

مقایسه سطح پلاسمایی هورمون کلسی‌تونین در افراد مبتلا به سرطان مدولاری تیروئید با و بدون جهش در اگزون ۱۰ و ۱۱ پروتوانکوژن RET

چکیده

دریافت: ۱۳۹۶/۱/۱۸ ویرایش: ۱۳۹۶/۶/۲۲ پذیرش: ۱۳۹۶/۶/۳۰ آنلاین: ۱۳۹۶/۶/۳۱

زمینه و هدف: سرطان مدولاری تیروئید، تومور غدد درون‌ریز بوده و به دو نوع وراثتی و تک‌گیر تقسیم می‌شود. جهش‌های ژرم‌لاین در پروتوانکوژن RET مسئول ایجاد نوع ارثی می‌باشد. کلسی‌تونین یک نشانگر اختصاصی جهت تشخیص سرطان مدولاری تیروئید است. هدف از این مطالعه یافتن ارتباط بین میزان کلسی‌تونین در بیماران سرطان مدولاری تیروئید با حضور یا و عدم حضور جهش پروتوانکوژن RET در اگزون ۱۰ و ۱۱ بود.

روش بررسی: مطالعه حاضر به صورت مطالعه توصیفی-تحلیلی انجام شد. افراد مورد بررسی از بیمارانی مبتلایان به سرطان مدولاری تیروئید که با تشخیص پاتولوژی به پژوهشکده غدد درون‌ریز و متابولیسم دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی از مهر ماه ۱۳۹۲ تا ۱۳۹۴ به روش نمونه‌گیری ساده برگزیده شدند. جمعیت مورد مطالعه بر اساس بود یا نبود جهش در اگزون‌های ۱۰ و ۱۱ پروتوانکوژن RET به دو گروه ۴۳ نفر تقسیم‌بندی شدند. DNA ژنومی استخراج و به روش PCR تکثیر شده و تعیین توالی گشتند. سطح پلاسمایی کلسی‌تونین به روش الیزا اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: بررسی سطح کلسی‌تونین ۴۳ بیمار با جهش مولکولی در پروتوانکوژن RET مورد بررسی (میانگین سنی ۳۱ سال) و ۴۳ بیمار بدون جهش مولکولی در پروتوانکوژن RET (میانگین سنی ۴۳ سال) به ترتیب $۰.۷/۳$ pmol/ml و $۳/۰۷$ pmol/ml بود. این اختلاف از لحاظ آماری معناداری بود ($P=۰/۰۰۱۴$).

نتیجه‌گیری: با توجه به اختلاف غلظت پلاسمایی کلسی‌تونین در دو گروه احتمال می‌رود وجود جهش در بیماران مبتلا به سرطان مدولاری تیروئید بر میزان کلسی‌تونین پلاسمایی بیماران موثر باشد.

کلمات کلیدی: مطالعات مقطعی، سرطان مدولاری تیروئید، پروتوانکوژن RET، کلسی‌تونین.

سمیرا اخیانی^۱، مهدی هدایتی^۲

مرجان ظریف یگانه^۲

سارا شیخ‌الاسلامی^۲

سید اسدالله امینی^{*۱}

۱- مرکز تحقیقات بیوشیمی بالینی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران.

۲- مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی غدد درون‌ریز، پژوهشکده علوم غدد درون‌ریز و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.

* نویسنده مسئول: چهارم‌هال و بختیاری، شهرکرد، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد.

تلفن: ۰۳۸-۳۳۵۰۰۸۰

E-mail: saamini@yahoo.com

مقدمه

شده به‌عنوان Multiple endocrine neoplasia type 2 از انواع وراثتی این بیماری می‌باشد. فرم شایع این سندرم (Multiple endocrine neoplasia type 2A, MEN2A) است که با ۹۵٪ احتمال وقوع سرطان مدولاری تیروئید، ۵۰٪ احتمال وقوع فئوکروموسیتوما و هیپرپاراتیروئیدسم شناخته می‌شود، درحالی‌که در بیماران مبتلا 90% (Multiple endocrine neoplasia type 2B, MEN2B) موارد دارای علائم سرطان مدولاری تیروئید، ۴۵٪ فئوکروموسیتوما، ۱۰۰٪ گانگلیونوروما توز می‌باشد.^۲ نوع دیگری از سرطان مدولاری تیروئید،

