محمدرضاروستا،مجیداکبری، کارشناسی ارشددانشگاه علوم دارویی
دکتر طاهره ناجی، دانشیار گروه علوم پایه داروسازی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم دارویی

مارکرهای مولکولی در تشخیص سرطان پانکراس

آدنوکارسینومای داکتال پانکراس،Pancreatic duc-tal adenocarcinoma (PDAC)، نئوپلازی کشنده را با میزان مرگ‌ومیر بالا نشان می‌دهد. روش‌های تشخیص زودهنگام مؤثر موردنیاز است؛ زیرا استفاده از این روش‌ها بهترین راه برای درمان این بیماری است. در سال‌های گذشته پژوهش های بسیاری به تعیین بیومارکرهای وابسته پرداخته‌اند، که می توانند درگام های نخستین رشد تومور پانکراس دیده شود.اگرچه بیومارکرهای متعددی برای تشخیص سرطان پانکراس معرفی‌شده است، اما کارایی کلینیکی آن‌ها تا اندازه ی زیادی با ابهام همراه بوده است. اگرچهCA۱۹-۹ تستی است که چند سالی است مورداستفاده قرار می‌گیرد؛ اما حساسیت و اختصاصیت آن برای بیماران مبتلا به سرطان پانکراس چندان بهینه نیست.در این پژوهش به چندین مارکر تازه در سرم ، پلاسما و مدفوع ، که مورد ارزیابی قرارگرفته‌اند، پرداخته ایم .اگرچه این مورد ها ، برای استفاده معمول آزمایشگاهی راست آزمایی نشده است؛ اما این مارکرها می‌توانند پس از انجام تحقیقات تکمیلی مورد استفاده قرار گیرد.امیدواریم که ترکیبی از این بیومارکرهای جدید بتواند ابزار مفیدی برای تشخیص زودهنگام PDAC پیش از تکنیک‌های تصویربرداری یا نشانگان بیمارانی که نموداراین بیماری است،باشد.

پیش گفتار

سرطان پانکراس یکی از کشنده‌ترین سرطان‌ها در جهان است که طول عمر۵ ساله تنها ۵٪ است. در سال ۲۰۱۲ در آمریکا نزدیک به ٤۳۹۲۰ بیمار دچاربهPDACشناسایی شد، که۳۷۳۹۰نفر از آن‌ها در اثر این بیماری جان باختند(۱). PDACمعمول‌ترین نوع سرطان پانکراس است که۹۰٪ همه ی بدخیمی های پانکراس را در برمی‌گیرد. اگرچهPDAC دهمین نوع معمول سرطان به شمارمی آید؛در غرب این نوع سرطان ازلحاظ شمار بیماران،چهارمین نوع سرطان محسوب می شود(۲). پیش‌آگاهی ۸ضعیف این نئوپلاسم به سبب چندین عامل است: ماهیت خاموش این بیماری و تشخیص دیرهنگام ، پتانسیل متاستاز بالا، مقاومت در برابر شیمی‌درمانی و رادیوتراپی مرسوم. با همه تلاش‌های گونه گون انجام گرفته در پژوهشهای چند دهه گذشته ، پیشرفت در تشخیص و درمان این نوع سرطان کند بوده است. تابه‌حال تنها گزینه ابتکاری در تشخیص این نوع سرطان surgical resection است؛ اما تنها ۲۰٪ بیماران با این روش در مراحل اولیه بروز بیماری شناسایی می‌شوند (۳). ۸۰٪ باقیمانده بیماران زمانی شناسایی می‌شوند که بیماری آن‌ها پیشرفت کرده باشد و رادیوتراپی و شیمی‌درمانی نمی‌تواند کمک زیادی به بهبودی آن‌ها نماید(٤). تابه‌حال تست‌های تشخیصی تنها بعد از انجام CT Scan،Eus،ERcpصورت می‌گیرد (۵). در دهه گذشته، با کمک Eus آسپیراسیون های دقیق تری انجام شده است، که دقت تشخیص آسیب های کوچک پانکراس را بهبود بخشیده است(کمتر از ۳cmاز٦٦,۷٪تا٨٦,۱٪)(٦). اگرچه این روش‌ها کمک کننده هستند، اما قابلیت آن‌ها برای تشخیص زودهنگام آسیب های نئوپلاستیک یا ایجاد تمایز بین پانکراتیت مزمن و

سرطان پانکراس کمتر از حد بهینه است.نیاز به تشخیص بهبودی سرطان امری ضروری است و بیومارکرهای مدفوع و سرم می‌توانند برای غربالگری این نوع سرطان مناسب باشد. هدف این پژوهش گذری بر واپسین کارایی بیومارکرهای تازه ی موجود و میزان دسترسی و قابلیت آن‌ها در تست های آزمایشگاهی است.

