مجتمع تخصصی آزمایشگاهی

فروردین

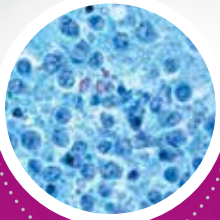
آزمایشگاه پاتوبیولوژی فروردین

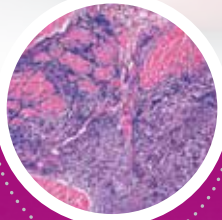
دارنده اولین لوح کیفیت استان تهران

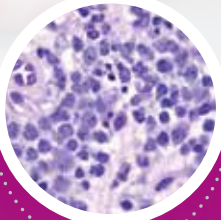
آزمایشگاه پاتوبیولوژی فروردین نوین

Liquid Biopsy of Cancers

Primary Retroperitoneal Diffuse large B Cell lymphoma







• پروفسور مسلم بهادری

استاد ممتاز پاتولوژی دانشگاه علوم پزشکی تهران

• دکتر فریناز راشد مرندی

متخصص پاتولوژی کلینیکال-آناتومیکال

• دکتر سیما همایونمهر

متخصص پاتولوژی کلینیکال-آناتومیکال

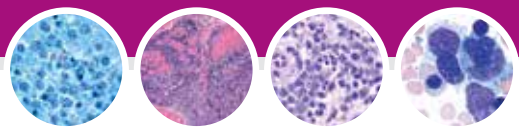
• دکتر بینش امامی

متخصص پاتولوژی کلینیکال-آناتومیکال

تقسیم بندی لنفوم منتشر سلول بزرگ B (DLBCL) براساس منشاء سلولی و اهمیت آن

دکتر سیما همایون مهر – دکتر فریناز راشد مرندی

لنفوم منتشر سلول بزرگ B (DLBCL) شایع‌ترین نوع لنفوم بالغین است که در گروه لنفوم‌های سلول B بالغ قرار دارد و ۳۰ تا ۴۰ درصد لنفوم غیرهوجکین را شامل می‌شود. بیماری اغلب با لنفادنوپتی علامت‌دار با رشد سریع و تهاجمی تظاهر می‌یابد در ۳۰ درصد موارد شروع تظاهرات بیماری خارج از غدد لنفاوی می‌باشد. DLBCL بسیار هتروژن است و زیرگروه‌های مرفولوژیک و کلینیکوپاتولوژیک متعددی دارد، با توجه به اینکه هر کدام می‌تواند پیش آگهی و درمان متفاوتی را ارائه دهد لذا تشخیص دقیق حائز اهمیت است. تقسیم بندی‌های DLBCL نه تنها از نظر پیش آگهی بلکه در درمان نیز در جهت درمان‌های ویژه یا شخصی‌شده (Personalized therapy) اهمیت بسزایی دارد. یکی از طبقه بندی‌های DLBCL تقسیم‌بندی بر اساس منشا سلول بدخیم است که اولین بار توسط دکتر علیزاده تحقیق و مطرح گردید و در طبقه‌بندی WHO این تقسیم‌بندی در زیرگروه "DLBCL, NOS" آورده شده است. نتایج تحقیق دکتر علیزاده و همکارانش در سال ۲۰۰۰ با استفاده از پروفایلینگ بیان ژن نشان داد: منشا سلول‌های لنفوم منتشر سلول بزرگ B (DLBCL) از سلول‌های B مرکز ژرمینال (Germinal-center B-cell-like ،GCB subtype) و یا سلول B فعال (Activated B-cell-like ،ABC subtype) است و بر این اساس DLBCL به دو زیرگروه اصلی تقسیم می‌شود. لازم بذکر است حدود ۱۰ تا ۱۵ درصد موارد در این دو گروه قرارنمی گیرند و تحت عنوان تقسیم‌بندی نشده (Unclassified) شناخته شده‌اند. بین دو زیرگروه GCB و ABC از لحاظ بیولوژی تفاوت اساسی وجود دارد به‌طوری‌که ازنظر بیان ژنی، ابنرمالیتی‌های کروموزومی و پیش آگهی و بقا بدنبال رژیم شیمی‌درمانی R-CHOP متفاوتند. مطالعات نشان داده است زیرگروه ABC بطور قابل توجهی پیامدهای بدی بدنبال درمان استاندارد شیمی درمانی خواهند داشت. همین‌طور شیوع این دو نیز بسته به محل جغرافیایی و سن متوسط متفاوت است. در زیر گروه GCD دو تغییر مولکولی رخ می دهد: جابجایی در (۱۴:۱۸) که BCL2 را درگیر می‌کند و آمپلیفیکاسیون C-REL. زیرگروه ABC از سلول‌های B بعد از مرکز ژرمینال منشا می گیرد که در بررسی مولکولی آمپلیفیکاسیون انکوژن SPIB، تریزومی کروموزوم ۳ و فعال شدن فاکتور هسته ای آنتی آپوپتوز را نشان می‌دهند. الگوریتم‌های ایمینوهیستوشیمی



متعددی برای شناسایی این‌ها وجود دارد و مطالعات نشان داده است تطابق بین روش ایمینوهیستوشیمی و پروفایلینگ بیان ژن ۸۶درصد می‌باشد. البته الگوریتم‌های ایمینوهیستوشیمی، DLBCL-NOS را به دو گروه GCB و Non-GCB تقسیم می‌کنند و موارد تقسیم‌بندی نشده (Unclassified) تشخیص داده نمی‌شوند ولی به‌دلیل هزینه بالای پروفایلینگ ژنی و در دسترس نبودن، ایمینوهیستوشیمی به‌عنوان روش تشخیصی آلترناتیو به‌طور گسترده‌ای استفاده می‌شود. بدین منظور اغلب از دو الگوریتم هانس (Hans) و یا کویی (Choi) استفاده می‌شود. WHO در طبقه بندی تومورهای بافت لنفاوی (۲۰۱۷) ضمن اشاره به الگوریتم هانس، تاکید نموده در صورت در دسترس نبودن تکنولوژی بیان ژن از ایمینوهیستوشیمی استفاده شود. مارکرهای الگوریتم هانس شامل: CD10، BCL6 و MUM-1 می باشند. (تصویر ۱)

علاوه بر تقسیم‌بندی پاتولوژیک DL CL، شاخص پروگنوستیک بین‌المللی (International Prognostic Index ,IPI) پیامد بالینی بیماری را پیش بینی می‌کند.

