مجله‌ی غدد درون‌ریز و متابولیسم ایران
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی شهید بهشتی
دوره‌ی بیست و پنجم، شماره‌ی ۲، صفحه‌های ۱۸۴ ـ ۱۷۴ (خرداد ـ تیر ۱۴۰۲)

مقاله‌ی مروری

کاربرد نشانگرهای توموری در گردش در سرطان مدولاری تیروئید با تشخیص مولکولی و رویکرد درمانی

خدیجه سعیدی[۱]، منیره موحدی[۲]، دکتر مریم السادات دانشپور[۳]، دکتر مهدی هدایتی[۳]

۱) گروه بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران. ۲) گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، تهران، ایران. ۳) مرکز تحقیقات غدد سلولی و مولکولی، پژوهشکده علوم غدد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران، **نشانی مکاتبه با نویسنده مسئول:** تهران، ولنجک، خیابان یمن، خیابان شهید اعرابی، پلاک ۲۳، پژوهشکده علوم غدد درون‌ریز و متابولیسم، دکتر مهدی هدایتی؛
e-mail: hedayati47@gmail.com
e-mail: hedayati@endocrine.ac.ir

چکیده

مقدمه: سرطان مدولاری تیروئید **(MTC)** یک نوع نادر و تهاجمی از انواع سرطان تیروئید است که تشخیص و درمان دقیق و سریع و زودهنگام آن به‌عنوان یک چالش بزرگ در حوزه پزشکی مطرح می‌شود. به تازگی استفاده از نشانگرهای توموری در گردش، به‌عنوان یک روش نوین نمونه‌برداری مایع که می‌تواند تشخیص، پیش‌بینی و پایش دقیق‌تری از توسعه سرطان فراهم کند، مورد توجه قرار گرفته است. این مقاله مروری تلاش دارد تا به تحلیل و بررسی ویژگی‌ها و زیست‌شناسی سلول‌های توموری در گردش **(CTCs)** و نیز تشخیص **DNA** توموری در گردش **(ctDNA)** در **MTC** بپردازد. از جمله هدف‌های اصلی این مطالعه، شناخت نقش این نشانگرها در تشخیص دقیق‌تر، پیش‌بینی موثرتر و نیز ارائه مبانی بهتر برای رویکردهای درمانی در این نوع سرطان است. از آنجا که **CTCs** و **ctDNA** می‌توانند تغییرات مولکولی و ژنتیکی در تومورها را به‌صورت غیرتهاجمی نمایان کنند، این اطلاعات قابلیت بهبود تشخیص زودرس و تداخل دقیق‌تر در توسعه بیماری را دارند. به‌علاوه، استفاده از این نشانگرها با کمک به ابداع و پیشرفت روش‌های جدید در تشخیص و درمان سرطان **MTC** می‌تواند منجر به تحقق نیازهای بالینی شود. این پیشرفت‌ها احتمالاً تأثیر بالقوه‌ای بر کارآیی تشخیصی و مداخله درمانی خواهند داشت و در نهایت به نتایج موثرتری در بهبود بیماران مبتلا به این بیماری می‌انجامند.

واژگان کلیدی: نمونه‌برداری مایع، MTC، ctDNA، CTC

دریافت مقاله: ۱۴۰۲/۲/۶ـ دریافت اصلاحیه: ۱۴۰۲/۶/۲۶ ـ پذیرش مقاله: ۱۴۰۲/۷/۹

۱. مقدمه

سرطان تیروئید[i] (TC) شایع‌ترین سرطان غدد درون‌ریز است که در سال‌های گذشته به‌ویژه در بزرگسالان جوان افزایش چشمگیری داشته است. تخمین زده می‌شود که تا سال ۲۰۱۹، سرطان تیروئید سومین نوع شایع سرطان در زنان باشد. در سراسر جهان، بدلیل رواج غربالگری، تغییرات محیطی و سبک زندگی، میزان بروز آن در افراد بالای ۳۰ سال؛ نسبت به گذشته سه برابر شده است. تعداد زیادی از مبتلایان به سرطان تیروئید دارای تومورهای متمایز[ii] (DTC)، تومورهایی با تمایز ضعیف[iii] (PDTC) و تومورهای آناپلاستیک[iv] (ATC) هستند. تومورهای تیروئید تمایز یافته، که معمولاً یک پیش آگهی مطلوب را نشان می‌دهند، غالبا به عنوان کارسینومای پاپیلاری[v] (PTC) (۹۰-۸۵ ٪)، فولیکولی (FTC) (۱۰-۵٪) و سلول هارتل طبقه‌بندی می‌شوند (۳ ٪). انواع TC با تمایز ضعیف و آناپلاستیک نادرتر هستند و با تهاجم بیشتر و پیش آگهی ضعیف مشخص می‌شوند.[۱] در نهایت، بخش کوچکی از TCها از سلول‌های مولد کلسیتونین

i-Thyroid Cancer
ii-Differentiated Thyroid Cancer
iii-Poorly Differentiated Thyroid Cancer
iv-Anaplastic Thyroid Cancer
v-Papillary Thyroid Cancer

منشأ می‌گیرند و مشخصات هیستولوژی مدولاری را دارند.[۲،۳]

تشخیص این بیماری با معاینه بالینی، سونوگرافی تیروئید، نمونه برداری با سوزن نازک[i] (FNAB)، معاینات سرولوژیکی، سینتی گرافی[ii]، سی‌تی‌اسکن[iii]، رزونانس مغناطیسی و PET-CT صورت می‌گیرد. اگرچه FNAB در حال حاضر استاندارد طلایی برای تشخیص اولیه TC می‌باشد، اما به دلیل میزان بالای عدم تشخیص، به ویژه در مورد ضایعات فولیکولی، محدودیت‌هایی را نشان می دهد. در فرآیندهای پس از جراحی DTC، نظارت بر سطوح تیروگلوبولین (Tg) یک فرآیند معمول است. با این حال، وجود آنتی‌بادی‌های ضد Tg (TgAb) ممکن است با اندازه گیری Tg تداخل داشته باشد، بنابراین کاربرد بالقوه آن به عنوان نشانگر تومور را مختل می‌کند.[۴] علاوه بر این، در حالی‌که اکثر DTC ها را می توان با جراحی و به دنبال آن استفاده از هورمون، درمان کرد، اما مدیریت موارد پیشرفته و PTC و TC های آناپلاستیک بسیار سخت‌تر می‌باشد. این تومورها را می توان با مهارکننده های تیروزین کیناز (TKIs)، مانند لنواتینیب[iv] و سورافنیب[v] برای DTC، دابرافنیب[vi]، ترامتینیب[vii]، و مورافنیب[viii] برای PTC یا ATC جهش یافته BRAF، کابوزانتینیب[ix] و واندتانیب[x] برای MTC، یا سلپرکاپتینیب[xi] در MTCs با ژن RET موتانت درمان کرد.[۵] اخیرا مشخص گردیده که نمونه‌برداری مایع می‌تواند منبع ارزشمندی برای کمک به مدیریت TC باشد، زیرا می‌توان از آن برای تعریف تشخیص صحیح، پیش‌بینی پیش‌آگهی تومور، نظارت بر تکامل بیماری و ایجاد رویکردهای دارویی استفاده کرد.[۶]

جستجو برای نشانگرهای زیستی برای کمک به تشخیص، پیش آگهی و پاسخ به درمان در MTC هنوز در حال انجام است. در واقع، علاوه بر نشانگرهای تثبیت شده مانند CEA[xii]، پیشرفت‌های فن‌آورانه اخیر امکان تولید انبوهی از داده‌های جدید در مورد اسیدهای نوکلئیک در MTC را بوجود آورده است. شناسایی DNA خارج سلولی یا بدون سلول (cfDNA)[xiii]، سلول‌های توموری در گردش[xiv] (CTC) و میکرو RNA های در گردش (miRNA)، مبنای استفاده از نمونه‌برداری مایع در MTC را ایجاد کرد. این مولکول‌ها یک ابزار ویژه برای تشخیص زودهنگام متاستازها در اختیار قرار می‌دهند. یکی دیگر از کاربردهای نمونه‌برداری مایع در حیطه پزشکی شخصی است که در آن هدف ما بهبود مراقبت و مدیریت بیمار است و شامل شناسایی نشانگرهای زیستی برای تشخیص، پیش آگهی، تمایز MTC های تهاجمی از موارد اولیه و پاسخ به درمان می شود. با این‌که تنها داده‌های کمی در مورد cfDNA، ctCell و miRNA ها در MTC گزارش شده است، اما این داده‌ها امیدوارکننده هستند. بنابراین مطالعات بیشتری برای شناسایی نشانگرهای زیستی جدید و قوی که می‌توانند وارد حیطه بالینی شوند، ضروری است.

