

# Liquid Biopsy: An Emerging Tool for Colorectal Cancer Diagnosis and Monitoring

Akbar Bagheri<sup>1</sup>, Mortaza Raeisi<sup>2</sup>, Mohammadreza Pashaei<sup>3</sup>, Leila Alizadeh<sup>4</sup>, Yousef Roosta<sup>3,5,6</sup>, Somaieh Matin<sup>7</sup>,

Abbasali Hosseinpour Feizi<sup>2,8</sup>, Abbas Karimi<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Molecular Medicine, Faculty of Medical Sciences, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

<sup>2</sup> Hematology and Oncology Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

<sup>3</sup> Department of Internal Medicine, School of Medicine, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran

<sup>4</sup> Gastroenterology and Liver Diseases Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

<sup>5</sup> Solid Tumor Research Center, Cellular and Molecular Medicine Research Institute, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran

<sup>6</sup> Hematology, Immune Cell Therapy, and Stem Cells Transplantation Research Center, Clinical Research Institute, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran

<sup>7</sup> Department of Internal Medicine, School of Medicine, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran

<sup>8</sup> Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

## Abstract

**Introduction:** This article discusses the diagnosis and monitoring of patients with colorectal cancer using liquid biopsy. Colorectal cancer is one of the most common types of cancer worldwide; moreover, its diagnosis and monitoring is of great importance due to various factors such as lifestyle, environmental and genetic factors. There are various methods for diagnosing and monitoring colorectal cancer which can be used as the basis for selecting appropriate treatment methods such as surgery, chemotherapy, targeted therapy, immunotherapy, gene therapy and combination therapies.

**Methods and Materials:** The current study has been performed through searching “Liquid biopsy”, “Colorectal Cancer”, “Tumor educated platelets”, “Biomarker”, and “Chemotherapy” keywords in various databases including PubMed, Scopus, Web of Science, and Google Scholar until Dec 2023. Out of the 297 articles, 49 articles were selected and they were included in the study based on the inclusion and exclusion criteria.

**Results:** Liquid biopsy-based analysis of circulating tumor cells (CTCs), circulating tumor DNA (ctDNA), and tumor-educated platelets (TEPs) provide useful tools for early detection, monitoring treatment response, detecting disease recurrence, and identifying tumor heterogeneity and drug resistance mechanisms in colorectal cancer.

**Discussion and Conclusion:** This article examines that due to the molecular characteristics of the tumor during the course of the disease and the genetic and phenotypic heterogeneity of the tumor between primary and metastatic lesions, liquid biopsy can be used as a new solution for diagnosis and monitoring of patients with colorectal cancer.

**Keywords:** Liquid Biopsy, Colorectal Cancer, Biomarker, Chemotherapy, Tumore-Educated Platelets

\*(Corresponding Author) Dr. Abbas Karimi, Department of Molecular Medicine, Faculty of Advanced Medical Sciences, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, East Azerbaijan, Iran.

Email: karimia@tbzmed.ac.ir

## بیوپسی مایع: ابزار و رهیافتی جدید برای تشخیص و پایش مبتلایان به سرطان کولورکتال

اکبر باقری<sup>۱</sup>، مرتضی رئیسی<sup>۲</sup>، محمدرضا پاشایی<sup>۳</sup>، لیلا علیزاده<sup>۴</sup>، یوسف روستا<sup>۵،۶</sup>،

سمیه متین<sup>۷</sup>، عباسعلی حسین پور فیضی<sup>۸،۹</sup>، عباس کریمی<sup>\*۱۰</sup>

<sup>۱</sup> گروه پزشکی مولکولی، دانشکده علوم نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

<sup>۲</sup> مرکز تحقیقات هماتولوژی و انکولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

<sup>۳</sup> گروه بیماری‌های داخلی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ارومیه، ایران

<sup>۴</sup> مرکز تحقیقات گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

<sup>۵</sup> مرکز تحقیقات سالیب تومور، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ارومیه، ایران

<sup>۶</sup> مرکز تحقیقات هماتولوژی، ایمون سل تراپی و پیوند سلول‌های بنیادی (HISRC)، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ارومیه، ایران

<sup>۷</sup> گروه بیماری‌های داخلی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران

<sup>۸</sup> گروه کودکان، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

### چکیده

مقدمه: این مقاله به تشخیص و پایش بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال با استفاده از روش بیوپسی مایع می‌پردازد. سرطان کولورکتال یکی از رایج‌ترین نوع‌های سرطان در جهان است و با توجه به عوامل مختلفی مانند سبک زندگی، عوامل محیطی و ژنتیکی، تشخیص و پایش آن از اهمیت بالایی برخوردار است. روش‌های مختلفی برای تشخیص و پایش سرطان کولورکتال وجود دارد که می‌تواند مبنای انتخاب روش درمانی مناسب از قبیل جراحی، شیمی‌درمانی، درمان هدف‌مند، ایمونوتراپی، ژن‌درمانی و درمان‌های ترکیبی قرار گیرد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه کلید واژه‌های Liquid biopsy, colorectal cancer, Tumor educated platelet, biomarker، chemotherapy در پایگاه‌های اطلاعاتی PubMed, Scopus, web of science, google scholar تا دسامبر سال ۲۰۲۳ مورد جستجو قرار گرفتند. از تعداد ۲۹۷ مطالعه به دست آمده بر اساس معیارهای ورود و خروج ۴۹ مقاله وارد مطالعه گردید.

یافته‌ها: بیوپسی مایع مبتنی بر سلول‌های تومور در گردش، DNA تومور آزاد در گردش و پلاکت‌های آموزش دیده با تومور، ابزارهای مناسبی برای تشخیص زود هنگام، پایش پاسخ به درمان، تشخیص عود و شناسایی ناهمگونی و مکانیسم‌های مقاومت دارویی در سرطان کولورکتال هستند.

بحث و نتیجه‌گیری: بیوپسی مایع به‌عنوان یک روش تشخیصی نوین، به دلیل قابلیت آن در تشخیص ویژگی‌های مولکولی تومور در طول دوره بیماری و همچنین شناسایی ناهمگونی ژنتیکی و فنوتیپی بین ضایعات اولیه و متاستاتیک، می‌تواند به‌عنوان یک راه‌حل مؤثر برای تشخیص و پایش بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال مورد استفاده قرار گیرد.

کلمات کلیدی: بیوپسی مایع، سرطان کولورکتال، نشانگر زیستی، شیمی‌درمانی پلاکت‌های آموزش دیده با تومور

## مقدمه

امکان ارزیابی تکامل سرطان نیاز به استفاده از سایر روش‌های تشخیصی را ضروری می‌سازد. در حدود بیش از ۱۰ سال پیش Pantel و Alix-Panabieres اصطلاح "بیوپسی مایع" را برای تعریف نشانگرهایی در خون که اطلاعات خاص در مورد تومور ارائه می‌دهند، به کار بردند. بیوپسی مایع ابزاری برای شناسایی تغییرات مرتبط با تومور در مایعات بدن یک روش سریع، آسان و کم‌هزینه با حداقل تهاجم است که می‌تواند به محدودیت‌های بیوپسی بافت در ناهمگونی تومور غلبه کرده و تشخیص مکرر را تسهیل کند (۴، ۵) و به‌عنوان یک روش غربالگری برای تشخیص سرطان‌ها در مراحل اولیه، نشان دادن حداقل بیماری باقی‌مانده پس از درمان، شناسایی مشخصات مولکولی سرطان، پیش‌بینی پاسخ درمانی در اسرع وقت و بررسی مکانیسم‌های مقاومت دارویی مورد استفاده قرار گیرد (۶). بیوپسی بافت پرکاربردترین روش در تشخیص و پایش بیماران مبتلا به CRC می‌باشد همچنین هر یک از روش‌های مذکور دارای مزایا و محدودیت‌هایی می‌باشند و می‌توانند در کنار یکدیگر در مراحل مختلف بیماری در تشخیص و پایش بیماران مورد استفاده قرار گیرند. هدف از این مطالعه بررسی استفاده از روش‌های مختلف بیوپسی مایع در طول دوره بیماری جهت تجزیه و تحلیل ناهمگونی ژنتیکی و فنوتیپی تومور بین ضایعات اولیه و متاستاتیک، به‌عنوان یک راه‌حل جدید برای تشخیص و پایش بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال می‌باشد.

## مواد و روش‌ها

پژوهش حاضر یک مطالعه مروری روایتی است. در این مطالعه کلید واژه‌های بیوپسی مایع (Liquid biopsy)، پلاکت‌های آموزش یافته با تومور (Tumor educated platelets)، سرطان کولورکتال (Colorectal Cancer)، نشانگر زیستی (Biomarker) و شیمی درمانی (Chemotherapy) در پایگاه‌های اطلاعاتی PubMed, Scopus, web of science, google scholar جستجو شدند. در مجموع ۲۹۷ مقاله که تا دسامبر سال ۲۰۲۳ چاپ شده بودند، بررسی گردید. سپس بر اساس معیارهای ورود (وجود کلیدواژه‌ها در چکیده و مقدمه) و معیارهای خروج (شامل مصاحبه‌ها، کنفرانس‌ها، مقالات همایش‌ها، عدم دسترسی به متن کامل و مقالات تکراری)، تعداد ۴۹ مقاله انتخاب شد.

سرطان کولورکتال (CRC) سومین شکل رایج سرطان در جهان است که ۱۱ درصد از کل تشخیص‌های سرطان در سال ۲۰۱۸ (۱۰۹۶۰۰۰) و ۱۰ درصد (۱۹۳۱۵۹۰) در سال ۲۰۲۰ را شامل می‌شود (۱، ۲). CRC سومین سرطان شایع در مردان (۱۰۶۵۹۶۰) و دومین سرطان شایع در زنان (۸۶۵۶۳۰) است. بر اساس داده‌های GLOBOCAN '۲۰۲۰ سرطان کولورکتال دومین سرطان کشنده با ۹۳۵۱۷۳ مرگ پیش‌بینی شده برای سال ۲۰۲۰ است که ۹/۴ درصد از کل مرگ و میرهای ناشی از سرطان را شامل می‌شود (۲، ۳). بر خلاف سرطان‌های دیگر از قبیل سرطان ریه، هیچ عاملی به تنهایی به عنوان ریسک فاکتور برای انواع مختلف سرطان کولورکتال محسوب نمی‌شود؛ با این حال عوامل متعددی در ایجاد سرطان کولورکتال نقش دارند. مطالعات اخیر نشان داده‌اند که افراد (یا بستگانشان) با سابقه ابتلا به سرطان، پولیپ روده بزرگ، بیماری‌های التهابی روده، دیابت ملیتوس یا کوله سیستکتومی، خطر ابتلا به CRC بالاتری دارند. عوامل مرتبط با سبک زندگی مانند اضافه وزن و چاقی، عدم تحرک بدنی، سیگار کشیدن، مصرف الکل و الگوهای غذایی نامناسب (رژیم غذایی با میزان فیبر، میوه‌ها، سبزیجات، کلسیم کمتر و محصولات رژیمی و سرشار از گوشت قرمز و فرآوری شده) خطر ابتلا به CRC را افزایش می‌دهد. علاوه بر این، میکروبیوم روده، سن، جنسیت و نژاد و وضعیت اجتماعی-اقتصادی بر خطر سرطان کولورکتال تأثیر می‌گذارند (۳). CRC یک فرایند پیچیده با ترکیبی از متغیرهای بالینی و پاتولوژیک است که از روش‌هایی مانند جراحی، درمان‌های هدفمند، رادیوتراپی، ایمونوتراپی و شیمی‌درمانی برای درمان آن استفاده می‌شود. تشخیص زودهنگام دقیق می‌تواند بیماران CRC را قادر به دریافت درمان به‌موقع و دقیق‌تر نماید؛ بنابراین وجود نشانگرهای زیستی برای تشخیص، نظارت و بررسی پاسخ به یک درمان خاص و مدیریت بیماران CRC بسیار ضروری است. امروزه از نشانگرهایی مانند CEA، آنتی‌ژن سرطان ۱۹-۹، آنتی‌ژن اختصاصی پلی‌پپتیدی بافت سرم (TPS) و آنتی‌ژن پلی‌پپتیدی بافتی (TPA) و... برای این منظور استفاده می‌شود؛ اما به دلیل حساسیت و اختصاصیت پایین (وجود نتایج مثبت کاذب) و عدم

## یافته‌ها

## ۱- مروری بر انواع سرطان کولورکتال

## ۱-۱- تقسیم‌بندی بر اساس ژنتیک، اتیولوژی بیماری، منشأ و شکل

## بیان

بر اساس ژنتیک، اتیولوژی بیماری، منشأ و شکل بیان سه فرم متفاوت از CRC می‌تواند از هم متمایز شود که عبارتند از: سرطان‌های کولورکتال فامیلی (Familial)، توارثی (Hereditary) و تک گیر (Sporadic).