درجه بندی این شاخص (IPI) بر اساس سن، مقادیر LDH، وضعیت و حال عمومی بیمار، مرحله بیماری و درگیری خارج از غدد لنفاوی می‌باشد. با وجودی‌که ارزیابی ایمینوهیستوشیمی به‌عنوان شاخص پروگنوستیک مستقل از IPI استفاده می‌شود ولی مشخص گردیده است IPI در زیرگروه Non-GCB به‌طور بارزی بالاتر از GCB است. بنابراین همانطور که قبلا نیز اشاره شد به‌دلیل تفاوت این دو زیر گروه از نظر بیولوژی و پاسخ به شیمی درمانی تشخیص زیرگروه GCB و ABC یک فاکتور مهم پیش‌بینی‌کننده و همین‌طور تعیین کننده نوع درمان در DLBCL, NOS می‌باشد.

1) Lučka Boltežar, Veronika Kloboves Prevodnik, Maja Pohar Perme, et al. Comparison of the algorithms classifying the ABC and GCB subtypes in diffuse large B-cell lymphoma. Oncol Lett. 2018; 15(5): 6903–6912.

2) Min-Chul Cho, Yousun Chung, Seongsoo Jan, et al. Prognostic impact of germinal center B-cell-like and non-germinal center B-cell-like subtypes of bone marrow involvement in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP Medicine (Baltimore). 2018 Nov; 97(45).

3) Nowakowski GS, Czuczman MS. ABC, GCB, and Double-Hit Diffuse Large B-Cell Lymphoma: Does Subtype Make a Difference in Therapy Selection?. Am Soc Clin Oncol Educ Book. 2015:e449-57.

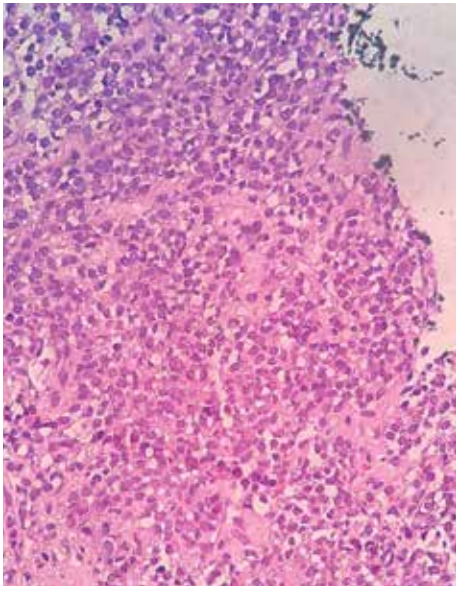
Primary retroperitoneal diffuse large B cell lymphoam

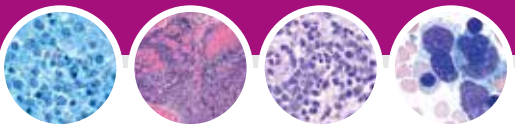
Dr S.Homayounmehr MD (AP/CP)

Case report:

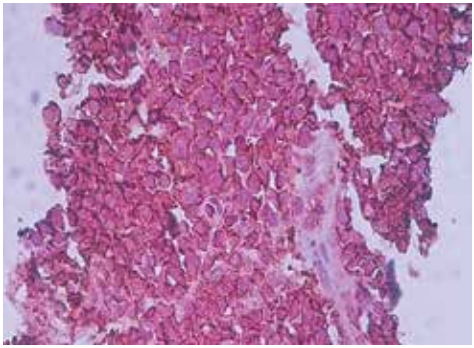
The patient was a 45-year-old female who presented with the chief complaint of low back pain, abdominal pain, weight loss and malaise. Symptoms had begun 3 months before admittance and had been aggravated for half a month. The CT examination revealed a mass in her retroperitoneal region. Systemic superficial lymph nodes were not enlarged and she had no significant medical history. Laboratory work-up yielded a high sedimentation(ESR:59), normal limited LDH and without other abnormalities.

Ultrasound-guided core needle biopsy of retroperitoneal mass was performed and sample was sent to our pathology laboratory. Three fragments of gray-white cord like tissue; each with a length of 1.6 cm was extracted. The sections showed sheet of medium cells without obvious differentiation, infiltrating fibrotic stroma. The neoplastic cells exhibited high N:C ratio, with scant cytoplasm. The markers done were LCA, PanCK, CD99, Vimentin, WT1, Myogenin in first step. The neoplastic cells were diffuse strong positive for LCA and focally positive for Vimentin and negative for the rest of the epithelium and mesenchyme antibodies, suggesting that the tumor was lymphoid-derived malignant tumor. Retroperitoneal lymphoma was considered, and markers of lymphoid cells were done in second step. The neoplastic lymphoid cells were positive for CD20, CD79a and negative for CD3 and cyclin D1. Ki67 (proliferative index) was about 80%. Histologic and IHC finding was compatible with diffuse large B-cell lymphoma.

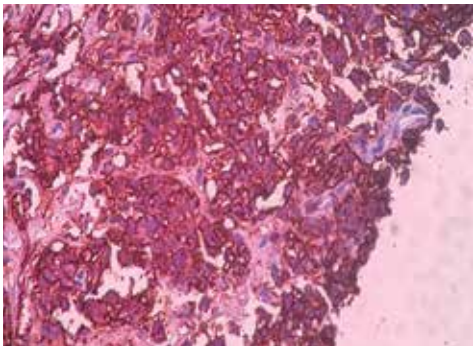




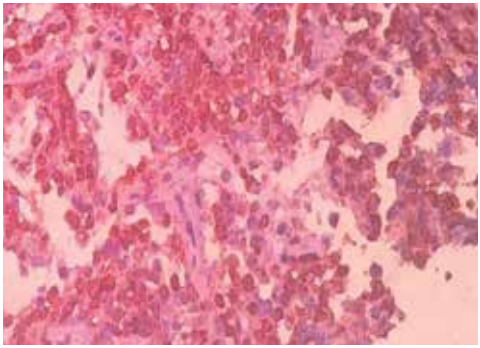
LCA:



CD20

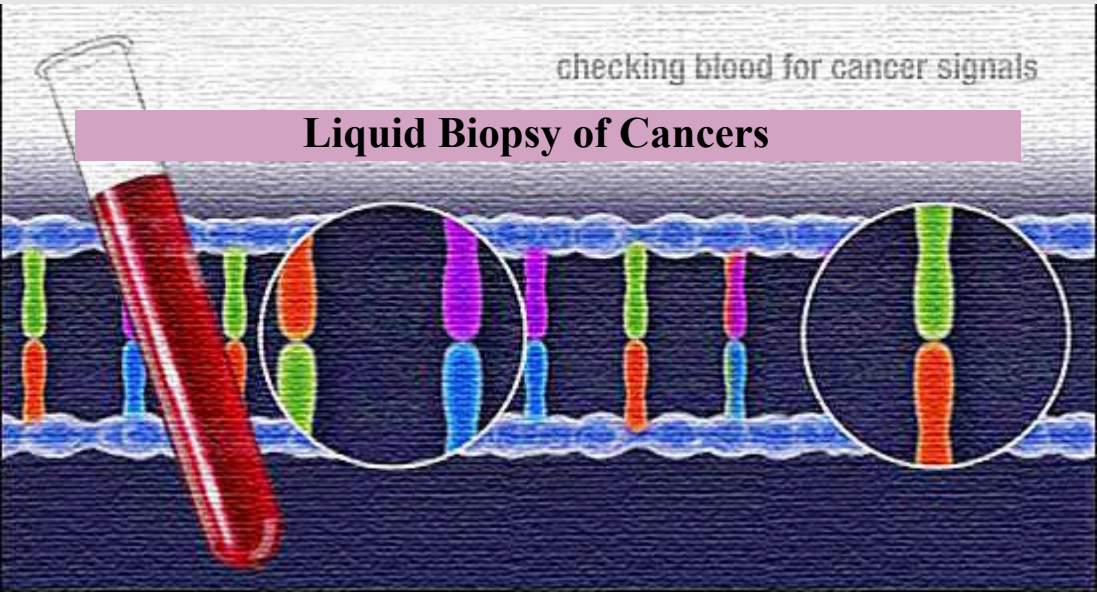


Ki67



Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) is the most prevalent subtype of non-Hodgkin lymphomas, NOS type constitutes 25-35% of adult non-Hodgkin lymphomas in developed countries, and a higher percentage in developing countries. DLBCL is an aggressive lymphoma and encompasses a clinically and biologically heterogeneous group of disorders. Most patients present with rapidly enlarging lymph nodes or tumor masses in extranodal sites.

About 30% of cases present in extranodal sites, and 71% have extranodal involvement during the course of the disease. Common primary extranodal sites include the gastrointestinal tract (especially the stomach) and Waldeyer's ring but practically any organ can be involved. Early diagnosis and commencement of chemotherapy is vital to ensure good prognosis, especially in aggressive tumours with limited systemic involvement. Primarily arising in the retroperitoneal region has been rarely reported. In this article, we report the rare case of an adult female suffering with primary DLBCL located in the region.



Liquid Biopsy of Cancers

دکتر مسلم بهادری – دکتر بینش امامی

در بیش از یک دهه‌ی گذشته ایده تشخیص دقیق در پزشکی به خصوص در انکولوژی به طور گسترده نوسازی شده است، پیشرفت فوق‌العاده در تمام اجزا قابل اندازه‌گیری در پیش اگهی و عاقبت بیماری شده است. بیوپسی در محیط مایع یک روش انقلابی است که دریچه‌ای به نتایج غیرمنتظره باز نموده است که بر پایه ردیابی، ایزولاسیون سلول‌های تومورال، DNA های در گردش مربوط به سلول‌های تومورال و اگزوزوم‌ها که به عنوان یک منبع ژنومیک و پروتئومیک از سلول‌های تومورال بیماران مبتلا استوار می‌باشد. خیلی از اشکالات تکنیکی ما رفع گردیده است و به علت دستیابی به تکنیک‌های جدید آنالیز مانند Next Generation Sequencing (NGS) اجازه فعالیت گسترده، در این زمینه را به ما می‌دهد. به طور ابتدایی این تکنیک برای تشخیص زودرس سرطان، تعیین پیش آگهی و به طور مهم‌تر برای پیشگویی پاسخ به درمان یا مقاومت به درمان استفاده می‌شود. در موارد مخصوص مقاومت ثانویه به درمان را نشان داده و در تشخیص زودرس پیشرفت بیماری بسیار کمک کننده است. هنوز برنامه کاربردی آن از واقعیت بسیار دور می‌باشد ولی تحقیقات در جریان منجر به ایجاد عصر جدیدی در انکولوژی خواهد گردید. این مقاله تکنیک‌ها و کاربردهای بیوپسی در محیط مایع در سرطان را بررسی خواهد نمود. در سال‌های اخیر نتایج پروژه ژنوم انسانی و فارماکوژنومیک بر چارچوب قبلی که در انکولوژی مبنی بر (One Size Fits all) بوده است، غلبه نمود. (مناسب برای همه) و مقادیر بسیار زیادی از اطلاعات مولکولی را تولید نمود که ایده Precision Medicine یا الگوی Tailoring Therapies را که هدف آن درمان متناسب با الگوی اختصاصی تومور برای هر فرد است را ارائه نمود. بیوپسی‌های سنتی، اعمال تهاجمی که منجر به عوارض بالقوه و گاه غیر قابل پیش‌بینی می‌شود و در مواردی که تومور غیر قابل دسترس بوده یا از لحاظ تکنیکی وضعیت بیمار وخیم باشد قابل انجام نیست به علاوه پروفایل ژنومیک در بیوپسی‌های بافتی یک تصویر در یک نقطه از زمان می‌باشد و شاید هتروژنیسیته را در ساب کلون‌های متعدد

تومورال نشان دهد. در حقیقت مطالعات زیادی نشان می‌دهد که در طول زمان منظره ژنومیک تومور یا متاستاز به‌طور دینامیک در حال تغییرات و با فشار درمانی اختصاصی می‌توان سرکوب یا پیشرفت کدون‌های سلولی را مشاهده نمود.

این محدودیت به خصوص در حضور مقاومت اکتسابی به درمان یا پایش رشد بیماری طی پیگیری بعدی قابل لمس می باشد.

به این دلایل در سال‌های اخیر یک جایگاه جدید در تحقیقات انکولوژی که متمرکز بر اجزا مشتق شده از تومور که در حال گردش در مایعات بدن می‌باشد، ایجاد شده است. سلول‌های آپوپتوتیک و نکروتیک و نیز سلول‌ها و اجزا تومورال در گردش خون شامل ۳ جز اصلی می‌باشند:

1. Circulating Tumor Cells (CTCs)
2. Circulating Tumor DNA (ctDNA)
3. Exosomes (EXOs)

۱. تومورهای اولیه و متاستاز می‌توانند سلول‌هایشان را آزاد کنند و به داخل جریان خون راه یابند که به آن CTCs می‌گویند.

۲. سلول‌های آپوپتوتیک و نکروتیک اجزایی از cfDNA هستند که چون وابسته به تومور هستند و ctDNA نامیده می‌شوند.

