پتانسیل پروفایل فارماکوژنتیک مبتنی بر توالی یابی کل ژنوم

فاطمه محمدی‌پور [1]

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

خلاصه

فارماکوژنتیک یک محرک اصلی در پزشکی دقیق است که نویدبخش انتخاب و دوز دارویی فردی است. به طور سنتی، پروفایل فارماکوژنتیک با استفاده از ژنوتیپ‌سازی هدفمند انجام می‌شود که بر واریانت‌های رایج و یا معروف تمرکز دارد. اخیراً، توالی‌یابی کل ژنوم (WGS) به عنوان یک رویکرد توالی‌یابی نسل بعدی جامع‌تر و کوتاه‌خوان در حال ظهور است که هم تشخیص ژن و هم پروفایل فارماکوژنتیک، از جمله انواع نادر و یا جدید، را در یک سنجش واحد امکان‌پذیر می‌کند. با استفاده از مثال فارماکوژن CYP2D6، پتانسیل پروفایل فارماکوژنتیک مبتنی بر WGS را نشان می‌دهیم و همچنین بر محدودیت‌های کوتاه‌خوانی توالی‌یابی نسل بعدی تأکید می‌کنیم. در آینده نزدیک، ما تغییر به سمت توالی خوانی طولانی را به عنوان روش غالب برای تشخیص ژن و پروفایل فارماکوژنتیک، ارائه کیفیت داده‌های بی سابقه و بهبود مراقبت از بیمار متصور هستیم.

وضعیت فعلی فارماکوژنتیک

اصطلاح فارماکوژنتیک (PGx) برای اولین بار در ادبیات علمی در سال ۱۹۵۹ ظاهر شد و زمینه ژنتیکی را توصیف می‌کند که تأثیر تنوع ژنتیکی بر پاسخ دارویی فردی را بررسی می‌کند. PGx شامل واریانت‌های ژرم لاین است که بر فارماکوکینتیک و فارماکودینامیک داروها و همچنین انواع محرک تومور جسمانی تأثیر می‌گذارد که بر پاسخ به درمان‌های دارویی سرطان تأثیر می‌گذارد.
در حال حاضر، پایگاه دانش فارماکوژنومیکس ۶۸ (PharmGKB) فارماکوژن مهم بالینی، بیش از ۱۰۰ جفت ژن-دارو و بیش از ۷۰۰ داروی مشروح

(pharmgkb.org، دسترسی به اکتبر ۲۰۲۰) را فهرست می‌کند کـه اطلاعات منابع مختلـف PGx، مانند گروه کاری هلنـدی Pharmacogene را یکپارچـه می‌کنـد. (DPWG، knmp.nl) و کنسرسیوم اجرای فارماکوژنتیک بالینـی (CPIC، cpicpgx.org). فارماکوژن‌ها را می‌توان بر اسـاس عملکردشان به دسـته‌هایی طبقه‌بندی کرد، ماننـد آنزیم‌های فـاز I (مانند CYP) و فـاز II (مانند UGTs)، ناقل‌ها (مانند ABCB1)، اهداف دارویی (مانند VKORC1)، انکوژن‌هـا (بـه عنوان مثـال، EGFR) یا درگیر در سیستم ایمنی بدن (به عنوان مثال، HLA-B). واریانت‌های شناسـایی شده (عملکردی) در درجه اول با استفاده از نامگذاری آلل ستاره (*) در اکثر فارماکوژن‌ها توصیـف می‌شـوند. در PGx، تفـاوت در فعالیت آنزیم منجـر به فنوتیپ‌های متفاوتی می‌شـود که بر اسـاس آن افـراد به عنوان متابولایزر ضعیـف (PM)، متابولایزر متوسط، متابولایزر نرمال (NM) یا متابولیزور فوق سریع طبقه‌بندی می‌شوند.

اهمیت PGx ممکن اسـت با چندین واقعیت برجسـته شـود. برای مثال، واکنش‌های نامطلوب دارویی یک بار اجتماعی-اقتصادی قابل‌توجه اسـت، و مسـئول حدود ۱۲.۸ درصـد از پذیرش‌هـای بیمارسـتانی در اتحادیه اروپا است، در حالی که تقریباً ۰.۵ درصد از واکنش‌های نامطلوب دارویی کشـنده هسـتند. در واقع، از آنجایی کـه تقریباً هر فـردی حداقل یک نوع توالـی عملی را طبق دسـتورالعمل‌های DPWG یـا CPIC دارد، PGx می‌توانـد برای طبقه‌بندی بیمار در مراقبت‌های بالینی و آزمایش‌های بالینی اجرا شـود. با این وجود، اکثر داروها در حال حاضر بدون ادغام اطلاعات فارماکوژنتیک تجویز می‌شوند.

پروفایل فارماکوژنتیک پیشگیرانه، مراقبت بهتر از بیمار را ارائه می‌دهد، و امکان ادغام PGx را در پشتیبانی تصمیم گیری بالینـی (CDS) فراهم می‌کند. تعـداد زیادی از رویکردها برای پروفایل فارماکوژنتیک در دسترس است و پیشرفت‌های فنی اخیر در توالی‌یابی نسل بعدی (NGS) ادغام PGx را در تنظیمات بالینی بیش از هر زمان دیگری ممکن می‌سازد. با این حال، در حال حاضر، مزایای PGx از کارآزمایی‌های تصادفی‌سـازی و کنترل‌شده (RCTs) و متاآنالیزهـا عمدتاً به جفت‌هـای تک دارو-ژن محدود می‌شـود و ژن‌ها/واریانت‌هایی که بایـد برای پیش‌بینی بهینه پاسـخ دارویی آزمایش شـوند، استاندارد نیستند. علاوه بر این، تطابق کم بین آزمایشـگاهی نتایج آزمایش وجود دارد و گزینه‌های فراوان برای اجرای PGx می‌تواند بسیار زیاد باشد.

در اینجـا، مـا روش‌هـای PGx را بررسـی می‌کنیم و پتانسـیل پروفایل‌سـازی فارماکوژنتیک را بر اساس نوع توالی‌یابی کل ژنوم (WGS) بررسی می‌کنیم، که ترکیبی از تشـخیص مولکولی جامع و پروفایل فارماکوژنتیک را در یک سـنجش واحد امکان‌پذیر می‌سازد. علاوه بر این، با اسـتفاده از مثال فارماکـوژن CYP2D6، چالش‌ها و فرصت‌های روش‌های نمایه‌سازی فارماکوژنتیک فعلی را ترسـیم می‌کنیم و جهت‌های بالقوه آینده را مورد بحث قرار می‌دهیم.

ژنوتیپ واریانت‌های فارماکوژنتیک روش‌های متداول

پس از اولین کشف اساس بیوشیمیایی تنوع فارماکوژنتیک در دهه ۱۹۷۰ در زمینه هیدروکسیلاسـیون دبریزوکین و اکسیداسـیون اسـپارتئین توسـط آنزیمی کـه بعداً CYP2D6 نامیده شـد، اولین آزمایش فارماکوژنتیک در سال ۱۹۹۰ در دسـترس قرار گرفت. این آزمایش برای شناسـایی PMهای CYP2D6 ایجاد شـد و بر اسـاس PCR اختصاصی آلل. به طور مشـابه، در سال‌های بعد، واریانت‌های عملکردی بیشـتری در سـایر فارماکوژن‌ها با اسـتفاده از روش‌هـای مبتنی بـر PCR و توالی‌یابی Sanger شناسایی شدند. از اواخر دهه ۱۹۹۰، ریزآرایه‌ها افزایش توان عملیاتی و ژنوتیـپ موازی گونه‌های رایج/ معـروف را در چندین ژن فعال کرده اند. در همین حال، انـواع روش‌های مولکولی بـرای کاربردهای تحقیقاتی و تشخیصی PGx اتخاذ شده است (جدول ۱).

