تداخلات فارماکوژنتیک در اســـکلروز جانبی آمیوتروفیک: یک قدم نزدیک به یک درمان؟

وحید رضا اصفهانی[1]
۱- کارشناسی ارشد سلولی مولکولی دانشگاه علوم پزشکی آزاد اسلامی تهران، تهران، ایران
پژوهشگر مرکز تحقیقات پزشکی شخصی آمیتیس ژن

مقدمه:

اسکلروز جانبی آمیوتروفیک (ALS) به واسطه‌ی ژنتیک بیماری، تلاش‌های بالینی و تنوع در آسیب‌شناسی‌اش شناخته شده است. ماهیت ناهمگن ALS، طراحی و انجام آزمایش‌های بالینی را پیچیده می‌کند و ممکن است پیشنهاد شود که ALS به صورت واحد قابل درمان نیست. بیماران ممکن است پاسخ متفاوت به درمان بدهند و چندین روش درمانی شخصی نیاز داشته باشند. اگرچه مکانیسم‌های پاتوفیزیولوژیکی اساسی ALS نامشخص است، اما احتمالاً جهش‌های ژنتیکی مرتبط با ALS از طریق مسیرهای مختلف و متمایز عمل می‌کنند که در پایان، همه منجر به تولید عصبی حرکتی می‌شوند. بنابراین، یک درمان جدید فقط در بیماران دارای جهش خاص مؤثر است و منجر به پاسخ‌های درمانی متفاوت در طول کارآزمایی بالینی می‌شود. برای فهم بیشتر، یک بررسی متاآنالیز اخیر نشان داد که پاسخ به لیتیوم به ژنوتیپ UNC13A بستگی دارد. این مشاهده به ضرورت در نظر گرفتن ژنتیک در آزمایش‌های بالینی ALS در آینده اشاره دارد؛ به ویژه اگر کسی به اثرات درمانی خاص ژنوتیپ علاقه مند باشد.

علیرغم تعداد معدودی از آزمایش‌های مربوط به ژنوتیپ، اکثریت قریب به اتفاق آزمایش‌های ALS اهمیت بالقوه اطلاعات ژنتیکی را نادیده می‌گیرند. در این مطالعه، ارزیابی‌های ما نشان می‌دهد که چگونه ژنوتیپ‌های مختلف ممکن است در چند جنبه از آزمایش‌های بالینی ALS، بر اساس داده‌های دو کارآزمایی کامل، تعامل داشته باشند. ما اثرات سه ژن (MOBP, UNC13A, C9orf72) مرتبط با ALS و همچنین اثر یک ژن کمتر شایع (SOD1) را ارزیابی کردیم.

مواد و روش ها

داده‌های فردی شرکت کننده ها

داده‌های این مطالعه مربوط به دو کارآزمایی بالینی تصادفی و doubleblind انجام شده در هلند است. هر دو کارآزمایی به صورت توالی وار ططططراحی شدند و تجزیه و تحلیل‌های موقت پس از هر جفت رویداد انجام شده است. اولین آزمایش با هدف تعیین اثربخشی کراتین مونوهیدرات در مقایسه با دارونما بر بقای کلی انجام شد. در کل ۱۷۵ بیمار بین ژوئن ۲۰۰۰ و دسامبر ۲۰۰۱ ثبت نام کردند که در این مرحله آزمایش به دلیل بیهودگی متوقف شد. کارآزمایی دوم با هدف تعیین تأثیر اسید والپروئیک اسید (VPA) در مقایسه با دارونما بر بقای کلی انجام شد. به طور مشابه، پس از ثبت نام ۱۶۳ بیمار بین آوریل ۲۰۰۴ و ژانویه ۲۰۰۷ آزمایش به دلیل بیهودگی متوقف شد.

