استفاده از DNA شناور به‌عنوان بیومارکر سرطان،

واقعیت یا افسانه

Moderators: Felix Leung,1 Vathany Kulasingam,2 and Eleftherios P. Diamandis3*
Experts: Dave S.B. Hoon,4 Kenneth Kinzler,5 Klaus Pantel,6 and Catherine Alix-Panabieres7

دکتر محمد کریمی

ایده استفاده از cell-free DNA (cfDNA) در خون به‌عنوان یک بیومارکر، مفهوم جدیدی نیست؛ حدود ۶۰ سال پیش Mandelو Metais حضور cfDNA را در خون افراد سالم نشان دادند. در دهه‌های بعد گروه‌های زیادی توانستند تجربیات Mandel و Metais را بسط دهند و cfDNA مربوط به تومورها را در خون بیماران سرطانی کشف کنند. این DNA را که مشتق از سلول‌های تومورال می‌باشد ctDNA می‌نامند. این یافته‌ها نشان می‌داد که "بیوپسی مایع" می‌تواند یک روش قابل انجام بالینی باشد چراکه سلول‌های تومورال قطعاتی از DNA را به داخل خون آزاد می‌کنند که این قطعات اختصاص به سلول‌های تومورال دارند و قابل اندازه‌گیری می‌باشند.

در طی دهه گذشته شاهد موجی در بهبود فناوری‌های موجود و ایجاد فناوری‌های جدید در توالی‌یابی DNA بوده‌ایم که سبب شده تا این کار پرزحمت و وقت‌گیر سریع‌تر و ارزان‌تر انجام شود. هزینه توالی‌یابی هر ژنوم در سال ۲۰۰۹ معادل ۱۰۰/۰۰۰ دلار بود، درحالی‌که به یمن این پیشرفت‌ها در سال ۲۰۱۴ به ۵۰۰۰ دلار کاهش یافت، درنتیجه استفاده از ctDNA به‌عنوان بیوپسی مایع بیش‌ازپیش قابل‌دسترس‌تر شد.

از نظر بالینی استفاده از ctDNA مزایای فراوانی در مدیریت سرطان دارد ازجمله:

الف- بازیابی ctDNA در مقایسه با بیوپسی بافتی غیرتهاجمی‌تر است.

ب- ctDNA به‌خوبی می‌تواند تومور را نمایندگی کند.

ج- ctDNA می‌تواند یک تصویر مقطعی و لحظه‌ای از بیماری فرد نمایش دهد.

اگرچه استفاده بالینی از ctDNA به‌عنوان بیومارکر هنوز با موانع بیولوژیک و تکنولوژیک متعددی مواجه است، اما مزایای بالقوه بی‌شماری را می‌توان برای آن تصور کرد؛ مانند شناسایی سریع بیماری، پایش حداقل بیماری باقیمانده (MRD) Minimal residual Disease، ارزیابی پاسخ به درمان و اولویت‌بندی بر اساس احتمال عود بیماری.

در این مقاله پرسش و پاسخ، چهار نفر از متخصصین نظرات خود را درخصوص وضعیت فعلی استفاده از ctDNA در مدیریت سرطان بیان می‌دارند، به‌ویژه درخصوص چالش‌های بیولوژیک و آنالیتیکال این تکنولوژی و مزایای بالقوه این فناوریِ در حال رشد بحث خواهد شد.

به نظر شما مکانیسم اصلی ریزش ctDNA به داخل گردش خون چیست؟

Dave S.B. Hoon: با در نظر داشتن اتفاقات متعددی که برای سلول‌های تومورال اتفاق می‌افتد می‌توان مکانیسم اصلی را توضیح داد. ctDNA موجود در جریان خون ممکن است از سلول‌های سرطانی اولیه، متاستاتیک و یا شناور در خون منشأ گرفته باشند. آپوپتوز، نکروز، تخریب سلول تومورال و یا ترشح می‌تواند آزادکننده ctDNA در جریان خون گردد. عواملی همچون وضعیت تومور، مقدار و هیستوپاتولوژی آن بر ترکیب کلی ctDNA جاری در خون اثر می‌گذارند.

Kenneth Kinzler: یک احتمال این است که DNA پس از مردن سلول‌های تومورال موجود در جریان خون آزاد می‌گردد. احتمال دیگر این است که مرگ سلول‌های تومورال در همان بستر تومور موجب آزاد شدن DNA می‌گردد. دلایل متعددی در دست است که فرضیه دوم را تأیید می‌کند؛ نخست اینکه در تعداد عمده‌ای از مواردی که ctDNA در گردش خون مشاهده می‌گردد نمی‌توان سلول‌های تومورال را در گردش خون شناسایی کرد. دوم اینکه درخصوص مواردی که می‌توان هم سلول‌های تومورال و هم ctDNA را در گردش خون شناسایی کرد میزان ctDNA یک تا دو برابر بیشتر از آن چیزی است که می‌توان در سلول‌های تومورال شناور پیدا کرد. سوم اینکه در موارد پیشرفته سرطان مقادیر زیادی cfDNA از سلول‌های نرمال آزاد می‌شود که این سلول‌های نرمال در بستر سلول‌های بدخیم تخریب شده‌اند.

