اعتبارسنجی بیومارکرهای جدید سرطان

حسن اسکندری

کارشناس ارشد بیوشیمی بالینی

زمینه: بیومارکرها نقش مهمی در تشخیص و مدیریت بیماران سرطانی دارند. علیرغم اینکه مقالات متعددی در زمینه بیومارکرهای سرطان منتشر شده‌اند، تعداد کمی از این بیومارکرها مورد استفاده وسیع بالینی واقع می‌شوند.

مفاد: در این مقاله به بررسی عوامل کلیدی پیش بردن یک کاندیدای بیومارکر جدید از مرحله مطالعاتی آزمایش تا کاربری بالینی می‌پردازیم.

چهار مرحله اساسی جهت ورود یک بیومارکر به مرحله بالینی وجود دارد:

- اعتبارسنجی اندازه‌گیری بیومارکر
- اعتبارسنجی بالینی آزمایش بیومارکر
- نشان دادن ارزش بالینی در عملکرد آزمایش بیومارکر
- تأیید شدن قانونی آزمایش بیومارکر

علاوه بر این مراحل چهارگانه، تمام مطالعات مربوط به بیومارکر باید با ذکر جزئیات و به‌طور شفاف و با استفاده از چک‌لیست‌ها و دستورالعمل‌های منتشرشده، گزارش گردند و در نهایت تمام مطالعات مربوط به بیومارکرها که درصدد نشان دادن ارزش بالینی آن‌ها می‌باشند، باید قبل از شروع به کار ثبت گردند.

خلاصه: روشی که در بالا شرح داده شد باید بتواند راهکاری مؤثر و کارآ جهت ایجاد و گسترش بیومارکرهای سرطان و همچنین گزارش مطالعات مربوطه ایجاد کند و با بکارگیری دقیق این روش همه ذینفع‌ها به‌ویژه بیماران سود خواهند برد.

بیومارکرها نقشی مهم و گاه بی‌همتا در تشخیص و مدیریت بیماران سرطانی دارند. در افراد بدون علامت بیومارکرها می‌توانند نقش غربالگر جهت تشخیص زودهنگام سرطان یا حالات قبل از سرطان داشته باشند و در بیماران با علامت در تشخیص افتراقی بین سرطان و بیماری‌های خوش‌خیم مورد استفاده واقع شوند.

پس از تشخیص سرطان هم بیومارکرها در بررسی پیشرفت سرطان و کمک به انتخاب درمان مناسب می‌توانند ایفای نقش کنند. در بیماران سرطانی که جراحی می‌شوند شاید بتوان موفقیت جراحی در ریشه‌کن ساختن تومور و نیز عود بیماری را توسط بیومارکرها بررسی نمود. در بیمارانی هم که تحت درمان دارویی قرار می‌گیرند بیومارکرها وسیله خوبی برای بررسی پاسخ به درمان می‌باشند (۱،۲).

علیرغم اینکه مقالات متعددی طی سال‌های اخیر در خصوص بیومارکرهای سرطانی منتشر شده است، اما در ۲۵ سال اخیر تعداد بیومارکرهای بافتی که مورد استفاده بالینی قرار گرفته‌اند از شمار انگشتان یک دست تجاوز نمی‌کنند و هیچ بیومارکر سرمی هم در این سال‌ها به مجموعه قبلی اضافه نشده است (۳). به اعتقاد Diamandis (۳) این موضوع به علت کمبود دانش بیولوژیک یا بیومدیکال و یا کمبود سرمایه‌گذاری نیست، بلکه ناشی از فقدان یک روش روشن اعتبارسنجی بیومارکرهای جدید می‌باشد (۴).

در این مقاله می‌خواهیم به بررسی مسیر یک بیومارکر سرطانی از تولد تا ورود به عرصه بالین بپردازیم. تمرکز اولیه ما بر روش‌هایی خواهد بود که تک– آنالیت‌ها را اندازه‌گیری می‌کنند، اما بیشتر محتوای مقاله با بیومارکرهای چندآنالیتی و Omics- related هم مرتبط خواهد بود، علاوه بر این در خصوص ثبت و گزارش مطالعات مربوط به بیومارکرها هم بحث خواهیم نمود. گرچه مقاله راجع به بیومارکرهای سرطانی است اما راجع به بیومارکرهای سایر بیماری‌ها نیز سخن خواهیم گفت. در این مقاله فرض بر این است که نتایج اولیه حاصل شده و نشان می‌دهد که بیومارکر موردنظر بالقوه اهمیت بالینی دارد.

عوامل اعتبارسنجی بیومارکر سرطان

جمع‌آوری و پردازش نمونه

یک مرحله مهم در اعتبارسنجی بیومارکرها که اغلب از آن غفلت می‌شود ارزیابی عوامل پیش‌آزمایشی است که می‌توانند بر غلظت بیومارکر اثر بگذارند. این عوامل که مختص بیومارکرهای سرطانی هم نیستند و در مورد همه بیومارکرهای بالینی صدق می‌کنند عبارتند از متغیرهای مربوط به بیمار و متغیرهای مربوط به نمونه (۵). عوامل مربوط به بیمار که بر روی بیومارکرها می‌توانند اثرگذار باشند عبارتند از: سن، وضعیت بدن(خوابیده، نشسته)، وضعیت آب بدن، ناشتا بودن و درمان قبلی یا فعلی (داروهایی که بیمار مصرف می‌کند). علاوه بر این عوامل بالقوه مخل در بیومارکرهای تشخیصی و غربالی سرمی نیز باید مدنظر باشند. این عوامل شامل بیماری‌های خوش‌خیم کبد، کلیه و ریه و نیز بیماری‌های التهابی می‌باشند. تمام این اختلالات می‌توانند منجر به افزایش سطح سرمی بیومارکرهای پروتئینی سرطان‌ها بشوند.

