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):

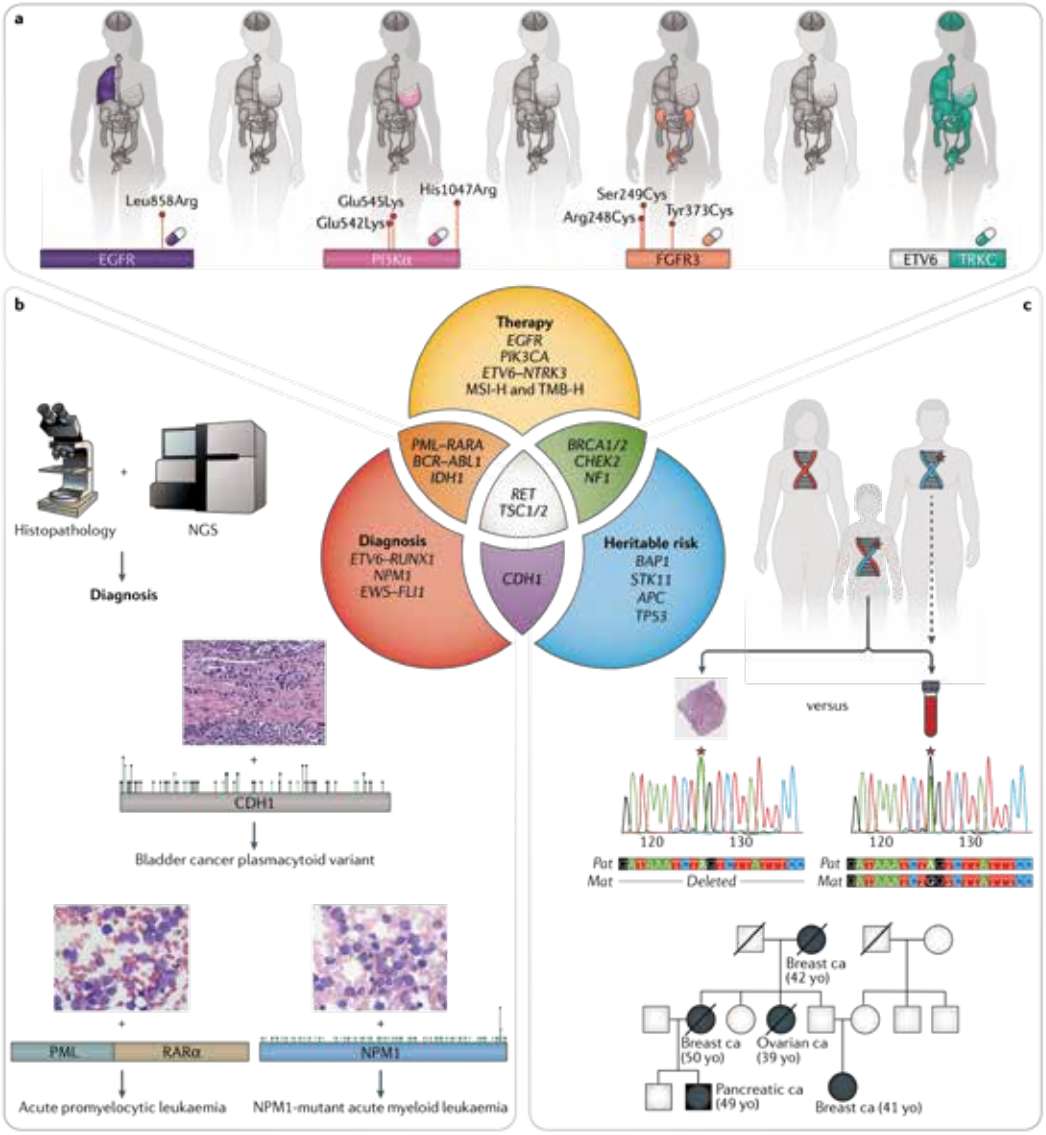
در چارچوب این مقاله، DNA تومور در گردش، یعنی قطعات DNA که توسط تومور به خون ریخته می‌شود.
کارآزمایی‌های سبد: یک طرح کارآزمایی بالینی که به‌طور آینده‌نگر بیمارانی را با تغییرات مولکولی خاص صرف‌نظر از نوع تومور جمع‌آوری می‌کند.