سرطان مدولاری تیروئید (Medullary thyroid carcinoma, MTC) یک تومور غدد درون‌ریز با تمایز پارافولیکولار C-cell می‌باشد. تقریباً ۵٪ از بدخیمی‌های اولیه تیروئید را شامل شده و به دو نوع وراثتی (۲۵٪) و تک‌گیر (۷۵٪) تقسیم می‌شوند.^۱ حضور جهش در پروتوانکوژن (REarranged during transfection, RET)، مسئول سرطان مدولاری تیروئید وراثتی می‌باشد.^۲ سندرم ژنتیکی شناخته

روش بررسی

مطالعه حاضر به صورت مطالعه توصیفی-تحلیلی انجام شد که به بررسی وضعیت سطح سرمی کلسی‌تونین سرم در بیماران مبتلا به سرطان مدولاری تیروئید جهش در اگزون‌های ۱۰ و ۱۱ پروتوآنکوژن RET پرداخت.

این پژوهش بر اساس منشور اخلاقی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد و مصوب کمیته اخلاق با کد اخلاقی ۶-۹-۹۳ در قالب پایان‌نامه دانشجویی صورت گرفت. جمعیت مورد مطالعه که با رضایت‌نامه کتبی وارد پژوهش شدند از بین افراد مبتلا به سرطان مدولاری تیروئید که بر اساس تشخیص پزشک و شواهد آسیب‌شناسی به پژوهشکده غدد درون‌ریز و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران ارجاع داده شدند انتخاب گردیدند. حجم نمونه با توجه به تغییرات سطح کلسی‌تونین با استفاده از فرمول آماری محاسبه شد. حداقل حجم نمونه ۳۹ نفر با در نظر گرفتن ۱۰٪ احتمال ریزش به ۴۳ نفر در هر گروه افزایش یافت. این افراد مبتلا به سرطان مدولاری تیروئید بوده که پس از بررسی جهش پروتوآنکوژن RET به دو گروه با و بدون جهش در اگزون ۱۰ و ۱۱ پروتوآنکوژن RET تقسیم شدند.

به منظور تعیین ژنوتیپ پس از تهیه خون محیطی افراد، DNA ژنومی با استفاده از روش استاندارد نمک اشباع/پروتئیناز k استخراج شد. برای تکثیر اگزون ۱۰ از پرایمر (10R) و (10F5'GCGCCCCAGGAGGCTGATGC3') و برای تکثیر اگزون ۱۱ از پرایمرهای (11AF5'CCTCTGCGGTGCCAAGCCTC3') و (11AR 5'CACCGGAAGAGGAGTAGCTG3') استفاده شد. واکنش PCR درحجم ۵۰ μl در ترمال‌سایکلر اتوماتیک با شرایط: ۱/۵ μl بافر ۱۰x، ۰/۳ μl از هر یک از dNTPها (۱۰ میلی‌مولار)، ۱ μl از پرایمرهای اگزون ۱۰ و ۱۱ (۱۰ μmol)، ۲۵ میکرولیتر MgCl₂ (۵۰ میلی‌مولار)، ۲/۵ میکرولیتر DNA (۱۰۰ ng/μl) و یک واحد آنزیم Taq Polymerase انجام شد.

شرایط Polymerase chain reaction هر دو اگزون شامل ۳۰ چرخه دمای ۹۳ °C به مدت ۴۵ ثانیه برای واسرشت شدن، دمای ۶۷ °C برای بازسرشته شدن، دمای ۷۲ °C به مدت ۴۵ ثانیه برای تکثیر

FMTC (Familial MTC) با حضور سرطان مدولاری تیروئید به تنهایی تعریف می‌شود و بر اساس نبود فنوکروموسیتوما یا هیپرپاراتیروئیدیسم در دو نسل خانوادگی یا بیشتر و یا حضور جهش‌های مربوط به FMTC تشخیص داده می‌شود.^۳ پروتوآنکوژن RET در ناحیه کروموزومی ۱۰ q11.21 قرار گرفته است.^۴ بیش از ۹۰٪ بیماران مبتلا به Multiple endocrine neoplasia و FMTC دارای جهش‌های بد معنی در یکی از توالی‌های سیستمی حفاظت شده در کدون‌های ۶۰۹، ۶۱۱، ۶۱۸، ۶۲۰ (در اگزون ۱۰) یا کدون‌های ۶۳۰ یا ۶۳۴ (در اگزون ۱۱) پروتوآنکوژن RET می‌باشد.^۵

