

مارکرهاي مولکولی در تشخیص سرطان پانکراس

است که طول عمر ۵ ساله تنها ۵٪ است. در سال ۲۰۱۲ در آمریکا نزدیک به ۴۳۹۲۰ بیمار دچار سرطان PDAC شناسایی شد، که ۳۷۳۹۰ نفر از آن‌ها در اثر این بیماری جان باختند (۱). PDAC معمول‌ترین نوع سرطان پانکراس است که ۹۰٪ همه ی بدخیمی های پانکراس را در برمی گیرد. اگرچه PDAC دهمین نوع معمول سرطان به شمار می آید؛ در غرب این نوع سرطان از لحاظ شمار بیماران، چهارمین نوع سرطان محسوب می شود (۲). پیش آگاهی ۸٪ ضعیف این نئوپلاسم به سبب چندین عامل است: ماهیت خاموش این بیماری و تشخیص دیر هنگام، پتانسیل متاستاز بالا، مقاومت در برابر شیمی درمانی 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. تا به حال تنها گزینه ابتکاری در تشخیص این نوع سرطان *surgical resection* است؛ اما تنها ۲۰٪ بیماران با این روش در مراحل اولیه بروز بیماری شناسایی می شوند (۳). ۸۰٪ باقیمانده بیماران زمانی شناسایی می شوند که بیماری آن‌ها پیشرفت کرده باشد و رادیوتراپی و شیمی درمانی نمی تواند کمک زیادی به بهبودی آن‌ها نماید (۴). تا به حال تست‌های تشخیصی تنها بعد از انجام *Eus, ERcp, CT Scan* صورت می گیرد (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 ۳cm از ۶۶,۷٪ تا ۸۶,۱٪) (۶). اگرچه این روش‌ها کمک کننده هستند، اما قابلیت آن‌ها برای تشخیص زودهنگام آسیب های نئوپلاستیک یا ایجاد تمایز بین پانکراتیت مزمن و

آدنوکارسینوماي داکتال پانکراس، *Pancreatic duct adenocarcinoma (PDAC)*، نئوپلازی کشنده را با میزان مرگ و میر بالا نشان می دهد. روش‌های تشخیص زودهنگام مؤثر مورد نیاز است؛ زیرا استفاده از این روش‌ها بهترین راه برای درمان این بیماری است. در سال‌های گذشته پژوهش‌های بسیاری به تعیین بیومارکرهاي وابسته پرداخته‌اند، که می توانند درگام های نخستین رشد تومور پانکراس دیده شود. اگرچه بیومارکرهاي متعددی برای تشخیص سرطان پانکراس معرفی شده است، اما کارایی کلینیکی آن‌ها تا اندازه ی زیادی با ابهام همراه بوده است. اگرچه *CA19-9* تستی است که چند سالی است مورد استفاده قرار می گیرد؛ 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 قرار گرفته‌اند، پرداخته ایم. اگرچه این موارد، برای استفاده معمول آزمایشگاهی راست آزمایی نشده است؛ اما این مارکرها می توانند پس از انجام تحقیقات تکمیلی مورد استفاده قرار گیرد. امیدواریم که ترکیبی از این بیومارکرهاي جدید بتواند ابزار مفیدی برای تشخیص زودهنگام PDAC پیش از تکنیک‌های تصویربرداری یا نشانگان بیمارانی که نمودار این بیماری است، باشد.

پیش گفتار

سرطان پانکراس یکی از کشنده‌ترین سرطان‌ها در جهان

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 تازه‌ی موجود و میزان دسترسی و قابلیت آن‌ها در تست‌های آزمایشگاهی است.