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.

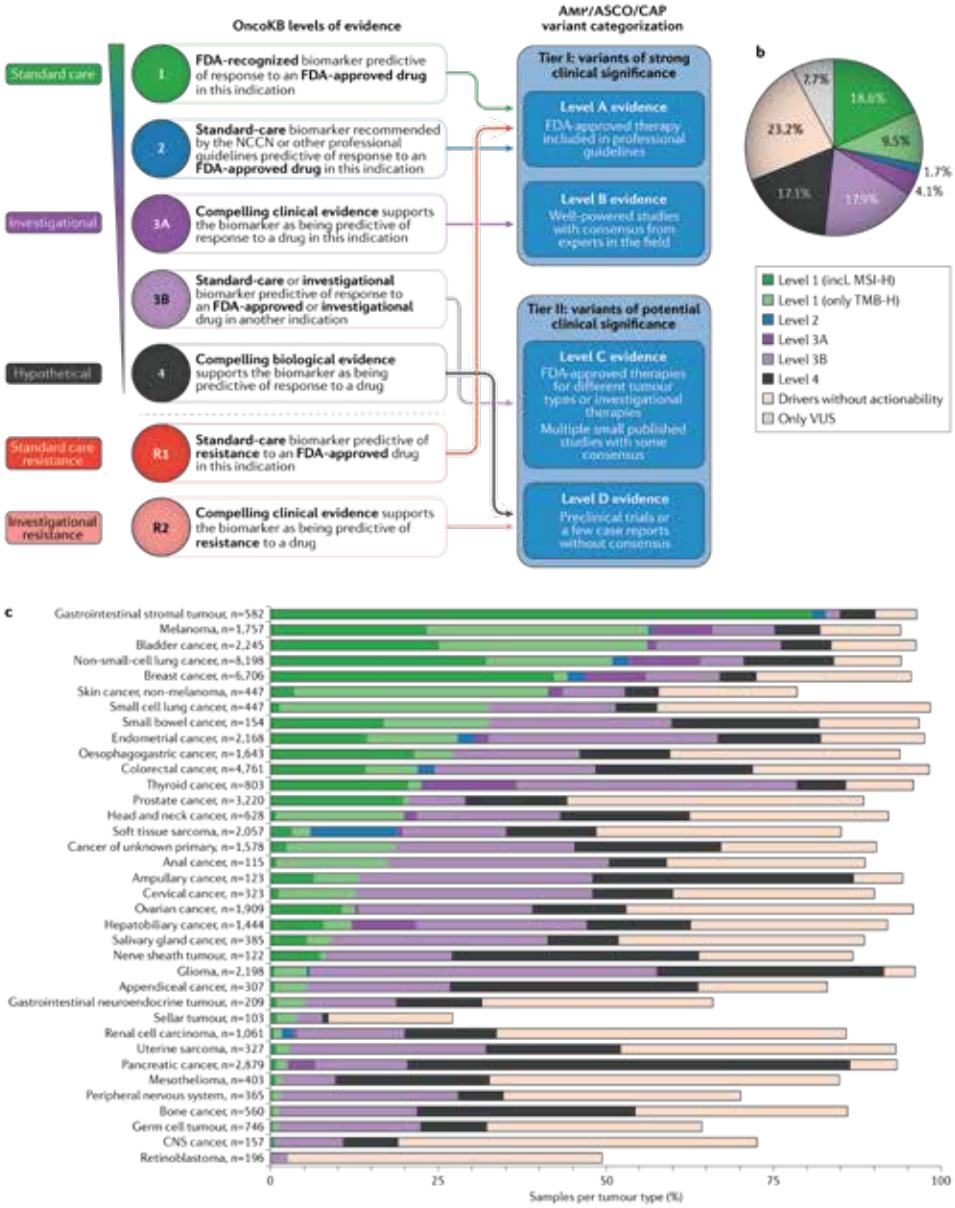
نیومن و همکاران ۹۲ با اعمال تجزیه و تحلیل جداسازی الگوهای بروز در گروهی متشکل از ۱۵۷۹ بیمار مبتلا به سرطان پستان، اولین کسانی بودند که نشان دادند یک آلل حساسیت اتوزومال غالب و بسیار نافذ مبنایی برای خوشه‌بندی خانوادگی موارد سرطان پستان با شروع زودرس است.

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.

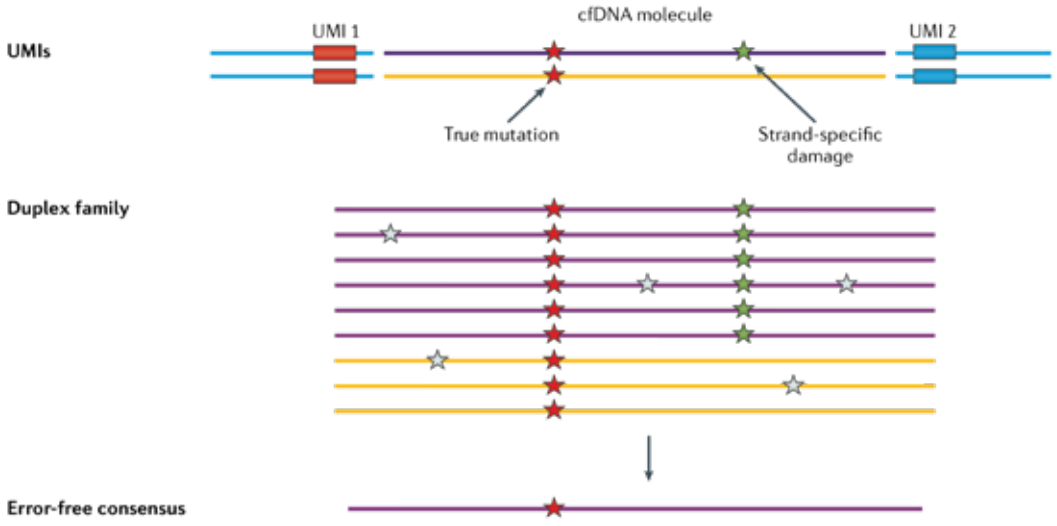
پیکربندی آللی و شاخصه‌های جهشی شبیه سازی جهش

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.

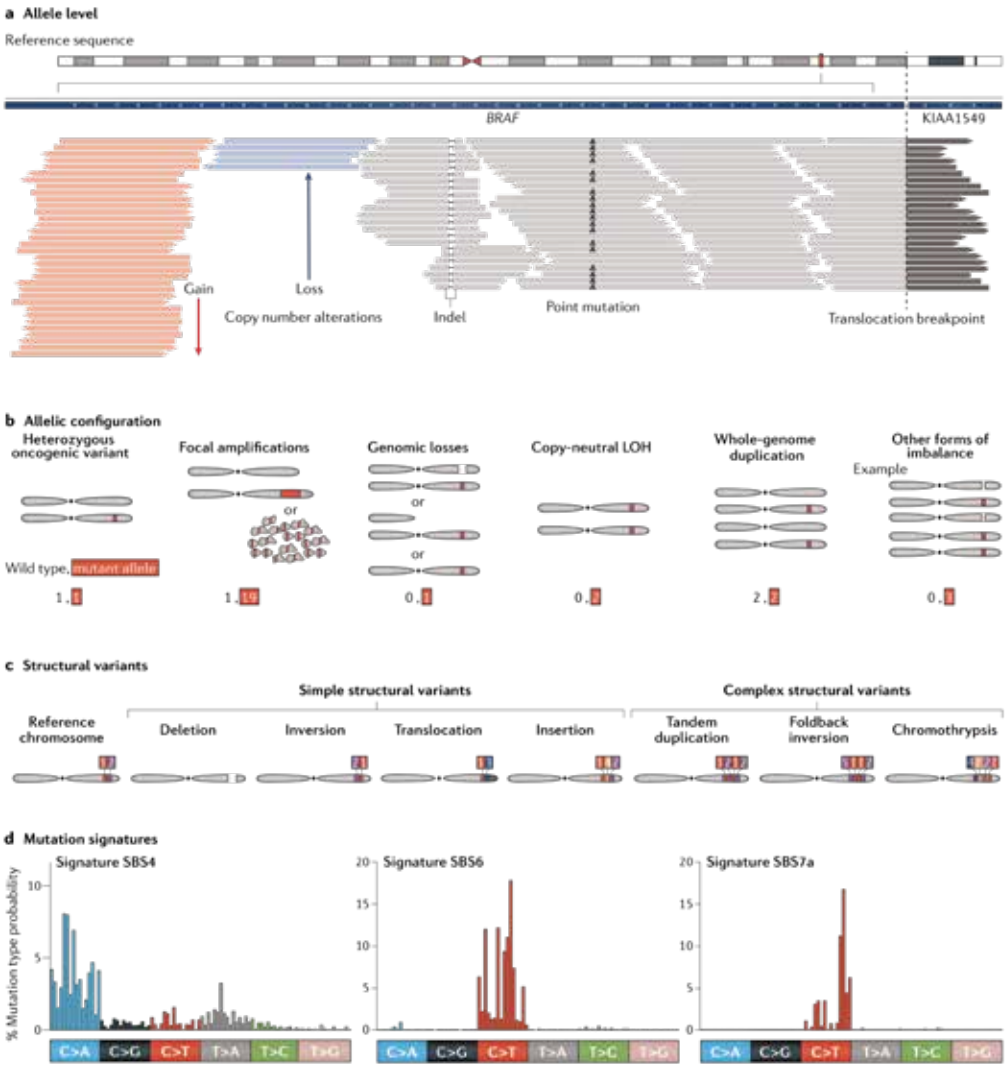
حاضر پیش درمان وجود دارد. الگوریتم‌های محاسباتی توسعه داده شده‌اند که از عمق بالای پوشش توالی‌یابی تولید شده توسط پروفایل تومور مبتنی بر NGS برای تبدیل فرکانس‌های آللی متغیر به بخش‌های سلول سرطانی، یک تخمین عددی از کسر سلول‌های سرطانی که دارای جهش خاصی هستند، استفاده می‌کنند. برای انواع تک نوکلئوتیدی (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 تشخیص زیرگروه سرطان بیمار را اصلاح یا تأیید می‌کند و بینشی را در مورد خطر سرطان ارثی و احتمال ابتلا به سرطان، عود سرطان 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 پاسخ دارو هستند، امکان پذیر کند. ظهور پلتفرم‌های مبتنی بر NGS که قادر به تشخیص و تجزیه و تحلیل DNA مشتق شده از تومور در پلاسما هستند، همچنین امکان توسعه روش‌های تشخیصی را برای غربالگری بیماران پرخطر از نظر سرطان‌های مخفی، ارزیابی حداقل بیماری باقی‌مانده پس از درمان با هدف درمانی فراهم می‌کند. نظارت و کمی کردن بهتر پاسخ درمانی و ارزیابی تکامل کلونال تحت فشار انتخاب درمان به عنوان مقدمه‌ای برای توسعه استراتژی‌های 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 حاشیه‌نویسی دقیق بالینی و داده‌های پاسخ درمانی فراهم می‌کند، مانند AACR GENIE، در ارزیابی کاربرد بالینی پروفایل ژنومی تومور، به‌ویژه در انواع سرطان‌های نادر، حیاتی خواهد بود. از آنجایی که همه جهش‌های یک ژن اثر بیولوژیکی یا اهمیت بالینی یکسانی ندارند، برای کمک به اطلاع رسانی ارتباط درمانی، تشخیصی و پیش‌آگهی جهش‌های فردی به پزشکان متخصص نیاز به بهبود پایگاه‌های دانش و گزارش‌های بالینی متفاوت است. برهم‌کنش‌های اپیستاتیکی بین جهش‌های همزمان و امضاهای جهشی در سطح ژنوم. گسترش قابل توجهی در بخش بیماران مبتلا به سرطان که از رویکرد پزشکی دقیق بهره می‌برند، همچنین مستلزم توسعه 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/