نشانگرهای متیلاسیون DNA مبتنی بر خون در تشخیص بیماری سرطان پستان

محمدکاظم شاهمرادی[1]، مونس مولودی تپه[2]، لیلا آب‌خوئی*[3]، معصومه جلالوند[4]

۱- استادیار، گروه جراحی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، خرم‌آباد، ایران

۲- گروه علوم پایه دانشکده دامپزشکی، واحد ارومیه، دانشگاه آزاد اسلامی، ارومیه، ایران

۳- استادیار، گروه بیوتکنولوژی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، خرم‌آباد، ایران

۴- گروه بیوتکنولوژی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، خرم‌آباد، ایران

یافته / دوره ۲۶ / شماره ۱ / بهار ۱۴۰۳ / مسلسل ۹۹

چکیده

دریافت مقاله: ۱۴۰۲/۸/۲۴ پذیرش مقاله: ۱۴۰۳/۲/۱۶

مقدمه: میزان ابتلا به سرطان پستان در بسیاری از کشورها رو به افزایش است. بنابراین تشخیص زودهنگام سرطان پستان در مراحل اولیه از جهت بهبود شانس درمان و جلوگیری از مرگ‌ومیر زنان بسیار حائز اهمیت است. امروزه با وجود پیشرفت در تشخیص و درمان سرطان، به‌کارگیری فناوری‌های غیر مولکولی مانند گاستروسکوپی، توموگرافی کامپیوتری و نشانگرهای زیستی پروتئین هنوز محور غربالگری سرطان بالینی است. همان‌طور که مطالعات نشان می‌دهد همگی این روش‌های ذکرشده اختصاصیت و حساسیت پایینی نشان می‌دهند. درنتیجه در غربالگری سرطان، اکثر بیماران مبتلا به سرطان دیر تشخیص داده می‌شوند و به دنبال آن دوره درمان ایده‌آل را از دست می‌دهند. در این مطالعه، استفاده از نشانگرهای زیستی شامل DNA عاری از سلول در گردش، DNA توموری در گردش و اگزوزوم‌ها در پلاسمای خون محیطی به‌عنوان یک روش غیرتهاجمی در تشخیص زودهنگام سرطان مورد بررسی قرار گرفته است. با توجه به تلاش‌های زیادی که در سال‌های اخیر برای بررسی ارتباط بین نشانگرهای متیلاسیون و سرطان پستان انجام شده است، به نظر می‌رسد بررسی الگوی متیلاسیون DNA مبتنی بر خون در سرطان پستان می‌تواند کاندید مناسبی جهت مطالعات بیشتر در جهت تائید نقش آن‌ها برای تشخیص زودهنگام، پیش‌بینی پیش‌آگهی و نظارت پویا سرطان پستان به‌عنوان یک روش غیرتهاجمی باشد. بااینکه متیلاسیون DNA مبتنی بر خون، برای کاربرد پزشکی هنوز در مراحل اولیه است و مشکلاتی برای استفاده از این نشانگرهای زیستی در کاربردهای پزشکی ازجمله فقدان استانداردهای یکپارچه روش‌های تشخیص بین مطالعات و قابلیت تکرارپذیری ضعیفی برای نشانگرهای انتخاب‌شده در مطالعات وجود دارد، همچنین در برخی موارد به دلیل کم بودن غلظت DNA مبتنی بر خون نتایج تشخیص ممکن است منفی کاذب گزارش شود. اما در آینده با افزایش حساسیت و اختصاصیت کیت‌های تشخیص می‌توان شاهد کاربردهای گسترده‌ی آن بود.

واژه‌های کلیدی: سرطان پستان، DNA عاری از سلول، DNA توموری در گردش، سلول تک‌هسته‌ای خون محیطی، DNA متیلاسیون.

***آدرس مکاتبه: خرم‌آباد، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، دانشکده پزشکی، گروه بیوتکنولوژی.**

پست الکترونیک: lilaabkhooie@yahoo.com

مقدمه

سرطان پستان یکی از شایع‌ترین سرطان‌ها در بین زنان است. سالانه ۲/۳ میلیون زن در سراسر جهان مبتلا به سرطان پستان تشخیص داده می‌شوند که ۶۸۵۰۰۰ مورد مرگ در سال ۲۰۲۰ گزارش شده است و متأسفانه میزان ابتلا به این سرطان هنوز در بسیاری از کشورها رو به افزایش است (۱). بنابراین تشخیص زودهنگام ابتلا به سرطان پستان مؤثرترین استراتژی برای کاهش تلفات سرطان پستان است. سرطان پستان معمولاً از طریق غربالگری یا از طریق یک علامت (به‌عنوان‌مثال، درد یا یک توده قابل‌لمس) تشخیص داده می‌شود (۲). از روش‌های غربالگری سرطان پستان برای تشخیص زودهنگام این سرطان ماموگرافی است که ۱۹درصد مرگ‌ومیر این سرطان را کاهش می‌دهد. از جنبه‌های منفی ماموگرافی می‌توان به آزمایش‌های مثبت کاذب، قرار گرفتن در معرض اشعه، درد، اضطراب و سایر اثرات منفی روان‌شناختی اشاره نمود (۲).

از روش‌های دیگر غربالگری و تشخیص زودهنگام سرطان پستان نشانگرهای تومور موجود در خون است. اگرچه این نشانگرهای پروتئینی موجود در سرم مانند آنتی‌ژن کارسینوم -۱۲۵ (CA-125) آنتی‌ژن کارسینوامبریونیک (CEA) و آنتی‌ژن اختصاصی پروستات (PSA)معمولاً برای تشخیص سرطان استفاده می‌شوند، اما این پروتئین‌ها در سرم افراد فاقد سرطان، نیز در غلظت‌های کمتر یافت می‌شوند (۵-۳). به‌علاوه، این نشانگرها در بخش قابل‌توجهی از بیماران مبتلا به سرطان‌های پیشرفته افزایش نمی‌یابند (۶،۷).

بنابراین ما به یک نشانگر زیستی حساس و خاص برای تشخیص زودهنگام و نظارت‌های بعدی سرطان نیاز داریم. در سال‌های اخیر بیوپسی مایع به‌طور فزاینده و گسترده‌ای در تحقیقات سرطان مورد استفاده قرار گرفته است که مزایای قابل‌توجه و کاربردهای زیادی را نشان داده است. در مقایسه با بیوپسی بافت، بیوپسی مایع غیرتهاجمی و قابل تکرار است. بنابراین، نقش مهمی در تشخیص زودهنگام، پایش پویا، ارزیابی پاسخ به درمان سرطان دارد (۸).

اصطلاح "بیوپسی مایع" در ابتدا برای شناسایی سلول‌های توموری در گردش در خون محیطی استفاده شد، اما سپس برای تشخیص و تعیین کمیت DNA توموری در گردش(ctDNA) و میکروآرناها (miRNAs) گسترش یافت. بااینکه آزمایش‌های مبتنی بر خون احتمالاً بیشترین استفاده را دارند، اما DNA توموری در گردش می‌تواند در بسیاری از مایعات بیولوژیکی دیگر مانند آسیت، بزاق، ادرار، مدفوع و مایع مغزی نخاعی شناسایی شود. بنابراین، اصطلاح "بیوپسی مایع" اکنون برای مجموعه گسترده‌ای از آزمایشات برای تجزیه‌وتحلیل نشانگرهای زیستی که از خود تومور آزاد می‌شوند مانند DNA توموری در گردش، سلول‌های توموری در گردش، وزیکول‌های مشتق از سلول (مانند اگزوزوم‌ها) استفاده می‌شود (۹).

متیلاسیون DNA در سرطان

درحالی‌که جهش‌های ژنتیکی و تغییرات اپی‌ژنتیکی را می‌توان در سرطان مشاهده کرد، مطالعات متعدد نشان داده‌اند که تغییرات اپی ژنتیکی یکی از اولین و مهم‌ترین تغییرات در سرطان‌زایی است (۱۰،۱۱). درک اینکه چگونه پدیده‌های اپی ژنتیکی مانند الگوهای متیلاسیون یا تغییر هیستون‌ها می‌توانند بر بروز سرطان اثر بگذارند، می‌تواند در تشخیص بهتر بیماران سرطانی مؤثر باشد. متیلاسیون DNA روی سیتوزین اتفاق می‌افتد و مکان‌های متیلاسیون متفاوت است. متیلاسیون کربن ۵ سیتوزین، به نام ۵-متیل سیتوزین(5-mC)، شکل اصلی متیلاسیون DNA انسان است (۱۲). DNA متیل ترانسفرازهای DNA، گروه متیل S-آدنوزین متیونین را به اتم‌های کربن ۵- سیتوزین منتقل می‌کنند تا ۵-متیل

سیتوزین را تشکیل دهند (۱۳،۱۴). متیلاسیون غیرطبیعی DNA در برخی بیماری‌های متابولیک ظاهر می‌شود و در بروز و توسعه سرطان نقش دارد (۱۵،۱۶). امروزه شواهد زیادی وجود دارد مبنی بر اینکه متیلاسیون DNA در سرطان دیده می‌شود (۱۷).