الف) سرطان کولورکتال تک گیر (Sporadic CRC): سرطان کولورکتال تک‌گیر شایع‌ترین نوع CRC است که هیچ شواهد آشکاری مبنی بر ارثی بودن اختلال نشان نمی‌دهند. این نوع از CRC در میان افراد مسن شایع بوده که احتمالاً به دلیل عوامل محیطی، رژیم غذایی و افزایش سن است. اکثریت قریب به اتفاق CRC، بین ۶۰ تا ۸۰ درصد، از نوع تک‌گیر هستند.

ب) سرطان کولورکتال فامیلی (Familial CRC): برای این نوع از سرطان کولورکتال که ۲۰ تا ۴۰ درصد موارد ابتلا را تشکیل می‌دهد هیچ ژن مرتبطی شناسایی نشده است و افرادی که سابقه سرطان کولورکتال در یکی از بستگان درجه یک دارند، دو تا سه برابر بیشتر از جمعیت عادی در معرض خطر هستند.

ج) سرطان کولورکتال ارثی (Hereditary CRC): این فرم از بیماری دارای ۵ نوع متفاوت است: سندرم لینچ (Lynch syndrome)، سندرم پتزر ژوگر (Peutz-Jeghers)، پولیپوزیس مرتبط با MUTYH (MUTYH-associated polyposis)، آدنوماتوز پولیپوزیس فامیلی (Familial adenomatous polyposis)، سندرم پولیپوز دندانانه‌دار (Serrated polyposis syndrome).

آدنوماتوز پولیپوزیس فامیلی (FAP): یک بیماری اتوزومال غالب که شایع‌ترین سندرم پولیپوز ارثی است و در اثر جهش در ژن APC واقع بر روی بازوی بلند کروموزوم ۵ ایجاد می‌شود. ژن APC یک ژن سرکوبگر تومور است که با تولید پروتئین APC سرعت رشد سلول‌ها را کنترل و از توسعه تومورها جلوگیری می‌کند. (۷). میانگین سنی برای افراد مبتلا به FAP برای ایجاد پولیپ ۳۵ سال است و اگر FAP تشخیص داده نشود و درمان نشود، به احتمال زیاد سرطان روده بزرگ ایجاد خواهد شد. چهار زیرگروه از FAP وجود دارد که توسط جهش‌های ژرم

لاین مختلف در ژن APC ایجاد می‌شوند عبارتند از: FAP خفیف (Attenuated FAP (AFAP))، سندرم گاردنر (Gardner syndrome)، سندرم تورکو (Turcot syndrome) و آدنوم معده و پولیپوز پروگزیمال معده (Gastric Adenocarcinoma and Proximal Polyposis of the Stomach (GAPPS)). پولیپوزیس مرتبط با MUTYH (MAP): یک بیماری اتوزومال مغلوب در اثر جهش ژرمینال دو آللی در ژن MUTYH واقع بر روی بازوی کوتاه کروموزوم ۱ ایجاد می‌شود. ژن MUTYH آنزیمی به نام MYH گلیکوزیلاز را کد می‌کند که در سیستم ترمیم Base Excision Repair نقش دارد. تعداد پولیپ‌ها در بیماری MAP کمتر از FAP بوده و از نظر فنوتیپی شبیه به FAP ضعیف شده است. میانگین سنی برای تشخیص MAP بین ۴۰ تا ۶۰ سال است. افراد مبتلا به MAP اگر تشخیص و درمان نشود، ۸۰ درصد در معرض خطر ابتلا به CRC خواهند بود. اکثر CRC‌های مورد مطالعه در افراد مبتلا به MAP، microsatellite stable هستند. اگرچه فنوتیپ MSI-H (ناپایداری ریزماهواره ای در سطح بالا) در اقلیت CRC افراد مبتلا به MAP گزارش شده است.

سندرم پتزر ژوگر (PJS): یکی از سندرم‌های پولیپوز ارثی و اختلال اتوزومال غالب نادر می‌باشد که با پولیپ‌های خوش‌خیم همارتوماتوز متعدد در دستگاه گوارش مشخص می‌شود و اغلب در روده کوچک یافت می‌شود. تعداد پولیپ‌ها در PJS کمتر از سندرم MAP بوده و این پولیپ‌ها از دوران کودکی وجود دارند. علت اصلی این بیماری جهش‌های ژرم لاین در ژن STK11 (سرین ترئونین کیناز ۱۱) که یک ژن سرکوبگر تومور و واقع در بازوی کوتاه کروموزوم ۱۹ است. جهش در این ژن ساختار و عملکرد پروتئین STK11 را تغییر می‌دهد و توانایی آن را برای مهار تقسیم سلولی با از دست دادن فعالیت کیناز مختل می‌کند. سندرم پولیپوز دندانانه‌دار (SPS): سندرم نسبتاً نادر با پولیپ‌های دندانانه دار متعدد روده بزرگ که قبلاً به عنوان سندرم پولیپوز هیپرپلاستیک شناخته می‌شد. این تومورها اغلب MSI-low یا MSS (Microsatellite Stable) در نظر گرفته می‌شوند.

سندرم لینچ (LS): شایع‌ترین سندرم ارثی سرطان کولون یک بیماری اتوزومال غالب است به عنوان سرطان کولورکتال غیر پولیپوز ارثی شناخته می‌شود و در اثر جهش‌های ژرمینال در یکی

ج) فنوتایپ جزایر CpG متیله شده (CpG Island Methylator Phenotype): مشخصه اصلی مسیر CIMP هیپر متیلاسیون گسترده پروموتورهای غنی از CPG و در نتیجه غیرفعال شدن ژن‌های سرکوبگر تومور می‌باشد (۹، ۱۰).

#### ۲: انواع روش‌های درمانی سرطان کولورکتال

پاتورنز مولکولی سرطان کولورکتال ناهمگن می‌باشد. مکانیسم‌های مولکولی پایه ای ایجاد این سرطان از نظر بالینی مهم هستند زیرا با پیش آگهی و پاسخ درمانی بیمار مرتبط می‌باشند. در طول دو دهه گذشته ارتباطات متقابل بین پاتورنز مولکولی، پیش آگهی و پاسخ درمانی در سرطان کولورکتال به طور فزاینده ای آشکار شده است (۱۱). پس از تشخیص CRC، مرحله بندی بالینی و پاتولوژیک برای تعیین گسترش موضعی و متاستاز بیماری ضروری است که به نوبه خود چهارچوبی برای تعیین پیش آگهی و درمان فراهم می‌کند (۱۲). با استفاده از متداول ترین سیستم مرحله بندی<sup>۱</sup> CRC، TNM، رامی توان به طور کلی به پنج مرحله تقسیم کرد: مرحله صفر (Carcinoma in Situ)، مرحله یک، مرحله دو (IIC، IIB، IIA)، مرحله سه (IIC، IIB، IIIA) و مرحله چهار (۱۳). مرحله بندی سرطان شدت آن را مشخص می‌کند و انتخاب روش درمانی سرطان کولورکتال به مرحله آن بستگی دارد. درمان‌های CRC شامل برداشتن با جراحی، شیمی درمانی، درمان هدفمند، ایمونوتراپی، ژن درمانی و درمان‌های ترکیبی است (۴). روش استاندارد جراحی برای درمان سرطان رکتوم، برداشتن کامل مزورکتال (رکتوم همراه با مزورکتوم و پوشش اطراف آن) است، زیرا حاوی بقایای تومور و بیشترین میزان غدد لنفاوی درگیر است (۱۱). در مراحل اولیه بیماری مانند CRC T1 ضایعات توموری پس از تشخیص ممکن است به صورت رزسکیون آندوسکوپیک مخاطی یا زیر مخاطی برداشته شوند و برای مراحل پیشرفته بیماری جراحی تنها درمان ممکن برای CRC می‌باشد (۱۴). عوامل شیمی درمانی رایج برای CRC شامل Tegafur/gimeracil/ S-1، Oxaliplatin، Capecitabine (oteracil)، Calcium folinate، Irinotecan، 5-Fluorouracil و TAS-102 (Trifluridine/Tipiracil) است. شیمی درمانی‌های CRC معمولاً ترکیبی از چندین مورد از آن عوامل شیمی درمانی

از چندین ژن ترمیم عدم تطابق DNA (MMR) مانند MSH2، MSH6، MLH1 و PSM2 ایجاد می‌شود. جهش‌های MSH2 و MLH1 اکثر موارد سندرم لینچ را تشکیل می‌دهند. ژن‌های MMR پروتئین‌هایی را کد می‌کنند که برای ترمیم مناسب عدم تطابق توالی DNA و اصلاح ناهماهنگی‌های پایه یا حذف‌ها یا درج‌های کوچک حیاتی هستند. غیرفعال شدن این ژن‌ها باعث وقفه در ترمیم DNA می‌شود و باعث تغییر در توالی‌های تکراری DNA کوتاه پشت سر هم یا ریزماهواره‌ها می‌شود و در نتیجه فنوتیپی به نام ناپایداری ریزماهواره ایجاد می‌شود که مشخصه سندرم لینچ است. این سندرم تقریباً ۳-۲٪ از کل موارد CRC را تشکیل می‌دهد. ناپایداری ریزماهواره در سطح بالا تقریباً در ۹۰ درصد از CRC‌های مرتبط با LS مشاهده شده است (۷، ۸).

#### ۱-۲: تقسیم‌بندی بر اساس ناپایداری‌های ژنتیکی و اپی ژنتیکی

بر اساس ناپایداری‌های ژنتیکی و اپی ژنتیکی سرطان کولورکتال را می‌توان به ۴ نوع تقسیم بندی نمود (۹): ناپایداری کروموزومی (Chromosome Instability, CIN)، ناپایداری ریزماهواره ای (Microsatellite Instability, MSI)، فنوتایپ جزایر CpG متیله شده (CpG Island Methylator Phenotype)، هیپومتیلاسیون سراسری DNA (DNA global hypomethylation)

الف) ناپایداری کروموزومی (Chromosome instability): تغییر در تعداد و ساختار کروموزوم‌ها منجر به آنیوپلوئیدی، subkaryotypic amplification، بازآرایی کروموزومی و ازدست‌دادن هتروزیگوسیتی در جایگاه‌های ژن‌های سرکوب گر تومور می‌شود که علت ایجاد ۸۵ درصد از CRC‌ها می‌باشد. علاوه بر این، تومورهای CIN جهش‌هایی را در انکوژن‌ها و ژن‌های سرکوبگر تومور از جمله TP53، KRAS، APC و BRAF تجمیع می‌کنند (۱۰).

ب) ناپایداری ریز ماهواره (microsatellite instability): مشخصه این نوع اختلال ناپایداری توالی‌های کوتاه تکراری DNA پشت سرهم به نام ریزماهواره‌ها است که حدود ۱۵ درصد از CRC‌ها را تشکیل می‌دهد و ممکن است ناشی از جهش در یکی از ژن‌های ترمیم عدم تطابق MMR مانند MLH1، MSH2، MSH6 و PMS2 یا خاموش شدن پروموتور MLH1 به دلیل هیپرمتیلاسیون باشد.

۱ برای مشخص نمودن مرحله سرطان از شاخص TNM استفاده می‌شود. T میزان تکر و رشد تومور ابتدایی، N<sub>۱</sub> گرفتاری گره‌های لنفاوی ناحیه مورد نظر و M وجود متاستاز بیماری را نشان می‌دهد.