کلسی‌تونین هورمونی است که توسط سلول‌های C-cell غده تیروئید ترشح می‌شود و نشانگر اختصاصی برای تشخیص سرطان مدولاری تیروئید است که با شدت بیماری افزایش می‌یابد.^۶ افزایش سطح کلسی‌تونین ممکن است در بیماری‌های دیگر مانند نارسایی مزمن کلیه، هیپرپاراتیروئیدیسم، نئوپلاسم نورواندوکراین و بیماری‌های خود ایمنی نیز دیده شود.^{۷،۸}

در بیشتر بیماران با سرطان مدولاری تک‌گیر (SMTc) سطح کلسی‌تونین سرم تمایل به بالا باقی ماندن داشته که این امر می‌تواند به علت باقی مانده بیماری باشد.^۹

کلسی‌تونین مهمترین بیومارکر در تشخیص، دستور جراحی، مدیریت پس از عمل و پیش‌بینی افراد با سرطان مدولاری تیروئید می‌باشد.^۹ با وجود اینکه کلسی‌تونین نشانگر تشخیصی کلاسیک ارایه شده برای سرطان مدولاری تیروئید است و اندازه‌گیری غلظت کلسی‌تونین در بیماران با ندول‌های تیروئیدی به تشخیص بیماری کمک می‌کند ولی شواهدی که نشان دهد، به کمک این تست بتوان مرگ و میر مربوط به بیماری سرطان مدولاری تیروئید را کاهش داد، وجود ندارد.^{۱۰}

از طرفی آنالیز جهش RET تمام ویژگی‌های یک تست ژنتیکی ایده‌آل برای سرطان را دارد و یک استراتژی موثر و ساده برای مدیریت افراد مبتلا را فراهم می‌کند.^{۱۱} مطالعه حاضر با هدف بررسی ارتباط میزان کلسی‌تونین و بود یا نبود جهش در پرووآنکوژن RET در بیماران مبتلا به سرطان مدولاری تیروئید به انجام رسید. بررسی و انجام این مطالعه پیشنهاد دهنده مارکری بیوشیمیایی و شاخصی مولکولی برای تشخیص و پیگیری درمان سرطان مدولاری تیروئید می‌باشد.

یافته‌ها

افراد بیمار مبتلا به سرطان مدولاری تیروئید دارای جهش در پروتوآنکوژن RET، شامل ۴۳ نفر (۲۳ مرد و ۲۰ زن با میانگین سنی ۳۱ سال و رنج سنی ۵۷-۱۲) و افراد مبتلا بدون جهش در پروتوآنکوژن RET، ۴۳ نفر (۱۳ مرد و ۳۰ زن با میانگین سنی ۴۳ سال و رنج سنی ۷۱-۱۹) می‌باشد. خصوصیات دموگرافیک و جهش‌های یافت شده در جدول ۱ آمده است.

نتایج گویای آن است که میزان سطح پلاسمایی کلسی‌تونین در افراد مبتلا به سرطان مدولاری تیروئید بدون جهش پروتوآنکوژن RET بیشتر از میزان سطح پلاسمایی کلسی‌تونین در افراد مبتلا به سرطان مدولاری تیروئید با جهش پروتوآنکوژن RET بود و اختلاف معناداری بین سطح کلسی‌تونین پلاسمایی دو گروه وجود داشت ($P=0/014$). (شکل ۱ و جدول ۲). با استفاده از Spearman's rho test رابطه بین سن و میزان کلسی‌تونین در هر دو گروه بررسی شد و ارتباط معناداری یافت نشد. در گروه مبتلا به سرطان مدولاری تیروئید بدون جهش پروتوآنکوژن RET ($\rho=0/174$ و $P=0/28$) و در گروه مبتلا به سرطان مدولاری تیروئید دارای جهش پروتوآنکوژن RET ($\rho=-0/136$ و $P=0/38$) بود.

