نشریه فارماکوژنومیک و فناوری‌های امیکس

فصلنامه پزشکی/ سال پنجم/ شماره شانزدهم/ قیمت: ۵۰۰۰۰۰ ریال/ تابستان ۱۴۰۲- شماره شاپا ۷۲۳۶- ۲۶۷۶

ژنوم شما بر نحوه پاسختان به داروها مؤثر است.

صاحب امتیاز:
شرکت دانش بنیان گروه توسعه فناوری آمیتیس ژن

مدیر مسئول: دکتر فرناز اقبال‌پور

سردبیر: مهندس سیده نیره مصلحی

مدیر اجرایی و طراح: فاطمه محمدی‌پور

طراح: فاطمه محمدی‌پور

صفحه آرا: فریبا دولت‌آبادی

ویراستاری و ارزیابی مقالات: زهرا انتشاری

اعضای هیئت تحریریه در کارگروه‌ها (به ترتیب حروف الفبا):
دکتر محمدرضا اکبری، دکتر ملیحه انتظاری، دکتر ناصر پارسا، دکتر سلام حیدری‌نژاد، دکتر عادل حیدری‌نژاد، دکتر علی اصغر رحیمی، دکتر رضا رفوگران، دکتر ندا سرای گرد افشاری، دکتر حسن سعادت، دکتر رضا شیرکوهی، دکتر محمد علی صارمی، دکتر جمشید مولایی، دکتر بهار نقوی، دکتر رضا نکوئیان، دکتر مجید نیک‌پی، دکتر سید مسعود هوشمند، دکتر محمود یعقوبی

شماره تماس: ۸۸۹۸۵۲۹۳(۰۲۱)
آدرس: تهران، ابتدای خیابان ایتالیا، پلاک ۲، طبقه ۱، واحد ۱
وب سایت: WWW.PGOTjournal.com
ایمیل: info@PGOTJournal.com

فهرست مطالب:

کاربرد پزشکی شخصی در بیماری آلزایمر با استفاده از هوش مصنوعی ۴

گزارشی از استفاده از پزشکی شخصی ۲۰

تجزیه و تحلیل ژنومیک سرطان در مطالعات بالینی ۲۸

بهبود مخاط روده با فعال کننده جدید کوچک مولکو محلول در آب، شبیه به دارو Focal Adhesion Kinase ۵۴

پتانسیل درمانی کارنوزین: تمرکز بر سلولی و مکانیسم‌های مولکولی ۶۸

کاربرد پزشکی شخصی در بیماری آلزایمر با استفاده از هوش مصنوعی

فرنوش هنرمند [1]

۱- کارشناسی بیوتکنولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
پژوهشگر مرکز تحقیقات پزشکی شخصی آمیتیس ژن

چکیده:

زوال عقل یک سندرم بسیار شایع در میان افراد مسن است و عامل اصلی ناتوانی و وابستگی است. بیماری آلزایمر (AD) اکثر موارد زوال عقل را تشکیل می‌دهد و شایع‌ترین بیماری تخریب کننده عصبی است. از آنجایی که سن، عامل اصلی خطر ابتلا به بیماری آلزایمر است، افزایش طول عمر نه تنها با افزایش شیوع همراه است، بلکه به پیچیدگی تشخیص نیز می‌افزاید. علاوه بر این، فقدان درمان‌های اصلاح‌کننده بیماری، محدودیت دیگری را برجسته می‌کند. تغییر از یک رویکرد درمانی به یک رویکرد پیشگیرانه قریب الوقوع است و ما به سمت استفاده از پزشکی شخصی حرکت می‌کنیم که در آن می‌توانیم بهترین مداخله بالینی را برای یک بیمار در یک نقطه مشخص شکل دهیم. این گام جدید در پزشکی به جدیدترین ابزارها و آنالیز حجم عظیمی از داده‌ها نیاز دارد که در آن کاربرد هوش مصنوعی (AI) نقش مهمی در ترسیم پویایی بیماری-بیمار دارد که در دستیابی به تشخیص زودهنگام و بهینه، نظارت و مداخله بسیار مهم است. مدل‌ها و الگوریتم‌های پیش‌بینی عناصر کلیدی در این زمینه نوآورانه هستند. در این بررسی، مروری بر موضوعات مرتبط در مورد کاربرد هوش مصنوعی در AD، جزئیات الگوریتم‌ها و کاربردهای آن‌ها در زمینه‌های کشف دارو، و نشانگرهای زیستی ارائه می‌کنیم.

کلمات کلیدی: بیماری آلزایمر؛ هوش مصنوعی؛ مدل‌های AD؛ یادگیری ماشین؛ علم داده

مقدمه

بیماری آلزایمر (AD) با شیوع ۳.۹٪ برای افراد بالای ۶۰ سال، شایع ترین اختلال عصبی در سراسر جهان

باقی مانده است. از آنجایی که یک بیماری مرتبط با سن است، تشخیص به یک چالش بزرگ تبدیل شده است، و بنابراین تشخیص زودهنگام برای برنامه ریزی آینده و ارائه روش‌های بهتر برای افراد برای انتخاب آزمایشات بالینی قبل از رسیدن آسیب شناسی به سطوح آسیب عصبی غیرقابل برگشت، ضروری است.

AD با تجمع پلاک‌های آمیلوئید بتا (Aβ) و گره‌های عصبی فیبریلاری مرتبط با تاو مشخص می‌شود که بر نواحی پیش‌پیشانی و مزیال-گیجگاهی مغز تأثیر می‌گذارد. اثرات مضر این تغییرات به کاهش تدریجی حافظه و عملکرد شناختی ناشی از از دست دادن بافت مغز (آتروفی) و تغییرات در مدارهای عصبی، به ویژه در موارد مربوط به اکتساب، تثبیت، تثبیت مجدد و از بین رفتن حافظه تبدیل می‌شود. و یادگیری. علاوه بر علائم نوروپاتولوژیک AD، مسیرهای متابولیکی و عصبی التهابی بیان شده است که بر سیر بیماری و علت تأثیر می‌گذارد.

به دلیل چندین تلاش ناموفق در ارائه درمان‌های مؤثر برای بیماران مبتلا به AD، علاقه عمومی از رویکرد درمانی به دیدگاه پیشگیرانه تغییر یافته است، جایی که با هدف آزمایش درمان‌های اصلاح‌کننده بیماری، مطالعات تمرکز خود را بر انتخاب افراد در مراحل پیش‌بالینی یا پیش‌درومیک تغییر داده‌اند. . در این مراحل اولیه، بیماران عمدتاً بدون علامت هستند یا با نقص حافظه خالص، که معمولاً به عنوان اختلال شناختی خفیف (MCI) شناخته می‌شود، حضور دارند، که در نهایت می‌تواند به AD-زوال عقل با نرخ تبدیل ۱۲ تا ۱۵ درصد در سال پیشرفت کند. بنابراین، بهبود تشخیص و پیش‌بینی پیشرفت و تبدیل به زوال عقل، اهداف اصلی در جستجوی پزشکی شخصی‌سازی شده در AD را تشکیل می‌دهد.

هدف از درمان در بیماران AD کاهش (و در صورت امکان، بهبود) از دست دادن شناختی و حفظ عملکرد خودمختار است. جایگزین‌های دارویی برای درمان (مربوط به علائم) از هدف قرار دادن مدولاسیون مدارهای عصبی آسیب دیده، توسط اهداف مولکولی گسترده و متنوع، تا بهبود تظاهرات رفتاری را شامل می‌شود. روش دیگر، رویکردهای غیردارویی مانند روان درمانی و تحریک مغز غیرتهاجمی (NIBS) وجود دارد. به عنوان یک تکنیک جدید، NIBS نتایج امیدوارکننده‌ای را در بازسازی فعالیت مغزی در رابطه با فرآیندهای تثبیت و تثبیت مجدد ارائه کرده است.

با توجه به افزایش طول عمر، تعداد بیمارانی که در کلینیک‌های زوال عقل به آنها کمک می‌شود افزایش یافته است و مقدار اطلاعات بالینی همچنان به طور تصاعدی در حال رشد است و نیاز به رویکرد تکنولوژیک تری برای تجزیه و تحلیل داده‌ها دارد. روش‌های سنتی تجزیه و تحلیل داده‌ها معمولاً وقوع را ارزیابی می‌کنند و نتایجی را ارائه می‌دهند که می‌توانند دقت کافی نداشته باشند و زمان‌بر و پرهزینه هستند. بنابراین، بکارگیری پیشرفته‌ترین تکنیک‌ها می‌تواند منجر به ارزیابی دقیق طبقه‌بندی‌ها و روابط شود که می‌تواند به داده‌های جدید تعمیم یابد. اینها برای مدیریت داده‌های بزرگ و پیچیده مناسب هستند و معمولاً برای پیش‌بینی و تشخیص الگو و همچنین برای تکمیل تشخیص صحیح و طبقه‌بندی در آزمایش‌های بالینی استفاده می‌شوند. علاوه بر این، ذخیره سازی نقش مهمی را حفظ می‌کند، زیرا توسعه پایگاه‌های داده فرصت سازماندهی، برچسب‌گذاری و طبقه‌بندی افراد را با سرعت بیشتری فراهم می‌کند. با در نظر گرفتن این موضوع، نیاز به طراحی و پیاده‌سازی معماری‌های خاص برای ذخیره اطلاعات مورد نظر به شیوه‌ای ایمن‌تر و کارآمدتر وجود دارد که امکان دسترسی و تحلیل آسان‌تر را فراهم می‌کند.

با توجه به امکان بهبود تشخیص و پیش‌بینی پیشرفت و تبدیل وضعیت بیمار به AD، استفاده از رویکردهای تکنولوژیکی مانند الگوریتم‌هایی که به عنوان هوش مصنوعی (AI) یا یادگیری ماشین (ML) شناخته می‌شوند، که ابزارهای کم‌هزینه با معیارهای عملکرد عالی هستند، می‌تواند مفید باشد. در چنین الگوریتم‌هایی، مجموعه خاصی از ویژگی‌ها یا متغیرها ایجاد می‌شود، که از طریق آن به مجموعه‌ای از دستورالعمل‌ها دستور داده می‌شود تا الگوهایی را کشف کنند که می‌توانند طبقه‌بندی یا تداعی را بیان کنند. در پشت این فرآیند یک مؤلفه ریاضی قوی وجود دارد که عمدتاً بر روی احتمال و تعیین حدود از طریق اندازه‌گیری فواصل بین نقاط متمرکز شده است.

کاربرد پزشکی دقیق، با استفاده از تکنیک‌های هوش مصنوعی، یک رویکرد نوظهور برای درمان و پیشگیری از بیماری است که اطلاعات چندوجهی را با متغیرهایی

مانند سبک زندگی، ژنتیک، فیزیولوژی و عوامل محیطی ترکیب می‌کند.

این بررسی شامل یک مرور کلی از مرتبط‌ترین مفاهیم استفاده از هوش مصنوعی برجسته کردن مدل‌های ML و DL در تحقیقات AD است. این ساختار به دو بخش تقسیم می‌شود: (۱) الگوریتم‌های پیاده‌سازی‌شده و مبانی آن‌ها با حذف جنبه‌های فنی عمیق و (۲) برنامه‌های کاربردی داده محور.

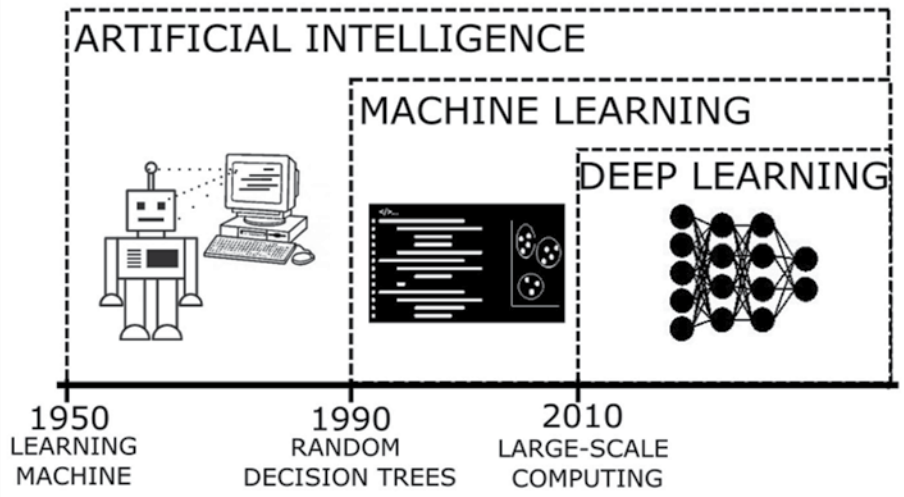
موضوعات نشان داده شده در هر بخش بر اساس جنبه‌هایی که بیشتر به کار می‌رفتند، بر اساس مقالات منتشر شده در پنج سال گذشته، انتخاب می‌شوند. این بررسی مروری بر ویژگی‌های اصلی، قابلیت کاربردی فعلی و دیدگاه‌های آینده اجرای هوش مصنوعی در مراقبت‌های بهداشتی، به‌ویژه در زوال عقل را نشان می‌دهد.

۲. رویکردهایی برای توسعه مدل‌های ML در تحقیقات AD

اصطلاحات AI و ML رابطه آنها را می‌توان در شکل ۱ مشاهده کرد. دستورالعمل‌ها به روشی بیش از حد ساده شده، در طول این فرآیندها، هنگامی که با یک شی اطلاعات جدید ارائه می‌شود، می‌توانیم تعدادی از ویژگی‌های مشابه عناصر قبلی شناخته شده (استخراج ویژگی) و ویژگی‌هایی را که متمایز از عناصر جدید هستند استخراج کنیم (قاعده- استدلال مبتنی بر آن) و سپس آن را نامگذاری یا برچسب‌گذاری کنید که به سرعت قابل تشخیص باشد (طبقه بندی). هنگام استفاده از یک سیستم پیچیده‌تر، انتظار می‌رود که رایانه بتواند حجم عظیمی از اطلاعات را به سرعت پردازش کند و به راه حل‌هایی برای مسائل پیچیده دست یابد یا از الگوهایی پیروی کند تا نتایج منطقی با میزان خطای کمتری تولید کند.

مراحل توسعه یک مدل (ML در شکل ۲ الف نشان داده شده است) از سه جنبه اصلی تشکیل شده است:(I) یک چارچوب داده با ساختار و مفهوم خوب، زیرا کیفیت داده‌های ورودی بر کیفیت خروجی منعکس می‌شود. (II): جداسازی چارچوب داده به داده‌های آموزشی و آزمایشی، که در آن توصیه می‌شود یک مرحله اعتبارسنجی متقاطع، به عنوان روش نمونه‌گیری مجدد، با هدف حذف نتایج ناشی از تصادف، اضافه شود. (III) مدل نهایی بهترین معیار عملکرد را ارائه می‌دهد، با در نظر گرفتن چندین جنبه مانند اینکه آیا به سؤال علمی پاسخ می‌دهد، آیا می‌توان آن را به جامعه تعمیم داد و آیا می‌توان نتایج را تکرار کرد.

علاوه بر اطلاعات ارائه شده در مقدمه، مزایای استفاده از الگوریتم‌های هوش مصنوعی در زوال عقل به ظرفیت مدیریت کارآمدتر داده‌ها و توانایی خودکارسازی، به ویژه در توسعه ابزارهایی که می‌تواند به تصمیم گیری در کلینیک‌های زوال عقل کمک کند، متکی است. آنها



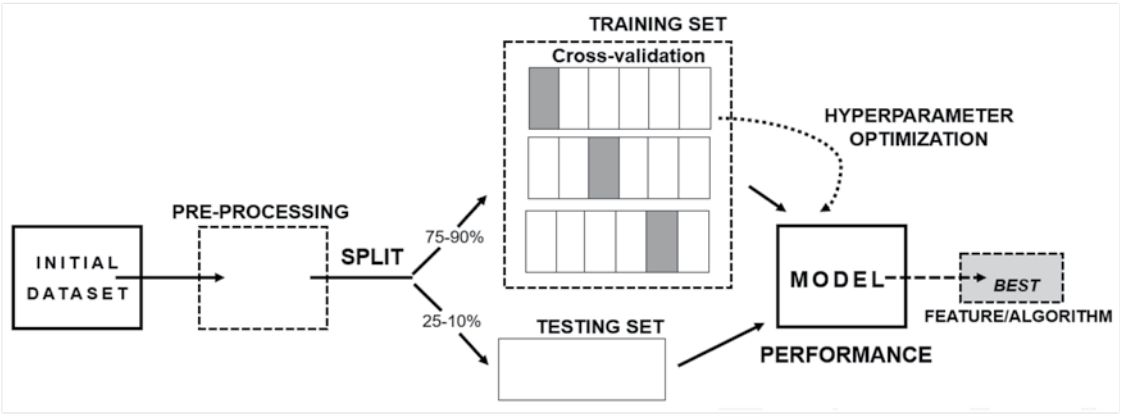
کل ۱. جدول زمانی پیشرفت‌های هوش مصنوعی به عنوان تکامل الگوریتم‌های نوآورانه.

همچنین دارای معایبی هستند که عمدتاً به خطاهای سهوی و گنجاندن سوگیری‌ها مربوط می‌شود. مقابله با این محدودیت‌ها به روش‌های پیش پردازش صدا بستگی دارد، جایی که عادی سازی داده‌ها و مدیریت مقادیر از دست رفته بسیار مهم است. از آنجایی که این الگوریتم‌ها همیشه مبتنی بر اصول ریاضی و آماری هستند، از مفاهیم منطق، تبعیض و نظریه‌های احتمال پیروی می‌کنند.

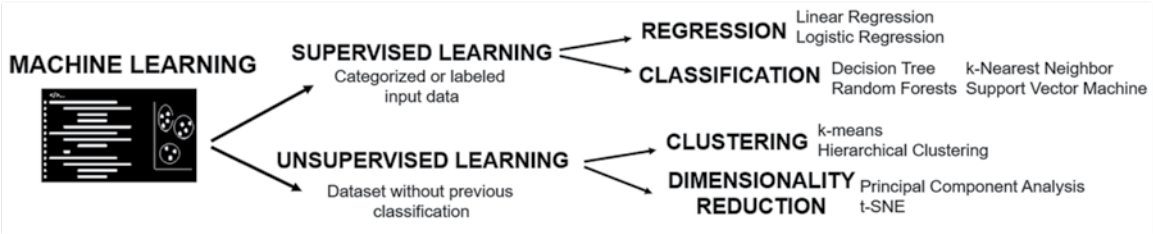
یکی از جنبه‌هایی که نیاز به احتیاط دارد، امکان پردازش بیش از حد است، یک اصطلاح آماری که در آن مدل از نویز به عنوان مؤلفه‌ای استفاده می‌کند که تأثیر منفی بر نتیجه دارد، زیرا می‌تواند سهم ویژگی‌هایی را اضافه کند که بخشی از توزیع اساسی نیستند. این مورد زمانی است که ویژگی‌ها یا متغیرهای بیش از حد در نمایش و موضوعات ناکافی وجود دارد. در مواردی که متغیرهای ناکافی به عنوان ورودی ارائه شده اند، به عنوان همتا، امکان عدم تناسب وجود دارد.

یکی از محدودیت‌های کلیدی هوش مصنوعی به کیفیت داده‌های «تغذیه‌شده» به رایانه اشاره دارد. مانند هر فرآیند علمی، دستکاری اطلاعات مورد آنالیز، در جایی که ویژگی‌ها برای رسیدن به یک هدف خاص مناسب است، می‌تواند به استنتاج در مورد فرآیند پاتولوژیک زیربنایی آسیب برساند. از این رو، تولید سوگیری‌ها عموماً توسط دانشمند/تحلیل‌گر داده‌ها معرفی می‌شود که منجر به خروجی به خطر افتاده به دلیل فرضیه‌های اشتباه می‌شود. توصیه پیش پردازش برای «پاک کردن» داده‌ها و حذف برخی موارد دور از دسترس، که با سوگیری حذف می‌شود، می‌تواند نتیجه گیری نهایی را مختل کند. علاوه بر این، با هدف ارزیابی تعمیم پذیری: ناهمگنی بیش از حد ارائه شده بر روی نمونه می‌تواند به نتایج آسیب برساند، همین امر در مورد همتای آن (همگنی) صدق می‌کند. مهم است که سؤال تحقیق و تفسیرپذیری نتایج را در در ذهن داشته باشیم و از درجه بالایی از پیچیدگی آگاه باشیم.

الگوریتم‌های ML به دو شاخه تقسیم می‌شوند (شکل ۲ ب): یادگیری با نظارت، که در آن لازم است دسته یا



(a)



(b)

شکل ۲. اساس یادگیری ماشین:
a) طرح مراحل توسعه یک مدل پیش‌بینی یادگیری ماشین.
b) انواع الگوریتم یادگیری ماشین

کلاس گروه‌های مورد علاقه ارائه شود، و یادگیری بدون نظارت، که در آن نیازی به ارائه متغیر برچسب‌دار کلاس نیست. هر دو در بخش‌های بعدی ارائه خواهند شد و جزئیات بیشتری ارائه خواهند شد.

۲.۱. آموزش تحت نظارت

اولین مقاله علمی با استفاده از الگوریتم‌های ML به کار رفته در AD از Mundt و همکارانش در سال ۲۰۰۰ بود. هدف ایجاد و ارزیابی یک ابزار غربالگری روان‌سنجی بود که در آن مقیاس و معیارهای عملکرد به تمایز بین افراد کنترل و بیماران احتمالی آلزایمر کمک می‌کرد. نویسندگان چندین مورد را در مورد نظرسنجی‌های انجام‌شده با مراقبین و نمرات عصب روان‌شناختی از بیماران جمع‌آوری و تجزیه و تحلیل کردند. آنها یک درخت تصمیم را برای تمایز بیماران بدون زوال عقل و مبتلایان به AD احتمالی اعمال کردند. الگوریتم مورد استفاده در این کار، و درخت‌های تصمیم، از پارتیشن‌های بازگشتی داده‌ها به زیر مجموعه‌های همگن و فزاینده تشکیل شده‌اند. هر پارتیشن یک گره ایجاد می‌کند، که یک متغیر واحد را نشان می‌دهد (یک نقطه تصمیم) که به حداکثر رساندن جدایی بین دو گروه کمک می‌کند. اگرچه این برنامه می‌تواند به طبقه‌بندی ترجمه شود، اما هدف آن ارزیابی تداعی‌ها بود، بنابراین فرآیند آماری پشت آن بر اساس رگرسیون بود. از آنجایی که درخت‌های تصمیم مستعد تغییرات کوچک در داده‌ها هستند، ساختار درخت و در نتیجه نتایج را تغییر می‌دهند، الگوریتم‌های دیگری برای خروجی‌های قابل اعتمادتر و قوی‌تر مورد استفاده قرار گرفتند.

در سال ۲۰۰۸، تراموتو مقاله‌ای را بر اساس استفاده از یک الگوریتم نیمه نظارت شده با Random forest و روشی برای انتشار برچسب منتشر کرد که به این نتیجه رسید که برای داشتن نتایج عملکرد بالا در پیش‌بینی بیمار AD در مراحل اولیه با استفاده از یک آموزش کوچک مفید است.

Random forest (RF) یک روش یادگیری نظارت شده بر اساس درختان تصمیم گیری و درختان رگرسیون است. این روش از یک روش نمونه‌گیری مجدد برای ایجاد شبه تکرار استفاده می‌کند که به عنوان bootstrapping شناخته می‌شود. هر نمونه یک طبقه‌بندی درختی ایجاد می‌کند که یک متغیر را در هر گره انتخاب می‌کند، و سپس بهترین تقسیم را با توجه به یک نتیجه متوسط انتخاب می‌کند. این یک طبقه‌بندی کننده در نظر گرفته می‌شود زیرا متریک فاصله ویژه کار را می‌سازد.

در اواخر دهه ۲۰۰۰، نوع دیگری از الگوریتم ML، ماشین بردار پشتیبان، در حوزه‌های تصویربرداری عصبی و ژنتیک شروع به کار کرد. مطالعات کاپریوتی و همکارانش در سال ۲۰۰۶، از این الگوریتم برای پیش بینی بیماری‌های عصبی انسان به دلیل یک جهش نقطه‌ای در شروع یک توالی پروتئین استفاده کردند. و لی و همکارانش در سال ۲۰۰۷ از آن به طور خاص برای پردازش تصاویر تشدید مغناطیسی بیماران مبتلا به AD با هدف تعیین تغییرات ظریف در هیپوکامپ استفاده

کردند که می‌تواند آنها را از گروه کنترل متمایز کند.
ماشین بردار پشتیبانی (SVM) یکی دیگر از الگوریتم‌های یادگیری نظارت شده است که طبقه‌بندی را ارائه می‌دهد. این مبتنی بر ترکیبی از مفاهیم هندسی و احتمالاتی است که در آن هدف ایجاد جدایی از دو بخش کاملاً تعریف شده از نقاط است و به دلیل پیچیدگی ذاتی توزیع مجموعه داده، یک ابر صفحه (یک ریاضی) ایجاد می‌کند. برون یابی برای ایجاد مرزها در ابعاد بالاتر. در الگوریتم، انتخاب از بهترین ابر صفحه مناسب، با حداکثر فاصله محاسبه می‌شود، و سپس به جدایی از خوشه‌ها در ابعاد حداقل تبدیل می‌شود. یکی از ویژگی‌ها این است که با اجازه دادن برخی طبقه بندی‌های نادرست، که به عنوان حاشیه نرم شناخته می‌شود، از جدایی ناپاک جلوگیری می‌کند.

۲.۲ آموزش بدون نظارت

در اوایل دهه ۲۰۰۰، الگوریتم‌های یادگیری بدون نظارت نیز در تصویربرداری عصبی و ژنتیک به طور خاص برای AD به کار گرفته شد. مطالعات رویال و همکاران، و ژانگ و همکاران که در سال ۲۰۰۲ منتشر شد، تحلیل خوشه‌ای سلسله مراتبی را به کار برد. اولی، به دنبال تعیین سهم مناطق قشری مورد علاقه در توزیع فضایی تائوپاتی در مواد کالبد شکافی و انجام کاهش ابعاد به سادگی به عنوان یک روش آماری بود. دومی، از آنالیز خوشه‌ای سلسله مراتبی برای تعیین الگوهای بیان ژن در جستجوی ژن‌های مرتبط برای توسعه هیپوکامپ انسان با آن‌هایی که مربوط به AD هستند، استفاده کرد.
همانطور که در بالا ذکر شد، خوشه بندی سلسله مراتبی یک روش آماری است که به عنوان یک الگوریتم پیاده سازی شده است. این شامل شناسایی گروه‌های متمایز (خوشه ها) با ویژگی‌های مشابه است که توسط ویژگی‌های خاص تعیین می‌شود. از اندازه‌گیری تقریب فضایی بین نقاط یک صفحه استفاده می‌کند. علاوه بر این، فواصل بین هر تشکیل خوشه ممکن را با ایجاد یک گره، به شکل درخت، به دنبال حداکثر احتمال ترتیب می‌دهد و دندروگرام این اندازه را تولید می‌کند. در پایان اگر بین خوشه‌ها تفکیک خوبی وجود داشته باشد، به عنوان طبقات یا دسته‌های موضوعی شناسایی می‌شوند.
علاوه بر خوشه بندی، بخش دیگری از روش‌های یادگیری بدون نظارت شامل روش‌هایی است که برای انجام کاهش ابعاد توسعه یافته‌اند. گوتفریس و همکارانش در سال ۲۰۰۱ مطالعه‌ای را منتشر کردند که در آن اطلاعات چندوجهی جمع‌آوری شده از بیماران مسن را که از اختلالات شناختی شکایت داشتند، تجزیه و تحلیل کردند. از ۱۹ متغیری که آنها ایجاد کردند، دو مولفه اصلی دو مسیر اختلال شناختی یکی مربوط به متابولیسم یک کربن و دیگری مربوط به زوال عقل را نشان داد. آنها تاکید کردند که نتایج به‌کارگیری تحلیل مؤلفه‌های اصلی باید برای ایجاد یک فرضیه بیولوژیکی مورد استفاده قرار گیرد و آنها را به‌عنوان گمانه‌زنی‌هایی در مورد تعمیم‌پذیری آن، به‌عنوان ابزاری که نیاز به تشخیص بیشتر دارد، توضیح دادند.
از آنجایی که داده‌های مورد استفاده در علوم بهداشتی دارای پیچیدگی فزاینده‌ای هستند و تعداد ورودی‌های

متغیر زیادی دارند، تلاش زیادی برای پردازش همزمان آنها لازم است. تجزیه و تحلیل مؤلفه اصلی (PCA) به عنوان ابزاری برای کاهش تعداد ابعاد توسعه داده شد. این مؤلفه‌های کمتری را که شامل بیشتر تغییرات داده‌ها هستند، تعیین می‌کند، و نیازمند استخراج مولفه‌هایی است که بیش از ۹۰ درصد واریانس را نشان می‌دهد. می‌تواند به تعریف تفاوت‌ها و شباهت‌ها در نمونه کمک کند. از نظر ریاضی، می‌توان آن را به عنوان یک ماتریس کوواریانس متقارن، توسط مجموعه خاصی از بردارهای یک تبدیل خطی استفاده کرد. به طور کلی، مولفه متنوع تر به عنوان مهم ترین عامل بیان شده است.

همه الگوریتم‌هایی که در بالا توضیح داده شد، یادگیری تحت نظارت و بدون نظارت، دارای محدودیت‌هایی هستند که امکان استقرار استراتژی‌ها و کدهای جدید را فراهم کرده‌اند. در رابطه با درختان و جنگل‌ها، Gradient Boosting (GB) به عنوان مثال، XGBoost با هدف به حداقل رساندن اشتباهات در هرس درختانی که بیشترین طبقه‌بندی را اشتباه انجام می‌دهند و امکان تعمیم بهبود یافته را فراهم می‌کند. یادگیری بدون نظارت با توجه به انعطاف پذیری آن، به ویژه به دلیل پیشرفت در شبکه‌های عصبی، تا حد زیادی تکامل یافته است.

یکی از نقاط عطف تکنولوژی در دهه‌های اخیر به ایجاد ابر رایانه‌ها اشاره دارد. با توجه به بهبود ظرفیت پردازش، زمان کمتری برای رایانه برای انجام تعداد فزاینده‌ای از عملیات مورد نیاز است و ما اکنون این قدرت را داریم که مقادیر عظیمی از اطلاعات را سریعتر آنالیز کنیم. این پنجره را برای ظهور یادگیری عمیق باز کرده است که به عنوان شبکه‌های عصبی مصنوعی نیز شناخته می‌شود.

۲.۳ یادگیری عمیق

یادگیری عمیق در زمینه پردازش تصویر و زبان، ژنومیک و کشف دارو ضروری است. شبکه‌های عصبی مبتنی بر مجموعه خاصی از قوانین تصمیم‌گیری هستند، برای مثال در تصویربرداری، این قوانین به تشخیص و تمایز بین یک شی و پس زمینه آن کمک می‌کنند. این مدل به عنوان یک معماری چند لایه، بر اساس یک سری مراحل یا ماژول تنظیم شده است. در هر لایه، مجموع وزنی ورودی‌های لایه قبلی منجر به یک تابع غیرخطی می‌شود که به لایه بعدی منتقل می‌شود، که به آن پس انتشار می‌گویند، و به طور کلی یک ترکیب سلسله مراتبی از ویژگی‌های مشابه را مونتاژ می‌کند لایه‌ها به دلیل استفاده از چندین روش نمونه‌گیری فرعی، امکان تقویت جنبه‌هایی را که به عنوان مهم در داده‌ها ایجاد می‌شوند، و تجزیه و تحلیل جزئیات آنها در هر سطح را فراهم می‌کند. برای انجام بهینه، مهم است که حجم زیادی از اطلاعات را به عنوان ورودی در برگیرد، از این‌رو مفهوم کلان داده عمیقاً با اجرای یادگیری عمیق مرتبط است.

پس از پوشش تمام جنبه‌های کلیدی - در یک چشم‌انداز ساده - از الگوریتم‌های ML اعمال شده در AD، ما می‌خواهیم موضوعی را که در مقدمه توضیح داده شده است مرور کنیم: پایگاه‌های داده. تقویت اطلاعات جمع‌آوری‌شده و تجزیه‌وتحلیل‌شده در کلینیک‌های منفرد برای ایجاد فرصت هم‌گرایی با مطالعات چند مرکزی، که به طور قابل‌توجهی در تعداد افراد افزایش یافته و تنوع ایجاد کرده است، بنابراین به ما اجازه می‌دهد تا فرضیه‌هایی را در مورد جنبه‌های زمینه‌ای بیماری کشف کنیم.

انجمن‌های چند مرکزی با هدف اعتبارسنجی ابزارهای تشخیصی (مانند تست‌های عصبی روان‌شناختی و نشانگرهای زیستی) سرچشمه می‌گیرند و پیوسته به دنبال درمان‌های مؤثر نوآورانه هستند. در اوایل دهه ۱۹۹۰، مطالعه تعاونی بیماری آلزایمر (ADCS) به عنوان کنسرسیومی از امکانات تحقیقاتی در سراسر ایالات متحده آمریکا و کانادا ایجاد شد که داروهای جدید را برای AD تقویت می‌کرد. همچنین در اروپا، تلاش‌ها برای ایجاد مطالعات مشترک با ایجاد اتحادیه اروپا انجام شد و برنامه‌هایی مانند برنامه مشترک اتحادیه اروپا - تحقیقات بیماری‌های عصبی (JPND) و کنسرسیوم اروپایی بیماری آلزایمر (EADC) ایجاد شد.

اذعان به مزایای یک رویکرد چند مرکزی منجر به پایه گذاری و رشد پایگاه داده ابتکار تصویربرداری عصبی بیماری آلزایمر (ADNI) شد. در سال ۲۰۰۴ در آمریکای شمالی با هدف اعتبارسنجی نشانگرهای زیستی و طراحی کارآزمایی‌های درمانی در سال ۲۰۱۹ آغاز شد. این گروه شامل افراد مبتلا به AD، MCI فراموش شده و سالمندان از نظر شناختی عادی است. هزاران بیمار را ثبت نام کرده است و اطلاعات مربوط به بالینی، ژنتیک، سیالات زیستی، تصویربرداری عصبی و عصب روانشناختی را که در دوره‌های حداکثر ۴۸ ماه به روز می‌شوند، مطابقت می‌دهد. تاکنون، بزرگترین پایگاه داده طولی عمومی برای بیماران مبتلا به AD با دسترسی آسان و سریع به اطلاعات باقی مانده است.

ADNI به دلیل سیاست‌های دسترسی عمومی، یکی از عوامل اصلی پیشرفت در کاربرد ML است. نزدیک به ۲۰۰۰ نشریه و نزدیک به ۳۰۰ مقاله علمی مرتبط با هوش مصنوعی اجازه داده است. اعتقاد بر این است که برای بهبود بیشتر این زمینه، شروع به اشتراک گذاری مدل‌های معتبر و اعمال آنها در داده‌های تک مرکزی (حفاظت از محرمانه بودن موضوع) در مقیاس جهانی ضروری است. علاوه بر این، هماهنگی داده‌های جمع‌آوری‌شده در کلینیک‌های زوال عقل و پروتکل‌های ایجاد شده در پردازش آن باید مورد اتفاق نظر باشد.

۳. کاربردهای اصلی هوش مصنوعی در تحقیقات AD

پتانسیل‌های بکارگیری هوش مصنوعی بسیار زیاد است، اما به دلیل در دسترس بودن داده‌ها (یعنی حجم نمونه و جمع‌آوری داده‌ها) و موانع در زمینه‌های ریاضی و فیزیک هنگام بررسی مدل‌سازی سیستم‌های پیچیده بیولوژیکی، که در آن برخی از عناصر نمی‌توانند توضیح داده شوند و در نتیجه گریزان باقی می‌مانند، محدود است.

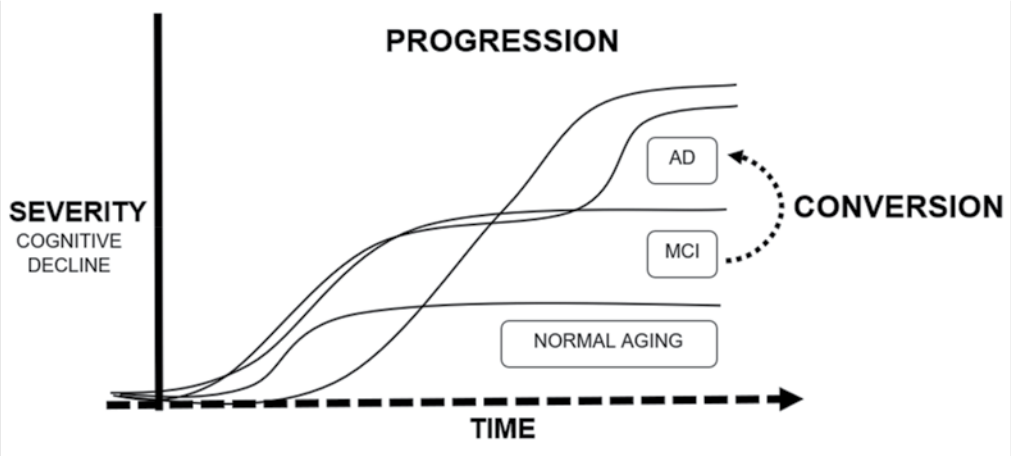
در ۲۰ سال گذشته، حوزه AD امکان استفاده از فناوری‌های جدید را در حوزه‌های مختلف فراهم کرده است. با دسترسی به داده‌های بزرگ، زمینه‌های تصویربرداری عصبی و ژنتیک بیشتر مستعد کار با الگوریتم‌ها هستند. علاوه بر این، با ایجاد بانک‌های زیستی و سلامت از راه دور، حوزه بیومارکرهای مایع مطالعات خود را به رویکرد چندوجهی‌تر گسترش داد و مقادیر زیادی از اطلاعات بالینی و عصب‌روان‌شناختی را برای توسعه مدل‌ها ادغام کرد. با پرداختن به موضوع کاربردهای ML در AD با جزئیات بیشتر، این بخش فرعی را به پنج موضوع مرتبط و فراوان در نشریات علمی اختصاص خواهیم داد: کشف دارو، تصویربرداری عصبی، نشانگرهای زیستی، تبدیل، و پیشرفت (نمونه آن در شکل ۳)

۳.۱ تصویربرداری عصبی

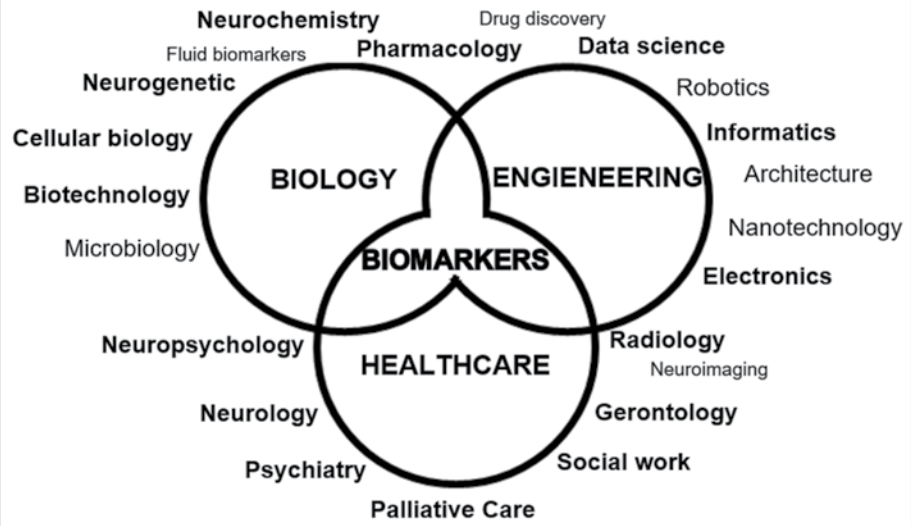
همانطور که قبلا ذکر شد، یکی از پیشرفت‌های عمده‌ای که با ML و الگوریتم‌های یادگیری عمیق انجام شد، در پردازش تصویر بود. از زمان کشف اشعه ایکس در قرن نوزدهم و توسعه توموگرافی کامپیوتری (CT)، تصویربرداری/رادیولوژی پزشکی رشته‌ای در هم تنیده با پیشرفت‌های فنی و علمی بوده است. هفتاد و شش سال بعد اختراع تصویربرداری تشدید مغناطیسی (MRI) و چند سال بعد، توموگرافی گسیل پوزیترون (PET) به وجود آمد. همه این تکنیک‌ها به محققان این امکان را می‌دهد که فیزیولوژی یک فرد را تجسم و اندازه‌گیری کنند و از زمان کشف آنها، پیشرفت‌های نوآورانه‌ای برای بهبود دقت این تصاویر وجود داشته است.

تصویربرداری عصبی یک ابزار حیاتی در توصیف AD است. تصاویر MRI امکان ارزیابی وضعیت ساختاری مغز را فراهم می‌کند و معمولاً برای ایجاد آسیب عصبی یا آتروفی استفاده می‌شود. علاوه بر این، MRI عملکردی را می‌توان برای تشخیص فعالیت مغز از طریق تغییرات در جریان خون انجام داد. اسکن‌های PET تهاجمی‌تر، گران‌تر هستند و به تجویز ردیاب‌های رادیواکتیو خاصی

نیـــاز دارند که امـــکان اندازه‌گیری تغییـــرات خاص در فرآیندهای متابولیک و فیزیولوژیکی را فراهم می‌کنند. تام و همکاران یک امضای چندوجهی از زوال عقل آلزایمر را از اســـکن‌های MRI بـــا وزن T1 از بیمـــاران با حالت شناختی طبیعی MCI ،(CN) و AD از پایگاه داده ADNI ایجاد کرد. آنها آنالیز مورفومتری مبتنی بر وکســـل را با تقسیم‌بندی به نقشـــه‌های احتمالی، نرمال‌سازی به یک الگوی ماده خاکستری از پیش تعریف‌شده و هموارسازی توســـط یک هسته تاری گاوســـی اعمال کردند. آنها این نتایج را بـــا اطلاعات جمعیت شـــناختی، بالینی، عصب روانشناختی و مایع مغزی نخاعی (CSF) ادغام کردند و یک مدل پیش بینی SVM با دقت ۰.۹۴۹ ایجاد کردند که بیـــن CN و AD تمایز قائل شـــد. آنها به این نتیجه رسیدند که در بیماران MCI، ویژگی‌های شناختی دارای امتیاز پیش‌بینی بالاتری نسبت به ویژگی‌های ساختاری هستند و بین شناخت و آتروفی چند افزونگی وجود دارد. عـــلاوه بر این، نگوین و همـــکاران از پایگاه داده ADNI برای اســـتخراج اطلاعات از بیمـــاران CN، MCI و AD اســـتفاده کـــرد و برای مقایســـه گروهی از بیمارســـتان دانشگاه Chosun استفاده کرد. در این مورد، آنها معیارها



(a)



(b)

شکل ۳. کاربردهای اصلی یادگیری ماشین در بیماری آلزایمر(الف) تعریف پیشرفت و تبدیل به عنوان معیارهای زمان تا رویداد به دلیل زوال شناختی (ب) زمینه‌های مطالعه بیماری آلزایمر، همگرا در توسعه نشانگرهای زیستی.

را از MRI عملکردی در حالت اســتراحت (rs-Fmri) به دست آوردند. آنها چندین مرحله از پیش پردازش را برای تضمیــن تصویربرداری با کیفیت خوب (کالیبراســیون، تنظیم مجدد، عادی ســازی، صاف کردن، و غیره) انجام دادند. تصاویر ساختاری (T1-weighted) پس از تنظیم مجدد به تصاویر عملکردی مشترک ثبت شدند. آنها یک مدل SVM را پس از تأیید اعتبار متقاطع و کاهش ابعاد با دقت ۰.۹۸۸ ایجاد کردند. در نهایت، آنها مناطق مورد نظر(ROI) را با تغییرات قابل‌توجهی اســتخراج کردند، که توســط آزمون t تک متغیره تعیین شــد و الگویی از تمایز را در قشر جلوی مغز و قشر سینگولات/پرکونوئوس نشــان داد. علاوه بر این، آنها با توجه به مجموعه داده‌ها، ویژگی‌های منطقه‌ای مهم متفاوتی را به دست آوردند که به تفاوت‌های جمعیتی اشاره دارد.