داده‌های ژنتیکی و تعیین توالی ژنوم:

هنگام انجام تجزیه و تحلیل‌های تعاملی در کارآزمایی‌های بالینی مهم است بدانید که سه محدودیت عمده وجود دارد: (۱) عدم تصادفی‌سازی در زیر گروه، (۲) تعدد آزمایش آماری و (۳) عدم قدرت و دقت آماری (کاهش اندازه نمونه). این محدودیت‌ها به ویژه در تجزیه و تحلیل ژنتیکی (فارماکوژنتیک) آشکار می‌شوند، که ممکن است به سرعت به تجزیه و تحلیل ده‌ها ژن با شیوع کم منجر شود. بنابراین، ما پنج ژن کاندیدا که مربوط به ALS و دارای فرکانس آللی جزئی (MAF) حداقل ۰.۱۵ در بین بیماران هلندی بود را انتخاب کردیم:

SCFD1 (rs10139154, MAF 0.331), SARM1 (rs35714695, MAF 0.162), UNC13A (rs12608932, MAF 0.403), MOBP (rs616147, MAF 0.302)

و تکرار بسط C9orf72 تنوع مشاهده شده در میان شرکت کنندگان آزمایشی برای SCFD1 و SARM1 بسیار پایین بود (به عنوان مثال، کمتر از ده مورد)، و این ژن‌ها از تجزیه و تحلیل حذف شدند. تنوع ژنتیکی در بین شرکت کنندگان در کارآزمایی برای اطمینان از اندازه نمونه پایدار در زیر گروه‌های ژنتیکی ضروری است. آنالیز فارماکوژنتیکی مبتنی بر ژن‌های نادر، مانند FUS، SOD1، یا TARDBP (شیوع <۱٪)، امکان پذیر نبوده است زیرا زیرگروه‌ها به احتمال زیاد فقط یک یا دو بیمار را تشکیل می‌دهند. قبلاً UNC13A و C9orf72 شرح داده شده‌اند. MOBP اخیراً به عنوان یک ژن مرتبط با ALS در یک مطالعه genome-wide کشف شد. نکته مهم، آلل فرکانس جزئی MOBP در بیماران مبتلا به ALS حدود ۳۰٪ است که می‌تواند تنوع کافی برای آلل در بین شرکت کنندگان در آزمایش را تضمین کند. در طی انجام مطالعات VPA و کراتین، به شرکت کنندگان این امکان داده شد که نمونه خون را برای استفاده‌های بعدی تهیه کنند. بیشتر نمونه‌های خون در مطالعات ژنتیکی قبلی (حدود ۷۵٪، شکل ۱) مورد استفاده قرار گرفته و داده‌ها به راحتی در دسترس بودند. برای نمونه‌های باقیمانده، C9orf72 با استفاده از PCR با تکرار اولیه همانطور که قبلاً توضیح داده شد، توالی یابی شد. ما بیماران با بیش از ۳۰ تکرار در ژن C9orf72 را به عنوان حامل C9orf72 طبقه بندی کردیم. همانطور که در گذشته توضیح داده شد، SNPهای UNC13A و MOBP با استفاده از روش‌های Taqman توالی یابی شدند.

تصویب پروتکل استاندارد، ثبت نام‌ها، و رضایت بیمار:

کمیته اخلاق پزشکی و هیئت بررسی پزشکی از مرکز پزشکی دانشگاه اوترخت این مطالعه را تأیید کردند. همه شرکت کنندگان در مطالعه رضایت آگاهانه کتبی ارائه دادند.

تحلیل آماری:

نقطه پایانی مرگ و میر بود، به عنوان زمان تصادفی تا مرگ برای هر نمونه تعریف شده است. ما از مدل خطرات متناسب Cox برای تحلیل تعامل بین درمان و ژنوتیپ استفاده کردیم. برای آزمایش اهمیت هر اثر فارماکوژنتیک، دو مدل در نظر گرفتیم: (۱) مدل با درمان و ژنوتیپ و (۲) مدل با درمان، ژنوتیپ و اثر متقابل این دو بر هم. برای مقایسه این دو مدل از آزمون نسبت احتمال استفاده شد. همه مدل‌ها برای پیش بینی خطر بقا ENCALS تنظیم شده‌اند تا برای عدم تعادل گروه و برای افزایش قدرت مدل کاکس تنظیم شوند. از طرح جنگلی برای بازرسی رابطه بین ژنوتیپ و اثر درمانی استفاده شد.

