](mailto:hedayati@endocrine.ac.ir)

Received: 05/05/2024 Accepted: 02/11/2024

### Abstract

**Introduction:** Papillary thyroid carcinoma (PTC) is becoming the fastest-growing thyroid cancer type worldwide. Therefore, finding effective biomarkers for early screening of PTC is urgent. In this study, we aimed to investigate circulating PTC metabolites in plasma samples using an untargeted NMR-based metabolomics approach. A systematic literature review was also conducted to compare our results with studies regarding PTC metabolic perturbation using NMR-based metabolomics. **Materials and Methods:** Proton nuclear magnetic resonance (<sup>1</sup>H-NMR) was used to assess the major metabolic alterations in plasma samples from PTC patients concerning healthy subjects. Multivariate and univariate analyses revealed the significantly altered metabolites, including orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA), enrichment and pathway analyses, and student t-tests. Besides, a literature search with publication dates from 2014 to 2024 was conducted. After removing duplicates, unrelated articles, and reviews, ten studies met the eligibility criteria. **Results:** Univariate and multivariate statistical analysis indicated that three metabolites, glutamine, choline, and succinic acid, significantly differed between PTC and healthy groups. The reduction in glutamine plasma levels was likely related to the high risk of PTC tumorigenesis (Odds ratio 0.90; 95% CI 0.83–0.97; P=0.011). Receiving operating characteristic (ROC) curve analysis corroborated this, which indicated that glutamine could discriminate PTC from healthy subjects (area under ROC curve value, AUC=0.98). **Conclusion:** This study demonstrated that the NMR-based metabolomics profiling approach has the potential to provide considerable insight into the identification of diagnostic biomarkers for the early detection of PTC patients.

**Keywords:** Biomarkers, <sup>1</sup>H-NMR, Metabolomics, Metabolites, Metabolic reprogramming, Papillary thyroid cancer