۲. ژنتیک مولکولی

تغییرات پروتوآنکوژن RET از فرایندهای بسیار مهم برای بروز سرطان تیروئید است. سازوکارهای مختلف فعال‌سازی RET، نظیر جهش‌های نقطه‌ای و بازآرایی ژنی، می‌توانند میزان کارسینوم مدولاری و پاپیلاری تیروئید را مشخص کنند و یک عامل بسیار قوی برای پیش‌آگهی ضعیف در MTC هستند.[۷] این ژن در جایگاه 10q11.2 قرار دارد و گیرنده تیروزین کیناز را رمزگذاری می‌کند. گیرنده تیروزین کیناز در بسیاری از مسیرهای پیام‌رسان سلولی دخیل است و نقش کلیدی در توسعه و تکامل پاراتیروئیدها، دستگاه ادراری تناسلی و تاج عصبی از جمله مغز، آدرنال، بصل‌النخاع، گانگلیون روده و سلول های C تیروئید دارد. بیش از ۱۰۰ جهش افزایش عملکرد ژن RET در رابطه با بروز کارسینوم مدولاری تیروئید شناسایی شده است. این جهش‌ها در رده سلول‌های زایا (در بیماران مبتلا به کارسینوم مدولاری تیروئید ارثی) یا سلول‌های سوماتیک (در بیماران مبتلا به کارسینوم مدولاری تیروئید تک‌گیر)، برای ژن RET در بیماران مبتلا به گزارش شده است.[۸] نوع ارثی، که در ۲۰ تا ۳۰ درصد بیماران تشخیص داده می‌شود، با سندرم نئوپلازی غدد درون‌ریز متعدد نوع ۲ (MEN 2[xv])

i-Fine Needle Aspiration Biopsy
ii-Scintigraphy
iii-Omputed Tomography Scan
iv-Lenvatinib
v-Sorafenib
vi-Dabrafenib
vii-Tramatinib
viii-Vemurafenib
ix-Cabozantinib
x-Vandetanib
xi-Selpercaptinib
xii-Carcinoembryonic Antigen

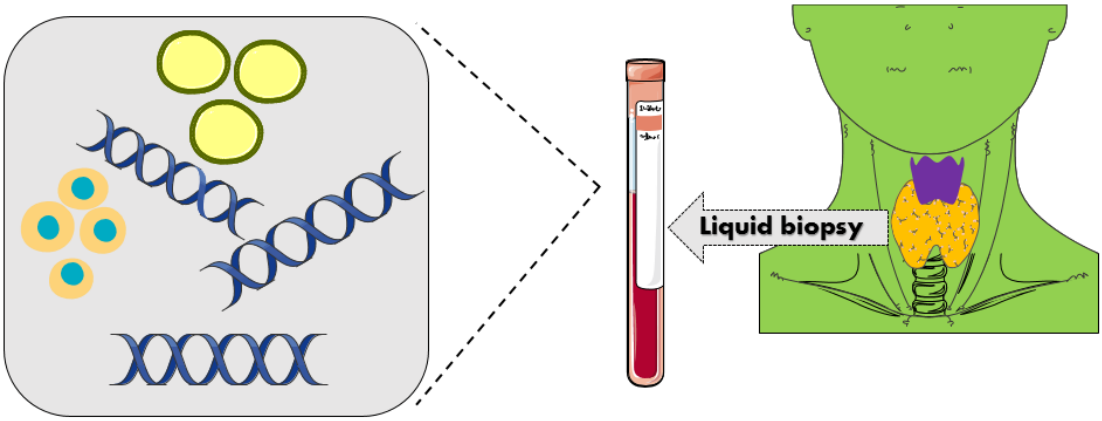
xiii-Cell Free DNA
xiv-Circulating Tumor Cells
xv-Multiple Endocrine Neoplasia, Type 2

همراه است که با الگوی توارثی اتوزومال غالب به ارث می‌رسد. با این حال، اکثریت قریب به اتفاق (۸۰٪) از MTC ها تک‌گیر هستند. تقریباً ۵۰ ٪ از آن‌ها دارای جهش‌های RET سوماتیک در سلول‌های تومور هستند. رایج‌ترین و شناخته‌شده‌ترین جهش RET در MTC تک‌گیر در محل کدون ۹۱۸ رخ می‌دهد و با شکل تهاجمی‌تر بیماری و شانس بقای کمتر بیمار همراه است.[۸] بیمارانی که حامل این جهش سوماتیک هستند، در مقایسه با بیماران فاقد آن یا حاملین سایر جهش‌ها، شانس بیشتری برای چند کانونی بودن و بزرگ تر بودن تومورهایشان دارند. هم‌چنین وجود جهش در کدون ۹۱۸ رابطه مستقیمی با افزایش احتمال تهاجم سلول‌های توموری به غدد لنفاوی یا سایر بافت‌های دوردست، و رسیدن بیماری به مرحله IV دارد. به عبارتی در شکل تکMTC، بیماران فاقد جهش RET سوماتیک بقای بیشتری نسبت به بیمارانی که دارای جهش RET در سلول‌های تومور بودند نشان دادند. ناهمگونی جهش RET در تومورهای تک‌گیر واجد جهش سوماتیک گزارش شده است. این بدان معناست که زیرمجموعه‌ای از سلول‌های تومور ممکن است دارای جهش RET باشند که در کل تومور وجود ندارد و ممکن است در برخی، اما نه همه متاستازها وجود داشته باشد.[۹] در MTC تک‌گیر، جهش‌های RET باعث ایجاد تومور نمی‌شوند، اما برای پیشرفت تومور مهم هستند. جهش دیگر با شیوع بالا در کدون ۸۸۳ واقع می‌شود و هم‌چون جهش ۹۱۸ با متاستازهای غدد لنفاوی و تداوم بیماری پس از عمل مرتبط است. اخیراً جهش‌های فعال‌کننده RAS نیز در ٦٨ درصد از MTC های تک گیر با RET طبیعی شناسایی شده است. بنابراین، ما با دو مسیر متمایز برای ایجاد MTC های تک‌گیر مواجهیم. این جهش ها ممکن است با تومورهای کمتر تهاجمی همراه باشد. نقاط داغ جهش شناخته شده در اگزون ۲، ۳، و ٤ می‌باشد و عمدتا شامل HRAS و KRAS است و جهش‌ها به ندرت شامل NRAS می‌شوند. جهش‌های RAS همیشه با جهش‌های RET رخ نمی‌دهند و تقریباً در ۱۰ تا ٤٥ درصد از تومورهای تک‌گیر با RET طبیعی وجود دارند. بنابراین گروه کوچکی از تومورها با جهش منفی RET و RAS باقی می‌ماند که تغییرات ژنتیکی اصلی برای آن‌ها تعریف نشده است.[۱۰] توجه به این نکته مهم است که مسیر RAS توسط گیرنده تیروزین کیناز RET فعال می شود. بنابراین، فعال شدن این مسیر با جهش RET یا RAS، هم در تومورهای ارثی و هم در تومورهای تک‌گیر مهم به نظر می‌رسد. RET هم‌چنین می‌تواند نقش اپی‌ژنتیکی در پاتوژنز MTC داشته باشد. مطالعات اخیر درجه کمتری از متیلاسیون پروتو انکوژن RET را در سلول های MTC در مقایسه با بافت‌های تیروئید طبیعی نشان داده‌اند که نشان‌دهنده نقش بیماری‌زایی متیلاسیون غیر طبیعی MET در توسعه MTC است.[۱۱]