مدل‌های تکامل و پیشرفت در PDAC

تبدیل سلول‌های نرمال به آدنوکارسینوما می‌مهاجم از راه مجموعه‌ای از آسیب‌های سرطانی اتفاق می‌افتد، که با افزایش فزاینده مقدار دیسپلازی مشخص می‌شود. بیشتر PDACها از آسیب‌هایی برمی‌خیزد که فنوتیپ داکتال را نشان می‌دهند. اگرچه اطلاعاتی وجود دارد که نشان می‌دهد، کانال‌ها یا acinusهای پانکراس، مکان‌هایی برای شکل‌گیری سرطان پانکراس هستند. این آسیب‌های پیشرو بیشتر نوپلازی داخل اپی‌تلیالی پانکراس (panIN) هستند. همچنین PMN و MCN در برخی از نمونه‌های سرطان پانکراس دیده می‌شوند. PanINs به زیرسته‌های 1A-panIN، panIN-2، 1B-panIN، 3-panIN تقسیم می‌شود. این مدل پیشرفت آسیب‌های panIN فراگیرترین مدل بوده و به بهترین شکل برای رشد PDAC انسان با فنوتیپ داکتال مشخص می‌شود. با این وجود شواهد جدید نشان می‌دهد که کمپلکس‌های توپولار که از طریق فرایند ADM شکل می‌گیرد، آسیب‌های مسطح غیرمعمولی را به وجود می‌آورد که می‌تواند منجر به کارسینوژن پانکراس می‌شود. بر اساس یک مدل acini، ADM پانکراس به تدریج به شکل مجرا (لوله) تغییر شکل می‌دهد. این فرایند با انبساط سلول‌های centroacinar مشخص می‌شوند و با آپاپتوز سلول‌های aciner همراه 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 آسیب‌های panIN می‌توانند همدیگر را در یک مقطع زمانی تکمیل نمایند. اگرچه تحقیقات بیشتری برای تأیید این یافته نیاز است (شکل ۱). در نتیجه، مشکل است بتوان ADM و رشد آسیب‌های 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 نوع II (۱۵). ۸۰ تا ۹۰٪ PDAC دوره‌ای هستند؛ لذا رویکرد دوم می‌تواند تمرکز بر غربالگری‌های اولیه گروه‌های منتخب پر ریسک باشد. این گروه شامل بیمارانی با زمینه‌های ژنتیکی PDAC، افرادی با سابقه خانوادگی Multiple family Member، بیمارانی با پانکراتیت وراثتی سندرم peutz jehgers، سندرم سرطان تخمدان - سینه ارثی یا ملانوم آتوپیک (غیرمعمول) خانوادگی که مسئول ۲۰ تا ۱۰٪ بیماران PDAC است.

مسیرهای مهم و ژن‌های حیاتی برای غربال بیومارکرها

توضیح ناهنجاری‌های ژنتیکی که منجر به رشد PDAC می‌شود به رشد بیومارکرهای پلاسمایی و بافتی برای آسیب‌های panIN کمک 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 شناخته شده‌اند تا نقشی در سلول‌های استرومال و تومورال پانکراس ایفا نمایند. فعال‌سازی نابجای مسیرهای اصلی نظیر Notch، Wnt، Hedgehog و AKT/13K غالباً در سرطان پانکراس مشاهده می‌شوند. علاوه بر این ژن‌های مرتبط با سرطان در PDAC انسان Upregulated می‌شود و غالباً با تکرار زیاد جهش در انکوژن KRAS ۹۵٪، ۱۶۸۵٪، ۵۳٪، ۷۵٪، ۵۵٪ SMAD4 که ژن‌های سرکوبگر تومور هستند در ارتباط است. علاوه بر این، اصلاح در بیان گیرنده فاکتور رشد epidermal (EGFR)، HER2/NE4 و سایر گیرنده‌های تایروزین کیناز و لیگاندها و تبدیل فعال‌سازی فاکتورهای رشد بتا که به اشتباه و نابجا بیان شده است مسلم است که فعال‌سازی جهش‌های نقطه‌ای در ژن KRAS و بیان بیش از حد HER2/NE4 ابتدا در دگرگونی سلولار اتفاق می‌افتد و غیر فعال‌سازی ژن P16 در مرحله میانی اتفاق می‌افتد. در نهایت غیر فعال‌سازی P53، SMAD4، BRCA2 در اواخر دوره بیماری اتفاق می‌افتد. علاوه بر این PDAC، ناپایداری

