مقاله مروری

نفس، سال ۴، شماره ۱، بهار ۱۳۹۶، صفحات ۱ تا ۹

مروری بر کاربرد DNA درگردش تومور در بررسی جهش‌های ژن گیرنده رشد اپیتلیالی سرطان ریه

حنیفه میرطاووسی مهیاری[1*]، محمد حسین مدرسی[2]، عدنان خسروی[3]، زهرا اصفهانی منفرد[4]، شراره سیفی[4]

۱) مرکز تحقیقات پیوند ریه، پژوهشکده سل و بیماری‌های ریوی، مرکز آموزشی، پژوهشی و درمانی سل و بیماری‌های ریوی بیمارستان دکتر مسیح دانشوری، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی، تهران، ایران

۲) گروه پزشکی مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران.۰، ایران

۳) مرکز تحقیقات پیشگیری و کنترل دخانیات، پژوهشکده سل و بیماری‌های ریوی، مرکز آموزشی، پژوهشی و درمانی سل و بیماری‌های ریوی بیمارستان دکتر مسیح دانشوری، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی، تهران، ایران

۴) مرکز تحقیقات بیماریهای مزمن تنفسی، پژوهشکده سل و بیماری‌های ریوی، مرکز آموزشی، پژوهشی و درمانی سل و بیماری‌های ریوی بیمارستان دکتر مسیح دانشوری، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی، تهران، ایران

چکیده:

مهمترین هدف تشخیصی و درمانی در سرطان ریه از نوع غیر سلول کوچک، گیرنده رشد اپیتلیالی می‌باشد. جهش‌های این گیرنده می‌تواند پاسخ به درمان‌های شخصی و هدف‌دار را پیشگویی کند. کشفیات فزاینده در زمینه نشانگرهای زیستی، موجب افزایش نیاز به نمونه‌های بافت توموری شده است؛ هرچند که در عمل این‌گونه نمونه‌ها همیشه راحت به دست نمی‌آیند. از این رو آنالیز خونی (که بیوپسی مایع نیز نامیده می‌شود) می‌تواند یک روش جایگزین باشد. پلاسمای افراد مبتلا به سرطان، دارای DNA درگردش است که حاوی اطلاعاتی در خصوص جهش‌های تومور و حجم تومور می‌باشد. این روش مقرون به صرفه می‌تواند دستیابی به خصوصیات تومور را به منظور تعیین اختصاصی ژنوم سرطانی، تسهیل نماید. در این مقاله کاربرد DNA در گردش تومور در تشخیص، تعیین پیش‌آگهی و پیشگویی مولفه‌های درمانی در خلال درمان سرطان ریه مورد بررسی قرار گرفته و دریچه‌ای به سوی پیشرفت‌های آینده می‌گشاید.

کلمات کلیدی: DNA درگردش تومور، سرطان ریه از نوع غیر سلول کوچک، گیرنده رشد اپیتلیالی، جهش

* **نویسنده مسئول:**

حنیفه میر طاووسی مهیاری، دانشجوی دکترای تخصصی ژنتیک دانشگاه تهران، مرکز تحقیقات بیماری‌های مزمن تنفسی، پژوهشکده سل و بیماریهای ریوی، دارآباد، نیاوران، تهران، ایران، پست الکترونیک: hanifehmirmah@yahoo.com

مقدمه:

سرطان ریه[1] به عنوان شایع‌ترین علت مرگ و میر ناشی از سرطان در سراسر دنیا شناخته می‌شود [۱]. در ایران نیز به عنوان هجدهمین کشور بزرگ دنیا و دومین کشور پهناور خاورمیانه به ترتیب دومین و سومین علت مرگ و میر ناشی از سرطان در مردان و زنان به دلیل این بیماری می‌باشد. [۲] میزان بروز سالانه این بیماری حدود ۴/۷-۹/۲ به ازای هر ۱۰۰۰۰۰ جمعیت برآورد گشته است. [۲] از نظر خصوصیات بافت‌شناسی، این بدخیمی به دو گروه عمده تقسیم می‌گردد:

سرطان ریه از نوع غیر سلول کوچک[2] و سرطان ریه از نوع سلول کوچک[3] که حدود ۸۰٪ تومورهای بدخیم ریه در گروه اول طبقه‌بندی می‌گردند [۳] گروه تومورهای دارای خصوصیات غیر سلول کوچک خود به زیرگروه‌های ذیل تقسیم‌بندی می‌گردند: آدنو کارسینوما[4]، سرطان سلول سنگ‌فرشی[5]، سرطان سلول بزرگ[6] و سرطان سلول غیر کوچک غیر اختصاصی[7]. در این میان زیر گروه آدنوکارسینوما از همه شایع‌تر است [۴].