شامل موارد زیر می‌باشد؛

FOLFOX (5-Fluorouracil, Calcium folinate, Oxaliplatin);  
FOLFIRI (5-Fluorouracil, Calcium folinate, Irinotecan);  
CAPEOX (Capecitabine, Oxaliplatin); FOLFOXIRI  
(5-Fluorouracil, Calcium folinate, Irinotecan, Oxaliplatin)  
همچنین برای درمان می‌توان از داروهای هدف‌مند استفاده کرد  
که می‌توان آن‌ها را به دو دسته عمده تقسیم کرد: مولکول‌های  
کوچک مهارکننده انتقال پیام و آنتی‌بادی‌های مونوکلونال.

مولکول‌های کوچک مهارکننده انتقال پیام: این مولکول‌ها می‌توانند  
سلول‌های سرطانی را با مسدود کردن مسیرهای سیگنال ضروری  
برای رشد و تکثیر تومور از بین ببرند و به صورت خوراکی، با  
ویژگی بالا و نیمه‌عمر کوتاه تجویز شوند.

آنتی‌بادی‌های مونوکلونال: با ویژگی بالا و نیمه‌عمر طولانی،  
سلول‌های تومور را از طریق بر هم‌کنش آنتی‌ژن و آنتی‌بادی  
اختصاصی شناسایی می‌کنند که عمدتاً به صورت داخل وریدی  
و بدون متابولیسم کبدی تجویز می‌شوند (۴). در حال حاضر  
داروهای متعددی برای درمان CRC تایید شده‌اند و انواع  
آزمایشات فارماکوژنتیک شامل نشانگرهای زیستی برای کمک  
به فرآیند انتخاب بیمار پذیرفته شده است که EGFR therapy و  
VEGF receptor therapies نمونه‌هایی از آن‌ها می‌باشد.

درمان‌های مبتنی بر گیرنده فاکتور رشد اپیدرمال (EGFR):  
EGFR یک گیرنده تیروزین کیناز گذرنده از غشا است که مسیرهای  
سیگنالینگ AKT, JNK, MAPK/ERK را که مسئول سنتز  
DNA، تکثیر سلولی، آپوپتوز و تحرک هستند، را تنظیم می‌کند.  
بیان بیش از حد EGFR با پیشرفت تومور در انواع مختلف سرطان  
از جمله CRC مرتبط است. مسدود کردن EGFR با استفاده از  
آنتی‌بادی‌های مونوکلونال مانند cetuximab یا panitumumab  
با ترکیب با داروهای شیمی‌درمانی منجر به پاسخ درمانی بهتری  
می‌شود. در بیماران mCRC این درمان‌ها را می‌توان با استفاده از  
یکی از ابزارهای فارماکوژنتیک مورد تأیید FDA که سطح بیان  
EGFR بیمار را اندازه‌گیری می‌کند یا جهش‌های اگزون ۲ (کدون  
۱۳/۱۲) KRAS Proto-Oncogen (KRAS) را شناسایی می‌کند،  
تنظیم کرد.

درمان‌های مبتنی بر گیرنده VEGF: گیرنده VEGF یک پروتئین  
غشایی است که حاوی یک دامنه تیروزین کیناز در سطح داخل

سلولی و هفت حوزه شبه ایمونوگلوبولین در سطوح خارج  
سلولی برای رگ‌زایی است. بیان بیش از حد VEGF منجر به  
پیشرفت تومور و متاستاز و همچنین میزان بقای کمتر بیمار  
می‌شود. Ramucirumab با تعدیل VEGFR-2، فعال‌شدن  
گیرنده VEGF-A را هدف قرار می‌دهد. Zivafibercept PIGF،  
VEGF-A و VEGF-B را با استفاده از IgG1 Fc-VEGFR خود  
مهار می‌کند و VEGF-A، bevacizumab را برای ایجاد لیگاندها  
مهار می‌کند (۱۳).

### ۳: تشخیص CRC با رویکرد مبتنی بر بیوپسی مایع

تست‌های تهاجمی و غیر تهاجمی بسیاری برای غربالگری  
CRC مورد استفاده قرار می‌گیرد. کولونوسکوپی یکی از حساس  
ترین (۸۰-۹۰٪) و اختصاصی‌ترین (۹۵-۱۰۰٪) تست‌ها برای  
غربالگری CRC است که امکان برداشتن پولیپ در طول عمل را  
امکان پذیر می‌کند (۱۵) همچنین بیومارکرهای به دست آمده از  
نمونه‌های مختلف مانند بافت، مدفوع، DNA تومور، سلول‌ها و  
miRNA مشتق از تومور موجود در نمونه خون و نشانگرهایی  
مانند CEA، آنتی ژن سرطان 9-19، آنتی ژن اختصاصی پلی  
پپتیدی بافت سرم (TPS) و آنتی ژن پلی پپتیدی بافتی (TPA)،  
سیتوکراتین ۸، ۱۸ و ۱۹... نقش مهمی در تشخیص زود هنگام و  
طبقه بندی پیش آگهی بیماری تحت درمان هدفمند CRC دارند.  
آنتی ژن کارسینو امبریونیک (CEA) گلیکوپروتئینی است که  
میزان آن در بدخیمی‌های کولورکتال افزایش می‌یابد و بیومارکر  
اصلی نشان دهنده پیش آگهی بیماری است، سطح بالای CEA با  
پیشرفت سرطان ارتباط مثبت دارد و نشان دهنده عود CRC پس  
از جراحی است که به طور گسترده مورد استفاده قرار می‌گیرد. اما  
CEA تست اختصاصی برای CRC نمی‌باشد زیرا افزایش سطح  
CEA در سایر بیماری‌ها مانند بیماری التهابی روده، متاستاز  
کبدی و پانکراتیت نیز مشاهده می‌شود. سایر تست‌های بکار رفته  
نیز همانند CEA حساسیت و اختصاصیت بالایی در تشخیص و  
پیش بینی شرایط بیمار و پاسخ دهی به درمان نداشته بنابراین  
نیاز به استفاده از بیومارکرهای تشخیصی در این بیماری مشهود  
می‌باشد (۴، ۶). روش‌های درمانی برای بسیاری از سرطان‌ها  
شامل جراحی، شیمی‌درمانی کمکی سیستمیک، پرتودرمانی،  
ایمونوتراپی و درمان هدفمند می‌باشد و گزارش‌های زیادی از  
عود به دلیل مقاومت به درمان و ناهمگونی تومور گزارش شده





است اما بیومارکر قابل اعتمادی که بتواند اثربخشی درمان را گزارش کرده و عود بیماری را پیش‌بینی کند، وجود ندارد.

بیوپسی بافت پرکاربردترین روش برای طبقه‌بندی تومورها، شناسایی نشانگرهای زیستی و استاندارد مراقبت در تشخیص و درمان سرطان است. نمونه‌های به‌دست‌آمده از بیوپسی‌ها از نظر بافت‌شناسی با افزودن نشانگرهای مولکولی و فنوتیپی مورد بررسی قرار می‌گیرند، که همگی امکان طبقه‌بندی تومور را برای درمان هدفمند شخصی‌شده فراهم می‌کنند. با این حال، بیوپسی بافت دارای محدودیت‌های متعددی است. یک روش پرهزینه و تهاجمی بوده که احتمال خونریزی، سوراخ شدن احشاء، عفونت، درد یا ناراحتی وجود دارد به‌ویژه زمانی که دسترسی به بافت هدف دشوار بوده یا در یک مکان حساس آناتومیک قرار داشته باشد. نمونه برداری از بافت تومور اطلاعاتی محدود به یک نقطه در فضا و زمان را فراهم می‌کند، بنابراین نمی‌تواند تغییرات مولکولی و ناهمگنی پیچیده تومور را به تصویر بکشد. ناهمگنی تومور، چه ژنتیکی و چه فنوتیپی، بین ضایعات اولیه و متاستاتیک در بیمارانی که با متاستازهای همزمان مراجعه می‌کنند، گزارش شده است. علاوه بر این، مشخصات مولکولی تومور به صورت پویا در طول زمان در پاسخ به فشار انتخابی اعمال شده به صورت درون‌زا (مانند سیستم ایمنی) و به صورت برون‌زا (مثلاً درمان) تغییر می‌کند همچنین نظارت بر پیشرفت بیماری از طریق بیوپسی‌های مکرر دشوار است. بررسی جامع سلول‌های ناهمگن سرطانی از نظر ژنتیکی و فنوتیپی با استفاده از روش‌های غیر تهاجمی یک چالش بزرگ برای انکولوژیست‌ها است (۱۶). برای غلبه بر این محدودیت‌ها، در سال‌های اخیر پیشرفت‌های زیادی در زمینه بیوپسی مایع وجود داشته است که به عنوان نمونه‌برداری و تجزیه و تحلیل بافت بیولوژیکی غیر جامد، مانند خون و سایر مایعات بدن (مانند ادرار، بزاق، آسیت، پلورال افیوژن، مایع مغزی نخاعی و ...) و اجزای مشتق شده از تومور یا مرتبط با تومور در نمونه‌ها با تجزیه و تحلیل DNA، ctDNA، CTCs یا RNA آزاد (cf) در گردش، اگزوزوم‌ها، TEPs، سلول‌های اندوتلیال مشتق از تومور (CTECs) و مولکول‌های پروتئینی است (۶، ۱۰، ۱۷).

با توسعه سریع فناوری‌های جداسازی سلولی و تشخیص ژن، موقعیت اصلی بیوپسی مایع در پزشکی دقیق تومور به طور فزاینده‌ای برجسته شده است. بیوپسی مایع یک روش

سریع، آسان و کم‌هزینه با حداقل تهاجم است که در مقایسه با بیوپسی بافت، این فناوری بهتر می‌تواند بر ناهمگنی تومور غلبه کرده و تشخیص مکرر را تسهیل کند. همچنین می‌تواند به عنوان یک روش غربالگری برای تشخیص سرطان‌ها در مراحل اولیه، نشان دادن حداقل بیماری باقیمانده پس از جراحی، شناسایی مشخصات مولکولی سرطان، خطر عود، اهداف درمانی، مکانیسم‌های مقاومت دارویی مورد استفاده قرار گیرد. (۱۸، ۶)

### ۳-۱: نشانگرهای پروتئینی در گردش

نشانگرهای پروتئینی در گردش، از پرکاربردترین ابزارهای تشخیصی غیرتهاجمی برای سرطان هستند. مانند: آنتی ژن اختصاصی پروستات (PSA) برای غربالگری سرطان پروستات، آنتی ژن سرطانی (CA) 3-15 برای پیگیری بعد از عمل سرطان پستان، آنتی ژن کربوهیدرات ۱۹-۹ است. (CA 19-9)، آنتی ژن کارسینومیریونیک (CEA) برای کلاژینوکارسینوم داخل کبدی (ICC)، آلفا فتوپروتئین (AFP) و آنتی ژن‌های کربوهیدرات برای غربالگری بدخیمی‌های متعدد. با این حال، به کاربردن نشانگرهای پروتئینی به تنهایی به طور قابل توجهی از نظر حساسیت و ویژگی محدود بوده و با نرخ مثبت کاذب بالا مرتبط هستند. وجود نتایج بالای مثبت کاذب در این تست‌ها باعث درمان‌های غیر ضروری و تشخیص‌های بیش از حد سرطان می‌شود، بنابراین استفاده از پانل‌ها یا امضاهای زیستی (biosignatures) شامل بیش از یک پروتئین می‌تواند رویکرد امیدوارکننده‌تری باشد، زیرا ترکیب بیومارکرهای متعدد با کاهش تعداد مثبت کاذب و منفی کاذب، قابلیت تشخیصی و یا پیش‌آگهی‌سنجش را افزایش می‌دهد (۱۹، ۲۰).

