

## تشخیص سرطان پروستات، از روش‌های مرسوم تا سلول‌های توموری در گردش، به عنوان نشانگرهای زیستی نوظهور

تاریخ دریافت مقاله: ۹۳/۱۲/۲۵؛ تاریخ پذیرش: ۹۴/۱۰/۵

### چکیده

سرطان پروستات دومین سرطان رایج در میان مردان جهان است. این سرطان معمولاً در مراحل اولیه خاموش بوده و تا قبل از متاستاز علائم مشخصی را بروز نمی‌دهد لذا تشخیص صحیح و زود هنگام می‌تواند در کنترل بیماری و انتخاب روش‌های درمانی هدفمند بسیار با اهمیت باشد. از آنجاکه روش‌های تشخیصی مرسوم از حساسیت و اختصاص کافی برخوردار نیستند، محققان در تلاش‌اند تا با ارائه نشانگرهای زیستی نوین، پیشگیری، غربالگری و درمان بیماری را ارتقا بخشند. سلول‌های توموری در گردش از جمله‌ی این نشانگرها هستند. این سلول‌ها، از تومور اولیه و/یا متاستاز یافته منشأ گرفته و در خون محیطی جریان می‌یابند. بررسی ویژگی‌های مولکولی این سلول‌ها می‌تواند اطلاعات ارزشمندی را از وضعیت تومور و انتخاب درمان موثر ارائه کند. تا به امروز روش‌های بسیاری از جمله استفاده از فناوری میکروسیالات، به منظور جداسازی این سلول‌های توموری ابداع شده است؛ ولی متأسفانه علی‌رغم پیشرفت‌های اخیر، هریک از این روش‌ها تنها قادرند بخشی از سلول‌های توموری را از خون محیطی جدا کنند، به‌همین دلیل تلاش برای یافتن روشی ایده‌آل که بتواند تمامی این سلول‌ها را به خوبی جدا کند همچنان ادامه دارد. در این مقاله، ابتدا روش‌های مرسوم تشخیص سرطان پروستات به صورت کلی مرور خواهد شد. در ادامه اهمیت استفاده از نشانگرهای زیستی نوینی چون، سلول‌های توموری در گردش بیان شده و روش‌های مبتنی بر جداسازی این سلول‌ها مورد بحث قرار می‌گیرد. نتیجه‌ی این بحث نشان می‌دهد که سلول‌های توموری در گردش می‌توانند در آینده‌ای نزدیک، نویدبخش روش‌های تشخیصی و درمانی کارا تر باشند.

**کلمات کلیدی:** سرطان پروستات، روش‌های تشخیصی، نشانگرزیستی؛ فناوری میکروسیالات، سلول‌های توموری در گردش.

محبوبه شهرابی فراهانی<sup>۱</sup>، نفیسه طارمی<sup>۱</sup>، ندا سرای‌گرد افشاری<sup>۲</sup>، محمد مراد فرج‌الهی<sup>۲</sup>

<sup>۱</sup> دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی پزشکی تهران، دانشگاه علوم پزشکی ایسران، دانشکده پیراپزشکی، گروه بیوتکنولوژی پزشکی، تهران، ایران  
<sup>۲</sup> عضو هیئت علمی و استادیار گروه بیوتکنولوژی پزشکی تهران، دانشگاه علوم پزشکی ایران، دانشکده‌ی پیراپزشکی، گروه بیوتکنولوژی پزشکی، تهران، ایران  
<sup>۳</sup> عضو هیئت علمی و استاد تمام گروه بیوتکنولوژی پزشکی تهران، دانشگاه علوم پزشکی ایران، دانشکده پیراپزشکی، گروه بیوتکنولوژی پزشکی، تهران، ایران

### \* نویسنده مسئول:

تهران، بزرگراه شهید همت غرب، تقاطع بزرگراه‌های شهید چمران و شیخ فضل‌الله نوری، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی ایران، دانشکده‌ی پیراپزشکی، گروه بیوتکنولوژی پزشکی