عوامل تأثیرگذار مربوط به نمونه به ماهیت نمونه که خون یا بافت باشد بستگی دارند. اگر نمونه از خون باشد پلاسما یا سرم بودن آن و نیز نوع ضدانعقاد اهمیت دارد. همولیز، شرایط سانتریفوژ (زمان، سرعت، حرارت) و ثبات نمونه در طی انتقال به آزمایشگاه، پردازش و ذخیره‌سازی از جمله عوامل تأثیرگذار دیگر هستند. گرچه سرم و پلاسما اغلب بجای هم استفاده می‌شوند، اما ترکیب پروتئینی آن‌ها تفاوت اساسی با هم دارند، چرا که در فرآیند انعقاد جهت ایجاد سرم پروتئین‌های انعقادی لخته می‌شوند.

DNA شناور تومور (ctDNA) این قابلیت را دارد که نشانگر ژنوم سرطان باشد، لذا اخیراً تمایل زیادی به اندازه‌گیری آن ایجاد شده است (۶). از آنجا که غلظت زمینه‌ای این ماده در پلاسما کمتر است لذا پلاسما برای انجام این آزمایش توصیه می‌شود (۶)، اما مراحل پردازش بهینه ctDNA هنوز کاملاً روشن نیست. همچنین شرایط بهینه برای پردازش سلول‌های توموری شناور (CTC) هم باید تحقیق شود.

اخیراً در بین چند مؤسسه که بر روی CTC کار می‌کردند لوله‌های حاوی نگهدارنده به‌طور موفقیت‌آمیزی مورد استفاده قرار گرفته است (۷).

از آنجایی که عوامل مختلفی بر روی ثبات و در نتیجه غلظت یک بیومارکر اثر می‌گذارند، لذا بجاست که یک مطالعه اولیه برای تعیین شرایط بهینه جمع‌آوری و نگهداری نمونه انجام شود. این مرحله باید قبل از اعتبارسنجی بالینی اقدام گردد.

درمورد بیومارکرهای بافتی باید مشخص شود کدامیک از بافت تازه، بافت منجمد یا بافت فیکس شده در پارافین را می‌توان استفاده کرد. گرچه بافت تازه یا منجمد در آزمایشگاه‌های تحقیقاتی قابل‌استفاده هستند، اما در مقاصد بالینی عمومی بافت فیکس شده در پارافین یا فرمالین استفاده می‌شود. در بافت‌های فیکس شده زمان فیکس کردن و طول مدت آن از فاکتورهای مهم تأثیرگذار بر نوسان نتایج هستند که هم پروتئین‌ها و هم RNA را تحت تأثیر قرار می‌دهند. دستورالعمل‌های منتشرشده برای رنگ‌آمیزی بهینه پروتئین‌ها شامل قرار دادن نمونه درمحلول فیکساتیو در عرض یک ساعت بعد از نمونه‌برداری، فیکس کردن در فرمالین بافره خنثی ۱۰٪ به مدت ۲۴ ساعت، آبگیری بین ۱/۵ تا ۱۵ ساعت و قالب‌گیری با پارافین در عرض ۰/۵ تا ۴/۵ ساعت می‌باشند (۸). شرایط بهینه‌سازی خاص از پروتئینی به پروتئین دیگر ممکن است تفاوت داشته باشد.

Pena- Llopis و Brugarolas (۹) اخیراً روشی را برای استخراج همزمان DNA، RNA، micro RNA و پروتئین‌ها را از یک نمونه شرح داده‌اند (۹). در این گزارش بافت دارای سلول‌های توموری بر اساس مشاهده هیستولوژی از نزدیک‌ترین قسمت به تومور تهیه می‌شود. سایر مسائل مرتبط با اندازه‌گیری بیومارکرهای بافتی نظیر هتروژنیسیته داخل تومور (۱۰) و آلودگی سلول‌های تومورال با سلول‌های غیربدخیم (۱۱) از حوصله این گزارش خارج است.

از آنجا که جمع‌آوری و پردازش اولیه نمونه ممکن است توسط افراد غیرمتخصص انجام شود، لذا لازم است که دستورالعمل دقیق کار تهیه شده و در اختیار آن‌ها قرار گیرد. هرگونه انحراف از اجرای این دستورالعمل در خصوص یک نمونه باید یادداشت شود. علاوه بر این در خصوص آزمایش‌های مشکل و دستی باید دستورالعمل‌های جامع بطور مشروح موارد پیش‌آزمایشی، آزمایشی و گزارش‌دهی را توصیف کنند. برای بیومارکرهایی چون رسپتورهای استروژن، رسپتورهای پروژسترون و HER2 در مورد سرطان پستان (۱۲ و ۱۳) و موتاسیون‌های (EGFR) و ترانسلوکاسیون‌های Anaplastic Lymphoma Receptor Tyrosine Kinase (ALK) در سرطان سلول‌های کوچک ریه (۱۴) و موتاسیون KRAS در سرطان روده، دستورالعمل‌های جامعی وجود دارند که می‌توانند الگو واقع شوند. علاوه بر دستورالعمل‌های اختصاصی، دستورالعمل‌های عمومی در خصوص ثبات آنالیت و کنترل کیفی آزمایشگاهی برای اندازه‌گیری بیومارگرهای مولکولی بافتی توسط Cree و همکارانش منتشر شده است (۱۶).