**DNA بدون سلول (Cell free DNA):** قطعات DNA شناور از پلاسما برای اولین بار در اوایل سال ۱۹۴۸ شناسایی شدند ولی برای مدت طولانی مورد توجه قرار نگرفتند (۵). حدود یک دهه بعد، مشخص شد که سلول‌های سرطانی سهم عمده‌ای از مجموع cfDNAهای موجود در پلاسما و رسوبات ادراری دارند (۲۱). بعدها مشاهده شد که سطح DNA آزاد پلاسما در بیماران توموری، به ویژه در بیماران با تومور پیشرفته، به طور قابل توجهی بالاتر از افراد سالم بود در نتیجه، حدس زده شد که میزان DNA آزاد ممکن است با بدخیمی‌ها مرتبط بوده و بعضی از cfDNAها از سلول‌های تومور مشتق شده باشند (۵). cfDNA

آن‌ها محدود است. در مقابل، پلتفرم‌های NGS حساسیت کمتری دارند (تشخیص جهش‌ها با فرکانس کمتر از ۱٪)، اما می‌توانند جهش‌های ژنوم ناشناخته DNA را شناسایی کنند. متأسفانه، استفاده معمول از پلتفرم‌های NGS در کلینیک در حال حاضر به دلیل هزینه‌های بالای آن‌ها محدود شده است. راه حلی که اغلب مورد بررسی قرار می‌گیرد، ترکیبی از دو تکنیک است، NGS اولین نمای گسترده و اکتشافی از مشخصات جهش را ارائه می‌دهد، با dPCR که برای اعتبارسنجی نتایج NGS و نظارت بر جهش‌های شناسایی شده در طول زمان، صرفه جویی در منابع استفاده می‌شود. این فناوری‌ها اکنون می‌توانند کوچک‌ترین مقادیر ctDNA را در «دریای» DNA آزاد در گردش طبیعی که پیش‌نیاز برای تشخیص زودهنگام سرطان یا حداقل بیماری باقی‌مانده (MRD) است، شناسایی کنند و با کمی سازی و تجزیه و تحلیل آن اطلاعات بالینی مرتبطی در مورد بار تومور، مرحله، واسکولاریتی و پاسخ درمانی ارائه دهد (۱۶). تشخیص زودهنگام سرطان یکی از کاربردهای اصلی آزمایش‌های خون ctDNA است که در سال‌های اخیر مورد توجه گروه‌های دانشگاهی، فروشندگان تجاری و رسانه‌ها قرار گرفته است. چشم انداز تشخیص سرطان قبل از هر گونه علائم بالینی یا نکات حاصله از روش‌های تصویربرداری مورد استفاده برای غربالگری سرطان (مانند ماموگرافی برای سرطان سینه یا CT اسکن با دوز پایین برای سرطان ریه) منجر به توسعه سنجش‌های فوق حساسی شده است که جهش‌ها، انحرافات تعداد کپی یا متیلاسیون روی ctDNA در مقادیر بسیار کم (معمولاً کمتر از ۰٫۱٪) وجود دارد را هدف قرار می‌دهد.

مطالعات در باره ctDNA برای جایگزینی آن‌ها به جای نشانگرهای تومور منفرد برای تشخیص ضایعات توموری کوچک مانند آنتی‌ژن کارسینوما بیونیک باهدف تشخیص زودهنگام سرطان شروع شد؛ با این حال، علی‌رغم پیشرفت‌های عظیم در فناوری‌های ctDNA به نظر می‌رسد بیولوژی توسعه سرطان قوی‌ترین محدودیت در این زمینه باشد. از آنجایی که ساختار ژنتیکی تومور "مخفی" ناشناخته است، سنجش ctDNA باید حداقل شایع‌ترین انحرافات ژنومی در ژن‌های سرطانی احتمالی را در بر گیرد. امروزه چندین فناوری این الزامات را برآورده می‌کنند و در حال حاضر برای تشخیص زودهنگام

ها قطعات DNA دو رشته‌ای با اندازه‌ی تقریبی ۱۵۰ جفت باز است که توسط مکانیسم‌های مختلفی از جمله آپویتوز سلولی، نکروز و آگزوسیتوز در گردش خون آزاد شده و در اکثر مایعات بدن از جمله پلاسما، ادرار، بزاق، مایع جنب و مایع مغزی نخاعی قابل اندازه‌گیری است. در حال حاضر، موفقیت‌آمیزترین کاربرد cfDNA در کلینیک‌ها احتمالاً استفاده از آن در آزمایش‌های قبل از تولد برای آنیوپلوئیدی جنین است، اگرچه فراوانی cfDNA در نتیجه عواملی مانند ورزش، تروما، عفونت و سرطان افزایش می‌یابد، مقدار cfDNA اندازه‌گیری شده در افراد سالم و گروه‌های مختلف بیماران به طور قابل توجهی متفاوت است. در میان افراد سالم و بیماران بدون سرطان، غلظت cfDNA پلاسما از غیرقابل شناسایی تا تقریباً ۳۰ نانوگرم در میلی‌لیتر متغیر است، در حالی که در بیماران سرطانی معمولاً ۳۰ تا ۱۸۰ نانوگرم در میلی‌لیتر است. نیمه عمر cfDNA در پلاسما بین ۳۰ دقیقه تا ۲ ساعت و در ادرار تا ۵ ساعت است. از این رو، cfDNA می‌تواند به عنوان یک نشانگر زیستی پویا برای نمایش بار بیماری در یک زمان مشخص (لحظه‌ی نمونه‌گیری) عمل کند (۲۱، ۲۲).

**DNA توموری در گردش (ctDNA):** حضور ctDNA در خون برای اولین بار در سال ۱۹۴۸ مورد بررسی قرار گرفت. ctDNA نسبتی از DNA بدون سلول (cfDNA) در گردش است که از سلول‌های سرطانی منشا می‌گیرد، این نسبت بسیار متغیر بوده و بسته به نوع تومور، اندازه، محل آن و مرحله بندی تومور می‌تواند از ۰٫۱٪ تا بیش از ۱۰٪ از کل cfDNA متغیر باشد. طول این قطعات در صورتیکه در ارتباط با نوکلئوزوم باشند ۸۰ تا ۲۰۰ جفت باز بوده و اگر بیش از ۱۰ کیلوباز طول داشته باشند در داخل Evs محصور می‌شوند (۱۹). میزان ctDNA در خون بسیار پایین می‌باشد و فناوری‌های تشخیص مولکولی بسیار حساس و پیشرفته و همچنین روش‌های جداسازی اختصاصی ctDNA مورد نیاز است. توسعه سریع فناوری‌های مولکولی جدید، مانند NGS و PCR دیجیتال (dPCR) کاربردهای بالینی ctDNA را تسهیل کرده است. به طور خاص، dPCR به دلیل هزینه کم و حساسیت بالا به طور گسترده‌ای استفاده می‌شود که امکان تشخیص جهش‌هایی که فرکانس آن‌ها کمتر از ۰٫۱٪ است را می‌دهد. با این وجود، روش‌های مبتنی بر PCR فقط می‌توانند جهش‌های شناخته شده را غربال کنند، بنابراین کاربردهای بالینی



شخصی سازی و هدفمند کردن درمان، بررسی پیش آگهی، عود، نرخ زنده مانی، مشخص نمودن حداقل بیماری باقیمانده و ... در بیماران مبتلا به سرطان‌های مختلف مانند سرطان پستان (۲۴)، سرطان ریه (۲۵)، گلیوما (۲۶) و بسیاری از سرطان‌ها با تومورهای جامد (۲۷) انجام شده است.

در یک مطالعه کوهورت چند مرکزی آینده نگر، ctDNA پلاسما در بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال مرحله I تا III مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. ctDNA در ۱۰۸ نفر از ۱۲۲ بیمار (۸۸/۵٪) قابل تشخیص بود. علاوه بر این، مشخص شد که احتمال عود بیماران ctDNA مثبت ۷ برابر بیشتر از بیماران ctDNA منفی در روز ۳۰ بعد از عمل است. پس از درمان منظم، بیماران ctDNA مثبت بیش از ۴۰ برابر بیشتر از بیماران دارای ctDNA منفی در معرض عود سرطان در طول مراقبت بودند. اعتقاد بر این است که ctDNA ممکن است برای طبقه بندی خطر (risk classification)، نظارت بر شیمی درمانی کمکی (adjuvant chemotherapy surveillance) و تشخیص زودهنگام عود در CRC مفید باشد (۲۸). متاستاز دوردست یکی از دلایل پیش آگهی ضعیف CRC است. سطوح نسبتاً بالایی از ctDNA در پلاسما بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال متاستاز داده به کبد (colorectal cancer liver metastasis patients, CRLM) تشخیص داده شده است. یک مطالعه گذشته نگر تک مرکزی برای بررسی تاثیر ctDNA بر نرخ زنده مانی (Overall Survival, OS) بیماران که تحت هپاتکتومی اولیه برای CRLM قابل برداشت قرار گرفتند، انجام شد. در این مطالعه، آن‌ها دریافتند که بیماران که قبل از جراحی تحت تشخیص ctDNA قرار گرفتند، میزان عود بالایی داشتند (۲۹). علاوه بر این، در یک مطالعه دیگر مشخص شد که در بیماران با CRLM خارج شده بیماران که پس از مداخله درمانی میزان ctDNA آن‌ها قابل تشخیص بود زنده مانی بدون عود (Relapse-Free Survival, RFS) و نرخ زنده مانی بسیار پایینی نسبت به بیماران با ctDNA غیر قابل تشخیص داشتند (۳۰).

سلول‌های توموری در گردش (CTC): سلول‌های تومور در گردش برای اولین بار در سال ۱۸۶۹ زمانی که توماس اشورث گروه کوچکی از سلول‌های توموری با منشأ بافت سرطانی را در جریان خون یک بیمار مبتلا به سرطان متاستاتیک شناسایی کرد، توصیف شد. این سلول‌ها می‌توانند از محل‌های اولیه مانند

سرطان در حال آزمایش هستند. علاوه بر این، گروه‌های تحقیقاتی پروتئین‌های در گردش را به این مجموعه اضافه کرده و از الگوریتم‌های یادگیری ماشینی برای ایجاد یک سنجش بیومارکر مرکب استفاده کرده‌اند. پیشرفت‌های فنی، سنجش‌های ctDNA را بسیار خاص‌تر کرده است، اما گزارش‌های اخیر نشان می‌دهد که افراد مسن پیش‌زمینه‌ای از جهش‌ها از جمله ژن‌های محرک سرطان را نشان می‌دهند که لکوسیت‌ها منبع اصلی آن هستند، جهش‌های "خون سازی کلونال با پتانسیل نامشخص" (CHIP) باید اندازه گیری شده و این جهش‌ها از مجموعه کل انحرافات ctDNA که در هر بیمار یافت می‌شود حذف شوند. با این حال، علاوه بر جهش‌های CHIP، منابع دیگری از جهش‌های «پس‌زمینه» ممکن است وجود داشته باشد، که اخیراً توسط توالی‌یابی تک سلولی پیچیده آشکار شده است (۲۳).

با تجزیه و تحلیل ctDNA می‌توان به اطلاعات کمی و کیفی در ارتباط با بیماری دست یافت. اطلاعات کمی بازتابی از بار تومور است و از اندازه گیری کسر آلل جهش یافته (درصد آلل جهش یافته در یک مکان مشخص) به دست می‌آید که در تشخیص حداقل بیماری باقیمانده (MRD)، متاستازهای پنهان و نظارت بر پاسخ و اثربخشی درمانی کاربرد دارد. اطلاعات کیفی نیز از طریق بررسی پروفایل جهش‌ها، آمپلیفیکیشن‌ها، حذف‌ها و جابجایی‌ها در ctDNA به دست می‌آید که امکان شناسایی تغییرات ژنتیکی مرتبط با پاسخ را فراهم می‌کند، در نتیجه از تصمیم گیری برای مدیریت شخصی حمایت می‌کند.

اولین آزمایش تشخیصی مبتنی بر ctDNA (cobas1 EGFR Mutation Test v2؛ Roche Diagnostics)، برای راهنمایی استفاده از مهارکننده تیروزین کینازی گیرنده‌های فاکتور رشد اپیدرمی بر اساس جهش‌های خاص حساس کننده EGFR در بیماران مبتلا به سرطان ریه سلول غیر کوچک (NSCLC) اخیراً مورد تایید FDA قرار گرفته است. Epi proColon1 تست دیگری که FDA آنرا تایید کرده است، آزمایش غربالگری برای سرطان کولورکتال می‌باشد و الگوی متیلاسیون پروموتور ژن SEPT9 که در CRC در مقایسه با نمونه‌های غیر بدخیم هیپرمتیله است را تجزیه و تحلیل می‌کند (۱۹).

در سال‌های اخیر مطالعات مختلف مبتنی بر ctDNA به عنوان ابزاری برای تشخیص زودرس، غربالگری، نظارت بر درمان،

مورفولوژی و خواص مولکولی خود را تغییر می‌دهند تا خود را تهاجمی تر و پیش رونده تر کنند. در روش غیرفعال، CTC ها متحرک هستند و توسط نیروهای خارجی به داخل گردش خون کشیده یا رانده می‌شوند.