P16^{INK4A}

در PDAC دوره ای، نقص در عملکرد تومور سرکوبگر P16 که بیشتر بدلیل جهش، حذف یا Hypermethylation تومور رخ می دهد در ۹۵٪ تا ۸۰٪ نمونه ها دیده می شود. از آنجائیکه پروتئین p16 سبب عدم اتصال سایکلین های خانواده (CDK) Cyclin-dependent kinase (CDK) می شود، نبود این پروتئین ها می تواند منجر به افزایش میزان تکثیر سلولی شده و علاوه بر این سبب می شود. اگرچه این جهش ها می تواند در PDAC رخ دهد، اما به سرطان پانکراس اختصاص ندارند؛ زیرا این جهش ها در سایر سرطان ها نظیر سرطان سینه سرطان ارثی melanoma دیده می شود. کمبود p16 در مراحل اولیه آسیب های panIN می شود. promoter Methylation می دهد. همچنین به نظر می رسد سایر تغییرات ژنتیکی ریسک فردی پانکراتیت مزمن و سرطان بالقوه را افزایش می دهد. متیلاسیون p16 شاخص های مفید بدخیمی بالقوه سلول های اپی تلیال پانکراس است. همچنین p16 مارکر تشخیصی است که سرطان پانکراس خوش خیم و بدخیم را متمایز می کند. با این وجود، p16 به تنهایی یا در ترکیب با سایر مارکرهای مولکولی قابلیت استفاده کلینیکی ندارد و مطالعات بیشتری برای مشخص کردن میزان مطلوب حساسیت و ویژگی آن لازم است.

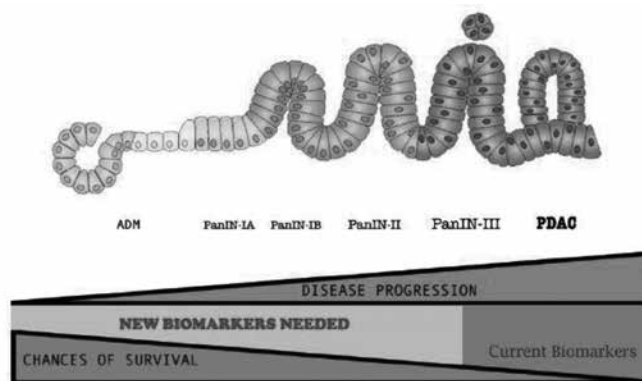
P53

تومور سرکوبگر P53 بیشترین ژن جهش یافته در سرطان های انسانی است و در ۷۰٪ تا ۵۰٪ از تومورهای پانکراس دیده شده است. از آنجائیکه جهش های P53 در طی رشد سرطان پانکراس دیرظاهر می شود، از این پروتئین برای بررسی واکنش به درمان استفاده می شود. در عوض ارزیابی P53 به تنهایی حساسیت لازم را به عنوان بیومارکر برای تشخیص اولیه را ندارد. با این وجود؛ با پژوهش های بیشتر و بدست آمدن نتایج معتبر می توان از آن برای تشخیص بیماری استفاده نمود.

SMAD4

SMAD4 یکی از اعضای 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

و آنیوپلوئیدی ژنومیک وسیعی را نشان می دهد. کاهش و جهش تومور 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 از آنها برای ارزیابی پیش بینی ها یا پاسخ به شیمی درمانی نیز معرفی شده اند؛ اما اینها ما آنها را فقط با هدف تشخیص مورد بررسی قرار می دهیم.