۰۲۱- ۸۶۷۰۴۶۶۸

E-mail: Afshari.n@iums.ac.ir

## مقدمه

سرطان پروستات پس از سرطان ریه، در جایگاه دوم سرطان‌های رایج مردان جهان طبقه‌بندی می‌شود.<sup>۱</sup> میزان بالای مرگ و میر ناشی از این بیماری، حاکی از ضعف روش‌ها و شیوه‌های درمانی موجود برای این بیماری است.<sup>۲،۳</sup> در چنین شرایطی، تشخیص به موقع و زودهنگام بسیار اهمیت یافته و در کنترل و مهار بیماری و همچنین انتخاب هدفمند روش‌های درمانی مؤثر خواهد بود.<sup>۴</sup> متأسفانه، روش‌های مرسوم، که امروزه برای تشخیص و غربالگری سرطان پروستات استفاده می‌شوند، اطلاعات کافی و مناسبی را در رابطه با پیش بینی وضعیت تومور ارائه نمی‌کنند. از جمله روش‌های مرسوم تشخیصی می‌توان به آزمون انگشتی راست روده (Digital Rectal Exam; DRE)، سونوگرافی از طریق معقد (Trans Rectal Ultrasound; TRUS)، سنجش میزان آنتی‌ژن ویژه پروستات (Prostate Specific Antigen; PSA)، تهیه بیوپسی از بافت مربوطه و یا استخوان و انواع روش‌های تصویر برداری اشاره کرد.<sup>۵</sup>

به منظور افزایش کارایی و اثربخشی روش‌های تشخیصی مرسوم و همچنین ایجاد شرایطی برای تشخیص زودهنگام بیماری، تلاش‌های بسیاری در جهت کشف نشانگرهای زیستی جدید با اختصاص و حساسیت بالا در حال انجام است.<sup>۶</sup> در مورد سرطان پروستات تنها نشانگر زیستی‌ای، که در حال حاضر به تایید سازمان غذا و دارو (Federation of Drug and Food; FDA) رسیده است، آنتی ژن ویژه پروستات (PSA) است که سنجش میزان آن از روش‌های رایج و مرسوم در تشخیص این سرطان می‌باشد.<sup>۷</sup> اخیراً تحقیقات بسیاری برای ارائه‌ی نشانگرهای زیستی جدید و مؤثر در کاربردهای درمانی - تشخیصی و یا روبش روند کنترل بیماری صورت گرفته‌است. آخرین تحقیقات نشان می‌دهند که شمارش و بررسی ویژگی‌های مولکولی سلول‌های توموری موجود در گردش خون (CTCها) (circulating tumor cells; CTCs) می‌تواند اطلاعات قابل توجهی را در رابطه با تعیین مرحله‌ی بیماری، بررسی عود مجدد آن، میزان پاسخ‌گویی به درمان و تخمین مدت بقاء بیمار ارائه نماید.<sup>۸،۷</sup>

## نگاهی به روش‌های مرسوم در تشخیص سرطان پروستات

علی‌رغم کاربرد وسیع روش‌های تشخیصی مرسوم، این روش‌ها به اندازه‌ی کافی دقیق و اختصاصی نبوده و نمی‌توانند به تنهایی مورد استفاده قرار گیرند به همین دلیل اغلب برای تشخیص دقیق‌تر سرطان پروستات از چندین روش تشخیصی استفاده می‌شود تا با مقایسه‌ی نتایج آن‌ها وجود یا عدم وجود تومور سرطانی با قطعیت بیشتری اعلام گردد. ترتیب انتخاب این روش‌ها و اجرای آن‌ها با توجه به شرایط بیمار و وضعیت بیماری متفاوت است.<sup>۹</sup> به منظور مقایسه‌ی ویژگی‌ها و بررسی محاسن و معایب روش‌های مرسوم تشخیص سرطان پروستات، گزیده‌ای از ویژگی‌های آن‌ها در جدول ۱-۱ گردآوری شده است.