تقریبا در ۷۰٪ موارد، بیماری در مراحل پیشرفته (مرحله ۳ و۴ بر طبق سیستم مرحله‌بندی سرطان ریه) تشخیص داده می‌شوند [۵] که متاسفانه پیش‌آگهی مبتلایان در این مرحله بسیار ضعیف است [۶]. علیرغم تمام پیشرفت‌ها در درمان سرطان ریه از نوع غیر سلول کوچک، پیش‌آگهی بیماران خصوصا در مراحل پیشرفته خیلی مطلوب نیست و بقای ۵ ساله بیماران کمتر از ۵٪ گزارش شده است [۶]. قبل از کشف و رواج آزمایش‌های ژنتیکی اختصاصی، درمان استاندارد سرطان ریه از نوع غیر سلول کوچک مبتنی بر شیمی‌درمانی بر پایه پلاتینوم[8] و در مواردی، از مرحله سوم، انجام رادیوتراپی علاوه بر شیمی درمانی بود [۷]. با استفاده از این داروها میزان پاسخ به درمان بیماران حدود ۳۰-۴۰٪ بوده و میانه بقای ایشان[9] حدود ۸-۹ ماه بوده است و در نهایت تمام بیماران عود بیماری را تجربه خواهند کرد [۸]. تصور می‌شود که مقاومت به شیمی‌درمانی عامل اصلی پیش‌آگهی نامطلوب بیماران است. سلول‌های سرطانی با مکانیسم‌های متفاوتی مانند جهش، آمپلیفیکاسیون[10]، حذف، جابجایی‌های داخل کروموزومی یا بین کروموزومی و یا مکانیسم‌های اپی‌ژنتیک فعالیت ژن‌های کلیدی را تغییر می‌دهند و به این وسیله نسبت به درمان مقاوم می‌گردند. بنابراین لزوم استفاده از داروهای جدید برای بهبود زندگی و افزایش طول عمر بیماران بسیار ضروری به نظر می‌رسد.

هر چند که سرطان و میزان تهاجم آن می‌تواند تحت تاثیر عوامل متعددی همچون ژنتیک اجدادی[11]، پلی‌مورفیسم لایه زایا و نوع زندگی افراد مبتلا باشد ولی در نهایت عامل اصلی این بیماری جهش‌های سوماتیک می‌باشد [۹]. یکی از پیشرفت‌های مهم در علم سرطان شناسی، تشخیص تغییرات ژنتیکی Driverها می‌باشد که هدف قرار دادن این تغییرات، منجر به پیشرفت‌های چشمگیری در درمان مبتلایان به مرحله پیشرفته سرطان ریه و انقلابی در زمینه‌ی درمان سرطان‌های غیر سلول کوچک ریه، از درمان‌های کور به سمت درمان‌های تخصصی‌تر، گردیده است. بیشتر این جهش‌ها در زیر گروه آدنوکارسینوم رخ می‌دهند و جهش‌هایی که در سایر گروه‌ها مانند سلول سنگفرشی و یا در سرطان ریه سلول کوچک رخ می‌دهند، از اهمیت بالینی چندانی برخوردار نیستند. یکی از مهم‌ترین جهش‌ها که در این زمینه رخ می‌دهد و مطالعات فراوانی در سایر کشورها در خصوص آن صورت گرفته است جهش گیرنده‌ی عامل رشد اپیتلیالی (EGFR)[12] است که به عنوان اولین تغییر ژنتیکی Driver در سرطان ریه غیر سلول کوچک شناخته شده است. این گیرنده که از خانواده‌ی تیروزین کیناز می‌باشد، در غشای سلولی واقع است و پیام‌های رشد را به داخل سلول هدایت می‌کند [۱۰] و با فسفریله کردن گروه‌های تیروزین در پروتیین‌های هدف باعث

[1] Lung cancer
[2] Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC)
[3] Small Cell Lung Cancer (SCLC)
[4] Adenocarcinoma
[5] Squamous cell carcinoma
[6] Large cell carcinoma
[7] Not –specified, Non-Small Cell Lung Cancer
[8] Platinum-based chemotherapy
[9] Median of overall survival
[10] Amplification
[11] Ancestral genetics
[12] Epidermal growth factor receptor

تنظیم فاکتورهای رونویسی برای بیان ژن می‌گردد [۱۱]. جهش‌های خود به خودی این ژن منجر به القای رشد بی رویه، بقا و پیام‌های ضد آپوپتوز می‌گردد. به بیان دیگر فعال شدن این ژن‌ها منجر به تزاید سلولی، چسبندگی و تهاجم سلولی می‌گردد [۱۲]. در حال حاضر در مورد تمامی سرطان‌های ریه از نوع غیر سلول کوچک و غیر سنگفرشی توصیه به بررسی جهش‌های ژن گیرنده رشد اپتلیالی می‌گردد [۱۳]. بلوک این مسیر (بلوک محل اتصال لیگاندهای خارج سلولی و یا مهار فعالیت داخل سلولی تیروزین کینازها) باعث مرگ سلول تومورال، مهار رشد تومور و بهبود شرایط بیمار می‌گردد [۱۴و۱۵]. اغلب داروهایی که این تغییرات مولکولی را هدف قرار می‌دهند عملکرد این انکوژن‌ها خصوصا پروتیین‌هایی با عملکرد کیناز[1] را مسدود می‌نمایند [۱۶]. در این گفتار سعی شده است ضمن بررسی خصوصیات زیستی عامل رشد گیرنده اپیتلیالی، روش‌های تشخیصی جدید از جمله استفاده از DNA درگردش تومور در تشخیص جهش این گیرنده و تعیین پیش‌آگهی بیماری بررسی گردد.