در طول CTC، EMT با کاهش نشانگرهای اپیتلیال مانند مولکول‌های چسبندگی سلول‌های اپیتلیال (EPCAM)، سیتوکراتین‌ها (CKs)، E-cadherin، و به تبع آن افزایش بیان نشانگرهای مزانشیمی مانند N-cadherin و vimentin، ویژگی‌های اپیتلیال خود را به فنوتیپ مزانشیمی برنامه ریزی مجدد می‌کنند. EMT از طریق هماهنگی بازیگران درون سلولی و خارج سلولی القا و تنظیم می‌شود. هنگامی که توسط برخی عوامل خارج سلولی مانند فاکتور رشد تبدیل کننده بتا (TGFβ)، فاکتور رشد اپیدرمی (EGF)، فاکتور رشد کبدی (HGF)، فاکتور رشد شبه انسولین (IGF) و فاکتور رشد فیبروبلاست (FGF) تحریک می‌شود، فاکتورهای رونویسی از جمله Twist، Snail، Slug و Zeb را برای حفظ ویژگی‌های مزانشیمی فعال می‌کند. در نتیجه، سلول‌های اپیتلیال به خوبی سازماندهی شده و به هم متصل شده، اتصالات محکم با یکدیگر را شل می‌کنند و تعامل با ماتریکس سلولی را برای به دست آوردن توانایی جدا شدن از کانون‌های تومور را از دست می‌دهند. به طور قابل توجهی، فعال‌سازی EMT منجر به ایجاد سلول‌های واسطه‌ای می‌شود که به عنوان سلول‌های بنیادی سرطانی (CSCs) تعریف می‌شوند، که حالتی بین اپیتلیال و مزانشیمی دارند (۳۱). شواهد قابل توجهی وجود دارد که نشان می‌دهد بسیاری از سرطان‌ها توسط سلول‌های بنیادی سرطانی (CSCs) که جمعیتی از سلول سرطانی با ویژگی‌های سلول‌های بنیادی مانند خود تجدید پذیری و تمایز به انواع مختلف سلولی هستند، یا سلول‌های شروع کننده تومور که سلول‌های شروع کننده متاستاز (MIC) در مکان‌های متاستاتیک نامیده می‌شوند، هدایت می‌شوند. سلول‌های بنیادی سرطان جمعیتی از سلول سرطانی با ویژگی‌های سلول‌های بنیادی مانند خود تجدید پذیری و تمایز به انواع مختلف سلولی هستند (۳۳). در حین گردش CTCها در محل انشعابات عروقی به دلیل محدودیت اندازه متوقف شده سپس آنزیم‌های ترشح شده بر اثر ایمنی CTC ها مانند ماتریکس متالوپروتئینازها (MMPs) و VEGF نفوذپذیری اندوتلیال را افزایش داده و باعث خارج شدن

(مانند سینه، کولورکتوم، تخمدان، کبد، لوزالمعده، پروستات و ریه) از طریق سیستم گردش خون به نقاط دوردست بدن منتشر شوند اما وجود آنها لزوماً به معنای میکرومتاستاز نمی‌باشد (۲۳). CTC ها کلون‌های یکدیگر نیستند، برخی از جمعیت‌های آنها دارای هویت‌های مشابه می‌باشند اما بیشتر آنها ویژگی‌های ناهمگن را در مراحل و انواع مختلف تومورهای بدخیم نشان می‌دهند. هنگامی که این سلول‌ها سیگنال‌های خاصی را از یک ریزمحیط در حال تغییر دریافت می‌کنند یا توسط استرس درمانی (therapeutic stress) تحریک می‌شوند، فنوتیپ و خواص مولکولی خود را تغییر می‌دهند. بنابراین، بیوپسی مایع بر اساس آنالیز CTC برای ارزیابی ناهمگنی تومور نسبت به بیوپسی بافت بیولوژیکی جامد امکان پذیرتر و کمتر تهاجمی است (۳۱). CTC ها در مرحله میانی آبشار متاستاتیک حضور دارند. سلول تومور موقعیت متاستاتیک یا تومور اولیه را ترک کرده و وارد عروق خونی یا لنفی شده و قبل از اینکه در یک موقعیت دیگر بافت توموری ایجاد کند در خون گردش می‌کند، از طریق سیستم گردش خون به اندام‌های دوردست منتقل شده و ایجاد متاستاز کنند همچنین می‌توانند وارد مغز استخوان شده و برای مدت زمان نامشخص در حالت غیر فعال باقی بمانند که در این حالت به آنها سلول‌های تومور منتشر شده (DTCs) اطلاق می‌شود. روزانه میلیون‌ها سلول توموری از تومور اولیه خارج می‌شوند. اما به دلیل نظارت ایمنی، فقدان فاکتورهای رشد، استرس اکسیداتیو، سیتوکین‌ها، آنوکیس (anoikis)، نیروهای برشی و استرس‌های فیزیکی تنها در حدود ۱ تا ۱۰ سلول در هر میلی لیتر خون می‌توانند زنده بمانند. این سلول‌ها در جریان خون به شکل سلول‌های منفرد یا خوشه‌ای یافت می‌شوند. CTC‌های خوشه‌ای پتانسیل متاستازی بیشتر و نیمه عمر کمتری (۶ تا ۱۰ دقیقه) نسبت به سلول‌های منفرد (۲۵ تا ۳۰) دارند (۳۲). اولین قدم برای CTCها برای شرکت در آبشارهای متاستاتیک، دسترسی به عروق پروگزیمال است که می‌توانند به دو روش فعال و غیرفعال این عمل را انجام داده و وارد جریان خون شوند.

در حالت فعال، CTCها متحرک هستند و به طور مستقیم مهاجرت می‌کنند. با روش انتقال اپیتلیال-مزانشیمی (epithelial-mesenchymal transition, EMT) از غشای پایه عبور کرده و به لایه اندوتلیال نفوذ می‌کنند. برای انجام این کار، CTC ها

EMT سلول‌های سرطانی دارای تغییرات مولکولی از جمله کاهش بیان نشانگرهای اپیتلیال ZO، E-cadherin، Claudins، و Occludin و افزایش بیان نشانگرهای مزانشیمی، vimentin و N-cadherin، پروتئین اختصاصی فیرو بلاست ۱، و فیبرونکتین می‌باشد. همچنین برای انجام EMT وجود فاکتورهای رونویسی مرتبط با آن که عمدتاً به خانواده‌های TWIST، SNAIL، و ZEB تعلق دارند ضروری است. از نظر تئوری همه این مولکول‌های مرتبط با EMT می‌توانند برای روش‌های هدف‌گیری EMTCTC استفاده شوند.

از نظر بالینی، ترکیب تعداد کل CTC و کسر CTC‌های مزانشیمی می‌تواند برای پایش مقاومت درمانی و پیش‌بینی پیش‌آگهی در بیماران سرطانی به دلیل تفاوت‌های قابل توجه بقای این معیار استفاده شود. با توجه به تعداد بسیار کم CTC‌ها در خون بیماران، جداسازی دقیق CTC‌ها از میان سلول‌های خونی متعدد و به ویژه ابداع روش‌های قابل اجرا که می‌توانند به طور موثر CTC‌های زنده را برای تجزیه و تحلیل عمیق بعدی شناسایی کنند، چالش بزرگی است.

به طور کلی، سه استراتژی اصلی برای فناوری‌های CTC وجود دارد که شامل (۱) ضبط و غنی‌سازی، (۲) تشخیص و شناسایی و (۳) آزادسازی می‌شود. مرحله اول جذب و غنی‌سازی می‌باشد که با استفاده از روش‌های فیزیکی (استفاده از تفاوت در اندازه، چگالی، تغییر شکل پذیری و خواص الکتریکی CTC‌ها با سایر سلول‌های خونی)، فناوری مبتنی بر ویژگی‌های بیولوژیکی، تعامل بین آنتی‌بادی-آنتی ژن مانند سیستم CellSearch (تنها دستگاه مورد تایید FDA برای استفاده بالینی) که از دانه‌های فرومغناطیسی با پوشش آنتی‌بادی EpCAM برای غنی‌سازی CTC‌های DAPI-/CD45+ /CK+ و حذف WBC‌های CK-/DAPI+ استفاده و CTC‌ها را از سایر سلول‌های خونی جداسازی می‌کند. دومین مرحله، شناسایی CTC‌هاست که به روش‌های مختلفی مانند میکروسکوپ فلورسانس، اسپکتروفتومتری فلورسانس، فلوسیتومتری، پراکندگی رامان ارتقا یافته سطحی یا امپدانس الکتریکی صورت می‌گیرد. در آخرین مرحله، از CTC‌های آزاد شده عمدتاً برای تجزیه و تحلیل پایین دستی، مانند ژنومیک، ترانس کریپتومیکس، پروتئومیکس و کشت CTC‌ها استفاده می‌شود. به طور کلی، روش‌های مبتنی

CTC‌ها از عروق می‌شوند. تومورهای تهاجمی روزانه هزاران سلول سرطانی را در گردش خون آزاد می‌کنند. با این حال، میزان متاستاز بسیار پایین می‌باشد. تشکیل و پیشرفت متاستاز به رفتار خوشه CTC در طول مراحل مختلف آبشار متاستاتیک و محافظت از آن‌ها در برابر استرس همودینامیک بستگی دارد همچنین سلول‌های سرطانی باید با ریزمحیط جدید سازگار شوند، جایی که در معرض تعامل با انواع سلول‌های استروما، سیگنال‌های قابل انتشار و پروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی، سیگنال‌های تمایزی و بازدارنده رشد، برهم‌کنش با سلول‌های مقیم در لانه و سیگنال‌های مضر قرار دارند (۳۴). برای تشخیص CTC در سرطان‌های مختلف از پانل‌های مولکولی استفاده می‌شود. از آنجایی که بیشتر سرطان‌ها منشأ اپیتلیالی دارند، رایج‌ترین نشانگر مورد استفاده برای CTC‌ها EpCAM است، بیان EpCAM در میان انواع مختلف سرطان متفاوت است و زیرگروه قابل توجهی از CTC‌ها EpCAM مثبت می‌باشد و فناوری‌های تشخیص CTC مبتنی بر EpCAM به طور گسترده برای سرطان‌هایی مانند سرطان سینه و پروستات که EpCAM را به میزان بالایی بیان می‌کنند، استفاده می‌شود. اما استفاده از EpCAM به عنوان نشانگر CTC دارای محدودیت‌هایی است. زمانی که CTC‌ها تحت تاثیر EMT قرار می‌گیرند میزان بیان نشانگرهای اپیتلیال مانند EpCAM، کاهش می‌یابد، در برخی از انواع سرطان، مانند بیماران مبتلا به سرطان ریه با سلول غیر کوچک (NSCLC)، حتی مشخص شد که مقدار CTC‌های EpCAM منفی به طور قابل توجهی بیشتر از CTCs با EpCAM مثبت است یا در تومورهایی مانند سرطان‌های نوروزنیک که بیان EpCAM کم یا منفی است نمی‌توان از آن استفاده کرد. برای غلبه بر این مشکل می‌توان به طور همزمان از هر دو نشانگر اپیتلیال و مزانشیمی با روش‌های تشخیص مستقل از نشانگر استفاده کرد. به عنوان مثال، در سرطان سینه، استفاده از نانوذرات فلورسنت مغناطیسی متشکل از یک رابط آنتی‌بادی دوگانه که هم EpCAM و هم N-cadherin را هدف قرار می‌دهد، به جداسازی با کارایی بالا و شناسایی سریع CTC‌ها کمک کرده است. در سرطان مجرای صفراوی، سنجش تک سلولی برای تشخیص CTC‌ها باعث شناسایی هر دو نوع CTC اپیتلیال و CTC‌های غیر متعارف که فاقد نشانگرهای اپیتلیال و لکوسیتی بودند، گردید. برنامه

است که تحت درمان جراحی قرار می‌گیرند. فراتر از شمارش، با بررسی CTC ها در سطح ژنومی، ترانسکریپتومی، پروتئومی و ترشحی می‌توان اطلاعات مولکولی و عملکردی در مورد تومور ارائه داد. آنالیز CTC ها، ژنوتیپ تومور در زمان واقعی و شناسایی نشانگرهای زیستی با ارزش پیش‌آگهی و مکانیسم‌های مقاومت دارویی را امکان‌پذیر می‌کند.