Klaus Pantel: اصولاً در بیماران سرطانی ctDNA می‌تواند از تومور اولیه، سلول‌های تومورال شناور، میکرومتاستاز یا متاستاز کامل رها گردد. بخش عمده ctDNA به احتمال زیاد از فرآیند آپوپتیک و نکروتیک سلول‌های تومورال آزاد می‌شوند. از سلول‌های طبیعی هم DNA آزاد می‌شود به‌ویژه زمانی که در اثر شیمی‌درمانی یا اشعه‌درمانی بافت‌های سالم هم تخریب می‌گردند. آزاد شدن DNA از سلول سالم باعث رقیق شدن ctDNA در خون می‌شود. طول قطعه آزادشده می‌تواند اطلاعاتی راجع به منشأ cfDNA ارائه دهد، گرچه این مسئله همچنان محل مناقشه است، چراکه محققین مختلف مقادیر کات‌آف گوناگونی را در بیماران سرطانی گزارش کرده‌اند. بخشی از این اختلاف در تکنیک‌هایی است که برای سنجش ctDNA و نوع تومور بکار می‌روند. مع‌الوصف ما هنوز محتاج اطلاعات بیشتر در خصوص بیولوژی آزاد شدن ctDNA در جریان خون هستیم.

Catherine Alix-Panabieres: با مرگ سلول‌های سرطانی در اثر نکروز یا آپوپتوز مقداری DNA آزادشده به‌طور پاسیو وارد جریان خون می‌گردد. رهایش cfDNA در جریان خون به هنگام مرگ سلول مختص به سلول‌های سرطانی نیست، بلکه در خون افراد سالم هم دیده می‌شود. حتی ممکن است cfDNA در خون افراد سالم بیشتر از بیماری‌های خوش‌خیم مزمن یا بیماری‌های التهابی یا افراد مسن باشد. نکروز توسط عوامل خارج از سلول‌ها یا بافت سرطانی اتفاق می‌افتد و سبب می‌شود که سلول‌ها به‌طور غیرقابل کنترلی هضم شده و مواد داخل آن‌ها آزاد گردد. آپوپتوز نوعی مرگ سلولی کنترل‌شده است که توسط عوامل مختلف فیزیولوژیک و فارماکولوژیک القا می‌گردد و موجب لیز سلول و تقطیع DNA می‌شود. در هردو حالت سلول‌های تومورال مرده قطعاتی از DNA خود را به داخل جریان خون آزاد می‌کنند. ازآنجایی‌که تقطیع ctDNA متعاقب آپوپتوز بیشتر از نکروز است، لذا با این فرض شاید بتوان مشخص کرد که ctDNA در بیماران سرطانی چگونه آزاد می‌گردد به‌ویژه ctDNA که طول آن bp ۱۸۰-۱۶۰ باشد منطبق با DNA محافظت‌شده توسط نوکلئوزمی است که در سلول‌های آپوپتیک دیده می‌شود. مطالعات اخیر نشان می‌دهد که سلول‌های زنده نیز توسط اگزوزوم مقدار بسیار کمی DNA را به خارج از سلول هدایت می‌کنند که البته این مسئله هنوز محل بحث و مناقشه است. برای اینکه ctDNA را به‌عنوان یک بیومارکر در بیماران سرطانی به رسمیت بشناسیم لازم است به این سؤال پاسخ دهیم که چگونه ctDNA وارد جریان خون می‌شود. در آینده باید روشن کنیم که:

۱- ctDNA از چه سلول‌هایی مشتق می‌شود،
۲- چه کلون‌هایی میزان ctDNA را افزایش می‌دهند و
۳- مقدار ctDNA در طی درمان سرطان چگونه تغییر می‌کند.