## CTCها نشانگرهای زیستی نوظهور در تشخیص سرطان

## پروستات

یک نشانگر زیستی مناسب برای تشخیص کارآمد و یا درمان هدفمند، علاوه بر اینکه می‌بایست از اختصاص قابل قبولی برخوردار باشد، لازم است از نظر میزان بیان به اندازه‌ای تولید شود که قابل اندازه‌گیری با روش‌های موجود باشد؛ همچنین مطلوب است که میزان آن با پیشروی مرحله‌ی بیماری افزایش یابد. آسان و بی‌خطر بودن روش نمونه‌گیری و سهولت سنجش آن نیز اهمیت دارد. همان‌طور که اشاره شد CTCها سلول‌های سرطانی‌ای هستند که از تومورهای اولیه یا متاستاز یافته منشأ گرفته و در خون محیطی در حال گردش‌اند.<sup>۱۰</sup> بدیهی است که این نشانگرهای موجود در خون محیطی، مشکلات جداسازی نشانگرهای موجود در بافت‌های سرطانی را ندارند؛ ولی متأسفانه جداسازی و ردیابی آن‌ها در نمونه‌های خونی، با مشکلاتی همراه است. از دلایل عدم سهولت جداسازی CTCها از نمونه‌های خونی، می‌توان به فراوانی بسیار اندک آن‌ها اشاره نمود. به علاوه بسیاری از CTCها نیمه عمر کوتاهی دارند (۲/۴-۱ ساعت) و سریعاً دچار آپوپتوز و یا لیز سلولی شده، از بین می‌روند.<sup>۱۱،۷</sup> با توجه به مطالب ذکرشده محققان به دنبال ارتقای روش‌های موجود جداسازی CTCها و یا ابداع روش‌های نوین و کارآمدتر هستند تا بتوانند مقدار اندک این سلول‌ها را با درجه خلوص بالا، به صورت زنده و دست نخورده و

## جداسازی CTCها بر اساس ویژگی‌های مولکولی و زیستی

برای جداسازی CTCها بر اساس ویژگی‌های زیستی، از مولکول‌های اختصاصی CTCها و/یا گلبول‌های خونی، که بر سطح غشای سیتوپلاسمی آنها مستقر هستند، استفاده می‌شود. دو رویکرد عمومی (انتخاب مثبت و انتخاب منفی) برای غنی‌سازی CTCها بر پایه‌ی آنتی‌ژن‌های سطحی متصور است. در انتخاب مثبت، به منظور جدا کردن CTCها از نشانگرهای سطحی ویژه‌ی CTCها استفاده می‌شود ولی در انتخاب منفی نشانگرهای سطحی ویژه‌ی گلبول‌های سفید مورد استفاده قرار می‌گیرند؛ تا به این وسیله، گلبول‌های سفید جدا شده و دیگر سلول‌ها از جمله CTCها باقی بمانند.<sup>۱۶۸</sup>

مولکول چسبندگی سلول اپی‌تلیال Epithelial Cell Adhesion Molecule (EPCAM)، از جمله نشانگرهایی است که به طور گسترده در انتخاب مثبت CTCها به کار می‌رود.

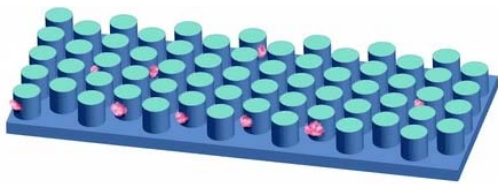
در سریع‌ترین حالت ممکن از خون جدا کرده و در آنالیزهای مولکولی و بررسی ویژگی‌های مورفولوژیکی مورد استفاده قرار دهند.

## نگاهی به روش‌های کنونی جداسازی CTCها از بیماران مبتلا به سرطان پروستات

یکی از اهداف روش‌های جداسازی و غنی‌سازی CTCها، حفظ ویژگی‌های این نشانگرها در حین جداسازی و افزایش کمیت قابل بررسی آنها در نمونه است. در بیشتر این روش‌ها برای جداسازی CTCها از ویژگی‌های مولکولی و زیستی (بیان نشانگرهای سطحی و ... ) و یا ویژگی‌های فیزیکی (اندازه، چگالی، بار الکتریکی و ...) استفاده می‌شود. در ادامه استفاده از برخی از این ویژگی‌ها در پاره‌ای از روش‌های جداسازی CTCها معرفی می‌گردند.

جدول ۱: مقایسه‌ی روش‌های مرسوم غربالگری و تشخیص سرطان پروستات (۱، ۲، ۵، ۷، ۹، ۱۱-۱۴)