اعتبارسنجی آنالیتیکال سنجش بیومارکر

از آنجایی که روش‌های سنجش با قالب‌های مختلف برای اندازه‌گیری بیومارکرها وجود دارند، لذا ضروری است تا هر روشی که در بالین مورد استفاده واقع می‌شود، اعتبارسنجی گردد (۱۷،۱۸)؛ بدین منظور برای بیومارکرهای پروتئینی سرمی معمولاً روش کمّی ایمونواسی (مثل ELISA اتوماتیک) استفاده می‌شود. بیومارکرهای بافتی برای پروتئین‌ها با ایمونوهیستوشیمی و برای DNA با in situ hybridization بررسی می‌شوند.

روش‌های جدید برای بیومارکرهای دارای اسیدهای هسته‌ای شامل آنالیز موتاسیون برای بیومارکرهای DNA (تک ژن، پانل ژن‌ها، تمام اگزوم یا تمام ژنـــــوم) (۱۹) و برای بیومارکرهای mRNA شامل reverse transcription- PCR (۲۰) یا میکرواری (۲۰) می‌باشد.

صرف‌نظر از فرمت سنجش، سنجش بیومارکر جدید باید از نظر آنالیتیکال (تکنیکال) نیز اعتبارسنجی گردد. اعتبارسنجی آنالیتیکال تأیید می‌کند که روش مورد استفاده از نظر صحت، دقت، ویژگی، قدرت و ثبات در طی زمان واجد شرایط می‌باشد (۲۴،۲۳،۲۲،۱۸،۱۷). سایر خصوصیاتی که در ارزیابی یک روش کمی مانند ELISA یا PCR موردتوجه قرار می‌گیرند عبارتند از خطی بودن، پاراللیزیم، بازیابی و حساسیت عملی (تعریف دقیق این مفاهیم را در جدول یک ببینید).

جدول ۱

معیارهای موردقبول همه برای تعریف محدوده اکثر این متغیرها در حال حاضر وجود ندارد، معذلک به اظهار آکادمی ملی بیوشیمی بالینی آمریکا، در خصوص ایمونواسی‌های سرمی interassay cv باید کمتر از ۱۰٪ و نوسان within- assay کمتر از ۵٪ باشد (۷). داشتن دقت قابل‌قبول به‌ویژه در غلظت‌های بالینی اهمیت دارد. در مورد ایمونوهیستوشیمی، تکرارپذیری با درصد توافق بین دو آزمایشگر تعیین می‌شود(۲۵).

توافق بیشتر از ۸۵٪ عموماً قابل‌قبول تلقی می‌گردد (۲۵).

اطلاعات بیشتر در خصوص ویژگی‌های مترولوژیک را می‌توان در بیانیه ذیل یافت:

Stockholm Consensus Statement on quality requirements for laboratory medicine tests (۲۶).

غالباً ایجاد روش سنجش اولیه و اعتبارسنجی آن در آزمایشگاه تحقیقاتی (اعم از دانشگاهی یا صنعتی) اتفاق می‌افتد؛ جایی که تعداد نمونه‌ها کم است و برخلاف آزمایشگاه بالینی فوریتی برای ارائه نتیجه وجود ندارد (۲۷)، لذا اعتبارسنجی دیگری باید در آزمایشگاه بالینی که تعداد نمونه‌ها زیاد و سرعت جوابدهی مهم است، انجام پذیرد. علاوه بر این در خصوص آزمایش‌هایی که تعداد آن‌ها زیاد است مانند بیومارکرهای پروتئینی معمولاً لازم است که آزمایش بر روی دستگاه اتوماتیک تنظیم شود که این کار تقریباً همیشه در شرکت‌های تجاری انجام می‌شود (۲۷). بعد از اتوماسیون آزمایش، یک دور دیگر اعتبارسنجی هم توسط شرکت و هم توسط آزمایشگاه بالینی ضرورت دارد.

Diamandis و همکارانش خطرات احتمالی استفاده از روش‌های ایمونواسی غیرمعتبر و بی‌اعتبار را در سنجش بیومارکرها توصیف کرده‌اند (۲۹،۲۸). این صاحب‌نظر توصیه کرده است تا جهت تقلیل این احتمال، از شرکت‌های معتبر نسبت به خرید معرف‌ها اقدام کرده و خود نیز آن‌ها را اعتبارسنجی نموده و هرگونه مشکل احتمالی را گزارش کنیم. توصیه می‌شود که اعتبارسنجی آنالیتیکال هر بیومارکر در ابتدای ایجاد آن انجام شود (۳۰). این کار برای حصول اطمینان از این موضوع است که صحت لازم را در کاربرد بالینی خواهد داشت (۳۰).

در خصوص بیومارکرهایی که برای مصرف ایمن و مؤثر داروها ضرورت دارند(companion)، FDA پیشنهاد می‌کند که ساخت و اعتبارسنجی آن هم‌زمان با ساخت داروی مربوطه باشد (۳۱).

اعتبارسنجی بالینی آزمایش‌های بیومارکر

اعتبارسنجی بالینی می‌خواهد به این یقین برسد که بیومارکر، افراد را به گروه‌های مختلف تقسیم میکند، مثلاً گروه بیمار و سالم یا گروهی که پیش‌آگهی خوبی دارند و آن‌ها که در معرض عود بیماری هستند (۲۴،۱۸،۱۷). در آزمایش‌های تشخیصی، اعتبارسنجی بالینی با عبارت صحت تشخیص بیان می‌شود. شاخص‌هایی که برای توصیف صحت تشخیصی یک بیومارکر استفاده می‌شود عبارتند از: حساسیت نسبت به بیماری، ویژگی نسبت به آن بیماری، ارزش پیش‌بینی مثبت PPV، ارزش پیش‌بینی منفی NPV، نسبت احتمال (likelihood ratio) و آنالیز (ROC) (تعریف این مفاهیم را در جدول ۲ ببینید).