دو نوع تغییر کلی در متیلاسیون DNA وجود دارد که به نظر می‌رسد در یک تومور در مقایسه با سلول‌های طبیعی از همان نوع بافت رخ می‌دهد شامل: هیپرمتیلاسیون جزایر CpG و دمتیلاسیون در بسیاری از مناطق ژنوم که معمولاً توالی تکراری هستند. محل‌های متیلاسیون طبیعی و درجه متیلاسیون در مراحل اولیه سرطان‌زایی نقش دارند (۱۸). در سلول‌های طبیعی DNA متیله از اتصال فاکتورهای رونویسی به مکان‌های اتصال فاکتور رونویسی جلوگیری می‌کند و باعث مهار رونویسی ژن می‌شود (۱۹). ولی سطح پائین متیلاسیونDNA در تومورها در مقایسه با بافت‌های طبیعی، باعث رونویسی نابجا از ژن‌ها می‌شود (۲۰). از طرفی کاهش سطح متیلاسیون در سطح ژنوم، ثبات کروموزوم را کاهش می‌دهد و خطر نوترکیبی غیرمنتظره میتوزی را افزایش می‌دهد. عناصر قابل‌انتقال فعال‌شده با ژنوم ادغام می‌شوند که منجر به افزایش بی‌ثباتی ژنومی و فرکانس بالاتر جهش ژن می‌شود (۲۱،۲۲). هیپرمتیلاسیون جزایر CpG در نواحی پروموتر ژن‌های مهارکننده تومور در بسیاری از سرطان‌ها دیده می‌شود (۱۸، ۲۳، ۲۴)، در نتیجه باعث مهار رونویسی این ژن‌ها و پیشرفت سرطان می‌گردد (۲۵).

MiRNA در سرطان

کشف مکانیسم‌های مولکولی پایه و اهداف درمانی برای سرطان پستان یک موضوع داغ در تحقیقات نوین است. miRNAها به‌عنوان RNAهای غیر کدکننده، نقش کلیدی در سرطان پستان ایفا می‌کنند و متیلاسیون نابجای miRNA ها می‌تواند مقاومت دارویی در طول درمان ایجاد نماید. بنابراین، تنظیم متیلاسیون miRNA و درنتیجه سطح بیان آن‌ها می‌تواند به‌عنوان یک هدف در درمان سرطان پستان مدنظر قرار گیرد (۲۶). در سرطان پستان، سطح بالای بیان DNMTها با پیش‌آگهی ضعیف ارتباط زیادی دارد، یعنی متیلاسیون غیرطبیعی ژن‌های سرکوبگر تومور معمولاً باعث ایجاد و پیشرفت تومور می‌شود. برای مثال در سلول‌هایMCF-7 مقاوم به تاموکسیفن (TamR)، افزایش متیلاسیون قابل‌توجه ناحیه پروموتر miR-27b نسبت به سلول‌های حساس به تاموکسیفن MCF-7 مشاهده می‌شود و با بیان مجدد miR-27bشاهد افزایش حساسیت دارویی و مهار تهاجم خواهیم بود (۲۷). تنظیم بیان miR-320a که به‌عنوان یک واسطه مقاومت شیمیایی است، مستقیماً توسط متیلاسیون پروموتر ETS فاکتور رونویسی پروتوآنکوژن ۱ (ETS-1) کنترل می‌شود. این miR زیرخانواده کانال کاتیونی گیرنده بالقوه گیرنده زیرخانواده ۵ (TRPC5) و فاکتور هسته‌ای سلول‌های T فعال ۳ (NFATC3) را هدف قرار می‌دهد (۲۸).

به‌علاوه، در سرطان پستان مقاوم به دارو، کاهش متیلاسیون نابهنجار miRNA های سرطان‌زا و افزایش بیان آن‌ها باعث ایجاد مسیرهای انکوژن می‌شود که منجر به از دست دادن حساسیت سرطان پستان به عوامل شیمی‌درمانی و پیشرفت تومور می‌شود. به‌عنوان‌مثال با کاهش متیلاسیون ناحیه پروموتر miR-663 ، سطح بیان این miR در سلول‌های سرطان پستان افزایش می‌یابد و به دنبال آن، مقاومت به داروهای شیمی‌درمانی مانند دوکسوروبیسین، دوستاکسل و سیکلوفسفامید افزایش می‌یابد (۲۹).

DNA توموری در گردش

آنالیز DNA عاری از سلول (cfDNA) به منظور یکی از روش‌های تشخیصی غیرتهاجمی در سرطان‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد. DNA عاری از سلول از قطعات کوچک اسیدهای نوکلئیک تشکیل شده است که توسط

سلول‌ها در اثر مرگ سلولی در گردش خون آزاد می‌شود (۲۶). DNA عاری از سلول مشتق شده از تومور، که معمولاً DNA توموری در گردش (ctDNA) نامیده می‌شود و در خون افراد مبتلا به سرطان مشاهده می‌گردد و به دلیل پتانسیل عظیم آن به‌عنوان یک نشانگر زیستی تومور در پلاسما یا سرم بیماران سرطانی، توجه زیادی را در دهه گذشته به خود جلب کرده است. متابولیسم و میزان تکثیر تومور همبستگی مثبتی با مقدار ctDNA در پلاسمای خون وجود دارد (۲۷). با آنالیز DNA توموری در گردش، وجود جهش‌های خاص در تومورها با استفاده از تکنیک‌های بسیار حساس اغلب می‌تواند به‌طور دقیق شناسایی شود (۲۶). تشخیص جهش در ctDNA این پتانسیل را دارد که در تشخیص زودهنگام سرطان، تعیین بافت منشا، پیش‌آگهی، نظارت بر پاسخ و ارزیابی مقاومت به درمان، استفاده شود (۲۸).

علاوه بر این ارزیابی cfDNA به‌منظور مطالعه بازآرایی‌های کروموزومی، متیلاسیون، انحرافات تعداد کپی، تقسیم‌بندی و بیان ژن نیز مورد توجه فزاینده‌ای قرار گرفته است. غلظت بالای ctDNA ممکن است در برخی موارد در تشخیص زودهنگام تومورها نقش داشته باشد (۲۹،۳۰). عواملی مانند محل تومور، خون‌رسانی تومور، میزان متابولیسم بدن و درمان ضد تومور بر محتوای ctDNA تأثیر می‌گذارند (۳۳-۳۱). بااین‌حال، مشکلات زیادی برای کاربرد cfDNA در غربالگری سرطان وجود دارد. cfDNA ناپایدار است و نیمه‌عمر کوتاهی در خون محیطی دارد اما ممکن است به مدت ۱ ماه در دمای ۲۰ یا ۷۰ درجه سانتی‌گراد پایدار باشد (۳۴).

سلول‌های توموری در گردش

دو منبع DNA تومور وجود دارد که می‌توان آن‌ها را به‌صورت غیرتهاجمی در گردش خون ارزیابی کرد: DNA تومور در گردش بدون سلول (ctDNA) و سلول‌های توموری در گردش (CTCs) (۳۵،۳۶). به دلیل پاسخ ایمنی، استرس اکسیداتیو یا آسیب مکانیکی و محیطی، سلول‌های توموری در گردش نیمه‌عمر کوتاهی در حدود ۱ تا ۲ ساعت دارند (۹). در مطالعاتی که بر روی بیماران مبتلا به سرطان پستان صورت گرفته است، برخی از زیرمجموعه‌های سلول‌های توموری در گردش با ظرفیت شروع تومور نشان داده شده است. از آنجایی‌که تعداد سلول‌های توموری در گردش معمولاً کم است، بین ۱ تا ۱۰ سلول در هر ۱۰ میلی‌لیتر، تشخیص سلول‌های توموری در گردش دارای مشکلاتی است (۴۰-۳۷).