منشأ ctDNA نهایت اهمیت را دارد چراکه منعکس‌کننده اطلاعات ژنتیکی سلول‌های تومورال است. ازآنجایی‌که ctDNA عمدتاً توسط سلول‌های مرده آزاد می‌شود، لذا اطلاعات حاصل از آن بیانگر وضعیت سلول‌های سرطانی مقاوم به درمان نخواهد بود، بلکه حکایت از گروهی از سلول‌های سرطانی می‌کند که به‌عنوان مثال پس از شیمی‌درمانی از بین رفته‌اند.

ctDNA چگونه از جریان خون پاک می‌شود و این عمل چه تأثیری بر پایداری آن دارد؟

Dave S.B. Hoon: پاک‌سازی ctDNA از خون تابع همان مکانیسم‌هایی است که DNA طبیعی از جریان خون پاک‌سازی می‌شود که از طریق غدد لنفاوی، کلیه و کبد می‌باشد. در محیط اطراف تومور، درناژ لنفاتیک احتمالاً بیشترین مقدار DNA آزادشده را پاک‌سازی می‌کند. ctDNAها عموماً ناپایدار هستند مگر برخی انواع آن که به دلایل ناشناخته نیمه‌عمر طولانی‌تری دارند. عواملی همچون شکل (اگزوزوم)، اندازه، مولکول‌های باندشده (لیپوپروتئین) و مکانیسم آزاد شدن، همگی در پاک‌سازی ctDNA نقش دارند.

Kenneth Kinzler: سرعت پاک‌سازی cfDNA از خون با استفاده از DNA اگزوژن، DNA جنین و DNA تومورال در انسان و مدل‌های حیوانی اندازه‌گیری شده است. تمام این مطالعات نشان می‌دهد که DNA به‌سرعت از خون پاک می‌شود. با بررسی پلاسمای یک فرد بعد از جراحی کامل تومور تخمین می‌زنیم که نیمه‌عمر ctDNA بعد از جراحی ۱۱۴ دقیقه باشد. Dennis Lo و همکارانش میزان DNA شناور جنین را در هشت زن پس از زایمان بررسی کردند و نتیجه گرفتند که نیمه‌عمر DNA جنین در خون مادر ۱۶/۳ دقیقه (با محدوده ۳۰-۴ دقیقه) می‌باشد. مکانیسم پاک‌سازی ctDNA به‌خوبی بررسی نشده است اما گمان می‌رود که مشابه با پاک‌سازی DNA جنینی بوده و به شرایط فیزیولوژیک بیمار هم بستگی دارد. مجموعه‌ای از تجزیه شدن توسط نوکلئاز، پاک‌سازی توسط کلیه و برداشت توسط کبد و طحال همگی می‌توانند در این روند ایفای نقش کنند.

Klaus Pantel: مکانیسم پاک‌سازی ctDNA به‌طور کامل شناسایی نشده است؛ گزارش‌های قبلی نیمه‌عمر ctDNA را ۱۶ دقیقه اعلام کرده بودند اما مطالعات اخیر توسط همان گروه اما این بار با استفاده از نسل جدید توالی‌یابی (NGS) نشان می‌دهد که پاک‌سازی ctDNA دارای دو مرحله است؛ مرحله سریع که در آن نیمه‌عمر DNA یک ساعت و مرحله بعدی که نیمه‌عمر ۱۳ ساعت می‌باشد. تصور بر این است که بیشترین مقدار دفع ctDNA از طریق کلیه باشد، به همین جهت علاقه به تشخیص ctDNA در ادرار افزایش یافته است که البته در اینجا فقط تومورهای ادراری تناسلی مدنظر نیست. در بیمارانی که اختلالات کلیوی دارند می‌توان حدس زد که پاک‌سازی ctDNA دچار اختلال گردد. این موضوع محتاج بررسی‌های بیشتر است چراکه ممکن است عامل تداخل‌گر مهمی در تنظیم میزان ctDNA خون باشد. علاوه بر کلیه، DNA ممکن است با مکانیسم‌های دیگری نیز پاک‌سازی شود، به‌عنوان مثال DNA یک مولکول چسبنده است و می‌تواند به سطح اندوتلیال عروق متصل گردد و بعید نیست که همین DNA مجدداً در خون رها شود. گزارش‌های متعددی وجود دارد که نشان می‌دهد

ctDNA توسط سلول‌های میزبان بازجذب شده و این بازجذب موجب تغییر بیولوژی این سلول‌ها می‌گردد، لذا مکانیسم‌های پاک‌سازی ctDNA و اثرات آن‌ها بر روی پایداری آن موضوعی است که باید مورد بررسی بیشتر قرار گیرد.

Catherine Alix-Panabieres: اینکه پاک‌سازی ctDNA چقدر طول می‌کشد و چگونه انجام می‌شود به‌خوبی مشخص نیست و تحقیقات درخصوص آن ادامه دارد. آنچه مشخص است این است که پایداری ctDNA در خون بیماران مبتلا به سرطان محدود است چراکه توسط DNase موجود در خون سریعاً تجزیه می‌شود، بنابراین نیمه‌عمر ctDNA در خون کوتاه بوده و حدود چند ساعت است که در طی آن زمان باید آزمایش شود. این مواد تکه‌تکه شده ژنتیکی در بیماران سرطانی سریعاً دچار تغییر می‌شوند و لذا زمان خون‌گیری اهمیت حیاتی دارد، علاوه بر این میزان رهایش ctDNA توسط سلول‌های سرطانی در حال مرگ به عوامل مختلفی همچون نوع تومور، مرحله تومور، پاسخ بیمار به درمان، حجم تومور و تکثیر سلولی بستگی دارد.