و $72^{\circ}C$ به مدت ۱۰ دقیقه برای تکثیر نهایی بوده و محصولات حاصل از آن با ژل پلی‌اکریل آمید ۸٪ و رنگ‌آمیزی نیترات نقره چک شدند. سپس نمونه‌های مناسب تعیین توالی شدند. نتایج تعیین توالی با استفاده از Chromas software, version 2.6 (www.technelysium.com.au/chromas.html) از طریق انجام Blast آنالیز گردید.

با استفاده از Human Calcitonin ELISA Kit (Cusabio Biotech, Wuhan, China) با حساسیت $1/175$ pg/ml، میزان سطح پلاسمایی کلسی‌تونین هر دو گروه بر اساس دستورکار کیت به روش الیزا اندازه‌گیری شد.

آنالیز آماری با استفاده از Med Calc, version 12.1.4.0 (Med Calc Software, Mariakerke, Belgium) صورت گرفت. نرمال بودن توزیع داده‌ها با استفاده از Kolmogorov-Smirnov test ارزیابی و مشخص شد. به دلیل وجود داده‌های پرت نرمال بودن داده‌ها رد شد. پس از حذف داده‌های پرت نرمال بودن داده‌ها دوباره بررسی شد و به دلیل رد فرض نرمال بودن داده‌ها مقایسه بین ۸۲ نفر از جمعیت مورد مطالعه ۴۲ نفر از افراد گروه دارای جهش و ۴۰ نفر از افراد گروه بدون جهش با استفاده از Mann-Whitney U test صورت گرفت. سطح معناداری بالاتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

جدول ۱: اطلاعات مربوط به بیماران دارای جهش و بدون جهش در پروتوآنکوژن RET

سن (سال)*	نسبت زنان به مردان	جهش در آگزون ۱۰	جهش در آگزون ۱۱
۳۱/۳±۱۱/۸	۲۳/۲۰	۱۲	۳۱
۴۳/۸±۱۳/۶	۱۳/۳۰	-	-

* اعداد به صورت میانگین± انحراف استاندارد بیان شده‌اند.

جدول ۲: سطح کلسی‌تونین در بیماران دارای جهش و بدون جهش در پروتوآنکوژن RET به تفکیک جنسیت

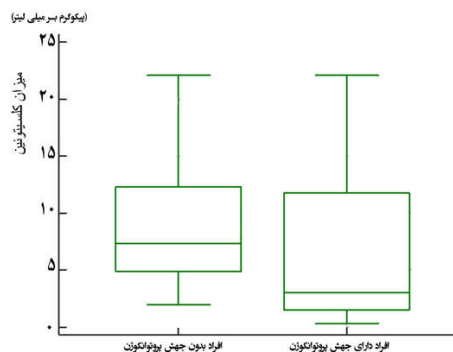
جنسیت	مرد*	زن*	P
بیماران بدون جهش	۸/۴(۵/۱۱-۸۵/۴۵)	۷/۲۵(۴/۱۲-۴۵/۳)*	۰/۵۹
بیماران دارای جهش	۴/۱(۱۱/۱-۳۵/۸۷)**	۲/۶(۱/۱۰-۳۲/۳)	۰/۴۸
سطح معناداری	۰/۱۲	۰/۰۰۳**	

* اعداد براساس میانه (دامنه میان چارکی) می‌باشد، ** $P<0/05$ می‌باشد.

تسهیل تشخیص زودرس بیماری و تاییدی برای تصمیم جراحی باشد.^{۱۶} اگرچه اندازه‌گیری کلسی‌تونین سرم توسط انجمن اروپا مورد تایید قرار گرفته است، انجمن تیروئید آمریکا هر پیشنهاد موافق یا مخالفی را در این مورد نپذیرفته است.^{۱۷} برخی شواهد پیشنهاد می‌کند که غربالگری کلسی‌تونین منجر به تشخیص زود هنگام سرطان مدولاری تیروئید می‌شود. همچنین مطالعات دیگر نشان می‌دهد در ۲۵٪-۲۰ موارد غربالگری کلسی‌تونین منجر به کشف سرطان مدولاری تیروئید در مرحله پایانی بیماری می‌شود.^{۱۹} افزون بر این، هیچ شواهدی که نشان دهنده کاهش بروز تومورهای پیشرفته به محض غربالگری کلسی‌تونین باشد وجود ندارد.^{۱۱} از طرفی آنالیز جهش RET تمام ویژگی‌های یک تست ژنتیکی ایده‌آل برای سرطان را دارد و یک استراتژی موثر و ساده برای مدیریت افراد مبتلا فراهم می‌کند.^{۱۱} از این رو مطالعه حاضر جهت ارایه و پیشنهاد مارکری بیوشیمیایی و شاخصی مولکولی برای تشخیص و پیگیری درمان سرطان مدولاری تیروئید موثر به نظر می‌رسد.