خصوصیات زیستی گیرنده‌ی عامل رشد اپیتلیالی:

گیرنده عامل رشد اپیتلیالی که به عنوان گیرنده شماره یک رشد اپتلیالی انسانی[2] نیز شناخته می‌شود، یکی از چهار عضو خانواده‌ای از گیرنده‌های تیروزین کینازی موسوم به خانواده ErbB و یک گلیکوپروتیین با وزن ۱۷۰ کیلو دالتون می‌باشد. ژن گیرنده عامل رشد اپیتلیالی بر روی کروموزوم ۷ قرار دارد. کشف عامل رشد اپیتلیالی و گیرنده آن برای کاشف خود Stanley Cohen جایزه نوبل را در پی داشت. در بسیاری از سلول‌ها، جهش عامل رشد گیرنده اپیتلیالی یا فعال شدن آن می‌تواند منجر به ایجاد سرطان گردد. این مولکول دارای یک دنباله یا حوزه[3] خارج سلولی دارای جایگاه اتصال به لیگاند و همچنین یک دنباله یا حوزه داخل سلولی از جنس تیروزین کیناز است که به وسیله یک ناحیه میان غشایی[4] از یکدیگر جدا می‌شوند. هنگامی که یک لیگاند درون‌زا[5] مانند عامل رشد اپیتلیالی[6] و عامل رشد تغییر شکل دهنده آلفا[7] و ...، به سطح سلول برخورد می‌کند، به دنباله خارج سلولی گیرنده متصل و به داخل سلول هدایت می‌گردد. با دریافت پیام و اتصال فاکتور رشد به گیرنده، گیرنده ابتدا دیمریزه و سپس خودفسفریله[8] می‌گردد. خودفسفریلاسیون گیرنده منجر به فعال شدن انتقال دهنده‌های درون سلولی (شامل Ras) و به راه افتادن آبشار سرین/تریونین کینازی (شامل فعال شدن زنجیروار آبشارهایی مانند BRAF و MEK1 و در نهایت ERK1,2) و در نهایت تنظیم فاکتورهای رونویسی برای بیان ژن، سنتز DNA و تزاید سلولی می‌گردد [۱۷] (شکل ۱). فعالیت گیرنده‌ی عامل رشد اپیتلیالی می‌تواند با مکانیسم‌های مختلفی مانند جهش گیرنده‌ی عامل رشد اپیتلیالی، افزایش تعداد کپی‌های ژن[9] و یا بیان بیش از حد[10] پروتیین گیرنده‌ی عامل رشد اپیتلیالی از کنترل خارج گردد.

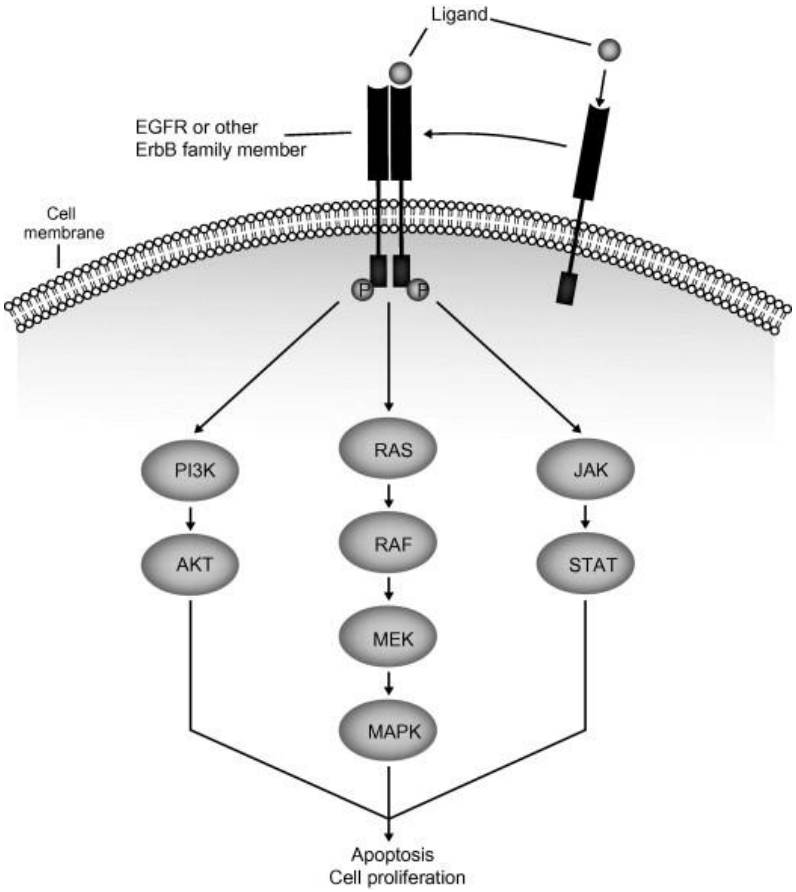
جهش گیرنده رشد اپتلیالی:

بطور خلاصه بر طبق تغییرات نوکلوتیدی، جهش‌های این ژن در سه گروه (کلاس) طبقه‌بندی می‌گردند:

گروه ۱ مشتمل بر حذف کوچک داخل چهارچوب[11] است که منجر به کاهش ۴-۶ اسید آمینه می‌شود (E746 to S752) و به وسیله اگزون ۱۹ کدگذاری می‌گردد. گروه ۲ جایگزینی تک نوکلوتیدی است که در اگزون ۱۸ یا ۲۱ رخ می‌دهد. در نهایت گروه ۳ جهش‌های داخل چهارچوب دوتا شدن[12] و/یا معکوس شدن[13] در اگزون ۲۰ است. بیشترین جهش‌های عامل رشد گیرنده‌ی اپیتلیالی در اگزون‌های ۱۸، ۱۹ و ۲۱ صورت می‌گیرد. جهش‌هایی که در اگزون ۱۸ و ۲۱ صورت می‌گیرند باعث تغییراتی در محل اتصال ATP [۱۵] می‌شوند. حال آن

[1] Kinase function
[2] Human epidermal growth factor receptor 1 (HER1)
[3] Domain
[4] Transmembrane