۳. نمونه‌برداری مایع

توسعه ابزار تشخیصی غیرتهاجمی، که به عنوان "نمونه‌برداری مایع" نیز شناخته می‌شود، بینش جدیدی را برای تشخیص و پیش آگهی سرطان به وجود آورده است. حدود ۱۵۰ سال پیش در ۱۸٦۹، آسیب شناس استرالیایی؛ توماس اشورث[i]، شواهدی مبنی بر وجود سلول های تومور در گردش خون بیماران مبتلا به سرطان پروستات متاستاتیک ارائه کرد.[۱۲] مشابه نمونه‌برداری بافت که به طور رایج استفاده می‌شود، این روش نه تنها یک روش برای تشخیص سرطان است، بلکه می‌تواند به طور مفیدی در طول درمان استفاده شود. این بدان معناست که نمونه برداری مایع می‌تواند به تشخیص کارآیی داروهای درمان سرطان، از طریق نمونه‌برداری‌های متعدد در طول درمان، و پیش‌بینی عود تومور کمک کند. علاوه بر این نمونه برداری مایع می‌تواند بینش‌های جدیدی را در مورد ناهمگنی درون توموری و تغییرات ژنتیکی و اپی‌ژنتیکی که مسئول آن هستند، به ارمغان بیاورد.[۱۳] در حالی‌که نمونه‌برداری مایع توسط سازمان غذا و داروی آمریکا به عنوان یک روش پیش آگهی مفید برای انواع مختلف سرطان تایید شده است، کاربرد بالینی آن هنوز گسترده نیست. استفاده از نمونه‌برداری مایع در سرطان‌شناسی عمدتا شامل DNA توموری در گردش[ii] (ctDNA)، CTC، اگزوزوم[iii] و DNA حلقوی خارج کروموزومی می‌باشد. در بدخیمی‌های تیروئید، نمونه برداری مایع می تواند برای تشخیص و پیش آگهی آن مهم باشد. این تغییرات ژنتیکی و اپی ژنتیکی می تواند در هر فرد متفاوت باشد و بدین‌صورت مفهوم نمونه‌برداری مایع می‌تواند رویکرد پزشکی شخصی‌سازی شده را نیز بهبود بخشد.[۱٤]

i-Thomas Ashworth
ii-Circulating Tumor DNA
iii-Exosomes



شکل ۱- اجزای اصلی نمونه‌برداری مایع

۴. سلول‌های توموری در گردش (CTC)

یک تومور سرطانی معمولی حاوی میلیون‌ها یا حتی میلیاردها سلول است که دارای جهش‌های ژنتیکی هستند و آن‌ها را به رشد، تقسیم و حمله به بافتی که در آن قرار گرفته‌اند، هدایت می‌کند. با این حال، با تکثیر سلول‌ها، همه آن‌ها در مجاورت هم باقی نمی‌مانند و برخی از سلول‌ها از حاشیه تومور جدا می شوند و توسط جریان خون یا گردش لنفاوی به سایر نقاط بدن انتقال می‌یابند. به این سلول‌ها اصطلاحا سلول‌های تومور در گردش می‌گویند که می‌توانند در گردش بمانند یا در بافت‌های جدید مستقر شوند. مسیرشان هرچه که باشد، بدین معنی است که CTC ها اطلاعاتی درباره یک تومور دارند، اطلاعاتی که محققان فکر می‌کنند می‌تواند برای تشخیص یا درمان سرطان از آن کمک بگیرند. بنابراین در دهه گذشته فناوری‌های نوظهور برای اولین بار اجازه داده‌اند تا CTC ها از نمونه‌های خونی جدا شوند. برخی از روش‌ها، از جمله اولین روش‌های ایجاد شده، بر ویژگی‌های فیزیکی سلول‌ها متکی هستند. هنگامی که یک نمونه خون در یک سانتریفیوژ قرار می‌گیرد، گلبول‌های قرمز، گلبول های سفید و سایر اجزای خون ته‌نشین می شود. بر اساس شناوری آن ها، CTC ها را می توان در بخش گلبول‌های سفید یافت. در ادامه چون CTC ها عموماً بزرگ‌تر از گلبول های سفید هستند، یک فیلتر مبتنی بر اندازه می تواند انواع سلول را جداسازی کند.[۱۵]

۴-۱- افزایش حساسیت شناسایی CTC ها

روش‌های متعددی برای شناسایی CTC ها وجود دارد که عبارتند از: ۱) روش‌های مبتنی بر استفاده از فیلتر: در این جا سلول‌های سرطانی بر اساس اندازه جدا می‌شوند ۲) روش‌های مبتنی بر فن‌آوری میکروفلوویدیک[i]: در این روش‌ها جداسازی سلول‌های سرطانی بر اساس ویژگی‌های سلولی؛ نظیر اندازه، تحرک الکتروفورتیکی، و اتصالات سلولی صورت می‌گیرد ۳) روش اسکن آرایه فیبر نوری[ii] : تمایز سلول‌های سرطانی از سلول‌های خونی بر اساس ریخت‌شناسی و ویژگی‌های دی الکتریک انجام می‌شود ٤) روش‌های مبتنی بر استفاده از آنتی‌بادی: در این روش‌ها اساس بر شناسایی نشانگرهای زیستی اختصاصی در سطح سلول‌های سرطانی است ٥) استفاده از آپتامرها[iii]: این مولکول‌های نوکلئیک اسیدی با ساختار فضایی ثانویه یا ثالثیه، معادل شیمیایی آنتی‌بادی‌ها بوده و با میل ترکیبی بالایشان برای شناسایی نشانگرهای سطحی سلول سرطانی به کار می‌روند.[۱۶]

۴-۲- نشانگرهای مولکولی CTC

مجموعه‌ای از نشانگرهای مولکولی برای تشخیص CTC در سرطان‌های مختلف استفاده شده است. از آنجایی که بیشتر سرطان‌ها منشا اپیتلیال دارند، شایع‌ترین نشانگر مورد استفاده برای CTC ها EpCAM[iv] است، و به عنوان یک نشانگر اپیتلیال همگانی در سرطان‌ها محسوب می‌گردد. حضور این CTC های EpCAM مثبت، متاستاز زودرس و بقای ضعیف‌تر بیماران را پیش‌بینی می‌کند. با این حال، استفاده از EpCAM به عنوان نشانگر CTC دارای محدودیت‌هایی است چرا که نمی‌توان از آن برای شناسایی

i-Microfluidic
ii-Fiber-optic Array Scanning Methods
iii-Optamers
iv-Epithelial Cell Adhesion Molecule