شکل ۱: مدلی برای رشد سرطان پانکراس و وضعیت بیومارکرها

بیومارکرهای بافتی

براساس مدل پیشرفت panIN تغییرات ژنتیکی خاصی در تومورهای پانکراس تشریح شد؛ سپس این تغییرات ژنتیکی به عنوان مارکرهای تشخیص PDAC مورد بررسی قرار گرفتند. رویدادهای ژنتیکی اولیه که در آسیب های پانکراس قابل تشخیص هستند، نظیر جهش فعالسازی در KRAS که در بیش از ۹۰٪ نمونه ها اتفاق می افتد یا از غیرفعالسازی ژن جلوگیری می کنند، تومور P16 که بیشتر در مراحل پایانی (در مورد ۹۵٪ تا ۸۰٪ گونه ها) اتفاق می افتد. که بانسانه های نظیر از دست دادن P53 (۷۵٪ تا ۵۰٪)، SMAD4 (۵۵٪) و BRCA2 (۷٪) 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

می‌شود. اگرچه این پروتئین در سایر سرطانها ناپدید می‌شود، فقدان SMAD4 در PDAC نسبت به سایر سرطان‌ها حساس تر و خاص تر است. این پروتئین در ۵۵٪ از سرطان‌های پانکراس، با حذف هر دو آلل ۳۵٪ یا با جهش در یک آلل که با فقدان آلل دیگر روبه‌رو است، غیرفعال می‌شود. حذف SMAD4 از مراحل قبلی آسیب‌های panIN شروع می‌شود. حذف این پروتئین به دلیل وجود متاستازها با پیش‌بینی ضعیف ارتباط دارد؛ از طرفی این حذف بیشتر در ترکیب با تغییرات KRAS و مسیرهای PTEN روی می‌دهد. بنابراین تحلیل SMAD4 هنوز برای تشخیص یا درمان‌های کلینیکی توصیه نمی‌شوند.

CEA

گلیکوپروتئینی است که در سال ۱۹۶۵ به عنوان مارکری برای سرطان روده بزرگ (کولون) کشف شد؛ اما CEA اولین بیومارکر تومورال برای تشخیص سرطان پانکراس است. میانگین حساسیت این مارکر ۵۴٪ و میانگین اختصاصیت آن ۷۹٪ است. حساسیت پایین به همراه این واقعیت که CEA در سرطان سینه، معده و روده افزایش پیدا می‌کند، نشان می‌دهد که آزمایش CEA برای تشخیص PDAC چندان کاربردی ندارد؛ در عوض CEA دقیق‌ترین تست موجود برای تشخیص آسیب‌های کیستیک موسینوس پانکراس است. در این نوع تومورها در رابطه با میزان Eus, CEA ابزار تشخیصی مفیدی به شمار می‌آید.

مارکرهای در حال ظهور

به تازگی مارکرهای جدیدی معرفی شده‌اند که قابلیت استفاده در کلینیک‌های درمانی را دارند. اما نیاز به انجام مطالعات بیشتری برای تایید این مارکرها هست. بیان DJ-1 با تهاجم توموری و متاستاز در PDAC ارتباط دارد. از سوی دیگر آنالیز ایمونوهیستوشیمی نشان داد که میزان DJ-1 up-regulation DJ-1 نمونه‌های PDAC است. علاوه بر این DJ-1 در شیره پانکراس و سرم بیماران PDAC در مقایسه با افراد سالم و پانکراتیت مزمن افزایش یافته است. APRIL مارکر تازه‌ای از خانواده بزرگ TNF است که می‌توان به عنوان یک بیومارکر بررسی شود. میزان APRIL موجود در سرم که در سرطان پانکراس افزایش یافته نشان‌دهنده ۷۰٫۱٪ حساسیت و ۸۵٫۵٪ اختصاصیت است. این مقادیر حساسیت و اختصاصیت زمانی که APRIL با مقادیر CEA, CA19-9 ترکیب می‌شود، افزایش