۳. اگزوزوم‌ها که ساختارهای ساب سلولار غشا کپسول‌دار هستند که حاوی پروتئین و اسیدنوکلئیک آزاد شده از سلول‌های تومورال می‌باشند (EXOs)

ایزولاسیون این مشتقات و اجزا تومورال در خون محیطی و ارزیابی ژنومیک و پروتئومیک یک راه جدید را برای ما باز کرده که به آن Liquid Biopsy می‌گویند.

محدودیت اولیه به علت بسیار ناچیز بودن اسیدنوکلئیک است، به همان اندازه که تشخیص بین اسیدنوکئیک سلول نرمال و سلول تومورال را مشکل می‌سازد، که به وسیله افزایش حساسیت تکنیک‌های NGS که در حال حاضر با دقت و صحت بالاتر در دسترس می‌باشد می‌تواند انحراف‌های ژنتیک و اپی ژنتیک را نمایان سازد. بیوپسی مایع در حال حاضر با وجود بالا بودن درجه اختصاصیت، اجازه جمع‌آوری اطلاعات بسیار زیادی را می‌دهد و این اطلاعات قابل بازسازی در یک نمونه‌گیری غیرتهاجمی یا یک نمونه خون محیطی می‌باشد. در حال حاضر بیوپسی مایع یک روش روتین در کلینیک نمی‌باشد، اما به طور بالقوه درخواست‌های آن به طور سریع و در حال رشد است. از پروفایل ژنومیک تشخیصی تا پایش رادیکال در نتایج جراحی بعد از سرطان در ارزیابی پاسخ یا مقاومت به درمان سیستمیک برای تشخیص Minimal Residual Disease (MRD) مورد استفاده قرار می‌گیرد.

1. Circulating Tumor Cells (CTCs)

از سال ۱۸۶۹ که اولین توصیف از تومورسل در خون محیطی انجام شده در طی چند سال گذشته پیشرفت‌های بزرگی در ایزولاسیون CTCs در خون به انجام رسیده است. این سلول‌های تومورال در گردش که هم می‌تواند تومورهای اولیه و هم از تومورهای ثانویه منشا بگیرد می‌تواند سبب متاستاز دوردست شود. میزان این سلول‌ها بسیار نادر است و از کمترین میزان یک سلول تومورال به ازای 10^{6}-10^{7} لکوسیت باشد. (که در مراحل اولیه تومور حتی از این میزان نیز می‌تواند کمتر باشد). در ارزیابی اولیه این سلول‌های غیرلکوسیت هسته‌دار با منشا اپی تلیال شاید به شکل موفولوژیک سلول اصلی نباشند و بر اساس نوع سرطان و مرحله آن شکل آن نیز می‌تواند متفاوت باشد. CTCها می‌تواند به همراه کلاسترهای سلول‌های

تومورال با فیبروبلاست، لکوسیت، سلول‌های اندوتلیال یا پلاکت همراه باشند که تمایل بالایی جهت سرطانی شدن در محل‌های دوردست نسبت به Single CTC داشته باشد، که این روند را باید مدیون محافظت سیستم ایمنی و استرس‌های اکسیداتیو دانست و این کلاسترها عمر بیشتری نموده و مشکلات بیشتری ایجاد می‌نمایند.

به هر حال CTC ها یک ایده‌آل جهت تشخیص مولکولار سرطان و همچنین درمان بر اساس خصوصیت آن‌ها فراهم می‌نمایند. تشخیص و ایزولاسیون آن‌ها بر اساس تفاوت‌های فیزیکی، پروتئینی، آنتی‌ژنیک و ژنومیک از سایر سلول‌ها می‌باشد. تفاوت عمده بر اساس سایز بزرگتر آن‌ها ۲۰-۳۰ میکرون، قابلیت انعطاف مکانیکی و خصوصیات حرکتی آن‌ها در مقابل باقی سلول‌های خونی است. (جدول ۱)

Technology	Methods	Platforms
Physical properties	Size, density, others	Physical filter Density gradient Dielectric Photoacoustic Microfluidic
High-throughput imaging	Scanning of cells on slide	Imaging cytometry
Leukocyte depletion	Negative depletion of leukocytes	Batch cell lysis Microfluidic CTC-iChip Immunomagnetic separation
Antibody capture	Selection for tumor-specific markers	CellSearch Magsweeper Microfluidic CTC-Chip
Functional characteristics	Protein secretion, cell migration	Epispot assay Invasion assay
Nanotechnology	Nanomaterials able to increase interactions with CTCs and specific antibodies, and to enable their electrical conductivity	Immunomagnetic nanobeads, nanostructures substrates in microchip

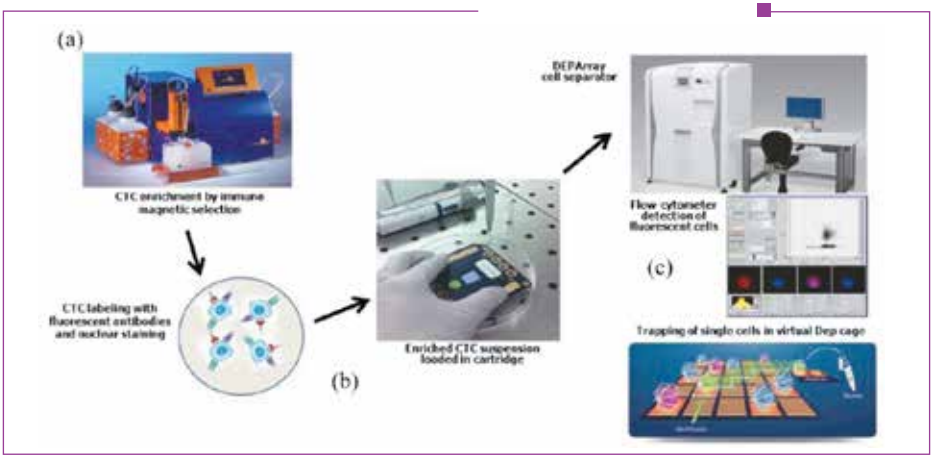
از لحاظ آنتی ژنیسیته و وجود آنتی بادی اختصاصی توافق کاملی وجود ندارد.