روش تشخیصی	محاسن	معایب
آزمون انگشتی رکتال (DRE)	ساده، بی‌خطر، نسبتاً ارزان، توانایی شناسایی سرطان پروستات در افراد با سطوح طبیعی PSA و تومورهای کوچک	اختصاص و حساسیت پایین و وابسته به مرحله‌ی تومور، نبود استاندارد قطعی مشخص برای آن و در نتیجه احتمال گزارش نتیجه اشتباه منفی
سونوگرافی از طریق مقعد (TRUS)	حساسیت بالا، نسبتاً بی‌خطر، تسهیل تهیه بیوپسی، تشخیص سرطان پروستات در مراحل اولیه، محاسبه‌ی اندازه‌ی غده‌ی پروستات	اختصاص پایین
سنجش میزان آنتی‌ژن ویژه پروستات (PSA)	حساسیت بالا، بی‌خطر، نسبتاً ارزان، استفاده در غربالگری و تشخیص زود هنگام سرطان پروستات	اختصاص پایین
تهیه بیوپسی	اختصاص بالا، نسبتاً بی‌خطر	حساسیت پایین و امکان گزارش نتیجه منفی، در صورت متاستاز به استخوان‌ها مشکل در نمونه‌گیری
روش‌های تصویربرداری Bone scan (Magnetic Resonance Imaging) MRI (Computed Tomography) CT	حساسیت نسبتاً بالا، تهیه تصاویری با وضوح بالا، شناسایی متاستاز به استخوان‌ها به راحتی	اختصاص پایین، تا حدی آسیب زننده، محدودیت در تشخیص سرطان در مراحل اولیه



شکل ۱: CTCهای گیر افتاده در بین ستون‌های پوشیده شده از آنتی‌بادی anti-EpCAM.<sup>۱۹</sup>

ابزارها انتخاب منفی نیز، علاوه بر انتخاب مثبت و یا در کنار آن، به منظور تخلیص کارتر CTCها به کار گرفته شد.

نسل اول این ابزارها که تراشه‌ی CTC Chip (CTC Chip) نام دارد، حاوی ۷۸۰۰۰ میکروستون پوشیده شده از آنتی‌بادی anti-EpCAM می‌باشد. آنچنان که در شکل ۱-۱ مشاهده می‌شود، در زمان عبور خون از بین این تراشه‌ی میکروسیال، CTCهای بیان کننده‌ی EpCAM در تماس نزدیک با این میکروستون‌ها قرار گرفته و به این ترتیب از جریان خون جدا می‌گردند.<sup>۱۹</sup>

نسل دوم این تراشه‌ها به علت وجود کانال‌های میکرو سیالی که با الگوی زیگزاگی طراحی و نقش‌نگاری شدند، HBCTC-Chip نام گرفتند. این طراحی سبب شد تا حین جریان یافتن خون در تراشه، میکرو گردابه‌هایی تشکیل شود. تشکیل این میکرو گردابه‌ها زمان تماس بین سلول‌ها و ستون‌های پوشیده شده با آنتی‌بادی anti-EpCAM را افزایش داده و به این ترتیب کیفیت کارایی جداسازی یافت. با استفاده از این ابزار، محققان طراح آن توانستند تا CTCها را از ۱۴ نفر از ۱۵ بیماری که مبتلا به سرطان پروستات بودند (۹۳٪)، با موفقیت جداسازی کنند.<sup>۱۵</sup>

از دیگر ابزارهای میکروسیال نسل دوم که بر پایه‌ی انتخاب مثبت CTCها ابداع شده است، می‌توان به سامانه‌ی Nanovelcro microfluidic (نوار چسب نانوی میکروسیال) اشاره نمود. این سامانه، که نمایی از آن در شکل ۲ به تصویر کشیده شده است، اولین بار در سال ۲۰۱۱ توسط محققین دانشگاه کالفرنیا طراحی، و در شمارش CTCهای مرتبط با سرطان پروستات به کار گرفته شد.

این مولکول، به طور پیوسته توسط سلول‌های توموری مشتق شده از اپی‌تلیال بیان می‌شود ولی بر روی گلبول‌های سفید معمولی یافت نمی‌گردد. همین تمایز در بیان این امکان را فراهم می‌کند که بتوان از این مولکول به‌عنوان یک نشانگر در بسیاری از انواع کارسینوماها استفاده کرد. سرطان پروستات از جمله مواردی است که در آن EpCAM در سطح بالایی بیان می‌شود.<sup>۷</sup> تاکنون برای جداسازی CTCها بر اساس آنتی‌ژن‌های سطحی دو نوع فناوری، جداسازی بر پایه‌ی دانه (بید)‌های ایمونو مغناطیسی (Immunomagnetic beads) و جداسازی با استفاده از ابزارهای میکروسیالات، ابداع شده‌است.