در مورد تشخیص، چندین رویکرد (ایمونولوژیک، تکنیک‌های مولکولی و عملکردی) توسعه یافته‌اند. بااین‌وجود، تنها فناوری تائید شده توسط سازمان غذا و داروی ایالات‌متحده(FDA) برای شمارش سلول‌های توموری در گردش در بیماران مبتلا به متاستاتیک پستان، پروستات و کلورکتال، مبتنی بر آنتی‌بادی‌های چسبنده مولکول ضد سلول‌های اپیتلیال (EpCAM) است (۴۱). بسیاری از مطالعات نشان داده‌اند که هر دو ctDNA و CTCs در نئوپلازی پیشرفته وجود دارند (۴۲،۴۳).

اگزوزوم‌ها

اگزوزوم‌ها وزیکول‌های خارج سلولی هستند که در مقیاس نانو هستند و اکثریت آن‌ها قطری حدود ۳۰ تا ۲۰۰ نانومتر دارند که توسط سلول‌های زنده به مایعات بدن ترشح می‌شوند. اگزوزوم‌های بافت‌های تومور حاوی DNA، RNA، پروتئین‌ها، لیپیدها و سایر موادی هستند که اطلاعات تومور را منعکس می‌کنند و مبنایی را برای تشخیص تومور، پروفایل ژنتیکی و تجزیه‌وتحلیل پروفایل اپی ژنتیکی فراهم می‌کند (۴۴). گزارش شده است که یک سلول سرطانی می‌تواند بیش از ۲۰۰۰۰ از این وزیکول‌ها را در طی ۴۸ ساعت آزاد کند (۴۵). قابل‌ذکر است که در افراد سرطانی وزیکول‌های بزرگ‌تر که انکوزوم نامیده می‌شوند نیز وجود دارند و می‌توانند تا ۱۰ میکرون قطر داشته باشند (۴۸-۴۶).

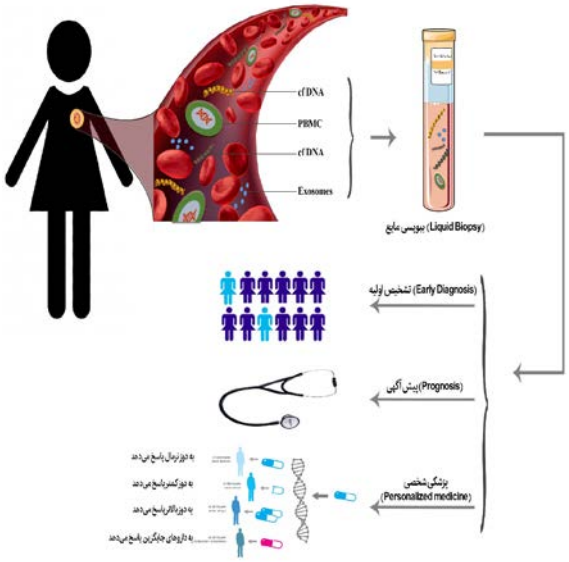
همه این وزیکول‌ها انواع نشانگرهای زیستی تومور، ازجمله مواردی که در فرآیند تومورزایی نقش دارند را حمل می‌کنند. به‌طور خاص، اگزوزوم‌ها در ویژگی‌های کلیدی رفتار سلول‌های بدخیم، از جمله تحریک رشد سلول‌های تومور، سرکوب پاسخ ایمنی، القای رگ‌زایی، افزایش مهاجرت سلول‌های تومور، و ایجاد متاستاز نقش دارند (۴۹).

مزیت بیوپسی مایع اگزوزومی این است که اطلاعات جامع‌تری نسبت به ctDNA در مورد تومور ارائه می‌دهد. پروتئین‌ها و سایر مواد واقع در سطح وزیکول‌های خارج سلولی نیز شواهدی از منشاء بافتی آن‌ها نشان می‌دهند (۵۰). به‌ویژه، اطلاعات تومور موجود در اگزوزوم‌ها پایدارتر است و به‌راحتی در مایعات بدن تجزیه نمی‌شود (۵۱). پایداری بیولوژیکی بالای او ارزش آن را در کاربردهای بالینی افزایش می‌دهد. به دلیل تنوع مواد گنجاندن چندگانه آن، بیوپسی مایع مبتنی بر اگزوزوم به‌طور جامع اطلاعات تومور را منعکس می‌کند (۴۴). پروتئین‌های واقع در سطح و درون اگزوزوم‌ها نیز ممکن است به‌عنوان نشانگرهای زیستی سرطان استفاده شوند. تشخیص انواع سرطان با چندین روش مختلف شناسایی پروتئین یا اگزوزوم، در بیوسیالات گوناگونی مانند پلاسما، سرم، ادرار، بزاق، CSF و آسیت، امکان‌پذیر گردیده است (۵۲،۵۳). البته استفاده از اگزوزوم‌ها در بیوپسی مایع در مرحله اولیه تحقیقات است و بررسی‌های بیشتری برای تائید اثربخشی آن‌ها و تجزیه‌وتحلیل جامع اگزوزوم‌ها در بیوپسی مایع موردنیاز است.

سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی (PBMCs)

تغییرات در سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی نیز ممکن است منعکس‌کننده حضور تومور باشد. تومورها ممکن است بر تغییرات ژنتیکی یا اپی ژنتیکی در گلبول‌های سفید خون در سیستم گردش خون تأثیر بگذارند. تغییرات متیلاسیون سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی در سرطان پستان، سرطان تخمدان، کارسینوم سنگفرشی سر و گردن، کلورکتال و سایر سرطان‌ها با بروز و پیشرفت سرطان مرتبط است. متیلاسیون DNA در سلول‌های خون محیطی همچنین حاوی اطلاعات متیلاسیون مربوط به تومور است که از کاربرد تشخیص متیلاسیون سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی در سرطان پشتیبانی می‌کند (۵۴). در مطالعه‌ای نشان داده شد که زنان دارای متیلاسیون قابل‌تشخیص در ناحیه پروموتر BRCA1 در سلول‌های خون محیطی، در معرض خطر بالایی برای ابتلا به سرطان پستان زودرس هستند (۵۵).

تغییرات متیلاسیون در ماکروفاژهای نوع M1 منجر به کاهش ژن‌های مرتبط با گلیکولیز در این سلول‌ها با اثرات ضد سرطانی می‌شود و باعث تبدیل این سلول‌ها به ماکروفاژهای نوع M2 با اثرات تحریک‌کننده سرطان می‌شود و این تغییر باعث پیشرفت تومورها می‌شود (۵۶, ۵۷). سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی دارای مزایای ویژه هستند، ازجمله اینکه در مقایسه با cfDNA یا CTC، نیمه‌عمر طولانی ۱-۲ روز داشته و فرآیند استخراج ساده‌تری دارند (۵۸) (شکل ۱).



شکل ۱. کاربرد متیلاسیون DNA مبتنی بر خون در بیماران سرطانی.

به‌طورکلی در فرآیند مدیریت سرطان، متیلاسیون DNA مبتنی بر خون می‌تواند برای تشخیص زودهنگام، پیش‌آگهی، درمان هدفمند و نظارت پویا پس از درمان بیماران سرطانی استفاده شود.

نقش متیلاسیون ctDNA/cfDNA در تشخیص زودهنگام و پیش‌بینی سرطان پستان

در رویکرد جدید DNA عاری از سلول در گردش مشتق شده از تومور (cfDNA) از نشانگرهای متیلاسیون cfDNA در گردش از تومورها برای طراحی یک مدل تشخیصی استفاده می‌شود و در این مدل، نمونه‌های آموزشی فقط از بیماران در مراحل آخر بیماری و افراد سالم مشتق می‌شوند. این مدل روی بیماران در مراحل اولیه و افراد سالم ارزیابی شده است و نتایج حساسیت ۸۶/۱ ٪ برای تشخیص زودهنگام سرطان و دقت متوسط ۷۶/۹ ٪ برای محل تومور را با اختصاصیت ۹۴/۷ ٪ نشان می‌دهند. درنتیجه برای غربالگری سرطان و نظارت بر پیشرفت تومور می‌تواند استفاده شود (۵۹).

همچنین بررسی‌ها نشان می‌دهد، DNA توموری در گردش متیله (ctDNA) به‌طور مداوم در خون بیماران سرطانی در مقایسه با ctDNA جهش‌یافته مشاهده می‌شود. ازاین‌رو، ctDNA متیله به‌عنوان یک نشانگر زیستی بالقوه برای بهبود تشخیص، پیش‌آگهی و پیش‌بینی سرطان عمل می‌کند (۶۰). متیلاسیون ctDNA نیز نقش مهمی در پیش‌بینی پیش‌آگهی سرطان‌هایی مانند سرطان تخمدان، سرطان روده بزرگ و سرطان پروستات دارد که همگی به نتایج پیش‌بینی خوبی دست یافتند.