ctDNA از جهات مختلف همچون موتاسیون نقطه‌ای، آنوپلویدی، بازآرایی و متیلاسیون قابل بررسی است. در حال حاضر کدام فناوری برای تحقیق در این مورد بکار می‌رود؟

Dave S.B. Hoon: فناوری‌های متعددی برای تحقیق در خصوص اختلالات ژنومیک و اپی‌ژنومیک ctDNA وجود دارد. هرکدام از این روش‌ها شایستگی‌های خاص خود را دارند ولی برخی از آن‌ها بیشتر از بقیه در آزمایش‌های بالینی کارآیی داشته‌اند. مهم‌تر از همه داشتن ویژگی و حساسیت روش است. توالی‌یابی مولکولی کوچک دیجیتال امروزه یک روش بسیار حساس و اختصاصی برای موتاسیون‌های نقطه‌ای و تشخیص آمپلیفیکاسیون ctDNA به‌حساب می‌آید.

Kenneth Kinzler: با استفاده از NGS، موتاسیون‌های نقطه‌ای، بازآرایی‌ها، آنوپلویدی و متیلاسیون برای تعیین هویت در ctDNA قابل انجام می‌باشند. این روش‌ها برای افتراق DNA طبیعی از DNA تومورال در میزان حساسیت و ویژگی تفاوت‌هایی دارند. گرچه کاربرد بالینی خاص مشخص می‌کند که کدام روش عملکرد بهینه‌ای دارد، در تجربیات ما موتاسیون‌های نقطه‌ای بهترین تجمیع صفات را برای کاربردهای بالینی داشته‌اند.

Klaus Pantel: روش‌های بسیار حساس و اختصاصی برای تشخیص ctDNA ایجاد شده‌اند: BEAMing، Safe-SeqS، Tam Seq و RCR دیجیتال برای موتاسیون‌های تک‌نوکلئوتیدی در ctDNA و یا توالی‌یابی تمام ژنوم برای بررسی تغییرات در نسخه‌برداری. در اصل این فناوری‌ها را می‌توان به دو دسته تقسیم کرد:

۱- روش‌های هدف‌گرا که موتاسیون‌ها را در یک سری ژن‌های ازپیش‌تعریف‌شده بررسی می‌کنند (مانند KRAS proto-oncogene)
۲- روش‌های غیرهدف‌گرا همچون array-CGH (Comparative Genemic Hybridization), توالی‌یابی کل ژنوم یا توالی‌یابی اگزوم که به غربالگری ژنوم پرداخته و اختلالات ژنومی نظیر مقاومت به یک دارو را بررسی می‌کنند.

نقاط ضعف و قوت این فناوری‌ها اخیراً در مقالات مروری به‌خوبی موردبررسی قرار گرفته است. به‌طورکلی روش‌های هدف‌گرا در مقایسه با روش‌های غیرهدف‌گرا حساسیت آنالیتیکال بیشتری دارند. اخیراً یک کنسرسیوم ارزیابی، متشکل از بیش از ۳۰

مؤسسه دانشگاهی و صنعتی تمرکز فعالیت خود را بر روی بیوپسی مایع قرار داده است. هدف اولیه آن‌ها ارزیابی فناوری‌های مختلف تشخیص cfDNA می‌باشد.

Catherine Alix-Panabieres: تشخیص ctDNA در میان کل مجموعه cfDNA در پلاسما محتاج استفاده از روش‌های مولکولی مبتنی بر اختلاف ژنتیکی یا اپی‌ژنتیکی بین DNA طبیعی و تومورال است. آشکارسازی ctDNA براساس یکی از موارد ذیل انجام می‌شود:

۱- موتاسیون شناخته‌شده
۲- موتاسیون غیرقابل پیش‌بینی و
۳- تغییرات اپی‌ژنتیک (مانند متیلاسیون)

برخی از فناوری‌هایی که قادر به انجام تحقیق درخصوص ctDNA می‌باشند عبارتند از:

الف- تلفیق pyrophosphorolysis-activated polymerization و allele- specific ampilification در طی PCR،

ب- گروهی از روش‌های ژنومیک دیجیتال که تشخیص تغییرات ژنتیک را در ctDNA بهبود می‌بخشند.

ج- روش BEAMing که یک نوع RCR است که RCR تک‌مولکولی بر روی مهره‌های مغناطیسی در امولسیون آب- روغن انجام می‌شود.