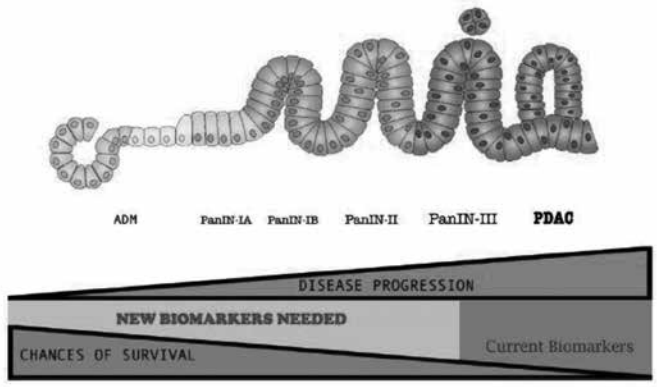
مدل‌های تکامل و پیشرفت درPDAC

تبدیل سلول‌های نرمال به آدنوکارسینومای مهاجم از راه مجموعه‌ای از آسیب های سرطانی اتفاق می‌افتد، که با افزایش فزاینده مقدار دیسپلازی مشخص می‌شود.بیشتر PDACها از آسیب هایی برمی خیزد که فنوتیپ داکتال را نشان می‌دهند.اگرچه اطلاعاتی وجود دارد که نشان می‌دهد،کانال ها یاacinus های پانکراس،مکان‌هایی برای شکل‌گیری سرطان پانکراس هستند.این آسیب های پیشرو بیشتر نئوپلازی داخل اپی تلیالی پانکراس(panIN) هستند. همچنین IPMNوMCNدر برخی از نمونه‌های سرطان پانکراس دیده می‌شوند. PanINsبه زیردسته‌های panIN-۱A،panIN-۲،۱B panIN-۳تقسیم می شود. این مدل پیشرفت آسیب هایpanINفراگیرترین مدل بوده و به بهترین شکل برای رشد PDACانسان با فنوتیپ داکتال مشخص می‌شود. با این‌وجود شواهد جدید نشان می‌دهد که کمپلکس‌های توبولار که از طریق فرایندADMشکل می‌گیرد، آسیب های مسطح غیرمعمولی را به وجود می‌آورد که می‌تواند منجر به کارسینوژن پانکراس می‌شود. بر اساس یک مدل ADM،acini پانکراس به‌تدریج به شکل مجرا(لوله)تغییر شکل می‌دهد. این فرایند با انبساط سلول‌های centroacinarمشخص می‌شوند و با آپاپتوز سلول‌های acinerهمراه است. علاوه بر این، تولید آنزیم و ارتفاع سلول‌ها کاهش یافته و اطراف استروما ملتهب می‌شود. پیشینه اخیر نشان می‌دهد که هر دو مدل ADM و رشد آسیب های panIN می‌توانند همدیگر را در یک مقطع زمانی تکمیل نمایند. اگرچه تحقیقات بیشتری برای تأیید این یافته نیازاست(شکل۱).در نتیجه، مشکل است بتوان ADM و رشد آسیب های panIN را با روش‌های تصویربرداری موجود به تصویر کشید.همچنین، به سبب عدم وجود علائم مرتبط با بیماری در مراحل اولیه آن، پزشکان قادر به تشخیص زودهنگام بیماران مبتلا به این بیماری نیستند. در مرحله اولیه تشخیص زودهنگام می‌تواند شامل قابلیت غربال روتین بیماران از طریق به دست آوردن نمونه‌های بیولوژیکال در برابر مارکرهای معروفی باشد که در مراحل اولیه بیماری نشان داده می‌شوند.یک رویکرد ممکن است غربال بیمارانی باشد که از بیماری‌های معروف زمینه‌ساز بروز سرطان پانکراس رنج می‌برند؛ نظیر پانکراتیت مزمن و دیابت ملیتوس نوعII(۱۵). ۸۰تا۹۰٪PDACدوره ای هستند؛لذا رویکرد دوم می‌تواند تمرکز بر غربالگری‌های اولیه گروه‌های منتخب پر ریسک باشد. این گروه شامل بیمارانی با زمینه‌های ژنتیکیPDAC، افرادی باسابقه خانوادگیMultiple family Member،بیمارانی با پانکراتیت وراثتی سندرم peutz jeghers،سندرم سرطان تخمدان -سینه ارثی یا ملانوم آتوپیک (غیرمعمول)خانوادگی که مسئول ۲۰تا۱۰٪بیماران PDACاست.