سرطان پستان یک بیماری ناهمگن است و طبقه‌بندی اولیه آن بر اساس نشانگرهای ایمونوهیستوشیمی در بیوپسی تومور شامل گیرنده استروژن، گیرنده پروژسترون، KI-67 و فاکتور رشد اپیدرم انسانی ۲ (HER2) می‌شود (۶۱). زیرگروه‌های مختلفی با هدف شخصی‌سازی درمان و پیش‌آگهی پیشنهاد شده‌اند که با استفاده از پروفایل‌های بیان ژن پنج نوع زیرگروه مولکولی ذاتی سرطان پستان، با پیامدهای متفاوت (مجرای A، مجرای B، HER -2 غنی‌شده، قاعده مانند، و کلودین کم) مشخص شده است (۶۲, ۶۳).

با مطالعه بر روی متیلاسیون cfDNA توسط توالی‌یابی ایمونوپسیتاسیون متیلاسیون DNA بدون سلول (cfMeDIP-Seq) در خون نشان می‌دهد که مشخص کردن مناطق cfDNA فوق متیله، غنی‌سازی قابل‌توجهی برای هیپرمتیلاسیون در بافت‌های سرطان پستان توده خارجی در مقایسه با لکوسیت‌های خون محیطی و بافت‌های طبیعی پستان دارند. بدین ترتیب پیش‌بینی سرطان پستان تا شش سال قبل از تشخیص بالینی در خون افراد بدون علامت با تجزیه‌وتحلیل نشانگرهای متیلاسیون DNA بدون سلول امکان‌پذیر می‌شود (۶۴). در یک کارآزمایی بالینی برای شناخت تفاوت‌های متیلاسیون کل ژنوم بین بیماران سرطانی و بیماران تومور خوش‌خیم، کل ژنوم برای بافت‌ها و cfDNA در سرطان پستان با استفاده از فناوری توالی‌یابی بی سولفیت توالی یابی شد و از آن به‌عنوان یک مدل تشخیصی ترکیبی برای تشخیص سرطان پستان می‌توان استفاده نمود (۶۵). بااین‌وجود، فناوری توالی‌یابی متیلاسیون در سطح ژنوم نمی‌تواند مکان‌های متیلاسیون را دقیقاً تعیین کند و برای تشخیص متیلاسیون DNA در محل خاص، روش‌هایی مانند PCR اختصاصی متیلاسیون (MSP) را می‌توان بکار برد (۶۶). در کل، توسعه فناوری‌های جدید در آینده، به‌منظور کاهش هزینه توالی‌یابی کل ژنوم، یک نیاز فوری برای غربالگری زودهنگام سرطان است.

نقش متیلاسیون PBMC در تشخیص زود هنگام و پیش‌بینی سرطان پستان

از مهم‌ترین تغییرات مولکولی در سرطان‌ها، تغییرات در متیلاسیون DNA است که هم در سطح ژن‌های خاص

و هم در سطح کل ژنوم می‌تواند رخ دهد. در بیماری سرطان شاهد هیپومتیلاسیون کلی و هایپرمتیلاسیون منطقه‌ای هستیم، که این هایپرمتیلاسیون منطقه‌ای به‌وضوح در چندین نواحی ژنومی متفاوت مشاهده می‌شود و می‌تواند شامل ژن‌های سرکوب‌کننده تومور شود که فعالیت‌های رونویسی را تنظیم می‌کنند (۶۷،۶۸).

مطالعات اخیر نشان می‌دهد سطح پایین متیلاسیون کلی در سلول‌های خون محیطی در سرطان‌های مختلف ازجمله سرطان پستان، مثانه و غیره مشاهده شده است که می‌تواند تحت تأثیر عوامل متعددی مانند سن، جنس، شیوه زندگی، مواجهه‌های محیطی و چندشکلی‌های ژنتیکی باشد (۶۹). در مطالعه‌ی ارتباط بین سطح متیلاسیون کلی DNA لکوسیت خون محیطی و سرطان پستان در بین زنان ژاپنی، مشاهده شد که سطح متیلاسیون کلی DNA لکوسیت‌های خون محیطی در بیماران مبتلا به سرطان پستان پایین است. درنتیجه، از سطح متیلاسیون کلی DNA لکوسیت خون محیطی می‌توان به‌عنوان یک نشانگر زیستی بالقوه برای خطر سرطان پستان استفاده نمود (۶۸،۷۰).

در مطالعه‌ای دیگر از توالی‌یابی بی‌سولفیت کاهش‌یافته (Reduced Bisulfite Sequencing) (RRBS) برای بررسی پروفایل متیلاسیون در سراسر ژنوم در تومور پستان و سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی (PBMCs) در مدل حیوانی استفاده شد و نتایج افزایش متیلاسیون در ژن‌های مربوط به آپوپتوز و انتقال غشای یونی را نشان داد، درحالی‌که ژن‌های مربوط به تکثیر سلولی و انکوژن در بافت‌های تومور هیپومتیله شدند (۷۱،۷۲). مطالعه بر روی زنان مبتلا به سرطان پستان و زنان سالم با استفاده از آرایه متیلاسیون DNA ایلومینا K۴۵۰ نشان می‌دهد که پروفایل متیلاسیون DNA سلول‌های T و سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی (PBMC) در پیشرفت سرطان تغییر کرده و تجزیه‌وتحلیل داده‌ها نشان داد که ۱۰۰۰۰ مکان با پیشرفت سرطان پستان مرتبط بودند. همچنین یافته‌ها فهرستی از ۸۹ مکان CG را نشان می‌دهد که با پیشرفت سرطان پستان ارتباط زیادی داشتند و اکثریت قریب به اتفاق این مکان‌ها هیپومتیله شده و با عملکرد سیستم ایمنی در ارتباط هستند (۷۳). طیف وسیعی از عوامل زمینه‌ساز سرطان پستان شامل سبک زندگی و رژیم غذایی با نشانگرهای متیلاسیون DNA گلبول‌های سفید خون ازجمله LINE-1، mdC و Alu ارتباط دارند. درنتیجه بر متیلاسیون کلی DNA گلبول‌های سفید خون تأثیر دارند (۷۴). سرطان پستان سه‌گانه منفی (TNBC) یک بیماری تهاجمی، ناهمگن است که درمان آن دشوار است. شناسایی شناساگرهای زیستی جدید در رابطه با این سرطان پستان برای تصمیم‌گیری بالینی بسیار حائز اهمیت است و برای این منظور، مطالعات زیادی افزایش نشانگرهای رونویسی خون در TNBC را گزارش کرده‌اند. این یافته‌ها مربوط به التهاب قوی و تقویت سیگنال‌های ایمنی تغییریافته هستند که می‌تواند TNBC را از سایر زیرگروه‌های کلاسیک سرطان پستان متمایز کرده و تشخیص را تسهیل کنند (۷۵).

نقش متیلاسیون DNA مبتنی بر خون در پایش پویا سرطان پستان

برای بررسی وضعیت بیماران سرطانی بعد از انجام عمل جراحی و پیگیری تأثیر داروها و نیز نظارت بر اینکه آیا عود تومور رخ داده یا خیر، نشانگرهای سرطان در خون مورد تجزیه‌وتحلیل می‌شوند. افزایش در سطح بیان این نشانگرها به دنبال عود مجدد تومور یا متاستاز سلول‌های سرطانی اتفاق می‌افتد. درحالی‌که کاهش آن‌ها بعد از جراحی یا استفاده از دارو نشان‌دهنده درمان مؤثر و مناسب است (۷۶،۷۷). برای تشخیص و عملکرد پیش‌آگهی متیلاسیون پروموتر چند ژن (APC، BRCA1، CCND2، FOXA1، PSAT1، RASSF1A و SCGB3A1) ارزیابی شد که بر اساس نتایج بدست

آمده، پنل با بهترین عملکرد در ccfDNA (APC، FOXA1 و RASSF1A) حساسیت، ویژگی و دقت بیش از ۷۰٪ را نشان داد. در نتیجه، امکان تشخیص زود هنگام در بیوپسی‌های مایع برای مدیریت سرطان پستان را فراهم می‌کند. جدول ۱ (۷۸).