بــا توجه به مطالعات با PET، ســه نــوع روش PET با توجه به هدف ردیاب‌های رادیویی انجام می‌شــود:PET متابولیــک، که معمولاً بــا فلودئوکســی‌گلوکز (FDG) انجام می‌شــود جزئیــات فعالیت متابولیــک در مغز را به عنــوان معیاری برای اتصال انجــام می‌دهد. به دلیل دریافت سریع گلوکز، هر گونه اثر پاتولوژیک مانند مرگ نورون یا تشــکیل پــلاک، می‌تواند ســیگنال را کاهش دهــد. آمیلوئید PET، که معمولا با ترکیب پیتســبورگ B (PiB) و فلوربتاپیر انجام می‌شــود، تمایل به رسوبات آمیلوئیــد را نشــان می‌دهد و برای مطالعــات آلزایمر و آنژیوپاتی آمیلوئید مغزی (CAA) استفاده می‌شود علاوه بر این، تاو PET با Flortaucipir، امکان برآورد توده‌های درهم‌تنه‌های نوروفیبریلاری کــه عمدتاً از پروتئین تائو فسفریله شده تشکیل شده‌اند را فراهم می‌کند. مطالعات PET نیز موضوع رویکردهای ML بوده اســت، همانطور که در مثال‌های زیر توضیح داده شده است:

دینگ و همکاران یک مدل یادگیری عمیق با استفاده از FDG-PET برای پیش‌بینــی اولیه AD ایجاد کرد. آنها از داده‌های طولی پایگاه داده ADNI اســتفاده کردند و همچنیــن مدل را روی یک گــروه کوچک (۴۰ نفر) از بیمــاران مراجعه کننده به کلینیک‌های حافظه کالیفرنیا آزمایش کردند. مشــابه مطالعات روی MRI آنها چندین مرحله پیــش پردازش را دنبال کردند. آنها یک شــبکه عصبی کانولوشــنال را بر اســاس ۱۴ میلیون تصویر از ۱۰۰۰ کلاس از مجموعــه داده ADNI ایجاد کردند. این مدل منجر به AUC برای پیش‌بینیMCI ،AD، و non-AD/MCI به ترتیب ۰.۹۲، ۰.۶۳ و ۰.۷۳ شد.

عزتــی و همکارانش یک مدل پیش بینــی کننده ML برای خطر Aβ+ ایجــاد کردند. آنها اطلاعات چندوجهی (نمرات عصب روانشناختی، اسکن MRI و PET، وضعیت ApoE۴، نشــانگرهای زیستی CSF، و اطلاعات جمعیت شــناختی) را از بیمــاران MCI amnestic پایــگاه داده ADNI اســتخراج کردند. آنها با توجه به نتیجه پردازش تصاویــر Florbetapir PET، بیماران را به عنوان Aβ+ و Aβ- برچســب زدند. الگوریتم مورد استفاده Ensemble Linear Discriminant بــود، یــک روش طبقه‌بندی که منجر به دقت بالاتری از یک قانون تصمیم‌گیری گروهی می‌شــود که از هــر طبقه‌بندی‌کننده منفرد به دســت می‌آید و با انتخاب بهترین فراپارامتر بهینه‌ســازی شــد. پــس از ارزیابی چندین ترکیب ویژگــی به عنوان مدل، بهترین آنها حاوی نشــانگرهای دموگرافیک، ApoE4 و CSF با AUC 0.86 بود.

در یک مطالعه‌ی دیگر یک شبکه عصبی کانولوشنال سه بعدی را با اســتفاده از اسکن‌های PET Flortaucipir از بیماران MCI ،CN و AD پایگاه داده ADNI ایجاد کرد. علاوه بر ایــن، آنها از یک الگوریتم انتشــار ربط لایه‌ای برای تعیین سهم یک پیکسل (ورودی) در پیش‌بینی کار طبقه‌بندی (خروجی)، که معیار دقیق‌تری از دقت است، استفاده کردند. بر اساس مدل، آنها امتیازات احتمال AD بیماران MCI را محاسبه کردند که به زودرس (EMCI) و دیررس (LMCI) تقســیم شــدند. امتیاز احتمال AD بیشتر با افزایش تجمع تائو در لوب تمپورال داخلی همراه بود. آنها به این نتیجه رسیدند که طبقه‌بندی‌کننده رسوب تاو در LMCI را بیشتر به AD نسبت به شرکت‌کنندگان EMCI مرتبط می‌کند.

همانطور که در این مطالعات توضیح داده شد، استفاده از داده‌های تصویربرداری چندوجهی، که در آن نویسندگان قادر به استخراج اطلاعات در مورد ناهنجاری‌های ساختاری و عملکردی بودند، قابلیت تبعیض را افزایش داد، عمدتاً زمانی که یک ارائه همپوشــانی وجود داشت. یکی از این موارد با مشــخصات زوال عقل عروقی «مخلوط»-(VD) AD، که در آن اختلال شــناختی پیشــرونده ناشــی از آسیب بافت مغز ناشی از بیماری عروقی است که می‌تواند به اشتباه به عنوان مرتبط با AD تعبیر شود، مثال زد. در

نتیجه، اســـتفاده از تصویربرداری تانسور انتشار (DTI) از مطالعات MRI می‌تواند به روشـــن شدن الگوهای متمایز تغییرات ماده ســـفید که تمایز بین VD و AD را تعیین می‌کند، کمک کند.

۳.۲. مطالعات مبتنی بر نشـــانگرهای زیستی چندوجهی

چارچوب تشخیص و تحقیقات AD به طور چشمگیری از طریق توسعه و استفاده از نشانگرهای زیستی تغییر کرده است. بیومارکرهای اصلی AD عبارتند از: (۱) مایع مغزی نخاعی ســـطوح پایین Aβ42 یا نسب Aβ42/40 و رسوب آمیلوئید مغز که توسط تصویربرداری PET مشهود است (۲) تاو کل (t-Tau) و تاو فسفریله (p-Tau) افزایش یافته است که به ترتیب نشان‌دهنده از دست دادن نورون‌های قشر مغز و تشکیل گره‌های قشر مغز است. و (۳) آتروفی هیپوکامپ نشان داده شده در MRI. این نشانگرها دقت تشـــخیصی بالایی را برای AD تثبیت شده نشان دادند و AD را قبل از شروع زوال عقل در مرحله MCI شناسایی کردنـــد، که در تـــک مرکز و مطالعات چنـــد مرکزی در مقیاس بزرگ مشاهده شد. حساسیت و ویژگی بالای آنها - بین ۸۵ تا ۹۵٪ در صورت ترکیب - منجر به گنجاندن آنها در معیارهای تشـــخیصی شد که توسط موسسه ملی انجمن پیری-آلزایمر برای زوال عقل AD، MCI و پیش بالینی پیشنهاد شده است.

با ایـــن حال، بـــا توجه بـــه محدودیت‌هـــای مربوط به تصویربرداری عصبی و جمـــع‌آوری نمونه‌های CSF (به ترتیب، هزینه و تهاجمی)، تلاش‌هایی برای توسعه ابزارها و روش‌های حساس‌تر انجام شـــد تا بتوان پروتئین‌های مشتق از مغز را از طریق سنجش ایمنی در خون کمیت کرد. امروزه، اندازه‌گیری‌های خونی نشـــانگرهای زیستی هســـته AD مؤثر بـــوده و نتایج امیدوارکننـــده‌ای را در چندین مطالعه نشان داده است.

اگرچه مطالعات نشـــانگر زیستی منفرد معمولاً به عنوان شـــاخص‌های مطالعات بیماری به خوبی عمل می‌کنند، با اســـتفاده از مدل‌های ML، که تا حـــد امکان متغیرها را جمع‌آوری می‌کند و امکان توســـعه مطالعات نشـــانگر زیســـتی چندوجهی را فراهم می‌کند، تا ســـعی شـــود الگوهایی را تشـــخیص دهد که به دلیل پیچیدگی کلی آن می‌توان نادیده گرفت. نمونـــه‌ای از چنین رویکردی در مطالعه بلتران که بر نشـــانگرهای زیستی خون تمرکز داشـــتند مشاهده شـــد. آنها یک مدل پیش بینی کننده از پیشـــرفت آلزایمر را بر اســـاس ترکیبی از نشانگرهای زیســـتی پلاسما، به دلیل انواع مســـیرهای بالقوه درگیر، توســـعه دادند. این مدل بر اساس پایگاه داده ADNI بود و آنها بهترین مدل را از بین چندین الگوریتم ML پیاده سازی شـــده (طبقه بندی و درخت رگرسیون، RF، GB و SVM) انتخـــاب کردند. علاوه بر این، یک PCA و یک تجزیه و تحلیل کاهش ویژگی انجام شد. نویسندگان دو دســـته از نتایج باینری (پایدار و پیشرونده) را با در نظر گرفتن فاصله زمانی انتقال از MCI به AD ایجاد کردند. بیومارکرهای پلاسما بر این اساس به گروه‌هایی به عنوان نشـــانگرهای قلبی، التهابی، متابولیک و عصبی تقســـیم شدند. در نهایت، RF و GB بالاترین AUC را به نمایش گذاشـــتندبه طور کلی، آنها کاربـــرد بالقوه بیومارکرهای خون را به عنوان اولین تماس برای تعیین خطر و انتقال به آزمایش‌های اضافی بـــرای تأیید (مانند نمونه برداری MRI، PET یا CSF) برجسته کردند.

قابلیـــت بالقوه کاربـــرد بیومارکرهای خون، تشـــخیص افتراقـــی بین زوال عقل عصبی اســـت. لیـــن یک مدل تجزیه و تحلیل متمایز خطـــی با طبقه‌بندی کننده RF بر اساس بیومارکرهای پلاســـما (Aβ42، Aβ40، t-Tau، p-Tau181 و α-synuclein) از افراد سالم، بیماران مبتلا بـــه طیف AD، طیف بیماری پارکینســـون (PD) و زوال عقل فرونتوتمپورال (FTD) ایجـــاد کرد. این مدل هنگام طبقه‌بندی اختلالات نورودژنراتیو دقت ۰.۷۶ را نشان داد و قادر بود شـــدت بیمـــاری را در طیف‌های AD و PD با دقت ۰.۸۳ و ۰.۶۳ متمایز کند.

یکی دیگر از اجزای مهم مطالعات نشـــانگرهای زیستی، ارزیابی عصب روانشـــناختی اســـت .یکـــی از مؤلفه‌های کلیـــدی تولید کلاس‌ها برای مدل‌هـــای یادگیری تحت نظارت، بر اساس امتیاز به‌دســـت‌آمده توسط رتبه‌بندی دمانس بالینی (CDR) اســـت. این یک ابزار مرحله بندی بـــرای تعیین اینکه آیا یک فرد بـــه عنوان MCI یا AD تشخیص داده می‌شود بسیار مهم است و معمولاً با نمره آزمون وضعیت ذهنی کوچک (MMSE) تکمیل می‌شود کـــه وضعیت کلی شـــناختی را اندازه‌گیـــری می‌کند. به عنـــوان مثال، مطالعه یائو و همکارانش اســـتفاده از یک مـــدل (SVM و GB) ML را توصیف کـــرد که به ایجاد

یک نمره تاب آوری شـــناختی کمک کـــرد، که آنها آن را به عنوان تفاوت بین وضعیت شـــناختی مشاهده شده و مورد انتظار نمایش داده شـــده تعریف کردند. توســـط یک بیمار مبتلا به AD با ســـطح فرضی خاصی از آسیب شناسی AD. آنها از داده‌های دو مطالعه کوهورت طولی (مطالعه نظم‌های مذهبی و پروژه حافظه عجله و پیری) و اطلاعات حاصل از مجموعه‌ای از ۲۱ تست شناختی که سالانه انجام می‌شود، استفاده کردند. پنج حوزه شناختی (حافظه اپیزودیک، حافظه معنایی، حافظه کاری، سرعت ادراکی، و توانایی دیداری-فضایی) علاوه بر این، اطلاعات مربوط به بیماری‌های همراه، جمعیت شناســـی، ســـبک زندگی و ارزیابی آســـیب شناســـی عصبی پس از مرگ گنجانده شد. عملکرد پیش بینی با معیارهای جمع‌آوری شـــده در ابتدا به دقت رســـید. ۰.۷۷ و نشان می‌دهد که ایـــن مدل می‌تواند به عنوان ابزاری برای مداخله در افراد دارای ذخیره شناختی پایین طبقه‌بندی شود.

یکی دیگر از منابع امیدوارکننده نشـــانگرهای زیســـتی در AD، ارزیابی عصبی-چشـــمی است. شبکیه اغلب به عنوان پنجره‌ای به مغز شـــناخته می‌شـــود زیرا تغییرات مورفولوژیکـــی در مغز در طول فرآیند تخریب عصبی در شبکیه چشم تکرار می‌شـــود. در یک مطالعه توموگرافی انســـجام نوری برای ارزیابی ضخامـــت لایه‌های داخلی شـــبکیه با انجـــام تجزیه و تحلیل بافت در افراد ســـالم، بیماران مبتلا به AD و PD مورد استفاده قرار گرفت. آنها داده‌های جمع‌آوری شده را تجزیه و تحلیل شد و SVM را به عنوان مدل طبقه‌بندی با دقت ۰.۸۸ به کار رفت. این روش یک ابزار ساده، ارزان و غیر تهاجمی برای تشخیص زودهنگام اســـت که می‌تواند علاوه بر تکنیک‌های دیگر برای ارزیابی تخریب عصبی نیز اجرا شود.

۳.۳ تبدیل و پیشرفت

با توجه به کاربرد الگوریتم‌های ML در AD با اســـتفاده از داده‌هـــای طولی، بیشـــترین هدف توســـعه مدل‌های پیش‌بینـــی بـــود که ریســـک/زمان تبدیـــل از MCI به AD یا ســـیر بیماری از نظر شـــدت را تعیین می‌کنند. این مدل‌ها بر اســـاس زمان هســـتند که لایه دیگری از پیچیدگی را اضافـــه می‌کند. طراحـــی اندازه‌گیری‌های مکرر، به‌عنوان یک روش آماری، به خوبی تثبیت شـــده اســـت و به اعتبارســـنجی نتایج با حفظ تنوع کم کمک می‌کند، اما پیش‌بینـــی زمان تا رویداد در ML همچنان چالش‌برانگیزتر است.

مطالعـــات طولی که مبتنـــی بر داده‌ها هســـتند، دارای

محدودیت‌هـــای متعددی هســـتند، که نیـــاز به حفظ ثبـــات برای دوره‌هـــای زمانی طولانی معمولاً مســـتلزم سرمایه‌گذاری بیشتر در منابع و خطر بالاتر ترک تحصیل است. علاوه بر این، در میان طیف AD، پیشرفت بیماری، در اکثریت آن، تا چندین دهه بســـیار کند است. شروع پروژه‌ای که برای ارائه نتایج شـــگفت‌انگیز به دهه‌ها نیاز دارد و حفظ هزاران بیمار با ویزیت منظم، به عنوان یک تلاش بزرگ تلقی می‌شود.

با در نظر گرفتن این مسائل، رویکردهای فناورانه به سمت دیجیتالی شدن توسعه یافت. به عنوان مثال، جمع‌آوری داده‌ها می‌تواند از راه دور از طریق دســـتگاه‌های ردیابی مشاوره‌های پزشکی از راه دور یا مجموعه‌ای از حسگرها و ابزارهای نصب شـــده در خانه انجام شود. اگرچه ممکن اســـت اینها در ابتدا گران به نظر برســـند، انتظار می‌رود هزینه‌های غیرمســـتقیم که با گذشـــت زمان انباشـــته می‌شوند کاهش یابد.

بـــدون اجرای ایـــن فناوری‌هـــا، رویکرد دیگر توســـعه مدل‌هایی بوده اســـت که می‌تواند ترک تحصیل و حضور ناموفق را در قرار ملاقات‌های پزشـــکی برنامه‌ریزی‌شده پیش‌بینـــی کند و اســـتفاده از تکنیک‌های مختلف ثبت داده‌ها یا ایجاد شبیه‌ســـازی با هدف جایگزینی مقادیر از دست رفته و تا حدودی بهبود کیفیت داده‌ها است.

گراســـی گزارش کرده است که تنها کسری از ۲۰ تا ۴۰ درصد از بیماران MCI در عرض ۳ سال پس از تشخیص اولیه به AD پیشرفت می‌کنند. بنابراین، آنها از اطلاعات پایگاه داده ADNI از ۵۵۰ بیمار MCI طبقه‌بندی شـــده بـــه عنوان مبدل و غیر مبدل با حداقل ۳ ســـال پیگیری اســـتفاده کردند و ۱۳ الگوریتم ML نظارت شـــده را بر اســـاس یک مجموعه میانگین رتبه وزنی که همه آنها به AUC 0.88 می‌رسید، اعمال کردند، که در نهایت احتمال یک فرد با مجموعه‌ای از مقادیر مشـــخص مبدل بودن را در طول آن دوره ۳ ساله تعیین می‌کند. برای تعیین یک نقطـــه زمانی دقیق تبدیل، محققـــان از اطلاعات موجود در پایگاه داده ADNI در طی ۸ ســـال مطالعه اســـتفاده کردند و یک الگوریتم GB با تخمین‌گر Kaplan-Meier تولید کردند که خروجی زمان تا رویداد را با AUC ایجاد می‌کند. از ۰.۸۶. رویکرد دیگری نیز ارائه شـــده است که قرار بود تغییرات MRI بیماران MCI پایدار را که از پایگاه داده ADNI نیز از طریق بازه‌های زمانی طبقه‌بندی شده (۲ و ۵ ســـال) واکشی شـــده بود، مطالعه کند و امضای اقدامات حجمی برای مبدل‌ها را به‌دست آورد.

در مورد پیشرفت، مدلی را برای سیر علائم اولیه بر اساس داده‌های چندوجهی از ADNI و مطالعه شـــاخص پیری، تصویربرداری، نشـــانگر زیستی و ســـبک زندگی استرالیا (AIBL) ایجاد شد، جایی که آنها از خوشه‌بندی سلسله مراتبی برای به دســـت آوردن ۹ نقطه زمانی در ۶ ســـال استفاده کردند. برای آنالیز بیشتر، آنها پنج کلاس مسیر را ایجاد کردند: پایدار و نزول، بر اساس MMSE و پایدار، کاهش آهسته، و نزول سریع بر اساس امتیازات ADAS-Cog 13، از طریق یک شبکه عصبی سیامی طولی با دقت ۰.۹. در رویکردی مشـــابه، محققان ســـه زیر گروه مجزا از بیماران را به دســـت آوردند: کاهش‌دهنده‌های سریع، کاهش‌دهنده آهسته، و کاهش‌دهنده‌های آهسته به‌شدت آســـیب‌دیده از طریق استفاده از الگوریتم مختلط کلاس پنهان بر اســـاس مجموعه داده‌های ۱۸ مطالعه. الگوریتم یادگیری بدون نظارت تحت عنوان ماشـــین بولتزمن به صورت محدود و مشروط روشـــی برای بازیابی داده‌های از دســـت رفته ایجاد می‌کند و به عنوان ابزار پیش‌بینی برای شبیه‌ســـازی جزئیات مسیر بیماران براساس پایگاه داده آنلاین در بیماری‌های اصلی شایع (CAMD) برای CORD-AD می‌باشد.

با توجه به تنوع در تظاهرات بالینی و مســـیر پیشـــرفت نشان داده شـــده در بیماران مبتلا به AD، پیشنهاد شد که تشخیص AD احتمالی باید در زیرگروه‌ها طبقه‌بندی شـــود مثال‌هایی که در بالا توضیح داده شد سعی کردند این فرض را حل کنند و بـــا افزایش پیچیدگی از طریق استفاده از الگوریتم‌های یادگیری بدون نظارت پیچیده‌تر و ارزیابی شبیه‌سازی‌ها سروکار داشتند. انتظار می‌رود که این رویکرد مصنوعی در شرایط واقعی تکرار شود، اگرچه در این مرحله، آنها هنوز نیاز به اعتبار دارند.

۳.۴ کشف دارو

روش‌های سنتی کشف و توســـعه دارو پرهزینه، زمان‌بر و ریسک بالایی هستند. پیشـــرفت‌های هوش مصنوعی امکان توســـعه روش‌های مبتنی بر فناوری را فراهم کرد. این آنالیزهای ســـیلیکونی امکان ارزیابـــی طراحی دارو تغییر موقعیت و ترکیبات دارویی را فراهم کردند. علاوه بر این، به عنوان ابزار مورد استفاده در درمان‌های ژنتیکی

و هدفمند ایمنی کمک کرد.

بـــه عنوان نمونه‌ای از طراحی دارو، مطالعه‌ای در ســـال ۲۰۲۰ منتشر شـــد که در آن یک مدل Bayesian ML بر اســـاس داده‌های آشکارا در دســـترس CHEMBL و PubChem بـــرای پروتئین‌های مرتبـــط با AD، با هدف یافتن یک مولکـــول کوچک جدید که می‌تواند به عنوان درمان اجرا میشـــد. محققان گلیکوژن سنتاز کیناز ۳ بتا (GSK3β)، آنزیمی که پروتئین تاو را فســـفریله می‌کند، به عنـــوان هدف مورد علاقه انتخـــاب کردند. در نهایت، این مدل چندین مهارکننده مولکول کوچک را شناسایی کرد که قبلاً برای ایمنی تأیید شـــده بودند و از کتابخانه SuperDRUG2 اســـتخراج شده بودند. مدل GSK3β از آســـتانه ۷۳۲.۸ نانومولار اســـتفاده کرد و ۲۳۶۸ ترکیب را تجزیه و تحلیل کرد و پس از اعتبار ســـنجی متقاطع ۵ برابری به دقت ۰.۸۵۸ رســـید. پـــس از آن، آنها مدل پیش‌بینـــی GSK3β IC 50 را برای امتیاز دادن به پایگاه داده SuperDRUG2 بـــرای اندازه‌گیـــری اطمینـــان در فعالیـــت بازدارنده ترکیبات در برابر هـــدف و کاربرد آن ارزیابی کردند و در نهایت روبوکسیســـتاورین را انتخاب کردند (امتیاز پیش‌بینی = ۰.۷۶، کاربردپذیری = ۰.۸۲) ســـپس، آنها پنج مهارکننده برتر را که بهترین عملکرد را داشـــتند، در شرایط آزمایشـــگاهی آزمایش کردند، با روبوکسیستاورین که بالاترین مهار را نشان داد (۹۶٪ در ۱۰۰ میکرومولار).

در مورد استفاده مجدد از داروی سیلیکو یک مدل یادگیری عمیـــق مبتنی بر رمزگذار خـــودکار عمیق چندوجهی با هدف استنباط سیستماتیک ارتباط‌های دارویی-بیماری جدید ایجاد کرد. آنها داده‌های شـــبکه دارویی-بیماری تایید شـــده بالینی و تجربی را از DrugBank و repoDB جمع‌آوری کردند. ســـپس، آنها ویژگی‌های سطح بالا را در شـــبکه‌های متعدد ادغام کردند و یک نمایش ویژگی با ابعاد پایین ساختند. این مدل روابط دارویی-بیماری را که توسط پایگاه داده ClinicalTrials.gov تایید شده بود، پیش‌بینی کرد و ۲۰ کاندید برای AD را شناســـایی کرد. آناستاســـیو همبســـتگی فواید اپیدمیولوژیک ترکیبات دارویـــی را که از پایگاه داده مرکـــز بیماری آلزایمر راش (RADC) مشتق شده است، تخمین زد. مدل محاسباتی با وارد کردن فعال‌ســـازی ســـلولی گیرنده‌ها، مسیرهای ســـیگنال‌دهی ســـلولی و بیان پروتئیـــن، التهاب عصبی ناشـــی از میکروگلیا را تقلید کرد. این مدل یک الگوریتم یادگیری شـــبکه تکرارشـــونده از واحدهـــای غیرخطی محدود شـــده توســـط یک محدوده باینـــری بود که ۹۰ ورودی از لیگاندهای گیرنده درونزا و برونزا و داروها را دریافت می‌کرد. پارامترها وزن اتصالات بین عناصر بودند و بـــا نتایج آزمایش‌های *in vivo* و *in vitro* که در ادبیات توصیف شـــده‌اند بهینه شـــدند. او نتیجـــه گرفت که ده بهترین ترکیب دارویی شـــامل حداقل دو نوع از داروهای اصلی مورد استفاده برای درمان فشار خون بالا و استفاده از آســـپرین با داروهایی که قبلاً تثبیت شده است، تقریباً (در اثربخشی) به نتایج داروهای ضد فشار خون است.

۴. بحث

کاربردهای ML در AD بـــرای زمینه‌های تصویربرداری عصبـــی، بیومارکرها، تبدیل، پیشـــرفت و کشـــف دارو، از اجـــرای ابزارهای مکمل برای پیشـــگیری از بیماری، تشـــخیص، نظارت بر بیمار و توسعه پروتکل‌های جدید برای درمـــان حمایت می‌کند و عمدتاً بـــه فرآیند آنالیز داده‌هـــای حجیم به شـــیوه‌ای دقیـــق و کارآمد در حال حرکت به سمت اتوماسیون است.

از نقطه نظر پزشـــکی مهم اســـت که تاکید شود، اگرچه دســـتورالعمل‌های بالینی برای تشـــخیص AD احتمالی وجود دارد، اما چالش‌هایی در ارائه یک تشخیص صحیح وجود دارد. علاوه بر این، شـــروع اولیـــه و اواخر زندگی، مراحل پیش علامتی و علامتی، و تظاهرات بالینی معمولی و غیـــر معمول وجود دارد، و در نتیجه AD به عنوان یک طیف تعریف می‌شود .از آنجایی که تشخیص قطعی فقط پس از مرگ می‌تواند به دست آید، ناشناخته‌های زیادی از شروع بیماری تا مســـیری که هر بیمار دنبال می‌کند وجود دارد. پیش‌بینی چگونگـــی تکامل یک فرد (با چه ســـرعت و شـــدت آن)، یکی از اهداف اصلی استفاده از ابزارهای ML را نشان می‌دهد.

در مورد رادیولوژی، به دلیل هزینه‌های بالای تجهیزات، تصویربـــرداری عصبی ســـاختاری و عملکردی عمدتاً در بهبود کیفیـــت تصاویر و اصلاح نرم افزار برای پردازش و تجزیـــه و تحلیل (به عنوان مثال، اطلس‌های تخصصی‌تر و متنوع‌تر - مجموعه توپوگرافی مغز) پیشـــرفت می‌کند. تصاویر محدود شـــده و دارای برچســـب) در شرایط ایده آل، بیماران مبتلا به AD باید در ابتدا با اســـکن MRI و

PET ارزیابی شوند و این روش‌ها در کنار پیگیری‌ها ادامه یابد، اما منابع (پولی، زیرساختی و کارکنان) قابل توجه است و نمی‌تواند توسط هر مرکز بهداشتی پشتیبانی شود، بنابراین تصویربرداری عصبی انجام می‌شود. با سایر اقدامات تکمیل شده است.

همانطور که در بخش قبل مشاهده شد، قدرت استفاده از اطلاعات چندوجهی باعث پیشرفت در تحقیقات AD به سمت پزشکی شخصی شده، ایجاد مجموعه‌ای از دسته بندی‌های دقیق (به عنوان کد) می‌شود که تغییرات را در طول دوره بیماری هر بیمار (در حال توسعه) تخمین می‌زند. ابزارهای محاسباتی از تغییر به سمت بهبود استراتژی‌های دقیق، سریع، مقرون‌به‌صرفه و غیرتهاجمی برای تشخیص و نظارت صحیح، از CSF گرفته تا نشانگرهای زیستی مبتنی بر خون و استفاده از تکنیک‌های تصویربرداری عصبی کمتر مضر مانند DTI و رادیو ردیاب‌های جدید PET حمایت می‌کنند.

علاوه بر این، استفاده از داده کاوی به محققان اجازه می‌دهد تا عمق جزئیات را در فرآیند طبقه بندی، ترکیب تجزیه و تحلیل اطلاعات چند عاملی و زمان، که در سفارشی کردن درمان در زمانی که درمان‌های مناسب در دسترس قرار می‌گیرند، مفید باشد.

با توجه به درمان بیماری AD، تلاش‌های انجام شده برای دستیابی به درمان‌های موفق عمدتاً نتایج منفی داشته است. شرکت‌های داروسازی زمان و هزینه زیادی را در زمینه زوال عقل صرف کرده‌اند که منجر به تلاش‌های ناموفق شده است. دلیل این نتایج منفی تا امروز کارشناسان را متحیر کرده است. اعتقاد بر این است که بسیاری از عوامل ناشناخته پیرامون علل آسیب‌شناسی عصبی زمینه‌ای AD و/یا اینکه شرکت‌کنندگان در کارآزمایی‌های بالینی در حال حاضر در مرحله از دست دادن عصبی عمیق هستند که قابل برگشت نیست، و پیشرفت می‌تواند بسیار کوچک یا حتی تحت الشعاع باشد. فقدان درمان کارآمد رابطه بین تشخیص و درمان را از بین می‌برد، جایی که پزشک با یک استراتژی جایگزین باقی می‌ماند: داروی تجویز شده نشانه‌شناسی را هدف قرار می‌دهد و برخی از اثرات مضر مرتبط با زوال شناختی را کاهش می‌دهد، همانطور که در مقدمه ذکر شد.

حتی با وجود نتایج امیدوارکننده آدوکانوماب و تأیید مشروط آن توسط سازمان غذا و داروی ایالات متحده به عنوان درمان بیماری AD در ژوئن ۲۰۲۱، شک و تردید در بین پزشکان همچنان وجود دارد. سایر داروهای آنتی بادی هدفمند پلاک Aβ مانند gantenerumab و solanezumab در بیماران مبتلا به بیماری آلزایمر غالباً ارثی (DIAD) ناکارآمد بودند. این نتایج بحث‌برانگیز در چندین کارآزمایی بالینی ثابت می‌کند که ادامه مطالعات مالی برای کشف دارو در AD به همراه ابزارهای محاسباتی ضروری است.

این رویکردهای سیلیکونی نیازمند ساختار چند رشته‌ای از تحقیقات هستند. آنها نشان‌دهنده اولین گام در کشف ترکیبات جدید هستند که از نظر تئوری کارآمد هستند. مرحله بعدی باید شامل مطالعات پیش بالینی باشد که برای آزمایش این داروها و در نهایت تجویز آنها در آزمایشات بالینی انجام می‌شود.

به طور کلی، کاربرد الگوریتم‌های ML در AD نشان‌دهنده یک میدان نوظهور است که به سرعت در حال حرکت است. پیشرفت‌های تکنولوژیکی در مراقبت‌های بهداشتی آینده جامعه ما را در سال‌های آینده تثبیت می‌کند. حتی با وجود درجه‌ای از تاب آوری، این روش‌ها ابزاری برای ارتقای مهارت‌های متخصصان سلامت هستند و به طور کلی، اهداف بر افزایش عمق دانش و ارائه مراقبت بهتر برای بیماران آسیب دیده متکی است.

در نهایت، تیم‌های تخصصی هوش مصنوعی به رسیدگی به این نگرانی‌ها ادامه می‌دهند و در تلاش برای ایجاد راه‌حل‌هایی از نهادهای دانشگاهی، تجاری و دولتی پافشاری می‌کنند.

۵. محدودیت‌ها و جهت گیری‌های آینده

از نقطه نظر فنی، برخی از نقاط ضعف در این مطالعات ارائه شده است که ارزش برجسته کردن دارد. ماهیت داده‌ها یک محدودیت ذاتی را نشان می‌دهد، زیرا نویسندگان با یک نمونه راحت کار می‌کردند، جایی که داده‌ها از کلینیک‌های زوال عقل یا با دسترسی به پایگاه‌های داده به دست آمده بودند، اندازه نمونه در هنگام کار با تعداد زیادی متغیر ناکافی (کم توان) بود. به موضوع بیش از حد برازش (از قبل توضیح داده شده است)، که در آن چیزی می‌تواند به عنوان مهم ظاهر شود، اما به سادگی می‌تواند محصول شانس باشد.

علاوه بر این، این روش‌های جمع‌آوری داده‌ها می‌توانند

منجر به سوگیری انتخاب شوند که در آن محقق ممکن است از دستیابی به نمایه نماینده جمعیت دور شود و اشتباه نمونه‌گیری را سهوا افزایش دهد، که منجر به یک مدل نامشخص می‌شود.

برای پاسخ به یک سوال علمی در ML آماری نیازی به انباشت حجم عظیمی از اطلاعات نیست، امّا برای جمع‌آوری داده‌های مرتبط و به اندازه کافی پراکنده که معرف جامعه باشد، ترجیح داده می‌شود. از سوی دیگر، داده‌های از دست رفته و داده‌های دورافتاده منابع اطلاعات مفیدی هستند و در هنگام استفاده از داده‌های بزرگ، ردیابی آنها به طور فزاینده‌ای دشوار است.

پس از مشاهده همه این مطالعات انجام شده با الگوریتم‌های هوش مصنوعی، تنها می‌توان این سوال را مطرح کرد که بهترین الگوریتم چیست یا چرا تعداد زیادی وجود دارد و خروجی‌ها به چه معنا هستند؟ در حال حاضر، ما فقط می‌توانیم این کار را به عنوان یک آزمایش بتا تعریف کنیم. این مدل‌ها نیاز به آزمایش و اعتبارسنجی بیشتر در شرایط واقعی (زمینه بالینی) دارند و زمان لازم است تا ببینیم چقدر خوب عمل می‌کنند. بیشتر این مدل‌ها باید در یک حلقه یادگیری قرار داده شوند تا بتوانند با معرفی داده‌های جدید تکامل یابند.

حتی با وجود حجم متنوع و گسترده ادبیات مربوط به تکنیک‌های هوش مصنوعی و مدل‌های ML در تحقیقات AD، ارزیابی کلی نشان می‌دهد که محققان بالاترین معیار ممکن را از میزان دقت طبقه‌بندی داده‌های جدید برای مقادیر بالای ۸۰ درصد ارائه کرده‌اند. درصد متعادل و بالایی از حساسیت و ویژگی (طبقه بندی صحیح)، که بین ۶۵ تا ۹۸ در نوسان است. داشتن این نتایج متفاوت نشان‌دهنده محدودیتی است که نیازمند یک فرآیند مداوم است که باید اصلاح شود، به ویژه هنگامی که تشخیص انسانی توسط متخصص مغز و اعصاب از قبل مرتبط است.

به طور خلاصه، این مطالعات نشان‌دهنده یک مرحله اولیه با برخی چالش‌های شناخته شده است: نیاز به استانداردسازی رویه‌ها، هماهنگ‌سازی داده‌ها، ترجمه این مدل‌های نظری به زمینه بالینی، تعمیم پذیری نتایج و ادغام تیم‌های چند رشته‌ای.

در این لحظه، همکاری‌های چندمرکزی، مانند همکاری ون موریک و همکاران که مقایسه عملکرد مدل مجموعه داده‌های مختلف اروپایی را انجام دادند، به ۲۶۱۱ نفر با MCI در چهار گروه رسیدند و تنها حجم نمونه محدودی به دست آمد.

بنابراین، ممکن است استفاده از تکنیک‌های ML بر روی چند صد یا هزاران فرد از بیماری‌ای که میلیون‌ها نفر را تحت تأثیر قرار می‌دهد کافی نباشد، و راه‌حل ممکن است متوسل شدن به ابزارهای نمونه‌گیری سنتی و ایجاد شبکه‌های جهانی با همکاری‌های چند مرکزی باشد که کیفیت و نمایندگی داده‌ها را تضمین می‌کند.

علاوه بر این، نیاز به تکرار این مطالعات بر روی مجموعه داده‌های مستقل با اندازه مناسب وجود دارد، که می‌تواند برای آن مشکلات ابعادی بالا که محققان در تلاش برای پاسخگویی به آنها هستند، مناسب‌تر باشند و بتوانند نتایج به‌دست‌آمده را تأیید کنند.

۶. نتیجه‌گیری

این بررسی جدیدترین و قابل توجه‌ترین پیشرفت‌های محاسباتی در AD را معرفی کرده است. امیدواریم مطالب ارائه شده به شناخت نقاط قوت این حوزه و ایجاد انگیزه برای ایجاد پروژه‌هایی برای درمان‌های پیشگیرانه و مشارکت تیم‌های چند رشته‌ای کمک کند. این تکنیک‌ها ابزاری را نشان می‌دهند که فقط علوم پایه و شیوه‌های بالینی را برای رسیدن به یک هدف متقابل تقویت می‌کند: بهبود مراقبت‌های بهداشتی در زوال عقل. مطمئناً این زمینه برای کمک به ارائه راه حل‌هایی برای جمعیت سالخورده به حرکت رو به جلو ادامه خواهد داد.

منبع:

https://www.mdpi.com/2227-9059/10/2/315

گزارشی از استفاده از پزشکی شخصی

عباس اردلان [1]

۱- کارشناسی ارشد ژنتیک، دانشگاه اراک، اراک، ایران
پژوهشگر مرکز تحقیقات پزشکی شخصی آمیتیس ژن

از درمان‌های ژنتیکی سفارشی گرفته تا ارگانیسم‌های مدل‌سازی شده برای بیماران، این فناوری در حال حاضر برای نجات بیماران مبتلا به بیماری‌های نادر استفاده می‌شود

در مهر گذشته، سوزانا روزن، دختر ۸ ساله‌ای با بیماری ژنتیکی مخرب عصبی، اولین دوز داروی ژنتیکی سفارشی خود را دریافت کرد. او این دارو را بدون هیچ هزینه ای، توسط بنیاد غیرانتفاعی n-Lorem دریافت کرد. این دارو ژن درمانی نبود و ژنوم سوزانا را تغییر نمی‌داد یا جهش او را خنثی نمی‌کرد. این دارو یک الیگونوکلئوتید آنتی سنس (ASO)، یک توالی کوتاه از DNA اصلاح شده است که برای اتصال به رونوشت مشکل‌ساز mRNA و توقف تولید پروتئین عامل بیماری طراحی شده است.

سوزانا به گروه کوچک امّا رو به رشدی از بیماران می‌پیوندد که درمان‌هایی به نام درمان‌های N of 1 را دریافت کرده‌اند که فقط برای آنها طراحی شده است. به نظر می‌رسید که پزشکی شخصی ده‌ها سال در راه است، اما در سال ۲۰۱۸ سرانجام زمانی که یک ASO با طراحی سفارشی اولین بالینی خود را در بیمارستان کودکان بوستون شروع کرد. محققان به رهبری تیم یو، یک داروی ASO به نام میلاسن را برای درمان کودکی به نام میلا که یک اختلال ژنتیکی منحصر به فرد داشت، توسعه دادند. به طور باورنکردنی، آین دارو در کمتر از یک سال طراحی، تولید و تجویز شد.

ASOها تنها یک رویکرد برای طراحی داروهای N -of-1 هستند و به وسیله ی پلتفرم ویرایش ژن CRISPR، یک ابزار قابل تنظیم، با موفقیت وارد کلینیک می‌شود و آن را به یکی دیگر از کاندیدای امیدوارکننده تبدیل می‌کند. آزمایشات بالینی برای بیماری‌های ژنتیکی از جمله کم

خونی سلول داسی شکل و کوری مادرزادی در حال انجام است، اگرچه این شرایط بسیار نادر نیستند، با این وجود نشـان داده‌اند که این روش می‌تواند بـه طور ایمن در انسان استفاده شود. برخی از افراد برای اعمال درمان‌های شخصی سازی شـده CRISPR به طور گسترده‌تر فشار می‌آورند، اما تنظیم کننده‌ها محتاط هستند. هنگامی که ویرایش ژن انجام می‌شود، در صورت بروز عوارض جانبی نمی‌توان آن را معکوس کرد.

راه دیگری کـه CRISPR می‌تواند کمـک کند، ایجاد مدل‌هایی برای مطالعات اسـتفاده مجدد از دارو است. با اصلاح ژنتیکی مخمر یا دیگر ارگانیسـم‌های مدل برای تقلید جهش بیمار، محققـان می‌توانند داروهای موجود را بررسی کنند تا ببینند آیا نقصی که باعث بیماری یک بیمار می‌شود برطرف می‌شود یا خیر.

وجه اشتراک همه این اسـتراتژی‌ها مسئله هزینه است. دانشـمندانی که بر روی بیماری‌های نادر کار می‌کنند، بـدون پایگاه بزرگ از متقاضیان درمان به‌دسـت‌آمده و محققـان در تلاش برای سـاخت مدل‌هـای جدیدی هستند که دسترسـی به درمان‌های نجات‌بخش را برای همه کسانی که به آن‌ها نیاز دارند، ممکن می‌سازد.

تعادل ایمنی با سرعت

ASOها جدید نیسـتند. سـازمان غـذا و داروی ایالات متحده (FDA) اولین فومی‌ویرسـن را در سـال ۱۹۹۸ تأیید کرد. فومی‌ویرسـن که به‌عنـوان یک ضد ویروس در برابر رتینیت سیتومگالوویروس در افراد مبتلا به ایدز ساخته شـد، یک اثبات مفهومی برای ASOهای بالینی ارائه کرد. ۱۵ سـال طول کشـید تا داروهای ضد حس شـروع به کار کنند. با این حال، از سال ۲۰۱۳، کمتر از هشـت داروی ASO برای اسـتفاده در ایالات متحده یا اروپا برای درمان بیماری‌های ژنتیکی، از جمله Spinraza (nusinersen)، اولیـن درمـان مورد تاییـد FDA برای آتروفی عضلانی نخاعی (SMA) اسـت. این بیماری یک بیماری نورون حرکتی است که در شدیدترین شکل خود باعث مرگ در دو سالگی می‌شود.

توسعه Spinraza، مانند بسیاری از درمان‌ها، یک اودیسه چند سـاله بود که از سال ۲۰۰۴ شروع شد و زمانی که این دارو در سـال ۲۰۱۶ تأیید شـد، به پایان رسید. در مقابل، داسـتان میلا نشـان داد که می‌توان خط زمانی را تسـریع کرد. از آنجایی که بیماری میلا پیشـرونده و کشـنده بود، خطرات یک سـال انتظار بـرای مطالعات ایمنی حیوانات بیشـتر از خطر عوارض جانبی احتمالی ناشـی از درمان بود، بنابراین میـلا در حالی که مطالعه ایمنی حیوان هنـوز در حال انجام بـود، درمان را آغاز کرد. درمان او توسط FDA تحت یک پروتکل دسترسی گسـترده مجاز بود، که به بیمار با شـرایط تهدیدکننده زندگی اجازه می‌دهد تا با یـک داروی تحقیقاتی خارج از آزمایشات بالینی درمان شود. با این حال، اینکه دقیقاً مرز این عمل کجاسـت و چه زمانـی یک کودک مبتلا به یک بیماری دژنراتیـو مورد درمان تجربی بالقوه مضر واقع می‌شود، موضوع بحث جدی است. در سرمقاله‌ای در سـال ۲۰۱۹ در مجله پزشکی نیوانگلند، همان شماره‌ای که مورد میلا در آن منتشـر شد، جانت وودکاک و پیتر مارکس در FDA مسـائلی را در مورد چگونگی ادامه کار ایمن مطرح کردند.

از آن زمـان، FDA یک سـند راهنمای غیـر الزام آور برای محققانی که داروهای شـخصی سازی شده ASO را توسـعه می‌دهند منتشر کرده اسـت. پروتکل‌هایی را برای برنامه‌های افزایـش دوز، ارزیابی‌های ایمنی منظم، و ایجاد معیارهای توقـف در صورت بروز عوارض جانبی جدی ارائه می‌کند. این سـند صراحتاً به سطح داده‌های بالینی یا الزامات کیفیت دارو که برای شروع درمان بیمار نیاز اسـت، نمی‌پردازد، و همچنین داروهایی را که برای بازاریابی تجاری در نظر گرفته شده‌اند، استثنا نمی‌کند.

بر این اساس، محققان می‌توانند در شرایطی که دارویی در موش‌ها بی‌خطر است، و بیمار در صورت عدم استفاده از درمـان احتمالی می‌میرد یا نورون‌هایش را از دسـت می‌دهد، درمان را برای بیمار ادامه دهند تا اینکه منتظر مطالعه نخستی سانان باشـند. جاناتان واتس از مؤسسه درمانی RNA در دانشکده پزشکی دانشگاه ماساچوست می‌گوید: عدم درمان بر خطر درمان بیشتر است.

یو اشـاره می‌کند که مسائل اخلاقی در مورد ASOهای شخصی‌سازی شده منحصر به فرد نیستند. از طریق این دسـتورالعمل‌ها، ما مفاهیمی را می‌بینیـم که در حال حاضر در عمل بالینـی و اقدامات نظارتی در زمینه‌هایی مانند سرطان شناسی وجود دارد، که در آن بیمارانی که در درمان خط اول، دوم، سوم و چهارم شکست خورده‌اند، اغلب در مراحل اولیه، آزمایش‌های تحقیقاتی کاملاً سوژه

اول مطالعه هستند. بیماران و پزشکان آنها تصمیمات خود را برای شرکت در این کارآزمایی‌ها می‌سنجند، زیرا می‌دانند که بیماری آنها کشنده است و از سایر گزینه‌ها خسته شده‌اند.