ما فرض کردیم که اگر آلل، تعامل بیولوژیکی با درمان داشته باشد، اثر درمان به عنوان تابعی از آلل تغییر می‌کند. به عنوان مثال، اگر اثر درمانی با آلل A همراه باشد اثر درمانی در ژنوتیپ CC دیده نمی‌شود، در ژنوتیپ AC به صورت متوسط و در AA زیاد است. به منظور بررسی بیشتر جهت تعامل، ژنوتیپ را به مدل غالب (یعنی AA در مقابل AC + CC) یا مدل مغلوب (مثلاً AC + AA در مقابل CC) بازنویسی کردیم. تعامل کیفی به عنوان تعامل با اثرات درمانی مخالف تعریف شد. فعل و انفعالات کمی به عنوان یک پاسخ درمانی متناوب، اما در همان جهت در زیر گروه‌ها تعریف شد. مدل‌های اثر خطی مختلط برای تجزیه و تحلیل نقاط پایانی ثانویه استفاده شد (مقیاس رتبه بندی عملکردی [ALSFRS] و٪ ظرفیت حیاتی اجباری [FVC] را پیش بینی کرد). ALSFRS تجدید نظر شده رایج تر (ALSFRS-R) هنوز در طول آزمایش کراتین اجرا نشده است. بنابراین ما از ALSFRS برای هماهنگی دو کارآزمایی استفاده کردیم. همه تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از بسته R بقا و lme۴ انجام شد. با توجه به ماهیت اکتشافی این مطالعه، نتایج نشان داده شد که آلفا کمتر از ۵ درصد نتایج بود.

نتایج

در کل ۳۳۸ بیمار منحصر به فرد در مطالعات کراتین و VPA شرکت کردند. اطلاعات ژنوتیپی مربوط به ژن‌های MOBP، C9orf72 و UNC13A برای ۳۰۹ شرکت کننده (٪۹۱/۴) در دسترس بود. جریان کار برای مطابقت با پروفایل‌های DNA در شکل ۱ نشان داده شده است. ۲۹ مورد هرگز نمونه DNA ارائه نکردند. بقای ۱۲ ماهه آنها بدتر از شرکت کنندگانی بود که DNA آنها در دسترس بود. جالب توجه است، DNA از دست رفته مربوط به تخصیص درمان بود. داده‌های نسبتاً بیشتری از بین شرکت کنندگانی که تحت درمان فعال بودند، وجود نداشت (٪۴/۸ دارونما در مقابل ٪۴/۱۲ فعال، P =۰/۲۲۲، جدول ۱). از آنجا که همه عوامل پیش آگهی در بازوهای درمان متعادل بودند، به نظر می‌رسد این مشاهدات به دلیل عوارض جانبی خاص مرتبط با ترک درمان است.

توزیع ژنتیکی:

جدول ۱ توزیع ژنوتیپ‌ها در بین بازوهای درمانی، طبقه بندی شده با آزمایش را خلاصه می‌کند. ژنوتیپ‌ها به طور مساوی در مطالعه VPA پخش شدند. با این حال، در مطالعه کراتین عدم تعادل نسبتاً زیادی وجود دارد (به عنوان مثال، ژنوتیپ UNC13A AA [۲۶ در مقابل ٪۴۰]). به منظور قرار دادن این عدم تعادل‌ها، احتمال عدم تعادل را برای اندازه و شیوع مختلف نمونه محاسبه کردیم (جدول ۲). ریسک عدم تعادل قابل توجه (≤٪۱۰) تا زمانی که اندازه کل نمونه برای ژنوتیپ‌های شیوع بالا مانند UNC13A CC یا MOBP GG به ۲۰۰ یا بیشتر برسد قابل توجه باقی مانده است. خطر بروز عدم تعادل معنی دار برای ژن‌های با شیوع کم قابل اغماض است (٪۱ یا کمتر، به عنوان مثال SOD1). به عنوان مثا، حدود ۱ در ۴ آزمایش (٪۲۳/۹) با اندازه کل نمونه ۱۰۰ خطر عدم تعادل ≤ ٪۱۰ در شیوع ژنوتیپ UNC13A CC را نشان می‌دهد، در حالی که این ریسک برای SOD1 فقط ٪۰.۰۲ (۲ در ۱۰، ۰۰۰ آزمایش) است.