د- سایر فناوری‌های RCR شامل RCR دیجیتال قطره‌ای و سیستم‌های میکروفلوئیدیک،

ه- آمپلیفیکاسیون RCR بعد از NGS

CfDNAی پلاسما که توسط NGS آنالیز می‌شود می‌تواند حضور یک موتاسیون خاص را تعیین کرده و فرکانس آللی آن را در یک نمونه تخمین بزند و همچنین خصوصیات تمام ژنوم و موتاسیون‌های مجموعه را در سرطان مشخص کند. درنهایت برای آنکه ایده‌ای از حساسیت بالای فناوری‌های جدید در تشخیص ctDNA داشته باشیم گفته می‌شود که RCR دیجیتال و BEAMing می‌توانند موتاسیون‌های نقطه‌ای سوماتیک را با حساسیت ۱٪ تا یک‌هزارم درصد آشکار کنند. علاوه بر بررسی موتاسیون‌های نقطه‌ای و تغییرات تعداد نسخه‌ها، بررسی متیلاسیون ژن‌های ساپرسور تومور و ژن‌های ساپرسور متاستاز در ctDNA با روش real-time methylation-specific RCR قابل انجام می‌باشد. همه این فناوری‌ها در خصوص رده‌های سلول‌های سرطانی در محیط آزمایشگاهی موردبررسی قرار گرفته و حساسیت‌های مختلفی برای آن‌ها گزارش شده است، اما ارزیابی آن‌ها در کارآزمایی‌های بالینی همچنان جای کار دارد.

اخیراً ما شاهد ظهـــــور فناوری‌های جدید توالی‌یابی همچون tagged-amplicon deep sequencing (TAM-Seq) و CAncer Personalized Profiling by deep Sequencing (CAPP-Seq) بوده‌ایم. مزیت این فناوری‌های جدید در مقایسه با فناوری‌های قدیم چیست؟

Dave S.B. Hoon: این فناوری‌ها هدف‌گیری مستقیم بیشتری را فراهم می‌کنند اما الزاماً بهتر از روش‌های جدید NGS نیستند. NGS سنجش مولکول‌های کوچک دیجیتال به‌مراتب از NGS متداول حساس‌تر و اختصاصی‌تر می‌باشد. NGS موازی مرسوم، پرهزینه و محدود است. فناوری‌های تشخیصی به‌سرعت در حال ارتقاء و بهبود هستند. روش‌های جدید تنها زمانی باید ارزشمند تلقی شوند که فایده بالینی آن‌ها کاملاً احراز گردد.

Kenneth Kinzler: در موارد پیشرفته سرطان که مقدار ctDNA به بیش از ۵٪ DNA توتال می‌رسد، روش‌های متعددی هستند که می‌توانند ctDNA را شناسایی کنند، اما در مراحل اولیه بیماری که مقدار ctDNA کمتر از ۰/۱٪ کل DNA می‌باشد نیازمند روش‌هایی هستیم که بتوانند تعداد کم مولکول‌های موتانت را شناسایی کنند. خوشبختانه روش‌های دیجیتال (همچون digital PCR, BEAMing و SafeSeqS) به‌طور دقیق می‌توانند این کار را انجام دهند.

Klaus Pantel: مهم‌ترین مزیت این فناوری‌های نوین حساسیت بالای آن‌هاست. فناوری‌های قدیمی در بیمارانی استفاده شده‌اند که مقدار ctDNA آن‌ها بسیار بالا بود و گاهی از ۵۰٪ DNA کل تجاوز می‌کرده است، لذا این فناوری‌ها قادر نبودند که ctDNA را در دریایی از DNA نرمال تشخیص دهند و اگر می‌خواستیم مراحل اولیه سرطان یا MRD را بررسی کنیم فاقد کارآیی بودند، بنابراین فناوری‌های جدیدی توسعه یافتند که بتوانند ctDNA را در مقادیر بسیار جزئی شناسایی کنند، تا حدی که فناوری CAPP-Seq می‌تواند غلظت ۰/۰۰۰۲۵ درصد ctDNA را تشخیص دهد، اما در این‌جا مقدار کل ctDNA اهمیت می‌یابد که باید حجم پلاسمای مورداستفاده را افزایش داد. از این نگاه، سنجش ctDNA در مراحل اولیه بیماری سرطان همان محدودیت‌هایی را دارد که سنجش سلول‌های توموری شناور داشتند، لذا وعده اینکه با اندازه‌گیری ctDNA در یک قطره خون می‌توان به تشخیص سرطان رسید، گمراه‌کننده است.