[5] Endogenous
[6] Epidermal growth factor
[7] Transforming growth factor-α
[8] Autophosphorylation
[9] Increased gene copy number
[10] Overexpression
[11] Short in-frame
[12] Duplications
[13] Insertions



شکل ۱ - مسیر انتقال پیام گیرنده رشد اپیتلیالی. به محض اتصال لیگاند، گیرنده رشد اپیتلیالی یا سایر اعضای خانواده ErbB، دی‌مریزه گشته که به نوبه خود منجر به فسفریلاسیون دنباله داخل سلولی تیروزین کینازی می‌گردد. این فرآیند منجر به انتقال پیام و راه افتادن زنجیره ای از آبشارهای متعدد داخل سلولی می‌گرددکه آپوپتوز و تزاید سلولی را تنظیم می‌نمایند.

Abbreviations:
EGFR: epidermal growth factor receptor; ErbB: erythroblastic leukemia viral oncogene homolog; PI3K: phosphoinositide-3-kinase; AKT: protein kinase B; RAS: retrovirus-ssociated DNA sequences; RAF: v-raf 1 murine leukemia viral oncogene homolog 1; MEK: mitogen-activated protein kinase kinase; MAPK: mitogen-activated protein kinase; JAK: Janus tyrosine kinase; STAT: signal transducers and activators of transcription.

که جهش اگزون ۱۹ باعث حذف[1] در ژن می‌گردد. شیوع جهش ژن عامل رشد گیرنده‌ی اپیتلیالی در مطالعات مختلف در ملیت‌ها و قومیت‌های مختلف بین ۱۰-۴۰٪ بوده است [۱۸]. بیشترین میزان جهش این گیرنده به صورت حذف در اگزون ۱۹ (مشتمل بر بیش از ۲۰ نوع حذف مختلف که شایع‌ترین آن‌ها حذف E746-A750 است) و یک جهش نقطه‌ای اختصاصی در اگزون ۲۱ (کدون ۸۵۸) می‌باشد، به قسمی که این دو جهش به تنهایی مسئول ۸۰-۹۰٪ جهش‌های یافت شده گیرنده رشد اپیتلیالی می‌باشند. این جهش‌ها که در محل اتصال ATP[2] رخ می‌دهند نسبت به مولکول‌های مهارکننده‌ی تیروزین کیناز بسیار حساس است [۱۶]. اهمیت محل جهش در گیرنده رشد اپتلیالی به دلیل تاثیر آن در پاسخ به درمان است به نحوی که بیماران دارای حذف در اگزون ۱۹ میزان پاسخ به درمان[3] بالاتری داشتند [۱۹]. جهش‌های گیرنده عامل رشد اپیتلیالی در زنان؛ غیر سیگاری‌ها و آسیایی‌ها بیشتر مشاهده می‌گردد [۱۱].

[1] Deletion

[2] ATP binding pocket of the kinase domain

[3] Response rate

بررسی جهش گیرنده رشد اپتلیالی:

آزمون جهش ژن گیرنده‌ی عامل رشد اپیتلیالی، عمدتا بر روی بافت‌های توموری صورت می‌گیرد ولی گاهی دستیابی به بافت توموری به ویژه در بیمارانی که کاندید جراحی نیستند، مشکل است. کافی نبودن نمونه یک محدودیت اساسی در بررسی جهش فوق می‌باشد بطوری که گاهی برای حدود ۵۰٪ بیماران نمونه کافی نسج توموری برای بررسی جهش ژن گیرنده رشد اپیتلیالی فراهم نیست [۲۰]. به همین دلیل تلاش‌هایی برای یافتن جایگزینی برای نسج توموری صورت گرفته است.

بیوپسی مایع[1]:

اصطلاح بیوپسی مایع مشتمل بر روش‌های بالقوه‌ای است که منجر به یافتن نشانگرهای زیستی[2] در افراد مبتلا به سرطان می‌گردد. این روش می‌تواند در تشخیص زودرس سرطان، تشخیص متاستاز، بررسی عود بیماری، ارزیابی پاسخ به درمان و مکانیسم‌های مقاومت به درمان مورد استفاده واقع گردد. در این روش از اجزای مختلفی مانند DNA درگردش تومور، اگزوم، RNA درگردش و یا میکروRNA[3] استفاده کرد [۲۱]. این اجزا می‌توانند از تمام مایعات بدن مانند خون، سرم، پلاسما، ادرار، بزاق، ترشحات پرده جنب و مایع آسیت استخراج شوند [۲۲]. در این میان مطالعات مختلف نشان می‌دهند که استفاده از DNA درگردش تومور بهترین منبع برای بررسی‌های جهش عامل رشد گیرنده‌ی اپیتلیالی بوده است [۲۳].