اثر ژنوتیپ بر نتیجه:

ژنوتیپ UNC۱۳A در طول آزمایش در مرگ و میر تأثیر داشت (p = ۰/۲۱۰). این اثر پس از در نظر گرفتن تنوع بین آزمایش باقی مانده است (P =۰.۰۴۸). اثر پاسخ دوز از آلل C در هر دو آزمایش مشخص شد (شکل ۲). جالب است که، C۹orf۷۲ بر مرگ و میر تأثیر نمی‌گذارد (P = ۰/۷۷) اما حاملان تکرار گسترش سرعت کاهش ماهانه در نمره کل ALSFRS را در مقایسه با حامل‌های نوع وحشی نشان دادند. این مشاهده در درجه اول با سرعت ماهانه کاهش سریع در زیر دامنه لامپ هدایت می‌شود (شکل ۳). UNC13A نرخ کاهش در کل نمره ALSFRS یا FVC را تحت تأثیر قرار نداد، اگرچه یک رابطه دوز-پاسخ در نرخ ماهانه کاهش در FVC مشاهده می‌شود. MOBP بر FVC، ALSFRS یا مرگ و میر تأثیری نگذاشت.

اثر ژنوتیپ بر درمان:

در نهایت ما تعامل فارماکوژنتیک را در هر دو مطالعه ارزیابی کردیم. در مطالعه VPA، هیچ الگوی پاسخ دوز مشخص نشده و تجزیه و تحلیل‌های اضافی کنار گذاشته شدند (شکل ۴a). اثر کلی کراتین بر مرگ و میر ۰/۹۸ بود.

شکل ۴b تعامل فارماکوژنتیکی با دوز پاسخ بین کراتین و آلل A ژنوتیپ MOBP را نشان می‌دهد، که در یک مدل مغلوب مورد بررسی قرار گرفت. این تعامل کیفی، با اثرات درمانی مخالف، از زیر گروه AG + AA سود می‌برد، اما در زیر گروه GG مضر به نظر می‌رسید. تعامل بین C9orf72 و کراتین به دلیل اندازه نمونه کوچک و عدم وقوع حوادث در بیماران با گسترش مکرر نمی‌تواند تعیین شود.

بحث:

مطالعه‌ی ما نشان می‌دهد که چگونه ژنوتیپ‌های مختلف در چندین جنبه از آزمایش‌های بالینی ALS تعامل دارند. اولاً ژنوتیپ می‌تواند تأثیر قابل توجهی در نقاط اولیه، ثانویه و انتهایی داشته باشد. ثانیاً خطر مشاهده عدم تعادل در ابتدا در ژنوتیپ‌های رایج، مانند تکرار گسترش C9orf72 و UNC13A CC، قابل توجه است. اگرچه این یافته ممکن است تعجب آور نباشد، اما نکته‌ی مهمی در توسعه پزشکی شخصی است و در کارآزمایی‌های بالینی فعلی به ندرت مورد توجه قرار می‌گیرد. این امر به ویژه هنگامی تعیین می‌شود که فرد وجود پاسخ‌های متغیر درمانی را به دلیل ناهمگونی کوهورت فرض کند، فرضیه‌ای که توسط تعامل فارماکوژنتیکی بین MOBP و کراتین پشتیبانی می‌شود. در نتیجه، عدم توجه به اطلاعات ژنتیکی ممکن است شواهد پاسخ به درمان را نقد کند و یا یک منبع تعصب ناشناخته باشد. ترکیب داده‌های ژنتیکی می‌تواند کارآزمایی‌های بعدی ALS را بهبود بخشد، به عنوان مثال جمعیت مورد آزمایش را با غنی‌سازی تطبیق پذیر یا مجدد اندازه نمونه‌ها بهبود ببخشد. رابطه بین ژن‌های مختلف (به عنوان مثال: SOD۱، C۹orf۷۲ و UNC۱۳A) و مرگ و میر در داده‌ها به خوبی برقرار شده است. گروه‌های مشابه بین UNC۱۳A و C۹orf۷۲ با بقا در شرکت کنندگان آزمایش در طول یک متاآنالیز اخیر نشان داده شد. نتایج ما این یافته‌های اولیه را با آشکار ساختن یک رابطه پاسخ دوز با مرگ و میر به عنوان عملکرد آلل Cدر UNC۱۳A دردو کارآزمایی بالینی مستقل گسترش می‌دهد. علاوه بر این، ما نشان می‌دهیم که چگونه C۹orf۷۲ و UNC۱۳A ممکن است بر میزان افت در کل نمرات ALSFRS یا FVC تأثیر بگذارند.

جالب اینجاست که اثر واضح UNC13A در زمان بقا وجود دارد، اما نه در ALSFRS نیست. این می‌تواند نتیجه تغییر تورم ALSFRS باشد. تنوع تورم (یا رقیق سازی) توسط ژنوتیپ C9orf72 نشان داده شده است، که در آن یک اثر نورانی قوی (p = ۰/۰۰۵، مطابق با فنوتیپ) وجود دارد اما هیچ تأثیر حرکتی ندارد (p = ۰/۲۹). در نتیجه، اثر کلی و خلاصه C۹orf۷۲ بر نمره کل ALSFRS تنها حاشیه معنادار بود (p = ۰/۰۵۱). شناخت تعامل بین نتیجه و ژنوتیپ برای آزمایش‌های بالینی آینده، نه تنها به منظور آشکار کردن نقاط ضعف بالقوه در نتایج بلکه برای شناسایی منابع بالقوه و همچنین زیر گروه‌های بالقوه پاسخگو مهم است.

مطالعات عملکردی و هیستوپاتولوژیک در مورد ژن‌های متداول در جهش یافته‌های خانواده‌ی SOD1 ،ALS و C9orf72، تأکید می‌کنند که مکانیسم‌های مختلف بیماری در ALS نقش دارند. اگرچه به نظر می‌رسد مکانیسم‌های فوق الذکر منحصر به فرد برای ALS مربوط به C9orf72 است جابجایی سیتوپلاسمی و تجمع TDP-43، مشخصه پاتولوژیک ALS، در این موارد نیز دیده می‌شود. در SOD1 و FUS جهش یافته مربوط به ALS، آسیب‌شناسی اصلی مربوط به TDP-43 نیست بلکه تجمع پروتئین جهش یافته غلط است، که ممکن است نشان دهد که تولید عصبی از طریق مسیرهای دیگر به این شکل از ALS ایجاد می‌شود. تنوع بالقوه در مکانیسم‌های بیماری فرضیه فارماکوژنتیک در ALS را پشتیبانی می‌کند. ما یک پاسخ درمانی ناهمگن بالقوه کراتین را به عنوان عملکرد آلل A در MOBP شناسایی کردیم. مکانیسم بیولوژیکی همچنان فرضیه است. MOBP ممکن است مربوط به سیگنالینگ میتوکندری باشد، جایی که اعتقاد بر این بود که کراتین اختلال عملکرد میتوکندری را کاهش می‌دهد. همچنین ممکن است که MOBP فقط جانشین ژن نزدیک باشد، این هنوز ناشناخته است.