Catherine Alix-Panabieres: سنجش توسط سیستم استاندارد RCR حساسیت محدودی دارد و نمی‌توان در مواردی که آلل‌های موتاسیون کمتر از ۵ تا ۱۰ درصد کل مجموعه هستند از آن استفاده کرد. درحقیقت روش‌های قدیمی آرتیفکت‌های متعددی ایجاد می‌کنند، به‌خصوص چنانچه میزان ctDNA کم باشد ولی روش‌های جدید قادرند مقادیر بسیار جزئی ctDNA را شناسایی نمایند. شناسایی اختلالات ژنتیکی و اپی‌ژنتیکی سوماتیک با فناوری‌های جدید بسیار حساس‌تر و اختصاصی‌تر شده است. با فناوری‌های قدیمی فقط می‌توانستیم سرطان‌های پیشرفته و متاستاتیک را شناسایی کنیم، اما اکنون می‌توانیم مراحل اولیه سرطان و MRD را نیز رهگیری نماییم.

بزرگ‌ترین چالش موجود در ژنوتایپینگ ctDNA چیست؟

Dave S.B. Hoon: بزرگ‌ترین مشکل فنی یا پاشنه آشیل این کار جدا کردن ctDNA از مقدار کم سرم یا پلاسما است. این مانع بقیه مراحل کار را نیز تحت‌تأثیر قرار می‌دهد. حساسیت اندازه‌گیری مشکل عمده دیگر است. مهم‌ترین چالش

تکنیکی این است که بدانیم چه مقدار از ctDNA اهمیت بالینی دارد. این مقدار احتمالاً در بین سرطان‌های مختلف متفاوت است و به وضعیت بالینی بیمار بستگی دارد.

Kenneth Kinzler: فناوری پیشرفته، شناسایی ctDNA را ممکن ساخته و پیشرفت‌های آتی احتمالاً آن را بهتر و مقرون به‌صرفه‌تر خواهد ساخت، اما این روش‌ها مشابه روش‌های فعلی بیشتر از مسائل تکنیکی توسط مسائل عملی و بیولوژیک محدودیت خواهند داشت.

از نظر عملی ما به‌واسطه تعداد کم مولکول‌ها در نمونه سرم یا پلاسما محدودیت داریم، به‌عنوان مثال در یک میلی‌لیتر پلاسما حدود ۳۰۰۰ نسخه از همه ژن‌ها داریم، لذا برای شناسایی یک مولکول ctDNA در میان ۱۵۰۰۰ نسخه نیازمند ۵ میلی‌لیتر پلاسما هستیم. از نظر بیولوژیک تنها بخش کوچکی از تومورهای خوش‌خیم و بعضی انواع تومورها (مانند گلایوبلاستوما)، ctDNA را در حدی آزاد می‌کنند که بتوان آن را حتی با روش‌های خیلی حساس اندازه‌گیری کرد.

برخی از محدودیت‌های استفاده از ctDNA به‌عنوان بیومارکر را شاید بتوان با افزایش حجم نمونه و تغییر پروتکل یا محل خون‌گیری، دور زد.

درنهایت باید گفت که DNA تومور ممکن است بتواند در سایر نمونه‌های قابل‌دسترس همچون مدفوع، ادرار، خلط، بزاق و پاپ اسمیر به‌عنوان بیومارکر موردتوجه واقع شود.

Klaus Pantel: مهم‌ترین چالش تکنیکی، تشخیص مقادیر کم ctDNA در خون و انتخاب پانل ژنومیک مناسب برای سرطان خاص می‌باشد. اگر بخواهیم اختلالات ژنومیک را بر اساس درمان‌های موجود انتخاب کنیم به نظر می‌رسد که با فناوری‌های موجود، این کار شدنی است، اما اگر هدف از آزمایش ctDNA غربالگری MRD در بیماران سرطانی و یا شناسایی زودهنگام بیماری باشد، اختلالات ژنومیک مجهول می‌باشند. در بیماران MRD تومور اولیه (یا حداقل یک بیوپسی) باید جهت توالی‌یابی در دسترس باشد، گرچه کیفیت این نمونه که در فرمالین فیکس شده می‌تواند بشدت متغیر باشد. برای تشخیص زودهنگام، هیچ تومور اولیه وجود ندارد و پانل اختلالات ژنومیک احتمالی برای بیشتر تومورهای جامد بسیار زیاد است. از طرفی می‌دانیم که موتاسیون‌های سرطانی با گذشت سن در افراد زیادی پدیدار می‌شود که این افراد هیچگاه ممکن است دچار بیماری سرطان نشوند. به‌عنوان مثال یک بررسی جدید نشان می‌دهد که ۱۵٪ افراد بالای ۶۵ سال سالم دارای موتاسیون‌های سوماتیک لوسمی هستند، درحالی‌که تعداد اندکی از آن‌ها به لوسمی مبتلا خواهند شد، لذا کشف موتاسیون‌های سرطانی در cfDNA الزاماً به این معنی نیست که فرد سرطان داشته و یا در آینده دچار سرطان خواهد شد، بلکه ممکن است تنها باعث شود که تست‌های تشخیصی دیگر همچون CT و MRI برای کشف یک ضایعه بدخیم پنهان الزامی گردد.