مسیرهای مهم و ژن‌های حیاتی برای غربال بیومارکرها

توضیح نابهنجاری‌های ژنتیکی که منجر به رشد PDAC می‌شود به رشد بیومارکرهای پلاسمایی و بافتی برای آسیب هایpanINکمک می‌کند. مدل‌های PDAC موش(۲۰) در درک ما از تغییرات ژنتیکی نقش دارد و این نتایج می‌تواند کلیدی برای تعریف خطر ابتلای افراد به این بیماری باشد.مسیرهای علامت‌دهی جنینی مختلفی شناخته‌شده‌اند تا نقشی در سلول‌های استرومال وتومورال پانکراس ایفا نمایند. فعال‌سازی نابجای مسیرهای اصلی نظیرHedgehog،Wnt،NotchوP۱۳K/AKTغالباً در سرطان پانکراس مشاهده می‌شوند. علاوه بر این ژن‌های مرتبط با سرطان درPDAC انسان Upregulated می‌شود و غالباً با تکرار زیاد جهش در انکوژنKRAS۹۵٪،P۱٦۸۵٪،P۵۳ ۷۵٪،SMAD٤۵۵٪که ژن‌های سرکوبگرتومور هستند در ارتباط است. علاوه بر این، اصلاح دربیان گیرنده فاکتور رشدepidermal(EGFR)،HER۲/NE٤و سایر گیرنده‌های تایروزین کینازولیگاندها و تبدیل فعال‌سازی فاکتورهای رشد بتا که به اشتباه و نابجا بیان‌شده است مسلم است که فعال‌سازی جهش‌های نقطه ای در ژن KRASو بیان بیش‌ازحدHER۲/NE٤ ابتدا در دگرگونی سلولار اتفاق می افتد و غیر فعالسازی ژن P۱٦ درمرحله میانی اتفاق می‌افتد. درنهایت غیرفعالسازی P۵۳،SMAD٤،BRCA۲دراواخردوره بیماری اتفاق می‌افتد. علاوه براین PDAC، ناپایداری

وآنیوپلوئیدی ژنومیک وسیعی را نشان می دهد.کاهش و جهش تلومر در مجموعه متنوعی از این ژن ها یا ژن های دیگر می تواند در بدخیم سازی فنوتیپ نقش داشته باشد. براساس دانش موجود در زمینه تغییر در این مسیرها و ژن ها، مارکرهای مدفوعی ،سرمی و بافتی برای تشخیص زودهنگام سرطان پانکراس ارائه گردید؛ اگرچه برخی ازآنها برای ارزیابی پیش بینی ها یا پاسخ به شیمی درمانی نیزمعرفی شده اند؛امادراینجا ما آنهارا فقط با هدف تشخیص مورد بررسی قرارمی دهیم.



شکل۱:مدلی برای رشد سرطان پانکراس و وضعیت بیومارکرها

بیومارکرهای بافتی

براساس مدل پیشرفت panINتغییرات ژنتیکی خاصی در تومورهای پانکراس تشریح شد؛ سپس این تغییرات ژنتیکی به عنوان مارکرهای تشخیصPDACمورد بررسی قرارگرفتند. رویدادهای ژنتیکی اولیه که در آسیب های پانکراس قابل تشخیص هستند، نظیرجهش فعالسازی درKRASکه دربیش از۹۰٪ نمونه ها اتفاق می افتد یا از غیرفعالسازی ژن جلوگیری می‌کنند، تومورP16 که بیشتر در مراحل پایانی (درمورد۹۵٪تا۸۰٪گونه‌ها)اتفاق می‌افتد.که بانشانه‌های نظیرازدست دادنP۵۳(۷۵٪تا۵۰٪)،SMAD٤(۵۵٪) و BRCA2(7%)همراه است.

Alteration	Frequency	Initiation
KRAS mutation	90–95%	PanIN-I
p16 ^{INK4A} inactivation or mutation	80–95%	PanIN-I and PanIN-II
p53 inactivation	50–75%	PanIN-III
Smad4 inactivation	55%	PanIN-III

جدول(۱):متداول ترین اصلاحات ژنتیکی در بافت PDAC

P16^{INK4A}

در PDACدوره ای ،نقص در عملکرد تومور سرکوبگر P16 که بیشتر بدلیل جهش،حذف یاHypermethylation تومور رخ می دهد در۹۵٪تا۸۰٪نمونه ها دیده می‌شود. ازآنجایکه پروتئین p16 سبب عدم اتصال سایکلین های خانواده(CDK)Cyclin_dependent kinase،D می‌شود، نبود این پروتئین‌ها می تواند منجربه افزایش میزان تکثیرسلولی شده وعلاوه براین سبب می‌شود.اگرچه این جهش‌ها می تواندرPDAC رخ دهد، امابه سرطان پانکراس اختصاص ندارند؛ زیرا این جهش‌ها درسایرسرطان ها نظیرسرطان سینه سرطان ارثی melanomaدیده می‌شود.کمبودp16درمراحل اولیه آسیب هایpanINو promoter Methylation رخ می دهد. همچنین به نظر می رسد سایرتغییرات ژنتیکی ریسک فردی پانکراتیت مزمن وسرطان بالقوه را افزایش می‌دهد.متیلاسیونp16 شاخص‌های مفید بدخیمی بالقوه سلول‌های اپی تلیال پانکراس است. همچنینp16 مارکرتشخیصی است که سرطان پانکراس خوش خیم و بدخیم را متمایز می‌کند. با این وجود،p16 به تنهایی یا درترکیب با سایرمارکرهای مولکولی قابلیت استفاده کلینیکی ندارد و مطالعات بیشتری برای مشخص کردن میزان مطلوب حساسیت و ویژگی آن لازم است.

P53

تومورسرکوبگرP53 بیشترین ژن جهش یافته در سرطان های انسانی است و در۵۰٪تا۷۰٪ ازتومورهای پانکراس دیده شده است. ازآنجائیکه جهش‌های P53 در طی رشد سرطان پانکراس دیرظاهرمی شود، از این پروتئین برای بررسی واکنش به درمان استفاده می شود. در عوض ارزیابی P53 به تنهایی حساسیت لازم را به عنوان بیومارکری برای تشخیص اولیه را ندارد.با این وجود؛ با پژوهش های بیشتر و بدست آمدن نتایج معتبرمی توان ازآن برای تشخیص بیماری استفاده نمود.

SMAD4

SMAD4یکی ازاعضای خانواده SMAD عوامل رونویسی است که در پاسخ به تبدیل فاکتور رشد بتا و همچنین پروتئین مورفولوژیک استخوان (BMP)و اکتیوین سیگنالینگ به وسیله کینازگیرنده سرین–ترئونین فعال

می‌شود.اگرچه این پروتئین درسایرسرطانها ناپدیدمی شود، فقدانSMAD٤ در PDAC نسبت به سایرسرطان ها حساس تروخاص تراست. این پروتئین در٥٥٪ازسرطان های پانکراس، با حذف هر دو آلل ٣٥٪ یا با جهش دریک آلل که بافقدان آلل دیگر روبه رو است،غیرفعال می‌شود. حذف SMAD٤ از مراحل قبلی آسیب هایpanINشروع می شود. حذف این پروتئین به دلیل وجود متاستازها با پیش بینی ضعیف ارتباط دارد؛ازطرفی این حذف بیشتر در ترکیب با تغییرات KRAS و مسیرهای PTENروی می دهد. بنابراین تحلیل SMAD٤ هنوز برای تشخیص یا درمان های کلینیکی توصیه نمی‌شوند.

CEA

گلیکوپروتئینی است که در سال ١٩٦٥ به عنوان مارکری برای سرطان روده بزرگ(کولون)کشف شد؛ اماCEA اولین بیومارکرتومورال برای تشخیص سرطان پانکراس است. میانگین حساسیت این مارکر٥٤٪ومیانگین اختصاصیت آن٧٩٪است. حساسیت پایین به همراه این واقعیت که CEA درسرطان سینه،معده وروده افزایش پیدا می‌کند، نشان می دهدکه آزمایشCEAبرای تشخیص PDAC چندان کاربردی ندارد؛ در عوض CEAدقیق‌ترین تست موجود برای تشخیص آسیب های کیستیک موسینوس پانکراس است. دراین نوع تومورها دررابطه با میزانEus،CEA ابزارتشخیصی مفیدی به شمار می آید.

مارکرهای درحال ظهور

به تازگی مارکرهای جدیدی معرفی شده اندکه قابلیت استفاده درکلینیک های درمانی رادارند.اما نیاز به انجام مطالعات بیشتری برای تایید این مارکرها هست. بیان DJ-١ باتهاجم توموری ومتاستازدر PDACارتباط دارد.ازسوی دیگرآنالیزایمونوهیستوشیمی نشان داد که میزان ٦٨.٥٪ up-regulation DJ-١ نمونه‌های PDACاست .علاوه براین Dj-١ درشیره پانکراس وسرم بیماران PDACدرمقایسه باافرادسالم وپانکراتیت مزمن افزایش یافته است. APRIL مارکرتازه ای ازخانواده بزرگTNFاست که می توان به عنوان یک بیومارکر بررسی شود. میزان APRILموجود در سرم که درسرطان پانکراس افزایش یافته نشان دهنده ٧٠,١٪ حساسیت و٨٥,٥٪ اختصاصیت است. این مقادیرحساسیت واختصاصیت زمانیکه APRIL با مقادیر CEA،CA19-9ترکیب می شود، افزایش می‌یابد. با این وجوداطلاعات تاییدکننده برای گروه‌های بزرگ‌تری ازبیماران لازم است. Plectin-1مارکریست که با توانایی در متمایزکردنPDAC وpanINIII ازپانکراتیت مزمن وpanINI,II مشخص می‌شوند.Muc1 بارویدادهای اولیه پیشرفت تهاجمیPDAC درارتباط است ومیزان حساسیت واختصاصیت آن به ترتیب ٨٢٪و٩٥٪است. Duttaوهمکاران HSP70 به عنوان بیومارکرسرولوژیکی جدیدی معرفی کردندکه با حساسیت ٧٤٪واختصاصیت ٩٠٪ PDACاولیه را ازبیماران پانکراتیت مزمن وکنترل های سالم متمایزمی سازد. Changوهمکاران ULBP2 را به عنوان بیومارکر دیگری معرفی نمودند که میزان سرم مشاهده شده دربیماران مبتلا به سرطان پانکراس درمقایسه با بیماران غیرسرطانی (سالم)را افزایش می دهند. میزان حساسیت این بیومارکر٨٣,٨٪ و میزان اختصاصیت آن ٧٣,٩٪است. نتیجه ترکیب،ULBP2AUC0.910;CA19-9است که درهرصورت بزرگ تراز هر مارکر به تنهایی است. Hars وهمکاران بیومارکرهای بالقوه عمده و اساسی را برای سرطان پانکراس ارائه کردند. اگرچه بیومارکرهای تشریح شده درتحقیق این محققان حاوی اطلاعات جامع وکامل وپروتئین سرطان پانکراس است؛ اما این مارکرها برای مصارف آزمایشگاهی موردتاییدقرارنگرفته است. عیب عمده مارکرهای مولکولی موجود، اختصاصیت پایین وبهینگی ناچیزآن ها برای استفاده کلینیکی معمول است.

miRNA

MicroRNAS، Non coding RNAS، ٢٢نوکلئوتیدی عملکردی است که به شکل منفی بیان ژن را تنظیم می‌کند. گزارش های تازه نشان می دهدکه تولید نابجای MicroRNA رویداد اولیه در رشد آسیب های panIN است. با استفاده ازتوضیح نحوه بیان MicroRNA محققان متعدد به این نتیجه رسیدندکه این مولکول‌ها این نوید را به جامعه علمی بدهند که بیومارکرها قادر به ایجاد تمایز بین بافت‌های پانکراس خوش خیم ،پانکراتیت مزمن وPDACهستند.به شکلی خاص می‌توان درطی فرآیند بیوپسی(fine needle -aspirate(FNA،MiR-217وMiR216 راکشف کرد. این Micro RNA و همچنین miR-155 [110], Let-7 microRNA [111],miR-10a [112],miR-146a [113],miR-34, miR-21 [114 تنها دربافت های

تومورال پانکراس بیان می‌شود و در بافت های خوش خیم دیده نمی شود. بسیاری ازMicroRNAهای دیگرکه به شکلی نابجا و نامناسب درسرطان پانکراس بیان شده، کشف شده است نظیر miR196a, miR190, miR186, miR221, miR222, miR200b, miR15b and miR95. Wang وهمکاران توانستند در پلاسمای بیماران مبتلا به سرطان پانکراس چهارMicroRNAراکشف کنند (miR196a-miR155-mir210-mir21 که به شکلی نامناسب بیان شده‌اند. مطلب فوق نشان می دهدکه توضیحMiRNA پلاسما می تواند به عنوان بیومارکرخونی،خاص وحساس برای تشخیص این بیماری معرفی گردد. بسیاری از نشریات دیگر،miRNA را درPDAC مورد بررسی قرارداده و نشان دادندکه ازآن می‌توان درآینده به عنوان مارکری تشخیصی استفاده نمود.درنتیجه miRNAS خاص مانند miR200 family, miR10a, miR34a and miR155 ازراه تنظیم ژن‌های مرتبط بافنوتیپ متاستاز وStem cell دربیولوژی PDACدرگیر می‌شوند. برخی ازآنهادرفرآیندانتقال اپی تلیال به مزانشیمال نقشی تعدیل کننده دارند.تابه امروز، ازتشخیصmicroRNA به عنوان شاخصی برای تشخیص PDAC استفاده نمی شود؛ اما تحقیقات تازه نشان داده که درآینده نزدیک ازآن می‌توان به عنوان بیومارکراستفاده نمود.

منابع

1. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2012. CA Cancer J Clin 2012;62:10–29.
2. Fesinmeyer MD, Austin MA, Li CI, De Roos AJ, Bowen DJ. Differences in survival by histologic type of pancreatic cancer. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2005;14:1766–73.
3. Hidalgo M. Pancreatic cancer. N Engl J Med 2010;362:1605–17.
4. Bardeesy N, DePinho RA. Pancreatic cancer biology and genetics. Nat Rev 2002;2: 897–909.
5. Ardengh JC, de Paulo GA, Ferrari AP. Pancreatic carcinomas smaller than 3.0 cm: endosonography (EUS) in diagnosis, staging and prediction of resectability. HPB (Oxford) 2003;5:226–30.
6. Harewood GC, Wiersema MJ. Endosonography-guided fine needle aspiration biopsy in the evaluation of pancreatic masses. Am J Gastroenterol 2002;97: 1386–91.
7. Maitra A, Hruban RH. Pancreatic cancer. Annu Rev Pathol 2008;3:157–88.
8. Hruban RH, Adsay NV, Albores-Saavedra J, et al. Pancreatic intraepithelial neoplasia: a new nomenclature and classification system for pancreatic duct lesions. Am J Surg Pathol 2001;25:579–86.
9. Sipos B, Frank S, Gress T, Hahn S, Kloppel G. Pancreatic intraepithelial neoplasia revisited and updated. Pancreatology 2009;9:45–54.
10. Ottenhof NA, Milne AN, Morsink FH, et al. Pancreatic intraepithelial neoplasia and pancreatic tumorigenesis: ofmice andmen. Arch Pathol LabMed 2009;133:375–81.
11. Esposito I, Konukiewitz B, Schlitter AM, Kloppel G. New insights into the origin of pancreatic cancer: Role of atypical flat lesions in pancreatic carcinogenesis. Pathologe Nov 2012;33 Suppl 2:189–93.
12. Shi G, Zhu L, Sun Y, et al. Loss of the acinar-restricted transcription factor Mist1 accelerates Kras-induced pancreatic intraepithelial neoplasia. Gastroenterology 2009;136:1368–78.
13. Guerra C, Schuhmacher AJ, Canamero M, et al. Chronic pancreatitis is essential for induction of pancreatic ductal adenocarcinoma by K-Ras oncogenes in adult mice. Cancer Cell 2007;11:291–302.
14. Habbe N, Shi G, Meguid RA, et al. Spontaneous induction of murine pancreatic intraepithelial neoplasia (mPanIN) by acinar cell targeting of oncogenic KRAS in adult mice. Proc Natl Acad Sci U S A 2008;105:18913–8.
15. Lowenfels AB, Maisonneuve P, Cavallini G, et al. Pancreatitis and the risk of pancreatic cancer. International Pancreatitis Study Group. N Engl J Med 1993;328: 1433 7.