علاوه بر این مانند هر تجزیه و تحلیل بعد از موئد، این تعامل نیاز به اعتبار بیرونی قبل از نتیجه‌گیری بعد از موعد دارد.

متأسفانه، آزمایش‌های فاز III / II بزرگتر اغلب اولین فرصت برای ارزیابی اثرات متقابل دارویی در ALS است. نتایج ما شایستگی داده‌های ژنوتیپی را برای

آزمایشات بالینی ALS نشان می‌دهد، و به طور همزمان بر پیچیدگی این فعل و انفعالات فارماکوژنتیک تأکید می‌کند. اولاً، بسیاری از ژن‌های مرتبط با ALS وجود دارد که ممکن است به سرعت منجر به تعدد شود. ثانیاً، ژن‌های مرتبط با ALS غالباً شیوع وابسته به جغرافیایی کم دارند، که اندازه نمونه (و قدرت) موجود را کاهش می‌دهد و می‌تواند تجزیه و تحلیل‌ها را پیچیده کند (به عنوان مثال فقدان وقایع در تعامل C9orf72- Creatine، شکل ۴ a). ثالثاً، تجزیه و تحلیل گذشته نگر از مواد DNA ممکن است منجر به یک تعصب انتخاب اضافی بقا وخیم‌تر شود؛ به طور مثال در نتایج ما، آن بیمارانی که مشخصات DNA آنها مشخص نیست.

ترکیب احتمالی ژنوتیپ در مرحله طراحی می‌تواند این محدودیت‌ها (به عنوان مثال، به دست آوردن مواد DNA در غربالگری، پیش تعیین کننده تجزیه و تحلیل‌های زیر گروه یا استفاده از تصادفی طبقه بندی شده) را کاهش دهد، اما ممکن است کافی نباشد. بنابراین، استراتژی‌های خلاقانه برای تشخیص موثر اثرات فارماکوژنتیک در آزمایشات بالینی ALS مورد نیاز است. ترکیب عناصر سازگار، مانند ارزیابی مجدد اندازه نمونه یا غنی‌سازی جمعیت، می‌تواند به شناسایی آینده در تعامل‌های فارماکوژنتیک کمک کند. اگر در طی یک تحلیل موقت یک اثر درمانی افتراقی وجود داشته باشد، اندازه نمونه می‌تواند مجدداً مورد بررسی قرار گیرد تا دقت تحلیلی در اتمام آزمایش بهبود یابد. به عنوان جایگزین، می‌توان تصمیم گرفت فقط با زیر گروه پاسخ دهنده ادامه یابد.

این عناصر سازگار می‌توانند در آزمایش‌های مربوط به ژن‌های مرتبط با ALS مانند C9orf72، UNC13A و MOBP نقش محوری داشته باشند. با این وجود، وقتی متغیرهای ژنتیکی نادر است، این روش‌ها ممکن است آزمایش‌های کوتاه و اختصاصی باشند مانند آزمایش ضد حساسیت SOD۱ که تنها گزینه ما است.

در نتیجه، در این مطالعه تعامل بین سه ژن مرتبط با ALS و دو کارآزمایی بالینی بررسی شده است. نتایج ما نشانگر ارزش ترکیب اطلاعات ژنوتیپی در کارآزمایی‌های بالینی ALS است، اما همچنین چالش‌های آزمایش‌های فارماکوژنتیک آینده را برجسته می‌کند. درج داده‌های ژنتیکی در کارآزمایی‌های بالینی آینده ALS می‌تواند مطالعات را بهبود بخشد، به عنوان مثال، جمعیت‌های آزمایشی را با غنی‌سازی تطبیقی یا مجدد اندازه نمونه‌ها بهبود بخشد. در نهایت، این استراتژی می‌تواند به محققان کمک کند تا سرنخ‌های مهم درمانی را در بیماران مبتلا به ALS شناسایی کنند.

منبع:

https: //www.nature.com/articles/s41397-019-0111-3