جدول۲

به‌طور ایده‌آل یک بیومارکر جدید باید پاسخگوی یک نیاز موجود در خصوص تشخیص سرطان یا مدیریت بیمار باشد. اگر بیومارکر جدید پاسخگوی یک نیاز برآورده‌نشده نباشد، حداقل باید درجاتی نسبت به بیومارکرهای قبلی برتری داشته باشد. بعنوان مثال دقیق‌تر، ساده‌تر، سریع‌تر یا ارزان‌تر باشد.

اعتبارسنجی بالینی سخت‌تر و زمان‌برتر از اعتبارسنجی آنالیتیکال است. در ابتدا باید بستر خاصی که بیومارکر در آن استفاده می‌شود تعریف گردد، بعنوان مثال اینکه برای چه نوع سرطانی کاربرد دارد و آیا بیومارکر در غربالگری، کمک به تشخیص، تعیین پیش‌آگهی، پیش‌بینی درمان یا پایش بیمار ایفای نقش خواهد نمود. پاسخ به این سؤالات از این جهت مهم است که مشخص می‌کند چه جمعیتی از افراد باید در اعتبارسنجی بالینی بکار گرفته شوند و خصوصیات آماری و قابل‌قبول بودن این اعتبارسنجی کدام‌ها هستند.

مشکلات اعتبارسنجی

سوءگیری (BIAS)

یکی از معمول‌ترین مشکلات در اعتبارسنجی بالینی سوءگیری یا تفاوت سیستماتیک بین گروه مورد آزمایش و گروه کنترل است. بنا به تعریف Ransohoff و Gourlay (۳۳،۳۲) سوءگیری عبارت است از "ارتباط نادرست سیستماتیک در مورد یک ویژگی از یک گروه که مقایسه آن را با گروه دیگر مختل می‌کند"، بنابراین سوءگیری ممکن است یافته‌های مثبتی را ایجاد کند که به واقعیت بالینی ربطی ندارد و لذا قابل تکرار هم نخواهد بود (۳۳،۳۲)، بعنوان مثال یک خطای رایج در مطالعات بیومارکرها این است که نمونه‌ها را از یک مخزنی که به‌راحتی در دسترس باشد جمع‌آوری می‌کنند در حالی که این نمونه‌ها از جمعیت‌های گوناگونی تهیه شده که سن، جنس، نژاد و سایر عوامل آن مشخص نیست و ممکن است ایجاد سوءگیری نماید، لذا تفاوت مقدار بیومارکر در دو گروه ممکن است به‌واسطه این عوامل و نه به‌واسطه بیماری باشد. یک منبع احتمالی دیگر در سوءگیری در مورد بیومارکرهای تشخیصی یا غربالی می‌تواند اختلاف در حمل‌ونقل، پردازش و نگهداری نمونه‌های بیماران و گروه کنترل باشد.

برای حذف سوءگیری در مطالعات اعتبارسنجی بالینی بیومارکرها پیشنهاد Pepe (۳۴) این است که قبل از تأیید تشخیص، نمونه‌های مربوط به بیماران و گروه کنترل جمع‌آوری شده و سپس بطور کورمال و نامشخص ارزیابی گردند. پس از آنکه نتایج داده‌ها مشخص شد نمونه‌های بیمار و گروه کنترل برای مطالعه انتخاب شوند. این راهکار تصادفی و گذشته‌نگر، مشکلات مربوط به نابرابری اولیه را تقلیل می‌دهد چرا که نمونه‌ها بدون اطلاع از وضعیت بیماری جمع‌آوری شده‌اند و انتخاب مشارکت‌کنندگان و جمع‌آوری نمونه کاملاً بی‌طرفانه بوده است (۳۴). علاوه بر این سوءگیری سیستماتیک را می‌توان با پردازش یکنواخت نمونه بیمار و کنترل حذف نمود. به نظر Pepe (۳۴) این روش را در ارزیابی بیومارکرهای غربالی، تشخیصی و پروگنوستیک می‌توان بکار گرفت.

Overfitting

این اصطلاح وقتی به کار می‌رود که یک مدل آماری خطای راندوم و نویز را به‌جای رابطه واقعی توصیف می‌کند. در مطالعات پروتومیک و ژنومیک هزاران متغیر را به‌طور همزمان می‌توان در تعداد نسبتاً کمی از بیماران اندازه‌گیری کرد. اطلاعات فراوانی که تولید شده است اغلب برای طراحی سیستمی (بیماری) استفاده می‌شود که داده‌ها از آن تولید شده‌اند. پس از آن این مدل‌ها اغلب برای پیش‌بینی پارامترهای مختلف از جمله عاقبت بیماری استفاده می‌شوند. راهکارهای آماری بی‌شماری (اغلب بر مبنای رگرسیون) وجود دارند که می‌توان از آن در ایجاد مدل برای سیستم‌های omics استفاده کرد، اما این راهکارها نسبت به Overfitting آسیب‌پذیر هستند. این پدیده منجر به یافته‌ها یا پیش‌بینی‌هایی در یک جمعیت مورد مطالعه می‌شوند که در جمعیت‌های دیگر قابل تکرار نیستند (۳۹-۳۷).

با استفاده از مطالعات اعتبارسنجی داخلی و خارجی مناسب می‌توان از این‌گونه اختلالات اجتناب کرد (۳۹-۳۷).