جدول ۱. متیلاسیون اختصاصی ژن در خون محیطی بیماران زن مبتلا به سرطان پستان

تغییرات اپی ژنتیکی	ژن	تعداد نمونه مورد/شاهدی	منبع
افزایش متیلاسیون	BRCA1	۶۶ / ۳۶ ۹۰۲ / ۹۹۰ ۲۵۵ / ۲۶۹	(۷۸)
افزایش متیلاسیون	ATM	۲۴۹ / ۲۴۸ ۱۹۰ / ۱۹۰	
افزایش متیلاسیون	ESR1	۳۴ / ۵۰ ۳۲۰ / ۶۷۶	
افزایش متیلاسیون	TIMP3	۳۴ / ۵۰ ۳۲۰ / ۶۷۶	
افزایش متیلاسیون	RASSF1A	۱۳۶ / ۶۴	
کاهش متیلاسیون	CD160 ISYNA RAD51B	۲۲۴ / ۲۲۴	

در مطالعه‌ای، تراکم ماموگرافی به‌عنوان یک عامل خطر قوی برای سرطان پستان را ازنظر اپی‌ژنوم مورد بررسی قرار داده و نتایج آن، دخالت بالقوه چندین ژن در مکانیسم‌های زیستی مربوط به تفاوت در تراکم پستان بین زنان را نشان می‌دهد. ازجمله آن‌ها می‌توان به متیلاسیون پروموترهای PAX8 و PF4 (ژن‌های دخیل در تنظیم رگ‌زایی) و ژن‌های مرتبط با سرطان مانند HDLBP، TGFB2، CCT4، و PAX8 اشاره نمود (۷۹). مطالعه‌ای روی جمعیت قفقازی درباره متیلاسیون مبتنی بر خون ژن P پروتئین متصل شونده به کلسیم S100 (S100P) و ژن هیالورونوگلوکوزامینیداز ۲ (HYAL2) و ارتباط آن با سرطان پستان توسط طیف‌سنجی جرمی انجام شده که نشان می‌دهد، هیپومتیلاسیون هر دو S100P و HYAL2 می‌تواند یک عامل خطر برای بروز سرطان پستان باشد. همچنین، متیلاسیون مبتنی بر خون ممکن است با پیش‌زمینه قومی، وضعیت هورمونی و سبک زندگی اصلاح شود (۸۰). به‌طورکلی، بررسی چندین مطالعه که برای ارزیابی ۳۵۵ نشانگر انجام شده است، مشخص می‌کند که ارزش تشخیصی اکثر نشانگرهای منفرد نسبتاً متوسط بودند. تنها شش نشانگر حساسیت بیش از ۴۰٪ و اختصاصیت بیشتر از ۷۵٪ را نشان دادند و فقط ۲ نشانگر (HYAL2 و S100P) به‌طور مستقل تائید شدند. همچنین ۲۷۶ محل CpG مرتبط با خطر سرطان پستان را شناسایی شدند، اما هیچ همپوشانی بین CpGهای گزارش شده از این مطالعات مشاهده نشده است. این نتایج نشان می‌دهد که نشانگرها یا ترکیبات نشانگر می‌تواند برای طبقه‌بندی خطر سرطان پستان مفید باشند (۸۱). درمجموع می‌توان نتیجه گرفت که نظارت پویا تومورها توسط متیلاسیون ctDNA در تشخیص مؤثر عود تومور در مراحل اولیه کمک‌کننده است و می‌تواند به اخذ تصمیمات بالینی مناسب منجر شود.

نقش متیلاسیون DNA مبتنی بر خون در درمان هدفمند سرطان پستان

امروزه با استفاده از توالی بی‌سولفیت هدفمند cfDNA، ده‌ها نشانگر CpG با الگوهای متیلاسیون بسیار متفاوت بین نمونه‌های پلاسما سرطان پستان و عادی شناسایی می‌شود که Cg23035715 (TLR5) بهترین قدرت تشخیصی را دارد و کمک‌کننده اصلی مدل‌های ۲۶ نشانگر و ۴ نشانگر می‌تواند باشد. به‌طورکلی، سطح متیلاسیون این نشانگرها در سرطان پستان کمتر است (هیپومتیلاسیون)، درحالی‌که بیشتر نشانگرهای دیگر هیپرمتیله هستند. گزارشات ژانگ و همکاران نشان می‌دهد که TLR5 در سرطان پستان بسیار بیان می‌شود و مسیر سیگنالینگ TLR5 در سلول‌های سرطان پستان بیش‌ازحد فعال است. همچنین، مارکرهای دیگری مانند

OTP، FEZF2 و TSHZ3 در تومورزایی سرطان پستان و کارسینوم نازوفارنکس نقش دارند. هزینه بالا یک مانع بزرگ برای اجرای NGS در غربالگری سرطان است. بنابراین، باید سعی شود تا عدد نشانگر در مدل‌ها را کاهش داد تا بتوان آن را به تست‌های مبتنی بر PCR تبدیل نمود. استفاده از مدل‌هایی این‌چنین در یک گروه بزرگ آینده‌نگر با هدف ایجاد یک تست مقرون‌به‌صرفه و کاربرپسند برای غربالگری سرطان پستان، آزمایش و اعتبارسنجی گردیده است و به‌عنوان مدل تشخیصی مبتنی بر الگوهای متیلاسیون cfDNA ایجاد شده است. این رویکرد قابل‌اعتماد برای تشخیص زودهنگام سرطان پستان عمل نموده که مدل چهار نشانگر ساده‌شده نسبت به مدل ۲۶ نمونه‌ای، دارای پتانسیل بالینی بسیارخوبی برای تشخیص و غربالگری زودهنگام سرطان پستان است (۸۲). مهم‌ترین دلیل تأثیر ضعیف درمان بر روی سرطان، ناهمگنی سرطان و تشکیل زیرگروه‌های کلونال جدید همراه با پیشرفت بیماری است که مطالعات DNA مبتنی بر خون می‌توانند به انتخاب درمان هدفمند بعدی کمک‌کننده باشند (۸۳, ۸۴). سرطان پستان سه‌گانه منفی (Triple Negative Breast Cancer)(TNBC) که تهاجمی‌ترین زیرگروه سرطان پستان است و به دنبال تغییرات اپی ژنتیکی مانند هیپرمتیلاسیون DNA توسط DNA متیل ترانسفراز ۱ (DNMT1) رخ می‌دهد. DNMT1 در زیرگروه TNBC بیش‌ازحد بیان می‌شود و بیان آن با بقای ضعیف سرطان پستان مرتبط است. DNMT1 با هیپرمتیلاسیون نواحی پروموتر گیرنده استروژن موجب کاهش بیان آن شده و با افزایش انتقال اپیتلیال مزانشیمی مورد نیاز برای متاستاز باعث اتوفاژی سلولی و رشد سلول‌های بنیادی سرطانی در TNBCs می‌شوند. درنتیجه با مهار DNMT1 با استفاده از مهارکننده‌هایی مانند هیپومتیل کننده آزاسیتیدین، دسیتابین و گوادسیتابین، شاهد اثرات ضد توموری بر سلول‌های TNBC و همچنین از بین بردن فنوتیپ‌های متاستاتیک و تهاجمی آن‌ها خواهیم بود (۸۵).

تشخیص DNA مبتنی بر خون به دلیل تکرارپذیری بالا و عدم ناهمگنی در مقایسه با بیوپسی بافت، می‌تواند تنظیم برنامه‌های درمانی برای نظارت بر تأثیر داروها و اقدامات درمانی را تسهیل نماید. همچنین بررسی CTCs، ctDNA و اگزوزوم‌ها و تغییر در وضعیت متیلاسیون DNA مبتنی بر خون در بیماران سرطانی می‌تواند دلیلی برای حضور تومورها باشد ولی برای یافتن علت دقیق ایجاد بیماری سرطان و یافتن جهش‌های ژنتیکی نیاز به مطالعات بیشتر و آزمایش‌های تکمیلی است (۸۶). متیلاسیون DNA در بافت‌ها باعث غیرفعال کردن ژن‌های سرکوبگر تومور و ایجاد سرطان می‌شود. متیلاسیون DNA و به‌ویژه مهارکننده‌های DNA متیل ترانسفراز، به‌عنوان یک روش مهم در درمان سرطان‌های پستان، پانکراس، مثانه و سایر سرطان‌ها موردتوجه قرار گرفته است (۸۷).

نتیجه‌گیری

در سال‌های اخیر تلاش‌های زیادی برای بررسی ارتباط بین نشانگرهای متیلاسیون و سرطان پستان انجام شده است. اگرچه نشانگرهای متیلاسیون DNA خون تاکنون برای تشخیص زودهنگام سرطان پستان کافی نیستند، اما آن‌ها را می‌توان به‌عنوان یک ابزار مؤثر در تشخیص زودهنگام، پیش‌بینی پیش‌آگهی و نظارت پویا سرطان استفاده نمود.