به دلیل هتروژنسیته CTC ها (Cancer stem cell phonotype ,EMT, Epithelial) به طور

Epithelial Cell Adhesion Molecule

سلول‌های تومورال در گردش EPCAM که نشانگر یک بیومارکر و نشان‌دهنده ریسک فاکتور عود می‌باشد را ارائه می‌نمایند. گرچه سایر سایتوکراتین‌ها شامل CD18,CK8,CK19 ونیز مارکرهای اختصاصی همچون TTF1,PSA,HER2 جهت شناسایی و ایزولاسیون CTC ها نیز مفید می‌باشند. از طرف دیگر مولکول EPCAM در طی فرآیند Epithelial to Mesenchymal Transition (EMT) مهاجرت و خروج از رگ را تسهیل میکند و در تومورهای پستان، کولورکتال، پروستات، تخمدان و تومور غیر سلول کوچک ریه(NSCLC) با پیش آگهی بد همراه می‌باشد. در ضمن CTC ها یک فنوتیپ اکتسابی شبیه سلول‌های بنیادین پیدا کرده و مارکرهای Aldehyde Dehydrogenase (CD133, CD44, ALDH) را بروز می‌دهند.

همزمان باید از متدهای مختلف جهت شناسایی آن اقدام نمود. دستگاه Cell search بر اساس تکنیک Antibody-based immunomagnetic technique و Image cytometry می‌باشد که FDA جهت متاستاز پستان، پروستات و سرطان کولورکتال تائید کرده است و دستگاه دیگر DEPArray system می‌باشد و بر اساس هر دو تکنیک (Detection and Recovery) بر اساس مارکرهای سیتوپلاسمیک و سطحی و نیز سایر خصوصیات Dielectrophoreticmoviementation می‌باشد.(شکل ۱وجدول ۲)



Phase	Aim	Tumor site
Prognosis	Stratification of patients	Breast
		Prostate
		NSCLC
		Colorectal
Diagnosis	Substitute to solid biopsy	Breast
		Prostate
		NSCLC
	Early diagnosis	NSCLC
Therapeutics	Prediction of response or resistance to treatment	Breast
		Prostate
		Melanoma
		NSCLC
		Colorectal
	Response to immunotherapy	NSCLC

جدول ۲: پیامدهای بالینی CTCs

تشخیص اولیه سلول‌های CTC کمک شایان به پیش آگهی می‌کند، یعنی تعداد سلول‌های CTC در ۷٫۵ سی‌سی خون با پروگنوز همخوانی دارد. به عنوان مثال در متاستاز سرطان پستان با تعداد سلول بالاتر در ۷٫۵ خون با پیش آگهی بدتر و پیشرفت مرحله بالاتر بیماری همراه خواهد بود. در سرطان پستان اگر تعداد CTC ها از ۵ سلول در ۷٫۵ سی‌سی خون بیشتر باشد متاستاز بیشتر، پروگنوز بدتر و محل های متاستاز جدیدتر و بیشتر و در زمان زودتر متاستاز ایجاد خواهد شد. نتایج مشابه در مورد پروستات نیز مشاهده گردیده است یعنی ۱۱٫۵ ماه بقا در مقابل ۲۱٫۷ ماه بقا در هنگامیکه بیش از ۵، CTC در ۷٫۵ سی‌سی خون مشاهده شود. این شواهد جهت NSCLC، سرطان کولورکتال، معده، پانکراس، تومورهای سر و گردن، نوروآندوکرین و سارکوما نیز تایید گردید.

مسائل و مشکلات اصلی در تعیین CTCs:

۱. اختصاصی بودن

۲. حساس بودن(همزمان) با اختصاصی بودن

۳. نادر و کمیاب بودن این سلول در گردش خون

۴. عدم وجود یک مارکر تشخیصی قابل اعتماد

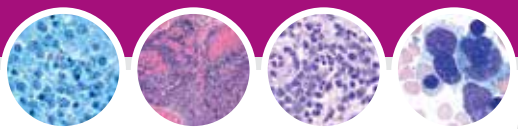
۵. عدم توانایی تکنیک های حاضر از نظر مولکولار و ژنومیک جهت تشخیص CTC

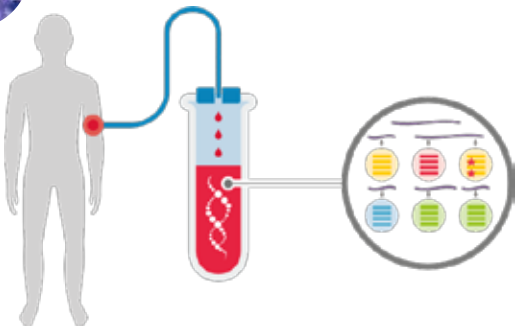
البته نانوتکنولوژی در این بین می تواند باعث افزایش کارایی و اختصاصی بودن یافت CTC ها شود. یافتن CTCs همچنین می تواند جایگزین بیوپسی بافتی شود، در زمان‌هایی که تومور غیر قابل مشاهده یا نمونه‌گیری موفقیت آمیز نباشد. در موارد پیشرفته سرطان نه تنها نشان دهنده ی حضور و تثبیت و پیشرفت بیماری است بلکه همزمان با بیماری نشان دهنده ی افزایش یا کاهش حجم تومور بوده است و در مواردی نیز نشان دهنده ی و پیشگویی کننده ی عاقبت بیماری بوده و شمارش تعداد سلول‌های CTC در طی درمان پیشگویی کننده، پاسخ به درمان حتی قبل از بروز شواهد رادیولوژیک باشد.

یکی دیگر از اهداف آن غربالگری سرطان‌ها می‌باشد ولی تشخیص اولیه هنوز یک معضل می‌باشد مثلا در سرطان ریه تمام افرادی که CTC مثبت داشته‌اند ظرف مدت ۴ سال دچار سرطان ریه شدند، یعنی CTC جهت افتراق ضایعه خوش‌خیم از بدخیم در CT و در ندول‌های ریوی بسیار موثر عمل می‌کند. در واقع اگر کسی ندول ریوی دارد و با این روش می‌توان تشخیص داد که این ضایعه خوش‌خیم یا بدخیم است (قبل از CT-guided fine needle aspiration) و با حساسیت ۷۰٪ و اختصاصی بودن و 100%. PPV (Positive Predictive Value).