با توجه به نتایج مطالعه حاضر، بر اختلاف غلظت پلاسمایی کلسی‌تونین در دو گروه احتمال می‌رود وجود جهش در بیماران مبتلا به سرطان مدولاری تیروئید بر میزان کلسی‌تونین تاثیرگذار باشد، ولی این افزایش کلسی‌تونین همیشگی و قطعی نبوده و بنابراین بررسی جهش پروتوانکوژن RET پتانسیل بیشتری در تایید تشخیص یا پیگیری درمان دارد و می‌تواند به همراه اندازه‌گیری کلسی‌تونین کمک بیشتری به تشخیص مبتلایان به سرطان مدولاری تیروئید بنماید. به عبارتی هدف کاربردی این پژوهش در جهت ارایه و پیشنهاد مارکری بیوشیمیایی و شاخصی مولکولی برای تشخیص و پیگیری درمان سرطان مدولاری تیروئید می‌باشد. حجم نمونه پایین و عدم دسترسی به سرم بیماران پیش از عمل تیروئیدکتومی از محدودیت‌های این طرح می‌باشد. انجام مطالعات آتی در جهت بررسی مکانسیم ارتباط پروتوانکوژن RET و کلسی‌تونین می‌تواند مفید به فایده باشد.

سطح پلاسمایی هورمون کلسی‌تونین در افراد مبتلا به سرطان مدولاری تیروئید با و بدون جهش در اگزون ۱۰ و ۱۱ پروتوانکوژن RET تفاوت معناداری دارد، بنابراین به نظر می‌رسد، غلظت کلسی‌تونین با حضور و یا عدم حضور جهش در پروتوانکوژن RET مرتبط می‌باشد و به احتمال بررسی این جهش بتواند همراه با



شکل ۱: میزان سطح پلاسمایی کلسی‌تونین در افراد مبتلا به سرطان مدولاری تیروئید بدون جهش پروتوانکوژن RET با میانه (۷/۳ pg/ml) بیشتر از میزان سطح پلاسمایی کلسی‌تونین در افراد مبتلا به سرطان مدولاری تیروئید با جهش پروتوانکوژن RET با میانه (۳/۰۷ pg/ml) بود و اختلاف معناداری بین سطح کلسی‌تونین پلاسمایی دو گروه مشاهده شد ($P=0/0014$).

بحث

در مطالعه حاضر مشاهده شد، میزان سطح پلاسمایی کلسی‌تونین در افراد مبتلا به سرطان مدولاری تیروئید بدون جهش پروتوانکوژن RET بیشتر از میزان سطح پلاسمایی کلسی‌تونین در افراد مبتلا به سرطان مدولاری تیروئید با جهش پروتوانکوژن RET بود و اختلاف معناداری بین سطح کلسی‌تونین پلاسمایی دو گروه وجود داشت.

مطالعات صورت گرفته پیشین که موید نتایج کسب شده در مطالعه حاضر می‌باشند نشان داده‌اند که در بیشتر بیماران مبتلا به نوع تک‌گیر سرطان مدولاری تیروئید سطح کلسی‌تونین سرم بالا باقی می‌ماند.^{۱۳} اگرچه اندازه‌گیری سطح کلسی‌تونین سرم به‌طور روتین در بیماران با تیروئید ندولار به‌عنوان یک متد غربالگری سرطان مدولاری تیروئید مورد بررسی قرار می‌گیرد.^{۱۴} اما افزایش سطح سرمی کلسی‌تونین می‌تواند در نارسایی مزمن کلیوی، تومورهای نورواندوکراین ریه یا معده، هایپرگاسترینمی، ماستوسیتوز، بیماری‌های اتوایمیون تیروئید و پسودوهیپوپاراتیروئیدیسم نیز صورت گیرد.^{۱۵} بسیاری از موارد تک‌گیر سرطان مدولاری تیروئید که در طی مراحل کلینیکی تشخیص داده می‌شوند متاستاتیک هستند و پیش‌آگهی ضعیفی دارند. در مقابل فرم وراثتی سرطان مدولاری تیروئید با تست‌های ژنتیکی شناخته می‌شود. این تست‌ها می‌تواند موجب

علوم پزشکی شهرکرد که هزینه‌های این طرح را در قالب پایان‌نامه با شماره ۱۷۰۸ ثبت و پرداخت نموده و همچنین پژوهشکده غدد و متابولیسم دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی سپاسگزاریم.