مشکلاتی برای استفاده از ctDNA، CTCها، اگزوزوم‌ها و PBMCها در کاربردهای پزشکی وجود دارد، ازجمله اینکه ctDNA به دلیل تکه‌تکه شدن زیاد و محتوای کم آن در خون محیطی به‌راحتی تحت تأثیر cfDNA یا DNA ژنومی در طول استخراج و تجزیه‌وتحلیل قرار می‌گیرد. همچنین مقدار CTC در خون محیطی بسیار کم است که استخراج و تجزیه‌وتحلیل آن را با مشکل روبرو می‌نماید. اگزوزوم‌های مشتق شده از

تومور منبع ناشناخته و پیچیده داشته و جداسازی اگزوزوم‌های خاص تومور سخت است (۸۸).

اگرچه PBMCها این مشکلات ذکرشده را ندارند اما اختصاصیت توموری آن‌ها کم بوده و درنتیجه کاربرد بیشتر آن‌ها را کاهش می‌دهد. متیلاسیون DNA مبتنی بر خون، برای کاربرد پزشکی هنوز در مراحل اولیه است و فقدان استانداردهای یکپارچه تشخیص بین مطالعات و قابلیت تکرارپذیری ضعیفی برای نشانگرهای انتخاب‌شده در مطالعات وجود دارد. به‌هرحال استفاده از متیلاسیون DNA مبتنی بر خون به‌عنوان جایگزینی مناسب برای بیوپسی بافت در تشخیص موردتوجه قرار گرفته است. از دیگر مشکلاتی که در بیماری سرطان با آن مواجه هستیم زمانی است که غلظت DNA مبتنی بر خون در خون محیطی کم باشد که به دلیل پایین بودن حساسیت برخی از کیت‌های بیوپسی مایع، نتایج تشخیص ممکن است منفی کاذب گزارش شود (۸۶،۸۸).

نتیجه اینکه، استفاده از متیلاسیون DNA مبتنی بر خون در سرطان در مراحل ابتدای راه است و محققان باید بیشتر به کشف نشانگرهای خاص توجه کنند و حساسیت تشخیص سرطان پستان را در مراحل اولیه بهبود بخشند (برای مثال از طریق غنی‌سازی ctDNA با طول کوتاه در پلاسما). درعین‌حال، هزینه و وضعیت پرداخت‌کننده (بیمه فردی یا پزشکی) دو عامل مهم هستند که هنگام توسعه و استفاده از آزمون متیلاسیون DNA در سرطان پستان باید مدنظر قرار گیرد. در کشورهای درحال‌توسعه و مناطق روستایی، انجام یک آزمایش مبتنی بر QMSP ممکن است اولین انتخاب باشد، درحالی‌که در کشورهای توسعه‌یافته و مناطق شهری، از روش‌های مبتنی بر NGS نیز می‌توان به‌عنوان یک‌راه حل جایگزین استفاده نمود (۸۹).

در کل، متیلاسیون DNA به‌عنوان یک نشانگر قوی و حساس به‌طور گسترده در نمونه‌های سرطان پستان مورد مطالعه قرار گرفته و بسیاری از نشانگرهای متیلاسیون DNA بالقوه که قبلاً در سرطان پستان مشخص شده‌اند و برخی از آن‌ها نیز به‌عنوان کیت‌های تجاری توسعه یافته‌اند می‌بایست ازنظر وجود حساسیت و ویژگی تشخیص سرطان پستان در مراحل اولیه، بهبود یابند. نمونه‌گیری استاندارد، تجزیه‌وتحلیل اولیه، جداسازی cfDNA و استفاده از روش‌های مولکولی باید در توسعه سنجش در نظر گرفته شود. بنابراین، با توسعه سریع فناوری جدید و کشف نشانگرهای متیلاسیون بیشتر و با افزایش حساسیت و اختصاصیت کیت‌های تشخیص و کاهش هزینه تشخیص بیوپسی مایع غیرتهاجمی انتظار می‌رود که متیلاسیون DNA به ابزاری مقرون‌به‌صرفه و غیرتهاجمی برای تشخیص زودهنگام سرطان پستان در آینده نزدیک تبدیل شود.

تشکر و قدردانی

از زحمات همه افرادی که در تهیه این مقاله به ما کمک نموده و ما را یاری دادند سپاسگزاریم.

تعارض منافع

نویسندگان اظهار می‌دارند که هیچ‌گونه تعارض منافعی در پژوهش حاضر وجود ندارد.

حمایت مالی

این مطالعه بدون هیچ حمایت مالی انجام پذیرفت.

مشارکت نویسندگان

لیلا آب‌خوئی و معصومه جلالوند، طراحی علمی و گردآوری مقالات، پیش‌نویس و اصلاح نوشتار اولیه، تائید نهایی نسخه نگارش شده. محمدکاظم شاهمرادی و مونس مولودی تپه نگارش پیش‌نویس و اصلاح نوشتار اولیه.

References

1. Nishimura T, Kakiuchi N, Yoshida K, Sakurai T, Kataoka TR, Kondoh E, et al. Evolutionary histories of breast cancer and related clones. Nature. 2023;620(7974):607-14.
2. McDonald ES, Clark AS, Tchou J, Zhang P, Freedman GM. Clinical diagnosis and management of breast cancer. Journal of Nuclear Medicine. 2016;57(Supplement 1):9S-16S.
3. Mazzucchelli R, Colanzi P, Pomante R, Muzzonigro G, Montironi R. Prostate tissue and serum markers. Advances in clinical pathology: the official journal of Adriatic Society of Pathology. 2000;4(3):111-20.
4. Morell AR. CEA serum levels in non-neoplastic disease. The International journal of biological markers. 1992;7(3):160-6.
5. Sikaris KA. CA125—a test with a change of heart. Heart, Lung and Circulation. 2011;20(10):634-40.
6. Wanebo HJ, Rao B, Pinsky CM, Hoffman RG, Stearns M, Schwartz MK, et al. Preoperative carcinoembryonic antigen level as a prognostic indicator in colorectal cancer. New England Journal of Medicine. 1978;299(9):448-51.
7. Ballehaninna UK, Chamberlain RS. Serum CA 19-9 as a biomarker for pancreatic cancer—a comprehensive review. Indian journal of surgical oncology. 2011;2:88-100.
8. Di Meo A, Bartlett J, Cheng Y, Pasic MD, Yousef GM. Liquid biopsy: a step forward towards precision medicine in urologic malignancies. Molecular cancer. 2017;16:1-14.
9. Danese E, Montagnana M, Lippi G. Circulating molecular biomarkers for screening or early diagnosis of colorectal cancer: which is ready for prime time? Annals of Translational Medicine. 2019;7(21).
10. Feinberg AP, Ohlsson R, Henikoff S. The epigenetic progenitor origin of human cancer. Nature reviews genetics. 2006;7(1):21-33.
11. Schott S, Yang R, Stöcker S, Canzian F, Giese N, Bugert P, et al. HYAL2 methylation in peripheral blood as a potential marker for the detection of pancreatic cancer: a case control study. Oncotarget. 2017;8(40):67614.
12. Portela A, Esteller M. Epigenetic modifications and human disease. Nature biotechnology. 2010;28(10):1057-68.
13. Bestor TH, Verdine GL. DNA methyltransferases. Current opinion in cell biology. 1994;6(3):380-9.
14. Morgan A, Davies TJ, Mc Auley MT. The role of DNA methylation in ageing and cancer. Proceedings of the Nutrition Society. 2018;77(4):412-22.
15. Mittelstraß K, Waldenberger M. DNA methylation in human lipid metabolism and related diseases. Current opinion in lipidology. 2018;29(2):116.
16. Okugawa Y, Grady WM, Goel A. Epigenetic alterations in colorectal cancer: emerging biomarkers. Gastroenterology. 2015;149(5):1204-25. e12.