تجزیه و تحلیل CTC ها همچنین می‌تواند برای ارزیابی EMT در سلول‌های بدخیم مشتق از CRC، که با یک فنوتیپ تهاجمی، مقاوم به بسیاری از خطوط شیمی‌درمانی و درمان‌های هدفمند و همچنین پتانسیل متاستاتیک بالا مرتبط است، استفاده شود. شناسایی نشانگرهای سطح سلولی مزانشیمی، مانند VIM، ANS، SNA11، TWIST1، AKT2، ممکن است به مرحله‌بندی تومور و ارزیابی گسترش متاستاتیک در بیماران مبتلا به CRC کمک کند. به طور خاص، شناسایی آنتی‌ژن‌های سطحی سلول‌های بنیادی سرطان کولون با مارکرهای CD44، CD44v6، و CD133 در ارزیابی وجود متاستازهای کبدی در بیماران مبتلا به بیماری در مرحله پیشرفته مفید است و امکان توسعه یک درمان هدفمند کبدی ک با یک نتیجه بهبود یافته را فراهم می‌کند. پروفایل ژنتیکی CTC ها با استفاده از هیبریداسیون ژنومی مقایسه‌ای آرایه‌ای و توالی‌یابی نسل‌بندی امکان‌شناسایی نشانگرهای مرتبط با مقاومت در برابر درمان‌های ضد EGFR، مانند جهش‌های KRAS را فراهم می‌کند. حضور هر دو نوع وحشی KRAS و CTC‌های جهش‌یافته با KRAS در نمونه خون به دست آمده از یک بیمار، ناهمگنی درون‌توموری ژنتیکی را تایید می‌کند. در مطالعه‌ای وجود جهش KRAS در CTC‌ها با جهش در تومور اولیه با تطابق ۷۱ درصد همبستگی داشت که باز هم ناهمگنی زمانی و مکانی تومور را تایید می‌کند (۳۷).

**اگزوزوم‌ها (Exosomes):** وزیکول‌های خارج سلولی ذرات غشایی هستند که از انواع سلول‌ها تحت شرایط فیزیولوژیکی و پاتولوژیکی و همچنین به دنبال انواع مختلف محرک‌ها از جمله پروتئازها، ADP، ترومبین، سایتوکاین‌های التهابی، فاکتورهای رشد، برش بیومکانیکی، تحریک‌کننده‌های استرس و سیگنال‌های آپوپتوز آزاد شده و تقریباً در تمام مایعات بدن، به ویژه خون یافت می‌شوند (۱۹). وزیکول‌های خارج سلولی را می‌توان به طور کلی به سه دسته طبقه‌بندی کرد: اگزوزوم‌ها،

بر خواص فیزیکی عموماً اختصاصیت و خلوص پایینی دارند و تکنیک‌های مبتنی بر EpCAM به خاطر ناهمگونی بالای آنتی‌ژن سطحی CTC توانایی جداسازی با خلوص بالای CTC‌هایی که بیان EpCAM پایینی دارند را نداشته، بنابراین ترکیب فناوری‌های مختلف، تکنیک‌های جستجوی CTC با حساسیت بالا و استفاده از نشانگرهای تومور خاص می‌تواند تا حدودی به این مشکلات غلبه کند. اخیراً، با توسعه تراشه‌های میکروسیال، نانومواد و تکنیک‌های توالی‌یابی نسل‌بندی، محققان پیشرفت‌های زیادی در زمینه فناوری‌های مرتبط با CTC دارند (۳۵).

مزیت استفاده از CTC‌ها برای نظارت بر رویدادهای جهش جدید، جمع‌آوری غیرتهاجمی نمونه‌ها، توانایی به دست آوردن آسان نمونه‌ها در طول زمان، و احتمالاً کاهش خطر سوگیری نمونه‌گیری است. به طور خاص، در بیماری متاستاتیک، تجزیه و تحلیل CTC امکان تجزیه و تحلیل تومور بیمار را فراهم می‌کند، زمانی که بیوپسی یک ضایعه متاستاتیک ممکن است بسیار خطرناک یا غیرممکن باشد. با این حال، چالش‌هایی برای استقرار این فناوری‌های CTC در مراقبت‌های بالینی وجود دارد، از جمله فقدان تکنیک‌های غنی‌سازی استاندارد، تعداد کمی از CTC‌هایی که در مراحل اولیه بیماری یافت می‌شوند و نیاز به فناوری تخصصی برای جداسازی و تجزیه و تحلیل DNA از سلول‌های محدود. تجزیه و تحلیل CTC احتمالاً مکمل روش‌های فعلی، از جمله تجزیه و تحلیل تومور اولیه است، اگرچه ممکن است نیاز به بیوپسی‌های مکرر ضایعات متاستاتیک را کاهش دهد (۳۶). در سرطان کولورکتال متاستاتیک (mCRC)، تعداد CTC‌ها قبل و در طول دوره درمان یک فاکتور پیش‌بینی‌کننده قوی برای بقا است. CTC‌های قابل تشخیص در بیماران با mCRC با افزایش ۲/۵ برابری احتمال مرگ و دو برابری احتمال افزایش پیشرفت و عود بیماری در ارتباط هستند.

در بررسی روند درمان و عود بیماری مشخص شده است که سطح CTC‌ها نشانگر پاسخ درمانی است. کاهش تعداد CTC‌های قابل تشخیص به کمتر از ۳ در ۲ هفته پس از شروع شیمی‌درمانی مبتنی بر اگزالیپلاتین نشان‌دهنده‌ی اثربخشی درمان است. در مقابل، افزایش مداوم سطوح CTC با یک بدخیمی تهاجمی همراه با مقاومت به شیمی‌درمانی همراه است و این یک پیش‌بینی‌کننده قوی برای عود در بیماران با مرحله بیماری II/III

اگزوزومی پایین تر، DFS و OS بهتری نسبت به آن‌هایی که سطوح CPNE3 اگزوزومی در آن‌ها بالاتر بود، داشتند. تشخیص زود هنگام سرطان کولورکتال برای بهبود نتایج بیمار بسیار مهم است. ریز محیط تومور بلافاصله با تغییرات بدخیم، از جمله فعال شدن فیرو بلاست ها در بافت همبند مجاور، سازگار می‌شود. QSOX1، پروتئینی که به طور قابل توجهی در فیرو بلاست‌های فعال و اگزوزوم‌های پلاسمای خون در گردش بیماران CRC کاهش می‌یابد. از این رو، بررسی سطح QSOX1 مرتبط با اگزوزوم ها در پلازما یک پلت فرم امیدوارکننده برای غربالگری تشخیصی CRC است (۴۰).

در یک مطالعه نشان داده شد که بیان پروتئین پرین سلولی اگزوزومی (PrP) که رفتار سلول‌های CRC و پیشرفت تومور را تنظیم می‌کنند تحت شرایط هیپوکسیک ریز محیط تومور در CRC افزایش می‌یابد. با استفاده از یک آنتی بادی بر علیه PrP به همراه 5-fluorouracil بیان PrP و پیشرفت CRC در فرد بیمار به طور قابل توجهی مهار شد. روی هم رفته، این یافته‌ها نشان می‌دهند که مصرف همزمان آنتی بادی ضد PrP و داروهای ضد سرطان ممکن است یک استراتژی درمانی مؤثر در سرطان کولورکتال باشد (۴۱). MicroRNA ها (miRNAs) به عنوان انکوژن یا سرکوبگر تومور در سرطان از طریق مکانیسم‌های مختلف تنظیم می‌شوند آن‌ها توانمند ریز محیط تومور را تنظیم کرده و بر رگزایی، تهاجم ایمنی تومور و برهمکنش‌های تومور-استرومایی تأثیر بگذارند. miRNAهای در گردش که از آسیب بافتی و آپوپتوز سلولی منشأ می‌گیرند، ممکن است از طریق ترشح میکرو و زیکول ها و اگزوزوم ها وارد جریان خون شوند. مطالعات مختلفی بر روی miRNAهای اگزوزومی در گردش در CRC و نقش آن‌ها در تشخیص، پیشرفت و درمان CRC صورت گرفته و نشان داده شده است که میزان بیان miR-125a-3p و miR-320c در اگزوزوم‌های پلاسمایی بیماران مبتلا به سرطان کولون در مراحل اولیه افزایش می‌یابد (۴۲). بیان miR-17-92a با عود بیماری ارتباط دارد و میزان بیان آن در بیماران CRC نسبت به افراد نرمال افزایش بیان دارد (۴۳). افزایش میزان miR-27a و miR-130a اگزوزومی با پیش آگهی ضعیف در CRC همراه است، از بررسی این دو نشانگر در کنار هم می‌توان برای تشخیص زود هنگام و پیش بینی پیش آگهی

میکرو و زیکول‌ها و اجسام آپوپتوز. اگزوزوم ها در لایه‌های لیپیدی مشتق از اندوزوم با قطر تقریباً ۳۰ تا ۱۵۰ نانومتر و حاوی طیف وسیعی از مولکول‌های فعال زیستی مانند اسیدهای نوکلئیک، لیپیدها و پروتئین‌ها هستند که توسط تمام سلول‌های زنده از جمله سلول‌های طبیعی و تومور ترشح شده و در مایعات بیولوژیکی مانند پلازما، سرم، ادرار، بزاق، صفرا، شیر مادر و مایعات مغزی نخاعی یافت می‌شوند. اگزوزوم ها برای اولین بار در سال ۱۹۸۱ توسط EG Trams در رتیکولوسیت‌های گوسفند کشف و ۶ سال بعد توسط جانستون نامگذاری گردید. در سال ۱۹۹۶ G. Raposo نوعی اگزوزوم مشتق از سلول B را کشف کرد که می‌تواند مستقیماً در پاسخ ضد توموری سلول‌های CD4+ شرکت کند. دو سال بعد، L. Zitvogel و همکاران تایید کرد که DCها همچنین می‌توانند اگزوزوم ها را آزاد کنند و اثر ضد توموری وابسته به سلول T را افزایش دهند. با پیشرفت تحقیقات اگزوزوم، مشخص شد که آن‌ها نقش مهمی در ارائه آنتی ژن، تمایز سلولی، رشد، پاسخ ایمنی تومور، مهاجرت سلول‌های تومور و تهاجم دارند (۵). اگزوزوم ها بسیار ناهمگن هستند و احتمالاً وضعیت فنوتیپی سلولی را که آن‌ها را تولید می‌کند منعکس می‌کنند (۳۸)، محموله اگزوزومی که عمدتاً وابسته به سلول مبدا می‌باشد شامل پروتئین‌های اسکلت سلولی، غشایی و شوک حرارتی، لیپیدها، آنزیم‌ها و اسیدهای نوکلئیک کد کننده و غیر کد کننده، عمدتاً mRNA، miRNA و همچنین DNA تک رشته‌ای و دو رشته‌ای است، می‌تواند به سلول‌های گیرنده مجاور یا دور منتقل شده و مسیرهای سیگنال دهی درون سلولی، بیان ژن و فنوتیپ آن‌ها را تعدیل کند (۳۹).

اگزوزوم‌ها حاوی پروتئین‌های مرتبط با تومور مانند CEA، EGFR VIII، HER2، MelanA، CD63، CD9 و CD81 می‌باشند (۲۰). با توسعه پروتئومیکس، نقش پروتئین‌های اگزوزومی در پیش بینی وقوع تومور، تشخیص و درمان بسیار مورد توجه قرار گرفته است. بسیاری از مطالعات نشان داده‌اند که بیان پروتئین‌های اگزوزومی در تومورهای مختلف بسیار متفاوت است. به عنوان مثال نشان داده شد بیماران CRC با سطوح CPNE3 اگزوزومی پایین تر، DFS و OS بهتری نسبت به آن‌هایی که سطوح CPNE3 اگزوزومی در آن‌ها بالاتر بود، داشتند (۵). بیماران CRC با سطوح CPNE3



بیماری استفاده کرد (۴۴).