اندازه‌گیری غلظت کلسی‌تونین داده‌های بیشتری در تایید تشخیص یا پیگیری درمان داشته باشد.
سپاسگزارى: از همکارى معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه

References

1. Yeganeh MZ, Sheikholeslami S, Dehbashi Behbahani G, Farashi S, Hedayati M. Skewed mutational spectrum of RET proto-oncogene Exon10 in Iranian patients with medullary thyroid carcinoma. *Tumour Biol* 2015;36(7):5225-31.
2. Carlson KM, Dou S, Chi D, Scavarda N, Toshima K, Jackson CE, et al. Single missense mutation in the tyrosine kinase catalytic domain of the RET protooncogene is associated with multiple endocrine neoplasia type 2B. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91(4):1579-83.
3. Elisei R, Cosci B, Romei C, Bottici V, Renzini G, Molinaro E, et al. Prognostic significance of somatic RET oncogene mutations in sporadic medullary thyroid cancer: a 10-year follow-up study. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93(3):682-7.
4. Hedayati M, Zarif Yeganeh M, Sheikhol Eslami S, Rezghi Barez S, Hoghooghi Rad L, Azizi F. Predominant RET Germline Mutations in Exons 10, 11, and 16 in Iranian Patients with Hereditary Medullary Thyroid Carcinoma. *J Thyroid Res* 2011;2011:264248.
5. Kitamura Y, Goodfellow PJ, Shimizu K, Nagahama M, Ito K, Kitagawa W, et al. Novel germline RET proto-oncogene mutations associated with medullary thyroid carcinoma (MTC): mutation analysis in Japanese patients with MTC. *Oncogene* 1997;14(25):3103-6.
6. Kihara M, Miyauchi A, Kudo T, Hirokawa M, Miya A. Reference values of serum calcitonin with calcium stimulation tests by electrochemiluminescence immunoassay before/after total thyroidectomy in Japanese patients with thyroid diseases other than medullary thyroid carcinoma. *Endocr J* 2016;63(7):627-32.
7. Tashjian Jr AH, Howland BG, Melvin KE, Hill Jr CS. Immunoassay of human calcitonin: clinical measurement, relation to serum calcium and studies in patients with medullary carcinoma. *N Engl J Med* 1970;283(17):890-5.
8. Karanikas G, Moameni A, Poetzi C, Zettinig G, Kaserer K, Bieglmayer C, et al. Frequency and relevance of elevated calcitonin levels in patients with neoplastic and nonneoplastic thyroid disease and in healthy subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89(2):515-9.
9. Pacini F, Castagna MG, Cipri C, Schlumberger M. Medullary thyroid carcinoma. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 2010;22(6):475-85.
10. Samà MT, Rossetto Giaccherino R, Gallo M, Felicetti F, Maletta F, Bonelli N, et al. Clinical challenges with calcitonin-negative medullary thyroid carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 2016;142(9):2023-9.
11. Yeganeh MZ, Sheikholeslami S, Hedayati M. RET proto oncogene mutation detection and medullary thyroid carcinoma prevention. *Asian Pac J Cancer Prev* 2015;16(6):2107-17.
12. Weber T, Schilling T, Frank-Raue K, Colombo-Benkmann M, Hinz U, Ziegler R, et al. Impact of modified radical neck dissection on biochemical cure in medullary thyroid carcinomas. *Surgery* 2001;130(6):1044-9.
13. Dralle H, Damm I, Scheumann GF, Kotzerke J, Kupsch E. Frequency and significance of cervicomediastinal lymph node metastases in medullary thyroid carcinoma: results of a compartment-oriented microdissection method. *Henry Ford Hosp Med J* 1992;40(3-4):264-7.
14. Kloos RT, Eng C, Evans DB, Francis GL, Gagel RF, Gharib H, et al; American Thyroid Association Guidelines Task Force. Medullary thyroid cancer: management guidelines of the American Thyroid Association. *Thyroid* 2009;19(6):565-612.
15. Hegedüs L. The thyroid nodule. *N Engl J Med* 2004;351(17):1764-71.
16. Costante G, Durante C, Francis Z, Schlumberger M, Filetti S. Determination of calcitonin levels in C-cell disease: clinical interest and potential pitfalls. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 2009;5(1):35-44.
17. Pacini F, Schlumberger M, Dralle H, Elisei R, Smit JW, Wiersinga W; European Thyroid Cancer Taskforce. European consensus for the management of patients with differentiated thyroid carcinoma of the follicular epithelium. *Eur J Endocrinol* 2006;154(6):787-803.
18. Cooper DS, Doherty GM, Haugen BR, Kloos RT, Lee SL, Mandel SJ, et al; American Thyroid Association (ATA) Guidelines Taskforce on Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer. Revised American Thyroid Association management guidelines for patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer. *Thyroid* 2009;19(11):1167-214.
19. Cheung K, Roman SA, Wang TS, Walker HD, Sosa JA. Calcitonin measurement in the evaluation of thyroid nodules in the United States: a cost-effectiveness and decision analysis. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93(6):2173-80.