17. Nejman D, Straussman R, Steinfeld I, Ruvolo M, Roberts D, Yakhini Z, et al. Molecular rules governing de novo methylation in cancer. Cancer research. 2014;74(5):1475-83.
18. Klutstein M, Nejman D, Greenfield R, Cedar H. DNA methylation in cancer and aging. Cancer research. 2016;76(12):3446-50.
19. Tahiliani M, Koh KP, Shen Y, Pastor WA, Bandukwala H, Brudno Y, et al. Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. Science. 2009;324(5929):930-5.
20. Feinberg AP, Tycko B. The history of cancer epigenetics. Nature Reviews Cancer. 2004;4(2):143-53.
21. Gaudet F, Hodgson JG, Eden A, Jackson-Grusby L, Dausman J, Gray JW, et al. Induction of tumors in mice by genomic hypomethylation. Science. 2003;300(5618):489-92.
22. Ushijima T. Detection and interpretation of altered methylation patterns in cancer cells. Nature Reviews Cancer. 2005;5(3):223-31.
23. Esteller M. CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future. Oncogene. 2002;21(35):5427-40.
24. Baylin SB, Jones PA. A decade of exploring the cancer epigenome—biological and translational implications. Nature Reviews Cancer. 2011;11(10):726-34.
25. Egger G, Liang G, Aparicio A, Jones PA. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. Nature. 2004;429(6990):457-63.
26. Pailler E, Auger N, Lindsay C, Vielh P, Islas-Morris-Hernandez A, Borget I, et al. High level of chromosomal instability in circulating tumor cells of ROS1-rearranged non-small-cell lung cancer. Annals of oncology. 2015;26(7):1408-15.
27. 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(2):345-58.
28. Feinberg AP, Koldobskiy MA, Göndör A. Epigenetic modulators, modifiers and mediators in cancer aetiology and progression. Nature Reviews Genetics. 2016;17(5):284-99.
29. Zhang Y, Chang L, Yang Y, Fang W, Guan Y, Wu A, et al. Intratumor heterogeneity comparison among different subtypes of non-small-cell lung cancer through multi-region tissue and matched ctDNA sequencing. Molecular cancer. 2019;18(1):1-6.
30. Zhao M, Wang Q, Wang Q, Jia P, Zhao Z. Computational tools for copy number variation (CNV) detection using next-generation sequencing data: features and perspectives. BMC bioinformatics. 2013;14(11):1-16.
31. Chen X, Chang C-W, Spoerke JM, Yoh KE, Kapoor V, Baudo C, et al. Low-pass whole-genome sequencing of circulating cell-free DNA demonstrates dynamic

changes in genomic copy number in a squamous lung cancer clinical cohort. Clinical Cancer Research. 2019;25(7):2254-63.
32. Murtaza M, Dawson S-J, Pogrebniak K, Rueda OM, Provenzano E, Grant J, et al. Multifocal clonal evolution characterized using circulating tumour DNA in a case of metastatic breast cancer. Nature communications. 2015;6(1):8760.
33. Jiang P, Chan CW, Chan KA, Cheng SH, Wong J, Wong VW-S, et al. Lengthening and shortening of plasma DNA in hepatocellular carcinoma patients. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2015;112(11):E1317-E25.
34. Pailler E, Oulhen M, Borget I, Remon J, Ross K, Auger N, et al. Circulating tumor cells with aberrant ALK copy number predict progression-free survival during Crizotinib treatment in ALK-rearranged non–small cell lung cancer patients. Cancer Research. 2017;77(9):2222-30.
35. Fleischhacker M, Schmidt B. Circulating nucleic acids (CNAs) and cancer—a survey. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer. 2007;1775(1):181-232.
36. Alix-Panabières C, Schwarzenbach H, Pantel K. Circulating tumor cells and circulating tumor DNA. Annual review of medicine. 2012;63:199-215.
37. Baccelli I, Schneeweiss A, Riethdorf S, Stenzinger A, Schillert A, Vogel V, et al. Identification of a population of blood circulating tumor cells from breast cancer patients that initiates metastasis in a xenograft assay. Nature biotechnology. 2013;31(6):539-44.
38. Racila E, Euhus D, Weiss AJ, Rao C, McConnell J, Terstappen LW, et al. Detection and characterization of carcinoma cells in the blood. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1998;95(8):4589-94.
39. Zhang L, Ridgway LD, Wetzel MD, Ngo J, Yin W, Kumar D, et al. The identification and characterization of breast cancer CTCs competent for brain metastasis. Science translational medicine. 2013;5(180):180ra48-ra48.
40. Alix-Panabières C, Pantel K. Challenges in circulating tumour cell research. Nature Reviews Cancer. 2014;14(9):623-31.
41. Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Matera J, Miller MC, et al. Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. New England Journal of Medicine. 2004;351(8):781-91.
42. Dawson S-J, Tsui DW, Murtaza M, Biggs H, Rueda OM, Chin S-F, et al. Analysis of circulating tumor DNA to monitor metastatic breast cancer. New England Journal of Medicine. 2013;368(13):1199-209.
43. Sausen M, Leary RJ, Jones S, Wu J, Reynolds CP, Liu X, et al. Integrated genomic analyses identify ARID1A and ARID1B alterations in the childhood cancer neuroblastoma. Nature genetics. 2013;45(1):12-7.
44. Yu W, Hurley J, Roberts D, Chakrabortty S, Enderle D, Noerholm M, et al.

Exosome-based liquid biopsies in cancer: opportunities and challenges. Annals of Oncology. 2021;32(4):466-77.
45. Balaj L, Lessard R, Dai L, Cho Y-J, Pomeroy SL, Breakefield XO, et al. Tumour microvesicles contain retrotransposon elements and amplified oncogene sequences. Nature communications. 2011;2(1):180.
46. Di Vizio D, Kim J, Hager MH, Morello M, Yang W, Lafargue CJ, et al. Oncosome formation in prostate cancer: association with a region of frequent chromosomal deletion in metastatic disease. Cancer research. 2009;69(13):5601-9.
47. Minciacchi VR, You S, Spinelli C, Morley S, Zandian M, Aspuria P-J, et al. Large oncosomes contain distinct protein cargo and represent a separate functional class of tumor-derived extracellular vesicles. Oncotarget. 2015;6(13):11327.
48. Vagner T, Spinelli C, Minciacchi VR, Balaj L, Zandian M, Conley A, et al. Large extracellular vesicles carry most of the tumour DNA circulating in prostate cancer patient plasma. Journal of extracellular vesicles. 2018;7(1):1505403.
49. Xu R, Rai A, Chen M, Suwakulsiri W, Greening DW, Simpson RJ. Extracellular vesicles in cancer—implications for future improvements in cancer care. Nature reviews Clinical oncology. 2018;15(10):617-38.
50. Zhou B, Xu K, Zheng X, Chen T, Wang J, Song Y, et al. Application of exosomes as liquid biopsy in clinical diagnosis. Signal transduction and targeted therapy. 2020;5(1):144.
51. Yang J-C, Hu J-J, Li Y-X, Luo W, Liu J-Z, Ye D-W. Clinical applications of liquid biopsy in hepatocellular carcinoma. Frontiers in Oncology. 2022;12:781820.
52. Al-Nedawi K, Meehan B, Micallef J, Lhotak V, May L, Guha A, et al. Intercellular transfer of the oncogenic receptor EGFRvIII by microvesicles derived from tumour cells. Nature cell biology. 2008;10(5):619-24.
53. Choi D, Montermini L, Kim D-K, Meehan B, Roth FP, Rak J. The impact of oncogenic EGFRvIII on the proteome of extracellular vesicles released from glioblastoma cells. Molecular & Cellular Proteomics. 2018;17(10):1948-64.
54. Kristensen LS, Raynor M, Candiloro I, Dobrovic A. Methylation profiling of normal individuals reveals mosaic promoter methylation of cancer-associated genes. Oncotarget. 2012;3(4):450.
55. Wong EM, Southey MC, Fox SB, Brown MA, Dowty JG, Jenkins MA, et al. Constitutional methylation of the BRCA1 promoter is specifically associated with BRCA1 mutation-associated pathology in early-onset breast cancer. Cancer Prevention Research. 2011;4(1):23-33.
56. Zhang M, Pan X, Fujiwara K, Jurcak N, Muth S, Zhou J, et al. Pancreatic cancer cells render tumor-associated macrophages metabolically reprogrammed by a GARP and DNA methylation-mediated mechanism. Signal