Catherine Alix-Panabieres: در ابتدا باید عوامل پره‌آنالیتیک همچون حجم نمونه، نوع نمونه (پلاسما یا سرم)، سانتریفوژ کردن خون، معرف‌های خاص برای جدا کردن DNA، استخراج DNA و شرایط نگهداری استاندارد شوند. سپس ارزیابی روش آزمایش (استحکام، تکرارپذیری، حساسیت، ویژگی، کنترل کیفی داخلی و خارجی) و زمان لازم از نمونه‌گیری تا ارائه جواب مورد ارزیابی قرار گیرد. تمام این نکات تکنیکی باید مدنظر باشد اما مهم‌تر از همه این است که باید اهمیت بالینی سنجش ctDNA را در زمان‌های مختلف برای پاسخ به سؤالات مختلف موردتوجه قرار دهیم؛ به‌عنوان مثال کاربرد این

سنجش در طبقه‌بندی بیماران برای درمان، ارزیابی کارآیی درمان، تشخیص زودهنگام عود بیماری و یا مشخص کردن مقاومت به درمان می‌تواند باشد. علاوه بر این در تشخیص زودهنگام سرطان باید دو نکته را درنظر بگیریم:

۱- موتاسیون خاص برای شناسایی ctDNA باید مشخص باشد (مثلاً موتاسیون KRAS یا B-Raf proto-oncogene، Serine/threonine kinase (BRAF) در سرطان روده)

۲- بسیاری از افراد که تومورهای خوش‌خیم دارند (مثل تومورهای پوستی) موتاسیون‌هایی دارند که با موتاسیون‌های بدخیم همپوشانی دارد و لذا ممکن است در غربالگری سرطان با ctDNA پاسخ مثبت کاذب ایجاد کند.

فکر می‌کنید چقدر زمان می‌برد تا ctDNA وارد حیطه بالینی گردد؟

Dave S.B. Hoon: در حال حاضر سنجش ctDNA در آزمایشگاه‌هایی که از نظر CLIA معتبر هستند انجام می‌شود [انجام آزمایش در این آزمایشگاه‌ها نیازمند تأیید FDA نیست (توضیح مترجم)] هزینه این آزمایش توسط سازمان‌های بیمه‌گر و خود بیماران پرداخت می‌شود. امیدواریم در چندسال آینده آزمایش‌های ctDNA برای برخی سرطان‌ها تأییدیه FDA را دریافت کنند.

Kenneth Kinzler: گرچه پیش‌بینی اینکه یک فناوری جدید چه زمانی وارد عرصه بالین خواهد شد امری ذهنی است، اما مطالعات زیادی هستند که نشان می‌دهند ctDNA در برخی زمینه‌ها، بیومارکرهای فعلی سرطان را پشت‌سر خواهد گذاشت، لذا من امیدوارم طی ۵ تا ۱۰ سال آینده سنجش ctDNA در تعداد زیادی از شرایط بیماری به تصمیم‌گیری بالینی کمک کند.

Klaus Pantel: طبقه‌بندی بر اساس آزمایش خون جهت هدایت درمان احتمالاً بلیط ورود ctDNA به عرصه بالین است. اخیراً اولین آزمایش ctDNA برای موتاسیون‌های epidermal growth factor receptor (EGFR) در سرطان سلول‌های غیرکوچک ریه توسط FDA تأیید شد. البته این عمل در صورتی موجه است که امکان بیوپسی بافتی نباشد. آزمایش‌های بیشتری برای بررسی موتاسیون ژن‌های کدکننده هدف‌های درمانی و یا ژن‌های ایجادکننده مقاومت به درمان در آینده نزدیک به تأیید خواهند رسید.

سرطان سلول‌های غیرکوچک ریه Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC) مورد قابل‌توجهی در بکارگیری این روش است زیرا موتاسیون‌های مختلفی در آن مشاهده می‌شود و در تعداد قابل‌توجهی از بیماران امکان بیوپسی فراهم نیست، اما باید تأکید کرد که آزمایش DNA در ctDNA یا بافت تومور تضمین نمی‌کند که پاسخ بیمار به درمان بادوام بوده و موجب افزایش طول‌عمر وی گردد. فایده بالینی استفاده از آزمایش ctDNA (مانند هر آزمایش تشخیصی دیگر) باید در مطالعات مداخله‌ای بالینی تصادفی که تصمیم درمانی بر اساس این آزمایش گرفته می‌شود، مشخص گردد، مثلاً باید دید که آیا آزمایش ctDNA می‌تواند درمان را در بیمار سرطانی هدایت کند و این کار موجب افزایش طول عمر بیمار می‌گردد یا خیر. ممکن است سال‌ها طول بکشد تا این مطالعات تکمیل شده و موردقبول جامعه پزشکی قرار بگیرد.