DNA درگردش تومور[4]:

DNA درگردش تومور یک DNA تک‌رشته‌ای یا دو رشته‌ای از DNA است که که در پلاسما یا سرم یافت می‌گردد. حضور DNA درگردش تومور در خون انسان اولین بار در سال ۱۹۴۸ نشان داده شد ولی سال‌ها طول کشید تا در خون افراد مبتلا به سرطان وجود آن اثبات و با موفقیت به عنوان یک نشانگر توموری[5] معرفی گردد. مطالعات اولیه حاکی از این بود که بسیاری از خصوصیات مولکولی سرطان مانند جهش‌های منفرد نوکلوتیدی و تغییرات متیلاسیون را می‌توان در DNA درگردش تومور یافت. میزان DNA درگردش تومور بین <۰/۱٪ تا <۳۰٪ کل DNA متغیر است و بستگی به حجم تومور، مرحله تومور، میزان turnover سلولی، میزان دسترسی تومور به گردش خون و همچنین عواملی که بر حجم خون موثرند، دارد. علاوه بر بررسی جهش‌های ژنتیکی از طریق DNA درگردش تومور، بررسی‌ها حاکی از آن است که سطح نسبی DNA درگردش تومور با حجم تومور و میزان پاسخ به درمان وابستگی دارد [۲۴]. سلول‌های تومورال قطعاتی از DNA را به داخل گردش خون وارد می‌کنند که همراه با DNA سلول‌های طبیعی در پلاسما قابل اندازه‌گیری هستند. باید دانست که در افراد سالم نیز قطعاتی از DNA وارد گردش خون می‌شود ولی توسط فاگوسیت‌ها از گردش خون پاک می‌شوند که این روند در خصوص سلول‌های توموری صادق نیست [۲۵]. ورود DNA به داخل جریان خون می‌تواند ناشی از ریخته شدن غیرفعال سلول‌های توموری اولیه به داخل جریان خون و یا یک گذار فعال از اپیتلیوم به مزانشیم باشد [۲۶]. در بیماران مبتلا به سرطان میزان DNA درگردش افزایش می‌یابد [۲۷].

DNA درگردش تومور، یطور بالقوه می‌تواند شمایی از کل ژنوم تومور را نشان دهد. این روش می‌تواند به آسانی در پایش تغییرات ژنومیک در بازه‌های زمانی مشخص بکار رود. مطالعات مختلف، سودمندی استفاده از DNA درگردش تومور را در اثبات تغییرات ژنتیکی شامل جهش انکوژن‌ها، ژن‌های مهار کننده‌ی تومور[6] و متیلاسیون ژن‌ها نشان داده‌اند. همچنین اثبات شده است که اندازه، موقعیت، متاستاز، وضعیت عروق خونی تومور با تغییراتی در سطح DNA درگردش تومور همراه است. نکته‌ی حایز اهمیت هماهنگی میان میزان موتاسیون در نمونه نسجی تومور و میزان موتاسیون نمونه خون بیمار از نظر DNA درگردش تومور می‌باشد [۲۸و۲۹]. در مجموع بیشترین محققین اجماع نظر دارند که بررسی جهش ژن گیرنده رشد اپیتلیالی به وسیله سنجش میزان آن در خون می‌تواند بطور بالقوه در ارزیابی و پیشگویی پاسخ به درمان و زمان بقای بیماران مورد استفاده قرار گیرد [۲۹و۳۰]. بیوپسی بافتی به صورت سنتی و قدیمی

[1] Liquid biopsy
[2] Biomarkers
[3] microRNAs
[4] Circulating-tumor DNA (ctDNA)
[5] Tumor marker
[6] Tumor suppressor genes

مشتمل بر یک روش تهاجمی برای به بدست آوردن بافت توموری است ولی همیشه امکان پذیر نیست. DNA درگردش تومور می‌تواند به صورت غیر تهاجمی و در زمان کوتاه، جهش‌های اختصاصی را در تومور تشخیص دهد. مطالعات مختلف حاکی از این است که در ۱۹٪ بیماران در مرحله پیشرفته، بررسی جهش عامل رشد گیرنده‌ی اپیتلیالی اصلا صورت نگرفته است که مهمترین دلایل عدم بررسی آن شامل نمونه نسجی ناکافی، زمان طولانی بررسی جهش بر روی بافت و در نهایت شرایط نامناسب فیزیکی بیمار بوده است [۳۱]. همچنین به دلیل ناهمگونی تومور، گاهی نیاز به بیوپسی‌های متعددی باشد.

کاربردهایی از DNA درگردش تومور

با استفاده از DNA درگردش تومور می‌توان در بازه‌های زمانی مشخص، پاسخ به درمان و یا عود بیماری را پایش کرد.

روش‌های سنجش کمی و کیفی DNA درگردش تومور

با استفاده از فن‌آوری‌های جدید حتی مقادیر کم DNA درگردش تومور نیز قابل شناسایی است. این روش‌ها شاملند بر:

- Real-time quantitative PCR (qPCR)
- Digital PCR (dPCR)
- Beads, emulsion amplification and magnetics (BEAMing)
- Next generation sequencing (NGS)

حساسیت این روش‌ها بین ۰/۰۱٪ تا ۱۵٪ متغیر است [۳۲]. در جدول شماره ۱ کاربرد، فواید و محدودیت‌های هر یک از روش‌های فوق خلاصه گشته است. نکته‌ای که بسیار حایز اهمیت است این موضوع است که چون در بررسی جهش گیرنده رشد اپتلیالی ثابت‌سازی با فرمالدیید (Formaldehyde fixation) وجود ندارد، میزان نتایج مثبت کاذب کاهش می‌یابد.

نقش DNA درگردش تومور در پیش آگهی بیماری:

بررسی DNA درگردش تومور در تعیین پیش‌آگهی سرطان ریه بسیار ارزشمند است. میزان سطوح بالاتر DNA درگردش تومور با پیش‌آگهی ضعیف‌تری همراه است، هرچند که مکانیسم آن کاملا مشخص نیست.