تولید آگزوزوم ها از طریق جوانه زدن غشای پلاسمایی به سمت داخل برای تشکیل اندوزوم های درون سلولی برای اولین بار در بررسی روند بلوغ رتیکولوسیت گوسفند به عنوان وسیله ای برای گردش پروتئین سطح سلول گزارش شد. هجوم بیشتر آندوزوم های داخل سلولی، اجسام چند وزیکولی (MVBs) حاوی وزیکول هایی با قطر ۴۰ تا ۱۵۰ نانومتر تولید می کند. اجسام چندوزیکولی (MVBs) و اندوزوم های دیررس غنی از وزیکول های داخل مجرای (ILVs) هستند که پروتئین ها، لیپیدها و اجزای سیتوزولی خاص را جدا می کنند. ILV ها که از طریق جوانه زدن غشای اندوزومی به سمت داخل تولید می شوند از طریق شبکه اسکلت سلولی و میکروتوبولی به غشای پلازما منتقل شده و پس از همجوشی با سطح سلول تحت آگزوسیتوز قرار گرفته و صورت آگزوزوم ترشح می شوند. سایر MVB ها از طریق همجوشی مستقیم با لیزوزوم ها یا از همجوشی با اتوفاگوزوم ها و به دنبال آن لیزوزوم ها تخریب می شوند (۴۵).

پلاکت های آموزش دیده با تومور (TEPs): پلاکت ها قطعات بدون هسته کوچک به قطر 2-5ml، ضخامت 0.5ml، حجم ۱۰-۶ فمیتو لیتر، نیمه عمر حدود ۷-۱۰ روز و غلظت تقریباً ۱۵۰ تا ۳۵۰×۱۰۹ در لیتر هستند که توسط مگا کاربوسیت های مغز استخوان در جریان خون آزاد شده و تحت تأثیر اینترلوکین های ۳، ۶، ۱۱ و ترومبوپوئیتین، تمایز و بلوغ می یابند (۴۶). اخیراً در یک مدل موش نشان داده شده است که پلاکت ها می توانند در ریه نیز توسط مگا کاربوسیت های داخل عروقی منشأ گرفته از محل های خارج ریوی تولید شوند (۴۷). پلاکت ها علیرغم حجم کوچکشان عناصر پیچیده سلولی هستند که از چهار ناحیه پریفرال، سول ژل، اندامکی و غشایی تشکیل شده اند که در کنار یکدیگر باعث فعال سازی، حفظ ساختار و مرفولوژی، ترشح آنزیم ها، فاکتورهای انعقادی، رشد، سیتوکین ها و کموکاین و ... می شوند (۴۶). پلاکت ها به دلیل عملکردشان در انعقاد خون و ترمیم زخم شناخته شده اند، اما ارتباط آن ها با سرطان نیز به طور گسترده مورد مطالعه قرار گرفته است. شروع این مطالعات در سال ۱۸۶۸ بود و مشخص شد انعقاد خود به خودی در بیماران سرطانی رایج است که نشان می دهد پلاکت های در گردش تحت تأثیر سرطان قرار می گیرند. در سال ۱۸۷۷، بیلرود ترومبوزهای

پر شده با عناصر توموری خاص را به عنوان بخشی از متاستاز تومور توصیف کرد، که نشان دهنده یک تعامل مستقیم بین سلول های تومور و پلاکت ها است. در سال ۱۹۰۶، رایت گزارش داد پلاکت ها بخش های جدا شده از سیتوپلاسم مگا کاربوسیت ها هستند که در مغز استخوان و طحال شناسایی شدند که در شرایط پاتولوژیک خاصی از جمله سرطان قابل مشاهده هستند. در سال ۲۰۱۰، Zaslavsky و همکاران نشان دادند که تعداد مگا کاربوسیت ها در مغز استخوان در پاسخ به سرطان افزایش می یابد. Kerr و همکاران نشان دادند که ارتباط بین تومور و استخوان توسط پلاکت ها از طریق پلاکت ها انجام می شود. پروتئین های مشتق از تومور در گرانول ها ذخیره می شوند افزایش در مگا کاربوسیت ها و پلاکت ها به عنوان یک پاسخ سیستمیک برای سرکوب رشد تومور در نظر گرفته می شد که با افزایش سطح ترومبوپوئیدین-۱ در پلاکت ها ایجاد می شود (۱۸).

پلاکت ها قطعات سلولی فاقد هسته هستند، اما توسط مگا کاربوسیت با مجموعه ای از mRNA های پیش ساز (pre-mRNAs)، مجموعه اسپلیسوزم عملکردی و ماشین ترجمه پروتئین پر شده اند. علاوه بر حضور mRNA ها، پلاکت ها حاوی RNA های کوچک از جمله microRNA ها (miRNA)، RNA های طولانی غیرکدکننده (LncRNA)، RNA های حلقوی (circRNA) و DNA میتوکندریایی هستند. پلاکت های جوان تر محتوی RNA بیشتری نسبت به پلاکت های پیر دارند، که نشان می دهد RNA تامین شده توسط مگا کاربوسیت برای پلاکت ها جهت انجام فعالیت هایشان مورد نیاز است. فعال سازی پلاکت ها از طریق محرک های مختلف مانند ترشحات آزاد شده از باکتری ها، انتشار مولکول های زیستی توسط سلول های سرطانی و ریز محیط تومور می تواند باعث اسپلیسینگ mRNA و ترجمه پروتئین شود؛ RNA های کوچک مانند miRNA در تنظیم این فرآیندها نقش دارند.

علاوه بر اسپلیسینگ RNA های داخل پلاکتی، پلاکت ها می توانند محتویات اسیدهای نوکلئیک و پروتئین خود را به طور مداوم با دیگر پلاکت ها، سلول های ایمنی، سلول های اندوتلیال و همچنین سلول های تومور، با مکانیسم های مختلف مانند انتقال با واسطه وزیکول مبادله کنند. آن ها همچنین با پذیرش مولکول های زیستی مرتبط با تومور و رفت و آمد ریزذرات

بر روی نمونه پلاکت خون جدا شده از افراد سالم و بیماران مبتلا به سرطان گلیوبلاستوما، سرطان سلول غیر کوچک ریه، سرطان کولورکتال، سرطان پانکراس، سرطان سینه، سرطان کبد و کارسینوم مجرای صفراوی انجام شد، در مجموع بیان mRNA از ۵۰۰۳ mRNA در TEPS در مقایسه با نمونه پلاکت اهداکنندگان سالم افزایش و ۷۹۳ mRNA از ۵۰۰۳ کاهش یافت. بنابراین با استفاده از پروفایل‌های مختلف mRNA بیماران سرطانی و اهداکنندگان سالم، می‌توان یک الگوریتم پیش‌بینی با دقت بالا در جداسازی افراد سالم از بیماران سرطانی ایجاد کرد. پروفایل‌های RNA امکان طبقه بندی support vector machine (SVM)) را فراهم و توانایی طبقه بندی صحیح اینکه آیا بیمار سرطان دارد یا خیر (دقت: ۹۶٪)، در حال حاضر چه نوع از تومور موجود است (دقت ۷۱٪) و تومور کدام زیرگروه از جهش مولکولی را دارد (دقت ۸۵-۹۵٪) امکان پذیر می‌کند. جالب توجه است که تمام ۳۹ بیمار مورد مطالعه مبتلا به سرطان در مراحل اولیه و بدون متاستاز به درستی به عنوان بیماران سرطانی شناسایی شدند (۵۰).

### بحث و نتیجه‌گیری

بیوپسی مایع تجزیه و تحلیل مواد مشتق از تومور در خون و سایر مایعات بدن بیماران سرطانی را نشان می‌دهد. اجزای بیوپسی مایع عمدتاً به تجزیه و تحلیل CTC ها، اسیدهای نوکلئیک بدون سلول در گردش، آگزوزوم ها، میکرووزیکول ها و پلاکت ها اشاره دارد. این عناصر طیفی از اجزای تومور را در خون تشکیل می‌دهند که مشخصات ژنتیکی ضایعات اولیه و متاستاتیک را منعکس می‌کند و نظارت در زمان واقعی تومور را ارائه می‌دهد. اهمیت بیوپسی مایع به این دلیل است که می‌توان مایعات مختلف بدن را بررسی و بر محدودیت‌های بیوپسی بافت به عنوان مشکلات عود کننده در ارزیابی بالینی تومورها که از عدم دسترسی به بافت تومور و ناهمگنی کلونال آن ناشی می‌شود، غلبه کرد. همچنین امکان تکرار چندین بار به دلیل تهاجمی نبودن با ایجاد یک نمایه مولکولی، در را به روی تعداد قابل توجهی از کاربردهای بالینی که هدف پزشکی دقیق هستند باز می‌کند. نتایج حاصل از این مطالعه نشان می‌دهد که روش بیوپسی مایع، یک روش جدید و مؤثر برای تشخیص و پایش بیماران مبتلا

مشتق از پلاکت به سلول‌های تومور و تنظیم برنامه‌های بیان ژنی از طریق miRNAها آموزش یافته (۴۸) و پروفایل RNA خود را تغییر می‌دهند (۴۷). علاوه بر تغییرات داخلی محتوای RNA پلاکت‌های آموزش دیده با تومور، تعداد و زیرجمعیت‌های پلاکتی در بیماران مبتلا به سرطان نیز ممکن است تغییر کنند. پلاکت‌ها تقریباً ۷ تا ۱۰ روز در جریان خون گردش می‌کنند و پس از آن در طحال تجزیه می‌شوند. آن‌ها به طور مداوم توسط مغز استخوان و مگاکاریوسیت‌های ساکن ریه آزاد شده و اولین روزهای خود را به عنوان پلاکت‌های جوان، شبکه ای و غنی از RNA به گردش در می‌آورند. در اواخر عمر خود، آن‌ها با تحریک کبد از طریق گیرنده Ashwell-Morell برای تولید ترومبوپوئیتین برای تحریک تولید بعدی پلاکت‌های جدید، با حذف گروه‌های سیالین توسط کبد برداشت می‌شوند. این فرآیند چرخه پیوسته تولید و تجزیه پلاکت‌ها را واسطه می‌کند و منجر به ایجاد زیرجمعیت‌های پلاکتی متعدد مانند پلاکت‌های شبکه‌ای، پلاکت‌های پیش‌انعقاد یا «پوشش‌دار» و پلاکت‌های «قدیمی» در خون می‌شود (۴۸). شواهد مختلفی مبنی بر تعامل پلاکت‌ها و سلول‌های سرطانی وجود دارد. مطالعه نشان داده اند تعداد، اندازه و نشانگرهای پروتئین پلاکتی، مانند P-selectin، برای تشخیص و پیش‌آگهی سرطان مبتنی بر خون استفاده می‌شود. پلاکت‌ها می‌توانند با سلول‌های سرطانی به روش‌های مختلفی تعامل داشته باشند که منجر به واکنش بیش از حد پلاکتی می‌شود. علاوه بر این، ممکن است افزایش پلاکت‌های شبکه ای جوان در بیماران سرطانی وجود داشته باشد. نسبت این پلاکت‌های جوان در کل جمعیت پلاکتی می‌تواند پس از درمان سرطان دوباره تغییر کند. این مشاهدات نشان می‌دهد که پلاکت‌ها می‌توانند در طول پیشرفت و درمان تومور به صورت واکنشی پاسخ دهند (۴۹). یک مطالعه اخیر نشان داد که تعیین توالی mRNA پلاکت‌های آموزش دیده با تومور، می‌تواند بیماران سرطانی را از افراد سالم با دقت ۹۶ درصد متمایز کند. خون حاوی ۲۰۰ تا ۵۰۰ میلیون پلاکت در هر میلی لیتر است که باعث می‌شود پلاکت‌ها برای استفاده‌های تشخیصی بسیار در دسترس باشند. خون کامل را می‌توان تا ۴۸ ساعت در دمای اتاق قبل از جداسازی پلاکت ذخیره کرد و در عین حال RNA با کیفیت بالا و امضاهای RNA سرطان غالب را حفظ کرد. در این مطالعه تعیین توالی RNA

شده و کلیه فعالیتهای مرتبط با آن با تأیید کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی تبریز و با رعایت کد اخلاقی ۱۶۰۲،۱۶۴ IR.. TBZMED.REC به انجام رسیده است.