در اعتبارسنجی داخل باید جمعیت را به دو گروه مستقل تقسیم کرد؛ گروه اول یا گروه آموزش برای آموزش و ساختن مدل استفاده می‌شود و گروه دوم یا گروه اعتبارسنجی برای این است که ببینیم مدل ساخته‌شده در گروه اول در این هم کارآیی دارد یا نه. جمعیت هر دو مدل باید شبیه جمعیتی باشند که قرار است مدل در آن‌ها بکار گرفته شود.

علاوه بر این آزمایش‌ها را می‌توان اعتبارسنجی متقاطع (cross-validation) نمود. راهکارهای فراوان برای اعتبارسنجی متقاطع وجود دارند که به‌طور مشروح می‌توانند در منابع ۳۷ تا ۳۹ ملاحظه شوند.

اعتبارسنجی خارجی با یک جمعیت متفاوت نیز ضروری می‌باشد (۳۹-۳۷). در اینجا نیز مانند اعتبارسنجی داخلی نمونه‌های مورد استفاده باید شبیه جمعیت هدف باشد که تست در آن جمعیت استفاده خواهد شد (۱۷). هرچه اعتبارسنجی خارجی در مکان‌ها و زمان‌های بیشتری انجام شود استحکام و عمومیت مدل افزایش می‌یابد. برای اطمینان از صحت و استقلال برونداد حاصله، تعداد بیماران در گروه باید به حد کافی زیاد باشد تا مطالعه از استحکام آماری برخوردار گردد (۳۸).

چندگانگی (کثرت)

علاوه بر مشکلات بالقوه که در تحقیق در خصوص تعداد زیاد بیومارکرها مطرح شد، مشکلات آماری دیگری، به‌عنوان مثال در تحلیل زیرمجموعه‌های بیماری و نقطه پایانی آن (بقای کلی، بقای بدون پیشرفت بیماری، سرعت پاسخگویی، دوره پاسخگویی) ممکن است رخ دهد (۴۰). به نظر Berry (۴۰) چندگانگی‌ها فراوانند و می‌توانند خاموش (گزارش‌نشده یا تشخیص داده‌نشده) باشند. برای تعلیل مشکلات ناشی از چندگانگی ضروری است که پروتکل مکتوب از قبل تهیه شده و اهداف و روش‌های مطالعه را توضیح دهد. علاوه بر آن تمام مراحل طراحی‌شده باید انجام شده و هر کار انجام‌شده گزارش گردد.) ۴۰).

نشان دادن ارزش بالینی

اعتبارسنجی آنالیتیکال و بالینی برای بکارگیری یک تومورمارکر در کار بالینی استاندارد کافی نیست، علاوه بر این الزامات، آزمایش باید دارای ارزش بالینی باشد؛ یعنی اگر مراقبت بالینی بر اساس این تست انجام می‌شود عاقبت بیمار بهتر از وقتی باشد که این تست استفاده نمی‌شود. اگرچه تعداد زیادی از بیومارکرها از نظر آنالیتیکال و بالینی اعتبارسنجی شده‌اند، اما تعداد اندکی از آن‌ها واجد ارزش بالینی بوده‌اند (جدول ۳). در واقع از نظر تاریخی بیشتر بیومارکرها وارد حیطه کاربرد بالینی شده‌اند بی‌آنکه ارزش بالینی آن‌ها روشن شده باشد، اما در آینده، نشان دادن ارزش بالینی برای آنکه یک بیومارکر وارد چرخه تشخیص گردد ضروری است.

جدول ۳

اگر دلایل زیادی وجود داشته باشد که اندازه‌گیری یک بیومارکر می‌تواند نتیجه مدیریت بیمار را در مقایسه با عدم استفاده از آن بیومارکر بهبود بخشد، داشتن ارزش بالینی برای آن بیومارکر اثبات می‌شود (۴۲،۴۱،۲۴،۱۸،۱۷). به‌طور ایده‌آل بیومارکری ارزش بالینی دارد که سنجش آن منجر به درمانی شود که طول عمر بیمار را بدون تحمیل عوارض ناخواسته افزایش دهد. به دست آوردن چنین شواهدی نیازمند مطالعات وسیع و بیماران زیاد و صرف هزینه و زمان گزاف است.

اقدامات دیگری که برای بررسی نتیجه بکارگیری یک تومورمارکر پیشنهاد شده‌اند شامل افزایش فواصل بهبود از بیماری، کاهش هزینه مراقبت {(مثلاً به‌واسطه تشخیص زودهنگام، کاهش ویزیت داخل و بیرون از بیمارستان، کاهش روش‌های مهاجم، کنار گذاشتن درمان نامناسب یا افزایش کیفیت زندگی (استفاده کمتر از داروهای سمی)} می‌باشند (۱۸). نتیجه‌ای که در اینجا موردقبول همه باشد در حال حاضر وجود ندارد؛ مثلاً اینکه عملکرد یک بیومارکر باید منجر به درمانی شود که عمر بیمار را سه ماه یا شش ماه یا بیشتر افزایش دهد.

نشان دادن ارزش بالینی باید مبتنی بر فایده‌ای باشد که از نظر بالینی معنی‌دار و از نظر آماری مهم باشد. به‌طور ایده‌آل بیومارکرهای پروگنوستیک باید در بیمارانی بررسی شوند که درمان اجوانت سیستمیک دریافت نمی‌کنند و در صورتی که این امر ممکن نباشد در بیمارانی بررسی شود که درمان استاندارد برای بدخیمی دریافت می‌کنند. این ارزیابی در مطالعه آینده‌نگر بهتر انجام می‌شود، اما اگر مطالعه گذشته‌نگر دارای سوءگیری نباشد و از نظر آماری قوی باشد و روش‌های معتبر اندازه‌گیری بکار رفته باشد هم می‌تواند قابل‌قبول باشد (۴۸).