Annemieke Aartsma-Rus، متخصص ژنتیک در مرکز پزشکی دانشگاه لیدن در هلند، خاطرنشان می‌کند که سیاست‌های نظارتی بین ایالات متحده و اروپا متفاوت است، و این بر انواع جهش‌هایی که برای تعیین N-of-1 واجد شرایط هستند، تأثیر می‌گذارد. او می‌گوید: دو کار می‌توانید با ASOs انجام دهید: بازیابی پروتئین یا کاهش تولید پروتئین سمی. یک ASO که یک بیماری را با کاهش یک پروتئین سمی درمان می‌کند، می‌تواند برای هر کسی که آن را ایجاد می‌کند، صرف نظر از جهش خاص، کارایی داشته باشد. Aartsma-Rus توضیح می‌دهد: شما می‌توانید آن را برای یک فرد توسعه دهید، اما می‌دانیم که این درمان می‌تواند برای دیگران نیز کاربرد داشته باشد. در ایالات متحده، شما اجازه دارید بگویید ما این دارو را در یک محیط N-of-1 توسعه خواهیم داد اما در اروپا، مجاز به انجام این کار نیستید. شما یا این کار را برای همه افرادی که واجد شرایط هستند انجام می‌دهید، یا اصلاً انجام نمی‌دهید. این مسئله برای جلوگیری از تبعیض در درمان است به صورتی که نتوان درمان را فقط برای یک بیمار خاص که اتفاقاً بتواند آن را تأمین مالی کند انجام داد.

میلا یک ASO پرش از اگزون است. این برای اتصال به بخش نادرست پیوند شده mRNA برای MSFD8 طراحی شده است که با تولید یک پروتئین ناقل لیزوزومی مورد نیاز برای بقای عصبی در شکل بسیار نادر بیماری باتن (لیپوفوسینوزیس سروئید عصبی نوزادی دیررس) تداخل می‌کند. Aartsma-Rus توضیح می‌دهد: جهش پیوند مرموز منجر به گنجاندن بخشی از یک اینترون در RNA پیام‌رسان می‌شود و تولید پروتئین را مختل می‌کند. گر بتوانید از آن اگزون مرموز بگذرید، رونوشت طبیعی بازگشته است، می‌توانید پروتئین طبیعی را بازیابی کنید. یک ASO که به درستی طراحی شده می‌تواند دقیقاً این کار را انجام دهد: یک اگزون رمزی را خنثی کند و رونوشت عادی را بازیابی کند. بنابراین، این نوع جهش‌ها امیدوارکننده‌ترین راه برای درمان‌های N-of-1 هستند، زیرا جهش‌های پیوند مرموز منحصربه‌فرد هستند و ASO سفارشی تنها در یک بیمار کار می‌کند. با این حال، شناسایی جهش‌هایی که در اینترون‌ها اتفاق می‌افتد دشوار است، زیرا اینترون‌ها دارای تنوع توالی زیادی هستند. همیشه مشخص نیست که آیا یک نوع خاص در رونوشت اختلال ایجاد می‌کند یا خیر. Aartsma-Rus می‌گوید: مردم می‌گویند [جهش‌های پیوند مرموز] بسیار نادر هستند، اما واقعیت این است که احتمالاً آنقدرها هم نادر نیستند، یافتن آنها واقعاً دشوار است.

شناسایی یک جهش مناسب تنها اولین مسئله است در حالت ایده‌آل، فرد می‌خواهد آن را برای بیماری‌هایی که مغز یا چشم را تحت تأثیر قرار می‌دهند (جایی که ASO می‌تواند به صورت موضعی تزریق شود)، اعمال کند. درمانگر می‌تواند از مقدار بسیار کم استفاده کند و لازم نیست نگران در معرض قرار گرفتن سیستمیک باشد. البته در زمان درمان باید امیدی برای بیمار وجود داشته باشد. به طور مثال در فردی که کاملا نابینا است شما می‌توانید تزریق موضعی در چشم انجام دهید و پروتئین را بازیابی کنید، اما بیمار کور می‌ماند پس شما قرار نیست عملکرد را به سلول‌ها برگردانید. در واقع اگر بیماری خیلی پیشرفته باشد، بیمار سودی نخواهدبرد. این مسئله بسیار مهم است که بیمار و خانواده به طور واقع بینانه درک کنند که چه مزایایی می‌توانند انتظار داشته باشند و خطرات درمان چیست.

N از ۱ ... و دیگری، و دیگری

برخلاف اروپا، در ایالات متحده "N of ۱" می‌تواند به معنای N از ۱ در یک زمان باشد. Jacifusen یک ASO است که علیه ژن FUS (پروتئین اتصال RNA ذوب شده در سارکوم) طراحی شده است، که وقتی جهش پیدا می‌کند، باعث شکل تهاجمی اسکلروز جانبی آمیوتروفیک (ALS) می‌شود. این دارو به نام Jaci Hermstad، که در سال ۲۰۱۹ اولین بیمار دریافت‌کننده دارو بود، نامگذاری شده است، اما این دارو به طور خاص برای او طراحی نشده بود. این دارو قبلاً توسط Ionis و همکارانش در دانشگاه کلمبیا ساخته شده بود و زمانی که هرمستاد در سن ۲۵ سالگی تشخیص داده شد، در موش Fus-mutant مدل ۵ کارایی خود را نشان داده بود و والدین Jaci از ترس از دست دادن دختر خود، کمپینی را برای گرفتن مجوز از FDA برای Jaci به راه انداختند

تا دارو را امتحان کند، حتی اگر هنوز روی انسان آزمایش نشده بود. در زمانی که بیماری Jaci تشخیص داده شد، FDA هنوز پیش نویس راهنمای خود را در مورد استفاده از ASOهای فردی در بیماران منتشر نکرده بود.

نیل اشنایدر از کلمبیا، که جسیفوزن را توسعه داد، می‌گوید FDA شریکی بسیار پاسخگو، متفکر و معقولی در این زمینه بود. هدف آنها به وضوح محافظت از بیمار من بود، اما در عین حال ماهیت ناامیدکننده بیماری و خطراتی که بیماری برای بیمار ایجاد می‌کرد را تشخیص داد. اگرچه اشنایدر اطلاعات سمیت محدودی در مورد جاسیفوزن داشت، امّا این دارو از نظر شیمیایی شبیه به دو Ionis ASO دیگر برای ALS بود که قبلاً به کلینیک معرفی شده بودند. Jaci درمان را تحت یک برنامه کاربردی تحقیقاتی جدید با دسترسی گسترده (IND) آغاز کرد و پس از آن، بیماران بیشتری با ALS مرتبط با FUS خواستند آن را امتحان کنند. اشنایدر می‌گوید: برنامه رشد کرد، اما یک به یک تدریجی بود. ما در نهایت ۱۲ IND را برای همان درمان ارائه کردیم. پس از چند بیمار اول، FDA محدودیت‌هایی را برای رویکرد IND سریال تعیین کرد و از Shneider خواست تا یک کارآزمایی بالینی را انجام دهد.

اشنایدر انتظار دارد داده‌های ۱۲ بیمار IND را در سال ۲۰۲۳ منتشر کند و می‌گوید، اگرچه جاسی حدود یک سال پس از شروع دارو درگذشت امّا، «او نشانه‌های دلگرم‌کننده‌ای نشان داد که به ASO پاسخ می‌دهد.»

به اشتراک گذاری داده‌ها

پس از میلاسن، یو شروع به دیدار با خانواده‌هایی کرد که امیدوار بودند داروهای ضد حس می‌توانند به فرزندانشان کمک کنند. یو با توجه به ملاحظات اخلاقی موجود، تصمیم گرفت یک بیماری ژنتیکی ویرانگر، آتاکسی-تلانژکتازی، ایجاد کند و دارویی به نام آتیپکسن را برای بیمار ۳ ساله‌ای به نام ایپک در اکتبر ۲۰۱۹ بسازد. و با اینکه ۳ سال پس از درمان گذشت امّا نتایج هنوز منتشر نشده است. در سال ۲۰۲۰، او دو کودک نوپا مبتلا به نوع شدید صرع را با ASO به نام سنبل الطیب درمان کرد. اگرچه این دارو دفعات تشنج را در یک بیمار کاهش داد و در بیمار دیگر آنها را از بین برد، اما هر دو کودک دچار هیدروسفالی شدند و متعاقباً درمان را متوقف کردند. یک نفر در نهایت فوت کرد (به دلایل غیرمرتبط با درمان دیگری پس از توقف درمان، شاهد افزایش تعداد تشنج‌هایش بوده است و والدینش در فکر شروع مجدد آن هستند.

رویداد نامطلوب غیرمنتظره اهمیت به اشتراک گذاری داده را کم گزارش می‌کند، که یو بر آن به عنوان کلیدی برای پیشرفت این حوزه تاکید می‌کند. یو می‌گوید: «لحظه‌ای که در بیماران خود با هیدروسفالی مواجه شدیم، با تمام افرادی که در زمینه‌ای که می‌دانستیم

بـا داروهای ASO کار می‌کنند تمـاس گرفتیم". مردم ۳۰ سـال است که ASOها را مورد مطالعه قرار داده اند، با این حال ، هیدروسـفالی قبـلاً در افرادی که با ASO درمان شـده بودند رخ داده بود. در مـارس ۲۰۲۱، فاز ۳ آزمایش دارو برای Minersen، که توسـط Ionis برای بیماران مبتلا به بیماری هانتینگتون سـاخته شده بود، به دلیل «انبسـاط بطنی» - اساساً هیدروسفالی - که به شـکل وابسته به دوز مشاهده شد، پیش از موعد متوقف شد. تست tominersen تحت نظارت Roche که با Ionis شریک است از سر گرفته شده است.

یو می‌گوید محتمل‌ترین فرضیه این است که تجمع مایع یک اثر کلاسی است، اما مکانیسم مسئول آن نامشخص اسـت. او می‌گوید: «خیلی خوب اسـت که بتوانیم فقط مقـداری را به ماینرها برسـانیم و کمی سـنبل الطیب دریافت کنیم و آزمایش‌های مناسـبی را برای شناسایی مشـترکات مکانیکی بین این دو دنبالـه انجام دهیم.» «دنیا همیشـه اینطور نیست. اما هر چه زودتر بتوانیم به نقطه‌ای برسـیم که این نوع کارها را به روشی مشترک انجام دهیم، برای همه بهتر است».

یو به همراه جولیا ویتارلو، مادر میلا، N=1 Collaborative یا N1C را راه‌اندازی کرد، سازمانی که به اتصال محققان ASO در سرتاسـر جهان اختصاص یافته و مرکزی برای ارتباطات و اشتراک‌گذاری داده‌ها فراهم می‌کند. یو اشاره می‌کند کـه اغلب، موانعی برای اشـتراک‌گذاری داده‌ها به‌عنوان عواقب ناخواسـته نحوه رسـیدگی به داده‌های پزشـکی و محافظت از حریم خصوصـی بیماران ایجاد می‌شود. یو می‌گوید: یکی از کارهای مهمی که امیدوارم N=1 همکاری بتواند انجام دهد این اسـت که بخشی از آن را در مراحل اولیه حذف کند و استانداردهایی را برای اشـتراک‌گذاری تنظیم کند کـه کار داوطلبانه را برای محققان و خانواده‌هایی که با آنها کار می‌کنند آسان کند. برای اینکه داده‌های آن‌ها به‌گونه‌ای به اشتراک گذاشته و جمع‌آوری شود که در این زمینه اطلاع‌رسانی کند.

واتـس می‌گویـد: فناوری‌های پلتفـرم در حال بهبود هسـتند، و من می‌توانم بگویم در حال حاضر، شـاخص درمانی نسبتاً محدود اسـت. ما می‌توانیم سکانس‌هایی را پیـدا کنیم که به خوبی تحمل می‌شـوند و زندگی‌ها را نجـات می‌دهند. اما قطعاً نمونه‌هایـی نیز وجود دارد که کاملاً سـمی اسـت از این رو ASOها با توالی‌های مختلف با شـیمی یکسان هستند. نمونه‌هایی وجود دارد که کمی مرزی هسـتند - آنها اثـرات مفیدی دارند، اما هنوز مشـخص نیسـت که آیا آنها به اندازه کافی ایمن هسـتند یا خیر. فکر می‌کنم اگر بتوانیم بسـتری برای داشتن شاخص درمانی داشته باشیم، انجام داروهای تک بیمار بسیار آسان‌تر می‌شود.

N1C همچنیـن از کارگاه‌هایـی حمایـت می‌کند تا به این حـوزه کمک کند تـا در مورد بهترین شـیوه‌های خاص، از جمله دسـتورالعمل‌هایی برای انتخاب جهش، آزمایش‌های بالینی، تسـت‌های ایمنی، مسائل نظارتی، و معیارهایـی برای تعیین میـزان کارآمدی یک درمان، اجمـاع ایجـاد کند. این سـازمان همچنین بـه عنوان منبعی برای پزشـکانی عمل می‌کند که ممکن است در درمان‌های ژنتیکی تجربه نداشته باشند. سال گذشته این گروه دستورالعمل‌های اجماع را برای طراحی و آزمایش ASO منتشـر کرد و آنها در حال ایجاد یک پایگاه داده آنلاین از ASOهای کنترلی هستند که تأیید شده‌اند که در انواع مختلف سلول به خوبی کار می‌کنند.

بسیاری از پزشکان ممکن اسـت بیمار مبتلا به بیماری نادری داشـته باشـند و بخواهند کمک کنند، اما هیچ ایـده‌ای ندارند که چگونه به FDA نزدیک شـوند. منبع اولیگونوکلئوتید زیر ۵۰۰۰۰۰ دلار از کجا پیدا می‌شود؟ برای یک بیمار مجرد؟ واتس می‌گوید. به اشتراک‌گذاری اطلاعات و کمک، راهنمایی و منابع و پروتکل‌ها در مورد همه این نوع سـؤالات، کار دیگری است که افراد دارای تفکـر بالینی بیشـتر در این گروه بـرای یکدیگر انجام می‌دهند.

یکـی از بازیگـران اصلـی در ASO تـا کنـون از به اشتراک‌گذاری داده‌ها در این گروه خودداری کرده است: n-Lorem.

ASO رایگان

اسـتنلی کروک، بنیانگذار Ionis، با درک این موضوع که مدل سنتی شرکت داروسازی انتفاعی نمی‌تواند از توسعه N-of-1 ASO پشتیبانی کند، بنیاد n-Lorem را در سال ۲۰۲۰ تأسیس کرد. ماموریت n-Lorem ارائه درمان‌های آزمایشی ASO به مردم است. با بیماری‌های ژنتیکی که کمتر از ۳۰ بیمار را در سراسـر جهـان تحت تاثیر قرار می‌دهد. این بنیاد با سـرمایه شـخصی کروک و روزان

کروک، همسرش، به علاوه ۳.۴ میلیون دلار از Ionis و ۱.۷۵ میلیون دلار از Biogen راه اندازی شد. کروک می‌گوید که شرکت‌های دیگر نیز برای مشارکت در این زمینه تلاش می‌کنند. کروک می‌گوید: ما بازخوردی فوق العاره داشتیم. واقعاً هر فروشنده‌ای در صنعت الیگونوکلئوتید، کار رایگان یا با تخفیف عمیق ما را همراهی کرد و اغلب کمک‌های نقدی نیز ارائه می‌دهد. آنها همچنین از سازمان‌های حامی بیماری کمک‌های مالی دریافت کرده اند.

در همان زمان، او در برابر این ایده که n-Lorem باید داده‌های خود را به تلاش‌های N1C کمک کند، مقاومت می‌کند. او با اشاره به اینکه Ionis از سال ۱۹۸۹ فناوری ASO را «به کمال رسانده است» می‌گوید مقایسه داده‌های آنها با داده‌های دیگرانی که تازه شروع به کار کرده‌اند، منطقی نیست. او می‌گوید: ما پیشنهاد می‌کنیم اساساً با هر بازپرسی که به ما مراجعه می‌کند، همکاری کنیم. همکاری‌های ما این است که ASO را طراحی و می‌سازیم، و سپس ASO بهینه را به جلو می‌آوریم، و سپس محقق بیمار را درمان می‌کند.

کروک از ایده ایجاد پایگاه‌های اطلاعاتی، تا زمانی که حداقل استانداردها برای فرآیندها و عملکرد آزمایش‌های پیش‌بالینی تعریف شده باشد و پروتکل‌های ارزیابی بالینی دقیق با نقاط پایانی بالینی به خوبی تعریف شده توافق شود، حمایت کرد. او می‌گوید: به‌این‌ترتیب، n-Lorem برای مشارکت داده‌ها در آزمایشگاه N=1 یا سایر پلت‌فرم‌های داده در صورت لزوم، باز است. اما، چون N1C داده‌های محققین مختلف را با استفاده از روش‌های مختلف برای ساخت ASO جمع‌آوری می‌کند، کروک می‌گوید: یکی از نگرانی‌هایی که من دارم این است که این کار توسط افرادی انجام می‌شود که واقعاً این فناوری را نمی‌فهمند.

استخراج جواهرات پنهان

ASOها تنها مسیر درمان‌های N-of-1 نیستند. CRISPR می‌تواند به افراد مبتلا به بیماری‌های بسیار نادر کمک کند. این فناوری به جای تغییر DNA بیمار، محققان را قادر می‌سازد تا مدل‌های مخمر یا کرمی با خطاهای ژنتیکی ایجاد کنند که با خطاهای موجود در بیماران مطابقت داشته باشد، بنابراین منبعی شخصی برای غربالگری با کارایی بالا از نامزدهای دارویی با مولکول کوچک ایجاد می‌کند. شما دارو را مانند مدل ASO برنامه ریزی نمی‌کنید. شما مدل مخمر را برنامه ریزی می‌کنید. چه چیزی مسیری سریع‌تر از یک ASO سفارشی‌شده به کلینیک دارد؟ یک داروی تغییر کاربری که قبلاً سابقه ایمنی دارد.

پرلشتاین می‌گوید ایده پشت پرلارا این است که با استفاده از مدل‌های مخمر، کرم و مگس موجود، استفاده مجدد از دارو را «تولید» کند. این شرکت در واقع در حال تکرار دوم خود است. با این حال، برخی از کارهای ناتمام مهم باقی مانده است. به مدت دو سال، پرلارا با Maggie's Cure ، یک LLC که توسط خانواده مگی کارمایکل تشکیل شده بود، کار می‌کرد. مگی دارای یک اختلال مادرزادی گلیکوزیلاسیون PMM2-CDg، (CDg) است که بر چندین سیستم ارگان تاثیر می‌گذارد. محققانی که با Perlara کار می‌کردند قبلاً مدل‌های مخمر و کرم بیماری مگی را غربالگری می‌کردند و به دنبال دارویی بودند که ممکن است موثر باشد. این پروژه پس از بسته شدن رسمی شرکت ادامه یافت و در ژانویه ۲۰۲۰، مگی دارویی به نام epalrestat را تحت نظارت پزشکان در کلینیک مایو در روچستر، مینه سوتا آغاز کرد. این دارو برای هیچ نشانه‌ای مورد تایید FDA نیست، اما در ژاپن به عنوان درمان نوروپاتی دیابتی تایید شده است. از زمانی که او شروع به مصرف epalrestat کرد، مهارت‌های حرکتی مگی بهبود یافته و دایره لغات او به طور چشمگیری افزایش یافته است.

در حوالی زمانی که مگی شروع به استفاده از epalrestat کرد، خانواده دیگری در جستجوی پاسخ برای CDg پسرشان بودند. جیک کارول در اوایل سال ۲۰۲۰ با Man1b1-CDg تشخیص داده شد و والدینش، کلر فست و مت کارول، به زودی متوجه شدند که اطلاعات کمی در مورد این بیماری وجود دارد. در چنین زمانی افراد دچار احساس درماندگی می‌شوند، زیرا افراد بسیار کمی در جهان در مورد این اختلال اطلاع دارند. خانواده کارولز با کارمایکل در یک گروه فیس بوک برای خانواده‌هایی که تحت تأثیر CDg قرار گرفته بودند ملاقات کردند و آن زمان بود که آنها درباره پرلارا با خبر شدند. در سال ۲۰۲۲، پرلشتاین خانواده را با کلمنت چاو در دانشگاه یوتا پیوند داد. چاو روی CDgs در مگس‌های میوه کار

می‌کنـــد، و او موافقت کرد کـــه غربالگری برای داروهای Man1b1 در مگس‌ها انجام دهد.

مدل‌های مگـــس چاو دارای کپی دقیقی از جهش جیک نبودند، بلکه یـــک ناک داون عمومـــی Man1b1 بودند که با اســـتفاده از تداخل RNA (RNAi) ساخته شد. او می‌گوید: در آینده، ممکن است بخواهیم به سمت ساخت مدل‌های شخصی‌شده‌تر حرکت کنیم، از CRISPR برای قرار دادن جهش‌های واقعی بیماران اســـتفاده کنیم، اما این زمان بسیار بیشـــتری می‌برد. ما می‌توانیم بلافاصله پس از تماس با بیماران، تمام معرف‌ها را ســـفارش دهیم تا آزمایش RNAi knockdown را انجام دهند، معرف‌ها را در عرض یک هفته دریافت کنیم، در حدود ســـه هفته چند آزمایش انجام دهیم، و ســـپس به رند اصلی برسیم. اگر ما CRISPR را انجام دهیم، ماه‌ها قبل از اینکه حتی یک مگس داشته باشیم می‌توانیم آزمایش کنیم.

از ژانویه ۲۰۲۳، صفحه نمایش چندین دارو را شناسایی کرده اســـت و گام بعدی این است که به عنوان یک تیم بنشینیم و درباره نحوه ادامه صحبت کنیم. چاو می‌گوید: حدود ۲۰ درصد از بازدیدهایی که تیم مسیر بیوشیمیایی یکســـانی را شناسایی کردند. در عرض یک هفته پس از شـــروع رژیم دارویی، لوسی اولین قدم بدون کمک خود را برداشت.

مجموعـه وسـیعی از داروهـای مولکولی کوچـک که قبلاً بـا ایمنـی آزمایـش شـده انـد، منبعـی را نشـان می‌دهد کـه کمتـر مـورد اسـتفاده قـرار می‌گیـرد کـه می‌توانـد بـرای درمـان اسـتخراج شـود. چـاو می‌گویـد: مـا در تـلاش هسـتیم کـه بتوانیم تمـام ایـن جواهـرات پنهان را در میـان چیزهایـی کـه قبـلاً بـه عنـوان امـن تأییـد کرده‌ایـم پیـدا کنیـم. مـن فکر می‌کنـم که بـرای تعداد زیـادی از بیماری‌هـا کار خواهـد کـرد. فقـط بیولوژیـک زیـادی در ایـن داروهـا نهفتـه اسـت و مـا از مکانیسـم دقیـق عـم اکثـر آن‌هـا درک خوبـی نداریم.

پرلشـــتاین می‌گوید که حدود ۳۰ مشـــتری دارد که به دنبال درمان هســـتند. پرلشـــتاین پیش‌بینـــی می‌کند: «تغییـــر مصرف دارو به زودی بـــه صورت تصاعدی پیش مـــی‌رود. «این چند N- از ۱- چه چیـــزی بود، تبدیل به جزر و مدی از N- از ۱- خواهد شـــد. و البته، این چیزی است که آنها با ASOها در مورد آن صحبت می‌کنند، این همان چیزی است که n-Lorem قرار است با آن سازگار شود، و N=1 Collaborative. آنها سعی می‌کنند جلوی این سونامی را بگیرند.

آیا داروهای بیماری‌های نادر می‌توانند سودآور باشند؟

یک ســـال پیش، مؤسســـه ملی ســـلامت ایالات متحده (NIH) برنامـــه درمـــان مبتنـــی بر ژن فوق‌العـــاده نادر (URgenT) خود را برای توســـعه ی بالینی درمان‌های بیماری‌های عصبی راه‌اندازی کرد. کریس بوشوف، مدیر برنامه می‌گوید: این هنوز در دست ساخت است. در حال حاضر، فقط از یک جزء پیش بالینی تشـــکیل شده است. دو اعلان فرصت تامین مالی برای پروژه‌هایی تا و شـــامل پرونده IND وجود دارد. او می‌گوید یک شبکه بالینی در حال توسعه اســـت و پیش‌بینی می‌شود در سال ۲۰۲۳ راه‌اندازی شـــود. ایـــن واقعاً پویایی ایـــن برنامه را تغییر خواهـــد داد. ما امیدواریم که انتقـــال تقریباً بدون درز از پیش بالینی به بالینی و یک فرآیند دسترســـی ســـاده را فراهم کند. اگر متقاضیان قبلا IND داشته باشند، مجبور نیستند همان پروســـه طولانی درخواست را برای تامین مالـــی طی کنند. پایگاه داده شـــبکه بالینی همچنین به عنوان یک منبع اشـــتراک داده عمل می‌کند که می‌تواند به ســـایر محققان کمک کند. بوشوف می‌گوید: حتی اگر به اندازه اشتراک‌گذاری یک پروتکل کارآزمایی بالینی یا اشتراک‌گذاری سنجش‌ها در طول توسعه کوچک باشد، شروعی است.

تاکنون هیچ پروژه‌ای تامین مالی نشده است، اما بوشوف می‌گوید دامنه این برنامه شـــامل هـــر فناوری مبتنی بر ژن یا رونویســـی، از جمله ASOs، ویرایـــش ژن، یا ژن درمانی مبتنی بر AAV کلاسیک است، مشروط بر اینکه بیماری‌های عصبی فوق‌العاده نادر را بررسی کنند.

در ســـرمقاله اخیر نیویورک تایمز، فئودور اورنوف، مدیر علمی مؤسســـه ژنومیکس نوآورانه و اســـتاد دانشـــگاه کالیفرنیـــا برکلی، پیشـــنهاد کرد که بـــرای بیماری‌های نـــادر، بودجه عمومـــی منطقی تر از کســـب و کارهای انتفاعی است و به مشـــکلات مالی اشاره کرد. انستیتوی کالیفرنیا برای پزشـــکی احیاکننده به‌طور مداوم و قوی از مســـیری به کلینیک برای درمان‌های تجربی از جمله CRISPR حمایت کرده اســـت و تنها ارگانی است که با بودجه دولتی این کار را انجام می‌دهد. در ســـطح فدرال،

NIH بودجه‌ای را برای محققان دانشگاهی برای توسعه داروهای مبتنی بر CRISPR ارائه می‌دهد. او می‌گوید: «من فکر می‌کنم این دقیقاً رویکرد درستی است. سرمایه گذاری دولت فدرال در ایجاد امکان سنجی درمان‌های CRISPR، در نهایت به نفع مالیات دهندگان خواهد بود. چرا؟ همانطور که بیشتر و بیشتر در مورد ویرایش ژن برای بیماری‌های نادر می‌آموزیم ، بیشتر و بیشتر در مورد چگونگی ویرایش ایمن ژن برای بیماری‌های رایج یاد خواهیم گرفت.

در همین حال، پرلشتاین با درس‌هایی از تلاش قبلی خود در بیوتکنولوژی صنعتی، پرلارا را در اواخر سال ۲۰۲۱ احیا کرد. و معتقد است که این بیوتکنولوژی غیرمتمرکز است. ما یک مدل کسب و کار اساسا متفاوت ارائه می‌دهیم که یک مشاوره مجازی است. پرلشتاین نقش پرلارا را تسریع تحقیقات برای یافتن درمان برای بیماران می‌داند. کل هدف شرکت اکنون تبدیل شدن به Y Combinator برای بیماری‌های نادر است.

در قالب جدید، Perlara دیگر یک فضای آزمایشگاهی فیزیکی دائمی یا کارمندان تمام وقت ندارد. آن‌ها را به نفع آزمایشگاه‌های پاپ‌آپ توزیع‌شده جغرافیایی و «راهنماهای درمان» که به‌عنوان پیمانکاران مستقل با شرکت کار می‌کنند کنار گذاشته است. در واقع این چیزی شبیه اوبر است، با این تفاوت که من به جای رانندگان، راهنمای درمان دارد. راهنماهای درمان با خانواده‌ها تطبیق داده می‌شوند و تیم‌های تحقیقاتی را برای ایجاد یک درمان شخصی تشکیل می‌دهند، همان طور که آزمایشگاه چاو در مورد پرونده جیک کارول انجام داد.

در حال حاضر، پرلشتاین اذعان می‌کند که خانواده‌هایی که با پرلارا کار می‌کنند تا حد زیادی از خود تأمین مالی می‌شوند. و می‌شود آنها را «نوک نیزه» در تلاش برای درمان بیماری‌های نادر نامید، که در نهایت می‌تواند در دسترس سایر بیماران قرار گیرد. در واقع این محقق سعی نمی‌کند چیزی بسازد که فقط به نفع ۱٪ باشد اما وجود آن‌ها را نیز نادیده نمی‌گیرد. موفقیت مگی با epalrestat منجر به راه‌اندازی یک آزمایش بالینی فاز ۳ با ۴۰ نفر در دسامبر ۲۰۲۲ شد. بدون تلاش Carmichaels، مزایای epalrestat برای CDgs ممکن است ناشناخته باقی بماند، حتی اگر فناوری ژنتیکی و بیوشیمیایی مورد نیاز برای یافتن آن در اکثر آزمایشگاه‌های مدرن قابل دسترسی باشد.

باید دید که آیا کشف داروی بیماری‌های نادر از نظر مالی پایدار خواهد بود، چه با استفاده از مدل Perlara، که تا کنون به کمک مالی از سوی خانواده‌ها متکی است چه مدل n-Lorem، که از کمک‌های مالی شرکت‌ها و سازمان‌های مدافع استفاده می‌کند. یا سناریوی بودجه عمومی پیشنهاد شده توسط اورنوف. سایر سرمایه گذاری‌های انتفاعی در حال ظهور هستند تا تلاش کنند تا درمان‌های N -of-1 را تسریع کنند. به عنوان مثال، جولیا ویتارلو، مادر میلا، اخیراً شرکت EveryONE Medicines را با حمایت سرمایه گذاری GV و Khosla تأسیس کرده است.

به صورت کلی این زمان برای بیماری‌های نادر است. زیرا مدل سازی بیماری‌های ژنتیکی نادر در آزمایشگاه بسیار ساده تر از شرایط پیچیده چند عاملی مانند بیماری قلبی یا سرطان استو ما همه ابزارها را داریم. آنچه کمبود دارد بودجه است.

منبع:

https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36973559/

تجزیه و تحلیل ژنومیک سرطان در مطالعات بالینی

وحید رضا اصفهانی [1]

۱- کارشناسی ارشد سلولی مولکولی دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
پژوهشگر مرکز تحقیقات پزشکی شخصی آمیتیس ژن

چکیده:

نوآوری‌های فناوری و کاهش سریع هزینه‌های توالی‌یابی، تجزیه و تحلیل ژنومیک صدها ژن مرتبط با سرطان را به عنوان یک جزء روتین از درمان سرطان ممکن ساخته‌اند. تجزیه و تحلیل ژنومیک تومور می‌تواند طبقه‌بندی زیرنوع‌های سرطان را بهبود ببخشد، افرادی را شناسایی کند که احتمالاً از درمان‌های سیستمی بهره‌مندتری خواهند شد، و برای یافتن وراثتی که بر روی خطر انتقالی سرطان تأثیر می‌گذارند، جستجو کند. در اینجا، ما تلاش‌های مستمر برای افزایش کاربرد بالینی تجزیه و تحلیل ژنومیک تومور را با یکپارچه‌سازی تجزیه و تحلیل تومور و ارائه محتوای اللیک و مشخص کردن علائم آللیک و شناسایی نشانهای جهشی که بر روی پاسخ به درمان اثر می‌گذارد، مورد بحث قرار داده‌ایم. همچنین ما کاربرد بالینی احتمالی تجزیه و تحلیل ژنوم کامل و ترانسکریپتوم کامل و پلتفرم‌های تجزیه و تحلیل سل-فری دی‌ان‌ای بسیار حساس را مورد بحث قرار داده‌ایم که امکان تجزیه و تحلیل تومور مشتق از خون را به صورت حداقل تهاجم و متوالی فراهم می‌کند.

سرطان یک بیماری ژنتیکی است که ناشی از تجمع جهش‌ها در ژن‌هایی است که تقسیم سلول، بقا، تهاجم و یا ویژگی‌های دیگر فنوتیپ تغییر یافته را کنترل می‌کنند. برخی از انواع سرطان‌ها خفیف هستند و سال‌ها نهفته مانده و در محلی که ایجاد شده‌اند باقی می‌مانند، در حالی که برخی دیگر به سرعت به اندام‌های مجاور حمله می‌کنند متاستاز می‌دهند و به نقاط دوردستی پخش می‌شوند. پژوهشگران مدت‌هاست که با طبقه‌بندی سرطان‌ها به زیرگروه‌های کوچک‌تر اما از نظر فنوتیپی مشابه‌تر، به دنبال درک مبنای بیولوژیکی این

تنـــوع در نتایج بالینی بوده‌اند. از نظر تاریخی طبقه‌بندی تومور بر اســـاس نوع ســـلول یا بافت منشا و ویژگی‌های مورفولوژیک، به ویژه ظاهر بافتی زیر میکروسکوپ نوری بود. درک بیشـــتری از پاتوفیزیولوژی مولکولی ســـرطان باعث شـــده اســـت که طبقه‌بندی مولکولی که اطلاعات ژنومی را با ویژگی‌های بالینـــی ترکیب می‌کند، تا خطر عود و بازگشـــت یا مرگ منحصرا مرتبط با ســـرطان فرد را پیش‌بینی کنیم. از آنجا که امکان پاسخ به درمان‌های سیتوتوکسیک، ایمنی و هدفمند اغلب به عنوان یک تابع از زیرگروه مولکولی تومور متغیر است، طبقه‌بندی دقیق تومور برای اطمینان از انتخاب بهترین درمان بسیار مهم اســـت. برای برخی از زیرگونه‌های ســـرطان، یک تغییر ژنومـــی پاتوژنومیک هم محرک شـــروع تومور و هم یک آسیب‌پذیری درمانی بالقوه است. برای مثال، تقریباً تمام لوســـمی‌های میلوژن مزمن (CMLs) دارای جابه‌جایی (کروموزوم فیلادلفیا) هســـتند که شـــامل ژن تیروزین کیناز ABL1 در کروموزوم ۹ و منطقه خوشـــه‌ای نقطه شکست (BCR) در کروموزوم ۲۲ می‌شود.

انتقال BCR-ABL حاصل به طور اساســـی فعال اســـت و داروهایـــی مانند ایماتینیب که به طور انتخابی ABL1 را مهار می‌کنند در بیماران مبتلا به CML بســـیار موثر هســـتند. موفقیت ایماتینیب در بیماران مبتلا به CML امید گسترده‌ای را ایجاد کرد که برخی از آن را بعدها به عنوان تبلیغاتی توصیف کردند که انتخاب تجزیه و تحلیل ژنومی تومور در بالین به ســـرعت توسعه استراتژی‌های درمانی شخصی‌ســـازی شـــده و کمتر سمی برای تمامی بیماران مبتلا به ســـرطان ممکن کند. اگرچه پیشرفت از پیش‌بینی‌ها کندتر و تدریجی‌تر بوده اســـت، سرطان ریه به سرعت به عنوان یک نوع سرطان ظاهر شده است که در آن سرطان‌شناســـی دقیق تأثیرگذار بوده است (جعبه ۱). تنوعـــی از تغییـــرات مولکولی قابل هـــدف، از جمله جهش‌هـــای EGFR و BRAF و همجوشـــی‌های ALK، ROS۱ و RET، نقش کلیدی و مرکزی در پاتوژنز سرطان ریه دارند. از آنجایی که تومورهای حاوی این محرک‌های مولکولی اغلب در زیر میکروسکوپ نوری قابل تشخیص نیســـتند، تجزیه و تحلیل ژنومـــی در بالین برای انتخاب درمان بهینه در بیماران مبتلا به ســـرطان‌های پیشرفته ریوی یک امر ضروری است.

گسترش تعداد ژن‌های قابل درمان در أنواع سرطان ریه و ســـایر أنواع ســـرطان‌ها، محدودیت‌های تشخیص‌های همراه تک-آنالیتی(تک متغیر) را آشکار کرد که از لحاظ تاریخی همزمـــان با درمان‌های هدفمند جدید توســـعه یافتند. در روزهای اولیه سرطان‌شناســـی دقیق، بیشـــتر آزمون‌های تشـــخیصی همراه تنها می‌توانستند تنها یک جهش ماننـــد BRAF p.Val600Glu (BRAF-V600E) یا تنها یک ترکیب ژنی مانند EML4–ALK را شناسایی کنند.

افزایش و تکثیر داروهای تاییدشده در کلنیک و تحقیقات و اخیراً نشانگرهای زیستی(بیومارکر) تومور-آگنوستیک پاسخ دارویی و بافت تومور محدود موجود برای تجزیه و تحلیل برای بســـیاری از بیماران مبتلا به سرطان، باعث توســـعه روش‌های تشخیصی چندگانه (در ابتدا بر اساس طیف‌ســـنجی جرمی یا تکنولوژی PCR) شد که می‌تواند وضعیت جهش ده‌هـــا ژن مرتبط با ســـرطان را در یک واکنش مشخص کند.

توســـعه جدیدتر پلتفرم‌های مبتنی بر توالی‌یابی نســـل بعدی (NGS)، آنالیز همزمان صدها ژن یا حتی کل ژنوم را با اســـتفاده از مقادیر کمـــی از بافت تومور جمع‌آوری شـــده توسط بیوپســـی ســـوزنی یا DNA ریخته شده از سلول‌های تومور به پلاسما، امکان پذیر کرده است که به آن اصطلاحا DNA بدون سلول (cfDNA) گفته می‌شود. بـــه همین ترتیب هزینه افزایشـــی انـــدک اضافه کردن ژن‌های ســـرطان اضافی به پنل‌های تشـــخیصی مبتنی بر NGS، توســـعه داروهایی را که به طور فزاینده‌ای زیر مجموعه‌های کوچک‌تر و تعریف‌شـــده مولکولی بیماران مبتلا به سرطان را هدف قرار می‌دهند، از نظر لجستیکی و مالی امکان‌پذیر کرده است.

توسعه کارآمد بالینی مهارکننده‌های موثر در سرطان‌های ناشی از جهش‌های ژنومی نادر، مستلزم توسعه همزمان طرح‌های کارآزمایی بالینـــی جدید مانند کارآزمایی‌های ســـبد بود، طرحی که در آن واجد شرایط بودن بر اساس وضعیت جهش به جای اندام است.

با تأیید بعدی در مطالعات سبدی از نشانگرهای بیولوژیکی بی‌مرز به پاســـخ دارو، مانند ناپایداری میکرواسکلتال ۲۹ و تکثیر ژنی NTRK30، اکنون بسیاری از انکولوژیست‌ها اعتقاد دارند که تجزیـــه و تحلیل ژنومی تومور مبتنی بر توالی نســـل بعدی (NGS) باید به تمام بیماران مبتلا به ســـرطان که واجدین شرایط درمان موضعی یا سیستمی

به هدف درمان نیستند، ارائه داده شود.
در این مقاله مروری، ما وضعیت فعلی عمل‌پذیری بالینی در سرطان‌شناسی دقیق و چالش‌های تفسیر متنوع که در نتیجه به کارگیری سریع و گسترده پلتفرم‌های تشخیصی مبتنی بر NGS با پنل بزرگ‌تر تشخیصی ایجاد شده‌اند را مورد بحث قرار می‌دهیم.
استفاده تکمیلی از NGS تومور بالینی نه تنها برای کمک به انتخاب درمان، بلکه تشخیص زیرگونه سرطان و ارزیابی خطر سرطان وراثتی در شکل ۱ خلاصه شده است.
بسیاری از چالش‌های فنی ناشی از استفاده از نمونه‌های بالینی برای پروفایل ژنومی تومور مبتنی بر NGS در جای دیگری مورد بحث قرار گرفته است، بنابراین در اینجا تمرکز ما بر روی تلاش‌های مستمر برای به دست آوردن ارزش بالینی بیشتر از داده‌های پروفایل ژنومی تومور از طریق طبقه‌بندی مبتنی بر شواهد قوی‌تر مانند ادغام تومور و توالی ژرم لاین و شناسایی پیکربندی‌های آللی و نقاط جهشی پیش بینی کننده پاسخ دارویی است. در نهایت، ما نقش بالقوه آینده برای پلتفرم‌های تشخیصی جامع‌تری مانند توالی‌یابی کامل ژنوم و توالی‌یابی RNA و پلتفرم‌های پروفایل cfDNA فوق‌حساس که می‌توانند به‌طور غیرتهاجمی عود تومور را نظارت کرده و تغییرات تطبیقی را که میانجی‌کننده مقاومت دارویی هستند را بررسی می‌کنیم.

DNA بدون سلول (cfDNA):

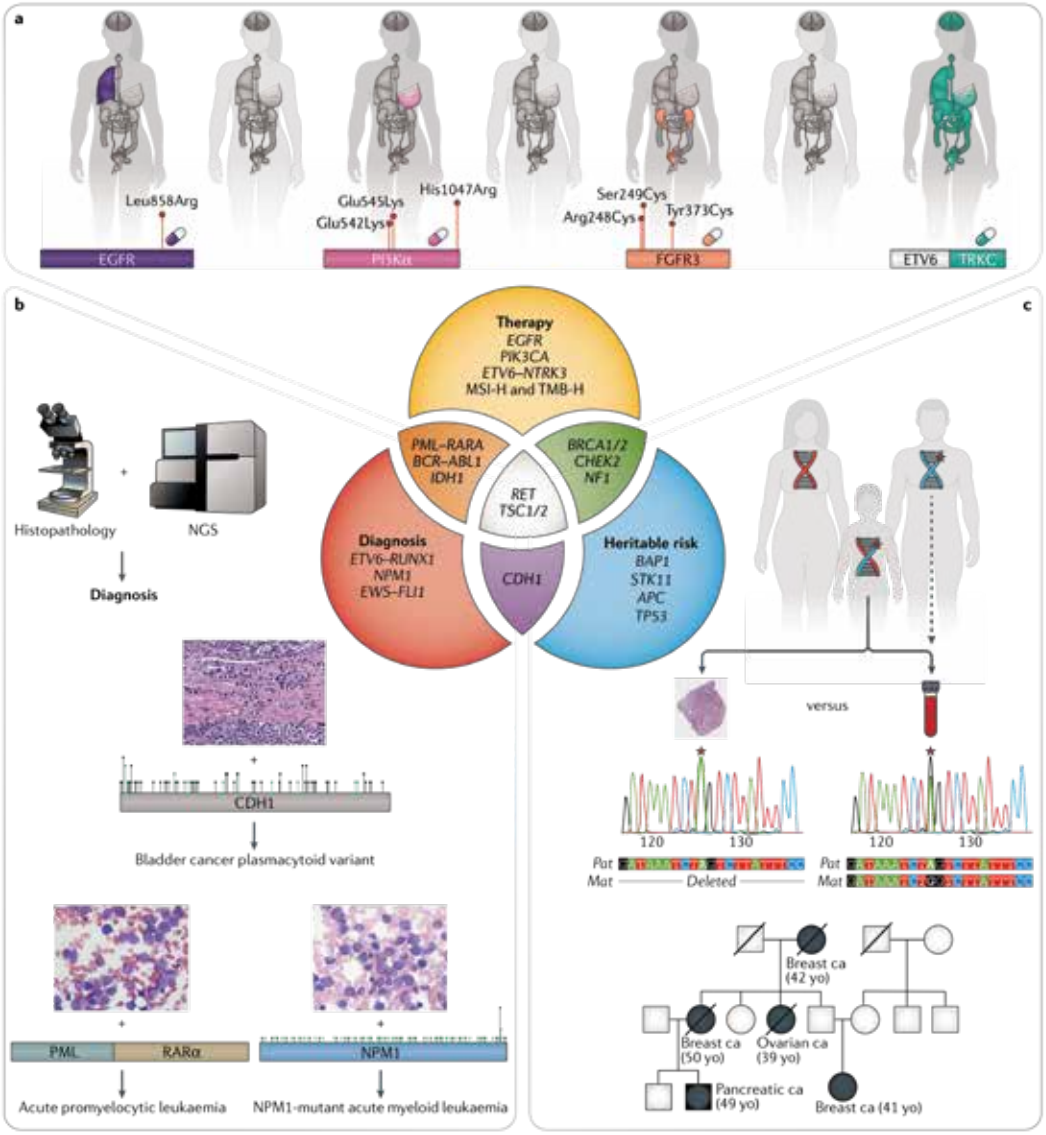
در چارچوب این مقاله، DNA تومور در گردش، یعنی قطعات DNA که توسط تومور به خون ریخته می‌شود.
کارآزمایی‌های سبد: یک طرح کارآزمایی بالینی که به‌طور آینده‌نگر بیمارانی را با تغییرات مولکولی خاص صرف‌نظر از نوع تومور جمع‌آوری می‌کند.

جهش‌های DNA به‌عنوان نشانگرهای زیستی پاسخ درمانی

همه جهش‌های یک ژن، خواص بیولوژیکی و پیامدهای بالینی یکسانی ندارند. جهش‌های سوماتیک به جهش‌هایی که انکوژن هستند (محرک) در مقابل جهش‌های بیولوژیکی بی‌اثر (مسافر- منتقل شونده) طبقه‌بندی می‌شوند. در میان محرک‌ها، زیرمجموعه‌ای بیومارکرهای پیش‌بینی‌کننده پاسخ دارویی یا به اصطلاح جهش‌های قابل عمل بالینی هستند. موفقیت استراتژی‌های انکولوژی دقیق به پزشکان نیاز دارد که تغییرات مولکولی قابل عمل بالینی را از انواع خوش‌خیم تشخیص دهند و درک کنند که چگونه تفاوت‌ها در خواص بیولوژیکی آلل‌های جهش‌یافته فردی بر پاسخ درمان و نتایج بیمار تأثیر می‌گذارد. در حال حاضر، بیشتر جهش‌هایی که از نظر بالینی قابل عمل هستند، هدف مهارکننده‌های کیناز مولکولی کوچک یا آنتی‌بادی‌هایی هستند که به گیرنده‌های سطح سلولی متصل می‌شوند. جهش‌های قابل عمل همچنین ممکن است حساسیت به داروهایی که از طریق یک مکانیسم کشنده مصنوعی عمل می‌کنند، مانند مهارکننده‌های پلی (ADP-ribose) پلیمراز (PARP) را افزایش دهند که در تومورهایی با جهش‌های «از دست دادن عملکرد» در ژن‌هایی که نوترکیبی همولوگ را واسطه می‌کنند مانند ترمیم DNA مبتنی بر BRCA1 و BRCA2 مؤثر هستند. جهش‌های ژنی در مسیرهای ترمیم DNA نیز پیش بینی کننده پاسخ به شیمی درمانی و ایمونوتراپی سیتوتوکسیک هستند.

چالش‌های تفسیر انواع سرطان‌ها

یک مانع بزرگ در پذیرش گسترده‌تر سرطان شناسی دقیق، دشواری در تشخیص انواع عملکردی از خوش خیم است، حتی در ژن‌های سرطانی که به خوبی مطالعه شده اند.
در مورد انکوژن‌ها، جهش‌های عملکردی معمولاً فعالیت آنزیمی را افزایش می‌دهند یا سیگنال‌دهی انکوپروتئین را از طریق دایمر شدن یا در نتیجه تغییر میل ترکیبی و فعال‌سازی عوامل پایین‌دستی القا می‌کنند.
از آنجایی که تنها یک زیرمجموعه کوچک از جهش‌های بالقوه در یک انکوژن قادر به القای فعال‌سازی از طریق این مکانیسم‌ها هستند، مطالعات مبتنی بر جمعیت برای شناسایی جهش‌های احتمالی افزایش عملکرد بر اساس عود آن‌ها، به‌اصطلاح کانون‌های جهشی، استفاده شده‌اند. اگرچه عود جهشی در یک جمعیت معمولاً نتیجه انتخاب مثبت برای یک فنوتیپ عملکردی است، انواع عود کننده غیرعملکردی («نقاط داغ مسافری») برای مثال، دآمیناسیون سیتوزین با واسطه APOBEC3A



شکل -۱ کاربردهای بالینی توالی‌یابی تومور.

پروفایل تومور می‌تواند با شناسایی جهش‌ها یا انواع ساختاری که نشانگرهای زیستی پیش‌بینی‌کننده پاسخ دارویی هستند (قسمت الف)، به تشخیص سرطان و زیرنوع (بخش ب) کمک می‌کند، یا افزایش خطر سرطان ارثی (قسمت ج) را افزایش می‌دهد.

همانطور که در بخش الف مشخص شد، نشانگرهای زیستی پیش‌بینی‌کننده پاسخ دارویی می‌توانند زیرگروه تومور خاص یا آگنوستیک تومور باشـــند. برخی تغییرات جسمی، مانند جابجایی BCR-ABL1، هم برای یک زیرگروه سرطانی تشخیصی هستند و هم نشانگرهای زیستی پیش بینی کننده پاسخ دارویی. زیرمجموعه‌ای از جهش‌های ژرمینال، مانند جهش‌های غیرفعال در ژن‌های سرکوب‌کننده تومور BRCA1 و BRCA2، هر دو پیش‌بینی‌کننده پاسخ دارویی هستند و با افزایش خطر ارثی مرتبط هستند. جهش‌های ژرم لاین(لاین سلولی زایا) CDH1 با افزایش خطر ابتلا به سرطان منتشر ارثی معده مرتبط است، در حالی که جهش‌های سوماتیک CDH1 پاتوگنومونیک نوع پلاسماسیتوئیدی سرطان مثانه هستند.

EGFR: گیرنده فاکتور رشد اپیدرمی

MSI-H: ناپایداری ریزماهواره- بالا

NGS: توالی‌یابی نسل بعدی

TMBH، بار جهشی تومور-بالا

در حلقه‌های سنجاق سر کوتاه DNA می‌توانند در مکان‌های ذاتاً تغییرپذیر ایجاد شوند.
برای ژن‌های سرکوب‌کننده تومور، واریانت‌های کوتاه‌کننده پروتئین (جهش‌های فریم‌شیفت، ردیف ژنی، یا جهش‌های محل اتصال) اغلب بر اساس توانایی آن‌ها در ترویج پوسیدگی mRNA با واسطه بی‌معنی، انکوژنیک (طبقه‌بندی شده به عنوان «احتمالاً انکوژن») فرض می‌شوند.
بنابراین، جهش‌های انکوژنیک و احتمالاً انکوژنیک معمولاً در سراسر توالی کدکننده ژن‌های سرکوب‌کننده تومور توزیع می‌شوند و استنتاج‌های محاسباتی مانند عود را برای تمایز بین انواع عملکردی و خوش‌خیم کمتر مفید می‌کنند.
جهش‌های نئومورفیک فنوتیپ‌های جدیدی ایجاد

جعبه ۱ - سرطان ریه به عنوان مدلی برای سرطان‌شناسی دقیق (انکولوژی دقیق)

مهارکننده‌های تیروزین کیناز گیرنده فاکتور رشد پوستی(EGFR (gefitinib و erlotinib اولین درمان‌های هدفمندی بودند که مجوز اداره غذا و دارو (FDA) را برای درمان بیماران مبتلا به سرطان ریه دریافت کردند.
مهارکننده‌های EGFR در ابتدا به روش تومور و جهش آگنوستیک مورد آزمایش قرار گرفتند، و در حالی که فعالیت بالینی محدودی در اکثر انواع سرطان مشاهده شد، تسکین سریع علائم و پسرفت چشمگیر تومور در اقلیت (۱۵ تا ۲۰٪) از بیماران سرطان ریه مشاهده شد. پاسخ‌ها در افرادی که هرگز سیگار نکشیدند و در زنان آسیایی رایج‌تر بود، که نشان می‌دهد تفاوت‌های اساسی در پاتوژنز بیماری، مبنای احتمالی پاسخ‌های متغیر به مهارکننده‌های eGFr در میان بیماران مبتلا به سرطان ریه است. مطالعات گذشته نگر بعداً نشان داد که اکثریت قریب به اتفاق پاسخ دهندگان دارای جهش‌های سوماتیک افزایش عملکرد در ژن EGFR هستند که باعث فعال سازی سازنده eGFr و وابستگی به انکوژن می‌شود.
از آنجایی که توسعه پیش بالینی مهارکننده‌های تیروزین کیناز eGFr قبل از آغاز توالی‌یابی در مقیاس بزرگ مانند اطلس ژنوم سرطان (tCGa) که از آن زمان چشم‌انداز ژنومی اکثر زیرگروه‌های سرطان را تعریف کرده است، قبل از مطالعات بالینی اولیه ژفیتینیب و ارلوتینیب، نمی‌دانستیم که جهش‌های فعال‌کننده در ژن EGFR در سرطان ریه متداول هستند.
در واقع، مهارکننده‌های EGFR ابتدا مجوز FDA برای درمان تمام بیماران مبتلا به سرطان ریه غیرسلول‌های کوچک (NSCLC) بدون توجه به وضعیت جهشی EGFR دریافت کردند، و تا چند سال پس از آن کارایی بالینی آزمون جهشی EGFR موضوع بحث و اختلاف فعالیت بود.
با توجه به گزینه‌های درمانی محدود موجود در آن زمان برای بیماران مبتلا به سرطان ریه متاستاتیک(پیشرفته) و این احتمال که بیان بیش از حد eGFr یا فعال سازی eGFr کیناز مبتنی بر لیگاند نیز می‌تواند وابستگی به eGFr و حساسیت دارویی ایجاد کند، بسیاری از پزشکان به درمان تمام بیماران مبتلا به NSCLC پیشرفته با مهارکننده‌های تیروزین کیناز EGFR بدون توجه به وضعیت جهشی EGFR حمایت می‌کردند.
در طول دهه گذشته، چندین مشاهدات بالینی و آزمایشگاهی به این توصیه منجر شده است که پروفایل ژنومی تومور بالینی برای همه بیماران مبتلا به سرطان ریه به طور موضعی پیشرفته و متاستاتیک برای انتخاب رویکرد درمان ضروری است.
ابتدا، شناسایی و اعتبارسنجی بالینی تغییرات انکوژنیک قابل هدف اضافی در ERBB2، BRAF، RET، ROS1، ALK و MET، در یک الگوی کاملاً منحصر به فرد متقابل در بیماران مبتلا به سرطان ریه، نشان داد که این تغییرات و سایر تغییرات سرطان زا هنوز قابل درمان نیستند، مانند جهش‌های KRAS زیرگروه‌های متمایزی از بیماران مبتلا به سرطان ریه را تعریف می‌کنند که پیش‌آگاهی، ویژگی‌های بالینی و پاسخ به درمان آنها تا حدی به وجود یا عدم وجود این تغییرات ژنومی مکرر مرتبط است.
دوم، آزمایش‌های بالینی روی بیماران مبتلا به سرطان ریه و کولورکتال نشان داد که درمان‌های هدفمند eGFr نه تنها مؤثر نیستند، بلکه می‌توانند برای بیماران مبتلا به تومورهای نوع وحشی eGFr به دلیل سمیت آنها یا تسریع رشد تومور ناشی از دارو مضر باشند.
احتمال دوم، اگرچه در ابتدا توسط برخی بعید تلقی می‌شد، توسط مطالعات همزمان تأیید شد که نشان می‌دهد مهارکننده‌های raF می‌توانند به طور متناقضی سیگنال‌دهی مسیر MaPK را در سلول‌های نوع وحشی BraF فعال کنند و رشد پوست مخفی و سایر سرطان‌های نوع وحشی BraF را تسریع کنند.
به عنوان نوع توموری با بیشترین تعداد ژن که درمان‌های هدفمند برای آن توسط سازمان غذا و دارو (FDA) تایید شده است، نیاز به شناسایی چندین نشانگر زیستی خاص سرطان ریه و تومورآگنوستیک پاسخ دارویی در تعداد زیادی از بیماران مبتلا به ریه است. سرطان باعث ایجاد و پذیرش بالینی نسل بعدی بزرگتر توالی‌یابی مبتنی بر تومور و پانل‌های توالی‌یابی DNA بدون سلول شده است.

می‌کنند که به سادگی عملکرد پروتئین نوع وحشی را تقویت یا مختل نمی‌کنند.

بنابراین، عدم مشاهده یک فنوتیپ متعارف در مطالعات بیولوژیکی مبتنی بر آزمایشگاه همیشه به این معنی نیست که یک جهش یک نوع خوش‌خیم است.

به عنوان مثال، در حالی که وظیفه اصلی زیرواحد p85α کدگذاری شده با PIK3R1 کیناز PI3 تنظیم محصول کاتالیزوری p110α در جایگاه PIK3CA است، پروتئین جهش یافته ناشی از یک جهش معمولی عود کننده برش دهنده PIK3R1 (p.Arg348) غیرقابل تغییر است. برای اتصال به p۱۱۰α. در عوض، با عمل به عنوان داربستی برای سیگنال دهی واسطه‌ها در مسیر JNK، بقای سلولی را افزایش می‌دهد و در نتیجه فعالیت مسیر JNK و MAPK را افزایش می‌دهد.

جهش‌های افزایش عملکرد در همان انکوژن همچنین می‌توانند خواص بیولوژیکی متمایزی داشته باشند که منجر به تفاوت در حساسیت دارویی می‌شود.

حساسیت‌های دارویی خاص آلل جهش یافته ممکن است به دلیل تفاوت در میل اتصال به دارو یا در مورد BRAF، تفاوت در توانایی جهش‌یافته برای ترویج تشکیل دایمر BRAF باشد.

علاوه بر پیچیده‌تر کردن کار طبقه‌بندی انواع، جهش‌ها می‌توانند فنوتیپ‌های مختلفی بسته به اصل و نسب تومور یا زمینه هم‌جهش داشته باشند.

به عنوان مثال، مطالعات آزمایشگاهی نشان می‌دهد که مهارکننده RAF وموراfنیب به‌شدت پروتئین جهش یافته BRAF-V600E را در سنجش‌های بدون سلول مهار می‌کند.

با این حال، احتمال اینکه یک بیمار مبتلا به تومور جهش یافته BRAF-V600E به وموراfنیب پاسخ دهد به شدت تحت تأثیر نوع تومور است.

در حالی که اکثر بیماران مبتلا به ملانوم و هیستیوسیتوز به وموراfنیب پاسخ می‌دهند، تک‌تراپی مهارکننده RAF فعالیت بالینی محدودی در بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال دارد که به دلیل مقاومت ذاتی مهارکننده RAF به واسطه تشکیل دایمر RAF فعال شده با EGFR است.

این بینش بیولوژیکی مبنای مولکولی برای آزمایش‌های ترکیبی آنتی‌بادی ضد EGFR ستوکسیماب و مهارکننده RAF انکورافنیب بود که در آوریل ۲۰۲۰ برای بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال جهش یافته BRAF-V600E مورد تأیید FDA قرار گرفت.

در مجموع، علی‌رغم تلاش‌های گسترده در چندین دهه گذشته برای تعریف ویژگی‌های بیولوژیکی جهش‌های سرطانی به عنوان راهنمایی برای تفسیر بالینی، بسیاری از جهش‌های سوماتیکی که با پروفایل ژنومی تومور بالینی شناسایی شده‌اند، انواعی با اهمیت بیولوژیکی و بالینی ناشناخته هستند.

این امر حتی برای ژن‌های سرطانی که به طور گسترده مورد مطالعه قرار گرفته‌اند مانند BRAF که مهارکننده‌های هدفمند برای استفاده بالینی توسط FDA تأیید شده‌اند، صادق است.

درک این موضوع که جهش‌های مختلف در یک ژن اغلب دارای ویژگی‌های بیولوژیکی متفاوتی هستند، تفسیر تعداد زیادی از گونه‌های جسمی و ژرمینی که از پروفایل ژنومی تومور بالینی به وجود می‌آیند، برای پزشکان نقطه‌ی مراقبت چالش برانگیز است.

نگرانی ویژه این است که بیماران ممکن است بر اساس عدم تشخیص پزشکان در تشخیص اینکه برخی جهش‌ها در یک ژن سرطانی قابل عمل نسبت به داروی انتخابی بی اثر هستند یا به صورت ذاتی مقاوم هستند، تحت درمان اشتباه قرار گیرند.

به عنوان مثال، در حالی که بسیاری از جهش‌های اگزون EGFR انکوژن هستند، معمولاً نسبت به مهارکننده‌های EGFR مورد تایید FDA ارلوتینیب و اوسیمرتینیب حساس نیستند.

چالش تفسیر انواع بالینی باعث توسعه ابزارهای حمایتی پزشک مانند OncoKB، CIViC (تفسیر بالینی انواع سرطان)، پایگاه دانش بالینی آزمایشگاهی جکسون (JAX-CKB)، پایگاه دانش پزشکی دقیق (PMKB) شده است. مفسر ژنوم سرطان پایگاه داده نشانگرهای زیستی سرطان (CGI) و منبع درمان سرطان شخصی (PCT)، که به دنبال فهرست‌بندی خواص بیولوژیکی شناخته شده و پیامدهای بالینی آلل‌های جهش یافته فردی است.

همانطور که درک ما از پیامدهای بالینی جهش‌های فردی به طور مداوم در حال تغییر است و از آنجایی که داروهای جدید تحقیقاتی وارد آزمایشات بالینی می‌شوند و یا توسط سازمان‌های نظارتی تایید می‌شوند یا در جمعیت‌های

تعریف شده ژنتیکی کارآیی نشان نمی‌دهند، این ابزارهای تفسیری متفاوت باید به طور مداوم به روز شوند تا از طریق نظارت متخصصین جامع و دقیق باقی بمانند.

چشم انداز فعلی عمل بالینی

یک انتقاد طولانی مدت از رشته انکولوژی دقیق این است که طرفداران آن اغلب در مورد عملکرد بالینی ژن‌های فردی یا گونه‌های ژنومی اغراق می‌کنند.

جهش‌هایی که از نظر بالینی تایید شده و توسط FDA به عنوان نشانگرهای زیستی پیش‌بینی‌کننده پاسخ دارویی به رسمیت شناخته شده اند، اغلب با جهش‌هایی که از نظر بالینی قابل عمل هستند، با هم گروه‌بندی می‌شوند و جهش‌هایی که به عنوان مبنای فرضی برای پاسخ‌های استثنایی یا انواعی که با حساسیت افزایش یافته در غربالگری‌های مبتنی بر سلول مرتبط هستند، شناسایی می‌شوند.

برای انتقال بهتر قدرت شواهدی که از عملکرد بالینی آلل‌های جهش یافته حمایت می‌کنند، بسیاری از پایگاه‌های دانشی تغییرات ژنومی را بر اساس سطح داده‌های بالینی و/یا بیولوژیکی که استفاده از آنها را به‌عنوان نشانگرهای زیستی پیش‌بینی‌کننده پاسخ یا مقاومت دارویی پشتیبانی می‌کنند طبقه‌بندی می‌کنند. در حالت مطلوب، این پایگاه‌های اطلاعاتی باید اطلاعاتی را در مورد اینکه چگونه اصل و نسب و زمینه جهشی بر احتمال پاسخ بالینی تأثیر می‌گذارند، در بر گیرند.

به عنوان مثال، در پایگاه دانش OncoKB، جهش‌های سطح ۱ و ۲ آن دسته از انواعی هستند که از طریق تجربه بالینی (ترجیحاً کارآزمایی‌های بالینی تصادفی‌شده آینده‌نگر) ایجاد شده‌اند تا نشانگرهای زیستی پیش‌بینی‌کننده پاسخ دارویی به درمان‌های مورد تأیید FDA در یک زیرگروه خاص سرطان باشند (جدول ۱).

سطوح پایین‌تر به جهش‌هایی با شواهد بالینی قانع‌کننده اما هنوز قطعی (سطح ۳) یا فقط شواهد آزمایشگاهی (سطح ۴) که جهش پیش‌بینی‌کننده حساسیت دارویی است، اختصاص داده می‌شود. از آنجایی که جهش‌های مختلف در یک ژن می‌توانند فنوتیپ‌های متفاوتی داشته باشند، انواع مختلف ژن‌های مرتبط با سرطان را می‌توان به سطوح مختلف OncoKB اختصاص داد.

علاوه بر این، از آنجایی که اصل و نسب تومور اغلب بر احتمال پاسخ دارویی تأثیر می‌گذارد، جهش مشابهی را می‌توان به سطوح مختلف OncoKB در انواع مختلف سرطان نسبت داد.

بر خلاف تنظیمات جرم‌لاین، که در آن تفسیر خط زایا(ژرم لاین)، بیماری زایی واریانت‌های مختلف از طریق تلاش مشترک کالج آمریکایی ژنتیک پزشکی و ژنومیک (ACMG) و انجمن آسیب شناسی مولکولی (AMP) استانداردسازی شده است تا به امروز هیچ توافق گسترده‌ای بین پایگاه‌های دانش و تنظیم کننده‌ها در مورد بهترین روش برای تعریف عملکرد بالینی واریانت‌های سوماتیک وجود ندارد.

برای پرداختن به این موضوع، AMP، انجمن آمریکایی انکولوژی بالینی (ASCO) و انجمن اروپایی انکولوژی پزشکی (ESMO) گروه‌های کاری را ایجاد کرده‌اند تا دستورالعمل‌هایی درباره بهترین روش طبقه‌بندی ارتباط بالینی و بیولوژیکی انواع ژنومی شناسایی‌شده توسط سنجش‌های بالینی پروفایل ژنومی تومور ایجاد کنند.

علاوه بر این، اتحادیه‌های مشارکتی میان مؤسسات مانند کنسرسیوم تفسیر نسخه (VICC) و کارگروه نسخه سوماتیک ClinGen برای استانداردسازی بهترین شیوه‌ها و تعریف واژگانی تشکیل شده است که در آینده می‌تواند به شناسایی پایگاه‌های داده‌های مختلف به عنوان ابزار پشتیبانی پزشک توسط FDA کمک کند.

برای تخمین کسر فعلی بیماران مبتلا به سرطان که پیش بینی می‌شود پروفایل ژنومی تومور به طور مستقیم بر انتخاب درمان تأثیر بگذارد، ما گروهی از ۵۲۰۶۹ نمونه تومور جامد را که از نوامبر ۲۰۲۰ در مرکز سرطان Memorial Sloan Kettering (MSK) با استفاده از پلتفرم NGS بالینی MSK-IMPACT توالی‌یابی شدند، تجزیه و تحلیل کردیم.

در این مجموعه داده آینده‌نگر، ۹۲ درصد از تومورها حداقل دارای یک جهش انکوژن هستند و ۳۴ درصد حداقل دارای یک جهش هستند که به عنوان نشانگر زیستی پیش‌بینی‌کننده پاسخ به یک داروی مورد تأیید FDA یا تحقیقاتی بر اساس داده‌های بالینی قانع‌کننده طبقه‌بندی شده است (OncoKB, سطوح 3A–1) (شکل ۲a,b).

جدول ۱. نشانگرهای زیستی با استاندارد OncoKB

بیومارکر ژنتیکی	نشانه	درمان هدفمند
سطح شواهد ۱		
همجوشی BCR -ABL1	ALL، CML	ایماتینیب، داساتینیب ، بوسوت inib ، nilotinib
ABL1 Thr315 le		پوناتینیب
همجوشی‌های ALK	NSCLC	کریزوتینیب ، سرتینیب ، الکتینیب
همجوشی‌های ALK و جهش‌های انکوژنیک	NSCLC	بریگاتینیب ، لورلاتینیب
ATM ,BARD1 ,BRIP1 ,CDK12 ,CHEK1 / CHEK2 ,	سرطان پروستات	اولاپاریب
FANCL، PALB2، RAD51B /RAD51C / RAD51D،		
جهش‌های از دست دادن عملکرد RADS4L		
جهش‌های BRCA1/BRCA2 از دست دادن عملکرد	سرطان تخمدان، صفاق	اولاپاریب ، روکاپاریب، نیراپاریب *
	کارسینوم سروزی،	
	سرطان پروستات	
BRAF Val600Glu	سرطان تیروئید آناپلاستیک، NSCLC	دبرافنیب +trametinib
	سرطان روده بزرگ	Encorafenib + cetuximab
BRAF Val600Glu /Lys	ملانوما	دابرافنیب + ترامتینیب،
		انکورافنیب + بینیمتینیب ،
		vemurafenib + cobimetinib ,vemurafenib +c
		اوبیمتینیب + اتزولیزوماب
BRAF Val600	بیماری اردهیم –چستر	مورافنیب
حذف‌های اگزون ۱۹ EGFR، EGFR Leu858Arg	NSCLC	Erlotinib,gefitinib, afatinib , dacomitinib,
		اوسیمرتینیب
EGFR Gly719 ,Leu861Gln ,Ser768lle		آفاتینیب
EGFR Thr790Met		اوزیمرتینیب

بیومارکر ژنتیکی	نشانه	درمان هدفمند
تقویت ERBB2	سرطان پستان	تراستوزوماب + شیمی درمانی
		+ pertuzumab /capecitabine + tucatinib ،
		آدو-تراستوزوماب امتانسین ، لاپاتینیب
		+لتروزول / کاپسیتابین، نراتینیب
		±کاپسیتابین، فام -تراستوزوماب
		deruxtecan – nxki
	سرطان مری معده	Trastuzumab ,fam -trastuzumab deruxtecan-nxki
EZH2 Ala692Val, Tyr646Cys/Phe/ Hys/Asn/Ser	لنفوم فولیکولار	تازمتوستات
همجوشی‌های FGFR2	کلانژیوکارسینوما	پمیگاتینیب
فیوژن FGFR2 و FGFR3 هات اسپات (, FGFR 3Gly370Cys,Arg248 Cys (Ser249Cys,Tyr 373Cys	سرطان مثانه	اردفیتینیب
تکرار پشت سر هم داخلی FLT3 و FLT3 جهش انکوژنیک، از جمله Asp835 و Ile836	لوسمی میلوئید حاد	گیلتریتینیب
جهش‌های انکوژن IDH1/IDH2	سرطان مثانه	lvosidenib ، enasidenib
KIT اگزون ۱۱،۹،۱۷ KIT Val654Ala و KIT جهش های انکوژنی Thr670lle	استرومای گوارشی تومورها	ایماتینیب، سونیتینیب، ریگوافنیب، ریپرتینیب
KRAS از نوع وحشی	سرطان روده بزرگ	ستوکسیماب، پانیتومومااب، رگورافنیب
اگزون MET 14 splice /exon -skipping جهش ها	NSCLC	کاپماتینیب
جهش NF1 از دست دادن عملکرد	نوروفیبروم	سلومتینیب
MSI -H /TMB -H	همه تومورهای جامد	پمبرولیزوماب
MSI -H	سرطان روده بزرگ	Ipilimumab +nivolumab ,nivolumab
همجوشی NTRK1 /NTRK2 /NTRK3	همه تومورهای جامد	لاروترکتینیب ، انترکتینیب
همجوشی COL1A1 -PDGFB	درماتوفیبروسارکوم برآمدگی ها	ایماتینیب
فیوژن FIP1L1 -PDGFRA	CEL -NOS	ایماتینیب
ادغام PDGFRA / PDGFRB	میلودیسپلاستیک / میلوپرولیفراتیو نئوپلاسم ها	ایماتینیب

بیومارکر ژنتیکی	نشانه	درمان هدفمند
PDGFRa Asp842 Val، Asp842 Tyr، Asp842 Hys845 del ,Asp842_Hys84 5insVal	استرومای گوارشی تومور	آواپریتینیب
جهش‌های انکوژنیک PIK3CA	سرطان پستان – ER /HER۲	Alpelisib +fulvestrant
همجوشی‌های RET	NSCLC	سلپرکاتینیب، پرلاستینیب
	سرطان تیروئید	
جهش‌های انکوژنیک RET	سرطان مدولاری تیروئید	سلپرکاتینیب، پرلاستینیب
همجوشی ROS1	NSCLC	کریزوتینیب، انترکتینیب
جهش‌های از دست دادن عملکرد SMARCB1	سارکوم اپیتلیوئیدی	تازمتوستات
جهش‌های TSC1/TSC2 از دست دادن عملکرد	سلول غول پیکر زیر اپاندیمی آستروسیتوم	اورولیموس
سطح شواهد ۲		
همجوشی BCR -ABL1	همه	بوسوتینیب، نیلوتینیب
ABL1 Glu255 Lys، Glu255Val، Phe317Cys،	ALL، CML	بوسوتینیب، داساتینیب، نیلوتینیب
Phe317lle، Phe317 Leu، Phe317Val،		
Phe359Cys، Phe 359lle، Phe359 Val،		
Thr315Ala ,Tyr 253His		
همجوشی‌های ALK	التهابی تومور میوفیبروبلاستیک	کریزوتینیب،سریتینیب
BRAF Val600Glu	گانگلیوگلیوما، مودار	کوبی متینیب + مورافنیب، trametinib +dabrafenib ,vemurafenib
	لوسمی سلولی، پیلوسیتیک	
	آستروسیتوم، پلئومورفیک	
	زانتوآستروسیتوما	
جهش‌های BRCA1/BRCA2 از دست دادن عملکرد	سرطان پستان	اولاپاریب، تالازوپاریب
تقویت CDK4	تمایز زدایی شده	پالبوسیکلیب،آبماسیکلیب
	لیپوسارکوم،	
	به خوبی متمایز شده است	
	لیپوسارکوم	

بیومارکر ژنتیکی	نشانه	درمان هدفمند
EGFR Ala763_Tyr 764insPheGlnGluAla	NSCLC	ارلوتینیب
تقویت ERBB۲	سرطان روده بزرگ	, Pertuzumab +trastuzumab لاپاتینیب +trastuzumab
	سرطان سروزی رحم / سروز پاپیلاری رحم سرطان	تراستوزوماب + کربوپلاتین - تاکسول رژیم
جهش های انکوژنیک ERBB۲	NSCLC	Ado-trastuzumab emtansine
جهش انکوژنیک اگزون ۱۷ KIT	استرومای گوارشی تومور	سورافنیب
KIT جهش های انکوژنیک	ملانوما	ایماتینیب، سونیتینیب
MET اگزون ۱۴ جهش اسپلایس، تقویت	NSCLC	کریزوتینیب
تقویت MET	کارسینوم سلول کلیه	کابوزانتینیب
جهش انکوژنیک PDGFRA، PDGFRa Asp842Val	استرومای گوارشی تومور	ایماتینیب، داساتینیب
همجوشی‌های RET	NSCLC	کابوزانتینیب

اگرچه تمرکز قابل توجهی بر روی استفاده از NGS با پنل گسترده برای شناسایی نشانگرهای زیستی تحقیقاتی پاسخ دارویی وجود دارد، پذیرش گسترده پروفایل تومور مبتنی بر NGS اساساً ناشی از نیاز به شناسایی جهش‌های سوماتیک و ژرم لاینی است که نشانگرهای زیستی پیش‌بینی‌کننده پاسخ به درمان‌های مورد تأیید FDA هستند.

از سال ۲۰۱۷، افزایش تقریباً سه برابری از ٪۹ به ٪۳۰ در بخش تومورهایی که با یک بیماری مشابه هستند، وجود داشته است. بیومارکر پیش‌بینی‌کننده مراقبت استاندارد پاسخ به یک درمان تایید شده توسط FDA توسط NGS تومور، که به عنوان سطوح ۱ و ۲ OncoKB تعریف می‌شود، شناسایی می‌شود (شکل ۲b). این افزایش در عملکرد بالینی مراقبت استاندارد تا حدی نتیجه تاییدیه‌های اخیر FDA از مهارکننده‌های انتخابی درجه یک شامل مهارکننده‌های زیر است:

IDH2 لوسمی میلوئید حاد ۲۰۱۷ AML

IDH1 لوسمی میلوئید حاد ۲۰۱۸ AML

TRKA/TRKB/TRKC تومور اگنوستیک ۲۰۱۸

PI۳Kα سرطان پستان ۲۰۱۹

FGFR3 سرطان مثانه ۲۰۱۹

FGFR2 کلانژیوکارسینوما ۲۰۲۰

RET سرطان ریه و تیروئید ۲۰۲۰

چشم انداز عملکرد بالینی نیز از طریق تأیید FDA در مورد نشانه‌های اضافی برای مهارکننده‌های PARP برای سرطان سینه (در سال ۲۰۱۸)، سرطان پانکراس (در سال ۲۰۱۹) و سرطان پروستات (در سال ۲۰۲۰) و مهارکننده‌های RAF و MEK برای سرطان ریه (در سال ۲۰۱۸) بیماری Erdheim-Chester (در سال ۲۰۱۷)، سرطان تیروئید آناپلاستیک (در سال ۲۰۱۸) و سرطان کولورکتال (در ترکیب با آنتی بادی ضد EGFR cetuximab در سال ۲۰۱۸) گسترش یافته است.

علاوه بر این، سه دسته از تغییرات مولکولی (همجوشی‌های NTRK1/NTRK2/NTRK3، ترمیم عدم تطابق زیاد/ناپایداری ریزماهواره‌ای (MSI-H/dMMR) و بار جهشی تومور بالا (TMB-H، تعریف شده به عنوان ≤۱۰ جهش در هر مگاباز) DNA در حال حاضر توسط FDA به عنوان نشانگرهای زیستی تومورآگنوستیک پاسخ دارویی شناخته شده‌اند. از آنجایی که حداقل یکی از این بیومارکرهای پیش‌بینی‌کننده تومور اساساً در همه زیرشاخه‌های سرطان گزارش شده است، پروفایل مولکولی تومور اکنون توسط اکثر انکولوژیست‌ها به عنوان یک ضرورت بالینی در همه بیماران مبتلا به سرطان متاستاتیک که نیاز به درمان سیستمیک دارند، در نظر گرفته می‌شود.

اگرچه تاییدیه‌های اخیر FDA در مورد درمان‌های بیشتر مبتنی بر ژنوتیپ نشان‌دهنده پیشرفت واضح است، احتمال شناسایی یک تغییر ژنومی قابل عمل بالینی همچنان به شدت وابسته به نوع تومور باقی می‌ماند، از ٪۸۰ بیشتر در تومورهای استرومایی گوارشی (GIST) و ٪۶۴ در سرطان ریه با سلول غیر کوچک، کمتر از ۱۰ درصد در گلیوما، سرطان پانکراس و مزوتلیوم (شکل ۲c). همچنین می‌توان استدلال کرد که افزایش اخیر در عملکرد مراقبت استاندارد تا حدودی مزایای پروفایل تومور توسط NGS را بیش از حد بیان می‌کند، زیرا بسیاری از تومورهای TMB-H در بیماران مبتلا به انواع تومور ایجاد می‌شوند که انسداد ایست بازرسی ایمنی از نظر بالینی صرف نظر از MSI نشان داده شده است. یا وضعیت TMB (شکل ۲c؛ کادر ۲). با این حال، پروفایل تومور با NGS همچنین می‌تواند با شناسایی جهش‌های پیش‌بینی‌کننده مقاومت دارویی (به اصطلاح جهش‌های مقاومتی) مانند جهش‌های KRAS و BRAF، که با مقاومت ذاتی به آنتی‌بادی‌های ضد EGFR مراقبت استاندارد در بیماران مرتبط است، مفید باشد. با سرطان کولورکتال بنابراین، پروفایل ژنومی تومور بالینی می‌تواند برای بیماران مفید باشد، زیرا به آنها اجازه می‌دهد از درمان‌های سمی بالقوه خودداری کنند که بعید است بر اساس مشخصات مولکولی تومور به سود بالینی منجر شود. در کوتاه‌مدت، مهم‌ترین مانع برای موفقیت گسترده‌تر پارادایم‌های انکولوژی دقیق، تعداد محدود ژن‌های موجود در پانل‌های مبتنی بر NGS نیست، بلکه تعداد زیادی جهش‌های سرطان‌زای «غیرقابل درمان» شناسایی‌شده توسط پروفایل ژنومی تومور است. تجربه آینده نگر MSK-IMPACT نشان می‌دهد که محرک‌های میتوژنیک غیرقابل درمان در بیمارانی که تغییرات بالینی قابل عمل ندارند، رایج هستند. نمونه‌هایی از جهش‌های انکوژنیک که در حال حاضر قابل عمل نیستند عبارتند از جهش‌های NF۱، PTEN،

RB1، STK11 و KEAP1. برای برخی از محرک‌های غیرقابل درمان، عوامل پایین‌دست به طور بالقوه قابل هدف هستند (به عنوان مثال، استفاده از مهارکننده‌های MEK در تومورهای جهش یافته KRAS). با این حال، داروهایی که عوامل پایین دست را هدف قرار می‌دهند، معمولاً سطوح اثربخشی بالینی داروهایی را که مستقیماً انکوپروتئین جهش یافته را مهار می‌کنند، نشان نمی‌دهند. نتایج امیدوارکننده اخیر با مهارکننده‌های کووالانسی KRAS p.Gly12Cys این امید را ایجاد کرده است که رویکردهای جدید برای توسعه دارو از جمله تخریب‌کننده‌های پروتئینی هدفمند و رویکردهای کشنده مصنوعی منجر به گسترش مداوم چشم‌انداز عملکرد بالینی در چند سال آینده شود.

لوسمی/لنفوم حاد لنفوبلاستیک ALL، سلول B. CEL-NOS، لوسمی ائوزینوفیلیک مزمن، در غیر این صورت مشخص نشده است. CML، لوسمی میلوژن مزمن؛ EGFR، گیرنده فاکتور رشد اپیدرمی؛ MSI-H، ناپایداری ریزماهواره- بالا. NSCLC، سرطان ریه غیر سلولی. TMB-H، بار جهش تومور- بالا. تاییدیه AFDA این دارو جهش آگنوستیک است. b در حالی که بیشتر درج‌های اگزون ۲۰ EGFR به مهارکننده‌های EGFR مورد تایید FDA مقاوم هستند، Ala763_ Tyr764insPheGlnGluAla به ارلوتینیب حساس است.

ادغام پروفایل سوماتیک و ژرم لاین(خط زایا)

خطر سرطان ارثی و فارماکوژنومیک. مدت‌هاست که مشخص شده است که برخی از خانواده‌ها و گروه‌های قومی در معرض خطر بیشتری برای ابتلا به سرطان‌های خاص هستند. برای مثال، افراد یهودی‌تبار اشکنازی در معرض افزایش خطر ابتلا به سرطان پستان و تخمدان زودرس هستند.

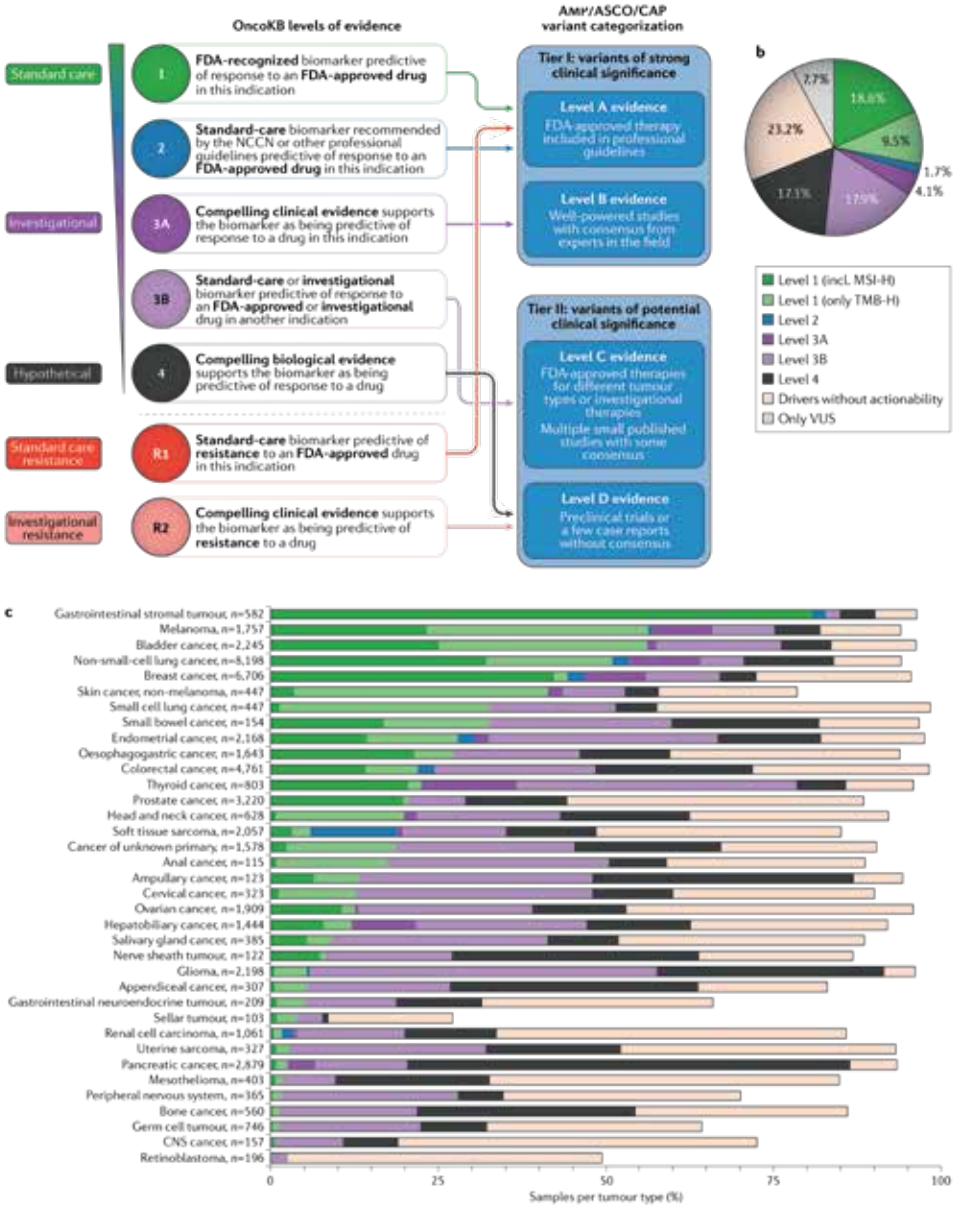
نیومن و همکاران ۹۲ با اعمال تجزیه و تحلیل جداسازی الگوهای بروز در گروهی متشکل از ۱۵۷۹ بیمار مبتلا به سرطان پستان، اولین کسانی بودند که نشان دادند یک آلل حساسیت اتوزومال غالب و بسیار نافذ مبنایی برای خوشه‌بندی خانوادگی موارد سرطان پستان با شروع زودرس است.

کلونینگ موضعی متعاقباً اولین ژن کاندید حساسیت به سرطان پستان، به نام BRCA1 را در کروموزوم 17q21 بومی سازی کرد. آزمایش بالینی برای انواع بیماری زا در BRCA1 و ژن‌های مستعد سرطان با نفوذ بالا و متوسط، از جمله BRCA2، CHEK2، PALB2، ATM، VHL، BAP1 و MSH2، در حال حاضر جزء مدیریت استاندارد تعداد رو به رشد سرطان است. انواع این آزمایش‌ها از یک نمونه DNA مشتق شده از بافت سالم («عادی»)، معمولاً خون، بریده ناخن یا سواب باکال استفاده می‌کنند. همانند سنجش‌های پروفایل ژنومی تومور، آزمایش‌های ژرمین تک ژنی به تدریج با پانل‌های مبتنی بر NGS چند ژنی که برای شناسایی انواع بیماری‌زای زایا در ده‌ها یا بیشتر ژن‌های مرتبط با سرطان وراثت‌پذیر طراحی شده‌اند، جایگزین شده‌اند. تجزیه و تحلیل زوجی نمونه‌های تومور و ژرمین مدت‌هاست که برای مطالعات توالی‌یابی کل اگزوم متمرکز بر تحقیق (WES) و توالی‌یابی کل ژنوم (WGS) استاندارد بوده است.

فیلتر کردن واریانت‌های ژرم لاین با استفاده از یک نمونه DNA نرمال منطبق با بیمار، امکان طبقه‌بندی دقیق‌تر جهش‌ها را به‌عنوان تغییرات سوماتیک در مقابل تغییرات ژرم لاین ارثی می‌دهد.

پنل‌های توالی‌یابی مبتنی بر NGS فقط بر اساس تومور - که اکنون به طور گسترده به عنوان تست‌های تشخیصی همراه برای انتخاب درمان استفاده می‌شود - به پایگاه‌های داده ژرم لاین موجود و الگوریتم‌های محاسباتی برای تشخیص انواع سوماتیک از ژرم لاین تکیه می‌کنند.

این می‌تواند منجر به طبقه‌بندی نادرست گونه‌های جرم‌لاین به عنوان جهش‌های سوماتیک شود، به ویژه برای بیماران اقلیت‌های نژادی و قومی، که در حال حاضر کمتر در پایگاه‌های اطلاعاتی انواع ژرم لاین ارائه شده‌اند. یک مزیت به همان اندازه مهم از ادغام تجزیه و تحلیل DNA ژرم لاین جفتی در پلتفرم‌های پروفایل ژنومی تومور، فرصتی برای تجزیه و تحلیل مجدد نمونه نرمال جفت شده برای شناسایی انواع بیماری زا مرتبط با افزایش خطر ابتلا به سرطان است. نشان داده شده است که پروفایل ژنومی تومور-ژرم لاین جفتی حداقل یک نوع بیماری زا یا احتمالی بیماری زا را در یک ژن مستعد سرطان در ۸ تا ۱۸ درصد از بیماران مبتلا به سرطان شناسایی می‌کند. شایان ذکر است، ۲۵ تا ۵۰ درصد از بیماران مبتلا به سرطان با واریانت‌های



شـــکل ۲ | چشـــم‌انداز فعلی عمل بالینی یک | سطوح شواهد OncoKB جهش‌های فردی یا تغییرات ساختاری بر اساس سطح شواهدی که نشـــان می‌دهد این تغییر یک نشـــانگر زیستی پیش‌بینی‌کننده پاسخ دارویی در یک زیرگروه خاص سرطان است (پانل سمت چپ) حاشیه‌نویسی می‌شود. نگاشت سطوح شواهد OncoKB به انجمن آسیب شناسی مولکولی (AMP) - کالج آسیب شناسان آمریکایی انجمن انکولوژی بالینی آمریکا (CAP) (ASCO) طبقه‌بندی انواع مبتنی بر شواهد۶۴ (پانل سمت راست).

b | عملکرد بالینی نمونه‌های تومور جامد به صورت آینده‌نگر با استفاده از روش توالی‌یابی بالینی نسل بعدی پروفایل تومور MSKIMPACT (تعداد = ۵۲۰۶۹). کسری از نمونه‌ها در تمام انواع سرطان تومور جامد که دارای جهشی هستند که از نظر بالینی قابل عمل با توجه به سطوح شواهد OncoKB (نمودار دایره‌ای) در نظر گرفته می‌شود. تومورهایی با تغییرات سطح ۱ فقط بر اساس تاییدیه پمبرولیزوماب با جهش تومور آگنوســـتیک تومور (TMB-H) با رنگ ســـبز روشن تر (سبز تیره، همه تومورهای سطح ۱ دیگر؛ آبی، سطح ۲؛ بنفش تیره، سطح ۳A؛ روشن نشان داده شده‌اند. بنفش، سطح ۳B؛ سیاه، سطح ۴؛ هلویی، فقط محرک‌های سرطان زا غیرقابل عمل؛ و خاکستری روشن، فقط تومورهایی با انواع با اهمیت ناشناخته (VUS)).

ج | عملکرد بالینی نمونه‌های تومور به عنوان تابعی از انواع تومورهای جامد رایج تجزیه و تحلیل مشابه با قسمت b تومورهای جامد در گروه آینده نگر MSK-IMPACT اما به عنوان تابعی از زیرگروه ســـرطان نشـــان داده شده است. تمام نتایج توالی‌یابی MSK- IMPACT از طریق کنسرسیوم AACR GENIE ۲۰،۶۶ در دسترس است. CNS، سیستم عصبی مرکزی؛ MSI- H، ناپایداری ریزماهواره- بالا.

جعبه ۲ | پروفایل ژنومی تومور و حساسیت ایمونوتراپی ناپایداری ریزماهواره- ترمیم عدم تطابق زیاد/کمبود (Msi-H/dMMr) و بار جهش تومور بالا (tMB-H، تعریف شده به عنوان 10≤ جهش در هر مگاباز DNA) نشانگرهای زیستی پیش بینی شده توسط FDa-FDa هستند. پاسخ به آنتی‌بادی ضد PD1 pembrolizumab. پاسخ‌های چشمگیر و بادوام در تومورهای متاستاتیک مقاوم به شیمی‌درمانی Msi-H/dMMr در انواع سرطانی مشاهده شده است که در آنها مهارکننده‌های ایمون بازرسی به طور گسترده فعال نیستند (مثلاً سرطان‌های کولورکتال و پروستات). بنابراین، عدم آزمایش همه بیماران مبتلا به بیماری متاستاتیک برای Msi-H dMMr می‌تواند منجر به عدم دریافت درمان استاندارد مؤثر و بالقوه درمانی شود. از آنجایی که سنجش توالی‌یابی تومور مبتنی بر توالی‌یابی نسل بعدی (NGs) می‌تواند به طور قوی ناپایداری ریزماهواره‌ای را تشخیص دهد، نیاز به غربالگری موثر همه بیماران مبتلا به تومورهای جامد متاستاتیک از نظر فنوتیپ Msi-H/dMMr برای ارزیابی واجد شرایط بودن برای درمان با مهارکننده‌های ایمونولوژیکی یک منطقی بوده است. برای پذیرش گسترده‌تر پروفایل ژنومی تومور مبتنی بر NGs در بیماران مبتلا به تومورهای جامد مقاوم به درمان.

در مورد مناسب بودن تأیید تومور آگنوستیک پمبرولیزوماب برای تومورهای tMB-H2984210 اختلاف نظر بین انکولوژیست‌ها بیشتر است زیرا گسترش برچسب عمدتاً بر اساس یک مطالعه تک دستی بر روی ۱۰۲ بیمار بود که در آن نرخ پاسخ عینی ۲۹ درصد مشاهده شد. در گروه tMB-H211. با این حال، بسیاری از پاسخ‌ها بادوام بودند و بیش از ۲ سال طول می‌کشید و بسیاری از آنها ادامه داشتند.

علیرغم محدودیت‌های آن به عنوان یک نشانگر زیستی پیش‌بینی‌کننده، گسترش برچسب tMB-H یک گزینه درمانی جدید و بالقوه تحول‌آفرین را برای بیماران مبتلا به انواع سرطان فراهم می‌کند که در آن مهارکننده‌های ایست بازرسی ایمنی هنوز نقشی در آن ایجاد نکرده‌اند، زیرا نرخ پاسخ در بیماران انتخاب‌نشده با نشانگر زیستی پایین است (برای به عنوان مثال، سرطان پروستات و پانکراس).

مهمتر از همه، تأیید tMB-H همچنین دسترسی به درمان با مهارکننده ایست بازرسی ایمنی را برای بیماران مبتلا به سرطان‌های نادر، که ثبت نام در کارآزمایی‌های بالینی با قدرت کافی برای آنها دشوار است، تسهیل می‌کند.

مطالعات آینده برای تعیین اینکه آیا مکانیسم زمینه‌ای هیپرجهش بر احتمال پاسخ ایمونوتراپی تأثیر می‌گذارد یا خیر و برای اصلاح برش بهینه tMB-H، که در مطالعات گذشته‌نگر به عنوان تابعی از نوع سرطان متفاوت است، مورد نیاز خواهد بود. تغییرات در انکوژن‌های فردی نیز با احتمال بیشتر یا کمتر پاسخ بازدارنده ایست بازرسی ایمنی همراه است. به عنوان مثال، فعال‌سازی مسیر WNT با طرد سلول‌های T و مقاومت ذاتی در برابر انسداد ایست بازرسی ایمنی در مدل‌های بالینی مرتبط است، و داده‌های بالینی نشان می‌دهند که جهش‌های مسیر wNt/β-کاتنین یک نشانگر زیستی پیش‌بینی‌کننده مقاومت مهارکننده‌های ایمن در کارسینوم سلول‌های کبدی ۲۱۸ است. در مرحله سوم کارآزمایی بالینی آزمایش مهارکننده ضد PDL۱ atezolizumab در سرطان ریه، بیماران مبتلا به تومورهای ALK فیوژن مثبت یا جهش یافته EGFR احتمال کمی برای پاسخ به محاصره ایست بازرسی ایمنی داشتند، اما این ممکن است به سادگی نشان‌دهنده بار جهشی مولکولی زیرگروه‌های مولکولی سرطان ریه تعریف شده باشد. عوامل میزبان مانند ژنوتیپ آنتی‌ژن لکوسیت انسانی (HLa) و تغییرات در میکروبیوم تومور نیز ممکن است بر حساسیت به درمان‌های ایمنی تأثیر بگذارد و به طور بالقوه می‌تواند توسط پانل‌های مبتنی بر NGs مورد سنجش قرار گیرد. همچنین پیشنهاد شده است که تومورهایی با اتیولوژی ویروسی به احتمال زیاد به ایمونوتراپی پاسخ می‌دهند و پروب‌هایی که برای گرفتن DNA ویروسی طراحی شده‌اند در سنجش‌های پروفایل ژنومی تومور مبتنی بر NGs جدیدتر گنجانده شده‌اند.

در نهایت، توالی‌یابی کل اگزوم و کل ژنوم همراه با رویکردهای یادگیری ماشینی که می‌تواند پیش‌بینی کند کدام پپتیدهای جهش‌یافته با میل ترکیبی بالا به مولکول‌های HLa اتولوگ متصل می‌شوند، توسعه واکسن‌های سرطان شخصی‌سازی شده را ممکن ساخته است. در چنین سناریویی، تومور NGs نه به عنوان یک نشانگر زیستی پیش‌بینی‌کننده پاسخ دارویی، بلکه به‌عنوان گام اولیه در توسعه درمان‌های ایمنی شخصی‌سازی‌شده که نئوآنتی‌ژن‌های موجود منحصراً در تومور بیمار را هدف قرار می‌دهند، امّا سلول‌های سالم را هدف قرار نمی‌دهند. درمان‌های مبتنی بر سلول‌های T به‌عنوان یک جایگزین معمول‌تر، در حال توسعه هستند که نئوآنتی‌ژن‌های مشترکی را که از جهش‌های مکرر در انکوژن‌های جهش‌یافته معمول ایجاد می‌شوند، هدف قرار می‌دهند. در مجموع، در حالی که قبلاً به عنوان وسیله‌ای برای هدایت انتخاب درمان‌های هدفمند در نظر گرفته می‌شد، پروفایل ژنومی تومور به سرعت نقش دیگری را در بهینه‌سازی استفاده از ایمونوتراپی در بیماران مبتلا به سرطان ایجاد کرد.

ژرم لاین بیماری‌زا در گروه‌های پروفایل ژنومی تومور مبتنی بر جمعیت، بر اساس دستورالعمل‌های بالینی تاریخی برای تجزیه و تحلیل ژنتیکی ژرم لاین(خط زایا) ارجاع نمی‌شوند. بر این اساس، حمایت فزاینده‌ای در میان انکولوژیست‌ها (سرطان شناسان) برای آزمایش همه بیماران مبتلا به سرطان برای انواع مولفه‌های بیماری‌زا وجود دارد تا به بیماران در مورد خطر شخصی سرطان بعدی و اعضای خانواده در مورد خطر ابتلا به سرطان ارثی مشابه توصیه کنند. پاسخ و سمیت شیمی درمانی نیز با تفاوت‌های ژنتیکی در ژن‌هایی که در جذب یا متابولیسم درمان‌های سیتوتوکسیک و هورمونی نقش دارند، مرتبط است. به عنوان مثال، مطالعات انجمن گسترده ژنوم (GWAS) در بیماران مبتلا به سرطان پستان، ارتباط بین انواع ژرم لاین در ژن‌های کدکننده آنزیم‌های سیتوکروم P450 CYP2D6 و CYP2C8 با تغییر متابولیسم تاموکسیفن و افزایش خطر نوروپاتی مرتبط با پاکلیتاکسل را شناسایی کرده‌اند. به ترتیب. به طور مشابه، پلی‌مورفیسم‌های ژرم لاین در ژن TYMS، که تیمیدیلات سنتتاز را کد می‌کند، با افزایش احتمال پاسخ و سمیت به کپسیتابین و۵- فلوراوراسیل، آنتی متابولیت‌هایی که به‌طور رقابتی به تیمیدیلات سنتتاز متصل می‌شوند و به‌طور برگشت‌ناپذیری آن را مهار می‌کنند، مرتبط است. اگرچه فقدان اجماع متخصص در مورد کاربرد بالینی این بیومارکرهای فارماکوژنومیک، پذیرش بالینی آنها را محدود کرده است، انواع ژرم لاینی که بر متابولیسم یا جذب دارو تأثیر می‌گذارند، می‌توانند به راحتی در پانل‌های NGS جفت شده تومور-خط زایا در آینده گنجانده شوند.

مپینگ شواهد OncoKB به انجمن آسیب شناسی مولکولی (AMP) - انجمن انکولوژی بالینی آمریکا (ASCO) - کالج آسیب‌شناسان آمریکایی (CAP) طبقه‌بندی انواع مبتنی بر شواهد (پانل سمت راست).

b) قابلیت عملکرد بالینی نمونه‌های تومور جامد به صورت آینده‌نگر با استفاده از روش توالی‌یابی بالینی نسل بعدی پروفایل تومور MSKIMPACT با مقدار n=52069 تجزیه و تحلیل شد.

کسری از نمونه‌ها در تمام انواع سرطان تومور جامد که دارای جهشی هستند که از نظر بالینی قابل عمل با توجه به سطوح شواهد OncoKB (نمودار دایره‌ای) در نظر گرفته می‌شود.

تومورهایی با تغییرات سطح ۱ که فقط بر اساس تاییدیه پمبرولیزوماب با جهش تومور آگنوستیک تومور (TMB-H) با رنگ سبز روشن تر (سبز تیره، همه تومورهای سطح ۱ دیگر؛ آبی، سطح ۲؛ بنفش تیره، سطح ۳A؛ روشن نشان داده شده‌اند. بنفش، سطح ۳B؛ سیاه، سطح ۴؛ هلویی، فقط محرک‌های سرطان زا غیرقابل عمل؛ و خاکستری روشن، تومورهایی با گونه‌هایی با اهمیت ناشناخته (VUS) فقط).

c) عملکرد بالینی نمونه‌های تومور به عنوان تابعی از انواع تومورهای جامد رایج تجزیه و تحلیل مشابه با قسمت b تومورهای جامد در گروه آینده نگر MSK-IMPACT اما به عنوان تابعی از زیرگروه سرطان نشان داده شده است. تمام نتایج توالی‌یابی MSK- IMPACT از طریق کنسرسیوم AACR GENIE در دسترس است.

خون‌سازی کلونال

خون‌سازی کلونال که با افزایش سن و درمان اولیه با پرتودرمانی یا شیمی‌درمانی سیتوتوکسیک همراه است، یک عامل مهم مختل‌کننده طبقه‌بندی جهش‌های بدنی است.

جهش‌های سوماتیک که در نتیجه خون‌سازی کلونال بروز می‌کنند، می‌توانند در داده‌های توالی‌یابی اختصاصی تومور در فرکانس‌های آللی متغیر بالاتر از آستانه‌هایی که معمولاً برای فراخوانی جهش‌های سوماتیک استفاده می‌شوند، وجود داشته باشند. بنابراین، در غیاب داده‌های توالی‌یابی DNA لاین زایا بیمار (که معمولاً از خون مشتق می‌شود)، جهش‌های سوماتیک حاصل از خون‌سازی کلونال را می‌توان به‌عنوان جهش‌های سوماتیک تومور طبقه‌بندی کرد.

از آنجایی که زیرمجموعه‌ای از جهش‌های خونساز کلونال در ژن‌های سرطانی عملکردی وجود دارد، پروفایل تومور به تنهایی ممکن است منجر به دریافت درمان نامناسب بیماران به دلیل طبقه‌بندی اشتباه انواع سوماتیک از تومور شود.

در این زمینه، انتخاب نادرست درمان ناشی از تفسیر نادرست از جهش‌های عملکردی مشتق از خون‌سازی کلونال می‌تواند شامل استفاده نامناسب از یک دارو باشد. به عنوان مثال، جهش کلونال خون‌ساز مشتق از ATM

در بیمار مبتلا به سرطان پروستات باعث استفاده از مهارکننده‌های PARP و یا پس زدن درمان خواهد شد.
به عنوان مثال جهش KRAS ناشی از خونسازی کلونال در بیمار مبتلا به سرطان کولورکتال متاستاتیک , استفاده استاندارد از آنتی بادی‌های ضد EGFR ستوکسیماب و پانیتومومب را مهار می‌کند.
از آنجایی که احتمال بروز جهش در فرکانس‌های آللی پایین‌تر, در اثر طبقه‌بندی نادرست جهش‌های ناشی از خون‌سازی کلونال, افزایش خواهد یافت؛ توالی‌یابی نمونه‌های جفت بدون سلول (پلاسما) و گلبول‌های سفید (پوشش بافی) اهمیت ویژه‌ای دارد.

چالش‌های لجستیکی توالی‌یابی یکپارچه سوماتیک-ژرم لاین(لاین زایا)

اگرچه تمرکز تاریخی آزمایش ژنتیکی ژرم لاین شناسایی انواع مرتبط با افزایش خطر سرطان موروثی بود، موفقیت مهارکننده‌های PARP در بیماران مبتلا به جهش در ژن‌های مرتبط با ترمیم نوترکیبی هومولوگ منجر به همگرایی در نیاز بالینی به تومور و آزمایش ژنتیکی ژرم لاین شده است.
مهارکننده‌های PARP در تومورهای هومولوگ با کمبود نوترکیبی، به‌ویژه در بیمارانی که جهش‌های از دست رفته در BRCA1 و BRCA2 دارند، مؤثرتر هستند.
از آنجایی که هم جهش‌های BRCA1 و BRCA2 در رده سوماتیک و ژرم لاین می‌توانند حساسیت مهارکننده PARP را ایجاد کنند، نه فقط تومور و نه پروفایل فقط سلول زایا نمی‌تواند همه بیمارانی را که کاندید درمان با مهارکننده‌های PARP هستند شناسایی کند.
نمونه‌های اضافی از جهش‌های سلول‌اهی زایا که نشانگرهای زیستی پیش‌بینی‌کننده پاسخ دارویی هستند شامل جهش‌های ALK در کودکان مبتلا به نوروبلاستوما و جهش‌های RET در بیماران مبتلا به سرطان مدولاری تیروئید است. جهش‌های خط زایا در مسیرهای ترمیم DNA که منجر به افزایش TMB می‌شود نیز با افزایش احتمال پاسخ به ایمونوتراپی مرتبط است. به عنوان مثال، بیشتر تومورهایی که در بیماران مبتلا به سندرم لینچ ایجاد می‌شوند، دارای کمبود ترمیم عدم تطابق هستند، که یک نشانگر زیستی تومورآگنوستیک برای پاسخ به آنتی‌بادی ضد PD1 pembrolizumab است. به طور مشابه، جهش‌های سلول‌های زایا در ژن MBD4 که یک DNA گلیکوزیلاز را کد می‌کند، با افزایش جهش و پاسخ ایمونوتراپی در ملانوم uveal همراه است. نیاز به آزمایش ژنتیکی گسترده در بیماران مبتلا به سرطان به عنوان مقدمه‌ای برای انتخاب درمان، چندین مانع اخلاقی و لجستیکی را ایجاد کرده است. اولاً، چندین ایالت آزمایش‌های ژنتیکی را به دلیل نگرانی در مورد خطر تبعیض (مثلاً در رابطه با بیمه یا شغل) در بیمارانی را که مستعد ابتلا به سرطان هستند، ارائه می‌کنند. ثانیاً نگرانی‌های مربوط به حفظ حریم خصوصی مرتبط با دسترسی به داده‌های ژنتیکی جرم‌لاین، به‌ویژه حاد است، زیرا نتایج می‌تواند نه تنها بر روی بیمار سرطانی شاخص بلکه بر اعضای خانواده که ممکن است ناقل جهش مولتی باشند و در نتیجه در معرض خطر بالاتر سرطان باشند، تأثیر بگذارد. یافتن یک نوع زایا بیماری‌زا نیز می‌تواند منجر به پریشانی و اضطراب برای بیماران و اعضای خانواده شود. این نگرانی‌ها باعث شده است که برخی از متخصصان پیشنهاد کنند که قبل از آزمایش ژنتیکی ژرم لاین، مشاوره توسط پرستاران یا پزشکان آموزش‌دیده ویژه لازم باشد تا اطمینان حاصل شود که بیماران خطرات مرتبط با یافته‌های تصادفی یک نوع مولفه بیماری‌زا را کاملاً درک می‌کنند.

نیاز به آزمایش بخش رو به رشـدی از بیماران مبتلا به سرطان برای تغییرات ژنتیکی بالقوه قابل عمل به عنوان راهنمای انتخاب درمان، مدل سـنتی مشـاوره پیش از آزمون را تغییر داده اسـت، زیرا در حال حاضر مشاوران ژنتیک کافی برای توصیه به همه بیماران مبتلا به سرطان (بر خلاف زیرمجموعه بیماران مراجعه کننده به مشـاور ژنتیک بر اسـاس تاریخچه دسـتورالعمل‌های بالینی.) نیاز به ارجاع برای مشـاوره قبـل از آزمون نیز می‌تواند به طور قابـل توجهی آزمایش ژنتیـک و گزارش نتایج را به پزشـکان معالج به تاخیر بینـدازد، که می‌تواند در بیماران مبتلا به بیماری متاستاتیک به سرعت پیشرونده که کاندیدهای مهارکننده‌هـای ALK، PARP یا RET هستند مضر باشـد. بنابراین انتظار می‌رود که بار کسب رضایـت و توصیه به بیماران در مـورد خطرات آزمایش ژرم لاین به طور فزاینده‌ای بر دوش انکولوژیسـت‌های پزشـکی، جراحی و پرتودرمانی باشـد زیرا بسـیاری از آنها آموزش محدودی در زمینه ژنومیک سـرطان دارند، تجربه کمتری در تفسیر پیامدهای بالینی واریانت‌های با اهمیت ناشناخته دارند و کمتر احتمال دارد که آزمایش متناوب تشخیصی برای اعضای خانواده را پیشنهاد کنند. توالی‌یابی جفت تومور-خط زایا به دلیل نیاز به بدسـت آوردن، اسـتخراج و تجزیه و تحلیل DNA از یک نمونه طبیعی می‌تواند به هزینه‌های انالیز اضافه کند.

به نظر ما، این هزینه‌های کار و معرف با کارایی بیشـتر تفسیر واریانت در زمینه توالی‌یابی ژنتیکی جفت تومور و سلول زایا جبران می‌شود.

با این حـال، برای بسـیاری از ارائه دهنـدگان، موانع لجسـتیکی و تاخیرهـای بالقوه مربوط بـه هماهنگی جمع‌آوری و ارسـال نمونه‌های تومور و بافت سـالم مانعی برای پذیرش گسـترده‌تر توالی‌یابی تومور-حوم لاین جفت شده است.

علیرغم این موانع لجسـتیکی و خطرات بالقوه مرتبط با یافته‌های تصادفی یک واریانـت زایا بیماری‌زا، ما انتظار داریم که نیاز به شناسایی انواع بالقوه عمل‌پذیر ژرم لاین در تعداد فزاینده‌ای از انواع سـرطان، پذیرش گسترده‌تر آزمایش‌های ژنومی تومور-ژرم لایـن جفتی را بیماران مبتلا به سرطان در پی داشته باشد.

جایگزین‌هـای NGS تومور مبتنـی بر پنل توالی‌یابی کل اگزوم و کل ژنوم.

محدودیـت اصلـی پانل‌های هدفمند NGS این اسـت که قادر به تشـخیص جهش در ژن‌هایی نیستند که در طراحی آنالیز گنجانده نشـده است. در پاسخ به کاهش هزینه‌های توالی‌یابی، اندازه پانل‌ها به طور پیوسته از ده‌ها به صدها ژن مرتبط با سرطان افزایش یافته است. اگرچه آنالیزهای WES و WGS بالینی توسـط آزمایشگاه‌های دانشگاهی و ارائه‌دهندگان تجاری منتخب ارائه می‌شوند، پذیرش گسـترده‌تر WES و WGS بالینی تا به امروز به دلایل مختلفی محدود شده است.

یکی از موانع این اسـت که محتوای تومور موجود برای بسـیاری از بیماران از کمیت، کیفیـت یا خلوص کافی بـرای این پلتفرم‌هـای توالی‌یابی گسـترده‌تر برخوردار نیست. یکی از موانع این است که مواد تومور موجود برای بسیاری از بیماران از کمیت، کیفیت یا خلوص کافی برای این پلتفرم‌های توالی‌یابی گسـترده‌تر برخوردار نیسـت. در طراحـی پلتفرم‌های NGS بالینـی، محدودیت‌های تحمیل‌شده توسـط هزینه و ظرفیت توالی‌یابی، مستلزم متعادل‌سـازی وسـعت و عمق توالی اسـت. با توجه به این مبادله، عمق پوشـش بیشـتر سنجش‌های هدفمند

NGS مزیتی نسبت به سنجش‌های WES و WGS برای به حداکثر رساندن تشخیص تغییرات در ژن‌هایی که نشانگرهای زیستی تایید شده بالینی پاسخ دارویی هستند، فراهم می‌کند به ویژه، در نمونه‌هایی با کیفیت پایین DNA یا آلودگی استرومایی قابل توجه.

پذیرش گسترده‌تر WGS نیازمند کاهش بیشتر در هزینه‌های توالی‌یابی و پیشرفت‌های تکنولوژیکی است تا امکان استفاده از بافت تومور با کیفیت پایین‌تر، بایگانی‌شده با فرمالین ثابت و جاسازی‌شده در پارافین (FFPE) فراهم شود. شایان ذکر است، اگرچه ترکیبات ژن انکوژنیک نادر و خصوصی اضافی (یعنی تغییرات ژنتیکی خاص برای یک فرد)، جهش‌های غیر کدکننده و تغییرات ساختاری که بیان ژن را مختل می‌کنند، مطمئناً در سال‌های آینده کشف خواهند شد، اما احتمال شناسایی یک عامل قابل عمل بالینی وجود دارد. جهش یا نوع ساختاری توسط WES یا WGS که توسط سنجش‌های NGS پانل بزرگ فعلی تشخیص داده نمی‌شد، کم است. بنابراین، ما و دیگران پیش‌بینی می‌کنیم که پذیرش WGS بالینی بیشتر به دلیل نیاز به توصیف قوی امضاهای جهشی پیش‌بینی‌کننده پاسخ دارو (به عنوان مثال، شاخصه‌های ساختاری کمبود نوترکیبی همولوگ) به جای نیاز به شناسایی تغییرات انکوژنیک گسسته افزایشی انجام می‌شود.

توالی‌یابی RNA

پنل‌های توالی‌یابی DNA مبتنی بر ضبط برای تشخیص همجوشی ژن انکوژنیک بهینه نیستند.

اگرچه همجوشی ژن را می‌توان با پانل‌های توالی‌یابی NGS مبتنی بر ضبط از طریق گنجاندن کاوشگرهایی که مناطق اینترونیک را هدف قرار می‌دهند شناسایی کرد، اندازه بزرگ برخی از اینترون‌ها و مکان متغیر نقاط شکست همجوشی، ارتباط دادن درست تمام مناطق اینترونیک مربوطه به هم را بسیار گران می‌کند. توالی‌یابی RNA (RNA-seq) برای تشخیص همجوشی بسیار مناسب تر است و همچنین می‌تواند اطلاعاتی را در مورد بیان ژن ارائه دهد که نمی‌تواند از پروفایل تومور مبتنی بر DNA مشتق شود. متأسفانه، تولید داده‌های RNA-seq کامل رونویسی با کیفیت بالا از نمونه‌های تومور ذخیره اطلاعات محدود و اغلب با کیفیت پایین موجود برای اکثر بیماران مبتلا به سرطان، چالش برانگیز بوده است. همچنین چالش‌های محاسباتی با داده‌های RNA-seq مرتبط با مصنوعات مرتبط با کیفیت نمونه و دسته‌ای وجود دارد. به عنوان یک جایگزین، پنل‌های ژنی مبتنی بر RNA ساخته شده‌اند که از فناوری PCR مالتی پلکس لنگردار استفاده می‌کنند که می‌تواند با استفاده از مقادیر کمی از RNA مشتق‌شده از FFPE، همجوشی ژن‌ها را به طور قوی تشخیص دهد. تعداد کمی از ژن‌هایی که تحت پوشش پنل‌های همجوشی مبتنی بر RNA فعلی قرار دارند، احتمالاً استفاده از آن‌ها را در آینده نزدیک به اعتبار ادغام ژن‌های احتمالی شناسایی‌شده توسط پروفایل تومور مبتنی بر DNA یا تجزیه و تحلیل نمونه‌های بیمار که در آن شبهات پیش‌آزمایی وجود دارد، محدود می‌کند. همجوشی ژن زیاد است (به عنوان مثال، سارکوم‌ها و سرطان‌های ریه که در آنها آزمایش DNA نتوانست عامل انکوژن را شناسایی کند.) به‌عنوان یک جایگزین، RNA-seq ضبط exome برای تشخیص همجوشی‌ها در نمونه‌های تومور بایگانی FFPE امیدوارکننده است. در نهایت، سنجش‌های تشخیصی که قادر به توصیف الگوهای متیلاسیون DNA جهانی هستند، احتمالاً در پالایش طبقه‌بندی زیرگروه تومور و برای شناسایی محل اولیه احتمالی در بیماران مبتلا به سرطان‌های اولیه ناشناخته مفید هستند. مورد دوم ممکن است به ویژه برای پلتفرم‌های غربالگری مبتنی بر cfDNA که در بخش بعدی مورد بحث قرار گرفت، مرتبط باشد. پلتفرم‌های تشخیصی جدیدی که می‌توانند تغییرات اپی‌ژنتیکی یا تغییرات در بیان یا فعال‌سازی پروتئین را که پیش‌بینی‌کننده پاسخ درمان هستند شناسایی کنند، نیز در حال توسعه هستند.

DNA بدون سلول

برخلاف پلتفرم‌های توالی‌یابی تومورهای گسترده‌تر مانند WES، پنل‌های ژنی باریک‌تر اما فوق‌حساس‌تر که قادر به تشخیص مقادیر کمی از DNA مشتق شده از تومور در گردش در پلاسما هستند، به سرعت شواهدی از سودمندی بالینی را نشان می‌دهند. نمونه‌های بیوپسی تومور اغلب از کمیت و کیفیت کافی برای پروفایل ژنومی تومور برخوردار نیستند و تجزیه و تحلیل یک محل تومور اولیه یا متاستاتیک ممکن است نتواند ناهمگنی فضایی یا

تکامل کلونال مرتبط با درمان را نشان دهد.
پروفایل cfDNA پلاسما می‌تواند با فعال کردن تجزیه و تحلیل کم تهاجمی DNA مشتق شده از تومور که می‌تواند به صورت سریالی با پیشرفت بیماران از بیماری موضعی به متاستاتیک یا ایجاد مقاومت در برابر درمان‌های سیستمیک، بر بسیاری از این محدودیت‌ها غلبه کند.
cfDNA حاصل از تومور همچنین می‌تواند در مایع مغزی نخاعی، مایع جنب، مایع آسیتی یا در ادرار وجود داشته باشد. تجزیه و تحلیل cfDNA فراتر از استفاده از آن برای شناسایی جهش‌های عملی، به عنوان بستری برای غربالگری سرطان‌های مخفی در جمعیت‌های پرخطر، برای تشخیص حداقل بیماری باقی‌مانده در بیمارانی که با هدف درمانی درمان می‌شوند و به عنوان وسیله‌ای برای تعیین کمیت پاسخ درمانی در بیماران مبتلا به بیماری متاستاتیک، نویدبخش است. چالش تجزیه و تحلیل cfDNA این است که مقدار DNA تومور در گردش معمولا کم است و تمایز بین جهش‌های سوماتیک مشتق از تومور، جهش‌های سوماتیک ناشی از خون سازی کلونال و مصنوعات ناشی از اکسیداسیون DNA، خطاهای تقویت PCR، یا از طریق فرآیند تعیین توالی DNA می‌تواند دشوار باشد. روش‌های سرکوب خطا مبتنی بر بارکد DNA اخیراً برای فیلتر کردن جهش‌های حاصل از PCR یا مصنوعات توالی‌یابی توسعه یافته‌اند (شکل ۳) این روش‌ها به عمق پوشش توالی ۲۰ تا ۴۰ برابر بیشتر از نیاز پنل‌های NGS مبتنی بر تومور متکی هستند و بنابراین سنجش‌های cfDNA معمولاً ژن‌های کمتری را تجزیه و تحلیل می‌کنند. وسعت توالی محدود پنل‌های cfDNA فعلی و کسر کم DNA مشتق شده از تومور در پلاسما نیز برخی از ویژگی‌های ژنومی مانند حذف‌ها و شاخصه‌های جهشی را برای تشخیص در خون چالش برانگیزتر می‌کند. نتایج منفی cfDNA در بیماران منفرد باید با احتیاط تفسیر شود زیرا برخی از تومورها DNA کافی برای تشخیص جهش با استفاده از حساس‌ترین روش‌ها را نمی‌اندازند. بنابراین، توالی‌یابی تومور و cfDNA احتمالاً استراتژی‌های مکمل برای شناسایی تغییرات ژنومی بالقوه قابل عمل در بیمارانی هستند که نیاز به درمان سیستمیک دارند. با وجود محدودیت‌های آن‌ها، سنجش‌های cfDNA چند ژنی مبتنی بر NGS به سرعت در سرطان ریه مورد استفاده قرار می‌گیرند، زیرا انکولوژیست‌ها باید تغییرات ژنومی قابل هدف‌یابی متعدد را در یک بازه زمانی کوتاه غربالگری کنند و نتایج cfDNA به طور متوسط می‌تواند سریع‌تر ارائه شود. به طور خاص، برای بیمارانی که بیوپسی تشخیصی تومور یا جراحی در مؤسسه دیگری داشتند، نتایج آزمایش cfDNA می‌تواند هفته‌ها یا حتی ماه‌ها سریع‌تر از آزمایش تومور با توجه به تأخیرهای لجستیکی مرتبط با درخواست و پردازش بافت تومور در دسترس باشد. توالی‌یابی cfDNA همچنین احتمالاً برای شناسایی تغییرات ژنومی قابل هدف در تومورهای دارای الگوی غالب گسترش استخوانی مانند سرطان سینه و پروستات، با توجه به چالش‌های بدست آوردن مواد ژنومی با کیفیت بالا از بیوپسی استخوان، مفید است. در شرایط حداقل بیماری باقیمانده، جایی که انتظار می‌رود کسر cfDNA مشتق از تومور بسیار کم باشد، به نظر می‌رسد سنجش‌های cfDNA شخصی‌سازی شده برای شناسایی جهش‌های کلونال متعدد شناسایی‌شده توسط توالی‌یابی تومور (که برخی از آنها ممکن است انواع غیر عملکردی باشند) نسبت به پانل‌های مبتنی بر NGS حساس تر باشند، که برای تشخیص تعداد محدودی از تغییرات قابل عمل در بیماران مبتلا به بار تومور یا بیماری متاستاتیک بیشتر مناسب هستند. در نهایت، میلیون‌ها سایت CpG در ژنوم انسان وجود دارد و الگوهای متیلاسیون DNA به عنوان تابعی از زیرگروه سرطان متفاوت است. بنابراین، برای کاربردهای غربالگری، سنجش‌های cfDNA طراحی‌شده برای تشخیص الگوهای ناهنجار متیلاسیون DNA ممکن است نسبت به پنل‌های cfDNA مبتنی بر NGS حساس‌تر باشند و در عین حال اطلاعاتی را در مورد محل احتمالی اولیه بیماری برای راهنمایی تصویربرداری بعدی یا آندوسکوپی‌های تشخیصی ارائه می‌دهند.

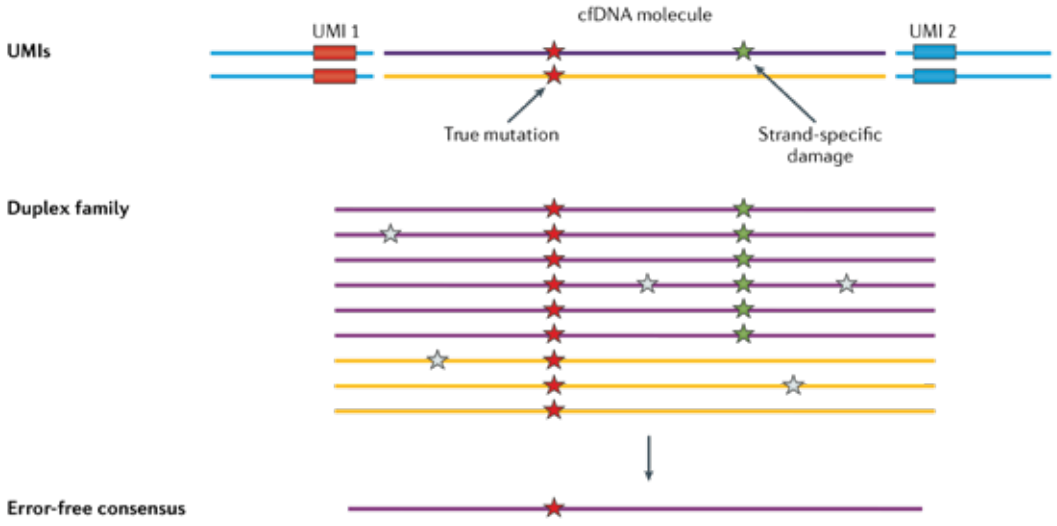
پیکربندی آللی و شاخصه‌های جهشی شبیه سازی جهش

تغییرات سوماتیک جدید به طور تصادفی در نتیجه کمبودهای ذاتی سلول‌های تومور در همانندسازی، ترمیم یا جداسازی کروموزومی DNA یا در نتیجه قرار گرفتن مداوم در معرض عوامل جهش زا مانند دود سیگار

یا داروها، از جمله شیمی درمانی‌های سیتوتوکسیک، که باعث آسیب DNA می‌شود، ایجاد می‌شود. ژنوم‌های سرطانی نیز به‌طور مداوم در حال تکامل هستند، با جهش‌های جدید و گونه‌های ساختاری که با حمله، متاستاز یا انطباق تومورها با فشارهای انتخابی ناشی از درمان به وجود می‌آیند.

بنابراین، جهش مداوم و انتخاب کلونال در طول دوره بیماری بیمار منجر به الگوهای پیچیده ناهمگونی ژنومی درون ضایعه و ضایعه به ضایعه می‌شود که ممکن است اثربخشی رویکردهای انکولوژی دقیق را کاهش دهد. گزارش‌های توالی‌یابی تومور کنونی جهش‌محور هستند، زیرا جهش‌ها و گونه‌های ساختاری انکوژنیک مانند تقویت انکوژن‌ها، حذف‌های شامل ژن‌های سرکوبگر تومور و جابه‌جایی‌های انکوژنیک درون چارچوب به‌عنوان رویدادهای مستقل و نامرتبط گزارش می‌شوند (شکل ۴a). گزارش‌های آتی NGS به دنبال قرار دادن بهتر جهش‌ها در بافت با گزارش کلونال بودن و تعامل عملکردی بالقوه آنها با جهش‌های محرک همزمان هستند (شکل ۴b).

برخی از جهش‌های محرک در اوایل رشد تومور ایجاد می‌شوند و کلونال هستند. برخی دیگر بعداً در طول پیشرفت متاستاتیک یا به عنوان واسطه‌های مقاومت در برابر درمان‌های سیستمیک ایجاد می‌شوند و ساب کلونال هستند. برای مهارکننده‌های کیناز، فرض بر این است که فعالیت ضد توموری در بیمارانی که جهش مورد نظر در آنها کلونال است، بیشتر است، زیرا انتظار می‌رود هدف قرار دادن جهش‌های ساب کلونال منجر به انتخاب سریع سلول‌های سرطانی فاقد جهش حساس‌کننده دارویی شود. به طور گسترده‌تر، سرطان‌هایی که درجه بالایی از ناهمگنی تومور دارند ممکن است نسبت به انواع درمان‌های سیستمیک از جمله شیمی‌درمانی‌های سیتوتوکسیک و ایمونوتراپی‌ها حساسیت کمتری داشته باشند، زیرا وجود تعداد بیشتری از ساب کلون‌های متمایز از نظر ژنومی قبل از شروع درمان، احتمال این را افزایش می‌دهد که یک درمان: کلون مقاوم در حال



شکل ۳) تشخیص جهش با فرکانس پایین در DNA بدون سلول تومور از آنجایی که کسر DNA بدون سلول (cfDNA) مشتق شده از سلول‌های تومور اغلب بسیار کم است، جهش‌های بدنی خاص تومور معمولاً در فرکانس‌های آللی بسیار پایین در خون وجود دارند. برای جهش‌های موجود در فرکانس‌های آللی پایین (<۱٪)، توالی‌یابی فوق‌عمیق و تصحیح خطا برای تشخیص خطاهای PCR و توالی‌یابی از واریانت‌های سوماتیک مشتق شده از تومور در خون مورد نیاز است. سرکوب خطا را می‌توان از طریق استفاده از شاخص‌های مولکولی منحصر به فرد (UMIs) با بارکدهای شاخص دوگانه، که امکان فیلتر کردن مصنوعات توالی‌یابی را فراهم می‌کند، به دست آورد. ستاره‌های قرمز نشان‌دهنده جهش‌های جسمی واقعی هستند، در حالی که ستارگان سبز آسیب‌های خاص پایه و خطاهای توالی ستاره‌های سفید هستند.

تصویر از M. F. Berger، مرکز سرطان Memorial Sloan Kettering، نیویورک، ایالات متحده آمریکا.

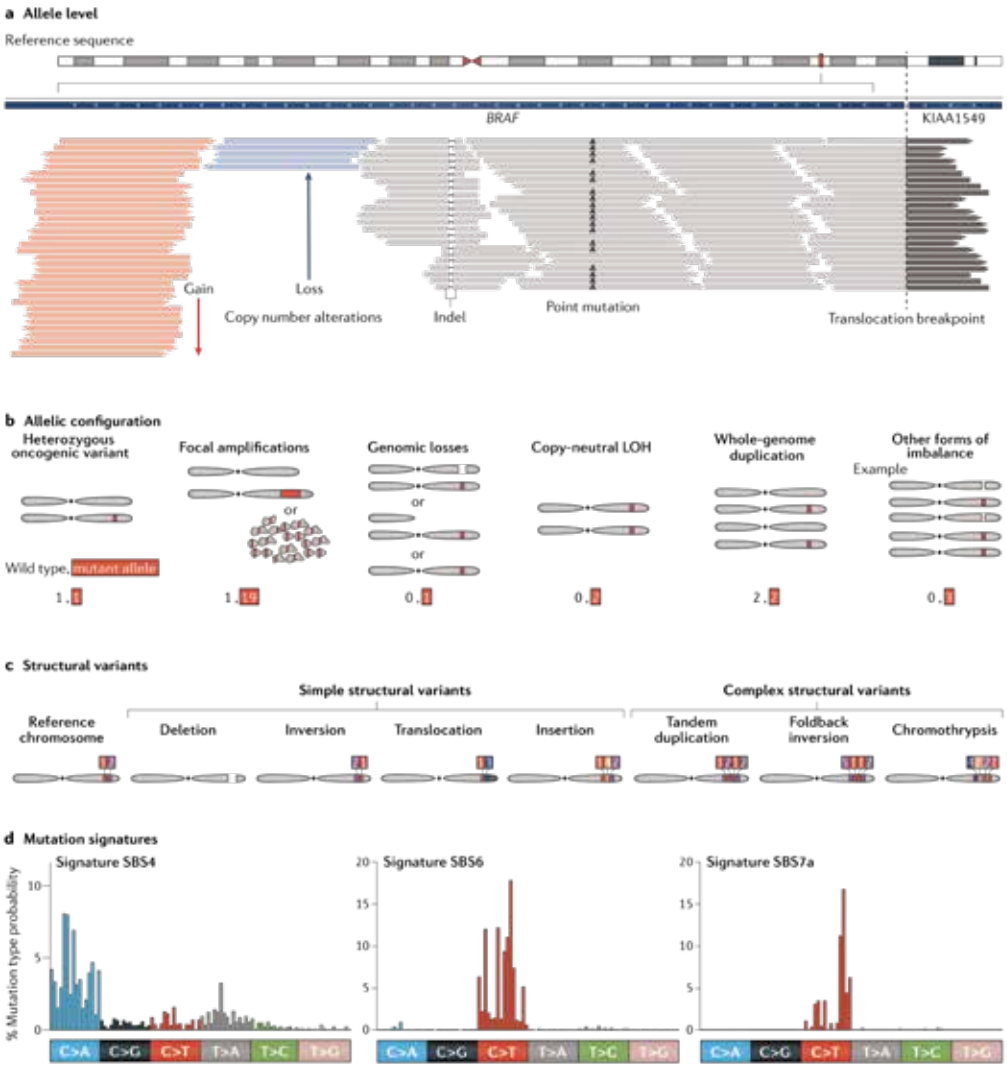
حاضر پیش درمان وجود دارد. الگوریتم‌های محاسباتی توسعه داده شده‌اند که از عمق بالای پوشش توالی‌یابی تولید شده توسط پروفایل تومور مبتنی بر NGS برای تبدیل فرکانس‌های آللی متغیر به بخش‌های سلول سرطانی، یک تخمین عددی از کسر سلول‌های سرطانی که دارای جهش خاصی هستند، استفاده می‌کنند. برای انواع تک نوکلئوتیدی (SNVs)، کسر سلول سرطانی را می‌توان از داده‌های NGS با استفاده از تخمین فرکانس آلل متغیر، خلوص تومور و تعداد کپی موضعی استنباط کرد. با این حال، دقت تخمین کسر سلول‌های سرطانی می‌تواند تحت تأثیر کیفیت بافت، عمق توالی و وسعت پانل توالی‌یابی قرار گیرد. کاربرد بالینی بخش سلول‌های سرطانی برای هدایت تصمیمات درمانی به خوبی تعریف نشده است، و تخمین‌های کلونالیته جهش به طور معمول در گزارش‌های پروفایل تومور بالینی گنجانده نمی‌شود. نگرانی عمده در مورد استفاده از استنتاج‌های کلونالیتی این است که نتایج ممکن است بازتاب دقیقی از بار بیماری فعلی بیمار ارائه نکنند. به عنوان مثال، یک جهش حساس کننده به دارو که سابکلونال در محل تومور اولیه برداشته شده با جراحی است، ممکن است در همه مکان‌های متاستاتیک کلونال باشد. کلونالیته جهش نیز می‌تواند بین محل‌های متاستاتیک متفاوت باشد. بنابراین، استفاده از استنتاج‌های کلونال به دست آمده از یک نمونه بیوپسی تومور ممکن است ارزیابی نادرستی از کلونالیته یک جهش عملی در بار کلی بیماری بیمار ارائه دهد. همچنین نشان داده شده است که جهش‌های حساس کننده دارویی ساب کلونال به موازات جهش‌های حساس کننده در سایر ژن‌ها از طریق فرآیند تکامل همگرا ایجاد می‌شوند. بنابراین، اگرچه مطالعات گذشته‌نگر نشان می‌دهد که ناهمگنی تومور از قبل موجود و کلونالیته جهش‌یافته اغلب بر پاسخ دارو تأثیر می‌گذارند، اما بهترین روش برای گنجاندن این دانش در دستورالعمل‌های عمل بالینی نیاز به مطالعه بیشتر دارد.

پیکربندی آللی

روش‌های مورد استفاده برای استنتاج بخش سلول‌های سرطانی جهش‌های سوماتیک از داده‌های پروفایل تومور مبتنی بر NGS می‌تواند اطلاعاتی را در مورد پیکربندی آللی جهش‌های فردی یا شاخصه‌های مختلف ساختاری جهانی ارائه دهد که ممکن است بر پاسخ درمان تأثیر بگذارد (شکل ۴b,c).

بسیاری از ژن‌های سرکوب‌کننده تومور فقط در شرایط غیرفعال‌سازی دو آللی هر دو نسخه ژن فنوتیپ دارند (فرضیه دو ضربه نادسن.) بنابراین، توانایی ارزیابی از دست دادن هتروزیگوسیتی ناشی از حذف آلل نوع وحشی غیر جهش یافته ممکن است بینشی را در اختیار پزشکان قرار دهد که آیا هدف قرار دادن یک جهش ژن سرکوبگر تومور خاص احتمالاً مؤثر است یا خیر. غیرفعال‌سازی دو آللی ژن‌های سرکوب‌کننده تومور نیز می‌تواند ناشی از اختلال در تنظیم اصلاح‌کننده‌های اپی ژنتیکی مانند متیلاسیون پروموتر باشد و بنابراین سودمندی بالینی تجزیه و تحلیل تومورها برای از دست دادن رویدادهای هتروزیگوسیتی با واسطه DNA بدون توانایی همزمان برای تشخیص یک ناحیه خاموش کننده ژنی که به صورت اپی ژنتیکی هدایت می‌شود، باشد. بحث و جدل اساسی اگرچه کمتر شناخته شده است، اما پیکربندی آللی جهش‌های افزایش عملکرد نیز می‌تواند بر وابستگی انکوژن و حساسیت دارویی تأثیر بگذارد.

برای مثال، ۱۲ تا ۱۵ درصد از سرطان‌های سینه جهش‌یافته با PIK3CA نه یک بلکه دو جهش در همان آلل PIK3CA دارند. این جهش‌های ترکیبی PIK3CA سیگنال‌دهی کیناز PI3 را به میزان بیشتری نسبت به جهش‌های فردی PIK3CA فعال می‌کنند و حساسیت بیشتر به مهارکننده‌های PI3Kα را پیش‌بینی می‌کنند. عدم تعادل آللی که منجر به به دست آوردن نسخه‌های اضافی از انکوژن‌های جهش‌یافته یا از دست دادن آلل نوع وحشی می‌شود نیز می‌تواند تناسب کلونال را افزایش دهد یا حساسیت به درمان‌های هدفمند را تعدیل کند. به عنوان مثال، از دست دادن آلل BRAF نوع وحشی در تومورهای جهش یافته BRAF-V600E ممکن است حساسیت بیشتری به vemurafenib، یک مهارکننده انتخابی RAF ایجاد کند. تخمین دقیق‌تر تعداد کپی عدد صحیح از داده‌های NGS تومور همچنین می‌تواند به پزشکان کمک کند تا اهمیت تقویت‌های مربوط به انکوژن‌های قابل هدف را تفسیر کنند، زیرا سطوح بالاتر تکثیر ژن ممکن است با وابستگی بیشتر انکوژن و حساسیت دارویی همراه باشد.



شکل ۴) گسترش کاربرد بالینی پروفایل ژنومی تومور.

الف) گزارش‌های ژنومی تومور بالینی کنونی جهش محور با جهش‌ها، درج‌ها/حذف‌های کوچک (indels)، تکثیر ژن، حذف‌ها و جابه‌جایی‌های گزارش‌شده به عنوان رویدادهای مجزا هستند.

ب) گزارش‌های توالی‌یابی نسل بعدی (NGS) به دنبال گزارش ویژگی‌های ژنومی اضافی مانند زمینه آللی (تعداد نسخه‌های جهش یافته و نوع وحشی از یک ژن سرطانی عمل‌پذیر تخمین زده می‌شود که در سلول سرطانی وجود داشته باشد) که ممکن است بر دارو تأثیر بگذارد. پاسخ یا پیش آگهی بیمار

ج) پلتفرم‌های توالی‌یابی گسترده‌تر مانند توالی‌یابی کل ژنوم می‌توانند وجود انواع ساختاری پیچیده مانند تکرارهای پشت سر هم، وارونگی‌های فولدبک یا کروموتریپسیس (هزاران بازآرایی کروموزومی خوشه‌ای در یک ناحیه ژنومی را شناسایی کنند)

د) الگوهای جهانی انواع پیچیده ژنومی و امضاهای جانشینی تک پایه ممکن است بینشی در مورد علت احتمالی سرطان بیمار ارائه دهد یا ممکن است پاسخ به مهارکننده‌های پلی (ADP–ribose) پلیمراز (PARP) یا ایمونوتراپی را بیشتر از وضعیت جهش ژنی پیش بینی کند. تنها. به عنوان مثال، SBS۴ امضای SBS۴ با جایگزینی با یک پایه مرتبط است و احتمالاً به دلیل آسیب DNA توسط جهش‌زاها مانند بنزو[a]پیرن موجود در دود تنباکو ایجاد می‌شود، در حالی که SBS۷a در سرطان‌های پوستی که در نواحی در معرض آفتاب ایجاد می‌شوند رایج است. و اعتقاد بر این است که نتیجه جهش‌زایی ناشی از نور فرابنفش است.

امضای جهشی SBS۶ با ترمیم ناهماهنگی DNA معیوب همراه است و معمولاً در تومورهایی با ناپایداری ریزماهواره یافت می‌شود، که پیش‌بینی‌کننده پاسخ به مهارکننده پست بازرسی ایمنی pembrolizumab است.

زمینه متقابل

بیشتر گزارش‌های توالی‌یابی تومور، جهش‌های نقطه‌ای، تغییرات شماره نسخه و انواع ساختاری مانند جابه‌جایی‌ها را مستقل از یکدیگر حاشیه‌نویسی می‌کنند. جهش‌های همزمان کــه باعث ایجــاد مقاومت دارویی یــا افزایش حساســیت دارویی می‌شوند، به ندرت برجسته می‌شوند. به عنوان مثــال، جهش در PTEN و NF1 نشــان داده شده است که بر پاسخ مهارکننده RAF در ملانوم جهش یافتــه BRAF- تأثیر می‌گذارد. متقابلا، تومورهایی با دو یا چند تغییر که مســیرهای یکســانی را فعال می‌کنند، برای مثال، تغییــرات همزمان TSC1 و NF2، که هر دو mTORC1 را فعال می‌کنند، حساسیت دارویی بیشتری نسبت به تومورهایی با هر یک از این تغییرات به تنهایی نشــان می‌دهند. بهبود گزارش‌هــای بالینی که جزئیات روابط اپیستاتیکی بین دو یا چند جهش همزمان را نشان می‌دهد و مشخص می‌کند که آیا دو جهش در یک ژن در سیس یا ترانس وجود دارد یا خیر، ممکن است در آینده به هدایت انتخاب درمان یا اصلاح پیش‌آگهی کمک کند. امضاهای جهشــی گسترش تجزیه و تحلیل‌ها فراتر از در نظر گرفتن تغییرات ژنتیکی فردی به الگوهای جایگزینی جفت پایه منفرد، دوتایی و خوشه‌ای، درج‌ها یا حذف‌های کوچک و تغییرات ســاختاری بزرگ‌تــر احتمالاً بینش بیشــتری در مورد اهمیت بیولوژیکی و بالینی جهش‌ها در ژن‌های ســرطانی بالقوه قابل عمــل ارائه می‌کند. با ترکیب شش کلاس SNV ممکن همراه با زمینه‌های سه نوکلئوتیــدی آنها، همه SNVهــا را می‌توان به ۱ از ۹۶ ترکیب ممکن طبقه‌بندی کرد.

تجزیه و تحلیــل الگوهای این جایگزینی SNV منجر به شناسایی ۸۱ شاخصه جهشی مبتنی بر SNV شده است که بسیاری از آنها با نقص‌های خاص در ترمیم DNA یا قرار گرفتن در معرض دارو یا سم مرتبط هستند. وجود یا عدم وجود یک شاخصه جهشی می‌تواند به تفسیر بالینی جهش‌هــای بالقوه قابل عمل کمک کند. به عنوان مثال، همه تومورهای دارای جهش در ژن‌های مرتبط با سندرم لینــچ MSH6، MSH2، MLH1 و PMS2 شــواهدی از dMMR ندارند، اما آنهایی که اغلب دارای الگوی متمایزی از تعویض‌های تک پایه هستند (شکل 4d). ادغام تجزیه و تحلیل امضای جهش با تجزیه و تحلیل مناطق ریزماهواره با استفاده از حسگر MSI یا سایر ابزارهای بیوانفورماتیک می‌تواند به تعریــف اهمیت بیولوژیکی و بالینی جهش‌ها در MSH6، MSH2، MLH1 و PMS2 بــا تعیین اینکه آیا شــواهد فنوتیپی مبنی بر کمبــود تعمیر عدم تطابق وجود دارد یا خیر، کمــک کند. چنین توصیف فنوتیپی ناپایداری ریزماهــواره‌ای احتمالاً پیش بینی کننده قوی تری برای حساسیت ایمونوتراپی نسبت به حضور یا عدم وجود جهش در یک ژن مرتبط با ســندرم لینچ است. توانایی مشخص کردن قوی شاخصه‌های جهشی ممکن است ثابت شود که از نظر بالینی مهم ترین مزیت افزایشی WGS نســبت به ســنجش توالی پانل هدفمند اســت. تغییرات ساختاری که با پیش‌آگهی ضعیف یا پیش‌بینی پاســخ دارویی مرتبط بوده‌اند شامل تکرارهای پشت سر هم کانونی ناشــی از جهش‌های از دســت دادن عملکرد CDK12، وارونگی‌هــای تاشــونده و حذف‌های بینابینی است که ممکن است مشخصه فرآیندهای ترمیم نابجای دی‌ان‌ای افتراقی در ســرطان تخمدان باشد. و از دست دادن متقابل هتروزیگوســیتی، که معمولاً در تومورهای سلول زایا مشــاهده می‌شود و ممکن است با مقاومت به سیس پلاتین مرتبط باشد (شکل 4c).

ســنجش‌های مقیــاس WGS همچنیــن می‌تواننــد جایگزین‌های پایه منفــرد و دوتایی و امضاهای کوچک درج و حذف را مشــخص کنند که ممکن است بیشتر از وضعیت جهش ژن‌های سرطانی منفرد پیش‌بینی‌کننده ایمونوتراپی یا پاسخ مهارکننده PARP باشد.

ایجاد تعادل در مقررات و نوآوری

اگرچــه اهــداف تضمیــن کیفیــت مقــررات دولتــی ســنجش‌های پروفایل ژنومی تومور قابل ستایش است، الگوی آزمایش‌های تشــخیصی همراه که در حال حاضر اجرا می‌شود، به بهترین وجه بهبودهای تکراری مورد نیاز برای ارتقای نوآوری سریع را تسهیل نمی‌کند. این احتمال وجــود دارد که بازپرداخت دارو و دسترســی به دارو در آینده نیاز به استفاده از یک تست تشخیصی همراه خاص داشته باشد. در حالی که بازپرداخت پروفایل ژنومی تومور مبتنی بر NGS در بیماران مبتلا به ســرطان تا به امروز با نیاز به غربالگری نشــانگرهای زیستی پیش‌بینی‌کننده پاسخ دارویی توجیه شده است، این سنجش‌های پروفایل پلتفرم‌های تشخیصی چند منظوره هستند که همچنین می‌توانند به اطمینان از طبقه‌بندی صحیح زیرگروه تومور

کمک کنند. اطلاع رسانی پیش آگهی و تعیین اینکه آیا سرطان در نتیجه یک استعداد سرطانی وراثتی ایجاد شده است یا خیر. پنل‌های NGS چند ژنی همچنین گزارش همزمان نشـــانگرهای زیستی تثبیت شده و تحقیقاتی را امکان پذیر می‌کند و توســـعه درمان‌های جدید را برای اهـــداف دارویی جدید تســـهیل می‌کنـــد. از این طریق، پروفایل تومور مبتنی بر NGS پتانسیل کاهش هزینه‌ها و بهبود نتایج بیمار را با جایگزینی و بهبود PCR محدودتر، هیبریداســـیون فلورســـانس درجا، ایمونوهیستوشیمی و تجزیـــه و تحلیل‌های مبتنی بـــر NGS با پنل کوچک دارد. بهبود آنالیزهای NGS تومور، مانند افزودن ژن‌های مرتبط با ســـرطان تازه شناسایی‌شـــده، احتمالاً افزایشی بوده و با کاهش هزینه‌های توالی‌یابی تســـهیل می‌شود. این نسخه‌های آنالیز جدیدتر نیازی به نشان دادن کاربرد بالینی ندارند. در عوض، تنظیم‌کننده‌ها باید بر اطمینان از اینکه سنجش‌های مورد استفاده برای مراقبت از بیمار دقیق، قابل تکرار هســـتند و توسط پرسنل واجد شرایط انجام می‌شـــوند، تمرکـــز کنند.چنین ســـاختار نظارتی سرعت کیفیت را تضمین می‌کند و در عین حال پتانسیل نوآوری را در این زمینه به ســـرعت در حال توســـعه به حداکثر می‌رســـاند. یک رویکرد منعطف و انطباقی برای تنظیم ســـنجش‌های بالینی پروفایل تومور همچنین بر بیمارستان و آزمایشگاه‌های تجاری به سرعت روش‌های جدید اســـتخراج DNA، آماده‌سازی کتابخانه، توالی‌یابی یـــا آنالیز بیوانفورماتیک را اتخـــاذ می‌کنند، با این فرض که چنین تغییراتی بر حساســـیت یا ویژگی تشـــخیص نشانگرهای زیستی تأثیر منفی نمی‌گذارد.

در مجموع، ســـازمان‌های نظارتی باید به دنبال تشویق توســـعه ســـنجش‌های مقرون‌به‌صرفه‌تر باشند که از نظر بافتی کارآمد بوده و قادر به تشخیص تمام تغییرات ژنی و امضاهای جهش‌یافته مورد نیاز برای راهنمایی مراقبت از بیماران مبتلا به سرطان باشند، با توجه به اینکه هیچ سنجش واحدی برای درمان سرطان ایجاد نشده است. به روز بودن برای همه کاربردها در همه انواع سرطان بهینه است.

نتیجه گیری و دیدگاه ها

کاهـــش مـــداوم هزینه‌هـــای توالی‌یابـــی و شناســـایی بیومارکرهای ژنومی جدید پیش‌بینی‌کننده پاسخ دارویی، پذیرش ســـریع پنل‌های پروفایل ژنومی تومور مبتنی بر NGS چند ژنی را به عنوان بخشی از مراقبت‌های معمول سرطان سوق داده است. علاوه بر شناسایی بیومارکرهای پیش بینی کننده پاســـخ درمانـــی، پروفایل ژنومی تومور

می‌تواند جهش‌های جسمی و ژرم لاین را شناسایی کند که تشـــخیص زیرگروه ســـرطان بیمار را اصلاح یا تأیید می‌کند و بینشی را در مورد خطر سرطان ارثی و احتمال ابتلا به سرطان، عود ســـرطان و مرگ در اختیار پزشکان قرار می‌دهد. پذیرش آینده پنل‌های توالی‌یابی گسترده‌تر یا روش‌های WGS باید ارزیابی دقیق تری از کلونالیته جهش، زمینه آللی و شناسایی شاخصه‌های جهشی و ساختاری را که پیش‌بینی‌کننده پاســـخ دارو هستند، امکان پذیر کند. ظهـــور پلتفرم‌های مبتنی بر NGS که قادر به تشـــخیص و تجزیه و تحلیل DNA مشـــتق شده از تومور در پلاسما هستند، همچنین امکان توســـعه روش‌های تشخیصی را برای غربالگری بیماران پرخطر از نظر سرطان‌های مخفی، ارزیابی حداقل بیمـــاری باقی‌مانده پس از درمان با هدف درمانی فراهم می‌کند. نظارت و کمی کردن بهتر پاســـخ درمانی و ارزیابی تکامل کلونال تحت فشار انتخاب درمان به عنوان مقدمه‌ای برای توســـعه اســـتراتژی‌های ترکیبی منطقی است که از مقاومت دارویی جلوگیری می‌کند یا به تاخیر می‌اندازد. طرح‌های اشتراک‌گذاری داده‌ها که امکان ادغام داده‌های پروفایل ژنومی تومور را با حاشیه‌نویســـی دقیق بالینی و داده‌های پاسخ درمانی فراهم می‌کند، مانند AACR GENIE، در ارزیابی کاربرد بالینی پروفایل ژنومی تومور، به‌ویژه در انواع ســـرطان‌های نـــادر، حیاتی خواهد بـــود. از آنجایی که همه جهش‌های یک ژن اثر بیولوژیکی یا اهمیت بالینی یکســـانی ندارند، بـــرای کمک به اطلاع رسانی ارتباط درمانی، تشخیصی و پیش‌آگهی جهش‌های فردی به پزشـــکان متخصـــص نیاز به بهبـــود پایگاه‌های دانش و گزارش‌های بالینی متفاوت است. برهم‌کنش‌های اپیســـتاتیکی بین جهش‌های همزمان و امضاهای جهشی در سطح ژنوم. گســـترش قابل توجهی در بخش بیماران مبتلا به سرطان که از رویکرد پزشکی دقیق بهره می‌برند، همچنین مستلزم توســـعه درمان‌های جدید موثر در برابر تومورهایی است که توسط محرک‌های سرطان زا غیرقابل درمان در حال حاضر هدایت می‌شوند.

منبع:

https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33762738/

بهبود مخاط روده با فعال کننده جدید کوچک مولکول محلول در آب، شبیه به دارو Focal Adhesion Kinase

گلناز زمانیان [1]

۱- کارشناسی ارشد سم شناسی ، دانشگاه علوم پزشکی تهران ، تهران، ایران
پژوهشگر مرکز تحقیقات پزشکی شخصی آمیتیس

چکیده:

داروهای ضد التهابی غیر استروئیدی (NSAIDs) با مکانیسم‌های مختلف به روده پروگزیمال و دیستال آسیب می‌رسانند. در حالی که بسیاری از داروها آسیب‌های دستگاه گوارش را کاهش می‌دهند، هیچ دارویی مستقیماً ترمیم زخم مخاطی را تحریک نمی‌کند. چسبندگی کانونی کیناز (FAK)، یک تیروزین کیناز غیر گیرنده، باعث مهاجرت ورقه اپیتلیال می‌شود.

ما یک مولکول کوچک فعال‌کننده FAK محلول در آب، M64HCl، با خواص دارو مانند را سنتز و ارزیابی کردیم. بسته شدن زخم تک لایه و وسترن بلات، مهاجرت و فسفوریلاسیون FAK را در سلول‌های Caco-2 اندازه‌گیری کردند، سنجش‌های کیناز آزمایشگاهی فعال‌سازی FAK را ایجاد کردند و آزمایش‌های فارماکولوژیک خواص مشابه دارو را ارزیابی کردند.

M64HCl وابسته به دوز فسفوریلاسیون Caco-2 FAK-Tyr 397 را افزایش داد، بدون اینکه Pyk2 را فعال کند و بسته شدن زخم تک لایه Caco-2 را تسریع کرد. M64HCl با دوز پاسخگو دامنه FAK کیناز را در مقابل M64 غیر نمکی فعال می‌کند و V max اتصال ATP را افزایش می‌دهد. آزمایشات فارماکولوژیک نشان داد که M64HCl دارای خواص دارویی است و از طریق روده جذب می‌شود. M64HCl انفوزیون مداوم باعث بهبود زخم‌های ایسکمیک و آسیب روده کوچک ناشی از ایندومتاسین در موش C57Bl/6 شد. موش‌های تحت درمان با M64HCl، ۴ روز پس از القای زخم ایسکمیک یا آسیب ایندومتاسین، زخم‌های کوچک‌تری نشان دادند. بافت‌شناسی کلیه و کراتینین پلاسما نرمال

بـود. تغییـرات التهابـی خفیـف کبـدی و افزایـش ALT در بیـن موش‌هـای تحـت درمـان بـا M64HCl و گـروه کنترل مشـابه بـود. M64HCl در کلیه و مخاط دسـتگاه گـوارش متمرکـز شـد و مطالعـات نفرکتومـی عملکردی نشـان داد کـه عمدتـاً دفـع ادراری اسـت. سـمیت کمی در شـرایط آزمایشـگاهی یـا در مطالعـات سـمیت موش بـا یـک دوز تـا بیـش از ۱۰۰۰ برابـر بیشـتر از غلظـت موثـر مشـاهده شـد. M64HCl، یک فعـال کننده FAK محلـول در آب، باعـث ترمیـم اپیتلیـال و بهبـود مخـاط روده می‌شـود و ممکن اسـت برای درمان آسـیب مخاط روده مفیـد باشـد.

مقدمه

آسـپرین و سـایر داروهای ضدالتهابی غیراستروئیدی (NSAIDs) مدت‌هاسـت کـه به مخاط معـده و اثنی عشر آسیب می‌رسـانند. ٪۵۰ از مصرف کنندگان مزمن NSAID به ترتیب به زخم دسـتگاه گـوارش فوقانی یا تحتانی مبتلا می‌شـوند. آنتروپاتی مرتبط با NSAID به دلیـل معرفی دسـتگاه‌های تشـخیصی جدیـد مانند آندوسـکوپی با کپسول ویدیویی و انتروسکوپی به کمک دستگاه، توجه زیادی را به خود جلب کرده است. ضایعات فرسایشی در سراسـر روده کوچک مشاهده می‌شود که مصرف‌کنندگان آسـپرین با دوز پایین تحت آندوسکوپی کپسـولی در مصرف کنندگان آسپرین با دوز پایین قرار می‌گیرند. آسـیب GI تحتانی ناشی از NSAID می‌تواند باعث خونریزی حاد یا کم خونی مزمن، سـوراخ شـدن، تنگی یا انسـداد شـود. متأسـفانه، هزینه آندوسکوپی کپسـول ویدیویی اسـتفاده گسـترده از آن را محدود کرده اسـت، بنابراین انتروپاتی NSAID همچنان کمتر تشخیص داده می‌شود.

مهارکننده‌های پمپ پروتون (PPIs) همراه با NSAIDها برای بهبود آسـیب NSAID دستگاه گوارش پروگزیمال تجویز شـده‌اند. با این حال، اکنون می‌دانیم که سرکوب اسـید معده نمی‌تواند آسـیب روده دیسـتال ناشی از NSAID را محافظـت یا ترمیـم کند، و در واقع در واقع انتروپاتـی روده کوچـک NSAID را حداقل تا حدی به دلیل تغییرات در تعداد و انواع باکتری‌ها در روده کوچک در طـول درمان با مهارکننده پمپ پروتون بدتر می‌کند. بنابراین PPIها دیگر برای جلوگیری از آسـیب NSAID توصیه نمی‌شـوند، مگـر در بیمارانی که سـابقه زخم دسـتگاه گوارش فوقانی دارند. اگرچه نشـان داده شده اسـت که میزوپروستول آنالوگ پروسـتاگلاندین خطر آسـیب‌های روده فوقانی و کوچک مرتبط با اسـتفاده از NSAIDها را کاهش می‌دهد. میزوپروسـتول باعث درد شکمی، تهوع یا استفراغ یا اسـهال در برخی از بیماران می‌شود و تحمل ضعیف استفاده بالینی میزوپروستول را به ویژه برای پیشـگیری طولانـی مدت محدود می‌کند. بنابراین، یـک عامل تقویت کننـده UGI و LGI برای بیمارانی که به NSAIDها وابسـته هسـتند ارزشـمند اسـت. ترمیم مخاط روده یک فرآیند پیچیده اسـت که شامل ترمیم، تکثیر و رگ زایی است، اما شرط اصلی آن مهاجرت ورقه اپیتلیال یا ترمیم است. چسبندگی کانونی کیناز (FAK)، یک تیروزین کیناز غیر گیرنده ۱۲۵ کیلو دالتون، یک تنظیم کننده کلیدی چنین تحرک سـلولی اسـت. مطالعات قبلی دو مولکول کوچک تجاری موجود را شناسـایی کردند که FAK را در شرایط آزمایشگاهی فعال می‌کردند. و نشان دادند که یکی از این مولکول‌ها، ZINC40099027 نـه تنها بسـته شـدن زخم تک‌لایه سلول Caco-2 را در غلظت‌های کمتر از 10 nM تحریک می‌کند. اما همچنین باعث بهبود زخم مخاطی در هر دو مدل آسیب روده ایسکمیک و آسیب روده موش ناشی از ایندومتاسین می‌شود. علاوه بر این، این مولکول کوچک آسـیب معده ناشی از آسپرین را نیز با فعال کردن FAK بهبود می‌بخشـد. ما اخیراً کتابخانه‌ای از فعال‌کننده‌های جدید مولکول کوچک FAK را توصیف کردیم که FAK را فعال می‌کنند و بسـتن زخم در شرایط آزمایشگاهی را در غلظت‌هـای کمتر از ۱۰۰ pM تسـریع می‌کنند و در عیـن حال باعث بهبود زخم مخاطی روده کوچک در موش‌ها طی سه روز بدون سمیت آشکار می‌شوند. با این حال، این فعال‌کننده‌های FAK، مانند ZINC40099027 و سـایر مولکول‌هایـی کـه تاکنون مـورد مطالعه قرار گرفته‌انـد، همگی نیاز به انحـلال در DMSO دارند که سـمی اسـت. بنابراین، ما یک ترکیب جدید محلول در آب، M64HCl، با خواص دارویی امیدوارکننده را سنتز و ارزیابی کردیم و در اینجا گزارش دادیم که FAK را فعال می‌کند، مهاجرت ورقه اپیتلیال را در شرایط آزمایشگاهی القا می‌کند، و بهبود زخـم مخاط روده را در داخل بدن تحریک می‌کند.

۳. نتایج

۳.۱ ساختار M64/M64HCl و کنترل کیفیت

شکل ۱ ساختارهای ۱-(۲-(دی متیل آمینو)۲--(پیریدین۴--یل) اتیل)۳--(۲-مورفولینو۵--(تری فلورومتیل) فنیل) اوره را نشان می‌دهد.

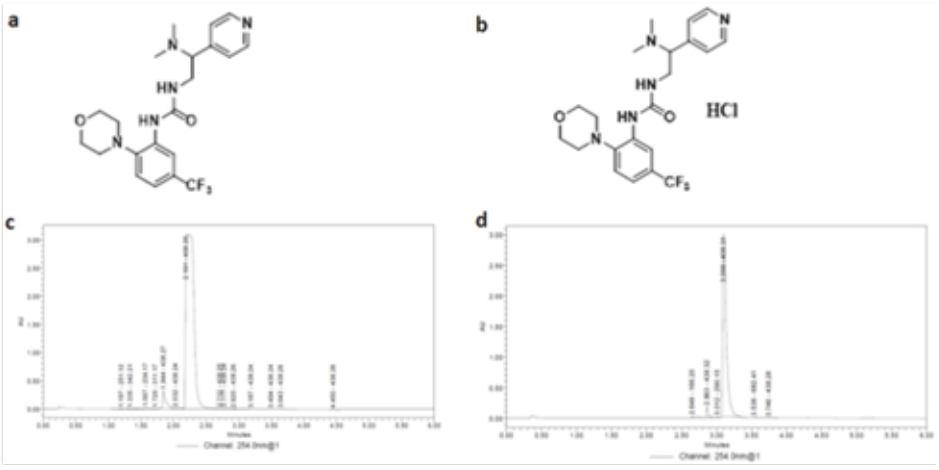
۳.۲ M64HCl باعث فعالیت FAK در سلول‌های Caco-2 می‌شود

سلول‌های Caco-2 معلق تیمار شده با M64HCl فسفوریلاسیون FAK-Tyr397 را در ۱۰۰ pM و ۱ نانومولار به ترتیب ۳.۰ ٪ ۹.۱ ± ۳.۹ ، ۸.۷٪ ± فسفوریلاسیون FAK-Tyr397 فعال کردند (شکل ۲ a, n = p < 0.05). سلول‌های Caco-2 با M64HCl در ۱۰- ۱۰۰۰ نانومولار در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۱ ساعت تیمار شدند و باعث افزایش فسفوریلاسیون FAK-Tyr397 در مقایسه با شاهد H2O به میزان ۷.۴ ۲۰.۲ ± ± ۲۵.۳ ٪ و ۷.۸ ± شد. به ترتیب ۲۸.۴ ٪ ۹.۳ ± (شکل b2 n = 6، * p < 0.05). اثر فعال‌سازی FAK در ۱۰۰ نانومولار با افزودن ZN۴۰۰۹۹۰۲۷ به‌عنوان یک کنترل مثبت تأیید شد (شکل c2 n = 8، * p < 0.05). سپس فعال‌سازی FAK را در سلول‌های AGS اپیتلیال معده انسان آزمایش کردیم. M64HCl فسفوریلاسیون FAK-Tyr-397 را در مقایسه با شاهد H2O به میزان ۷.۴ ± ۲۰.۲ درصد در ۱۰۰ نانومولار افزایش داد (شکل 2d). جالب توجه است، مولکول غیر نمکی M64 FAK را در غلظت ۱۰۰۰-۱۰ نانومولار فعال نکرد (شکل ۳ a).

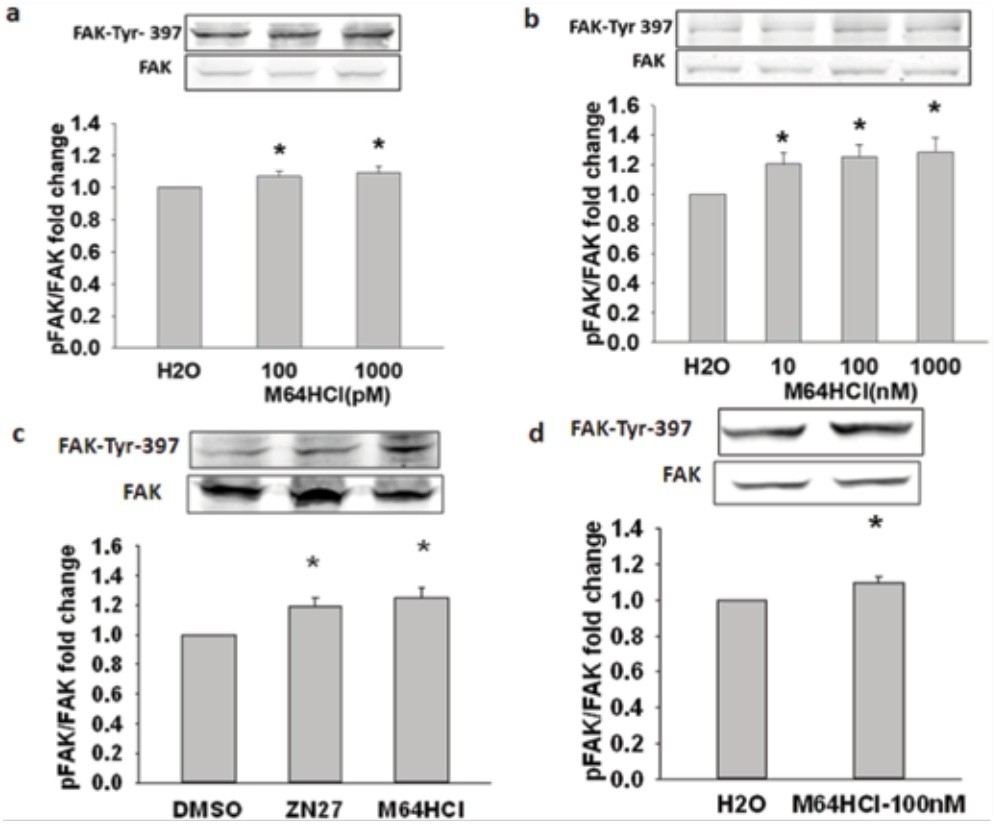
در مقابل، M64HCl پارالوگ FAK، تیروزین کیناز ۲ غنی از پرولین (Pyk2) را که با فسفوریلاسیون Pyk2-Tyr-402 حتی در ۱۰۰۰ نانومولار اندازه‌گیری شد، فعال نکرد (شکل M64HCl .(۳b همچنین پروتئین غیر گیرنده تیروزین کیناز Src را فعال نکرد، همانطور که توسط فسفوریلاسیون Src-Tyr-419 ارزیابی شد (شکل ۳ c).

۳.۳ M64HCl دارای خواص دارویی امیدوارکننده‌ای است

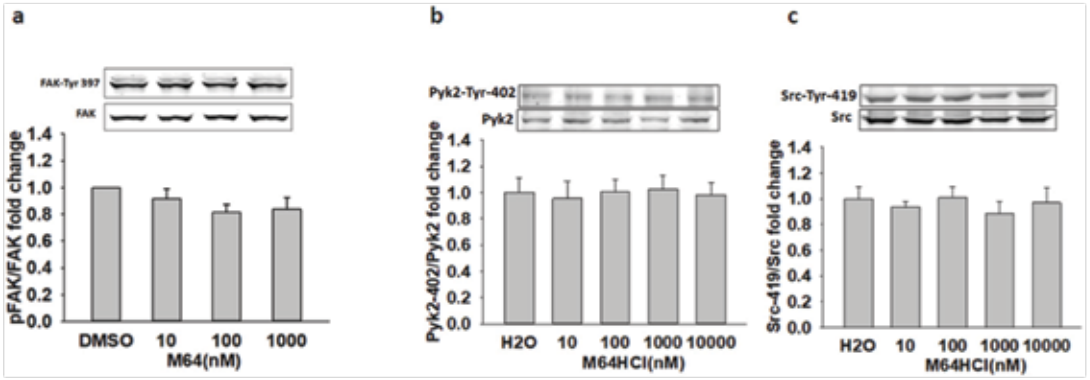
حلالیت M64HCl در بافر ۲۸۹.۲۹ PBS، pH7.4 میکرومولار بود. هیچ تخریبی در مایع شبیه سازی شده معده (pH = ۱.۲) (شکل ۴a) یا مایع شبیه سازی شده روده (pH = ۶.۸) (شکل ۴b) تا ۴ ساعت مشاهده نشد. سنجش Mini-Ames منفی بود. M64HCI افزایش ≤۲ برابری (برای سویه آزمایشگر TA98، TA100 و ((WP2 uvrA (pKM 101 یا افزایش ≤۳ برابری (برای سویه آزمایشگر TA1535 و TA1537) در سطح کلونی‌های برگشتی در مقایسه با هر دو، ایجاد نکرد. کنترل منفی/حلال همزمان هیچ افزایش وابسته به دوز کلنی‌های برگشتی مشاهده نشد. IC 50 CYP2C9، CYP2D6، CYP2C19 و CYP3A4 توسط M64HCl در میکروزوم‌های کبد انسان به ترتیب ۱.۲۵ میکرومولار، ۳.۹۸ میکرومولار، ۱۵.۴۱ میکرومولار، ۰.۴۴ میکرومولار M6-HCl اثر بالقوه 5-bit انسان بود (شکل ۵).



شکل ۱. (a) ساختار M64. (b) ساختار M64HCl. (c) خلوص M64 توسط LC/MS. (d) خلوص M64HCl توسط LC/MS.



شکل ۲. تأثیر M64HCl بر فسفوریلاسیون FAK–Tyr–397 در سلول‌های Caco-2 انسانی. (a) لکه‌های نماینده و تغییر برابر Tyr–397/FAK در سلول‌های Caco-2 به صورت سوسپانسیون در غلظت 100 pM و 1000 pM (n = 4، * p <0.05). (b)لکه‌های نماینده و تغییر چین Tyr–397/FAK در سلول‌های Caco-2 در حالت تعلیق در ۰–۱۰۰۰ نانومولار پس از تیمار با M64HCl (n = 6، * p <0.05). (c) ZN40099027 به عنوان یک کنترل مثبت، FAK را در ۱۰۰ نانومولار فعال می‌کند (n=8، p <0.05). (d) بلات‌های نماینده و تغییر برابری Tyr–397/FAK در سلول‌های AGS تیمار شده با M64HCl در ۱۰۰ نانومولار.



شکل ۳. (a) نسخه غیر نمکی مولکول M64 FAK را در ۱۰۰۰–۱۰ نانومتر فعال نمی‌کند.
(b) M64HCl در ۱۰۰۰۰–۱۰ نانومولار فسفوریلاسیون Pyk2 در Tyr–402 را تحریک نمی‌کند (n=4) یا از (c) Src در (n=4) Tyr-419.

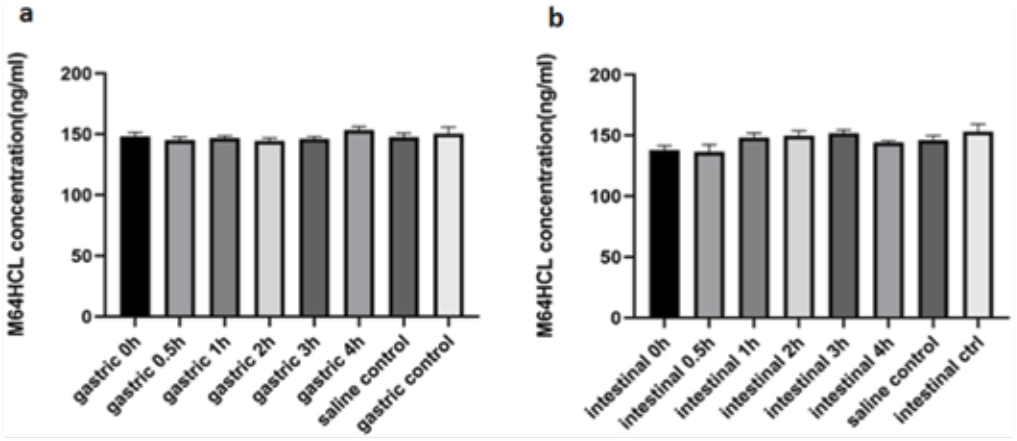
کانال ژن مربوط به go-go (hERG) با استفاده از سیستم پچ‌گیره دستی مورد ارزیابی قرار گرفت. IC50 بیشتر از ۳۰ میکرومولار بود، نشان داد که M64HCl به عنوان یک مهارکننده ضعیف در کانال hERG رتبه بندی می‌شود. ضریب توزیع (Log D) در اکتانول/ PBS 2.87 بود. مطالعات اتصال پروتئین در پلاسمای انسان نشان داد که مولکول ٪۹۱.۴ با ٪۱۱۶.۷ بازیابی و ٪۸۸.۶ پایداری در ۶ ساعت است.

۳.۴ M64HCl بسته شدن زخم تک لایه سلول Caco-2 را تحریک می‌کند

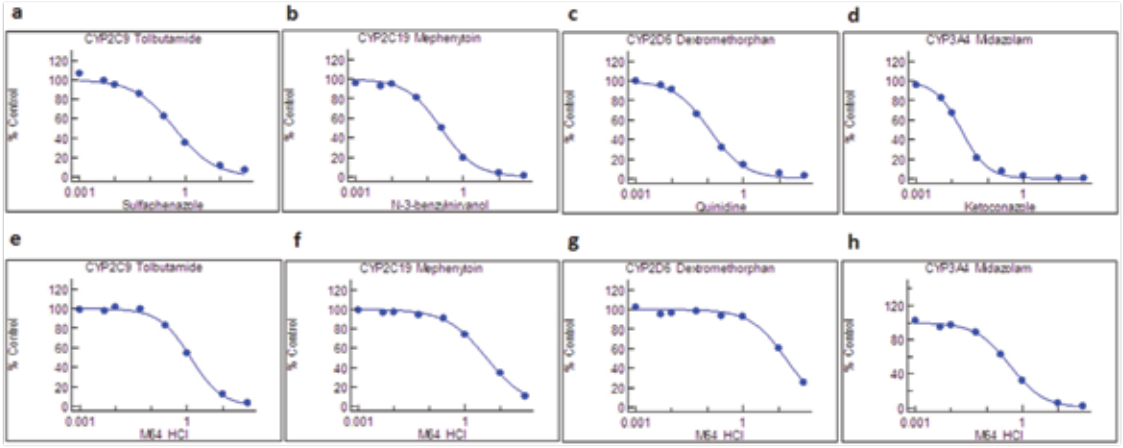
در مقایسه با کنترل H 2O ناقل، انکوباسیون با ۱۰ نانومولار یا ۱۰۰ نانومولار M64HCl به مدت ۲۴ ساعت بسته شدن زخم اپیتلیال Caco-2 را به ترتیب ۰.۸ ± ۱۳.۰ ٪ و ۰.۹ a ٪ ۲۴.۳ ± تحریک کرد (شکل ۶ c)، (n=۱۶، گردآوری شده از ۴ مطالعه جداگانه، 0.05> p *). حتی زمانی که تکثیر توسط هیدروکسی اوره ۴ میلی مولار مسدود شد، M64HCl همچنان بسته شدن زخم تک لایه دایره‌ای را در مقایسه با کنترل‌های H2O تسریع می‌کند (شکل۶ b، d) (n=16 ادغام شده از ۴ مطالعه جداگانه، $p < ۰.۰۵$ *). این نتایج نشان می‌دهد که M64HCl نه تنها FAK را فعال می‌کند، بلکه مهاجرت ورقه اپیتلیال را نیز تحریک می‌کند.

۳.۵ M64HCl به طور مستقیم با دامنه کیناز FAK تعامل می‌کند تا FAK را فعال کند

هنگامی که FAK تمام طول خالص (۱۲۵ کیلو دالتون) یا دامنه کیناز FAK (۳۵کیلو دالتون) به مدت ۳۰ دقیقه



شکل ۴. پایداری M64HCl در سیال شبیه سازی شده (a) غلظت M64HCl در مایع شبیه سازی شده معده در ۴-۰ ساعت در مقایسه با ثبات در سالین. (b) غلظت M64HCl در مایع شبیه سازی شده روده در ۴-۰ ساعت در مقایسه با سالین.

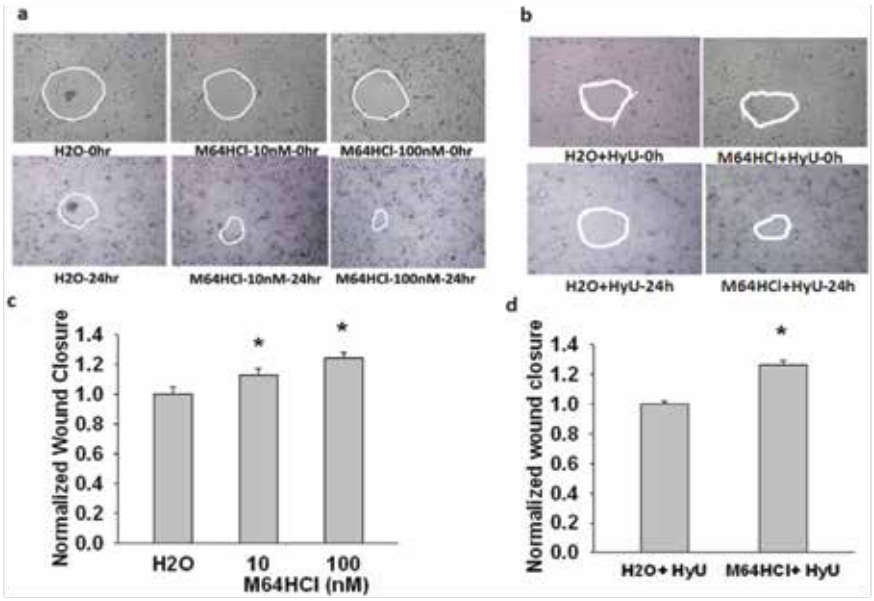


شکل ۵ . مهار CYP2D6 ، CYP2C19 ، CYP2C9 و CYP3A4 توسط M64HCl در شرایط آزمایشگاهی در میکروزوم‌های کبد انسان.

در حضور ATP بدون و با ۱۰ نانومولار M64HCl انکوبه شـــدند، ما افزایش قابل توجهی فعالیـــت کیناز را برای هر دو کامل مشـــاهده کردیم. طول FAK (شـــکل a۷ ، 0.04 ± 1.58، $n = 4$، $^{*}p < 0.05$) و دامنـــه کینـــاز آن (شـــکل b۷ و $0.01 > p$ ***، $n = 4$ ، ± 0.05 1.24) در مقایسه با شـــاهد. برای تعیین غلظت فعال کننده بهینه M64HCl در شـــرایط آزمایشگاهی، ما از همین سیستم تشـــخیص ADP شـــب تاب با دامنه کیناز FAK خالص در محدوده غلظت M64HCl استفاده کردیم. M64HCl وابسته به دوز دامنه FAK کیناز را در مقایسه با مولکول غیـــر نمکی M64 فعال می‌کند (شـــکل c۷). M64HCl Vmax اتصال ATP را در مقایسه با کنترل H2O افزایش می‌دهد (شکل ۷d). این نتایج نشان می‌دهد که M64HCl یک فعال کننده مســـتقیم و بســـیار قوی FAK اســـت.

۶. M64HCl باعث ترمیم مخاط پس از آســـیب مخاط روده موش می‌شود.

ما ابتـــدا ۲ میلی‌گرم بـــر کیلوگرم را بـــه صورت داخل صفاقی به موش‌های C57BL/6J تزریق کردیم و غلظت M64HCl پلاسما را طی ۱۲ ساعت اندازه‌گیری کردیم. ســـطح پلاســـمایی 1 M64HCl ســـاعت پس از تزریق داخل صفاقی به اوج خود رســـید و تا ۲ ســـاعت به طور قابل توجهی کاهش یافت (شـــکل ۸ a). در مرحله بعد، مـــا 10 mg/kg M64HCl را با گاواژ بـــه موش‌ها تزریق کردیم و یک الگوی فارماکوکینتیک مشـــابه پیدا کردیم (شـــکل ۸ b). ما بعد در داخل بدن التیام مخاط اپیتلیال روده را در پاســـخ بـــه M64HCl مطالعـــه کردیم. برای حفظ غلظت پلاســـمایی پایدار، مـــا انفوزیون M64HCl 25mg/kg/day مداوم توســـط پمپ‌های کوچک اسمزی به مدت ۴ روز انجام دادیم. زخم‌های ایسکمیک مخاطی ژژنوم با استفاده از دیسک‌های آغشته به اسید استیک از کاغذ صافی به مدت ۱۵ ثانیه در ســـروز روده ایجاد شد. موش‌های دریافت کننده M64HCl به مدت چهار روز پس از عمل، زخم‌های کوچک‌تری نســـبت به موش‌هایی که شاهد سالین دریافت کرده بودند نشان دادند (شکل ۸c، ۸d 0.37 ± 5.06 mm 2 ، n=10 . در مقابـــل 0.50 ± 3.28



شکل ۶ . تاثیر M64HCl بر بسته شدن زخم تک لایه سلول (Caco-2).

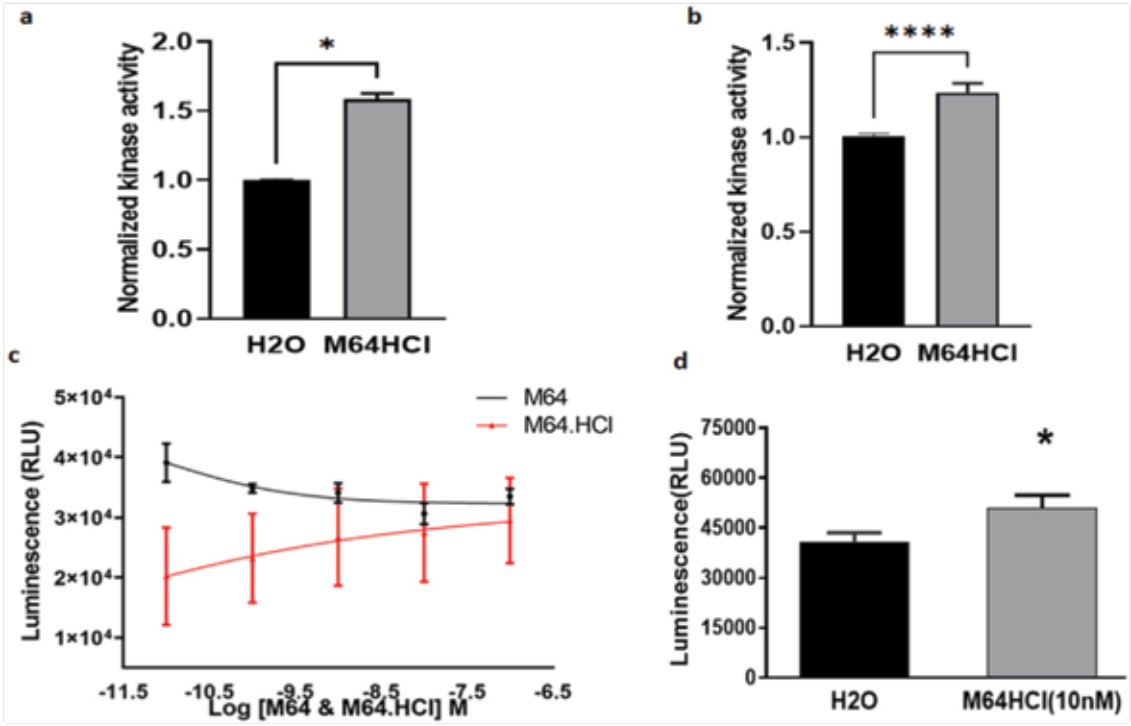
(a) تصاویر زخم معمولی که با H2O یا M64HCl در ۱۰ nM یا ۱۰۰ nM درمان می‌شوند. تصاویر در ۰ و ۲۴ ساعت پس از زخمی‌شدن گرفته شد.

(b) تصاویر زخم معمولی درمان شده با H2O یا M64HCl در ۱۰ نانومولار در حضور ۴ میلی مولار هیدروکسی اوره.

(c) ۱۰ نانومولار یا ۱۰۰ نانومولار M64HCl بسته‌شدن زخم را در تک لایه‌های Caco-2 تسریع می‌کند (۱۶ = n، گردآوری شده از ۴ مطالعه جداگانه، $^{*}p < 0.05$)

(d) M64HCl زخم تک لایه سلول Caco-2 را حتی زمانی که تکثیر توسط هیدروکسی اوره ۴ میلی مولار مسدود می‌شود، افزایش می‌دهد ($n = 16$، $^{*}p < 0.05$).

$p < 0.05$ *). در دومین مدل موش *in vivo*، به موش‌ها ۱۷ میلی‌گرم بر کیلوگرم ایندومتاسین به صورت زیر جلدی برای ایجاد آسیب روده کوچک داده شد و سپس به‌طور تصادفی برای دریافت کنترل سالین، ۲۵ میلی‌گرم/کیلوگرم M64HCl، ۸۰۰ میکروگرم/کیلوگرم میزوپروستول، انتخاب شدند. یا M64HCl به همراه میزوپروستول به مدت ۴ روز. در روز ۴، ضایعات زخمی متعدد در سراسر روده کوچک مشاهده شد.M64HCl کل ناحیه زخم روده کوچک را به ۲۹/۰±۶۹/۲ میلی‌متر مربع در مقایسه با ۳۷/۰±۹۲/۳ میلی‌متر مربع در موش‌های تحت درمان با وسیله نقلیه کاهش داد (شکل ۸ e p <۰.۰۵*) درمان میزوپروستول به تنهایی سطح زخم را به ۰.۳۲ ± ۲.۸۴ میلی متر مربع کاهش داد. مجموع سطح زخم در روده‌های موش‌هایی که هم M64HCl و هم میزوپروستول دریافت می‌کردند ۰.۲۹±۲.۰۷ میلی‌متر مربع بود که همچنین کمتر از شاهد سالین بود (شکل f۸ p *<0.05). ارزیابی ایمونوهیستوشیمی کور، ایمنی واکنش پذیری بالاتری را برای FAK فسفریله در اپیتلیوم در لبه زخم‌های تیمار شده با M64HCl در مقابل زخم‌های تیمار شده با نمک نشان داد (شکل ۸ گرم و ۰.۲۸ ± ۲.۹۷ h, در مقابل ۱.۸۱ ۱.۸۱ ± تا ۴ a ± مقیاس، $n = ۹، p < ۰.۰۵$). غلظت پلاسمایی M64HCl در زمان قربانی ۵۸ نانوگرم ± ۱۱.۲ نانوگرم در میلی لیتر بود که تقریباً معادل ۲۳.۵ ۱۲۲.۴ ± نانومولار بود.



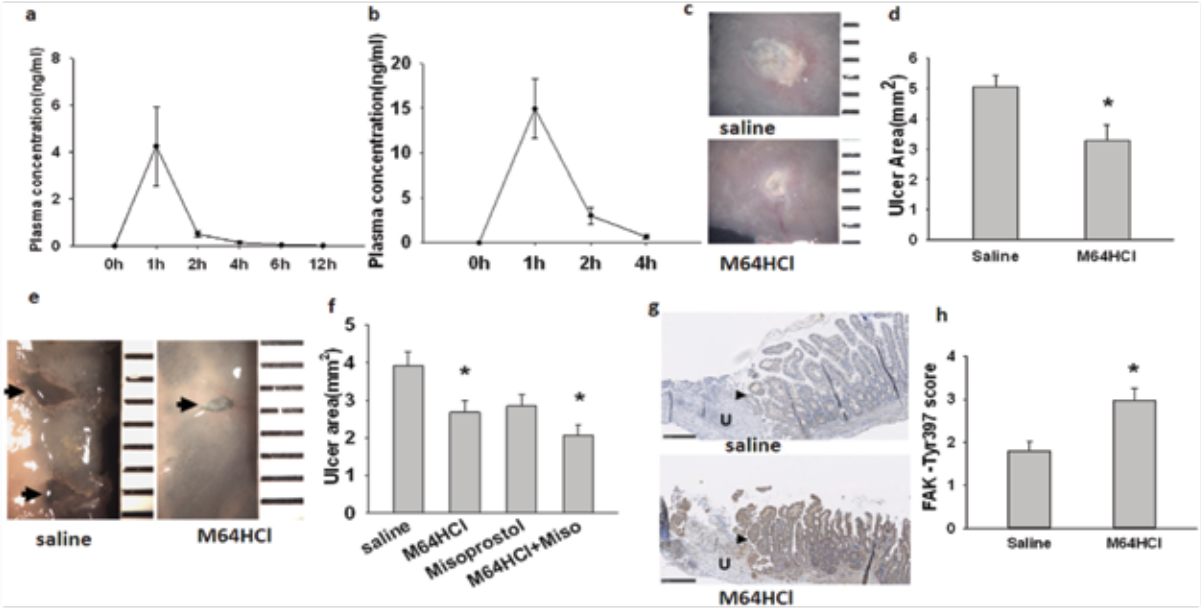
شکل ۷. M64HCl با دامنه کیناز FAK تعامل دارد.

(a) M64HCl تبدیل ATP به ADP را توسط FAK انسانی ۱۲۵ کیلو دالتون با طول کامل خالص شده در یک آزمایش کیناز آزمایشگاهی ۲ آزمایش مستقل با ۴ تکرار در هر آزمایش تحریک می‌کند.

(b) ($p < 0.05$*) اتصال M64HCl تبدیل ATP به ADP را توسط دامنه ۳۵ کیلو دالتون FAK کیناز تحریک می‌کند (شکل داده‌های تلفیقی از ۳ آزمایش را با ۴ تکرار در هر آزمایش نشان می‌دهد

(c) ($n = ۲۰$) دوز M64HCl به طور وابسته دامنه FAK کیناز را در مقایسه با مولکول غیر نمکی M64 فعال می‌کند.

(د) M64HCl Vmax اتصال ATP را در مقابل کنترل H2O افزایش می‌دهد ($n=6، * p <0.05$).



شکل ۸. M64HCl ترمیم مخاط را در دو مدل آسیب روده کوچک موش ترویج می‌کند.

(a) غلظت پلاسمایی ۱۲-۰ M64HCl ساعت پس از یک تزریق داخل صفاقی ۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم در موش.

(b) غلظت پلاسمایی M64HCl پس از تجویز گاواژ ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم.

(c) تصاویری از زخم‌های ایسکمیک ژنوم در موش‌های تحت درمان با نمک و موش‌های تحت درمان با 4 M64HCl روز پس از القای زخم.

(d) ناحیه زخم ایسکمیک پس از ۴ روز انفوزیون مداوم M64HCl یا درمان سالین (0.50 ± 3.28 در مقابل 0.37 ،n = 10 ، 2 mm 5.06 ± .(* p < 0.05

(e) تصاویری از زخم‌های روده کوچک ناشی از ایندومتاسین از موش‌های تحت درمان با نمک و موش‌های تحت درمان با M64HCl.

(f) اندازه مجموع زخم در آسیب روده کوچک ناشی از ایندومتاسین که با کنترل سالین، M64HCl، میزوپروستول یا M64HCl به اضافه میزوپروستول درمان شده است (3.92 mm2 ± 0.37 در گروه کنترل سالین در مقابل 2.69 mm2 ± 0.32 . 2.84 ± 0.29 ± 0.29 mml2 فقط در میزوپروستول در مقابل 2.07 mm2 ± 0.29 در تیمار هم افزایی، p < 0.05 * ،n = 12).

(g) تصاویر ایمونوهیستوشیمی نماینده فسفوریلاسیون FAK-397 در اپیتلیوم در لبه بستر زخم از موش‌های کنترل نمکی یا تحت درمان با M64HCl. فلش‌ها نشان‌دهنده اپیتلیوم در لبه زخم است.

(h) نمرات رنگ‌پذیری فسفر-FAK کور در زخم‌های درمان‌شده با M64HCl در مقابل زخم‌های درمان‌شده با نمک افزایش می‌یابد(n= 9، * p <0.05).

۳.۷. چهار روز درمان انفوزیون مداوم M64H-Cl بر عملکرد کلیوی یا کبدی موش تأثیر نمی‌گذارد

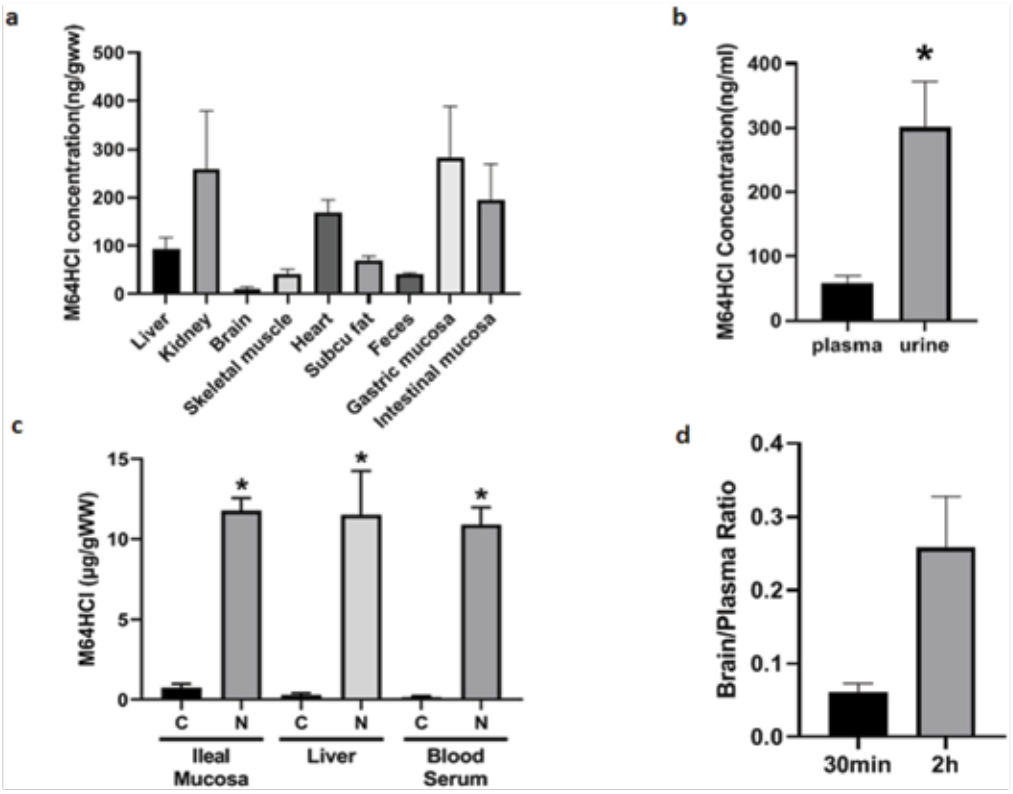
سطح کراتینین و آلانین آمینوترانسفراز پلاسما (ALT) به عنوان شاخص‌های عملکرد کلیوی و کبدی در هر دو مدل زخم اندازه‌گیری شد (جدول ۱). کراتینین پلاسما در موش‌ها بدون هیچ تفاوت آماری بین گروه‌های سالین یا M64HCl در هر دو مدل زخم ایسکمیک و آسیب ناشی از ایندومتاسین در محدوده طبیعی باقی ماند. غلظت ALT پلاسما در موش‌های تحت درمان با نمک و M64HCl در هر دو مدل زخم بالاتر از حد نرمال بود، اما موش‌های تحت درمان با M64HCl سطوح بالاتری نسبت به موش‌های تحت درمان با وسیله نقلیه نمکی نشان ندادند. بافت‌شناسی کلیه در زمان قربانی طبیعی بود. هر مدل منجر به برخی تغییرات التهابی کبدی شد، اما این تغییرات در بین موش‌های تحت درمان با M64HCl و گروه‌های کنترل مشابه ظاهر شد.

جدول ۱. غلظت کراتینین و ALT پلاسما موش پس از دریافت سرم نمکی یا M64HCl 30 mg/kg/day به مدت چهار روز.

مدل ایندومتاسین		مدل زخم ایسکمیک		محدوده نرمال	
M64HCl(n=6)	سالین (n=6)	M64HCl(n=6)	سالین (n=6)		
0.10 ± 0.02	0.14 ± 0.03	0.12 ± 0.023	0.11 ± 0.013	۰.۰۶-۱۶ میلی‌گرم در دسی لیتر	کراتینین پلاسما
0.73 ± 5.02	4.58 ± 0.47	13.15 ± 1.82	13.08 ± 2.03	۰.۶۷-۳.۷۶ نانوگرم در میلی‌لیتر	ALT پلاسما

۳.۸. درمان M64HCl باعث تغییرات رفتاری آشکار یا افزایش کاهش وزن در مدل‌های آسیب روده کوچک نمی‌شود

ما هیچ چروک یا ناهنجاری رفتاری ندیدیم. اگرچه همه موش‌ها با مدل زخم ایسکمیک وزن کم کردند، اما کاهش وزن بیشتری را در موش‌های تحت درمان با M64HCl مشاهده نکردیم. کاهش وزن 4.7 ± 1.1 درصد برای گروه شاهد با سالین در مقابل 0.7 ± 4.6 درصد برای موش‌های تحت درمان با M64HCl در مدل زخم ایسکمیک بود. پس از آسیب روده کوچک ناشی از ایندومتاسین، میانگین کاهش وزن در موش‌های تحت درمان با نمک، M64HCl، میزوپروستول و تیمار ترکیبی 6.08 ± 0.72درصد، 4.92 ± 0.84 درصد، 5.53 ± 1.18 درصد، ٪ و ٪1.0 ± 4.70 به ترتیب.



شکل ۹. توزیع بافتی M64HCl

(a) غلظت M64HCl در بافت‌ها پس از انفوزیون مینی پمپ اسمزی مداوم چهار روزه با ۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در روز.

(b) سطح M64HCl در پلاسمای موش در مقابل ادرار پس از انفوزیون ۴ روزه با ۳۰ میلی‌گرم/کیلوگرم در روز (n=8، * $p<0.05$).

(c) دفع M64HCl توسط نفرکتومی عملکردی دو طرفه مسدود شد. سطح داروی M64HCl با LC-MS 2 ساعت پس از نفرکتومی عملکردی دوطرفه و تزریق زیر جلدی ۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم M64HCl اندازه‌گیری شد. C=کنترل‌های غیر جراحی، N =نفرکتومی (n =2، * $p<0.05$).

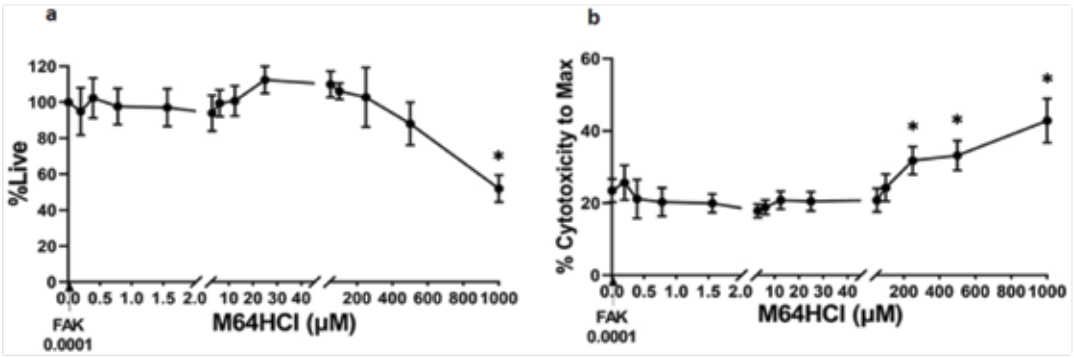
(d) M64HCl در مغز در مقابل پلاسما ۳۰ دقیقه یا ۲ ساعت بعد از ۵ mg/kg به صورت داخل صفاقی تجویز شد.

۳.۹. توزیع بافتی M64HCl

برای درک بیشـــتر توزیع و متابولیسم بافت M64HCl، غلظت M64HCl را در بافت‌های موش پس از چهار روز تزریق مداوم مینی‌پمپ بـــا ۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم در روز بررســـی کردیم. M64HCl در کلیه، مخاط معده و مخاط روده متمرکز به نظر می‌رســـد (شکل ۹a). غلظت M64HCl در ادرار 84/300 ± 27/55 نانوگرم در میلی لیتر بود که تقریباً شـــش برابر بیشتر از پلاسما بود که نشان می‌دهد M64HCl غلیظ شـــده و در ادرار دفع می‌شـــود (شـــکل ۹b). برای تأیید بیشـــتر اینکه M64HCl تا حد زیادی توسط کلیه‌ها دفع می‌شود، نفرکتومی عملکردی دوطرفه برای از بین بردن کلیرانس کلیوی انجام دادیم و سپس سطوح دارو را در سرم، کبد و مخاط روده بررسی کردیم. مـــا افزایش قابل توجهی در M64HCl در مخاط روده، کبد و سرم ۲ ساعت پس از تجویز دارو در موش‌های نفرکتومی شده عملکردی در مقایسه با موش‌های کنترل غیرجراحی مشـــاهده کردیم (شکل ۹c). در یک آزمایش جداگانه، ما یک دوز ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم از M64HCl را به صورت داخل صفاقی تجویز کردیم و ســـپس غلظت پلاســـما و مغز را در ۳۰ دقیقه و ۲ ســـاعت اندازه‌گیری کردیم. ۳۰ دقیقه پس از تزریق، نســـبت مغز به پلاسما 0.06 ± 0.01 بود، در حالی که در ۲ ســـاعت، نسبت مغز به پلاســـما به 0.26 ± 0.07 افزایش یافت که نشان‌دهنده توانایی M64HCl برای عبور از سد خونی مغزی در طول زمان است (شکل ۹d).

۳.۱۰. M64HCl ســـمیت کمی در غلظت‌های بالاتر از FAK فعال نشان می‌دهد

فیبروبلاســـت‌های ریوی انســـانی IMR-90 و سلول‌های عصبی انســـان SH-SY5Y بـــا M64HCl در ۰-۱۰۰۰ میکرومولار تیمار شدند. IC50 سمی برای M64HCl 1 میلی‌مولار در ســـلول‌های IMR-90 (شکل ۱۰a) و ۲۰۰ میکرومولار برای ســـلول‌های SH-SY5Y (شکل ۱۰b) بود، که به طور قابل‌توجهی بالاتر از غلظت آســـتانه ۱۰۰ pM بود که FAK یا حتی غلظت ۱۲۲ نانومولار پلاســـما را که در مطالعات موش به دست آوردیم را فعال می‌کند. ما تـــلاش کردیم تا بالاتریـــن دوز منفـــرد قابل تحمل M64HCl را در داخل بدن مشـــخص کنیم. به موش‌ها دوزهای داخل صفاقـــی M64HCl در ۱۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، ۱۸۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم و ۲۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم (۴ برابر، ۶ برابر و ۸ برابر بیشتر از مدل‌های آسیب مخاط روده موش) داده شـــد. ۱۴ روز بعد ســـالم بودند، در حالـــی که موش‌های دریافت کننده ۳۶۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم پس از تزریق ۴۸ ساعت بیمار و ناراحت بودند و



شکل ۱۰. IC50 سمی برای M64HCl از غلظت فعال کننده FAK 10 7 برابر بیشتر است.

(a) درصد سلول‌های زنده IMR-90 پس از ۴۸ ساعت قرار گرفتن در معرض M64HCl، با روش سمیت سلولی کریستال ویولت تجزیه و تحلیل شد. تعداد درصد کمتر به معنای مرگ سلولی است.

(b) درصد سمیت سلولی به حداکثر انتشار LDH در سلول‌های SH-SY5Y، از طریق سنجش پرومگا سیتوتوکس آنالیز شد. اعداد درصد بالاتر به معنای مرگ سلولی است. محورهای X از ۲ به ۱۰ و ۴۰-۵۰ تقسیم می‌شوند. آستانه فعال سازی FAK با برچسب "FAK"، در میکرومولار در زیر، و با یک خط قرمز نقطه‌گذاری شده است. N=8-9 برای سلول‌های IMR-90، N=6-8 برای سلول‌های SH-SY5Y؛ * $p<0.05$.

جدول ۲. ترکیبات شیمیایی سرم موش پس از تزریق تک دوز M64HCl.

کلسیم (mg/dL)	کالک اسمولاریته (mmol/L)	آنیون گپ (mmol/L)	نسبت Na/K	TCO2 (mmol/L)	کلرید (mmol/L)	پتاسیم (mmol/L)	سدیم (mmol/L)	کراتینین (mg/dL)	نیتروژن اوره (mg/dL)	شناسه حیوان
۸.۶	۳۱۴	۲۳	۲۰	۱۹	۱۱۰	۷.۳	۱۴۵	۰.۲	۲۷	۱۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم
۸.۶	۳۱۱	۱۹	۲۳	۲۱	۱۱۱	۶.۲	۱۴۵	۰.۲	۲۰	۱۸۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم
۸.۶	۳۱۰	۲۰	۲۵	۱۹	۱۱۱	۵.۷	۱۴۴	۰.۲	۲۶	۲۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم
۹.۱	۳۶۵	۲۷	۱۶	۱۲	۱۱۴	۹.۱	۱۴۴	۱	۱۷۵	۳۶۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم
مستقیم بیلی (میلی‌گرم در دسی‌لیتر)	بیلی کل (mg/dL)	آمیلاز (U/L)	گلوکز (mg/dL)	کالک گلوبولین (g/dL)	آلبومین (g/dL)	پروتئین کل (گرم در دسی لیتر)	آهن (ug/dL)	منیزیم (mg/dL)	فسفر (mg/dL)	شناسه حیوان
۰	۰.۲	۵۵۹	۲۵۴	۱.۸	۲.۷	۴.۵	۱۶۲	۲.۶	۷.۶	۱۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم
۰	۰.۲	۳۷۳	۲۴۲	۱.۵	۲.۸	۴.۳	۱۲۴	۲.۶	۸	۱۸۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم
۰	۰.۲	۹۰۸	۲۳۶	۱.۶	۲.۷	۴.۳	۱۳۹	۲.۵	۸	۲۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم
۰	۰.۴	QNS	۲۵۹	۱.۲	۲.۳	۳.۵	۱۳۷	۶.۱	QNS	۳۶۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم
لیپمی شیمی	Icterus Chem	همولیز شیمی	چول (mg/dL)	CK (U/L)	AST (U/L)	ALT (U/L)	GGT (U/L)	ALP (U/L)	بیلی غیرمستقیم (mg/dL)	شناسه حیوان
طبیعی	طبیعی	طبیعی	۷۲	۸۹۸۶	۶۲۸	۱۰۶	<۳	۷۲	۰.۲	۱۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم
طبیعی	طبیعی	طبیعی	۷۶	۸۱۴۰	۵۳۹	۸۰	<۳	۶۳	۰.۲	۱۸۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم
طبیعی	طبیعی	طبیعی	۶۸	۸۸۳۹	۶۸۴	۹۶	<۳	۷۵	۰.۲	۲۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم
طبیعی	طبیعی	اندک	۳۵	QNS	۱۷۳۸	۷۲۱	۷	۳۲۹	۰.۴	۳۶۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم

معدوم شدند. شیمی سرم در mg/kg 180، mg/kg 120 و mg/kg 240 مشابه بود. سمیت کبدی در ۳۶۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم مشاهده شد (جدول ۲).

۴. بحث

یک نیاز اساسی برای یک عامل جدید وجود دارد که به طور مستقیم بهبودی دستگاه گوارش فوقانی و تحتانی را بهبود بخشد و ممکن است برای بهبود آسیب مداوم مخاطی مرتبط با استفاده مزمن NSAID استفاده شود. M64HCl به طور خاص FAK را فعال می‌کند و مهاجرت ورقه اپیتلیال را هم در شرایط in vitro و هم in vivo ترویج می‌کند. خواصی شبیه دارو دارد، حداقل در کوتاه مدت سمی به نظر نمی‌رسد، تا زمانی که سطوح ۱۰۰۰ برابر بیشتر از حد درمانی به دست آید، و جذب روده‌ای شود.

بهبودی مخاطی مهاجرت و تکثیر اپیتلیال را متعادل می‌کند تا روده آسیب دیده را در برابر آسیب مداوم ظاهر کند. NSAIDها با مهار سیکلواکسیژناز، آنزیم اولیه مسئول سنتز پروستاگلاندین، به مخاط UGI آسیب می‌رسانند. این امر جریان خون مخاطی، ترشح مخاط و بی کربنات و تجمع پلاکتی را مختل می‌کند. مهارکننده‌های انتخابی COX-2 عوارض کمتری در دستگاه گوارش فوقانی ایجاد می‌کنند و یا عوامل انتخابی COX-2 یا ترکیبی از NSAIDها با یک مهارکننده پمپ پروتون توصیه شده‌اند. جلوگیری از زخم گوارش فوقانی ناشی از NSAID و کاهش خطر خونریزی مکرر UGI در بیماران در معرض خطر بالای حوادث گوارشی و قلبی عروقی که به آسپرین و NSAID برای درمان‌های قلبی عروقی و ضد التهابی نیاز دارد. با این حال، علائم بیمارانی که بیش از سه ماه با مهارکننده‌های COX-2 درمان شده‌اند، تفاوتی با علائم بیمارانی که با داروهای ضدالتهاب غیراستروئیدی سنتی درمان می‌شوند، نداشت. یک بررسی سیستماتیک اخیر به این نتیجه رسید که مهارکننده‌های انتخابی COX-2 خطر انفارکتوس میوکارد و سایر حوادث قلبی عروقی را افزایش می‌دهند. PPIهایی که مستقیماً پمپ هیدروژن را در سلول جداری مهار می‌کنند یا آنتاگونیست‌های گیرنده H2 که گیرنده هیستامین را در سلول‌های جداری مسدود می‌کنند و در نتیجه آزادسازی یون هیدروژن را کاهش می‌دهند، برای جلوگیری از عوارض جانبی UGI توصیه می‌شود که با NSAIDها تجویز شوند. با این حال، هم مطالعات حیوانی و هم شواهد بالینی نشان می‌دهند که استفاده از PPI یا آنتاگونیست‌های گیرنده H2 به طور چشمگیری آسیب روده دیستال را بدتر می‌کند، خطر خونریزی گوارشی را کاهش می‌دهد. میاک و همکاران، ۲۰۱۵ ؛ لو و لاناس، ۲۰۱۶)، و زخم روده کوچک ناشی از NSAID را تشدید می‌کنند. مکانیسم اصلی این بدتر شدن با افزایش قابل توجه سمیت سلولی صفرا در صورت کمپلکس شدن با NSAID و تغییرات درمیکروبیوتای روده مرتبط با خنثی سازی اسید معده. میزوپروستول آنالوگ پروستاگلاندین سطوح پروستاگلاندین را در سرم و مخاط روده کوچک بالا می‌برد و با افزایش جریان خون و افزایش ترشح موکوس و بی کربنات، دفاع مخاطی را تقویت می‌کند. در حالی که میزوپروستول می‌تواند زخم‌های روده کوچک را در مصرف کنندگان آسپرین التیام بخشد، یک بررسی اخیر توانایی محافظتی آن را ناکافی دانسته است. علاوه بر این، میزوپروستول به دلیل عوارض جانبی از جمله تهوع، استفراغ، اسهال و درد شکمی قابل تحمل ضعیف است و برای پیشگیری مزمن مفید نیست.

FAK بسیاری از فرآیندهای سلولی که برای هموستاز و بازیابی اپیتلیال حیاتی هستند، از جمله مهاجرت سلولی، تکثیر و بقا را تنظیم می‌کند. FAK هم یک پروتئین داربست و هم یک تیروزین کیناز غیر گیرنده است که در طول رشد ضروری است و عملکردهای کلیدی در ترمیم بافت و بهبود زخم دارد. فعال‌سازی FAK برای بهبود مخاط بسیار مهم است. فعال‌سازی FAK با یک تغییر ساختاری شروع می‌شود که دومن FAK کیناز را از دامنه (بازدارنده) FAK FERM آزاد می‌کند. این دومن کیناز FAK را آزاد می‌کند تا FAK را در Tyr-397 اتوفسفریله کند. رابطهای مسئول دیمریزاسیون اولیه و اتصال غشا برای اتوفسفوریلاسیون FAK ضروری هستند فعال شده در لبه زخم‌های تک لایه اپیتلیال روده در شرایط آزمایشگاهی و اطراف زخم‌های معده و کولون انسان در داخل بدن کاهش می‌یابد، که FAK را به یک هدف جذاب برای فارماکوتراپی برای ارتقاء می‌بخشد. بهبود زخم مخاط دستگاه گوارش. تحقیقات ما در مورد فعال‌کننده‌های FAK با جستجو برای جلوگیری از تعامل AKT1-FAK که متاستاز را ترویج می‌کند، آغاز

می‌شود. یک پپتید آمینو اسید 7 mer مشتق از دامنه FAK FERM از این تعامل جلوگیری می‌کند. بنابراین ما به دنبال تقلید ساختار این زیر دامنه FAK با غربالگری در سیلیکو مولکول‌های کوچک موجود بر اساس فرضیات مربوط به ساختار سوم زیر دامنه بودیم. یک صفحه مجازی از پایگاه داده ZINC مولکول‌هایی را بر اساس یک پپتید جهش یافته FAK تولید کرد که چسبندگی سلول‌های سرطانی را کاهش داد. با این حال، دو مولکول بر اساس توالی FAK نوع وحشی همولوگ، FAK را فعال کردند. سپس ما درگیر مطالعه یک سری مولکول مرتبط اضافی شدیم و چهار مولکول اضافی را شناسایی کردیم که فسفوریلاسیون FAK را در غلظت‌های بسیار پایین تحریک می‌کنند. با این حال، تمام آن مولکول‌هایی که تاکنون مورد مطالعه قرار گرفته‌اند، به حل شدن DMSO با سمیت DMSO نیاز داشتند. بنابراین، در کاوش بیشتر، این ترکیب جدید محلول در آب، M64HCl را سنتز و ارزیابی کردیم. مانند مولکول‌های قبلی که در این سری مطالعه کرده‌ایم، به نظر می‌رسد M64HCl احتمالاً از این دنباله FAK تقلید می‌کند و بنابراین به خود FAK متصل می‌شود، مولکول را باز می‌کند و اجازه فعال‌سازی خودکار آن را می‌دهد.

قبلاً گزارش دادیم که فعال کننده FAK ZN40099027 فعالیت FAK را از طریق تعامل با دامنه کیناز FAK افزایش می‌دهد تا Vmax FAK را برای ATP افزایش دهد. ZN40099027 در ۱۰ نانومولار FAK را تا ۱۴.۸ درصد در سلول‌های Caco-2 معلق فعال می‌کند. این مولکول جدید، M64HCl ممکن است قوی‌تر باشد زیرا FAK را در غلظت‌های کمتر از ۱۰۰ pM فعال می‌کند و ۲۰.۲ درصد فعال‌سازی را در ۱۰ نانومولار ایجاد می‌کند. اثرات M64HCl به دوز پاسخگو به نظر می‌رسد، اما در غلظت‌های بالاتر غیر خطی است، و در ٪۳۰-۲۰ فعال‌سازی فلات می‌کند. اگرچه ممکن است این سطح محدودی از فعال‌سازی به نظر برسد، ما و دیگران قبلاً اهمیت افزایش‌ها را مطالعه کرده‌ایم و کاهش با قدر مشابه در فسفوریلاسیون FAK در زمینه‌های دیگر. فعال‌سازی FAK در بالای یک آبشار سیگنال قرار دارد که اثرات آن را برای ایجاد پیامدهای بیولوژیکی بسیار واقعی تقویت می‌کند. در واقع، نتایج کنونی ما نشان می‌دهد که این اثر متوسط بسته شدن زخم تک لایه سلول Caco-2 را تحریک می‌کند در حالی که مطالعات in vivo ما به وضوح نشان می‌دهند که M64HCl باعث بهبودی مخاط روده در دو مدل حیوانی آسیب روده کوچک می‌شود.

M64HCl نه Pyk2، کیناز نزدیک به FAK، و نه Src، دیگر تیروزین کیناز غیر گیرنده اصلی دیگر را در مجتمع چسبندگی کانونی فعال نمی‌کند، حتی در ۱۰ میکرومولار، غلظتی ۱۰۰۰۰ برابر بیشتر از غلظت مورد نیاز برای فعال کردن FAK. . ما انتظار داریم (و در واقع قبلاً برای ZN۲۷ فعال کننده FAK گزارش داده بودیم که سایر کینازهای پایین دست FAK نیز در پاسخ به فعال سازی FAK فعال شوند. فعال کردن FAK ممکن است از نظر تئوری کمتر احتمال داشته باشد، زیرا Pyk2 را فعال نمی‌کند، اما یک احتمال برای مطالعه آینده باقی می‌ماند.به نظر می‌رسد M64HCl مهاجرت ورقه اپیتلیال را مستقیماً در شرایط آزمایشگاهی ترویج می‌کند و بهبود مخاط را در موش تسهیل می‌کند.

M64HCl دارای خواص فیزیکوشیمیایی دارو مانند است. وزن مولکولی آن ۵۰۰>، حلالیت ۱۰۰ < میکرومولار و log D بین ۰ تا ۳، همگی احتمال نفوذپذیری خوب روده را افزایش می‌دهند. در واقع، پس از گاواژ روده‌ای به سرعت جذب می‌شود و به شدت در مخاط معده و روده کوچک متمرکز می‌شود. M64HCl سمیت سلولی را در ۱ میلی‌مولار در فیبروبلاست‌های ریوی انسانی IMR-90 و ۲۰۰ میکرومولار در سلول‌های عصبی SH-SY5Y نشان می‌دهد، ۱۰۷ برابر بیشتر از ۱۰۰ pM که FAK را فعال می‌کند. این ممکن است توضیح دهد که چرا ما هیچ سمیت عصبی آشکاری را در دوزهای درمانی مشاهده نکردیم، حتی اگر M64HCl از سد خونی مغزی عبور کند. حداکثر دوز تک دوز قابل تحمل M64HCl در داخل بدن ۲۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم است. یک ساعت پس از دوز ۲۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، سطوح پلاسما ۱۷۶ میکروگرم بر میلی لیتر است که ۳۰۰۰ برابر در مقایسه با غلظت پلاسمایی درمانی ۵۸ نانوگرم بر میلی لیتر پس از ۴ روز دوز ۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در روز تغییر می‌کند.

اگرچه مهارکننده‌های FAK در کارآزمایی‌های درمانی برای درمان سرطان استفاده شده‌اند اما به طور یکسان موفق نبوده‌اند. آزمایش ایمز نتوانست اثر جهش‌زایی M64HCl را نشان دهد، و ما اثر میتوژنیک را حتی در

غلظت‌های بالاتر از میزان موثر در رده‌های سلولی مورد مطالعه مشاهده نکردیم. مطالعات جداگانه نشان می‌دهد که فعال‌سازی FAK توسط این دسته از مولکول‌های کوچک ناقص است و در مکان و پیامدهای سیگنال‌دهی پایین دست با پارادایم‌های مرسوم فعال‌سازی FAK توسط فاکتور رشد و پروتئین‌های ماتریکس متفاوت است.

M64HCl یک ترکیب دارو مانند امیدوارکننده است. با این حال، نیمه عمر کوتاه پلاسمایی آن ممکن است در استفاده بالینی نیاز به دوزهای متعدد داشته باشد. مطالعات آینده باید بر روی طراحی و بهینه سازی نسل بعدی مولکول‌های سرب برای نیمه عمر طولانی تر تمرکز کنند، بنابراین به طور بالقوه یک درمان موثر برای آسیب مخاطی دستگاه گوارش مرتبط با NSAID ایجاد می‌شود که بهبودی مخاطی پروگزیمال و دیستال را افزایش می‌دهد.

۵. نتیجه گیری

M64HCl یک مولکول کوچک دارو مانند محلول در آب است که چسبندگی کانونی کیناز را فعال می‌کند و باعث بهبودی مخاط روده در موش‌ها پس از آسیب با حداقل سمیت می‌شود.

منبع:

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9827036/

پتانسیل درمانی کارنوزین: تمرکز بر سلولی و مکانیسم‌های مولکولی

غزل قجری [1]

۱- کارشناسی ارشد سلولی مولکولی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران
پژوهشگر مرکز تحقیقات پزشکی شخصی آمیتیس

چکیده

کارنوزین یک دی‌پپتید درون‌زای طبیعی است که از اتصال بتاآلانین و ال هیستیدین تشکیل شده است به ویژه توسط بافت‌هایی با متابولیسم اکسیداتیو افزایش‌یافته مانند عضلات و مغز تبدیل می‌شود. در ۵۰ سال گذشته سال‌ها مطالعات مختلف نقش و عملکرد کارنوزین را از طریق تعداد زیادی *in vitro* و *in vivo* ارزیابی کرده‌اند. مطالعات بالینی، نشان‌دهنده مکانیسم عملکرد چندوجهی این دی پپتید است که شامل ضد آگرگانت است، فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی به ویژه فعالیت آن به صورت تجربی در مدل‌های بیماری قلبی عروقی (CVD)، دیابت نوع ۲ (T2DM) و اختلالات عصبی، مانند به عنوان ایسکمی مغزی و بیماری آلزایمر (AD) مورد بررسی قرار گرفته است. در مطالعه حاضر، نقش محافظتی را بررسی کردیم. کارنوزین می‌تواند در زمینه CVD، T2DM، و AD دخیل باشد که مکانیسم‌های بیماری‌زایی مشترکی را از جمله استرس اکسیداتیو، التهاب، و پدیده‌های تجمع را نشان می‌دهند. مشخصات فارماکودینامیک کارنوزین چندوجهی و ترکیبی از فعالیت‌های ضد التهابی و آنتی‌اکسیدانی سیستمیک با اثر ضد تجمع و محافظتی عصبی در سیستم عصبی مرکزی مسیر گسترده جدیدی را در فعالیت فارماکولوژیک باز می‌کند. این بررسی به پتانسیل ویژه درمانی کارنوزین در سه گروه از بیماران شامل بیماران مبتلا به دیابت T2، که اغلب سابقه CVD را نشان می‌دهند و همچنین بیمارانی که خطر ابتلا به اختلالات شناختی خفیف و AD را دارند می‌پردازد.

مقدمه

کارنوزین بیش از ۱۰۰ سال پیش در دانشگاه چارکوف اوکراین توسط گولویچ و امیر ادزیبا هنگامی که در حال تجزیه و تحلیل عصاره گوشت بودند کشف شد. کارنوزین یک دی‌پپتید طبیعی ساخته شده از بتاآلانین و ال هیستیدین است که به طور گسترده در بافت‌های پستانداران توزیع می‌شود، به طوریکه می‌توان آن را در سطح بسیار بالایی در عضلات قلبی و اسکلتی و همچنین در مغز یافت. برخی از گونه‌های بی‌مهرگان نیز حاوی کارنوزین است. بسیاری از مطالعات اخیر فارماکولوژیک متفاوتی را شناسایی کرده‌اند و فعالیت‌های اعمال شده توسط کارنوزین، که از جمله آنها ضد آگرگانت است و اثر آنتی‌اکسیدان، و فعالیت‌های ضد التهابی قطعا قابل توجه را هر دو گونه اکسیژن فعال (ROS) و نیتروژن (RNS) به طور معمول توسط ارگانیسم‌های درگیر در مکانیسم‌های سیگنالینگ و عملکردهای فیزیولوژیکی، در حالی که دیسومئوستاز آنها با شرایط پاتولوژیک متعدد و به ویژه اختلالات نورودژن مرتبط است. عدم تعادل بین تولید و خنثی‌سازی آن‌ها، که می‌تواند به تجمع ROS/RNS یا به اختلال در سیستم آنتی‌اکسیدانی بستگی داشته باشد، منجر به شرایط استرس اکسیداتیو و نیتروزاتیو می‌گردد. ارگانیسم با افزایش غلظت واسطه‌های پیش‌التهابی به محرک‌های بیولوژیکی، شیمیایی یا فیزیکی پاسخ می‌دهد تا شرایط محرک را سرکوب و یا ا از آسیب به خود جلوگیری نماید. در میان سیتوکین‌های پیش‌التهابی، سه مورد بیشتر مورد مطالعه قرار گرفته‌اند: فاکتور نکروز تومور α-(TN))، اینترلوکین (IL-1βو IL-6) (استیونز) عوامل اصلی محسوب می‌شوند و مسئول وضعیت التهابی که در پی خواهد داشت هستند. بسیاری از اختلالات نورودژنراتیو با این بیماری مرتبط هستند. سه مکانیسم مضر در بالا (استرس اکسیداتیو، التهاب، و تجمع پروتئین)، مانند ایسکمی مغزی بیماری قلبی عروقی (CVD)، دیابت نوع ۲ (T2DM) و کارنوزین AD که قبلا ذکر شد، بنابراین، از طریق مکانیسم اثر چندوجهی خود، می‌تواند نقش مهمی در مقابله و یا در بهترین حالت، به طور کامل از تغییرات مولکولی زمینه‌ساز مرگ نورون‌ها در این آسیب شناسی‌ها جلوگیری نماید. هدف بررسی حاضر تجزیه و تحلیل عمیق نقش محافظتی کارنوزین در زمینه بیماری‌های عصبی مرتبط با استرس اکسیداتیو، التهاب و پدیده‌های تجمع می‌باشد.