جداسازی CTCها با کمک دانه‌های ایمونومغناطیسی به روش‌های مختلفی امکان‌پذیر است که از آن جمله می‌توان به سامانه‌ی جستجوگر سلولی (MagSweeper) و روبنده‌ی مغناطیسی (Herringbone)، اشاره نمود.

#### استفاده از فناوری میکروسیالات در جداسازی CTCها

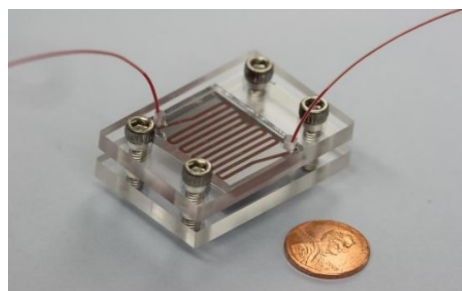
فناوری میکروسیالات از جمله فناوری‌های نوین و مورد توجه است که این امکان را فراهم می‌آورد تا مقادیر بسیار کم از یک سیال ( $10^{-6}$  تا  $10^{-12}$  لیتر)، با استفاده از کانال‌هایی در ابعاد میکرومتر مورد دست‌ورزی قرار گیرد. از ویژگی‌های ارزشمند این فناوری در مقایسه با سایر روش‌ها، می‌توان به کاهش مقادیر مصرفی نمونه مورد آنالیز و معرف‌ها، جداسازی با وضوح و حساسیت بالا، قابلیت استفاده‌ی توأم با دیگر روش‌ها، بازدهی بالا و هزینه‌ی پایین اشاره نمود. امروزه انواعی از دستگاه‌های جداسازی سلول ابداع شده‌اند که بر پایه‌ی فناوری میکروسیالات عمل می‌کنند؛ بدیهی است که این ابزارها در جداسازی CTCها نیز بسیار کاربرد دارند. از نگرانی‌های مهمی که در رابطه با این ابزارها مطرح است، از دست دادن سلول‌ها در زمان انتقال از مقیاس ماکرو به میکرو است که به طور چشمگیری سبب کاهش حساسیت روش می‌گردد.<sup>۱۵</sup>

در ابتدای توسعه سامانه‌های میکروسیالات که نسل‌های اول و دوم این ابزارها محسوب می‌شوند از انتخاب مثبت برای جداسازی CTCها استفاده گردید ولی در سال‌های بعد و در نسل سوم این

از دیگر روش‌های فیزیکی جداسازی CTCها، می‌توان به تراشه‌های میکروسیال اشاره نمود که به طور جامع در مورد آن‌ها بحث شد.

## بحث و نتیجه‌گیری

تمامی روش‌های مرسوم که امروزه به طور گسترده در تشخیص و غربالگری سرطان پروستات در فاز بالینی به کار می‌روند (آزمون انگشتی راست روده، سونوگرافی از طریق مقعد، سنجش PSA در خون، تهیه بیوپسی و انواع تصویربرداری) محدودیت‌هایی دارند که کاربرد آن‌ها را با مشکلاتی مواجه می‌سازد. ظهور CTCها به عنوان نشانگرهای زیستی نوین، بسیاری از این مشکلات را مرتفع نموده و بررسی بی‌خطر و در لحظه‌ی سرطان را امکان پذیر کرده‌است. سنجش و ارزیابی CTCها می‌تواند اطلاعات دقیق و کاملی را از تومورهای سرطانی پروستات ارائه دهد و جایگزین مناسبی برای بیوپسی‌های پی در پی و خطرناک، در تشخیص این سرطان باشد. این نشانگرهای زیستی نه تنها درباره‌ی ویژگی‌های مولکولی تومورهای سرطانی در فرد بیمار آگاهی می‌بخشند، بلکه نقش مهمی در کنترل در لحظه‌ی پیشروی سرطان و انتخاب درمان‌های هدفمند ایفا می‌کنند. حضور روش‌های ارزیابی و شمارش CTCها در کنار سایر روش‌های تشخیصی مرسوم می‌تواند کمک شایانی به تشخیص زودهنگام سرطان پروستات نموده و منجر به آغاز درمان مناسب، پیش از متاستاز تومورهای سرطانی، گردد. در سال‌های اخیر پیشرفت‌های چشمگیری در روش‌های جداسازی CTCها وجود داشته که حساسیت و سرعت تخلیص را ارتقا بخشیده و لذا امکان بررسی‌های مولکولی دقیق‌تر آن‌ها را فراهم کرده‌است، که از مهمترین این روش‌ها استفاده از فناوری میکروسیالات می‌باشد؛ ولی متأسفانه علی‌رغم موفقیت‌های بسیار، هر کدام از این روش‌ها کاستی‌هایی نیز داشته‌اند. به همین دلیل هر روش تنها می‌تواند دسته‌ای از CTCها را جداسازی نماید؛ در نتیجه نیاز برای ابداع روشی کارآمد در جداسازی CTCهای سرطان پروستات همچنان باقی است. در حال حاضر اگرچه نیاز است تا برای استفاده از این نشانگرها در فاز بالینی مطالعات و تحقیقات تاییدی بسیاری صورت گیرد ولی با توجه به ویژگی‌های برجسته‌ی