وقتی که CTC جداسازی شد باید با ژنومیک و پروتئومیک پروفایل بررسی شود تا مولکول‌های هدف درمان دارویی را در روی آن تعیین نمود. میزان DNA یک سلول حدود ۷-۲ پیکوگرم می‌باشد که این میزان ناچیز اسیدنوکلئیک را با افزایش لکوسیت به وسیله‌ی Whole Genome Amplification (WGA) به میزان کافی جهت آنالیز مولکولار آماده می سازد. بروز همزمان ER RCL2، HER2، Ki67 روی سلول‌های CTC یک فاکتور مناسب جهت نشان دادن پاسخ به درمان هورمونی در سرطان پستان می باشد. در سرطان پروستات بروز همزمان PSA، PSMA جایگزین Androgen Receptor Signaling شده است. در نهایت بیولوژی CTC بسیار هتروژن می‌باشد و از لحاظ ژنتیک Proteomic and Metabolic Level و Transcription این تفاوت‌های هتروژنیسیته در سلول‌های CTC یک هدف مطلوب است جهت سطوح پروگنوستیک برای تشخیص عود یا جهت درمان اختصاصی برای هر فرد. (Personalize the therapy)

2. Circulating Tumor DNA





اولین تجربه در cfDNA (Cell Free DNA) در خون سال ۱۹۴۸ انجام شد و در ادامه در سال ۱۹۷۷ در لوپوس مشاهده شد و اولین تجربه در مورد انکولوژی در سال ۱۹۷۷ به انجام رسید. به انجام رسید. (در سرطان پانکراس که بعد از درمان میزان آن، کاهش یافت). استفاده تکنیکی از cfDNA اولین بار در تشخیص جهش ژن KRAS در سرطان پانکراس انجام شود و به cfDNA که از سلول های تومورال منشا بگیرد ctDNA می گویند.

در حالت نرمال ctDNA از سلول های آپوپتوتیک و نکروتیک آزاد شده در خون محیطی به سرعت توسط بیگانه خواری ماکروفاژها و سلول های مشابه از خون محیطی پاک می شود. وقتی ظرفیت آزادسازی بیش از ظرفیت بیگانه خواری باشد میزان نوکلئوزوم در خون محیطی زیاد می شود و این شواهد با یافتن قطعات ctDNA به طول ۱۸۰-۲۰۰ جفت باز در خون محیطی یافت می شود. در واقع ctDNA همه از سلول، نکروتیک و آپوپتوتیک و هم سلول های زنده تومورال در خون محیطی وارد می شود و این ctDNA می تواند هدایت پروسه متاستاز را انجام دهد و سبب ناپایداری ژنتیک که برای ترانسفورماسیون بدخیمی ضروری است، شود. در حالت نرمال غلظت cfDNA کمتر از ۱۰ نانوگرم بر میلی لیتر تا بیش از ۱۰۰ نانوگرم بر میلی لیتر است که با نیمه عمر آن ۱۶ دقیقه تا ۲,۵ ساعت می باشد.

در مقابل افزایش cfDNA فقط با بدخیمی‌ها تناسب نداشته و می‌تواند التهاب، تروما و ورزش بسیار شدید مرتبط باشد. در بیماران سرطانی ctDNA نشان دهنده ی درصدی از کل cfDNA می‌باشد که از ٪۰.۱ تا ٪۱۰ بر اساس حجم کل تومور، مرحله سرطانی، تغییر و تبدیل سلولی (Cellular Turn Over) و پاسخ به درمان می باشد.

پس هم میزان ctDNA هم تعیین واریانت‌های اختصاصی یا نقاط جهش‌های اختصاصی در ctDNA اثر مستقیم روی سودمندی ctDNA دارد. نشان داده شده که سایز ctDNA به میزان ۲۰-۵۰ جفت باز (Base paires) کوتاه‌تر از cfDNA افراد سالم است. پلاسما برای اندازه گیری بهتر از سرم است، چون سانتریفیوژ نشده و DNA خالص‌تری را به ما می‌دهد و مطالعات دیگر هم نشان می دهد که ادرار، بزاق، CSF می‌تواند مقادیر بالاتری را نسبت به پلاسما به ما ارائه دهد، نمونه ها باید در لوله‌های EDTA دار جمع شود که فعالیت DNAse خون را مهار کرده و مناسب جهت آنالیز PCR می باشد.

یک فاکتور بحرانی دیگر زمان است که باید هرچه سریعتر پس از نمونه‌گیری سلول‌های خون تخلیه شوند تا از آزاد شدن DNA سلول‌های خونی جلوگیری شود. در نهایت دما فاکتور مهمی دیگری است که می‌تواند تاثیر در میزان cfDNA داشته باشد و پس از نمونه‌گیری نباید در دمای محیط بماند زیرا موجب لیز سلول و آزادسازی مقادیر بسیار زیادی از cfDNA می‌شود.

خصوصیات ctDNA

1.Integrity 2.Methylation 3.Mutation

دو روش بررسی و آنالیز cfDNA داریم که هر کدام نقاط قوت و ضعف خودشان را دارند.

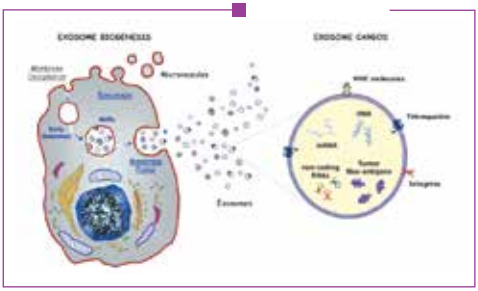
جدول ۳: مقایسه روش های بررسی و آنالیز CtDNA

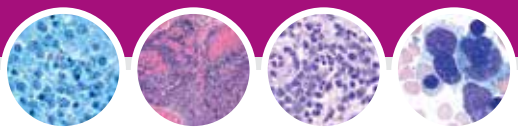
Method		Approach or technologies	Purpose	Detection limit limitations
Targeted ctDNA approaches	PCR-based technologies	ddPCR and BEAMing (beads, emulsion, amplification, and magnetics)	Detection of somatic point mutations	Range from 1% 0.001%; test a s number of geno positions and m miss substantia information
	NGS-based technologies	TAm-Seq (tagged amplicon deep sequencing)	Detection of somatic mutations in a predefined gene panel obtaining a larger and more comprehensive view of genomic regions	<0.01%–0.5%–2 less comprehen needing an assa customized
		CAPP-Seq (cancer personalized profiling by deep sequencing)		
		Safe-SeqS (safe sequencing system)		
		AmpliSeq		
		PARE (personalized analysis of rearranged ends)	Detection of specific somatic structural chromosomal rearrangements	5%–10%
Untargeted ctDNA approaches	NGS-based technologies	WGS (whole genome sequencing)	Analysis of entire genome and copy number alterations	Low sensitivity a expensive
		WES (whole exome sequencing)	Analysis of entire exome (all protein coding genes) and copy number alterations	