پایش ctDNA برای موتاسیون‌های القاکننده مقاومت نسبت به درمان خاص با این مانع مواجه است که ما هنوز اطلاعات اندکی در خصوص بیولوژی دینامیک رهایش ctDNA داریم. ctDNA عمدتاً از سلول‌های مرده آزاد می‌شود درحالی‌که مقاومت به دارو توسط سلول‌هایی ایجاد می‌گردد که توانسته‌اند زنده بمانند و موجب گسترش سرطان شوند، لذا انتخاب زمان

مناسب برای غربالگری ctDNA در شناسایی آن گونه از ctDNAها که از سلول‌های مقاوم تومور آزاد می‌شوند، بسیار اهمیت دارد. در این زمینه سنجش هم‌زمان سلول‌های تومورال شناور در خون به‌عنوان نشانه شکست درمان می‌تواند مفید باشد.

Catherine Alix-Panabieres: توسعه آزمایش‌های مولکولی برای تصمیم‌سازی درخصوص درمان به همراه پیشرفت‌های تکنولوژی در سال‌های اخیر متداول شده است و ما امیدواریم که بیوپسی مایع بتواند به راه‌های تشخیص غیرتهاجمی و حساس‌تر در تشخیص و پایش سرطان منجر گردد، بااین‌حال ورود ctDNA به عرصه بالین ممکن است سال‌ها زمان ببرد. در این مسیر باید بهترین فناوری را برای تهیه و آشکارسازی ctDNA مشخص کنیم و اینکه نهایت کار چه خواهد بود و آیا آزمایش ctDNA اطلاعات بیشتری از بیوپسی به دست خواهد داد یا نه. همان‌طور که قبلاً گفته شد ما نیازمند بررسی ارتباط بالینی ctDNA و فایده بالینی آن هستیم، علاوه بر این برای غربالگری اولیه همگروه‌های بزرگی از بیماران سرطانی و گروه‌های کنترل متناسب باید مورد بررسی قرار بگیرند. مانند سایر روش‌های غربالگری چون PSA و ماموگرافی این بررسی نیز باید بر روی هزاران بیمار و کنترل در طی ده سال و یا بیشتر انجام شود.

توضیح مصاحبه‌کننده: پس از اتمام این مصاحبه باخبر شدیم که شرکت جدیدی به نام Grial تأسیس شده است که هدف آن ارائه یک آزمایش خون با قیمت کمتر از ۱۰۰۰ دلار و تشخیص انواع مختلف سرطان در مراحل اولیه می‌باشد. این آزمایش مبتنی بر بیوپسی مایع (نمونه خون) و سنجش ctDNA خواهد بود. این شرکت با سرمایه ۱۰۰ میلیون دلار و با سهامداران معروفی همچون بیل گیتس (مایکروسافت) و جف بزوس (آمازون) تأسیس شده است. ادعا شده که این آزمایش تا سال ۲۰۱۹ به بازار عرضه خواهد شد.

پاورقی:

1 Department of Laboratory Medicine and Pathobiology, University of Toronto, Toronto,
ON, Canada; 2 Department of Laboratory Medicine and Pathobiology, University of Toronto,
and Department of Clinical Biochemistry, University Health Network, Toronto, ON, Canada; 3 Department of Laboratory Medicine and Pathobiology, University of Toronto,
Toronto, Ontario, Canada; Department of Clinical Biochemistry, University Health Network;
Department of Pathology and Laboratory Medicine, Mount Sinai Hospital, Toronto, Ontario, Canada; 4 Professor, Director Molecular Oncology & Sequencing Center, John
Wayne Cancer Institute, Saint Johns Health Center Providence, Santa Monica, CA; 5 Professor
of Oncology, Director, Ludwig Center at Johns Hopkins University, The Johns Hopkins
Kimmel Cancer Center, Baltimore, MD; 6 Professor, Director, Department of Tumor Biology, University of Hamburg, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Germany;
7 Associate Professor, University Medical Center of Montpellier, Hoˆ pital
Saint-Eloi - CHRU Montpellier, France.

8 Nonstandard abbreviations: cfDNA, cell-free DNA; ctDNA, circulating tumor DNA; MRD, minimal residual disease; NGS, next generation sequencing; TAM-Seq, tagged-amplicon deep sequencing; CAPP-Seq, CAncer Personalized Profiling by deep Sequencing; FDA, US Food and Drug Administration; NSCLC, non–small cell lung cancer

این مقاله ترجمه‌ای است از:

Circulating Tumor DNA as a Cancer Biomarker:
Fact or Fiction?

Moderators: Felix Leung,1 Vathany Kulasingam,2 and Eleftherios P. Diamandis3*
Experts: Dave S.B. Hoon,4 Kenneth Kinzler,5 Klaus Pantel,6 and Catherine Alix-Panabie` res7

Clinical Chemistry 62:8
1054–1060 (2016)