شکل ۲: نمایی از تراشه‌ی نوار چسب نانوی میکروسیال برای تشخیص CTCهای سرطان پروستات.<sup>۲۱</sup>

تاکون این فناوری در سنجش CTCهای خون بیماران مبتلا به مرحله‌ی پیشرفته و مقاوم به هورمون درمانی سرطان پروستات (Castrate Reasant Prostate Cancer) به کار رفته و ارتباط معناداری بین شمار CTCها و میزان پاسخ به درمان در این بیماران مشاهده شده‌است.<sup>۲۲،۲۳</sup>

اولین ابزار میکروسیال در نسل سوم CTC-iChip نام گرفت. در این نوع ابزارها، نشانگرهای سطحی سایر سلول‌های خونی برای غنی‌سازی CTCها مورد استفاده قرار گرفت. مزیت مهم انتخاب منفی در CTC-iChipها، این است که در این ابزارها CTCها در حالتی جدا می‌شوند که به هیچ آنتی‌بادی و یا دانه مغناطیسی متصل نشده‌اند.<sup>۱۵،۱۶</sup>

## جداسازی CTCها بر اساس ویژگی‌های فیزیکی

در این دسته از روش‌ها، CTCها بر اساس تفاوت در ویژگی‌های فیزیکی چون، اندازه، چگالی، انعطاف پذیری و بار الکتریکی از سایر سلول‌های خونی جدا می‌گردند. مزیت مهم این دسته از روش‌ها مستقل بودن جداسازی از خصوصیات مولکولی CTCها است.<sup>۱۷،۱۸</sup>

یکی از رایج‌ترین روش‌های فیزیکی جداسازی CTCها، سانتریفیوژ شیب غلظتی است؛ که در آن CTCها بر اساس چگالی از سایر سلول‌های خونی جدا می‌گردند. دانشمندان توانسته‌اند تا با استفاده از روش سانتریفیوژ شیب غلظتی CTCهای موجود در ۷۹٪ از بیماران مبتلا به سرطان پروستات پیشرفته که مقاوم به هورمون درمانی شدند (CRPC)، را جدا نمایند. هم‌اکنون این روش، یکی از روش‌های مرسوم جداسازی CTCها به شمار می‌آید.<sup>۷</sup>

سرطان پروستات باشند.

CTCها امید می‌رود که این نشانگرها بتوانند در آینده‌ای نزدیک نوید بخش روش‌های مؤثرتری در تشخیص سرطان‌هایی همچون