اگرچه استفاده از آزمایش تصادفی یا آینده‌نگر برای اعتبارسنجی ارزش بالینی، روش استاندارد طلایی است، اما این‌گونه مطالعات وقت‌گیر، هزینه‌بر و محتاج مقدار کثیری شرکت‌کننده می‌باشند.

در صورتی که اعتبارسنجی به‌وسیله مطالعه تصادفی آینده‌نگر ممکن نباشد شواهد لازم را می‌توان از مطالعه آینده‌نگر-گذشته‌نگر بدست آورد (۴۹)، اما در این صورت هشدارهایی وجود دارد که باید به آن‌ها توجه شود. در طراحی مطالعه آینده‌نگر– گذشته‌نگر باید از وجود شرایط ذیل مطمئن شد (۴۹):

- تعداد نمونه‌های بافتی آرشیوی کافی باشد تا به لحاظ آماری قابل اتکا باشد (۴۹).
- مشارکت‌کنندگان در آزمایش بیومارکر نماینده مشارکت‌کننده‌گان در آزمایش نهایی باشند.
- سنجش بیومارکر قبلاً از نظر پره‌آنالیتیکال و آنالیتیکال اعتبارسنجی شده باشند.
- پروتکل ارزیابی بیومارکر قبل از شروع هرگونه سنجش بر روی نمونه‌های آرشیوی، تدوین نهایی شده باشد.
- نتایج حاصل از نمونه‌های آرشیوی حداقل با نمونه‌های یکی از مطالعات مرتبط اعتبارسنجی شوند.

گرچه مطالعات اعتبارسنجی آینده‌نگر یا گذشته‌نگر برای نشان دادن فایده بالینی ترجیح دارند، اما همیشه برای بکارگیری یک بیومارکر جدید ضروری نیستند. به اعتقاد Lerd (۵) اگر بیومارکر جدید از نظر بالینی اختصاصی‌تر یا ایمن‌تر از بیومارکر قبلی باشد نیاز به مطالعه تصادفی نیست. اگر بیومارکر جدید حساس‌تر از بیومارکر قبلی باشد طبیعتاً موارد بیشتری از بیماری کشف می‌شود. در این صورت اطلاعات مطالعات قبلی که با بیومارکر قبلی انجام شده قابل استفاده برای موارد جدید کشف‌شده نخواهد بود. در این صورت ضروری است که مطالعه تصادفی جدیدی انجام شود تا کارآیی درمانی را در خصوص موارد جدیدی که توسط بیومارکر جدید کشف شده‌اند، بیازماید. راه دیگر تهیه شواهد و مدارک برای بیومارکر جدید، مطالعه سیستماتیک در کارهای قبلی انجام‌شده و متاآنالیز آن‌هاست. به‌طور ایده‌آل مطالعه سیستماتیک باید شامل مطالب چاپ‌شده و چاپ‌نشده، داده‌های مستقل بیماران (در صورتی که ممکن باشد) و مطالعاتی که روش‌های معتبر بکار گرفته‌اند، باشد. استفاده از مطالعات چاپ‌نشده هم برای جلوگیری از سوءگیری اهمیت دارد چرا که نتایج مثبت بیشتر از نتایج منفی احتمال چاپ شدن دارند. به اعتقاد Egger (۵۱) برای اثبات ارزش بالینی متاآنالیز باید در کنار یک مرور سیستماتیک انجام شود. چک‌لیست مفیدی برای ارزیابی کیفیت مطالعات چاپ شده است که در مرور سیستماتیک مطالعات صحت باید مورد استفاده قرار گیرد (۵۲).

گرچه داشتن ارزش بالینی جهت ورود یک بیومارکر جدید به عرضه روتین بالینی ضروری است، اما الزاماً منجر به پذیرش همگانی آن نمی‌شود، به‌خصوص اگر نمونه غیرروتین لازم داشته و روش کار آن مشکل و هزینه‌بر باشد.

تصویب قانونی

پس از اعتبارسنجی آنالیتیکال، اعتبارسنجی بالینی و نشان دادن ارزش بالینی، اخذ تأییدیه‌های قانونی الزامی است. روند اخذ تأییدیه قانونی جهت بیومارکرها در کشورهای مختلف فرق می‌کند. در آمریکا برای ورود بیومارکر به بازار دو راه وجود دارد:

۱- تأییدیه FDA

۲- انجام آزمایش در آزمایشگاهی که تأییدیه CLIA را دارد.

تست‌های بیومارکر از نظر FDA به‌عنوان تجهیزات پزشکی شناخته می‌شوند و از نظر تبعیت از مقررات قانونی مانند سایر تجهیزات پزشکی می‌باشند. تجهیزات پزشکی بر اساس نوع مصرف و ایجاد خطر برای بیمار به سه گروه تقسیم می‌شوند (۵۸)؛ گروه اول خطر کمی دارند و معمولاً از بررسی توسط FDA معاف هستند، اما شرکت سازنده باید آن را در FDA ثبت کند. گروه دوم خطر متوسطی دارند و قبل از عرضه به بازار توسط FDA بررسی می‌شوند. در صورتی که مدارک و شواهد ارسالی حاکی از آن باشد که این تجهیزات مشابه تجهیزاتی هستند که قبلاً تأییدیه FDA را گرفته‌اند، مورد تأیید قرار می‌گیرند. تجهیزات گروه سوم می‌توانند خطر بزرگی برای بیمار ایجاد کنند. تأیید این تجهیزات مستلزم بررسی شواهد اعتبارسنجی آنالیتیکال و بالینی بوده و باید مشخص شود که برای بیمار بی‌خطر و مفید هستند. در حال حاضر شواهد فایده بالینی جز در مورد بیومارکرهای companinon توسط FDA ضروری تلقی نمی‌شود.