در غیاب مقررات و دسـتورالعمل‌های روشن، روش‌های اعمال شده و ژن‌ها/واریانت‌های مورد بررسی ممکن است در آزمایشگاه‌های آزمایش متفاوت باشد که منجر به نتایج متناقض شود. به طور معمول، واریانت‌های آزمایش شده با توجه به نشانه یا کلاس دارویی انتخاب می‌شوند، مانند داروهای ضد فشـار خون، روانگردان‌هـا یا ضد انعقادها. از منظـر اقتصادی و به ویژه با توجه به اسـتفاده مجدد احتمالی از نتایج، آزمایش پیشـگیرانه انواع مختلف برتر از یک رویکرد ژن-داروی واحد اسـت. با توجه به کارایی

جدول ۱. مقایسه روش‌های پروفایل فارماکوژنتیک.

روش‌های متداول	مزایای • هزینه‌های کم، زمان کوتاه، تفسیر نتایج	معایب • محدود به زیر مجموعه انواع/ قطعه‌های آزمایش شده
PCR (به عنوان مثال، Luminex xTAG CYP2D19/CYP2D6، LGC (SNPline	• حساسیت بالا • انواع روش‌های موجود مبتنی بر PCR (TaqMan، PCR با برد بلند، PCR کمی و زمان واقعی، PCR دیجیتال)	• توان عملیاتی کم/محدود
توالی سانگر	• اجازه می‌دهد تا توالی با وضوح تک جفت پایه • ترکیب با برد بلند PCR برای ویژگی آلل	• توان عملیاتی کم/محدود • پر زحمت
تقویت پروب وابسته به بستن چندگانه (MLPA)	• تشخیص نیمه کمی CNVs	• توان عملیاتی کم/محدود و محدود به محل‌های اتصال پروب • پر زحمت، حساس به جابجایی
طیف سنجی جرمی (به عنوان مثال، TOF-MALDI)	• توان عملیاتی بالا (گزینه‌ای برای اتوماسیون) • حساسیت بالا	• تجهیزات گران قیمت، بدون پلت فرم مورد تایید FDA ایالات متحده
ریزآرایه‌ها (به عنوان مثال، PharmacoScan ThermoFisher، Human Wide-Genome Affymetrix (Array SNP	• توان عملیاتی بالا (گزینه ای برای اتوماسیون)	• انواع ساختاری پیچیده شناسایی نشده باقی می‌مانند (مانند CYP2D6*13،*68)
NGS کوتاه خوانده شده (به عنوان مثال، Illumina، Torrent Ion، BGI (Genomics	• تشخیص انواع نادر/ جدید	• زمان چرخش، تفسیر نتایج
توالی یابی هدفمند (به عنوان مثال، پانل تحقیقاتی فارماکوژنومیک یون (PGRNseq ،AmpliSeq	• صرفه جویی در هزینه • ابزارهای تجزیه و تحلیل خاص PGx موجود (برای PGRNseq)	• سنجش‌های جداگانه برای تشخیص و پروفایل فارماکوژنتیک • غنی سازی پر زحمت است
WES	• افزایش توان عملیاتی • مقرون به صرفه (تشخیص مولکولی و پروفایل فارماکوژنتیک در یک سنجش)	• پوشش ناقص exome • انواع غیر اگزونیک مورد بازجویی قرار نمی‌گیرند (مثلاً CYP2C19*17، UGT1A1*28/*37 و CYP3A5*3، VKORC1*2)
WGS	• ابزارهای تجزیه و تحلیل خاص PGx موجود • تشخیص مولکولی و پروفایل فارماکوژنتیک در یک سنجش	• خواندن تراز و فراخوانی در نواحی همولوگ/تکراری (به عنوان مثال، ژن‌های CYP و UGT)

روش‌های متداول	مزایای • هزینه‌های کم، زمان کوتاه، تفسیر نتایج	معایب • محدود به زیر مجموعه انواع/ قطعه‌های آزمایش شده
NGS طولانی خوانده شده (به عنوان مثال، PacBio، ONT)	• فازبندی، تشخیص نوع در مناطق همولوگ/تکرار	• نرخ خطای خام خواندن (ONT)، هزینه‌ها، مواد ورودی (PacBio)
توالی هدفمند و WES	• انواع روش‌های غنی سازی هدف موجود (به عنوان مثال، مبتنی بر PCR، مبتنی بر هیبریداسیون، غنی سازی محاسباتی توسط ONT)	• غنی سازی هدف ممکن است پر زحمت باشد
WGS	• تشخیص مولکولی و پروفایل فارماکوژنتیک در یک سنجش	• در دسترس نبودن ابزارهای تجزیه و تحلیل خاص PGx برای خواندن طولانی

CNV: تنوع تعداد کپی؛ NGS: توالی یابی نسل بعدی. ONT: فناوری‌های نانوپور آکسفورد؛ PacBio: Pacific Biosciences; PGRN: شبکه تحقیقات فارماکوژنومیک؛ PGx: فارماکوژنتیک. WES: توالی یابی کل اگزوم. WGS: توالی یابی کل ژنوم.

هزینه، مقیاس پذیری، زمان چرخش کوتاه و کاربرد بالینی بالا، ژنوتیپ هدفمند مبتنی بر PCR و ریزآرایه (که از این پس به عنوان ژنوتیپ هدفمند نامیده می‌شود) اغلب برای پروفایل فارماکوژنتیک استفاده شده است. به عنوان مثال، در برنامه فارماکوژنومیک فراگیر (U-PGx)، که هدف آن ارائه شواهدی برای سودمندی بالینی پروفایل فارماکوژنتیک پیشگیرانه است، یک روش مبتنی بر PCR برای پروفایل فارماکوژنتیک استفاده می‌شود. ریزآرایه‌های مدرن ممکن است به انواع فارماکوژنتیک محدود شوند (مانند PharmacoScan، AmpliChip CYP450 [Roche, Basel, BS, Switzerland], [ThermoFisher, MA, USA]) یا نزدیک به ۱ میلیون نوع را مورد بازجویی قرار دهند (مثلاً Infinium Global Screening Asay 3.3a0I, [CA, USA], Genome-Wide Human SNP Array 6.0 [Affymetrix, CA, USA]) و ممکن است برای پروفایل فارماکوژنتیکی بانک‌های زیستی در مقیاس بزرگ استفاده شود.

یک احتیاط عمده در مورد پروفایل فارماکوژنتیک هدفمند، زیرمجموعه ای از واریانت‌های مورد بررسی است. انتخاب واریانتی که باید آزمایش شوند ممکن است برای نتیجه درمان تعیین کننده باشد، همانطور که نتایج متناقض چندین مطالعه با هدف ارزیابی اثربخشی هدایت شده با PGx در مقایسه با دوز هدایت شده بالینی وارفارین ضد انعقاد نشان داده شده است. در واقع، فارماکوژنتیک اروپایی درمان ضد انعقاد (EU-PACT) و کارآزمایی انفورماتیک ژنتیکی (GIFT) در سال ۲۰۱۳ و همچنین یک آنالیز گذشته نگر و یک مطالعه کنترل منطبق، مزایای بالینی دوز هدایت شده با PGx را نشان داد، در حالی که Optimalification در سال ۲۰۱۳ ضد انعقاد از طریق ژنتیک (COAG) با دوز هدایت شونده RCT PGx منجر به بهبود قابل توجهی نشد. این یافته‌های متناقض به طور بالقوه با این واقعیت توضیح داده می‌شود که در COAG RCT، ~۳۵٪ از شرکت کنندگان از تبار آفریقایی بودند. از آنجایی که فقط واریانت‌های CYP2C9*2،*3 و VKORC1*2 آزمایش شدند، اما نه واریانت‌های PM CYP2C9*5،*6،*8،*11 که در آفریقایی‌ها رایج است، به ناقلان این گونه‌ها به اشتباه * اختصاص داده شد. ۱ آلل (یعنی واریانت وحشی) و بنابراین به دلیل داده‌های ژنتیکی ناقص به طور بالقوه از دست رفته است.

علاوه بر این، در سال‌های اخیر، مطالعات متعددی چشم‌انداز فارماکوژنتیک را در مقیاس جمعیتی مورد بررسی قرار داده‌اند. این مطالعات نشان داد که واریانت‌های نادر تقریباً ۳۰ تا ۴۰ درصد از تغییرات در

فارماکوژن‌ها را شامل می‌شوند و در برخی از خانواده‌های ژنی حتی بیش از ۹۰ درصد از تنوع PGx ممکن است به واریانت‌های نادر نسبت داده شود. اگرچه در نتایج این مطالعات تفاوت‌هایی وجود داشت، اما ممکن است تا حد زیادی به ژن‌های انتخاب‌شده، اندازه گروه مورد مطالعه و اینکه آیا مطالعه همه گونه‌ها را در نظر گرفته است یا منحصراً بر روی واریانت‌های رایج/عملکردی انتخاب شده متمرکز شده است، نسبت داده می‌شود. با این حال، به طور کلی، همه واریانتهای نادر در فارماکوژن‌ها (به عنوان مثال، از جمله موارد غیرانتخاب شده) می‌توانند در پاسخ به دارو نقش داشته باشند و از این رو، از اهمیت بالینی برخوردار باشند. از آنجایی که ژنوتیپ هدفمند نمی تواند واریانت‌های نادر (یعنی غیر هدفمند) را شناسایی کند و هزینه هر پایه NGS کاهش می‌یابد، پروفایل فارماکوژنتیک مبتنی بر NGS جانشین منطقی روش‌های سنتی به نظر می‌رسد.

پروفایل فارماکوژنتیک مبتنی بر NGS

ظهور NGS با فعال کردن توالی‌یابی موازی ژن‌های متعدد با استفاده از توالی‌یابی هدفمند، مناطق بیرونی ژنوم با استفاده از توالی‌یابی کل اگزوم (WES) یا کل ژنوم با استفاده از WGS تا حد زیادی، زمینه ژنتیک را متحول کرده است. این تکنیک‌ها به طور فزاینده ای نه تنها در تشخیص ژنی بیماری‌های نادر و در انکولوژی استفاده می‌شود، بلکه در زمینه PGx نیز شروع به ادغام می‌کند. پروفایل فارماکوژن‌ها مبتنی بر NGS امکان گسترش آزمایش‌های فارماکوژنتیک از واریانت‌های انتخاب‌شده به کل ژن‌ها را فراهم می‌کند و امکان تشخیص واریانت نادر و شناسایی ارتباط‌های جدید واریته/ژن-دارو را می‌دهد (جدول ۱).

پانل‌های PGx هدفمند مبتنی بر NGS شامل پانل تحقیقاتی فارماکوژنومیک AmpliSeq یا PGRNseq است که امکان توالی یابی عمیق فارماکوژن‌های متداول را فراهم می‌کند. پروژه در حال انجام eMERGE-PGx PGRNseq را در ۹ موسسه در ایالات متحده با هدف ارزیابی تنوع فارماکوژنتیک در حدود ۹۰۰۰ شرکت‌کننده، به‌ویژه واریانت‌های نادر، و ایجاد یک مخزن بزرگ به نام SPHINX ، که تا حدی به داده‌های فنوتیپی مرتبط است، مستقر می‌کند. ، امکان بررسی تغییرات فارماکوژنتیک جدید را فراهم می‌کند. بر این اساس، این مطالعه به یکی از موانع اصلی PGx می‌پردازد و هدف آن گسترش دامنه PGx است. در نهایت، هم تعیین ژنوتیپ هدفمند و هم پروفایل فارماکوژنتیک مبتنی بر توالی هدفمند، احتمالاً دارای محدودیت هستند که باید به عنوان یک آزمایش اختصاصی برای PGx انجام شود، در حالی که WGS، به جای WES، امکان امکان تشخیص ژن و پروفایل فارماکوژنتیک را در یک تست واحد فراهم می‌کند.

در واقع، اگرچه WES یکی از پرکاربردترین و مقرون‌به‌صرفه‌ترین فناوری‌های NGS است که امکان توالی‌یابی اگزوم، از جمله فارماکوژن‌ها را فراهم می‌کند، ما و دیگران نشان داده‌ایم که WES (i) عملاً توالی‌یابی کل اگزوم را به دلیل امکان‌پذیر نمی‌سازد. از دست رفته پروب‌های ضبط و حساسیت آن به محتوای گوانین سیتوزین (GC). و (ii) بسته به کیت ثبت اگزوم اعمال شده، چندین واریانت فارماکوژنتیک معروف اما غیر اگزونیک (یعنی غیر اگزونیک) با استفاده از WES (از جمله CYP3A5*3، CYP2C19*17، UGT1A1*28/*37 و VKORC1*2) مورد بررسی قرار نمی گیرند. در بدترین حالت و بدون توجه مناسب، این محدودیت‌ها ممکن است به تشخیص ناقص یا منفی کاذب و یا توصیه‌های فارماکوژنتیک نادرست منجر شود. بر اساس پیشرفت فعلی در فناوری‌های NGS، قابل پیش‌بینی است که WGS در طول زمان به طور فزاینده‌ای جایگزین WES نه تنها در تحقیقات، بلکه در کاربردهای بالینی نیز خواهد شد. WGS این مزیت را دارد که بر محدودیت‌های WES غلبه می‌کند، به عبارت دیگر، WGS (PCR، PE150 بدون ۶۰ ×) نه تنها امکان توالی یابی بهتر (دقیق تر) اگزوم را در پوشش مناسب فراهم می‌کند، بلکه توالی یابی مناطق غیر کد کننده را نیز ممکن می‌سازد. . علاوه بر این، پوشش مداوم و یکنواخت WGS بدون PCR، تشخیص تغییرات تعداد کپی را تسهیل می‌کند. از آنجایی که WGS خواندن کوتاه جامع ترین رویکرد توالی خوانی کوتاه (SRS) را نشان می‌دهد، بستری را برای تشخیص ژن و پروفایل فارماکوژنتیک در یک سنجش ایجاد می‌کند و امکان شناسایی انواع فارماکوژنتیک رایج/معروف و نادر/ جدید را فراهم می‌کند. در واقع، ما اخیراً نشان داده‌ایم که چگونه پروفایل فارماکوژنتیک

ممکن است در یک گردش کار تشخیصی ادغام شود. به طور خلاصه، پس از استخراج ژنوتیپ‌های ۴۶ نوع U-PGx فعلی از داده‌های WGS با استفاده از ابزارهای بیوانفورماتیک اختصاصی، مطابق دستورالعمل‌های DPWG تفسیر می‌شوند و گزارش فارماکوژنتیک و همچنین کارت ایمنی دارو در قالب کارت اعتباری تولید می‌شود. به همین ترتیب، ابزار حاشیه‌نویسی بالینی فارماکوژنومیکس منبع باز رویکرد مشابهی را نشان می‌دهد که فرمت فراخوانی متغیر WGS (ژنومیک (VCF[g]) و فایل‌های نقشه تراز دودویی (BAM) را به عنوان ورودی می‌پذیرد و گزارش‌های فارماکوژنتیک را طبق دستورالعمل‌های CPIC تولید می‌کند.

علیرغم اینکه روش غالب NGS است، SRS به دلیل طول خواندن آن معمولاً ۱۵۰ جفت باز در معرض محدودیت‌های ذاتی است. این قرائت‌های کوتاه ممکن است به طور واضح به ژنوم مرجع نگاشت نشوند، به ویژه در مناطق تکراری و/یا همولوگ طولانی تر از طول خوانده شده. این مناطق در مجموع «منطقه مرده» نامیده می‌شوند و حدود ۱۷٪ از ژنوم مرجع، از جمله چندین فارماکوژن، مانند اعضای خانواده ژن UGT و CYP را تشکیل می‌دهند. یک مثال قابل توجه CYP2D6 است که به دلیل شبه ژن‌های همولوگ (CYP2D7 و CYP2D8)، آلل‌های ستاره ای متعدد و تنوع ساختاری پیچیده، تعیین دقیق ژنوتیپ چالش برانگیز است.

پروفایل فارماکوژنتیک مبتنی بر WGS CYP2D6

با استفاده از زیرمجموعه‌ای از ژنوتیپ‌های اجماع ۲۰۱۹ GeT-RM برای CYP2D6، ما قبلاً ابزارهای بیوانفورماتیکی Aldy، Astrolabe و Stargazer را محک زده‌ایم که ژنوتیپ CYP2D6 را با استفاده از داده‌های SRS امکان‌پذیر می‌کنند. ما و دیگران متوجه شدیم که Aldy در ژنوتیپ CYP2D6 مبتنی بر WGS به بالاترین دقت رسیده است. اخیراً رویکرد جدیدی به نام سیریوس معرفی شده است که نویدبخش دقت بهبود یافته است. در اینجا، ما معیار قبلی خود را با نتایج Cyrius گسترش می‌دهیم، که با این حال، ممکن است به نفع خود مغرضانه باشد زیرا Cyrius با استفاده از ژنوتیپ‌های GeT-RM CYP2D6 بهینه‌سازی و آموزش داده شده است. برای ارزیابی گسترده ما از تشخیص نوع CYP2D6 مبتنی بر WGS، ژنوتیپ‌های CYP2D6 را ارزیابی کردیم و فنوتیپ‌های PGx را در ۵۶۵ نمونه WGS عمدتاً کوتاه قفقازی (i) با استفاده از Aldy در مقایسه با Cyrius پیش‌بینی کردیم. (ii) علاوه بر در نظر گرفتن واریانت‌های نادر (iii). PGx منحصراً با در نظر گرفتن الل‌های U-PGx CYP2D6 که در حال حاضر پیاده‌سازی شده‌اند.

برای WGS (i) (بدون PE۱۵۰ × ۶۰، PCR) از ۵۶۵ فرد غیرمرتبط همانطور که قبلا توضیح داده شد انجام شد. متعاقباً، فایل‌های FASTQ با استفاده از Isaac (v.01.15.02.08) یا (v.04.18.11.09، که ۵ <× سریع‌تر از aligner استاندارد طلایی Burrows-Wheeler Aligner (BWA) است و فایل‌های ورودی BAM مورد نیاز را ایجاد می‌کند، تراز شدند. برای Aldy (v2.2.6) و Cyrius (v1.0). از ۵۶۵ نمونه مورد آنالیز، ژنوتیپ‌ها و فنوتیپ‌ها به‌طور یکسان توسط هر دو ابزار در ۵۳۴ و ۵۵۳ نمونه پیش‌بینی شدند که معادل نرخ شناسایی ژنوتیپ و فنوتیپ یکسان به ترتیب ۹۴.۵ و ۹۷.۹ درصد است (شکل ۱). ما این هشدار را تشخیص می‌دهیم که ژنوتیپ‌ها عمدتاً با روش اضافی تأیید نشدند، به عبارت دیگر، نمی‌توانیم خطاهای ژنوتیپی یکسان آلدی و سایریوس را حذف کنیم. در ۵۳۴ نمونه با پیش‌بینی‌های یکسان، ما ۲۴ هاپلوتیپ CYP2D6 را شناسایی کردیم که شامل ۷۶ دیپلوتیپ منحصر به فرد است. از این ۵۳۴ نمونه هماهنگ، ۵.۱٪~، ۳۴.۶٪~، ۵۶.۰٪~ و ۲.۶٪~ به ترتیب به عنوان NM، متابولایزر میانی، PM و متابولایزر فوق سریع طبقه بندی شدند (شکل ۱). این پیش‌بینی‌های عملکردی تا حد زیادی با تخمین‌های قبلی برای قفقازی‌ها مطابقت دارند، اما شواهد بیشتری ارائه می‌کنند که انواع پیچیده ساختاری (SVs)، مانند *۶۸+*۴ (فرکانس نسبی ۶.۵٪)، رایج‌تر از تخمین‌های قبلی هستند.

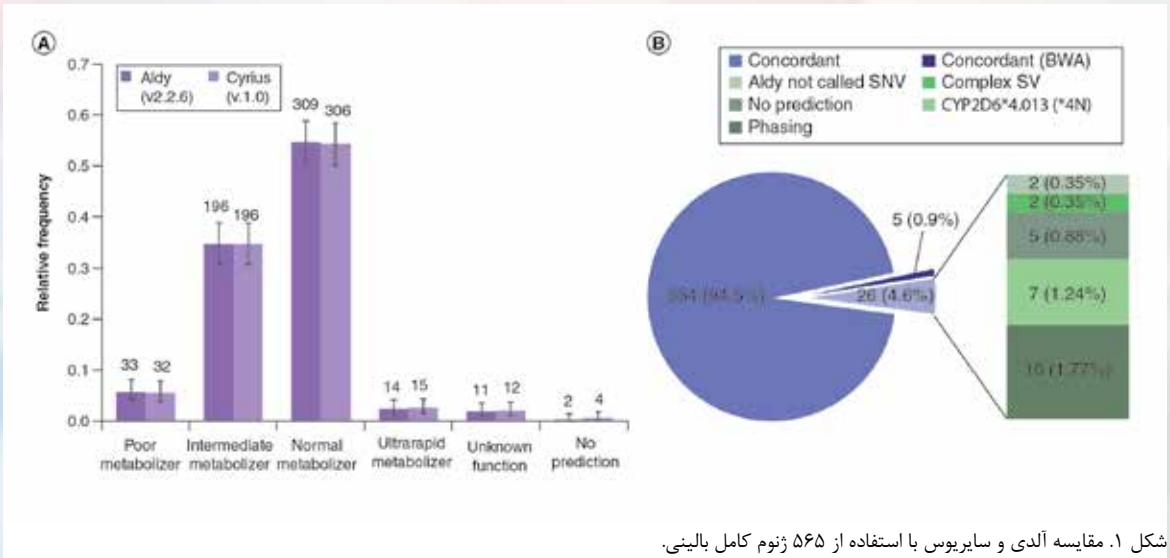
(الف) تکرارهای نسبی فنوتیپ‌های عملکردی CYP2D6 که توسط ابزارهای نرم‌افزار Aldy و Cyrius با استفاده از توالی‌یابی کل ژنوم (۶۰× بدون PE۱۵۰، PCR) داده‌های ۵۶۵ نمونه غیرمرتبط پیش‌بینی شده‌اند. تابع ناشناخته: دیپلوتیپ‌هایی که عملکرد حداقل یک آلل آن ناشناخته است. بدون پیش‌بینی: نمونه‌هایی را مشخص می‌کند که ابزار مربوطه نمی‌تواند ژنوتیپ CYP2D6 را

برای آنها فراخوانی کند. نوارهای خطا CI ٪۹۵ محاسبه شده با استفاده از vassarstats.net/prop1.html (شامل تصحیح تداوم) را نشان می‌دهد. (ب) تعداد ژنوتیپ‌های CYP2D6 پیش‌بینی‌شده توسط Aldy یا Cyrius و همچنین دلیل پیش‌بینی‌های ناسازگار. :Concordant ۵۳۴ نمونه که آلدی و سیریوس ژنوتیپ‌های برابر/همسان را با استفاده از فایل‌های Isaac BAM پیش بینی کردند. 5 :Concordant (BWA) نمونه از ۳۱ نمونه با ژنوتیپ‌های مختلف/ناسازگار که پیش‌بینی‌ها برای آن‌ها با استفاده از فایل‌های BAM ورودی تراز شده با BWA به جای Isaac یکسان و یا همخوان بود. بدون پیش‌بینی: پنج نمونه که نه سایریوس و نه آلدی نتوانستند ژنوتیپ CYP2D6 را برای آنها بخوانند. آلل CYP2D6*4.013 (*4N) تنها توسط Cyrius در هفت نمونه پیش بینی شده است.

SNV: واریانت تک نوکلئوتیدی.

SV: واریانت ساختاری.

علاوه بر این، برای ۳۱ نمونه با ژنوتیپ‌های ناهماهنگ CYP2D6، فایل‌های FASTQ را با استفاده از BWA v0.7.17 (شتاب‌دهی شده با Sentieon) مجدداً تراز کردیم، فایل‌های BAM به‌دست‌آمده را با استفاده از یکپارچه‌سازی Genomics Viewer ارزیابی کردیم و Aldy و Cyrius را دوباره اجرا کردیم. بدین ترتیب، پنج نمونه از ۳۱ نمونه ناسازگار را می‌توان «نجات داد» (یعنی پیش‌بینی‌های آلدی و کوریوس یکسان/همخوان بودند). چهار مورد به دلیل یک نتیجه جدید از Aldy و یک مورد به دلیل یک نتیجه بدیع از هر دو، Aldy و Cyrius بود که نشان دهنده حساسیت بالاتر Aldy به ابزار تراز مورد استفاده برای فایل BAM ورودی است. تفاوت مهم بین Isaac و BWA مدیریت خواندن است که می‌تواند در موقعیت‌های مختلف تراز یا نقشه برداری شود. به‌طور پیش‌فرض، Isaac (v.01) این قرائت‌ها را با اولین مکان ژنومی ممکن تراز می‌کند، در حالی که BWA این قرائت‌ها را به‌طور تصادفی تراز می‌کند، که ممکن است تفاوت‌های خاصی را در فراخوانی انواع ایجاد کند و با تعداد خوانده‌های تراز شده با REP6 و REP7 قابل مشاهده است. شایع‌ترین دلایل ناهماهنگی‌ها به این دلیل بود که آلل CYP2D6*4.013 (که قبلاً با نام 4N* شناخته می‌شد) توسط Aldy پوشش داده نمی‌شد و بنابراین در هفت نمونه به عنوان 4* و همچنین به دلیل تفاوت در فازبندی متغیر در ده نمونه گزارش شد. به عنوان مثال، در یک نمونه، آلدی دیپلوتیپ را 41*/27/* نامید، در حالی که کوریوس 32*/1/* را نامید. ترکیب، این آل‌ها دارای انواع مشابه اما در فازهای متفاوت هستند. علاوه بر این، بازآرایی پشت سر هم ۴*۶۸+* با تطابق نزدیک به ٪۱۰۰ فراخوانی شد، در حالی که در سایر بازآرایی ها، از جمله 13*،10* و 36*، واریانت‌های مشابه، اما روی آل‌های مختلف شناسایی شد. آنالیز چنین نتایج ناسازگاری صرفاً با استفاده از



شکل ۱. مقایسه آلدی و سایریوس با استفاده از ۵۶۵ ژنوم کامل بالینی.

داده‌های SRS چالش برانگیز است و از این رو روش‌های متعامد، داده‌های طولانی خوانده شده یا داده‌های اعضای خانواده برای روشن شدن ضروری است. با این حال، این ژنوتیپ‌های ناهماهنگ، بینش‌های مهمی را ارائه می‌کنند و مشخص می‌کنند که کدام نوع از واریانت ممکن است با استفاده از چنین ابزارهایی اشتباه نامیده شوند.

هر دو Aldy و Cyrius برای استفاده آسان هستند، نتایج را در کمتر از یک دقیقه برای داده‌های ورودی WGS ارائه می‌دهند، به سخت افزار پیشرفته نیاز ندارند، و به نظر می‌رسد در اکثر موارد بسیار دقیق و هماهنگ عمل می‌کنند. Aldy در حال حاضر از ده فارماکوژن پشتیبانی می‌کند، در حالی که Cyrius فقط برای CYP2D6 قابل استفاده است. با این حال، Cyrius نسبت به Aldy دارای مزایای کمتری نسبت به نرم افزار تراز، پشتیبانی از GRCh38/hg38 علاوه بر GRCh37/hg19، و کمی به روزتر بودن در مورد نامگذاری آلل است.

برای (ii)، در ۵۳۴ نمونه WGS با پیش‌بینی‌های یکسان، واریانت دیگر توالی CYP2D6 را با استفاده از روشی که قبلاً شرح داده شده بود شناسایی کردیم. بنابراین، ما ۱۷ واریانت کد کننده با فنوتیپ ناشناخته PGx (طبق pharmvar.org/gene/CYP2D6) را شناسایی کردیم. یکی از این واریانت‌ها، NM_000106.5:c.1353G>A p. (Met451Ile)، تنها در یک نمونه هتروزیگوت بود و با استفاده از چارچوب پیش‌بینی گونه خاص PGx به‌عنوان مضر طبقه‌بندی شد و بنابراین ممکن است فعالیت CYP2D6 پیش‌بینی‌شده توسط Aldy را تغییر دهد. و کوریوس آلدی علاوه بر این، واریانت احتمالاً عملکردی را شناسایی کرد، که بخشی از یک آلل ستاره ای به شکل الحاق پسوند «مانند» به آلل شناسایی شده (مانند، 2*/1*-شبیه) نیستند، در حالی که سیریوس گونه‌های شناسایی شده اضافی را گزارش نمی‌کند.

برای (iii)، ما آنالیز ۵۳۴ نمونه WGS با پیش‌بینی‌های یکسان را به ۱۱ آلل CYP2D6 که در حال حاضر در پروژه U-PGx آزمایش شده‌اند و همانطور که اخیراً پیشنهاد شده است محدود کردیم (*8، *6، *5 (del)، *4، *3، xN، *41، *17، *14، *10، *9*). در غیاب این انواع، آلل نوع وحشی (*1) اختصاص داده شد. بر این اساس، در ۵۳۴ نمونه، ما ۳۳ دیپلوتیپ منحصر به فرد را شناسایی کردیم، در حالی که ۵۳ از ۷۶ دیپلوتیپ شناسایی شده توسط Aldy/Cyrius به طور انحصاری با در نظر گرفتن الل‌های U-PGx فعلی به طور ناقص اختصاص داده شدند. با این حال، از آنجایی که آلل‌های معمول اما با عملکرد طبیعی شامل CYP2D6*2،*33،*35 اکثر آلل‌های غیر U-PGx را تشکیل می‌دهند، وضعیت متابولیزه‌کننده پیش‌بینی‌شده تنها در مجموع هشت دیپلوتیپ از ۱۲ نمونه متفاوت است. قابل ذکر است، طبقه بندی بر اساس سیستم U-PGx، فازبندی مستقیم نوع را فعال نمی کند. بنابراین، در مورد تکرارها، مشخص نیست که آیا یک آلل عملکردی یا غیرعملکردی تکرار شده است و سیستم وضعیت متابولیزه کننده را با فرض شدیدترین فنوتیپ، که منبع اصلی پیش‌بینی فنوتیپ ناسازگار است، خروجی می‌دهد.

داده‌های ما تأکید می‌کنند که ادغام پروفایل فارماکوژنتیک در یک گردش کار تشخیصی مبتنی بر WGS نه تنها امکان‌پذیر و مقرون به صرفه است، بلکه تا حد زیادی امکان پیش‌بینی دقیق ژنوتیپ و فنوتیپ CYP2D6 را با استفاده از ابزارهای نرم‌افزاری مناسب فراهم می‌کند. علاوه بر این، برای مثال CYP2D6، داده‌های ما این مفهوم را تأیید می‌کند که به نظر می‌رسد محدود کردن تحلیل به رایج‌ترین و شناخته‌شده‌ترین واریانت‌ها یک رویکرد مفید برای اکثر افراد باشد. با این حال، به طور مشابه با ادغام SVs برای پیش‌بینی فنوتیپ CYP2D6، از جمله تمام آلل‌های ستاره‌ای شناخته‌شده، مزایای بیشتری برای موارد خاص/نادر فراهم می‌کند. علاوه بر این، اختلاط انواع نادر غیر ستاره آلل در پروفایل فارماکوژنتیک حداقل تا حدی قابل دستیابی است. در حالی که واریانت از دست دادن عملکرد (LOF) در فارماکوژن‌ها، مانند جهش‌های مزخرف، تغییر قاب یا جهش‌های پیوندی که منجر به ناکافی بودن هاپلون می‌شوند (به عنوان مثال، آلل‌های غیرفعال)، ممکن است به راحتی با استفاده از ابزارهای تفسیر استاندارد NGS تفسیر شوند، سایر انواع چالش‌برانگیزتر هستند و نیاز به تخصص دارند. ابزارهایی مانند چارچوب خاص PGx یا سنجش‌های عملکردی. علاوه بر این، فازبندی متغیر ممکن است برای پیش‌بینی فنوتیپ تعیین‌کننده باشد، اما، بدون شواهد اضافی، مستقیماً از داده‌های SRS یا ژنوتیپ‌سازی هدفمند امکان‌پذیر نیست. اگرچه برون

یابی از CYP2D6 به ژن‌های دیگر دشوار است، ما فرض می‌کنیم که نتایج گزارش شده در اینجا احتمالاً تا حدی برای سایر فارماکوژن‌ها نیز قابل استفاده است.

پروفایل فارماکوژنتیک با استفاده از توالی‌خوانی طولانی

اگرچه SRS قدرتمند است، اما با محدودیت‌های ذاتی همراه است. در مقابل، توالی خوانی طولانی (LRS؛ طول خواندن بیش از ۱ کیلوباز) به عنوان مثال، توسط Pacific Biosciences (pacb.com؛ PacBio) و Oxford NanoporeTechnologies(nanoporetech.com؛ONT) پتانسیل غلبه بر این محدودیت‌ها را دارد، اما اغلب می‌تواند به دلیل گران بودن و داشتن نرخ خطای خام خواندن ٪۱۰~ در مقایسه با ٪۱> با استفاده از SRS کنار گذاشته شد. با این حال، همراه با دیگر مطالعات مهم اخیر، Precision FDA Truth Challenge V2 که به تازگی منتشر شده است، با هدف فراخوانی واریانت‌های توالی در مناطقی که نقشه برداری دشوار است، تأکید می‌کند که LRS به تنهایی یا در ترکیب با SRS ابزار برتر برای فراخوانی، فازبندی و انواع مختلف است. حل نواحی ژنومی پیچیده یا تکراری، از جمله چندین فارماکوژن.

در واقع، در سال‌های اخیر، پیشرفت‌های فنی بیشتر در قالب دستگاه PacBio Sequel II (و IIe آینده) و سلول ۸M بی‌درنگ تک مولکولی (SMRT) باعث افزایش توان عملیاتی و بهبود دقت خواندن خام می‌شود. به طور خاص، با تولید و خواندن چندین بار مولکول‌های DNA الگوی دایره‌ای (توالی‌بندی اجماع دایره‌ای)، می‌توان قرائت‌هایی با دقت بالا با دقت ۹۹.۸ درصد تولید کرد. این به طور مشابه با SRS توسط Illumina دقیق است، اما با طول متوسط خواندن ۱۵ کیلو باز، که برای خواندن کل ژن CYP2D6 و تعیین مکان HLA (با عمق خواندن ×30~) کافی است. دقت خواندن خام بهبود یافته، مونتاژ ژنوم انسان جدید (N50 > 15 مگابایت) را امکان‌پذیر می‌سازد، سرعت بخشیدن به این فرآیند ۱۰ تا ۱۰۰ برابر فازبندی متغیر را بهبود می‌بخشد و تشخیص دقیق نوع تک نوکلئوتیدی، ایندل و SV را در عمق خواندن ~ قادر می‌سازد. ۱۵× پوشش. بنابراین، یک ژنوم کامل انسان را می‌توان با توالی یابی با وفاداری بالا با حداقل ۲ تا ۳ سلول SMRT ۸M تعیین توالی کرد و هزینه‌های توالی یابی را کاهش داد.

رقیب PacBio، ONT، توالی‌بندی انعطاف‌پذیری را در مقیاس‌های مختلف، از Flongle کوچک‌تر طراحی‌شده برای میکروبیولوژی گرفته تا GridION یا PromethION، فراهم می‌کند که WGS را قادر می‌سازد تا توالی‌یابی در مقیاس جمعیتی را فراهم کند. در واقع، یک مطالعه اخیر در مقیاس جمعیت نشان داده است که تعیین توالی ژنوم‌های انسانی در عمق بیش از ۱۰× عمق پوشش با تشخیص دقیق SV با استفاده از یک سلول جریانی PromethION، که شامل حدود ۳۰۰۰ کانال نانو حفره است در مقایسه با ~۵۰۰ کانال در MinION/ امکان‌پذیر است. سلول‌های جریان GridION. علاوه بر این، انتشار جدیدترین نانوحفره‌های ONT (R10.3) نوید بهبود دقت خواندن خام را می‌دهد.

برای LRS، در حال حاضر هیچ استاندارد طلایی قابل مقایسه با BWA/GATK برای تراز و فراخوانی واریانت در SRS وجود ندارد. مجموعه‌های ژنومی از LRS ممکن است با استفاده از یکی از بسیاری از اسمبلرهای موجود، از جمله wtdbg2، Flye، Canu، FALCON و Shasta تولید شوند. دقت اجماع ممکن است با استفاده از ابزارهای صیقل دهنده مانند Racon Medaka، Nanopolish یا Arrow افزایش یابد، که در نتیجه مجموعه‌هایی با دقت مشابهی که توسط SRS تولید می‌شوند، اما با مجاورت قابل ملاحظه‌ای طولانی‌تر می‌شوند.

در زمینه PGx، هم PacBio و هم ONT برای توالی‌یابی آمپلیکن‌های PCR با برد بلند ژن‌های CYP2D6، HLA-A و HLA-B برای تشخیص دقیق و فازبندی هاپلوتیپ‌ها استفاده شده‌اند. علاوه بر این، برای کاهش هزینه‌های توالی یابی و افزایش عمق خواندن توالی، مشابه در SRS، نمونه‌ها ممکن است مالتی پلکس شوند و LRS ممکن است برای فارماکوژن‌ها هدف قرار گیرد. علاوه بر PCR دوربرد، فارماکوژن‌ها همچنین ممکن است با استفاده از روش‌های مبتنی بر CRISPR/Cas9 (به عنوان مثال) یا با گرفتن هیبریداسیون غنی شوند. علاوه بر این، دو رویکرد اخیر، هدف‌گیری محاسباتی محاسباتی مناطق ژنومی را با استفاده از ONT، بر اساس انتخاب بلادرنگ مولکول‌های DNA مورد علاقه با استفاده از واحدهای پردازش مرکزی پیشرفته (CPU) یا واحدهای پردازش گرافیکی (GPU) ممکن می‌سازد.

روی هم رفته، به نظر می‌رسد الگوی خواندن SRS دقیق و نادقیق LRS به طور فزاینده ای منسوخ می‌شود. اگرچه تماس گیرندگان واریانت CYP2D6 مبتنی بر SRS، مانند Aldy و Cyrius، در حال حاضر با LRS سازگار نیستند، حوزه LRS به سرعت در حال رشد است، که به دلیل اکتشاف برنامه‌های کاربردی جدید و ابزارهای آنالیز بیوانفورماتیک PacBio و ONT LRS توسط جامعه علمی هدایت می‌شود.

تفسیر تنوع ژنتیکی به دستورالعمل‌های عملی: مرز نهایی PGx

در حالی که در آینده قابل پیش‌بینی، تشخیص دقیق و مرحله‌بندی همه گونه‌های توالی در ژنوم یک فرد در دسترس است، ما و دیگران انتظار داریم که تفسیر واریته برای مدت قابل توجهی در آینده یک چالش باقی بماند. پس از توالی یابی اولین ژنوم انسان، پیشرفت عظیمی در تفسیر سیلیکونی انواع توالی حاصل شده است. با این حال، بیشتر تلاش‌ها برای پیش‌بینی اثر متغیر بر شناسایی واریانت‌های آسیب‌رسان/مضر، به عبارت دیگر، تمایز از انواع خنثی متمرکز شده‌اند. الگوریتم‌های سیلیکونی یا بر اساس تفاوت‌های فیزیکوشیمیایی بین اسیدهای آمینه (به عنوان مثال، امتیاز Grantham)، حفظ فیلوژنتیک (به عنوان مثال، GERP، SiPhy) و/یا تأثیر بر ساختار پروتئین (به عنوان مثال، Polyphen-2، SIFT) یا مجموعه‌ای از ابزارهای مختلف موجود هستند. ابزارها را در یک امتیاز واحد (به عنوان مثال، CADD، REVEL، Eigen، DANN). با این حال، این الگوریتم‌ها برای فارماکوژن‌های متنوع اغلب تکاملی بهینه‌سازی نشده‌اند. علاوه بر این، با توجه به اینکه بیشتر این ابزارها برای شناسایی واریانت‌های LOF توسعه یافته اند، دقت آنها برای واریانت‌های افزایش عملکرد محدود است. برای رسیدگی به این چالش‌ها و شناسایی دقیق‌تر واریانت‌های عملکردی در فارماکوژن‌ها، اخیراً یک چارچوب تخصصی PGx با ترکیب و تطبیق آستانه‌های چندین الگوریتم پیش‌بینی رایج ایجاد شده است.

این امتیازات پیش‌بینی، که ما همچنین برای طبقه‌بندی انواع عملکردی در CYP2D6 اعمال کردیم، برای طبقه‌بندی انواع تک نوکلئوتیدی طراحی شده‌اند. با این حال، آلل‌های ستاره ای اغلب شامل چندین واریانت هسته هستند و به عنوان مثال، ٪۵۰ از آلل‌های ستاره ای فعلی CYP2D6 عملکرد ناشناخته ای دارند. علاوه بر این، با استفاده از نام‌گذاری آلل ستاره و سیستم امتیاز فعالیت، مقدار قابل توجهی از تنوع در متابولیسم دارو با واسطه CYP2D6 غیرقابل توضیح است. دو مطالعه اخیر به این چالش‌ها پرداختند، هر دو مدل‌های یادگیری عمیق را برای پیش‌بینی عملکرد CYP2D6 به کار بردند، اثرات واریانت‌های مختلف را روی یک هاپلوتیپ ترکیب و وزن کردند و نتایج را با داده‌های آزمایشگاهی تأیید کردند. در این مطالعات، مدل‌ها فعالیت آنزیم را در مقیاس پیوسته پیش‌بینی می‌کنند و پیشنهاد می‌کنند که سیستم آلل ستاره‌ای برای CYP2D6 حذف شود. در واقع، با داده‌های توالی یابی بیشتر در دسترس، گونه‌های شناسایی شده در ژن چندشکلی CYP2D6 به رشد خود ادامه می‌دهند و به طور بالقوه باعث ایجاد آلل‌های ستاره ای پیچیده تر می‌شوند. می‌توان استدلال کرد که نام‌گذاری آلل ستاره‌ای که در ابتدا برای تعداد قابل کنترل‌تری از آلل‌ها ایجاد شده بود، می‌تواند با سیستم‌های مبتنی بر مقیاس‌های پیوسته جایگزین شود، که شاید برای واریانت‌های بی‌شمار کشف‌شده توسط NGS مناسب‌تر باشند.

محدودیت‌های فعلی PGx

مدت‌ها پیش‌بینی می‌شد که PGx عامل اصلی بهبود ایمنی و یا اثربخشی دارو و در نتیجه کاهش هزینه‌ها برای سیستم‌های مراقبت‌های بهداشتی باشد. اگرچه موفقیت PGx مسلماً همانطور که در اوایل دهه ۲۰۰۰ پیش‌بینی شده بود، هنوز تأثیر تغییردهنده‌ای بر پزشکی درمانی ندارد، شواهد علمی در حال انباشته شدن است، که نشان می‌دهد ترکیب PGx در CDS ممکن است ایمنی و کارایی را بهبود بخشد و همچنین هزینه‌ها و بستری شدن در بیمارستان را در مقایسه با استاندارد کاهش دهد. رفتار. با وجود این شواهد انباشته، چندین مانع برای پزشکی دقیق مبتنی بر PGx در روال بالینی باقی مانده است. نظرسنجی‌های اخیر از متخصصان مراقبت‌های بهداشتی نشان داد که به طور کلی، پذیرش فرضیه و مزایای PGx زیاد است، در حالی که دانش درک شده، فقدان دستورالعمل‌های واضح و هزینه‌های آزمایش فارماکوژنتیک هنوز موانعی را نشان می‌دهد. بنابراین،

منابع آموزشی، مانند PharmGKB یا پلت فرم آموزش الکترونیکی U-PGx بسیار تضمین شده است.