## منابع

1. Felgueiras J, Silva JV, Fardilha M. Prostate cancer: the need for biomarkers and new therapeutic targets. *Journal of Zhejiang University Science B*. 2014;15(1):16-42.
2. Mohsenzadegan M, Tajik N, Madjd Z, Shekarabi M, Farajollahi MM. Study of NGEF expression in androgen sensitive prostate cancer cells: A potential target for immunotherapy. *Medical journal of the Islamic Republic of Iran*. 2015;29:159.
3. Taeb J, Asgari M, Abolhasani M, Farajollahi MM, Madjd Z. Expression of prostate stem cell antigen (PSCA) in prostate cancer: A tissue microarray study of Iranian patients. *Pathology-Research and Practice*. 2014; 210(1):18-23.
4. Mohsenzadegan M, Shekarabi M, Madjd Z, Asgari M, Abolhasani M, Tajik N, et al. Study of NGEF expression pattern in cancerous tissues provides novel insights into prognostic marker in prostate cancer. *Biomarkers in medicine*. 2015;9(4):391-401.
5. Zhang X, Soori G, Dobleman TJ, Xiao GG. The application of monoclonal antibodies in cancer diagnosis. *Expert review of molecular diagnostics*. 2014;14(1):97-106.
6. Sardana G, Dowell B, Diamandis EP. Emerging biomarkers for the diagnosis and prognosis of prostate cancer. *Clinical chemistry*. 2008;54(12):1951-60.
7. Miyamoto DT, Sequist LV, Lee RJ. Circulating tumour cells-monitoring treatment response in prostate cancer. *Nature reviews Clinical oncology*. 2014;11(7):401-12.
8. Galletti G, Portella L, Tagawa ST, Kirby BJ, Giannakakou P, Nanus DM. Circulating tumor cells in prostate cancer diagnosis and monitoring: an appraisal of clinical potential. *Molecular diagnosis & therapy*. 2014;18(4):389-402.
9. Carter HB, Albertsen PC, Barry MJ, Etzioni R, Freedland SJ, Greene KL, et al. Early detection of prostate cancer: AUA Guideline. *The Journal of urology*. 2013;190(2):419-26.
10. Harouaka R, Kang Z, Zheng S-Y, Cao L. Circulating tumor cells: Advances in isolation and analysis, and challenges for clinical applications. *Pharmacology & therapeutics*. 2014;141(2):209-21.
11. Reinsberg S, Scurr E, Brewster J, Payne G. Magnetic resonance imaging in prostate cancer: the value of apparent diffusion coefficients for identifying malignant nodules. *Magnetic resonance imaging*. 2014;80(950):8-19.
12. Shiose Y. [Current development status and prospect of dual PI3K/mTOR inhibitors for cancer therapy]. *Nihon yakurigaku zasshi Folia pharmacologica Japonica*. 2013;142(4):156-61.
13. Lilja H, Ulmert D, Vickers AJ. Prostate-specific antigen and prostate cancer: prediction, detection and monitoring. *Nature Reviews Cancer*. 2008;8(4):268-78.
14. Sonn GA, Natarajan S, Margolis DJ, MacAiran M, Lieu P, Huang J, et al. Targeted biopsy in the detection of prostate cancer using an office based magnetic resonance ultrasound fusion device. *The Journal of urology*. 2013;189(1):86-92.
15. Hyun KA, Jung HI. Advances and critical concerns with the microfluidic enrichments of circulating tumor cells. *Lab on a chip*. 2014;14(1):45-56.
16. Stott SL, Lee RJ, Nagrath S, Yu M, Miyamoto DT, Ulkus L, et al. Isolation and characterization of circulating tumor cells from patients with localized and metastatic prostate cancer. *Science translational medicine*. 2010;2(25):25ra3-ra3.
17. Esmaeilsabzali H, Beischlag TV, Cox ME, Parameswaran AM, Park EJ. Detection and isolation of circulating tumor cells: Principles and methods. *Biotechnology advances*. 2013; 31(7): 1063-1084.
18. Powell AA, Talasaz AH, Zhang H, Coram MA, Reddy A, Deng G, et al. Single cell profiling of circulating tumor cells: transcriptional heterogeneity and diversity from breast cancer cell lines. *PloS one*. 2012;7(5):e33788.
19. Hajba L, Guttman A. Circulating tumor-cell detection and capture using microfluidic devices. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2014;59:9-16.
20. Sheng W, Ogunwobi OO, Chen T, Zhang J, George TJ, Liu C, et al. Capture, release and culture of circulating tumor cells from pancreatic cancer patients using an enhanced mixing chip. *Lab on a chip*. 2014;14(1):89-98.
21. Dolgin E. New technologies aim to take cancer out of circulation. *Nature medicine*. 2011;17(3):266.
22. Chen J, Li J, Sun Y. Microfluidic approaches for cancer cell detection, characterization, and separation. *Lab on a chip*. 2012;12(10):1753-67.
23. Wang S, Liu K, Liu J, Yu ZTF, Xu X, Zhao L, et al. Highly efficient capture of circulating tumor cells by using nanostructured silicon substrates with integrated chaotic micromixers. *Angewandte Chemie International Edition*. 2011;50(13):3084-8.
24. Karabacak NM, Spuhler PS, Fachin F, Lim EJ, Pai V, Ozkumur E, et al. Microfluidic, marker-free isolation of circulating tumor cells from blood samples. *Nature protocols*. 2014;9(3):694-710.