داروهای مهارکننده تیروزین کیناز:

بلوک عامل رشد گیرنده اپتلیالی با کشف داروهایی مانند Gefitinib و Erlotinib که در حقیقت مهار کننده‌ی تیروزین کینازی عامل گیرنده‌ی رشد اپیتلیالی می‌باشند، در بیمارانی که چنین جهش‌های سوماتیکی را دارا هستند، میسر گردیده است (شکل۱) [۱۳] که عمدتا با پاسخ‌های کلینیکی مناسب و طولانی شدن زمان عاری از عود[1] نیز همراه بوده است [۳۳]. از دیگر داروهای این دسته می‌توان به Afitinib که اخیرا توسط سازمان غذا و داروی ایالت متحده[2] به عنوان خط اول درمان در کانسر ریه تایید گشته است و به صورت برگشت ناپذیر با گیرنده رشد اپیتلیالی باند می‌شود، را نام برد.

ارزیابی مقاومت به درمان در بیمارانی که با داروهای مهار کننده‌ی تیروزین کینازی درمان شده‌اند.

تقریبا تمامی بیمارانی که در ابتدا پاسخ مناسب به درمان با داروهای مهار کننده‌ی تیروزین کینازی (مانند Erlotinib و یا Gefitinib) داشته‌اند، نسبت به این داروها مقاوم می‌شوند [۳۴]. یکی از دلایل شکست درمانی، جهش مهم دیگری موسوم به EGFR T790M در اگزون ۲۰ می‌باشد که با جایگزینی متیونین به جای تیونین همراه است و این جهش با کاهش تمایل گیرنده به دارو و افزایش چسبندگی آن به ATP همراه است [۳۵]. در حال حاضر توصیه می‌گردد که به جهت بررسی علت مقاومت بیوپسی مجدد صورت گیرد. پر واضح است که انجام بیوپسی بافتی در بسیاری از موارد به دلایلی همچون ناتوانی بیماری که در مرحله پیشرفته بیماری است، مقدور نیست. هم چنین ماهیت تهاجمی بیوپسی بافتی این عمل را ناایمن می‌نماید. از طرفی جهش‌های منجر به این مقاومت که با استفاده از یک بیوپسی از ضایعه تومورال اثبات می‌گردند ممکن است به دلیل ناهمگونی تومور نماینده تمام تومور نباشد [۳۶]. از DNA درگردش تومور در سال‌های اخیر در بررسی جهش T790M که مهمترین و شایع‌ترین مکانیسم مقاومت به داروهای مهار کننده‌ی تیروزین کینازی است، استفاده شده است و نشان داده شده است

[1] Progression free survival
[2] FDA

جدول ۱ – روش‌های رایج برای آنالیز DNA درگردش تومور و فواید و محدودیت‌های آن‌ها

اصول	روش	نوع تغییرات	فواید	محدودیت
PCR-based	Nested real-time PCR ARMS/Scorpion PCR PCR-SSCP Mutant allele-specific PCR Mass spectrometry Bi-PAP-A amplification	جهش‌های نقطه‌ای شناخته شده مانند as KRAS, EGFR, and PIK3CA	هزینه کم و استفاده آسان	حساسیت پایین، تنها بر روی genomic loci قابل بررسی است
Digital PCR	BEAMing Droplet-based digital PCR Microfluidic digital PCR	جهش‌های نقطه‌ای شناخته شده، بازسازی ژنوم	حساسیت بالا	تنها بر روی genomic loci قابل بررسی است
Targeted deep sequencing	SafeSeq TamSeq Ion-AmpliSeq™ CAPP-Seq OnTarget	بررسی SNVs, CNVsهای انتخابی، بازسازی مناطق هدف‌گذاری شده	حساسیت بالا ، نسبتا گران	کمتر با روش توالی تمام ژنوم قابل مقایسه است
Whole-genome sequencing	Digital karyotyping	بررسی پرکندگی ژنومی SNVs, CNV ، بازسازی	استفاده وسیع	گران

Abbreviations:
PCR: polymerase chain reaction; ARMS: amplified refractory mutation system; SSCP: single-strand conformation polymorphism; Bi-PAP-A: amplification bidirectional pyrophosphorolysis-activated polymerization allele-specific amplification; BEAMing: beads, emulsion, amplification, and magnetics; SafeSeq: safe sequencing system; TamSeq: tagged amplicon deep sequencing; CAPP-Seq: cancer personalized profiling by deep sequencing; PARE: personalized analysis of rearranged ends; KRAS: Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog; EGFR: epidermal growth factor receptor; PIK3CA: phosphatidylinositol-4,5-biphosphate 3-kinase, catalytic subunit alpha; SNV: single-nucleotide variants; CNVs: copy number variations; WES: whole-exome sequencing;

که در ۶۰٪ بیماران مقاوم این جهش یافت شده است [۳۷]. از آن جایی که درمان با داروی Osimertinib که مهار کننده‌ی برگشت‌ناپذیر تیروزین کینازی است فقط در بیمارانی کاربرد دارد که جهش T790M در آن‌ها به اثبات رسیده است، اثبات این جهش ضروری است و با استفاده از DNA درگردش تومور به آسانی میسر است [۳۸] مطالعات گوناگونی نشان داده‌اند که بین ۶۰-۹۰٪ هماهنگی بین جهش T790M در بافت و نمونه خون وجود دارد [۳۹].