علیرغم شواهد علمی تا حد زیادی پذیرفته شده برای PGx، برخی از موارد بحث هنوز وجود دارد، که بیشتر آنها از این واقعیت ناشی می‌شود که در حال حاضر، PGx قادر به توضیح ۱۰۰٪ از تنوع در پاسخ به دارو نیست. این را می‌توان تا حدی با عوامل دیگری که بر پاسخ به دارو تأثیر می‌گذارند، مانند سن، جنس، مصرف همزمان دارو، وضعیت بیماری، و عملکرد کلیه و کبد توضیح داد که ممکن است تا ۶۰ درصد از تنوع بین فردی در پاسخ به دارو را توضیح دهد. علاوه بر این، درک فعلی ما از PGx هنوز ناقص است. برای مثال، علاوه بر انواع نادر، انواع سیس و ترانس تنظیم‌کننده در فارماکوژن‌ها شناسایی شده‌اند که لایه‌ای از پیچیدگی را به ترجمه ژنوتیپ به فنوتیپ اضافه می‌کنند.

مرحله نهایی اجرای PGx در CDS سیستمی است که به متخصصان مراقبت‌های بهداشتی اطلاع می‌دهد یا زمانی که تست PGx نشان داده می‌شود (هشدار قبل از آزمون) یا زمانی که یک نوع قابل عمل شناسایی شده است (هشدار پس از آزمون). در حالت ایده‌آل، سیستم‌های CDS باید الکترونیکی باشند، به راحتی در دسترس باشند و دستورالعمل‌های بصری در مورد انتخاب و دوز دارو ارائه دهند. چندین تلاش در حال انجام است، از جمله رویکردهایی برای ادغام CDS در سوابق سلامت الکترونیکی یا ابتکار کد ایمنی دارو مستقل از پلتفرم. ایجاد گسترده آزمایش فارماکوژنتیک استاندارد چالش برانگیز خواهد بود و ذینفعان باید برای امکان اجرای آن بر تحقیقات مستدل تکیه کنند.

نتیجه

از ابتدای اجرای خود، PGx پیشرفت قابل توجهی داشته است. با این وجود، کاربردهای واقعی فعلی آن راه‌حل‌های ناقصی هستند و تأثیر، پلتفرم بهینه و شواهدی از مزایای PGx همچنان محل بحث در جامعه علمی است. تا به امروز، با تمرکز بر رایج‌ترین واریته‌ها با پیش‌بینی عملکردی، ژنوتیپ‌سازی هدف‌دار هنوز هم به‌طور گسترده‌ای پذیرفته‌شده‌ترین رویکرد پروفایل فارماکوژنتیک است. با این حال، با در نظر گرفتن این محدودیت که گونه‌های نادر اما از نظر بالینی (بسیار مرتبط) شناسایی نشده باقی می‌مانند، ژنوتیپ‌سازی هدفمند به طور مداوم با رویکردهای مبتنی بر NGS جایگزین می‌شود. از آنجایی که تفسیر واریانت‌های نادر شناسایی‌شده با NGS در فارماکوژن‌ها چالش برانگیز است، ما از آن دفاع می‌کنیم که داده‌های NGS ممکن است در سیلیکو به زیر مجموعه‌ای از انواع با دستورالعمل‌های بالینی موجود کاهش یابد. واریانت LOF و همچنین واریانت‌های نادر و مرتبط بالینی ممکن است در یک محیط تحقیقاتی ارزیابی شوند و به طور ایده آل در یک پایگاه داده (های) در دسترس عموم ذخیره شوند. برای فعال کردن هدف CDS، ادغام اطلاعات فارماکوژنتیک در پرونده‌های سلامت الکترونیکی با هشدارهای مناسب یا سیستم‌های مستقل از پلت فرم بسیار ارزشمند خواهد بود.

در زمینه بیماری‌های نادر، NGS تشخیصی به طور معمول برای غربالگری جهش‌های ایجاد کننده بیماری، صرف نظر از استعداد فارماکوژنتیک مشکوک، انجام می‌شود. WGS نه تنها جامع ترین داده‌های توالی یابی را برای غربالگری جهش تولید می‌کند، بلکه ارزش افزوده ای نیز ارائه می‌دهد زیرا داده‌ها ممکن است برای پروفایل فارماکوژنتیک نیز استفاده شوند. چنین رویکردی نشان دهنده یک سنجش کارآمد دو در یک بدون ایجاد هزینه‌های اضافی قابل توجه است. با این حال، محدودیت‌های SRS، به‌ویژه مناطق ژنومی غیرقابل دسترس و فازبندی انواع، برای PGx نیز اعمال می‌شود. در نتیجه، LRS به تنهایی یا در ترکیب با SRS نه تنها در تحقیقات و آزمایش‌های بالینی، بلکه در PGx نیز کاربرد دارد.

چشم انداز آینده

برای جلوگیری از شکاف بیشتر بین پیشرفت‌های فنی و ترجمه آن‌ها به مراقبت‌های بالینی، مطالعات بالینی آینده‌نگر به خوبی طراحی شده (مانند کارآزمایی U-PGx PREPARE) شواهد بیشتری برای اثربخشی آزمایش‌های فارماکوژنتیک پیشگیرانه به‌عنوان یک ابزار با ارزش برای دقت فراهم می‌کند. دارو. پیشرفت‌های فنی بیشتر منجر به فراوانی انواع توالی‌های شناسایی‌شده در فارماکوژن‌ها، از جمله مواردی با عملکرد و یا اهمیت ناشناخته می‌شود. برای فنوتیپ کردن فارماکوژن‌ها، راه‌حل‌های مبتنی بر هوش مصنوعی ممکن است با

سنجش‌های عملکردی in vitro با کارایی بالا، بر اساس کتابخانه‌های تولید شده توسط بیمار، معکوس PCR یا CRISPR/Cas9، که قبلاً برای CYP2D6 در یک نشان داده شده است، جفت و ارزیابی شوند. مقیاس کوچکتر در نهایت، اطلاعات در مورد PGx در کارآزمایی‌های بالینی در حال حاضر محدود به انکولوژی است. همانطور که در اوایل دهه ۲۰۰۰ پیش بینی می‌شد، اطلاعات PGx ممکن است برای طبقه بندی آزمایشات بالینی و همچنین به طور بالقوه برای نجات داروهای رد شده به دلیل نتایج غیر قابل توجه قبلی مورد استفاده قرار گیرد.

علاوه بر این، تغییر NGS و PGx به سمت تست نقطه مراقبت یا حتی به سمت توالی یابی قابل حمل، به عنوان مثال، با استفاده از SmidgION قابل اتصال به گوشی هوشمند ONT قابل انتظار است. ما تصور می‌کنیم که در سال‌های آینده، LRS به اندازه کافی بالغ شود تا بتواند عصر ژنومیک طولانی خوانده شده را آغاز کند و میلیون‌ها بیمار در سراسر جهان به داده‌های توالی یابی با کیفیت بالا دسترسی داشته باشند و اجرای پزشکی دقیق را بیشتر کند.