### تشکر و قدردانی

از تمامی اعضای محترم آزمایشگاههای دانشکده علوم نوین پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز که با همکاری و مساعدت خود، به ما در انجام این تحقیق یاری رساندند، صمیمانه سپاسگزاری می‌نماییم. این مطالعه با حمایت مالی دانشگاه علوم پزشکی تبریز و تحت شماره گرنت ۷۱۱۳۰ که بخشی از پایان نامه دکتری است، به سرانجام رسید.

به سرطان کولورکتال است. باتوجه به دقت بالای این روش در تشخیص سرطان کولورکتال، می‌توان آن را به عنوان یک ابزار تشخیصی مؤثر برای پیش و درمان این نوع سرطان استفاده کرد. همچنین، مزیت‌های دیگر این روش شامل عدم نیاز به عمل جراحی و غیرتهاجمی بودن آن است. با توجه به این نتایج، می‌توان با اطمینان بیشتری به بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال کمک کرد و روش درمان مناسبی را برای آنها انتخاب کرد.

### تعارض منافع

بدین وسیله نویسندگان تصریح می‌نمایند که هیچ گونه تضاد منافی در خصوص پژوهش حاضر وجود ندارد.

### مجوز اخلاقی

این پروژه تحقیقاتی تحت رعایت کامل موازین اخلاقی انجام

### References

1. Rawla P, Sunkara T, Barsouk A. Epidemiology of colorectal cancer: incidence, mortality, survival, and risk factors. *Prz Gastroenterol.* 2019;14(2):89-103.
2. GLOBAL CANCER OBSERVATORY 1965-2022 [Available from: <https://gco.iarc.fr/>].
3. Sawicki T, Ruszkowska M, Danielewicz A, Niedźwiedzka E, Arłukowicz T, Przybyłowicz KE. A review of colorectal cancer in terms of epidemiology, risk factors, development, symptoms and diagnosis. *Cancers.* 2021 Apr 22;13(9):2025.
4. Huang Z, Yang M. Molecular Network of Colorectal Cancer and Current Therapeutic Options. *Front Oncol.* 2022;12:852927.
5. Zhou H, Zhu L, Song J, Wang G, Li P, Li W, et al. Liquid biopsy at the frontier of detection, prognosis and progression monitoring in colorectal cancer. *Mol Cancer.* 2022;21(1):86.
6. Zygulska AL, Pierzchalski P. Novel diagnostic biomarkers in colorectal cancer. *International journal of molecular sciences.* 2022 Jan 13;23(2):852.
7. Nojadeh JN, Behrouz Sharif S, Sakhinia E. Microsatellite instability in colorectal cancer. *Excli j.* 2018;17:159-68.
8. Arvelo F, Sojo F, Cotte C. Biology of colorectal cancer. *Ecancermedicalscience.* 2015;9:520.
9. Yiu AJ, Yiu CY. Biomarkers in Colorectal Cancer. *Anticancer Res.* 2016;36(3):1093-102.
10. Harada S, Morlote D. Molecular Pathology of Colorectal Cancer. *Adv Anat Pathol.* 2020;27(1):206.
11. Dekker E, Tanis PJ, Vleugels JLA, Kasi PM, Wallace MB. Colorectal cancer. *Lancet.* 2019;394(10207):1467-80.
12. Chen K, Collins G, Wang H, Toh JWT. Pathological Features and Prognostication in Colorectal Cancer. *Curr Oncol.* 2021;28(6):5356-83.
13. Yau TO. Precision treatment in colorectal cancer: Now and the future. *JGH Open.* 2019;3(5):361-9.
14. S Shinji S, Yamada T, Matsuda A, Sonoda H, Ohta R, Iwai T, Takeda K, Yonaga K, Masuda Y, Yoshida H. Recent advances in the treatment of colorectal cancer: a review. *Journal of Nippon Medical School.* 2022 Jun 25;89(3):246-54.
15. Geneve N, Kairys D, Bean B, Provost T, Mathew R, Taheri N. Colorectal Cancer Screening. *Prim Care.* 2019;46(1):135-48.
16. Russano M, Napolitano A, Ribelli G, Iuliani M, Simonetti S, Citarella F, et al. Liquid biopsy and tumor heterogeneity in metastatic solid tumors: the potentiality of blood samples. *J Exp Clin Cancer Res.* 2020;39(1):95.
17. Taghizadeh M, Jafari-Koshki T, Jafarlou V, Raeisi M, Alizadeh L, Roosta Y, et al. The role of piRNAs in predicting and prognosing in cancer: a focus on piRNA-823 (a systematic review and meta-analysis). *BMC Cancer.* 2024;24(1):484.
18. In 't Veld S, Wurdinger T. Tumor-educated platelets. *Blood.* 2019;133(22):2359-64.
19. De Rubis G, Rajeev Krishnan S, Bebawy M. Liquid Biopsies in Cancer Diagnosis, Monitoring, and Prognosis. *Trends Pharmacol Sci.* 2019;40(3):172-86.
20. Wu J, Hu S, Zhang L, Xin J, Sun C, Wang L, et al. Tumor circulome in the liquid biopsies for cancer diagnosis and prognosis. *Theranostics.* 2020;10(10):4544-56.
21. Muluhngwi P, Valdes R, Jr., Fernandez-Botran R, Burton E, Williams B, Linder MW. Cell-free DNA diagnostics: current and emerging applications in oncology. *Pharmacogenomics.* 2019;20(5):357-80.
22. Ray A, Vohra TK. Liquid biopsy—from bench to bedside. *Neuro-Oncology Advances.* 2022 Nov 11;4(Supplement\_2):ii66-72.
23. Honoré N, Galot R, van Marcke C, Limaye N, Machiels JP. Liquid biopsy to detect minimal residual disease: methodology and impact. *Cancers.* 2021 Oct 26;13(21):5364.

24. Oshiro C, Kagara N, Naoi Y, Shimoda M, Shimomura A, Maruyama N, et al. PIK3CA mutations in serum DNA are predictive of recurrence in primary breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat.* 2015;150(2):299-307.
25. Sun X, Abrahamson P, Ballew N, Kalilani L, Phiri K, Bell KF, et al. The Utility of ctDNA in Lung Cancer Clinical Research and Practice: A Systematic Review and Meta-analysis of Clinical Studies. *Cancer Invest.* 2023:1-55.
26. Friedman JS, Hertz CAJ, Karajannis MA, Miller AM. Tapping into the genome: the role of CSF ctDNA liquid biopsy in glioma. *Neurooncol Adv.* 2022;4(Suppl 2):ii33-ii40.
27. Mittal A, Valiente CM, Tamimi F, Di Iorio M, Al-Showbaki L, Cescon DW, Amir E. Utility of ctDNA in predicting relapse in solid tumors after curative therapy: a meta-analysis. *JNCI Cancer Spectr.* 2023.
28. Reinert T, Henriksen TV, Christensen E, Sharma S, Salari R, Sethi H, et al. Analysis of Plasma Cell-Free DNA by Ultradeep Sequencing in Patients With Stages I to III Colorectal Cancer. *JAMA Oncol.* 2019;5(8):1124-31.
29. Kobayashi S, Nakamura Y, Taniguchi H, Odegaard JI, Nomura S, Kojima M, et al. Impact of Preoperative Circulating Tumor DNA Status on Survival Outcomes After Hepatectomy for Resectable Colorectal Liver Metastases. *Ann Surg Oncol.* 2021;28(8):4744-55.
30. Tie J, Wang Y, Cohen J, Li L, Hong W, Christie M, et al. Circulating tumor DNA dynamics and recurrence risk in patients undergoing curative intent resection of colorectal cancer liver metastases: A prospective cohort study. *PLoS Med.* 2021;18(5):e1003620.
31. Feng Z, Wu J, Lu Y, Chan YT, Zhang C, Wang D, et al. Circulating tumor cells in the early detection of human cancers. *Int J Biol Sci.* 2022;18(8):3251-65.
32. Lozar T, Gersak K, Cemazar M, Kuhar CG, Jesenko T. The biology and clinical potential of circulating tumor cells. *Radiol Oncol.* 2019;53(2):131-47.
33. Dianat-Moghadam H, Heidarifard M, Jahanban-Esfahlan R, Panahi Y, Hamishehkar H, Pouremamali F, et al. Cancer stem cells-emanated therapy resistance: Implications for liposomal drug delivery systems. *J Control Release.* 2018;288:62-83.
34. Dianat-Moghadam H, Azizi M, Eslami-S Z, Cortés-Hernández LE, Heidarifard M, Nouri M, Alix-Panabières C. The role of circulating tumor cells in the metastatic cascade: biology, technical challenges, and clinical relevance. *Cancers.* 2020 Apr 3;12(4):867.
35. Lin D, Shen L, Luo M, Zhang K, Li J, Yang Q, et al. Circulating tumor cells: biology and clinical significance. *Signal Transduct Target Ther.* 2021;6(1):404.
36. García SA, Weitz J, Schölch S. Circulating Tumor Cells. *Methods Mol Biol.* 2018;1692:213-9.
37. Buim ME, Fanelli MF, Souza VS, Romero J, Abdallah EA, Mello CA, et al. Detection of KRAS mutations in circulating tumor cells from patients with metastatic colorectal cancer. *Cancer Biol Ther.* 2015;16(9):1289-95.
38. Kalluri R. The biology and function of exosomes in cancer. *J Clin Invest.* 2016;126(4):1208-15.
39. Pinzani P, D'Argenio V, Del Re M, Pellegrini C, Cucchiara F, Salvianti F, Galbiati S. Updates on liquid biopsy: Current trends and future perspectives for clinical application in solid tumors. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM).* 2021 Jun 25;59(7):1181-200.
40. Ganig N, Baenke F, Thepkaysone ML, Lin K, Rao VS, Wong FC, Polster H, Schneider M, Helm D, Pecqueux M, Seifert AM. Proteomic analyses of fibroblast-and serum-derived exosomes identify QSOX1 as a marker for non-invasive detection of colorectal cancer. *Cancers.* 2021 Mar 17;13(6):1351.
41. Yun CW, Lee JH, Go G, Jeon J, Yoon S, Lee SH. Prion protein of extracellular vesicle regulates the progression of colorectal cancer. *Cancers.* 2021 Apr 29;13(9):2144.
42. Wang J, Yan F, Zhao Q, Zhan F, Wang R, Wang L, et al. Circulating exosomal miR-125a-3p as a novel biomarker for early-stage colon cancer. *Sci Rep.* 2017;7(1):4150.
43. Matsumura T, Sugimachi K, Iinuma H, Takahashi Y, Kurashige J, Sawada G, et al. Exosomal microRNA in serum is a novel biomarker of recurrence in human colorectal cancer. *Br J Cancer.* 2015;113(2):275-81.
44. Liu X, Pan B, Sun L, Chen X, Zeng K, Hu X, et al. Circulating Exosomal miR-27a and miR-130a Act as Novel Diagnostic and Prognostic Biomarkers of Colorectal Cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2018;27(7):746-54.
45. Gurung S, Perocheau D, Touramanidou L, Baruteau J. The exosome journey: from biogenesis to uptake and intracellular signalling. *Cell Commun Signal.* 2021;19(1):47.
46. Contursi A, Sacco A, Grande R, Dovizio M, Patrignani P. Platelets as crucial partners for tumor metastasis: from mechanistic aspects to pharmacological targeting. *Cell Mol Life Sci.* 2017;74(19):3491-507.
47. Plantureux L, Crescence L, Dignat-George F, Panicot-Dubois L, Dubois C. Effects of platelets on cancer progression. *Thromb Res.* 2018;164 Suppl 1:S40-s7.
48. Best MG, Wesseling P, Wurdinger T. Tumor-Educated Platelets as a Noninvasive Biomarker Source for Cancer Detection and Progression Monitoring. *Cancer Res.* 2018;78(13):3407-12.
49. Sol N, Wurdinger T. Platelet RNA signatures for the detection of cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 2017;36(2):263-72.
50. Best MG, Sol N, Kooi I, Tannous J, Westerman BA, Rustenburg F, et al. RNA-Seq of Tumor-Educated Platelets Enables Blood-Based Pan-Cancer, Multiclass, and Molecular Pathway Cancer Diagnostics. *Cancer Cell.* 2015;28(5):666-76.