کـه توسـط سـلول‌های تومـورال آزاد می‌شـوند و بـه آن

3. Exosomes (EXOs)

اگزوزوم‌ها یک وزیکول‌های نانو سایز هستند (40-100nm) که توسط سلول آزاد شده و در بیشتر مایعات بدن مثل پلاسما، ادرار، بزاق یا مایع آسیت قابل شناسایی و ردیابی هستند. اگزوزم وزیکول‌های کوچک خارج سلولی هستند با غشا لیپیدی دولایه (Lipid bilayer) مانند غشا است که منشا اندولیتیک دارد و از غشای سلولی جدا می‌شوند، و این اگزوزوم‌ها محصول نهایی بازیابی مسیر اندوزومال هستند و از غشای سلول جدا می‌شوند. اگرچه قبلا فکر می‌کردند به عنوان مواد دفعی سلولی هستند ولی اکنون مشخص شده است که یک نقش در ارتباط بین سلولی ایفا می‌کنند. اگزوزوم‌ها در بسیاری از پروسه‌های فیزیولوژیک و پاتولوژیک نقش ایفا کرده که در پیشرفت سرطان و متاستاز هم موثر است. قابل توجه آن که، اگزوزم هایی Tumor derived EXOs نامیده می‌شود و باعث پیشبرد EMT و پرولیفراسیون، مهاجرت و تهاجم سلول های بدخیم شده و همینطور در پروسه رگ سازی و مکانیزم های مقاومت به شیمی درمانی نقش ایفا می کنند. اگزوزوم‌ها حاوی غشا دو لایه چربی هستند و حاوی پروتئین های بین غشایی و غیر غشایی و RNA غیر کدینگ (mRNA) و همچنین DNA تک و دو رشته می باشند. (شکل ۲ و جدول ۴)





Isolation technique	Mechanism	Pros	Cons
Ultracentrifugation	Based on different sedimentation velocity of vesicles under centrifugation, due to differences in size, density, and shape	Low cost procedure. Large sample amounts. High yields of exosomes. High purity of isolated exosomes	Requires expensive ultracentrifuge equipment. Very time consuming. Exosome loss or contamination. Exosomes may be damaged by high speed
Size based	Exclusively based on the size difference between exosomes and other extracellular vesicles	Very fast and cheap procedures. Different commercial kits available	Moderate purity of isolated exosomes. High loss of exosomes due to their trapping into the membranes
Precipitation	Exploit the alteration of exosome solubility by using of water-excluding polymers	User-friendly procedures. No special equipment is required. Large sample capacity	Coprecipitation of nonexosomal contaminants. Time consuming
Immunoaffinity capture	Based on the interaction between specific exosomal surface antigens and immobilized antibodies	Possibility to isolate specific and highly purified exosomes	High cost. Limited sample capacity. Low yields. Very time consuming

نتیجه گیری و دورنمای آینده

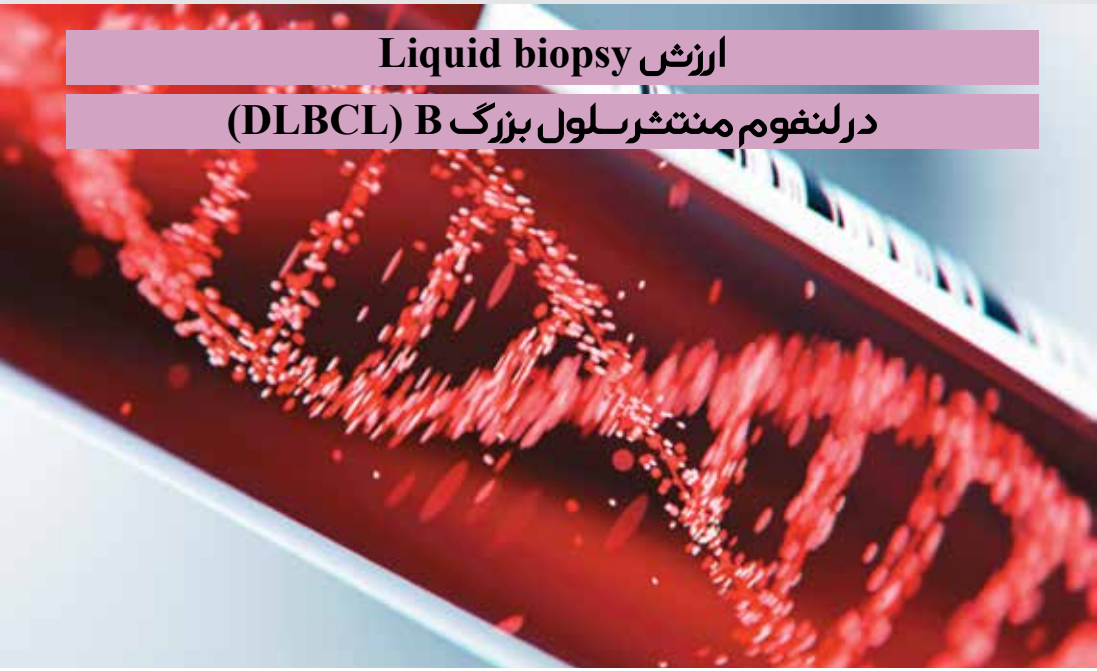
روش مدرن بیوپسی مایع یک پیشرفت شگرف و قدرتمند در غربالگری، تشخیص، پروگنوز و درمان در بیماران سرطانی می‌باشد و مشابه با بیوپسی سنتی، در بیوپسی محیط مایع را به دنبال EXOs، ctDNA، CTCs هستیم که طیف کامل از اطلاعات و مطالعات را در دسترس، قرار می دهد.

هنوز برخلاف روش‌های سنتی و علی‌رغم پتانسیل بالا یک فاصله واضح بین این روند بیوپسی وجود دارد که باید در آینده پر شود و ابزارهای بیوپسی مایع به طور واقعی آزمایش شوند به تاخیر افتاده است که به علت خیلی از موانع مثل عدم اختصاصی بودن و حساسیت، عدم وجود استانداردسازی مناسب هزینه‌های زیاد اجتماعی و انسانی بالا و مشکلات عدیده فراوان این امر به تاخیر افتاده است. در حقیقت به علت غلظت بسیار کم ctDNA، CTCs و EXOs، نتایج آنالیز بعضی مواقع از میزان ناکافی اختصاصی بودن و حساسیت رنج می‌برند و برای استفاده مطلوب و کافی از این تکنیک نیاز به استانداردسازی، آنالیز قابل اعتماد و روش‌های مطلوب‌تر بیوپسی مایع موردنیاز است. همچنین آنالیز کامپیوتری نیازمند وسایل جدید، الگوریتم‌های درست، تفسیر صحیح و ارتباط بالینی مطلوب با داده‌های مولکولی می باشد.

Palmirotta R, Lovero D, Cafforio P, Felici C, Mannavola F, Pellè E, et al. Liquid biopsy of cancer: a multimodal diagnostic tool in clinical oncology. Therapeutic advances in medical oncology. 2018;10:1758835918794630.