گرچه دریافت تأییدیه FDA نشان می‌دهد که محصول موردنظر ایمن و قابل‌اطمینان است، اما فرآیند دریافت این مجوز زمان‌بر و گران است. این مسئله به‌ویژه برای مراکز آکادمیک و شرکت‌های کوچک چالش محسوب می‌گردد. درواقع اخذ مجوز FDA مانع دیگری بر سر راه عرضه بیومارکرها به بازار محسوب می‌شود.

راه دوم جهت ورود به بازار آمریکا به‌موجب مصوبه CLIA ۱۹۸۸ توسط مراکز خدمات درمانی تنظیم می‌گردد.

Laboratory Developed Tests (LDTs) آزمایش‌هایی هستند که معمولاً در همان آزمایشگاهی که ایجاد شده و اعتبارسنجی شده‌اند انجام می‌شوند. در حال حاضر انجام این آزمایش‌ها نیاز به تأیید FDA ندارد، اما این آزمایش‌ها درواقع در آزمایشگاه‌هایی انجام می‌شوند که خود آزمایشگاه توسط CLIA تأیید شده است.

گرچه شواهد اعتبارسنجی آنالیتیکال و بالینی برای انجام این آزمایش‌ها لازم است اما نیازی به اثبات فایده بالینی نیست، لذا در حال حاضر آزمایش‌های LDT ممکن است توسط پزشکان جهت تصمیم‌گیری استفاده شوند بی‌آنکه ارزش بالینی آن‌ها اثبات شده باشد.

اخیراً FDA اعلام کرده که قصد دارد آزمایش‌های LDT را نیز تحت نظارت خود درآورد تا از ایمنی و اعتبار نتایج آن‌ها مطمئن شود (۵۹). اولین تست‌های LDT که مشمول این تصمیم خواهند شد تست‌های پرخطر نظیر بیومارکرهای companion خواهند بود.

این تغییرات مطابق توصیه‌های Hayes و همکارانش است که قبلاً منتشر شده‌اند و به شرح ذیل می‌باشند (۴):

- FDA باید تمام فرآورده‌های انکولوژیک شامل داروها و بیومارکرها را در یک بخش بررسی کند.
- تأیید بیومارکرها باید شامل شواهد اعتبارسنجی بالینی و ارزش بالینی باشد.
- نشان دادن ارزش بالینی توسط مطالعه‌ای همچون آزمایش بالینی آینده‌نگر یا آزمایش آینده‌نگر– گذشته‌نگر برای اخذ تأیید ضروری است.

- FDA باید برای تست‌های LDT از جمله تومورمارکرها احتیاط‌های لازم را در نظر بگیرد و مطمئن شود که آن‌ها تحت کنترل‌های قانونی FDA قرار دارند.
- FDA باید توصیه کند که آزمایش‌های داروهای ضدسرطان همراه با یک مجموعه از نمونه‌هایی باشد که در حین آزمایش‌ها جمع‌آوری و نگهداری شده‌اند. هزینه این اقدام باید توسط شرکت‌های سرمایه‌گذار تأمین شود.

در اروپا ورود بیومارکرها به بخش بالینی مستلزم دریافت تأییدیه Conformite´ Europeenne (CE) است. این تأییدیه مبین آن است که سازندگان اظهار کرده‌اند که محصول آن‌ها الزامات رهنمودهای جامعه اروپا را دارا می‌باشد. گرفتن گواهی CE هم توسط خود سازنده و هم توسط مؤسسه ذیصلاح دیگر در کشورهای اتحادیه اروپا امکان‌پذیر است.

اگرچه در حال حاضر اتحادیه اروپا بیومارکرهای همراه (companion) را جزء تجهیزات کم‌خطر می‌داند، اما قوانین اعطای تأییدیه به آن‌ها در حال بررسی مجدد است (۶۰). احتمال می‌رود این محصولات در زمره محصولات با خطر متوسط یا بالا طبقه‌بندی شوند. در این صورت ارزیابی تأییدیه باید توسط یک مؤسسه صاحب صلاحیت انجام شود و شواهد ارزش بالینی نیز موردنیاز خواهد بود (۶۰).

ارزیابی پس از ورود به بازار

ارزیابی بیومارکرها نباید پس از بکارگیری آن‌ها در عرصه بالینی متوقف شود (۱۸)، بنابراین ضروری است ثابت شود که عملکرد یک بیومارکر در آزمایشگاه روتین حداقل با عملکرد آن در زمان ساخت اولیه برابری می‌کند. از طریق برنامه‌های سخت کنترل کیفی داخلی و خارجی می‌توان به این هدف دست یافت. یک مثال برای ارزیابی پس از بازار که منجر به بهبود آزمایش شد، HER2 در پیشگویی پاسخ به trastuzumab بود (۱۳).

اثر تست‌های بیومارکر علاوه بر محیط‌های تحقیقاتی و آزمایش‌های بالینی باید بطور مستمر در بخش بالین مورد ارزیابی قرار گیرد (۶۱)، به‌عنوان مثال با توسعه تکنولوژی باید این سؤال مطرح شود که آیا یک بیومارکر خاص هنوز ارزش بالینی خود را حفظ کرده است یا اینکه روش‌های جدید باید جایگزین گردند. مطلب دیگری که باید پایش گردد این است که آیا بیومارکر در همان حوزه‌ای که ابتدا اعتبارسنجی شده مورد استفاده واقع می‌شود یا نه.