نتیجه گیری:

در حال حاضر در دانش انکولوژی با گسترش بررسی‌های مولکولی، درمان‌های تخصصی رایج گشته است. در همین راستا، آزمون‌های تشخیصی مولکولی با هدف انتخاب بهترین و مناسب‌ترین درمان برای هر فرد انجام می‌گیرند. به همین دلیل استفاده ازDNA درگردش تومور به دلیل ماهیت غیر تهاجمی، سهولت انجام و پایش آن در بازه‌های زمانی مختلف بسیار مورد توجه است. از این روش می‌توان در تشخیص زودرس بیماری، ارزیابی پاسخ به درمان، تعیین پیش‌آگهی بیماری، بررسی عود بیماری و مکانیسم‌های مقاومت بهره برد.

منابع:

1) Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2015. CA: A Cancer Journal for Clinicians. 2015;65(1):5-29.
2) Mousavi SM, Gouya MM, Ramazani R, Davanlou M, Hajsadeghi N, Seddighi Z. Cancer incidence and mortality in Iran. Annals of Oncolology. 2009; 20(3):556-563.
3) Govindan R, Page N, Morgensztern D, et al. Changing epidemiology of small-cell lung cancer in the United States over the last 30 years: analysis of the surveillance, epidemiologic, and end results database. Journal of Clinical Oncology. 2006;24(28):4539-4544.

4) National Cancer Institute [Internet]. Non-small cell lung cancer treatment (PD: general information about non-small cell lung cancer (NSCLC). [cited 2011 Nov 7]. Available from: https://www.cancer.gov/cancertopics/pdq/treatment/non-small-cell-lung/healthprofessional
5) Edge SB, Compton CC. The American joint committee on cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. Annals of Surgical Oncology. 2010;17(6):1471-1474.
6) Miller KD, Siegel RL, Lin CC, et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2016. CA: A Cancer Journal for Clinicians. 2016;66:271–289.
7) Coate LE, Shepherd FA. Maintenance therapy in advanced non-small cell lung cancer. Journal of Thoracic Oncology. 2010;5(5):723-734.
8) Blackhall FH, Shepherd FA, Albain KS. Improving survival and reducing toxicity with chemotherapy in advanced non-small cell lung cancer: a realistic goal? Opens in new window. Treatments in Respiratory Medicine. 2005;4(2):71–84
9) Wijesinghe P, Bollig-Fischer A. Lung cancer genomics in the era of accelerated targeted drug development. In: Ahmad A, Gadgeel SM, editors. Lung cancer and personalized medicine: novel therapies and clinical management, advances in experimental medicine and biology. Switzerland: Springer International Publishing; 2016.
10) Karachaliou N, ClaraMayo-de C, Queralt C, et al. Association of EGFR L858R mutation in circulating free DNA with survival in the EURTAC trial. JAMA Oncology. 2015;1(2):149-157.
11) Roengvoraphoj M, Tsongalis GJ, Dragnev KH, Rigas JR. Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors as initial therapy for non-small cell lung cancer: Focus on epidermal growth factor receptor mutation testing and mutation-positive patients. Cancer Treatment Reviews 2013;39:839-850.
12) Prenzel N, Fischer OM, Streit S, Hart S, Ullrich A. The epidermal growth factor receptofamily as a central element for cellular signal transduction and diversification. Endocrine-Related Cancer. 2001;8(1):11–31.
13) Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, et al. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small- cell lung cancer to gefitinib. New England Journal of Medicine. 2004;350(21):2129–2139.
14) Shepherd FA, Rodrigues Pereira J, et al. Erlotinib in previously treated non-small-cell lung cancer. New England Journal of Medicine. 2005;353(2):123–132.
15) Hirsch FR, Jänne PA, Eberhardt WE, et al. Epidermal growth factor receptor inhibition in lung cancer: status 2012. Journal of Thoracic Oncology. 2013;8(3):373-384.
16) Sharma SV, Settleman J. Oncogene addiction: setting the stage for molecularly targeted cancer therapy. Genes and Development. 2007;21(24):3214–3231.
17) Roche. Roche's Tarceva receives European approval for first-line use in a genetically distinct type of lung cancer. http://www.roche.com/media/
18) Kasana BA, Dar WR, Aziz ShA, et al. Epidermal growth factor receptor mutation in adenocarcinoma lung in a North Indian population: Prevalence and relation with different clinical variables. Indian Journal of Medical and Paediatric Oncology. 2016;37(3):189–195.
19) Zhu JQ, Zhong WZ, Zhang GC, et al. Better survival with EGFR exon 19 than exon 21 mutations in gefitinib-treated non-small cell lung cancer patients is due to differential inhibition of downstream signals. Cancer Letters. 2008;265(2):307–17.
20) Costa DB, Kobayashi S, Tenen DG, Huberman MS. Pooled analysis of the prospective trials of gefitinib monotherapy for EGFR-mutant non-small cell lung cancers. Lung Cancer. 2007;58(1):95-103.
21) Cheng F, Su L, Qian C. Circulating tumor DNA: a promising biomarker in the liquid biopsy of cancer. Oncotarget. 2016;7(30):48832-48841.
22) Rolfo C, Castiglia M, Hong D, et al. Liquid biopsies in lung cancer: the new ambrosia of researchers. Biochimica et Biophysica Acta (BBA). 2014;1846:5349-546.
23) Punnoose EA, Atwal S, Liu W, et al. Evaluation of circulating tumor cells and circulating tumor DNA in non-small cell lung cancer: association with clinical endpoints in a phase II clinical trial of pertuzumab and erlotinib. Clinical Cancer Research. 2012;18:2391-2401.
24) Haber DA, Velculescu VE. Blood-based analyses of cancer: circulating tumor cells and circulating tumor DNA. Cancer Discovery. 2014;4:650-61.
25) Qin Z, Ljubimov VA, Zhou C, Tong Y, Liang J. Cell-free circulating tumor DNA in cancer. Chinese Journal of Cancer. 2016;7:35-36.
26) Cohen SJ, Punt CJ, Iannotti N, et al. Relationship of circulating tumor cells to tumor response, progression-free survival, and overall survival in patients with metastatic