Recommended by: Dr.Moslem Bahadori

ارزش Liquid biopsy در لنفوم منتشر سلول بزرگ B (DLBCL)



دکتر سیما همایون مهر - دکتر فریناز راشد مرندی

همانطور که در مقاله قبل توضیح داده شد ترم Liquid Biopsy به معنی دستیابی مشتقات تومور در نمونه خون است. یکی از این مشتقات قطعات آزاد DNA سلول (cfDNA) است که بدنبال آپوپتوزیس به داخل خون آزاد می‌شوند و در غلظت‌های پایین در پلاسما جریان دارند. در افراد سالم منشا cfDNA اغلب آپوپتوزیس سلول‌های هماتوپوتیک می‌باشد که در غلظت ۱۰-۱ نانوگرم در میلی‌لیتر پلاسما در گردش‌اند. در مبتلایان به لنفوما مقدار کل cfDNA همیشه نسبت به افراد سالم افزایش نشان می‌دهد (به طور متوسط ۳۰ نانوگرم در میلی‌لیتر پلاسما) که این افزایش مرتبط به سلول‌های تومورال آپوپتوتیک است.

البته سطوح cfDNA مربوط به تومور تحت عنوان Circulation tumor DNA (ctDNA) در انواع لنفوم‌ها متفاوت است به طوری که در لنفوم‌های تهاجمی و پیشرونده مثل DLBCL و در مراحل پیشرفته بیماری نسبت به لنفوم‌های با رشد بطئی‌تر و لنفوم‌هایی که به درمان پاسخ می‌دهند، بالاتر است.

DLBCL یک گروه هتروژن از لنفوم‌های غیرهوچکین با منشا لنفوسیت‌های B بالغ می‌باشد. در این لنفوم تعداد زیادی جهش‌های سوماتیک و تغییرات مولکولی توصیف شده است، شناسایی آن‌ها کمک به جداسازی بیومارکرهای جدیدی می‌نماید که در درمان هدفمند و فرد محور و در نهایت درمان قطعی و ریشه کن شدن بیماری کاربرد دارد. در این رابطه ctDNA می‌تواند بعنوان یک منبع DNA در DCBCL جهت بررسی جهش‌های اختصاصی و تشخیصی تومور بر

اساس منشا سلول باشد. یک بررسی توسط Rossi D و همکارش در سال ۲۰۱۷ نشان داد ژنوتایپینگ ctDNA پلاسما می‌تواند موتاسیون‌هایی که در عمق نمونه بافتی قابل جداسازی نیستند را مشخص نماید. در یک بررسی دیگر بر روی ۳۰ بیمار مبتلا به DLBCL مشخص گردید علاوه بر اینکه مقدار ctDNA بطور قابل توجهی مرتبط با بار تومور است بلکه نسبت به بیوپسی‌های بافت به طور دقیق‌تری هتروژنیسیتی تومور را نشان می‌دهد. در تشخیص لنفوما هنوز ctDNA نمی‌تواند جایگزین بیوپسی بافت باشد و گفته شده در سناریوهای خاص در آینده بتوان از ctDNA به عنوان ابزار تشخیصی لنفوما استفاده نمود. یکی از این سناریوها لنفوم های اولیه CNS است که امکان دسترسی به تومور و جراحی وجود ندارد. مورد دیگر لنفوم سلول بزرگ B داخل عروقی IVLBCL می‌باشد که یک نوع نادر DLBCL است و بدون لنفا دنوپتی و توده اکسترانودال تظاهر می‌یابد. در IVLBCL معمولا برای تشخیص بیوپسی مغز استخوان و یا بیوپسی پوست انجام می‌شود که به دلیل بار کم تومور نتایج منفی کاذب نادر نیست. مطالعات اخیر نشان داده است که استفاده از cfDNA می‌تواند برای شناسایی جهش‌های اختصاصی این تومور کمک نماید. نکته مورد توجه دیگر اهمیت این تکنولوژی درتعیین پیش آگهی و پیش بینی پیامد بیماری است. با توجه به اینکه برخی بیماران مبتلا به DLBCL به درمان اولیه پاسخ نمی‌دهند، لذا برخی بررسی‌ها پیشنهاد می‌دهد که پزشکان می توانند در طی درمان با استفاده از تکنولوژی بیوپسی در محیط مایع، پاسخ به درمان بیماران مبتلا به DLBCL را تعیین نماید و در زمان کوتاهی در طی درمان چند روز یا هفته بسته به استراتژی درمان پیامد بیماری را پیش بینی نماید. همچنین برخی بررسی‌ها نشان داده است که استفاده از ctDNA می‌تواند یک ابزار قدرتمند در ارزیابی MRD در DLBCL باشد.

1- Spina V, Rossi D.Liquid biopsy in tissue-born lymphomas. Swiss Med Wkly. 2019 Jan 23;149:w14709.

2-Elodie Bohers, Pierre-Julien Viailly et al,Non-invasive monitoring of diffuse large B-cell lymphoma by cell-free DNA high-throughput targeted sequencing: analysis of a prospective cohort. Blood Cancer J. 2018 Aug; 8(8): 74.

3-Camus V, Jardin F, Tilly H.The value of liquid biopsy in diagnosis and monitoring of diffuse large b-cell lymphoma: recent developments and future potential. Expert Rev Mol Diagn. 2017 Jun;17(6):557-566.

4-Yasuhito Suehara, Mamiko Sakata-Yanagimoto et al,Liquid biopsy for the identification of intravascular large B-cell lymphoma. Haematologica. 2018 Jun; 103(6): e241–e244.

آزمایشگاه پاتوبیولوژی فروردین

تقاطع خیابان امام خمینی و کارون، ساختمان ۱۰۲۶
تلفن : ۶۶۳۷۳۸۹۰ – ۶۶۳۶۷۹۱۴ تلفکس: ۶۶۸۷۴۹۹۶

آزمایشگاه پاتوبیولوژی فروردین نوین

انتهای بلوار کشاورز، روبروی درب شرقی بیمارستان امام خمینی،
پلاک ۱۵۱ تلفن: ۶۶۹۰۲۱۲۱ – ۶۶۹۳۳۰۱۴

وب سایت: www.farvardin-lab.com
ایمیل: info@farvardin-lab.com
ایمیل: ravabetomoumi1396@gmail.com
کانال تلگرام: @farvardinlabs
اینستاگرام: farvardinlaboratory

روابط عمومی:

۶۶۶۷۶۴۹۴ • • • ۰۹۳۶۲۵۹۲۹۹۹