تومورهایی که EpCAM آن‌ها منفی است یا بیان اندکی دارد، مانند سرطان‌های نوروژنیک، استفاده کرد.[۱۷] CTC ها می‌توانند تحت EMT[i] قرار گیرند، و نشانگرهای اپیتلیال، از جمله EpCAM، در طول EMT کاهش می‌یابند، که بر میزان تشخیص CTC های EpCAM مثبت تأثیر می‌گذارد. با این حال CTC های EpCAM مثبت زیرگروه قابل توجهی از همه CTC ها هستند و هم‌چنان این مولکول می‌تواند نشانگر زیستی قابل اعتمادی برای این زیرگروه باشد. نشانگرهای زیستی دیگری؛ مانند گیرنده ۲ فاکتور رشد اپیدرمی انسانی[ii] (HER2)، گیرنده استروژن، آنتی‌ژن غشایی اختصاصی پروستات، گیرنده فولات و سروایوین[iii]) نیز به عنوان نشانگرهای CTCs در سرطان های مختلف با اهمیت بالینی متفاوت نیز توصیف شده‌اند.[۱۸] در مورد MTC، نشانگرهایی از قبیل CEA و CA19-9[iv] شناسایی شده است و مورد استفاده قرار می‌گیرد. تنوع نشانگرهای CTC ها نشان‌دهنده ناهمگنی CTC ها در بین انواع مختلف سرطان است. حتی در یک بیمار، CTC ها از نظر مکانی-زمانی ناهمگن هستند، که ممکن است نتیجه یک ریزمحیط مکانی متفاوت در خون و تغییرات زمانی در پاسخ درمانی باشد. بنابراین در حال حاضر، تعریف کل جمعیت CTC با استفاده از نشانگرهای مولکولی بسیار محدود دشوار است. علاوه بر این، نشانگرهای CTC نباید در مراحل مختلف سرطان و دوره‌های درمان ثابت باشند.[۱۹]

۴-۳- تجزیه و تحلیل رونویسی CTC ها

توالی‌یابی تک سلولی در سال های اخیر به سرعت توسعه یافته است و برای بررسی رونوشت های CTC استفاده شده است. نیم‌رخ های بیانی تک سلولی می‌تواند CTC ها را از سلول‌های مزوتلیال و سلول‌های خونی در سرطان‌های مختلف متمایز کند. علاوه بر این تجزیه و تحلیل رونوشت مبتنی بر توالی‌یابی تک سلولی می‌تواند ناهمگونی را در زیرجمعیت CTC نشان دهند. هم‌چنین توالی‌یابی تک سلولی CTC ها به کشف مسیرهای جدیدی که به نفع متاستاز و شکست هستند کمک زیادی کرد. تعیین توالی RNA استخراج شده از CTC سرطان پروستات نشان داده است که فعال شدن بیش از اندازه مسیر Wnt یکی از دلایل مقاومت به داروهای ضد آندروژن در بیماران است. علاوه بر این، در مدل‌های موشی مشاهده شده است که بیان نابجای Wnt5a اثرات یک مهارکننده گیرنده آندروژن را کاهش داده است و سرکوب Wnt5a می‌تواند تا حدی حساسیت به دارو را در سلول‌های سرطان پروستات مقاوم شده بازگرداند.[۲۰]

۴-۴- سلول‌های تومور در گردش به عنوان نشانگر زیستی در MTC

به عنوان نشانگرهای زیستی، CTCs جداشده از تومورهای جامد می‌تواند در پیش‌بینی تهاجم و پیش آگهی‌ها بیماری و هم‌چنین نظارت بر اثربخشی درمان کمک کند. در این رابطه مطالعه‌ای بر روی ۷۲ فرد بیمار انجام گرفت. میزان CTC ها در ۷/۵ میلی‌لیتر از نمونه خون محیطی، با استفاده از غنی‌سازی منفی - ایمونوفلورسانس و هیبریداسیون درجا [v] اندازه‌گیری و نشان داده شد که میزان CTC ها در مبتلایان به سرطان تیروئید همراه با متاستاز به میزان قابل ملاحظه‌ای نسبت به مبتلایان به سرطان تیروئید بدون متاستاز و گروه شاهد بیشتر بود. علاوه بر این CTC برابر یا بیشتر از ۵ به میزان زیادی با سرطان تیروئید با متاستاز همراهی داشت و در صورتی‌که میزان آن برابر ۷ یا بیشتر بود، بیماران پاسخ ضعیفی به درمان با ^{131}I نشان می‌دادند و پیش آگهی بیماری بد بود.[۲۱] علاوه بر این، در مطالعه‌ای که اخیرا توسط اهلرز[vi] و همکاران انجام شد، میزان فراوانی CTC ها در بیماران مبتلا به سرطان تیروئید سنجش و به ارتباط آن با نشانگرهای بالینی پرداخته شد. در این مطالعه مشخص شد که بیماران مبتلا به سرطان تیروئید به طور قابل توجهی دارای CTC بالاتری نسبت به گروه شاهد بودند و نیز میزان CTC ها با مرحله اولیه تومور مرتبط است.[۲۲]

۵. DNA توموری در گردش (ctDNA)

در سال ۱۹۴۰ بود که برای اولین بار اسیدهای نوکلئیک خارج سلولی یا بدون سلول شناسایی شدند و پس از آن در پلاسمای بیماران مبتلا به سرطان سطوح بالای DNA بدون سلول (cfDN) تشخیص داده شد. ctDNA طولی معادل ۱۶۰ تا ۲۰۰ جفت باز دارد (که عمدتاً ۱۶۶ جفت باز است) و توسط سلول‌های تومور در جریان خون آزاد می‌شوند. این مولکول‌ها را می‌توان در سایر مایعات بدن از قبیل غدد لنفاوی، ادرار، مایع منی، بزاق و مایع مغزی نخاعی نیز

i-Epithelial Mesenchymal Transition
ii-Human Epidermal Receptor 2
iii-Survivin
iv-Carbohydrate Antigen 19

v-Negative Enrichment (NE), Immunofluorescence and in Situ Hybridization (FISH)
vi-M Ehlers

مشاهده کرد و[۲۳] هم‌چنین ممکن است از CTC که در جریان خون تخریب شده‌اند، مشتق شوند.[۲۴] ctDNA ممکن است عملکردهای فیزیولوژیکی داشته باشد که بر سلول های طبیعی، به ویژه آن هایی که در مجاورت تومور هستند، تأثیر گذارد. مولکول‌های تک رشته‌ای و دو رشته‌ای DNA به گیرنده‌های شبه تول TLR[i] که بر روی سطح سلول‌های تومور و سلول های نفوذکننده تومور بیان می شوند، متصل می‌شوند. علاوه بر این ctDNAها می‌توانند به TLR های موجود در سطح لکوسیت‌ها متصل شوند و مسیرهای پیام‌رسانی مختلف پاسخ ایمنی به سلول‌های توموری را در ریز محیط تغییر می‌دهند، فعال کنند. فعال‌سازی TLR ها می تواند مسیرهای پیام‌رسان را راه‌اندازی کند که منجر به آزادسازی سیتوکین‌ها و سایر تغییرات عملکردی در سلول های هدف می شود. انتشار ctDNA ممکن است اثرات مستقیمی بر سلول های ایمنی ریزمحیط تومور و هم چنین اندام دوردست داشته باشند. ctDNA هم‌چنین ممکن است از طریق انتقال افقی ژن به سلول‌های طبیعی در ریزمحیط تومور عمل کنند.[۲۵]