colorectal cancer. Journal of clinical Oncology. 2008;26(19):3213-3221.
27) Gadgeel SM, Gandhi L, Riely GJ, et al. Safety and activity of alectinib against systemic disease and brain metastases in patients with crizotinib-resistant ALK-rearranged non-small-cell lung cancer (AF-002JG): results from the dose-finding portion of a phase 1/2 study. The Lancet Oncology. 2014;15:1119–1128.
28) Yung TK, Chan KC, Mok TS, Tong J, To KF, Lo YM. Single-molecule detection of epidermal growth factor receptor mutations in plasma by microfluidics digital PCR in non-small cell lung cancer patients. Clinical Cancer Research. 2009;15:2076–84.
29) Kwapisz D. The first liquid biopsy test approved. Is it a new era of mutation testing for non-small cell lung cancer? Annals of Translational Medicine. 2017;5(3):46.
30) Zhang Y, Xu Y, Wang M. Research advancement on EGFR mutation detection of cell-free DNA and tumor cell in peripheral blood of patients with non-small cell lung cancer. Chinese Journal of Cancer. 2016;19(11):766-772.
31) Reck M, Popat S, Reinmuth N, et al. Metastatic non-small-cell lung cancer (NSCLC): ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. Annals of Oncology. 2014;Suppl 3:iii27-39.
32) Normanno N, Denis MG, Thress KS, Ratcliffe M, Reck M. Guide to detecting epidermal growth factor receptor (EGFR) mutations in ctDNA of patients with advanced non-small-cell lung cancer. Oncotarget. 2017;8(7):12501–12516.
33) Zhou C, Wu YL, Chen G, et al. Erlotinib versus chemotherapy as first-line treatment for patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (OPTIMAL, CTONG-0802): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 study. The Lancet Oncology. 2011;12(8):735-742.
34) Thress KS, Brant R, Carr TH, et al. EGFR mutation detection in ctDNA from NSCLC patient plasma: A cross-platform comparison of leading technologies to support the clinical development of AZD9291. Lung Cancer. 2015;90(3):509-15.
35) Balak MN, Gong Y, Riely GJ, et al. Novel D761Y and common secondary T790M mutations in epidermal growth factor receptor-mutant lung adenocarcinomas with acquired resistance to kinase inhibitors. Clinical Cancer Research. 2006;12:6494–6501.
36) Fisher R, Pusztai L, Swanton C. Cancer heterogeneity: implications for targeted therapeutics. British Journal of Cancer. 2103;108(3):479-85.
37) Arcila ME, Oxnard GR, Nafa K, et al. Rebiopsy of lung cancer patients with acquired resistance to EGFR inhibitors and enhanced detection of the T790M mutation using a locked nucleic acid-based assay. Clinical Cancer Research. 2011;17(5):1169-1180.
38) FDA approves new pill to treat certain patients with non-small cell lung cancer. 2015. Available from: http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm472525.htm
39) Zhang H, Liu D, Li S, et al. Comparison of EGFR signaling pathway somatic DNA mutations derived from peripheral blood and corresponding tumor tissue of patients with advanced non-small-cell lung cancer using liquidchip technology. The Journal of Molecular Diagnostics. 2013;15(6):819-26.

Nafas, Vol. 4, No. 1, Spring 2017, Pages: 1-9

Review Article

The Application of Circulating Tumor DNA for Analysis of Gene Mutations of the Epidermal Growth Factor Receptor in Lung Cancer

Hanifeh Mirtavoos-Mahyari [1*], Mohammad Hossein Modarressi[2], Adnan Khosravi[3], Zahra Esfahani-Monfared[4], Sharareh Seifi[4]

1) Lung Transplant Research Center, National Research Institute of Tuberculosis and Lung Diseases (NRITLD), Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
2) Department of Molecular Medical, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran. Iran
3) Tobacco Prevention and Control Research Center, National Research Institute of Tuberculosis and Lung Diseases (NRITLD), Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
4) Chronic Respiratory Diseases Research Center, National Research Institute of Tuberculosis and Lung Diseases (NRITLD), Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

Abstract:
The most important diagnostic and therapeutic target in non-small cell lung cancer (NSCLC) is epidermal growth factor receptor (EGFR). The mutations of this receptor can predict responsiveness to personalized (or individualized) and targeted therapy. The increasing discoveries on biomarkers has resulted in more requirement to tumor tissues; however, most of times the sample harvesting is not easily available, without major discomfort for the patients. Therefore, blood sampling (also called "liquid biopsy") is an alternative method. The blood plasma of the cancer patients contains circulating tumor DNA (ctDNA) which carries information on tumor mutations and burden. This low-cost method could facilitate analysis of tumor characteristics for personalized cancer genomics. This review presents the application of ctDNA for diagnosis and prognosis of lung cancers, and discusses its predictive parameters during the therapeutic course. Furthermore, it gives an outlook on future developments.
Keywords: Circulating tumor DNA, Non-small cell lung cancer, Epidermal growth factor receptor, Mutation.

[*] **Corresponding Author:**
Hanifeh Mirtavoos-Mahyari. Department of Molecular Medical, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran. Iran. Email: hanifehmirmah@yahoo.com