Plasma levels of calcitonin in medullary thyroid carcinoma patients with and without the RET proto-oncogene mutations in exons 10 and 11

Samira Ehyayi M.Sc.¹
Mehdi Hedayati Ph.D.²
Marjan Zarif Yeganeh Ph.D.
Student²
Sara Sheikholeslami Ph.D.
Student²
Sayed Asadollah Amini Ph.D.^{1*}

1- Clinical Biochemistry Research Center, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran.

2- Cellular and Molecular Endocrine Research Center, Research Institute for Endocrine Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

* Corresponding author: Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Chaharmahal and Bakhtiari Province, Iran.
Tel: +98- 38- 33350080
E-mail: saamini@yahoo.com

Abstract

Received: 07 Apr. 2017 Revised: 13 Sep. 2017 Accepted: 21 Sep. 2017 Available online: 22 Sep. 2017

Background: Thyroid carcinoma is the most common endocrine malignancy and approximately accounts 2% of all cancer cases. Medullary thyroid cancer (MTC) is an endocrine tumor with differentiation of Parafollicular or C-cells and is categorized into hereditary or sporadic types. Medullary thyroid carcinoma approximately accounts for 5-10% of all thyroid carcinoma. Germ-line and somatic mutations in exons 10 and 11 RET (Rearranged during Transfection) proto-oncogene are responsible for the occurrence of the familial and sporadic types, respectively. Calcitonin is a key marker in MTC diagnose and has been demonstrated to be highly sensitive for differential diagnosis prognostic assessment, follow-up and evaluation of MTC treatment. The aim of this study was to investigate the relationship between plasma levels of calcitonin in MTC patients with or without RET mutation.

Methods: In this cross-sectional study, the population consist of MTC patients who have referred to the endocrine and metabolism research center of Shahid Beheshti University of medical sciences since October 2013 till October 2016. Genomic DNA was extracted from peripheral blood leucocytes using the standard salting out/proteinase K method. Nucleotide change detection in exons 10 and 11 was performed using polymerase chain reaction (PCR) and direct DNA sequencing methods. Participants were then divided into two groups with or without mutation (43 individuals in each group). Plasma calcitonin levels were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method in both groups.

Results: Evaluation of the level of plasma calcitonin in 43 patients with a molecular mutation in RET proto-oncogene (mean age 31 years) and 43 patients without molecular mutations in RET proto-oncogene (mean age 43 years) were 7.6 pmol/mL and 3.07 pmol/mL respectively. This difference is statistically significant ($P=0.0014$).

Conclusion: Routine measurement of calcitonin has been investigated as a screening method for the diagnosis of medullary thyroid carcinoma patients. Nevertheless, additional data are required to definitely support routine measurement of calcitonin due to the role of RET proto-oncogene.

Keywords: calcitonin, cross-sectional study, medullary thyroid carcinoma, RET proto oncogene.