می‌یابد. با این وجود اطلاعات تاییدکننده برای گروه‌های بزرگ‌تری از بیماران لازم است. Plectin-1 مارکریست که با توانایی در متمایز کردن PDAC و panIN با توانایی مزمن و II, panIN مشخص می‌شوند. Muc1 با رویدادهای اولیه پیشرفت تهاجمی PDAC در ارتباط است و میزان حساسیت و اختصاصیت آن به ترتیب ۸۲٪ و ۹۵٪ است. Dutta و همکاران HSP70 به عنوان بیومارکر سرولوژیکی جدیدی معرفی کردند که با حساسیت ۷۴٪ و اختصاصیت ۹۰٪ PDAC اولیه را از بیماران پانکراتیت مزمن و کنترل‌های سالم متمایز می‌سازد. Chang و همکاران ULBP2 را به عنوان بیومارکر دیگری معرفی نمودند که میزان سرم مشاهده شده در بیماران مبتلا به سرطان پانکراس در مقایسه با بیماران غیرسرطانی (سالم) را افزایش می‌دهند. میزان حساسیت این بیومارکر ۸۳٫۸٪ و میزان اختصاصیت آن ۷۳٫۹٪ است. نتیجه ترکیب CA19-9, CA19-9, ULBP2 AUC 0.910 است که در هر صورت بزرگ‌تر از هر مارکر به تنهایی است. Hars و همکاران بیومارکرهای بالقوه عمده و اساسی را برای سرطان پانکراس ارائه کردند. اگرچه بیومارکرهای تشریح شده در تحقیق این محققان حاوی اطلاعات جامع و کامل و پروتئین سرطان پانکراس است؛ اما این مارکرها برای مصارف آزمایشگاهی مورد تایید قرار نگرفته است. عیب عمده مارکرهای مولکولی موجود، اختصاصیت پایین و بهینگی ناچیز آن‌ها برای استفاده کلینیکی معمول است.

miRNA

MicroRNAs, Non coding RNAs, ۲۲ نوکلئوتیدی عملکردی است که به شکل منفی بیان ژن را تنظیم می‌کند. گزارش‌های تازه نشان می‌دهد که تولید نابجای MicroRNA رویداد اولیه در رشد آسیب‌های panIN است. با استفاده از توضیح نحوه بیان MicroRNA محققان متعدد به این نتیجه رسیدند که این مولکول‌ها این نوید را به جامعه علمی بدهند که بیومارکرها قادر به ایجاد تمایز بین بافت‌های پانکراس خوش‌خیم، پانکراتیت مزمن و PDAC هستند. به شکلی خاص می‌توان در طی فرآیند بیوپسی (FNA, MiR-217) و fine needle aspirate MiR216 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 در بافت‌های

ation 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. *Pancreatol* 2009;9:45–54.

10. Ottenhof NA, Milne AN, Morsink FH, et al. Pancreatic intraepithelial neoplasia and pancreatic tumorigenesis: of mice and men. *Arch Pathol Lab Med* 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.

تومورال پانکراس بیان می‌شود و در بافت های خوش خیم دیده نمی‌شود. بسیاری از MicroRNA های دیگر که به شکلی نابجا و نامناسب در سرطان پانکراس بیان شده، کشف شده است نظیر miR196a, miR190, miR186, miR221, miR222, miR200b, miR15b and miR95. Wang. همکاران توانستند در پلاسمای بیماران مبتلا به سرطان پانکراس چهار MicroRNA را کشف کنند (miR196a-miR155-) که به شکلی نامناسب بیان شده‌اند. مطلب فوق نشان می‌دهد که توضیح MiRNA پلاسمای می‌تواند به عنوان بیومارکر خونین، خاص و حساس برای تشخیص این بیماری معرفی گردد. بسیاری از نشریات دیگر، miRNA را در PDAC مورد بررسی قرار داده و نشان دادند که از آن می‌توان در آینده به عنوان مارکری تشخیصی استفاده نمود. در نتیجه miRNAs خاص مانند miR200 family, miR10a, miR34a and miR155 از راه تنظیم ژن‌های مرتبط با فنوتیپ متاستاز و Stem cell در بیولوژی PDAC درگیر می‌شوند. برخی از آنها در فرآیند انتقال اپی‌تلیال به مزانشیمال نقشی تعدیل‌کننده دارند. تا به امروز، از تشخیص microRNA به عنوان شاخصی برای تشخیص PDAC استفاده نمی‌شود؛ اما تحقیقات تازه نشان داده که در آینده نزدیک از آن می‌توان به عنوان بیومارکر استفاده 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 evalu-