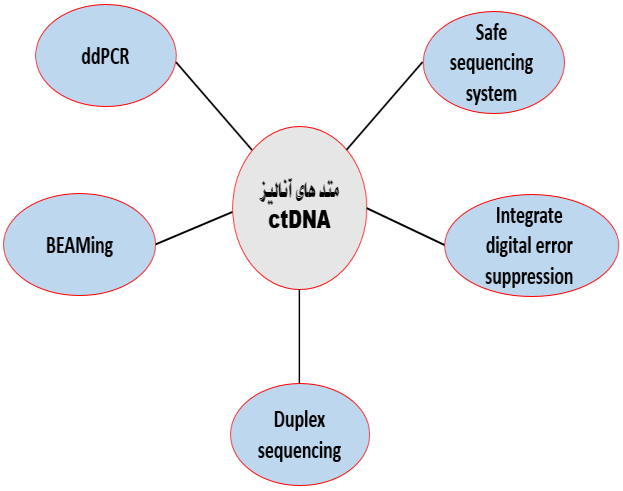
بسیاری از محدودیت‌های استفاده از بافت برای آزمایش نشانگرهای زیستی را می‌توان با اندازه‌گیری DNA آزاد شده از تومورها به خون دور زد. برای مثال زمانی که جراحی/نمونه‌برداری قابل اجرا نیست، یا بافت به دست آمده برای تجزیه و تحلیل کافی یا نامناسب نیست، استفاده از ctDNA در گردش یک منبع جایگزین کارآمد برای تهیه DNA توموری است. علاوه بر این، انتظار می‌رود که استفاده از ctDNA نمای کلی‌تری از جهش‌های موجود در مکان‌های مختلف تومور را نسبت به نمونه‌برداری از یک ناحیه تومور ارائه دهد. سایر مزایای کلیدی ctDNA نسبت به آزمایش بافت عبارتند از: زمان کمتر برای گزارش نتیجه، هزینه کمتر برای انجام و سهولت انجام اندازه‌گیری‌های متوالی. مزیت اخیر ممکن است در نظارت بر اثربخشی درمان‌های در حال انجام، شناسایی کلون‌های اولیه مقاوم به درمان و شناسایی سازوکارهایی درگیر در مقاومت کاربرد ویژه داشته باشد.[۲۶] در حالی که استفاده از ctDNA در مقابل بافت دارای چندین مزیت برای سنجش پیش‌بینی درمان است، اما محدودیت‌های متعددی نیز دارد. یکی از محدودیت های اصلی این است که همه تومورها، حتی در حالت پیشرفته، ctDNA را وارد گردش خون نمی کنند. به طور خاص، تومورهای با حجم کم معمولا ctDNA کمتری نسبت به نمونه‌های بزرگتر آزاد می‌کنند. علاوه بر این، برخی از انواع تومورها مانند تومورهایی که در مغز ایجاد می‌شوند، در مقایسه با ضایعات روده، کبد یا ریه، سطوح کمتری از ctDNA را در خون آزاد می‌کنند. برای بیماران مبتلا به تومورهای مغزی که DNA قابل تشخیص اندکی را وارد جریان خون می کنند (یا اصلاً نمی‌کنند)، استفاده از مایع مغزی نخاعی برای تعیین دارایی ژنتیک سلول‌های توموری توصیه می‌شود. رویکردهای بالقوه برای افزایش حساسیت عبارتند از: برداشت حجم بیشتری از خون (همیشه امکان‌پذیر نیست)، استفاده از توالی‌یابی با حساسیت بسیار کم، ترکیب روش‌های شناسایی جهش و سنجش متیلاسیون، سنجش mRNA مربوطه و بالاخره استفاده از مایعات فیزیولوژیک غیر از خون (مثلاً ادرار برای سرطان‌های مثانه، CSF برای سرطان‌های مغز، بزاق برای سرطان‌های دهان) است.[۲۷]

۵-۱- روش‌های شناسایی ctDNA موتانت

توسعه سریع روش های مختلف مشاهده شده در دو دهه اخیر، امکان تجزیه و تحلیل کل رونوشت های سلول توموری (روش مبتنی بر ریزآرایه)، کل اگزوم یا ژنوم (توالی‌یابی نسل بعدی) را برای شناسایی نشانگرهای مولکولی بالقوه فراهم می‌کند. توالی‌یابی سریع و نسبتاً ارزان DNA تومور در مقیاس وسیع، امکان شناسایی اهداف مولکولی بالقوه، تعیین زیرنوع سرطان و تعیین پیش آگهی بیمار را فراهم می‌کند. علاوه بر این با بینش‌هایی جدید در مورد زیست‌شناسی سرطان همراه است که می‌تواند مبنای تحقیقات بیشتر باشد. چنین طبقه‌بندی، بر اساس نشانگرهای مولکولی، با موفقیت در سرطان پستان انجام شده است. تست MammaPrint، توصیه شده توسط انجمن اروپایی سرطان‌شناسی پزشکی و تایید شده توسط سازمان غذا و دارو، بر اساس مشخصات بیان ژن، این اجازه را به ما می‌دهد تا بیماران را به عنوان خطر کم یا بالا در ایجاد متاستازهای دوردست طبقه‌بندی کنیم. به همین جهت، در ادامه به تعدادی از روش‌های مورد استفاده برای شناسایی جهش در ctDNA اشاره می‌کنیم. در حال حاضر، روش‌های تشخیص ctDNA عمدتاً حول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) و رویکردهای توالی‌یابی می‌چرخند. روش Allele-specific quantitative PCR با محدودیت تشخیص ۰/۰۱۴-۰/۰۰۴ ٪، از حساسیت بالایی برای شناسایی

i-Toll Like Receptor

ctDNA ها دارند. روش‌های امولسیونی PCR مانند PCR دیجیتال قطره‌ای (ddPCR) و bead، emulsion، amplification و magnetics (BEAMing) از بالاترین حساسیت برخوردارند و از محدودیت تشخیص ۰/۰۱-۰/۰۰۱ ٪ برخوردار هستند. نقطه ضعف روش‌های بر پایه بر PCR آن است که تعداد محدودی از موارد را می‌توان ارزیابی کرد و عموما به شناسایی اولیه تغییرات اختصاصی بافت سرطانی بیمار تکیه دارد. روش‌های توالی‌یابی از جمله توالی‌یابی نسل بعدی[i] (NGS) پوشش ژنومی وسیع‌تری را امکان‌پذیر می‌کند. با این حال، این روش زمان‌بر و پرهزینه‌بر است و این امر تصمیم‌گیری بالینی را با مشکل مواجه می‌کند.[۲۸]



شکل ۲- روش‌های مورد استفاده برای آنالیز ctDNA

۵-۲- استفاده از ctDNA/cfDNA در MTC

در مطالعه‌ای که اخیرا انجام گرفته است، سطح cfDNA حاوی جهش RET M918T در پلاسمای بیماران مبتلا به MTC از طریق ddPCR[ii] اندازه‌گیری شد. تشخیص RET M918T cfDNA به شدت با بقای کلی کمتر بیمار همبستگی داشت و نسبت به زمان دو برابر شده مقدار کلسیتونین[iii] (به عنوان نشانگری برای پیش آگهی MTC) با دقت بیشتری سیر بیماری را پیش‌بینی می‌کند. به همین دلیل می‌توانیم از نسبت آللی DNA تومور در گردش حاوی جهش RET M918T برای بقای کلی و پاسخ به درمان استفاده کنیم. علاوه بر این، مطالعه چندجهشی cfDNA با استفاده از نسل جدید تعیین توالی، برای آزمایش این فرضیه که آیا ctDNA یک نشانگر زیستی بالقوه در بیماران مبتلا به سرطان تیروئید پیشرفته است یا خیر کمک‌کننده بوده است. این مطالعه که شامل نمونه‌های DTC، MTC، و آناپلاستیک بود نشان داد که اکثر بیماران مبتلا به سرطان پیشرفته تیروئید دارای ctDNA قابل تشخیص بودند. اندازه‌گیری ctDNA نسبت به نشانگرهای معمولی، از چندین جهت داری برتری هستند: تشخیص زودهنگام پیشرفت بیماری در MTC، به عنوان یک نشانگر زیستی جایگزین زمانی که نشانگرهای معمولی در دسترس نیستند، ارزیابی سریع‌تر وضعیت بیماری در پاسخ به درمان‌های هدفمند، و در نتیجه به طور بالقوه امکان توقف سریع درمان های بیهوده را فراهم می کند. این نتایج اولیه از این فرضیه که ctDNA ممکن است یک نشانگر زیستی مفید بالینی در سرطان مدولاری تیروئید باشد را حمایت می‌کند. در نتیجه cfDNA می‌تواند به عنوان یک نشانگر اولیه برای پیشرفت MTC عمل کند.[۲۹]

۶. استفاده از ردپای نوکلئوزومی[iv] به عنوان نشانگر زیستی

با توجه به این‌که ctDNA پس از آپوپتوز و نکروز سلولی از سلول های تومور آزاد می‌شود، طول ctDNA مطابق با نوکلئوزوم‌ها (۱۴۷ جفت باز) و کروماتوزوم (نوکلئوزوم به علاوه هیستون پیوندی با حدود ۱۶۷ جفت باز) است. در سلول‌های یوکاریوتی، پروتئین‌هایی به نام هیستون‌ها به عنوان خانواده‌ای از پروتئین‌های کوچک با بار مثبت به نام‌های H1، H2A، H2B، H3 و H4 وجود دارد. مولکول DNA به دلیل وجود گروه های فسفات در اسکلت فسفات-قند آن دارای بار منفی است، بنابراین هیستون ها به DNA ملحق شده و با ساخت نوکلئوزوم DNA را فشرده می‌سازند. نوکلئوزوم یک واحد اساسی از بسته‌بندی DNA در یوکاریوت‌ها است که در آن مولکول DNA با تقریباً ۱۴۶ جفت باز حدود ۱/۶۷ چرخش مارپیچ چپ گرد به دور یک هسته ۸ تایی از هیستون‌ها پیچیده شده است. هیستون‌های پیونددهنده یاH1 و در تراکم بیشتر کروماتین نقش دارند و در قاعده نوکلئوزوم نزدیک ورودی و خروجی DNA، که به ناحیه پیونددهنده DNA متصل می‌شوند، قرار می‌گیرند. وضعیت قرار گرفتن نوکلئوزوم‌ها[v] بر اساس چگونگی بیان ژن و تغییرات اپی‌ژنتیکی هیستون‌ها و DNA، در بین

i-Next Generation Sequencing
ii-Droplet Digital PCR
iii-Calcitonin Doubling Times

iv Nucleosome Footprinting
v-Nucleosome Positioning

سلول‌ها متفاوت است و «ردپای نوکلئوزومی» نامیده می‌شود. بنابراین ردپای نوکلئوزمی در سلول طبیعی با سلول سرطانی متفاوت خواهد بود. توالی‌یابی عمیق ctDNA جدا شده از پلاسمای خون و ایجاد نقشه‌هایی از نوکلئوزوم در سراسر ژنوم،[i] نشان داد که قطعات ctDNA، همچون نوکلئوزم‌ها، ردپای عوامل رونویسی را در خود جای داده‌اند. بنابراین ctDNA ها می‌توانند در تشخیص نوع سلول منشا تومور کمک کنند. در واقع، ردپای نوکلئوزومی را می‌توان برای یافتن منشاء تومور و انواع سلولی که به بیماری زایی، مانند ایجاد سرطان تیروئید کمک می‌کند، استفاده کرد.[۳۰]

جدول ۱ - بررسی اجمالی روش‌های مختلف به عنوان نشانگرزیستی

نمونه	مزایا	معایب	رفرنس
ctDNA	روش جداسازی آن ساده‌تر است	تمام جهش‌ها بیان نمی‌شوند	۳۱
	نسبت به سلول و RNA پایدارتر است	مرگ سلول‌های خونی می‌تواند نسبت آن را تغییر دهد	۳۱
	میزان آن با زنده ماندن بیمار ارتباط دارد	منبع آن کاملا مشخص نیست	۳۱
	حساسیت بالایی دارد	در بیشتر موارد به دانش قبلی از هدف مورد نظر داریم	۳۱
	برای جداسازی ctDNA (کمتر از ۲ میلی‌لیتر) به خون اندکی نیاز داریم	نمی‌توانیم زمان تشخیص متاستازرا مشخص کنیم	
	ارزیابی ناهمگونی تومور آسان است	قدرت ضعیفی در شناسایی تومورهای مقاوم به درمان دارند	
CTCs	حساسیت و ویژگی بالایی دارند	روش‌های جداسازی آن می‌تواند چالش برانگیز باشد	۳۱
	تکرارپذیری بالایی دارند	تورش‌های موجود در هنگام نمونه‌برداری از سلول‌ها	۳۱
	در شناسایی اهداف سلولی جدید کارآیی بالاتری نسبت به ctDNA دارند	چالش‌های مربوط به توالی‌یابی تک سلولی	۳۲
	می‌توانیم زمان تشخیص متاستاز را مشخص کنیم	CTC ها بدون نشانگرهای اپی‌تلیالی قابل تشخیص نیستند	۳۲
	قدرت بالایی در شناسایی تومورهای مقاوم به درمان دارند	برای جداسازی ctDNA (۷ تا ۱۰ میلی‌لیتر) به خون بیشتری نیاز داریم	

i-Genome Wide in Vivo Nucleosome Occupancy

۷. استفاده از مولکول‌های RNA غیر کدکننده[ii]

میکروآر ان ای‌ها و یا miRNAs مولکول‌های RNA غیر کدکننده کوتاه با طول ۱۸ تا ۲۵ نوکلئوتید هستند که به عنوان تنظیم‌کننده‌های پس از رونویسی بیان ژن عمل می‌کنند. miRNA هایی که می‌توانند از سلول‌ها آزاد شوند و در جریان خون یافت شوند، به عنوان microRNA های در گردش شناخته می‌شوند. نیم‌رخ miRNA های در گردش در بیماری‌های مختلف و نیز پاسخ به درمان اختصاصی است.[۳۳] مطالعات مختلفی بیان نابجای miRNA های خاص را در بافت‌های MTC گزارش نموده‌اند و نشان داده‌اند که این تغییرات miRNAها، آن‌ها را به عنوان نشانگرهای زیستی پیشنهاد می‌کند[۳۴] به عبارتی خلاف cfDNA یا CTC ها، تجزیه و تحلیل miRNA های در گردش به شناسایی جهش ها متکی نیست، بلکه بر بیان متفاوت miRNA ها در بیماران در مقایسه با گروه سالم، یا در میان زیرگروه‌های بیماران متکی می باشد. بنابراین برخی از محدودیت‌های CTC ها و cfDNA ها در مورد آن‌ها مطرح نمی‌باشد. MiR-375 یک RNA غیرکدکننده حفاظت‌شده است که در تکثیر سلول های سرطانی، مهاجرت و مقاومت دارویی نقش دارد. مطالعات قبلی نشان داده است که miR-375 از طریق برخی از فاکتورهای رونویسی کلیدی مانند YAP1[iii]، SP1[iv] و مسیرهای پیام‌رسان Wnt و NF-κB[v] بر انتقال اپیتلیال – مزانشیمی سلول‌های تومور انسانی تأثیر می‌گذارد و بدین‌صورت برای توسعه سرطان حیاتی است.[۳۵] در مورد MTC، اخیرا مشخص شده که miR-375 از طریق مسیر پیام‌رسانی PI3K/Akt در بیماری زایی آن نقش دارد.[۳۶] علاوه بر این نتایج مطالعه‌ای که اخیرا بر روی نمونه‌های پلاسما افراد مبتلا به MTC انجام شده نشان داده است که miR-375 به میزان قابل ملاحظه‌ای در این بیماران افزایش می‌یابد و با کاهش قابل توجه در بقا بیمار و پیش‌آگهی ضعیف بیماری همراه است. از این رو می‌توانیم از نیم‌رخ بیانی miR-375 به عنوان یک فاکتور پیش آگهی در بیماران مبتلا به MTC استفاده کنیم.[۳۷] علاوه بر این در مطالعه‌ای دیگر میزان بیان miR-21 و LncRNA MALAT1 در MTC اندازه‌گیری شد. در این مطالعه مشخص شد که میزان بیان miR-21 و LncRNA MALAT1 در مبتلایان به MTC

ii-Non Coding RNA
iii-Yes-associated Protein 1
iv-Specific Protein 1
v-Nuclear Factor Kappa Beta

افزایش می‌یابد و در پیشرفت این بیماری موثر است.[۳۸] از این‌رو بدلیل پایداری بالای miRNA ها می‌توانیم از آن‌ها به عنوان فاکتورهای تشخیصی و پیش‌آگهی در بیماران MTC کارسینوما استفاده کنیم.

۸. نشانگر زیستی‌های آنتی‌ژنیک

آنتی‌ژن کارسینوامبریونیک[i] (CEA): مجموعه‌ای از گلیکوپروتئین‌های درگیر در چسبندگی سلولی می‌باشند. CEA معمولاً در طول رشد جنین در بافت گوارشی تولید می‌شود، اما تولید آن قبل از تولد متوقف می‌شود. در نتیجه، CEA معمولاً در سطوح بسیار پایین در خون بزرگسالان سالم وجود دارد (حدود ٤-٢ نانوگرم در میلی‌لیتر). گلیکوفرم‌های سیالوفوکوزیله تخصصی آن‌ها به عنوان لیگاندهای L-سلکتین و E-سلکتین کارسینومای کولون عمل می‌کنند، که برای گسترش سرطان سلول‌های کارسینوم کولون حیاتی می‌باشد. اخیرا مطالعه‌ای بر روی CEA سرمی در مبتلایان به MTC و استفاده از آن به عنوان یک فاکتور پیش آگهی انجام گردید. مقدار CEA با مرحله آناتومیکال به عنوان نشانگر زیستی برای MTC همراهی دارد و می‌توان از آن برای پیش‌بینی پیش آگهی ضعیف استفاده کرد. با این حال، آزمایش CEA سرم نقش محدودی در تشخیص و پی‌گیری MTC بازی می‌کند، زیرا می‌تواند مقادیر طبیعی را حتی در مواردی که بیماری در حالت پیشرفته خود قرار دارد نشان دهد.[۳۹]

پیش‌ساز پپتید آزادکننده گاسترین[ii] (ProGRP): یک انتقال‌دهنده عصبی است که متعلق به خانواده neuromedine B/bombesine است. GRP باعث تحریک ترشح گاسترین به منظور افزایش اسیدیته اسید معده می شود. Pro-GRP یک پپتید متشکل از ۱۲۵ اسید آمینه است که در سیستم عصبی و دستگاه گوارش بیان می‌شود. سطوح ProGRP به طور قابل توجهی در مبتلایان به MTC در مقایسه با افراد سالم بالاتر است. علاوه بر این سطوح ProGRP به طور دقیق، بیماران فعال را از بیماران درمان شده و هم‌چنین بیماران مبتلا به بیماری فعال موضعی را از افراد دارای متاستاز دوردست متمایز می‌کند.[٤٠]

آنتی‌ژن کربوهیدرات ۱۹-۹ [iii](CA19-9): از نشانگر توموری است که به صورت رایج برای بررسی و پی‌گیری تومورهای پانکراس مورد استفاده قرار می‌گیرد. سطوح سرمی آن در بیماری‌های بدخیم و خوش‌خیم دستگاه گوارش و تنفس افزایش می یابد و با برخی دیگر از موارد بالینی مانند سرطان پروستات و سرطان پاپیلاری تیروئید همراه با تبدیل آناپلاستیک نیز همراهی دارد. علاوه بر این، آن را به عنوان یک نشانگر بیماری عودکننده در سرطان ریه و سرطان پاپیلاری تیروئید نیز یاد می‌کنند. اخیرا بررسی که بر روی ۱۲۲ بیمار مبتلا به MTC انجام شد مشخص شد که میزان CA19-9 در بیمارانی MTC که پیش آگهی بدتری دارند، افزایش می‌یابد. علاوه بر این می‌توانیم در واقع این نشانگر را با سایر نشانگرها را برای پیش‌آگهی طولانی‌مدت دقیق‌تر و درمان اولیه و پی‌گیری ترکیب کنیم.[۱۹]

۹. چشم‌انداز آینده نمونه برداری مایع در مدیریت سرطان مدولاری تیروئید

با توجه به تحقیقات اخیر، رویکردهای جدیدی برای تشخیص سرطان مدولاری تیروئید بر اساس تغییرات ژنتیکی و اپی‌ژنتیکی سلول‌های تومور مورد ارزیابی قرار گرفته‌اند. استفاده از نمونه‌برداری مایع به همراه پیشرفت‌های اخیر روش‌های زیست‌شناسی مولکولی مانند NGS، GWAS[iv]، EWAS[v] و توالی‌یابی متیلوم DNA تک سلولی، توسط سرطان‌شناس برای تشخیص و ردیابی زودهنگام و کارایی درمان مورد استفاده قرار می‌گیرد. اطلاعات مربوط به ارتباط ctDNA با شاخص‌های پروتئینی تومور تیروئید، می‌تواند اطلاعاتی در مورد محل یافتن سرطان و محل منشاء تومور ارائه دهد. به تازگی، نمونه‌برداری مایع مبتنی بر خون نیز به عنوان جایگزین کم تهاجمی برای شناسایی ویژگی‌های سلولی و مولکولی که می‌توانند به عنوان نشانگرهای زیستی برای تشخیص سرطان در مراحل اولیه، پیش‌بینی پیشرفت بیماری، نظارت پاسخ به داروهای شیمی درمانی و ارائه گزینه‌های درمانی شخصی مورد استفاده قرار می‌گیرد.

i-Carcinoembryonic Antigen
ii-Progastrin Releasing Peptide
iii-Carbohydrate Antigene 19

iv-Genome Wide Association
v-Epigenetic Wide Association

References

1. Rajabi S, Dehghan MH, Dastmalchi R, Mashayekhi FJ, Salami S, Hedayati M. The roles and role-players in thyroid cancer angiogenesis. Endocrine Journal 2019; 66: 277-93.
2. Roman BR, Morris LG, Davies L. The thyroid cancer epidemic, 2017 perspective. Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes 2017; 24: 332-6.
3. Hedayati M, Zarif Yeganeh M, Sheikholeslami S, Afsari F. Diversity of mutations in the RET proto-oncogene and its oncogenic mechanism in medullary thyroid cancer. Crit Rev Clin Lab Sci 2016; 53: 217-27.
4. Nguyen QT, Lee EJ, Huang MG, Park YI, Khullar A, Plodkowski RA. Diagnosis and treatment of patients with thyroid cancer. Am Health Drug Benefits 2015; 8: 30-40.
5. Cabanillas ME, Ryder M, Jimenez C. Targeted therapy for advanced thyroid cancer: kinase inhibitors and beyo nd. Endocrine Reviews 2019; 40: 1573-604.
6. Khatami F, Tavangar SM. Liquid biopsy in thyroid cancer: new insight. Int J Hematol Oncol Stem Cell Res 2018; 12: 235-48.
7. Hedayati M, Yaghmaei P, Pooyamanesh Z, Zarif Yeganeh M, Hoghooghi Rad L. Leptin: a correlated peptide to papillary thyroid carcinoma? Journal of Thyroid Research 2011; 2011.
8. Salvatore D, Santoro M, Schlumberger M. The importance of the RET gene in thyroid cancer and therapeutic implications. Nature Reviews Endocrinology 2021; 17: 296-306.
9. Cote GJ, Evers C, Hu MI, Grubbs EG, Williams MD, Hai T, et al. Prognostic significance of circulating RET M918T mutated tumor DNA in patients with advanced medullary thyroid carcinoma. The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 2017; 102: 3591-9.
10. Fussey JM, Vaidya B, Kim D, Clark J, Ellard S, Smith JA. The role of molecular genetics in the clinical management of sporadic medullary thyroid carcinoma: A systematic review. Clinical Endocrinology 2019; 91: 697-707.
11. Moura MM, Cavaco BM, Leite V. RAS proto-oncogene in medullary thyroid carcinoma. Endocr Relat Cancer 2015; 22: R235-52.
12. Alix-Panabières C, Pantel K. Liquid biopsy: from discovery to clinical application. Cancer discovery 2021; 11: 858-73.
13. Romano C, Martorana F, Pennisi MS, Stella S, Massimino M, Tirrò E, et al. Opportunities and challenges of liquid biopsy in thyroid cancer. International Journal of Molecular Sciences 2021; 22: 7707.
14. Neumann MH, Bender S, Krahn T, Schlange T. ctDNA and CTCs in liquid biopsy–current status and where we need to progress. Computational and Structural Biotechnology Journal 2018; 16: 190-5.
15. Pantel K, Speicher M. The biology of circulating tumor cells. Oncogene 2016; 35: 1216-24.
16. Dickey DD, Giangrande PH. Oligonucleotide aptamers: A next-generation technology for the capture and detection of circulating tumor cells. Methods 2016; 97: 94-103.
17. Wit Sd, Dalum Gv, Lenferink A, Tibbe AG, Hiltermann TJN, Groen HJ, et al. The detection of EpCAM+ and EpCAM–circulating tumor cells. Scientific Reports 2015; 5: 1-10.
18. Nini A, Hoffmann MJ, Lampignano R, große Siemer R, van Dalum G, Szarvas T, et al. Evaluation of HER2 expression in urothelial carcinoma cells as a biomarker for circulating tumor cells. Cytometry Part B: Clinical Cytometry 2020; 98: 355-67.
19. Alencar R, Kendler DB, Andrade F, Nava C, Bulzico D, de Noronha Pessoa CC, et al. CA19-9 as a predictor of worse clinical outcome in medullary thyroid carcinoma. European Thyroid Journal 2019; 8: 186-91.
20. Lin D, Shen L, Luo M, Zhang K, Li J, Yang Q, et al. Circulating tumor cells: biology and clinical significance. Signal Transduction and Targeted Therapy 2021; 6: 1-24.
21. Qiu Z-L, Wei W-J, Sun Z-K, Shen C-T, Song H-J, Zhang X-Y, et al. Circulating tumor cells correlate with clinicopathological features and outcomes in differentiated thyroid cancer. Cellular Physiology and Biochemistry 2018; 48: 718-30.
22. Ehlers M, Allelein S, Schwarz F, Hautzel H, Kuebart A, Schmidt M, et al. Increased numbers of circulating tumor cells in thyroid cancer patients. Hormone and Metabolic Research 2018; 50: 602-8.
23. Heitzer E, Ulz P, Geigl JB. Circulating tumor DNA as a liquid biopsy for cancer. Clinical chemistry 2015; 61: 112-23.
24. Marotta V, Cennamo M, La Civita E, Vitale M, Terracciano D. Cell-Free DNA Analysis within the Challenges of Thyroid Cancer Management. Cancers 2022; 14: 5370.
25. Calabuig-Farinas S, Jantus-Lewintre E, Herreros-Pomares A, Camps C. Circulating tumor cells versus circulating tumor DNA in lung cancer—which one will win? Transl Lung Cancer Res 2016; 5: 466-82.
26. Leung F, Kulasingam V, Diamandis EP, Hoon DS, Kinzler K, Pantel K, et al. Circulating tumor DNA as a can cer biomarker: fact or fiction? Clinical Chemistry 2016; 62: 1054-60.
27. Han X, Wang J, Sun Y. Circulating tumor DNA as biomarkers for cancer detection. Genomics, proteomics & bioinformatics 2017; 15: 59-72.
28. Bach S, Sluiter NR, Beagan JJ, Mekke JM, Ket JC, van Grieken NC, et al. Circulating tumor DNA analysis: clinical implications for colorectal cancer patients. A systematic review. JNCI Cancer Spectrum 2019; 3: pkz042.
29. Allin D, Shaikh R, Carter P, Thway K, Sharabiani M, Gonzales-de-Castro D, et al. Circulating tumour DNA is a potential biomarker for disease progression and response to targeted therapy in advanced thyroid cancer. Eur opean Journal of Cancer 2018; 103: 165-75.
30. Keller L, Belloum Y, Wikman H, Pantel K. Clinical relevance of blood-based ctDNA analysis: Mutation detection and beyond. British Journal of Cancer 2021; 124: 345-58.
31. Lang J. Advantages and Disadvantages of CtDNA vs CTC Assays: How to Move the Needle Forward towards Clinical Application. Keck Medicine of USC: Los Angeles, CA, USA. 2007.
32. Lianidou E, Hoon D. Circulating tumor cells and circulating tumor DNA. Principles and applications of mole cular diagnostics: Elsevier; 2018. p. 235-81.
33. Chu Ying-Hsia, Hardin H, Schneider David F, Chen H, Lloyd RV. "MicroRNA-21 and long non-coding RNA MALAT1 are overexpressed markers in medullary thyroid carcinoma." Experimental and Molecular Pathology 2017; 103: 229-36.
34. Chu Y-H, Lloyd RV. Medullary thyroid carcinoma: rece nt advances including microRNA expression. Endocrine Pathology 2016; 27: 312-24.

35. Wei J, Lu Y, Wang R, Xu X, Liu Q, He S, et al. MicroRNA-375: potential cancer suppressor and therapeutic drug. Biosci Rep 2021; 41: BSR20211494.
36. Shi L, Zhao S-m, Luo Y, Zhang A-w, Wei L-h, Xie Z-y, et al. MiR-375: A prospective regulator in medullary thyroid cancer based on microarray data and bioinformatics analyses. Pathology-Research and Practice 2017; 213: 1344-54.
37. Romeo P, Colombo C, Granata R, Calareso G, Gualeni AV, Dugo M, et al. Circulating miR-375 as a novel prognostic marker for metastatic medullary thyroid cancer patients. Endocrine-related Cancer 2018; 25: 217-31.
38. Chu Y-H, Hardin H, Schneider DF, Chen H, Lloyd RV. MicroRNA-21 and long non-coding RNA MALAT1 are overexpressed markers in medullary thyroid carcinoma. Experimental and Molecular Pathology 2017; 103: 229-36.
39. Kim J, Park H, Choi MS, Park J, Jang HW, Kim TH, et al. Serum Carcinoembryonic Antigen as a Biomarker for Medullary Thyroid Cancer. Int J Thyroidol 2021; 14: 143-51.
40. Giovanella L, Fontana M, Keller F, Ceriani L, Paone G. Circulating pro-gastrin releasing peptide (ProGRP) in patients with medullary thyroid carcinoma. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM) 2021; 59: 1569-73.

Review Article

Application of Circulating Tumor Markers in Medullary Thyroid Cancer with a Molecular Diagnostic, and Therapeutic Approach

Saeidi Kh[1], Movahedi M[2], Daneshpour MS[3], Hedayati M[3]

[1]Department of Biochemistry, Faculty of Biological Sciences, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran. [2]Department of Cellular and Molecular Biology, Faculty of Biological Sciences, Islamic Azad University, North Tehran Branch, Tehran, Iran. [3]Cellular and Molecular Endocrine Research Center, Research Institute for Endocrine Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, I.R. Iran.

e-mail: hedayati47@gmail.com
e-mail: hedayati@endocrine.ac.ir

Received: 26/04/2023 **Accepted**: 01/10/2023

Abstract

Medullary Thyroid Cancer (MTC) is a rare, aggressive, and fatal subtype of thyroid cancer, presenting a significant medical challenge that necessitates prompt and accurate diagnosis and treatment. Recently, attention has shifted towards utilizing circulating tumor markers as a novel liquid biopsy technique, offering the potential for improved precision in diagnosis, outcome prediction, and cancer progression monitoring. Hence, this review aims to analyze the characteristics and biological aspects of Circulating Tumor Cells (CTCs) and Circulating Tumor DNA (ctDNA) in MTC. One of the main objectives is to understand how these markers can enhance diagnosis accuracy, provide better predictive insights, and establish a more substantial basis for treatment strategies tailored to this particular type of cancer. The non-invasive nature of CTCs and ctDNA enables them to reveal molecular and genetic changes in tumors. This information holds promise for enhancing early detection and providing more precise tracking of disease development. Moreover, using these markers could address clinical needs and drive advancements in MTC diagnosis and treatment. These progressions have the potential to significantly improve diagnostic precision and treatment effectiveness, ultimately leading to better outcomes for individuals dealing with this intricate condition.

Keywords: Liquid biopsy, MTC, ctDNA, CTC