transduction and targeted therapy. 2021;6(1):366.
57. Kurahara H, Shinchi H, Mataki Y, Maemura K, Noma H, Kubo F, et al. Significance of M2-polarized tumor-associated macrophage in pancreatic cancer. Journal of Surgical Research. 2011;167(2):e211-e9.
58. Ziegler-Heitbrock L. Monocyte subsets in man and other species. Cellular immunology. 2014;289(1-2):135-9.
59. Zhou X, Cheng Z, Dong M, Liu Q, Yang W, Liu M, et al. Tumor fractions deciphered from circulating cell-free DNA methylation for cancer early diagnosis. Nature Communications. 2022;13(1):7694.
60. Han X, Wang J, Sun Y. Circulating tumor DNA as biomarkers for cancer detection. Genomics, proteomics & bioinformatics. 2017;15(2):59-72.
61. Kobayashi K, Ito Y, Matsuura M, Fukada I, Horii R, Takahashi S, et al. Impact of immunohistological subtypes on the long-term prognosis of patients with metastatic breast cancer. Surgery today. 2016;46:821-6.
62. Prat A, Parker J, Fan C, Perou CM. PAM50 assay and the three-gene model for identifying the major and clinically relevant molecular subtypes of breast cancer. Breast cancer research and treatment. 2012;135:301-6.
63. Sant M, Bernat-Peguera A, Felip E, Margelí M. Role of ctDNA in breast cancer. Cancers. 2022;14(2):310.
64. Cheng N, Skead K, Singhawansa A, Ouellette T, Elliott M, Cescon DW, et al. Pre-diagnosis plasma cell-free DNA methylome profiling up to seven years prior to clinical detection reveals early signatures of breast cancer. medRxiv. 2023:2023.01. 30.23285027.
65. Liu J, Zhao H, Huang Y, Xu S, Zhou Y, Zhang W, et al. Genome-wide cell-free DNA methylation analyses improve accuracy of non-invasive diagnostic imaging for early-stage breast cancer. Molecular Cancer. 2021;20:1-7.
66. Matsui S, Kagara N, Mishima C, Naoi Y, Shimoda M, Shimomura A, et al. Methylation of the SEPT9_v2 promoter as a novel marker for the detection of circulating tumor DNA in breast cancer patients. Oncology reports. 2016;36(4):2225-35.
67. Terry MB, Delgado-Cruzata L, Vin-Raviv N, Wu HC, Santella RM. DNA methylation in white blood cells: association with risk factors in epidemiologic studies. Epigenetics. 2011;6(7):828-37.
68. Kuchiba A, Iwasaki M, Ono H, Kasuga Y, Yokoyama S, Onuma H, et al. Global methylation levels in peripheral blood leukocyte DNA by LUMA and breast cancer: a case–control study in Japanese women. British journal of cancer. 2014;110(11):2765-71.
69. Zhu Z-Z, Hou L, Bollati V, Tarantini L, Marinelli B, Cantone L, et al. Predictors of global methylation levels in blood DNA of healthy subjects: a combined

analysis. International journal of epidemiology. 2012;41(1):126-39.
70. Esteller M. Epigenetics in cancer. New England Journal of Medicine. 2008;358(11):1148-59.
71. Sarvari P, Sarvari P, Ramírez-Díaz I, Mahjoubi F, Rubio K. Advances of epigenetic biomarkers and Epigenome editing for early diagnosis in breast cancer. International Journal of Molecular Sciences. 2022;23(17):9521.
72. van Veldhoven K, Polidoro S, Baglietto L, Severi G, Sacerdote C, Panico S, et al. Epigenome-wide association study reveals decreased average methylation levels years before breast cancer diagnosis. Clinical epigenetics. 2015;7(1):1-12.
73. Parashar S, Cheishvili D, Mahmood N, Arakelian A, Tanvir I, Khan HA, et al. DNA methylation signatures of breast cancer in peripheral T-cells. BMC cancer. 2018;18(1):1-9.
74. Chopra-Tandon N, Wu H, Arcaro KF, Sturgeon SR. Relationships between global DNA methylation in circulating white blood cells and breast cancer risk factors. Journal of Cancer Epidemiology. 2017;2017.
75. Čelešnik H, Potočnik U. Peripheral blood transcriptome in breast cancer patients as a source of less invasive immune biomarkers for personalized medicine, and implications for triple negative breast cancer. Cancers. 2022;14(3):591.
76. Xu X, Xiao Y, Hong B, Hao B, Qian Y. Combined detection of CA19-9 and B7-H4 in the diagnosis and prognosis of pancreatic cancer. Cancer Biomarkers. 2019;25(3):251-7.
77. Liang Y, Cui J, Ding F, Zou Y, Guo H, Man Q, et al. A new staging system for postoperative prognostication in pancreatic ductal adenocarcinoma. Iscience. 2023;26(9).
78. Salta S, P. Nunes S, Fontes-Sousa M, Lopes P, Freitas M, Caldas M, et al. A DNA methylation-based test for breast cancer detection in circulating cell-free DNA. Journal of clinical medicine. 2018;7(11):420.
79. Lucia RM, Huang W-L, Alvarez A, Masunaka I, Ziogas A, Goodman D, et al. Association of mammographic density with blood DNA methylation. Epigenetics. 2022;17(5):531-46.
80. Yin Q, Yang X, Li L, Xu T, Zhou W, Gu W, et al. The association between breast cancer and blood-based methylation of S100P and HYAL2 in the Chinese population. Frontiers in Genetics. 2020;11:977.
81. Guan Z, Yu H, Cuk K, Zhang Y, Brenner H. Whole-blood DNA methylation markers in early detection of breast cancer: a systematic literature review. Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention. 2019;28(3):496-505.
82. Zhang X, Zhao D, Yin Y, Yang T, You Z, Li D, et al. Circulating cell-free DNA-based methylation patterns for breast cancer diagnosis. NPJ Breast Cancer. 2021;7(1):106.
83. Hutóczki G, Virga J, Birkó Z, Klekner A. Novel concepts of glioblastoma therapy

concerning its heterogeneity. International Journal of Molecular Sciences. 2021;22(18):10005.
84. Nunes SP, Henrique R, Jerónimo C, Paramio JM. DNA methylation as a therapeutic target for bladder cancer. Cells. 2020;9(8):1850.
85. Wong KK, editor DNMT1: A key drug target in triple-negative breast cancer. Seminars in cancer biology; 2021: Elsevier.
86. Li Y, Fan Z, Meng Y, Liu S, Zhan H. Blood-based DNA methylation signatures in cancer: A systematic review. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease. 2023;1869(1):166583.
87. Wong KK. DNMT1 as a therapeutic target in pancreatic cancer: mechanisms and clinical implications. Cellular Oncology. 2020;43:779-92.
88. Nikanjam M, Kato S, Kurzrock R. Liquid biopsy: Current technology and clinical applications. Journal of Hematology & Oncology. 2022;15(1):1-14.
89. Xue Y, Huang C, Pei B, Wang Z, Dai Y. An overview of DNA methylation markers for early detection of gastric cancer: current status, challenges, and prospects. Frontiers in Genetics. 2023;14:1234645.

Blood-based DNA methylation signatures in the detection of breast cancer

Shahmoradi MK[1], Moloody Tapeh M[2], Abkhooie L[3*], Jalalvand M[4]

1. Assistant Professor, Department of General Surgical, Faculty of Medicine, Lorestan University of Medical Sciences, Khorramabad, Iran

2. Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University of Urmia Branch, Urmia, Iran

3. Assistant Professor, Department of Medical Biotechnology, Faculty of Medicine, Lorestan University of Medical Sciences, Khorramabad, Iran, lilaabkhooie@yahoo.com

4. Department of Medical Biotechnology, Faculty of Medicine, Lorestan University of Medical Sciences, Khorramabad, Iran

Received: *2023/11/15* Accepted: *2024/5/5*

Abstract

Background: The incidence of breast cancer is increasing in many countries. Therefore, early-stage breast cancer detection is of great importance in order to improve the chances of detection and treatment, as well as the prevention of women's deaths. Nowadays, despite the progress in cancer treatment, the use of non-molecular technologies, such as gastroscopy, computed tomography, and protein biomarkers, is still at the center of clinical cancer screening. These methods have some disadvantages, including low specificity and sensitivity. As a result, in breast cancer screening, most cancer patients may fail to be diagnosed and then miss the ideal treatment period. The objective of the present study was to examine the efficacy of biomarkers, specifically circulating cell-free DNA, circulating tumor DNA, and exosomes present in peripheral blood plasma, as a non-invasive means of detecting cancer at an early stage. In recent years, many efforts have been made to investigate the relationship between methylation markers and breast cancer. It appears that analyzing the DNA methylation pattern in blood for breast cancer could be a promising candidate for further research to confirm their roles in early diagnosis, prognosis prediction, and dynamic monitoring of breast cancer as a non-invasive method. Although the use of blood-based DNA methylation for medical applications is still in its early stages and is along with some challenges (e.g., the lack of unified standards for detection methods between studies and poor reproducibility of selected markers), in some cases, false negative results may be reported due to the low blood-based DNA concentration. However, with the increased sensitivity and specificity of diagnostic kits, their broader applications can be seen in the future.

Keywords: Breast cancer, Cell-free DNA, Circulating tumor DNA, Peripheral blood mononuclear cells (PBMC), DNA methylation.

Citation: Shahmoradi MK, Moloody Tapeh M, Abkhooie L, Jalalvand M. Blood-based DNA methylation signatures in the detection of breast cancer. Yafte. 2024; 26(1):38-55.