به طور خاص، ما مکانیسم‌های سلولی و مولکولی اعمال شده توسط کارنوزین را بررسی خواهیم کرد، که زمینه‌ساز پتانسیل درمانی این دی پپتید طبیعی است و شواهد متعددی نسبت به آن علاقه رو به رشد مستند شده در سال‌های اخیر را توجیه می‌کند. هدف نهایی بیان اثربخشی پیش بالینی شناخته شده آن به کاربردهای بالینی برای بهبود کیفیت زندگی بیمار است.

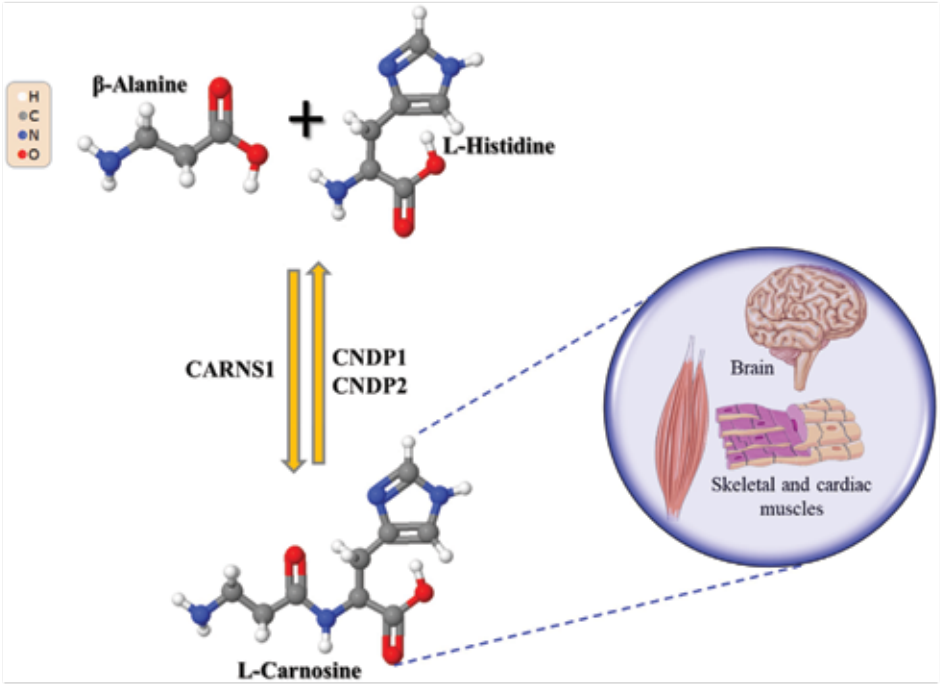
متابولیسم کارنوزین و فعالیت‌های بیولوژیکی

سنتز کارنوزین بر اساس کارنوزین سنتتاز ۱ (CARNS1) است و از طریق یک واکنش وابسته به ATP، دی پپتید (β-آلانیل-ال-هیستیدین) را تشکیل می‌دهد که از اسیدهای آمینه دو جزئی آن بتا آلانین شروع می‌شود که ال هیستیدین و تخریب کارنوزین، مکانیسم اصلی تنظیم کننده سطح آن در بافت‌ها و همچنین در مایعات بیولوژیکی به دلیل فعالیت دو دی‌پپتیداز مختلف متعلق به خانواده لوپروتئاز فلزی M20: کارنوزین دی پپتیداز ۱ (CNDP1) و کارنوزین دی پپتیداز ۲ (CNDP2) در سیتوزول می‌باشد (شکل ۱).

همانطور که قبلاً ذکر شد، سطوح کارنوزین در ماهیچه‌های قلبی و اسکلتی، حاوی ٪۹۹ از کل کارنوزین بدن و در مغز بسیار بالا است. همچنین دی‌پپتیدهای مختلف حاوی هیستیدین اضافی از جمله آنسرین، آنالوگ متیله کارنوزین را می‌توان در بافت‌های گونه‌های جانوری یافت. کارنوزین دارای فعالیت‌های بیولوژیکی متعدد و قابل ذکر است و در واقع، می‌تواند فعالیت‌های بیولوژیکی خود را نه تنها در عضله و سطوح مغز که در آن به شکل بسیار بالا متمرکز است اعمال نماید. همچنین در طول دهه‌های گذشته تعداد زیادی از مطالعات به شرح ساختار کارنوزین و فعالیت بیولوژیکی در نواحی مختلف بدن احتمالاً بومی‌سازی غالب آن پرداخته‌اند.

نقش فیزیولوژیکی اصلی اعمال شده توسط این دی‌پپتید در بافت عضله ثابت شده است. کمک به "پدیده سورین"، جلوگیری از اسیدی شدن عضلانی با کاهش تجمع لاکتات، تنظیم انرژی عضلات، متابولیسم و افزایش عملکرد فیزیکی و کارکردهای اجرایی به عنوان خلاصه مرتبط‌ترین فعالیت‌های دارویی کارنوزین می‌باشد و نتیجه

فعالیت‌های متعـــدد آن، توانایی بهبود بافر داخل عضلانی است. کارنوزین قبلاً به عنوان یک "پادزهر درونی طبیعی" در نظر گرفته شده است. مشخص شده است که کارنوزین که از بافت عضلانی خارج می‌شود، به عنوان انتقال‌دهنده عصبی، بهبود دهنده متابولیسم انرژی سلولی، افزایش پاسخ ایمنی، تنظیم متابولیسم RNS (از جمله نیتریک) اکسید (NO))، فعالیت‌های ضد گلیکوزیشن و ضد پیری فعالیت می‌کند و فلزات سنگین را جداسازی و/یا چلات می‌نماید. توانایی کارنوزین برای تعدیل سیستم گلوتاماترژیک توسط افزایش فعالیت ناقـــل گلوتامات ۱ (GLT-1) که منجر به کاهش سطح گلوتامات در سیستم عصبی مرکزی (CNS) و در نتیجه جلوگیری از ســـمیت تحریکی با توجه خاص به متابولیســـم کارنوزین می‌شود به خوبی نشان داده شده است. هشت پروتئین مختلف: CARNS1 سنتز کارنوزین، CNDP1 و CNDP2 تخریب کارنوزین و کارنوزین N متیل ترانسفراز (CARNMT1) متیلاسیون کارنوزین را تنظیم می‌نمایند. چهار پروتئین اضافی ناقل کارنوزین هســـتند. در مغز انســـان، CARNS1 تنها در الیگودندروســـیت‌ها بیان می‌شود (در حالی که در موش‌ها فقط در سلول‌های میلینی کننده الیگودندروســـیت‌های تازه تشـــکیل شده بیان می‌شـــود) که بیشتر مسئول تخریب آن هستند و از طریق فعالیت CNDP1 رخ می‌دهد. آستروسیت‌ها دارای ناقل‌هـــای ضروری برای جذب کارنوزین هســـتند، به این معنی که این ســـلول‌ها حتی اگر قادر به سنتز آن نیستند به نوعی از این دی‌پپتید اســـتفاده می‌کنند که احتمالاً به این دلیل است که بتا آلانین با بازجذب گاما آمینوبوتیریک اسید (GABA) تداخل می‌کند. سلول دیگری که قادر به مدیریت کارنوزین اســـت میکروگلیا است. اولین شواهدی که بین کارنوزین و CNS ارتباط برقرار می‌کند فیزیولوژی با کمبودهای ناشـــی از نارسایی آن نشـــان داده می‌شود. کارنوزین یک واژه مرتبط با آسیب‌شناســـی اســـت که با تغییر دژنراتیو CNS مشـــخص می‌شود و اغلب همزمان با کارنوســـینوری، بیماری ناشی از آن به صورت ترشح بیش از حد کارنوزین در ادرار ظاهر می‌شود و در بدترین حالت، فعالیت کارنوزیناز ســـرم محدود است یا اصلاً وجود ندارد. کالبد شـــکافی در الف همچنین مغز پـــس از مرگ بیمار با کمبودهای فوق‌الذکر دژنراسیون آکسون و "سفرویدها" در ماده خاکستری، دمیلیناســـیون، و فیبروز، همراه با از دســـت دادن ســـلول‌های پورکنژ. چندین ســـایر آسیب شناســـی‌ها با کمبود کارنوزین مانند دژنراســـیون ماکولا وابســـته به سن، فعالیت‌های دارویی مختلف، از جمله ضد تجمع، آنتی اکسیدانی و ضدالتهابی مرتبط هستند و دلیل



شکل ۱. متابولیسم کارنوزین (سنتز و تجزیه) و محلی سازی (بافت‌هایی با بالاترین غلظت)

اینکه چرا پتانسیل درمانی کارنوزین در نظر گرفته شده است بیماری‌های متعدد از جمله ایسکمی مغزی، CVD، T2DM، افسردگی و زوال عقل، سرطان، پارکینسون و اخیراً COVID-19 به دلیل عوارض دراز مدت این عفونت می‌باشد.

کارنوزین و بیماری‌ها

همانطور که در بالا ذکر شد، پتانسیل درمانی کارنوزین در چندین بیماری بررسی شده است و بخش‌های بعدی با جزئیات بیشتری وضعیت دخالت کارنوزین در فیزیوپاتولوژی AD، T2DM و CVD را بررسی می‌کنند، همه آسیب‌شناسی‌هایی که با استرس اکسیداتیو و نیتروزاتیو، التهاب و تجمع نابجای پروتئین مشخص می‌شوند.

بیماری آلزایمر (AD)

بیماری آلزایمر (AD) شایع‌ترین نوع زوال عقل اولیه و آن را نشان می‌دهد. هزینه‌های اجتماعی و مالی سنگینی را در سراسر جهان به همراه دارد. ویژگی‌های بالینی اصلی AD با کمبود حافظه، وخامت، و علائم عصبی روانی -شناختی نشان داده می‌شود.

دو علامت مشخص AD، تجمعات درون سلولی پروتئین تاو (درهم‌تنیدگی‌های نوروفیبریلاری) و پلاک‌های پیری حاوی آمیلوئید (Aβ) β، است که هم برای تعاملات بالقوه آنها و هم اثرات هم‌افزایی آنها در القای مرگ عصبی در مغز AD مورد مطالعه قرار گرفته است.

با توجه به فرضیه آمیلوئید اصلاح شده، الیگومرهای ۴۲ اسید آمینه‌ای Aβ (Aβ1-42) نشان‌دهنده مولکول‌های سمی اصلی هستند که باعث ایجاد یک آبشار بیماریزای پیچیده می‌شود که در میان همه، منجر به فسفوریلاسیون بیش از حد پروتئین تاو و اختلال عملکرد سیناپسی می‌شود که با مرگ سلول‌های عصبی خاتمه می‌یابد، علاوه بر این، نشان داده شده است که مونومر Aβ1-42 یک عملکرد کلیدی در بقای نورون ها، نورون‌ها و همچنین هموستاز گلوکز در فرآیندهای یادگیری و حافظه اعمال می‌نماید.

بنابراین، پیشنهاد شده است که در مراحل اولیه AD، وقوع تجمع Aβ1-42 ممکن است مونومرها را مصرف کند (که به الیگومرها تبدیل می‌شوند) و حمایت تغذیه‌ای به سلول‌های عصبی را کاهش دهد، که منجر به شروع نقص‌های شناختی و کمک به آسیب‌شناسی AD شود. نشان داده شده است که کارنوزین از تجمع Aβ در CNS جلوگیری می‌کند. در موش‌های تراریخته مدل AD فیبریلوژنز در شرایط آزمایشگاهی Aβ1-42 را نشان می‌دهند و باعث کاهش آن می‌شود. فرض شده است که کارنوزین در فاز ازدیاد طول فیبریل‌ها و همچنین گونه‌های الیگومری کروی در فاز مونتاژ دخالت می‌کند. التهاب عصبی معمولا به عنوان یک عامل اصلی در این بیماری شناخته می‌شود. پاتوفیزیولوژی AD، با یک تعامل متقابل بین میکروگلیا و آستروسیت‌های ترویج شده توسط الیگومرهای Aβ. نشان داده شده است که تولید بیش از حد سیتوکین‌های پیش التهابی، از جمله IL-1β، TNF-α، و IL-6، عمیقاً در AD دخیل است، در حالی که سطوح فاکتور رشد تبدیل کننده واسطه ضد التهابی β1 - (TGF) در AD کاهش می‌یابد.

علاوه بر این، دانه‌های Aβ نشان داده شده است که Ca۲þ را مختل می‌کند. هموئستاز، سطح استرس اکسیداتیو را افزایش می‌دهد، بنابراین باعث افزایش یخ زدگی سیناپتوکس و مرگ نورون‌ها می‌شود. علاوه بر این، تغییرات متابولیکی با پاتوژنز AD مرتبط است زیرا محصولات نهایی گلیکوزیشن پیشرفته (AGEs) نیز در پلاک‌های Aβ یافت شدند.

فقدان فاکتور نوروتروفیک مشتق از مغز به خوبی ثابت شده است.

(BDNF) و فاکتور رشد عصبی به طور قابل توجهی به تخریب عصبی در مغز AD و کمبود BDNF و گیرنده آن تروپومیوزین گیرنده کیناز B (TrkB) کمک می‌کند که در اوایل AD رخ می‌دهد. جالب توجه است، در مطالعات اخیر ثابت شده است که کارنوزین از سد خونی مغز عبور می‌کند و باعث آزاد شدن نوروتروفین‌هایی مانند BDNF و NGF از سلول‌های گلیال می‌شود.

ما قبلاً فرضیه‌ای را مطرح کرده‌ایم و داده‌های اولیه‌ای داریم که نشان می‌دهد توانایی کارنوزین برای حفظ سطوح مونومرهای Aβ با مهار تجمع آنها در الیگومرهای گلوب Aβ یا جدا کردن دانه‌هایی که قبلاً تشکیل شده‌اند. هدف اصلی برای مطالعات آتی ما اعتبارسنجی اثربخشی پیش‌بالینی کارنوزین در مدل‌های آزمایشی و حیوانی مختلف AD است تا سپس مطالعات بالینی فاز

I/II را در بیماران با اختلال شناختی خفیف اوایل بعد از میلاد برنامه‌ریزی کنیم.

دیابت نوع ۲ (T2DM)

دیابت شیرین یک وضعیت متابولیک است که با سطوح بالای گلوکز خون (هیپرگلیسمی) مشخص می‌شود. دیابت نوع ۱ (عدم تولید انسولین) و T2DM (اختلال در پاسخ‌گویی به انسولین و نارسایی سلول‌های پانکراس) دو نوع شایع دیابت هستند. عدم حساسیت به انسولین به دلیل مقاومت به انسولین، کاهش تولید انسولین و نارسایی لوزالمعده از ویژگی‌های اصلی دیابت نوع دوم است. عوارض دیابت شامل کتواسیدوز، نوروپاتی، رتینوپاتی، نفروپاتی، آسیب عصبی و آترواسکلروز است که همگی در شدت و مرگ بیماران دیابتی نقش دارند. مطالعات به خوبی نشان داده شده است که هیپرگلیسمی و هیپرلیپیدمی حلقه‌ای ایجاد شده در T2DM به شدت با استرس اکسیداتیو و التهاب مرتبط هستند و در ایجاد دیابت نقش دارند. علاوه بر این، ارتباط اختلال سلول‌های β پانکراس، وقوع تجمع آمیلین در سلول‌های بتا لوزالمعده به خوبی با مکانیسم‌های مولکولی سیتوتوکسیک پیشنهادی مختلف، از جمله استرس اکسیداتیو ناشی از تولید ROS به خوبی شناسایی شده است.

مطالعات مختلف ارتباط عصبی بیولوژیکی بین متابولیسم کارنوزین و T2DM از دیدگاه ژنتیکی، پلی مورفیسم‌های ژن کارنوسیناز ۱ و ژن CNDP1 با بیماری کلیوی دیابتی مرتبط هستند. علاوه بر این، اثر محافظتی کارنوزین بر سلول‌های کلیه انسان تحت شرایط هیپرگلیسمی، و کنترل متابولیک آن در دیابت است. همچنین چندین مطالعه ارتباط پتانسیل‌درمانی کارنوزین و سطوح سرمی کارنوزیناز و حساسیت به نفروپاتی در مدل‌های حیوانی را ثابت کرده‌اند که نشان‌دهنده وجود اثر محافظتی کارنوزین در کلیه‌ها است.

در پیشگیری از عوارض T2DM شواهد بالینی اثربخشی مکمل کارنوزین را بر سطوح گلوکز، تری گلیسیرید و TNF-α در بیماران مبتلا به دیابت نوع دوم به عنوان مکملی برای عوامل ضددیابتی نشان می‌دهد.

عوارض ریز عروقی دیابت به دلیل تولید بیش از حد AGEها است. در این زمینه نشان داده شده است که کارنوزین می‌تواند با گونه‌های کربونیل فعال (RCS) واکنش نشان دهد و از تشکیل آنها جلوگیری کند.

به طور خلاصه، شواهد زیادی نقش بالقوه درمانی کارنوزین را که می‌تواند در برابر T2DM به‌عنوان یک ترکیب آنتی‌اکسیدان، ضد گلیکوزیشن و ضد نیترات‌کننده اعمال کند و همچنین تاثیر بر کنترل قند خون و و پیش‌گیری از عوارض دیابت نشان می‌دهد.

بیماری قلبی عروقی (CVD)

اصطلاح "بیماری قلبی عروقی(CVD) " موارد مختلفی را در برمی‌گیرد. از نظر آسیب‌شناسی، آترواسکلروز به عنوان علت اصلی CVD شامل دو مشخصه سخت شدن و باریک شدن رگ‌ها و همچنین با تشکیل پلاک در دیواره‌های عروق کرونر داخلی می‌باشد. شکل‌گیری این پلاک‌ها با ترشح هورمون‌ها، عوامل رشد، و واسطه‌های پیش التهابی و پرواکسیدانی و در نتیجه تعامل بین سلول‌های اندوتلیال، لیپوپروتئین‌های با چگالی کم (LDL) و سلول‌های ایمنی مانند ماکروفاژها مرتبط می‌باشد. پتانسیل‌درمانی کارنوزین در زمینه CVD و در پیشگیری از عوامل خطر قلبی متابولیک با تمرکز بر آترواسکلروز در اکثر مطالعات مشخص شده است. بارسکی و همکاران، با استفاده از مدل آترواسکلروز متشکل از ApoE / موش تغذیه شده با رژیم غذایی پرچرب، توانایی مکمل کارنوزین در رژیم غذایی برای جلوگیری از تشکیل ضایعات آترواسکلروتیک اولیه را نشان داد. از همین مدل حیوانی توسط گروه تحقیقات دیگر با نتایج مشابه در تعدیل پدیده‌های مرتبط با استرس اکسیداتیو یعنی کاهش آترواسکلروز و بیماری کلیوی از طریق کاهش استرس اکسیداتیو و التهاب استفاده شد. در یک مطالعه دیگر که توسط براون و همکارانش انجام شد، استفاده از یک ApoE دیابتی ناشی از استرپتوزوتوسین در موش در معرض مکمل خوراکی طولانی مدت با کارنوزین معنی‌دار بود.

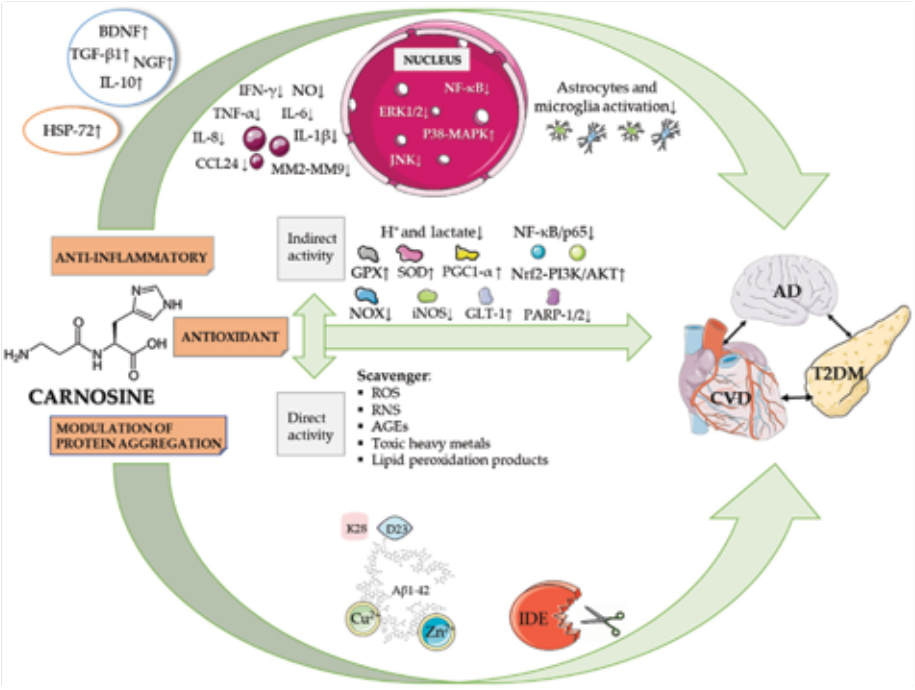
همچنین در یک مطالعه ارزیابی آئورت و کلیه ضایعات و همچنین بیان پروتئین و ژن نشانگرهای بیماری در موش‌های دیابتی نشان داده شده است که کارنوزین با کاهش تری‌گلیسیرید و تشکیل پلاک به موازات افزایش جذب ماکروفاژها در درمان محافظتی ماکرو و میکرووواسکولار، کاهش پیشرفت ماکروآنژیوپاتی و بهبود ایجاد ضایعات پایدارتر نقش دارد.

مکمل کارنوزین (پیش درمان) توانایی خود را نشان داده است. کاهش اندازه ضایعات ایسکمیک در قلب، مغز، کبد و کلیه مدل‌های حیوانی ایسکمی کارنوزین که به صورت داخل صفاقی تجویز می‌شود، از آن محافظت می‌کند. همچنین عملکرد قلب را با مقابله با ایسکمی قلبی بهبود می‌بخشد. در موش‌ها اثرات محافظتی اعمال شده کارنوزین مرتبط با توانایی کاهش پراکسیداسیون لیپیدی غشای سلولی کارنوزین که در برابر ایسکمی مغزی محافظت می‌کند نشان داده شده است. در موش‌ها احتمالاً به‌عنوان پیامد نیم‌سایه علاوه بر موارد فوق، تجویز کارنوزین به طور قابل توجهی اختلال عملکرد کلیه ناشی از ایسکمی/پرفیوژن مجدد و همچنین آسیب کبدی در موش‌ها را کاهش داد. همچنین توانایی کارنوزین برای محافظت از ماست‌سل‌ها در برابر آسیب ایسکمیک ناشی از آن محرومیت از گلوکز اکسیژن نیز نشان داده شده است. کارنوزین قادر است از تشکیل AGE و پیشرفته جلوگیری کند. محصولات نهایی لیپواکسیداسیون از طریق سم‌زدایی RCS، احتمالاً مسئول اثرات محافظتی کارنوزین در زمینه آسیب‌شناسی‌هایی مانند تصلب شرایین و عوارض مرتبط با دیابت است. اثرات محافظت عصبی کارنوزین همراه با فعالیت آنتی‌اکسیدانی و محافظت قلبی آن نشان می‌دهد که این دی‌پپتید ممکن است یک ابزار دارویی ایده‌آل برای مطالعات بالینی آینده در بیماران مبتلا به دیابت باشد که در آن عوارض عروق مغزی و قلبی عروقی اغلب همزمان وجود دارند.

فعالیت مستقیم و غیر مستقیم آنتی اکسیدانی

متابولیسم هوازی منجر به تولید ROS و RNA می‌شود و به این دلیل، سلول‌ها ماشینی مولکولی برای خنثی کردن آن ایجاد کرده‌اند، که از آسیب ایجاد شده به پروتئین‌ها و غشاها اجتناب کنند. تعادل بین تولید و خنثی‌سازی تنظیم شده است. زمانیکه این تعادل برهم می‌خورد، فرایندهای پیام رسانی فعال شده که هشیار کننده کل ارگانیسم برای تولید بیش از حد این گونه‌ها یا کمبود در مکانیسم‌های انتی اکسیدانی است منجر به شرایط اکسیداتیو یا استرس نیتروساتیو می‌شوند. (شکل ۲)

مطالعات *in vitro* و *in vivo* فعالیت ضد اکسیدانی کارنوزین را بررسی کرده‌اند، هر دو به صورت مستقیم ذکر کرده‌اند که کارنوزین به عنوان یک رفتگر عمل کرده و به شکل غیر مستقیم با افزایش ماشین انتی-اکسیدانی، کاهنده همزمان آنزیم‌های پیش-اکسیدانی و پیش-التهابی است.



شکل ۲. مکانیسم چندوجهی اثر کارنوزین

کارنوزین فعالیت مستقیم آنتی‌اکسیدانی را به عنوان رفتگر رادیکال آزاد غیر آنزیمی اعمال می‌کند. با محصولات لیپیدی پیش اکسیدانی میانکنش می‌دهد، خنثی کننده سمیت فلزهای سنگین و کاهنده سطوح درون سلولی ROS/RNS متعدد در میان رادیکال‌های سوپراکسید و هیدروکسیل و گونه‌های کربونیل است. به ویژه با درنظر گرفتن مورد اخیر، یک فعالیت فارماکولوژیک مرتبط کارنوزین در برابر سمیت القا شده آلدهیدها هم در محیط in vitro و هم در in vivo نشان داده شده است. دی پپتید به دلیل داشتن گروه ایمیدازول هیستیدین برای پاکسازی مولکول‌های مختلف طبیعت، از گلوکز تا مالوندیآلدهید شدیدا سمی توانمند است. کارنوزین با آلدهیدهای دارای وزن پایین (مانند AGE، آلدهیدهای غیر ساختارمند آلفا و بتا که از اسیدهای چرب غیر اشباع تحت استرس اکسیداتیو-۴هیدروکسینال و ترانس۲-هگزانال) مشتق شده‌اند و کتکوالدهید (محصول متابولیسم دوپامین و نوراپی‌نفرین توسط فعالیت آنزیم مونوآمین اکسیداز (MAO) که فعالیت آن به شدت توسط استرس اکسیداتیو مختل می‌شود، میان‌کنش می‌دهد. به لطف این فعالیت پاک‌سازی، کارنوزین می‌تواند عواقب ارتباط متقاطع DNA- پروتئین و پروتئین-پروتئین القا شده توسط الدهید و نیز تشکیل گروه‌های کربونیل پروتئین و پروتئین‌های glycated را مهار کند.

کارنوزین فعالیت آنتی‌اکسیدانی را حتی قوی‌تر از یک گلوتاتیون (که یکی از مهم‌ترین سیستم‌های سم‌زدایی است) عمل کند، زمانی که در حضور پراکسید هیدروژن، حلقه ایمیدازول اش اکسید شود. مشتق -۲ اکسو کارنوزین در سلول‌های SH-SY5Y نوروبلاستوما یافت شده است که به شکل پایداری بیان کننده CARNS1 است. علاوه بر این حلقه ایمیدازول کارنوزین می‌تواند با اسیدهای با کلر کم واکنش دهد که منجر به تشکیل کلرامین ایمیدازول شده و حفاظت سلول‌ها از ترکیبات سمی می‌شود.

فعالیت غیر مستقیم آنتی- اکسیدانی کارنوزین به جای آن با افزایش سیستم انتی اکسیدانی اندوژن مرتبط شده است. با یک مثال واضح توسط نجات مسیر فاکتور هسته‌ای اریتروئید ۲ مرتبط شده با فاکتور ۲ (Nrf2) به وسیله افزتیش ترانسلوکاسیون هسته‌ای ارائه شده است. این فعالیت فارماکولوژیک کارنوزین می‌تواند از لحاظ بالینی در پشگیری از سمیت القایی نوروتوکسیک و کاردیوتوکسیک داروها مرتبط شود. در حقیقت Nrf2 بیان ژن‌های متعددی را تنظیم می‌کند از جمله اما نه محدود به تیوردوکسین ۱، سوپراکسید دیسموتاز۱- (SOD1) یا کاتالاز است، همراه با این آنزیم‌ها می‌تواند برای تمیز دادن فعالیت مجدد گروه‌های کربونیل توسط احیا آن‌ها به الکل یا دیگر ترکیبات واکنش دهنده و بنابراین در فعالیت آنتی glycating که در بالا شرح داده شده است دخالت می‌کند که کاهنده سمیت متیل کلی اکسال و AGEs است. بر اساس این شواهد مفروض است که Nrf2 نقش حیاتی در میانجی‌گری فعالیت آنتی اکسیدانی با حفاظت نورونی کارنوزین دارد. مکانیسم مطرح شده که منجر می‌شود کارنوزین مسیر Nrf2 را تعدیل کند درگیر کننده فعالیت مسیر پیام رسانی فسفاتیدیل اینوزیتول -۳ کیناز (PI3K)/AKT است.

مکانیسم مخالف (با همان هدف نهایی) برای کارنوزین در پیشگیری از ترانسلوکاسیون به درون هسته توسط پراکسید هیدروژن فاکتور هسته‌ای افراینده زتجیره سبک کاپای سلول‌های B فعال شده (NF-κB)/p65 که یک فاکتور رونویسی مهم حساس به ردوکس در سلول‌های جزایر پانکراس، سلول‌های حفاظت کننده و متعاقباً حفظ کننده ترشح انسولین، نشان داده شد.

فعالیت ضد التهابی

یک وضعیت التهابی ناشی از تولید مدیاتورهای التهابی (TNF-α, IL-1β, and IL-6) و کاهش آزادسازی مدیاتورهای ضد التهابی (GF-β1 and IL-10) است و تقریباً تمام سلول‌های بافتی را درگیر می‌کند. تمرکز بر روی التهاب نورونی، نشان داده است که سلول‌های نورونی و گلیال شامل میکروگلیا نقش کلیدی در این رخدادها دارند.

فعالیت ضد التهابی کارنوزین اولین بار توسط گروه ناگایی در زمینه مهار تشکیل ادم و پاسخ‌های آلرژیک شرح داده شد. از مطالعه مذکور کاربردهای مختلف در مدل‌های آزمایشگاهی یافت شد و مورد آزمایش قرار گرفت.

مکانیسم مولکولی تحت تأثیر این پاسخ‌های ضد التهابی متفاوت هستند که نشان می‌دهد کارنوزین به عنوان یک دی پپتید دارای فعالیت‌های چند وجهی است. تمرکز بر روی مثالی مربوط به سیستم اعصاب مرکزی و التهاب نورونی نشان می‌دهد که کارنوزین به واسطه

کاهش فعالیت آستروسیتیک دارای فعالیت ضدالتهابی و آزادسازی اینترفرون گاما در مدل موشی زوال عقل واسکولار ایسکمیک ساب کورتیکال است. علاوه بر این کارنوزین توانایی کاهش ترشح سایتوکاین‌های ضد التهابی را مانند زمانی که در سلول‌های BV-2 به عنوان مکمل خواهد بود، به طور خودبخودی افزاینده تولید و آزادسازی TGF-β1 است. آزادسازی TGF-β1 همچنین توسط سطح کلیوی کارنوزین کاهش می‌یابد بنابراین کاهنده تجمع ماتریکس و پاتولوژی مرتبط به آن مانند نفروپاتی دیابتی است. بر اساس این شواهد کارنوزین توانایی فارماکولوژیک پایدار کننده بر روی مسیر TGF-β1 دارد و کاهنده آن در جایی است که فعالیت بیش از حد در بافتها مانند کبد و کلیه (در طی فیبروز) دارد و کاهنده سطوح آن و تقویت کننده حفاظت نورونی در اختلالات تخریب نورونی مانند استروک و AD است.

در یک مطالعه مکمل کانوزین، همراه با آنسرین (با نسبت ۳ به یک آنسرین به کارنوزین) برای ۳ ماه منجر به کاهش بیان موتیف C-C لیگاند ۲۴ سایتوکاین التهابی (CCL۲۴) شد. دی پپتید مورد نظر در مطالعه مروری ما توانمندی کاهش بیان و فعالیت ماتریکس متالوپروتئیناز ۲ (MMP-2)(رده سلول فیبروسارکوما انسانی HT1080) را داشته و همزمان فرایندهای بالادست آن که مربوط به مسیر پیام رسانی فعال کننده پرو-اوروکیناز پلاسمینوژن، MMP-9، رده سلولی اندوتلیالی SK-Hep-1 و سلول‌های فیبروسارکوما انسانی HT1080 که به لحاظ فیزیولوژیک در تعدیل ماتریکس خارج سلولی و پاتولوژی مرتبط به CVD است می‌باشد را مهار می‌نماید.

کارنوزین در سیستم اعصاب مرکزی بر روی سلول‌های میکروگلیا به عنوان رده مونوسیت-ماکروفاژ تخصصی در بافت و نشانگر سیستم ایمنی موثر است. به دلیل اینکه علاوه بر کارنوزین، هیستامین (پیش‌ساز هیستیدین یکی از دو جز دی پپتید) نیز به حرکت و پلاستیسیتی ساختاری سلول‌های میکروگلیا و تنظیم آزادسازی IL-1β مرتبط می‌باشد، تنظیم این مکانیسم‌ها شامل تعدیل کانال مخصوص پتاسیم به نام دومین دو منفذی کانال پتاسیم (THIK-1) است.

فرم ویژه کارنوزین، چلاتور یا برداشت‌کننده یون روی است که به نام ال-کارنوزین روی (یا پلارپرزینک) نامیده می‌شود و برای کاهش بیان فعالیت NF-κB و نیز بیان IL-8 در سلول‌های اپی‌تلیال گاستریک توانمند است، همچنین القا کننده پروتئین شوک حرارتی ۷۲ (Hsp-72) است. همین ترکیب روی مارکروفاژها مهار کننده بیان مدیاتورهای پیش-التهابی تحریک شده به واسطه LPS است. حتی جالب تر آنکه یون‌های روی و مس توانایی مهار فعالیت گیرنده‌های NMDA را داشته که مکانیسم افزایشی جهت حفاظت نورونی نسبت به سمیت تحریکی گلوتامات توسط کارنوزین (ذکر شده در بالا، با افزایش بیان GLT-1) می‌باشد.

با این حال، کارنوزین مشخص شده است که کاهنده سطح فسفریلاسیون کیناز یک و دو خارج سلولی تنظیم شده (ERK1/2) و p38 پروتئین کیناز فعال شده با میتوژن (MAPK) در سلول‌های مزانشیال (با اثرات نوید بخش برای درمان نفروپاتی دیابتی) است. این اثر سرکوب‌کنندگی بر روی ERK1/2 با تنظیم جریان پایین دست چرخه‌های سلولی در سلول‌های نورونی رت نشان داده شده است. تمام فعالیت فارماکولوژیک ذکر شده کارنوزین به شکل معناداری با سیستم ضد التهابی و اثرات حفاظتی دی‌پپتید مشارکت دارد.

تعدیل گردهمایی پروتئین

اولین عملکرد کارنوزین به عنوان عامل ضد پروتئینی با ارتباط متقاطع در سال ۱۹۹۵ با کار Hipkiss و همکارانش نشان داده شد. این فعالیت به جهت حضور گروه عملکردی ایمیدازول هیستیدین و در in vitro برای آلفا-کریستالین به حساب می‌آید، هر دو عامل جلوگیری کننده گردهمایی و جدایی فرم‌های مجتمع شده هستند، سپس به نگهداری عملکرد فیزیولوژیک چاپرونی پروتئین کمک می‌کنند.

سایر مطالعات فعالیت کارنوزین نسبت به مهار Aβ1-42 تشکیل فیبریل/ گردهمایی را بررسی کرده‌اند که مفروض است با توانایی اختلال در باندهای هیدروژنی اطراف ریشه‌های که برای فیبریلوژنز حیاتی می‌باشد مرتبط است. مطالعه‌ای به طور خاص نشان داد که اسیدهای آمینه مشتکل بین اسید آمینه‌های هفدهم و بیست و یکم هدف‌های اصلی برای فعالیت کارنوزین به حساب می‌آیند، حال آنکه مطالعه دیگری به صورت in silico با رویکرد داکینگ اسیدهای آمینه بیست و سوم و همچنین بیست و هشتم به عنوان پایه بروز یافتند. مقاله ذکر شده

مطالعه‌ای را ارجاع داد که در آن ۹۸ ترکیب مختلف آنالیز شد شامل هوموکارنوزین (گاما-آمینوبوتیریل-هیستیدین) آنسرین، بالینی (ان(بتا)-آلانیل ۱--متیل-هیستیدین) و ۸۶ مهار کننده تجمع Aβ1-42، که پیش بینی می‌کند که کارنوزین به عنوان بهترین لیگاند از میان دی پپتیدهای آزمایش شده طبیعی حاوی هیستیدین است که کارایی بالینی خیلی خوبی در مقایسه با دیگر ترکیبات مهار کننده دارد. فعالیت ویژه در برابر تجمع، بر اساس این مطالعه شامل مدیریت کارنوزین در ناحیه یک کویل است که بین دو بخش صفحات بتا پپتید Aβ تحت وضعیت کانفورماسیون تاخورده قرار گرفته است که توسط پپتید طی فرایند پلی‌مریزه شدن فیبریل کسب شده است، جایی که D23 و K28 مستقر هستند و نقش پایه‌ای در فرایند تجمع دارند. به ویژه نشان داده شده که حلقه ایمیدازول ال-هیستیدین کارنوزین توانایی اتصال به ریشه Aβ1-42 D23 را دارد، حال آنکه بتا-آلانین با لایزین ۲۸ میانکنش داده و خنثی کننده اتصالی است که در جهت مخالف بین D23 و ریشه Aβ و لایزین ۲۸ مجاور آن رخ داده است. در نهایت، فرایند تشکیل فیبریل مهار می‌گردد. این مطالعات تایید می‌کند نتایجی که اخیرا از آزمایشات in vitro به دست آمده است.

در مجموع با توجه به مکانیسم‌هایی که عمیقا نشان داده شده است، یک مورد کلی تر برای توضیح فعالیت ضد تجمعی کارنو پیشنهاد شده است، این دی پپتید که دارای ویژگی چلاته کنندگی یون‌های مس و روی را دارد به شکل کاملا مشخصی افزاینده تجمع Aβ است؛ کارنوزین می‌تواند فرایند تجمع را از طریق جدا کردن یون‌های فلزی ذکر شده کند کند. مکانیسم متفاوت دیگر کارنوزین، مهارِ تجمعی که تحریک کننده تخریب ناشی از آنزیم تخریب کننده انسولین (IDE) است که یک آنزیمی ترشح شده از سلول‌های گلیال است. نشان داده شده است که کارنوزین فعالیت خود را نه تنها به سمت Aβ بلکه به انسولین نیز تحریک می‌کند، که هر دو به اصطلاح سوبستراهای طولانی آنزیم هستند. یکی از مکانیسم‌های پیشنهادی تعدیل است که کارنوزین ممکن است در حمایت از الیگومریزاسیون و در نتیجه فعال‌سازی IDE داشته باشد و در نهایت از سمیت ناشی از Aβ در کشت‌های عصبی جلوگیری کند.

نتیجه‌گیری

مطالعات متعددی در ۷۰ سال اخیر برای ارزیابی ساختار، نقش، عملکرد و فعالیت‌های بیولوژیک کارنوزین انجام شده است که منجر به این شواهد شده که مکانیسم چند وجهی عملکرد کارنوزین که از طریق ویژگی‌های ضد تجمع، آنتی‌اکسیدانی و ضد التهابی است یکی از موارد جالب توجه و مهم در مورد دیابت ملیتوس نوع دو، بیماری‌های قلبی-عروقی و AD و نیز در مورد بسیاری از اختلالات تخریب نورونی و سیستمیک است.

در بررسی حاضر به بررسی نقش محافظتی کارنوزین پرداختیم. کارنوزین می‌تواند در زمینه بیماری‌های مختلف مانند دیابت ملیتوس نوع دو، CVD و AD که مکانیسم‌های بیماری‌زایی مشترکی از جمله استرس اکسیداتیو، التهاب و پدیده‌های تجمع را نشان می‌دهند، اعمال شود. تأثیر این مکانیسم‌ها می‌تواند در پاتوفیزیولوژی این سه بیماری با نقش شایع‌تر یک مکانیسم در یک بیماری نسبت به سایرین تغییر کند (به عنوان مثال تجمع Aβ در پاتوژنز AD در مقایسه با التهاب سیستمیک در CVD). مشخصات فارماکودینامیک چندوجهی کارنوزین فعالیت‌های ضد التهابی و آنتی اکسیدانی سیستمیک را با اثر ضد تجمعی و محافظت کننده عصبی آن در CNS ترکیب می‌کند. این فعالیت فارماکولوژیک وسیع، امکان کشف پتانسیل درمانی کارنوزین در همه سه بیماری، به ویژه در بیماران مبتلا به دیابت ملیتوس نوع دو که اغلب سابقه دو بیماری همزمان با CVD را نشان می‌دهد و همچنین افزایش خطر ابتلا به ایجاد اختلال شناختی خفیف و AD را ارائه می‌دهد.

منبع:

https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2590257123000019

مرکز شتابدهی و نوآوری رایاژن

مرکز شتابدهی و نوآوری رایاژن را به کمک جمعی از اساتید برجسته ایران تاسیس کردیم تا دانشجویان و محققان جوان و مستعد حوزه زیست پزشکی، بتوانند کسب و کار دانش محور خود را ایجاد کنند و نه تنها جزء فرهیختگان علمی کشور باشند بلکه دانش خود را به ثروت تبدیل کنند.

خدمات تخصصی

مشاوره های تخصصی

کارآفرینان و مدیران موفق در حوزه های مختلف در مرکز نوآوری و شتابدهی، ما را همراهی می کنند و تیم های پذیرفته شده از تجربیات آن ها بهره مند می شوند

خدمات آموزشی و مربیگری

ما در مرکز نوآوری و شتابدهی، برای افراد دارای ایده های ناب کلاس ها، دوره ها و کارگاه های آموزشی مرتبط با حوزه های مختلف را برگزار می کنیم

معرفی فضاها و خدمات

ما در مرکز نوآوری و شتابدهی در تلاشیم تا با فراهم آوردن تمام بسترهای مورد نیاز در مسیر راه اندازی کسب و کارتان شما را همراهی کنیم

سرمایه گذاری

این مرکز علاوه بر ارائه امکانات و خدمات در دوره های شتاب دهی، با توجه به نوع فعالیت تیم استارتاپی، سرمایه نقدی برای تیم های پذیرفته شده فراهم می کند

اشتیاق، خلاقیت و مقاومت،
اساسی ترین مهارت‌ها در کسب‌وکار هستند.
اگر این‌ها را دارید، برای فتح قله آماده هستید.

با ما در ارتباط باشید

www.RayaaGen.ir
RayaGen_Accelerator
RayaGen_Accelerator

This Number articles

The Road to Personalized Medicine in Alzheimer's Disease: The Use of Artificial Intelligence 4

Personalized Medicine is having its day 20

Clinical cancer genomic profiling 28

A novel drug-like water-soluble small molecule Focal Adhesion Kinase (FAK) activator promotes intestinal mucosal healing 54

The therapeutic potential of carnosine: Focus on cellular and molecular mechanisms 68

Magazine Owner: AmitisGen Tech Dev Group

Responsible Director: Dr. Farnaz Eghbalpour

Editor In Chief: Seyedeh Nayyere Moslehi

Telephone:+98(21)88985293

Email: info@PGOTJournal.com

Editorial Board:
Dr.N.Afshari, Dr.M.R.Akbari,Dr.M.Entezari, Dr.A.Heydarinejad, Dr.S.Heydarinejad, Dr .S.M.Houshmad, Dr.J.Molaei, Dr.B.Naghavi, Dr.R.Nekouian, Dr.M. Nikpay, Dr.N.Parsa, Dr.A.A.Rahimi, Dr.H.Saadat, , Dr.M.A.Saremi, Dr.R.Shirkoohi, Dr.M.Yaghubi

Pharmaco Gen Omics & Technologies JOURNAL

Medical Journal / 5 year / No.16 / 500000 Rials / 2023 Summer / ISSN 2676 -7236

Your Genome Affects The Way You Respond to Drugs.