بنابراین اگر بیومارکری برای پایش بیمار طراحی شده، بدون اعتبارسنجی جداگانه نباید در حوزه غربالگری بکار گرفته شود. این اتفاقی است که در مورد PSA رخ داده است. نهایتاً اینکه اگر بیومارکر جدیدی جایگزین بیومارکر قبلی شده آیا باید بیومارکر قبلی را کنار گذاشت؟ یک مثال در این خصوص اسید فسفاتاز پروستاتیک بود که پس از آمدن PSA کنار گذاشته شد.

ثبت و گزارش مطالعات بیومارکر

اعتقاد بر این است که طراحی و گزارش‌دهی بسیاری از مطالعات بیومارکرها بسیار ضعیف می‌باشند. فقدان جزئیات در خصوص انتخاب بیماران و کنترل‌ها و پردازش نمونه‌ها، استفاده از روش‌های سنجش نامناسب و آنالیز آماری نامناسب از جمله نقاط ضعف این گونه طراحی و گزارش‌دهی‌ها می‌باشند (۶۲)، از طرف دیگر تحقیقاتی که نتایج مثبت به بار می‌آورند بیش از تحقیقات با نتایج منفی به چاپ می‌رسند که این خود موجب نوعی سوءگیری می‌شود.

به‌منظور نشان دادن این نقایص و بهبود مطالعات مربوط به بیومارکر، اخیراً مرکزی برای ثبت بیومارکرها ایجاد شده که هدف آن ارائه ثبت‌نام تمام مطالعات تکمیل‌شده و در حال اجرا در خصوص بیومارکرهای سرطانی می‌باشد و نیز می‌خواهد محققین با تحقیقات تکمیل‌شده اما انتشارنیافته در این خصوص آشنا شوند (۶۴)، همچنین این پایگاه داده‌ها اطلاعات مربوط به بیومارکرها که نتیجه منفی داشته و چاپ نشده‌اند را در اختیار می‌گذارد (۶۵). این اقدامات به کاهش سوءگیری در آماده‌سازی مطالعات متاآنالیز و مرورهای سیستماتیک کمک می‌کند.

کیفیت و شفافیت مطالعات بیومارکرها با بهبود گزارش‌دهی آن‌ها افزایش می‌یابد. سردبیران تعدادی از مجلات پزشکی درخواست کرده‌اند که روش‌های آزمایشگاهی بکاررفته و پردازش نمونه‌ها به‌طور مشروح در مطالعات بیومارکرهای بالینی ذکر شوند (۶۶).

این اطلاعات شامل نوع نمونه موردسنجش، نحوه جمع‌آوری و نگهداری، دستگاه و روش اندازه‌گیری، کارآیی سنجش در طی مطالعه (مثل عدم دقت، محدوده گزارش) و منشأ محدوده مرجع بکاررفته می‌شوند. تمام داده‌های خام هم باید در دسترس عموم قرار گیرد تا محققین مستقل بتوانند آن‌ها را مورد تجزیه و تحلیل و تفسیر مجدد قرار دهند (۱۷).

دستورالعمل‌ها و چک‌لیست‌های متعددی در سال‌های اخیر منتشر شده‌اند (جدول ۴). پیروی از این دستورالعمل‌ها در گزارش تمامی مراحل مطالعات بیومارکر توصیه می‌شود.

ضروری است که محققین، مؤلفین و بررسی‌کننده‌ها این دستورالعمل‌ها را سریعاً مورد استفاده قرار دهند.

جدول۴

نتیجه

گرچه گزارش‌های متعددی درباره اعتبارسنجی بیومارکرها منتشر شده (۷۸،۴۴،۴۳،۳۴،۲۷،۱۸،۱۷)، اما مقاله فعلی یکی از جامع‌ترین آن‌ها در ابعاد گوناگون بحساب می‌آید. این طرح پیشنهادی برای بیومارکرها اعم از خونی یا بافتی است و در تمام مراحل قابل اجرا است. از آنچه که شرح داده شد مشخص می‌گردد که فرآیند ایجاد یک بیومارکر بالینی مفید بسیار طولانی و هزینه‌بر است و مستلزم همکاری افراد گوناگون اعم از محققین دانشگاهی، پزشکان بالینی، متخصصین آزمایشگاهی، آمارگران زیستی، مراجع قانونی و کارکنان بالینی و علمی در شرکت‌های دارویی و تشخیصی است. در گذشته هزینه‌های گزاف و اوقات زیادی صرف تولید بیومارکرهایی شد که نهایتاً هیچ ارزش بالینی نداشتند. بکارگیری روشی که در این مقاله توضیح داده شد کمک می‌کند که در آینده مطالعات مربوط به بیومارکرهای سرطانی، مؤثرتر و کارآمدتر باشند. با این اقدامات دقیق و سختگیرانه همه افراد ذینفع و به‌ویژه بیماران منتفع خواهند شد.

این مقاله ترجمه‌ای است از:

Biomarkers:
A Position Statement from the European Group on
Tumor Markers
Michael J. Duffy, Catharine M. Sturgeon, Gy◌rgy S◌le ´ tormos, Vivian Barak,
Rafael Molina,
Daniel F. Hayes, Eleftherios P. Diamandis, and Patrick M.M. Bossuyt8

Clinical Chemistry 61:6
809–820 (2015)

منابع: