فصل سوم

فناوری‌های نوپدید

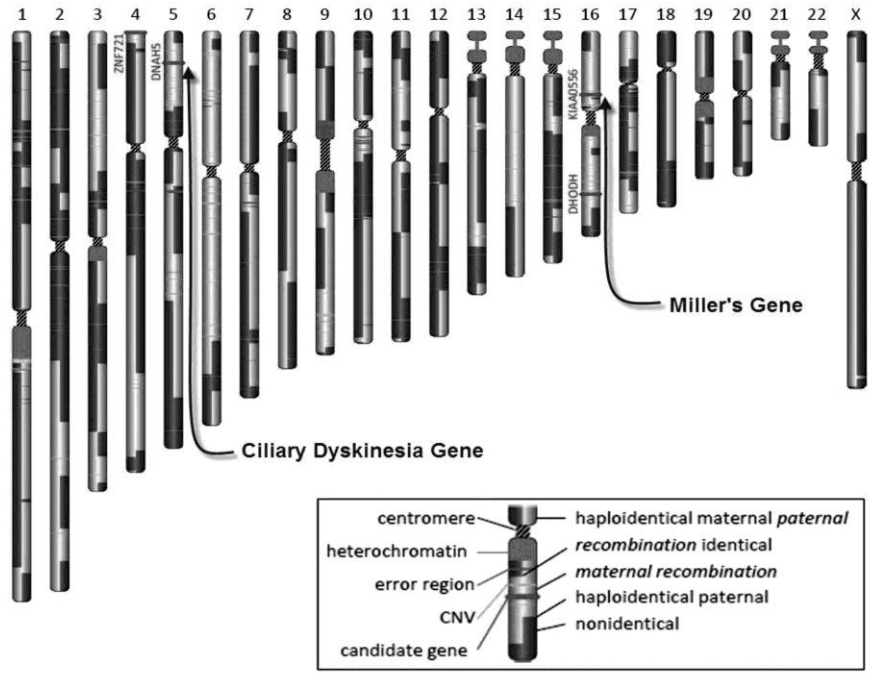
مطالعه‌ی مسائل مرز شکن در دانش بیولوژی و یا پزشکی و بیماری، مطالعات را به نقطه‌ای میل می‌دهد که به فناوری‌های نوینی نیاز خواهد بود تا ابعاد فضای داده‌های بیماران را آشکار نمایند. در اینجا به چند فناوری نوپدید مرزشکن برای پیشرفت پزشکی سیستمی، نگاه خواهیم افکند.

توالی یابی ژنوم خانوادگی[1]

باز توالی یابی خانواده‌ها، یک ابزار انقلابی در پزشکی و ژنتیک انسانی در آینده خواهد بود. در مطالعه‌ی آقای هود و همکاران وی، نخستین خانواده که توالی یابی شد یک خانواده‌ی چهار نفره بود که والدین آنها طبیعی بودند ولی هر کدام از بچه‌ها دچار یک بیماری ژنتیکی متفاوت بودند. فرضیه‌ی اولیه‌ی این پژوهشگران آن بود که با توالی یابی ژنوم تمام اعضاء چهار نفره‌ی این خانواده می‌توان تعداد ژن‌های کاندید برای بیماری‌های ژنتیکی را به صورت چشمگیری کاهش داد. با انجام توالی یابی خانواده و دیگر خانواده‌ها، آنان توانستند از توالی یابی ژنوم خانوادگی جهت حذف بیش از ۷۰ درصد از خطاهای توالی یابی در یک خانواده‌ی چهار نفره و ۹۰ درصد از خطاها در یک خانواده شش نفره استفاده کنند. افزون بر این آنان توانستند تنوع‌های نادر را بلافاصله شناسایی کنند؛ زیرا این تنوع‌های نادر در دو یا چند عضو خانواده وجود داشتند و از این قرار بسیار نامحتمل بود که خطاهای توالی یابی[2] باشند. این موضوع مهم است، زیرا

---

[1] Family Genome Sequencing
[2] Sequencing Errors



تصـــویر ۲۶ - یک نقشـــه‌ی کروموزومی یکی از فرزندان با بیماری ژنتیکی مورد مطالعه که ژن‌های کاندید احتمالی برای بیماری را نشـــان می‌دهد.

تنوع‌های نادر، منشـــاء بســـیاری از بیماری‌ها هســـتند. افزون بر این، حقیقتاً هاپلوتیپ‌های تمام اعضـاء خانواده با دقت چشمگیری آشکار شدند.

اهمیـت ابزاری ژنومیکس خانوادگی در توانایی آن در کاهش چشمگیر ابعاد فضای جستجوی کروموزومی، برای ژن‌های بیمار است. با جستجو برای ژن‌های بیمار، ما می‌توانیم به آســـانی بلاک‌های هاپلوتیپی[1] که افراد بیمار به اشـتراک گذاشـته و از افراد طبیعی متفاوتند را شـــناســـایی نماییم. این را نیز باید در نظر داشـــت که ژن‌های بیمار می‌بایست در چنین مناطقی ساکن باشند. هود و همکاران وی در یک چنین خانواده‌ای، فضـــای جسـتجو را به ۰/۱ درصـد کاهش دادند. چنین کاهشی این اجازه را به پژوهشگران می‌دهد تا ژن‌ها را در مابقی DNA جـانمـایی کنند. در خانواده‌ی چهار نفره‌ای که

[1] Haplotype Blocks

گفته شد، پژوهشگران توانستند چهار کاندید ژنی بیمار را شناسایی کنند و از این رو نسبتاً ساده بود تا بتوان ژن‌های بیمار که هر کدام از این دو بیماری ژنتیکی را کدگذاری می‌کردند، شناسایی نمود (تصویر ۲۶).

در آینده‌ی نزدیک، توالی یابی خانوادگی یک پایه‌ی پرونده‌ی پزشکی برای هر کدامیک از ما خواهد بود. هزینه‌ی توالی یابی در حال کاهش است و در گذری ۵ ساله به زیر یک هزار دلار خواهد رسید. نسل سوم فناوری‌های توالی یابی با استفاده از اندازه گیری‌های فیزیکی تک ملکولی[1] این اجازه را به ما خواهد داد تا توالی‌هایی به طول "۱۰,۰۰۰ تا ۱۰۰,۰۰۰ جفت - باز" را در یک زمان بخوانیم. در نتیجه، سرعت توالی یابی یک ژنوم انسانی بسیار شدید خواهد بود (در حد ۱۵ دقیقه)، و هزینه نیز به زیر ۵۰۰ دلار خواهد رسید.

تمام افراد از توالی یابی ژنوم سود خواهند جست. سود در شناسایی "تنوع‌های ژنی کارکرد پذیر[2]" نهفته می‌باشد. این ژن‌ها، ژن‌های ناقصی[3] هستند که اثرات منفی سلامت را موجب می‌شوند و تداخلات پزشکی برای برگردان اثرات آنها در دسترس است. برای مثال چنانچه توالی یابی، نقص در حامل ویتامین دی که موجب آغاز زودرس پوکی استخوان می‌شود را آشکار کند، یک راه حل در دسترس، مصرف دوزاژ عظیم ویتامین دی برای درمان پوکی استخوان خواهد بود. آقای هود و همکاران وی تقریباً ۳۰۰ تنوع ژنی با نفوذ بسیار بالا را یافت کرده‌اند که در گروه "تنوع‌های ژنی کارکرد پذیر" جای می‌گیرند. توالی یابی ژنوم، یک سرمایه‌گذاری در یک زمان است و هنگامی که ژنوم توالی یابی گردید، می‌توان آن را هر سال برای ژن‌های کارکرد پذیر شناخته شده‌ی جدید مورد پویش قرار داد. توالی یابی یک سرمایه‌گذاری هوشمند برای بهبودی و بهینه‌سازی سلامت و اجتناب از بیماری است.[4]

پروتئومیکس

پروتئوم، مکمل کامل پروتئین‌های یک سازمان زیستی (مانند یک فرد، یک ارگان، یک سلول، خون و

---

[1] Single-Molecule Physical Measurements
[2] Actionable Gene Variants
[3] Defective
[4] Hood L. Systems Biology and P4 Medicine: Past, Present, and Future. Rambam Maimonides Med J 2013; 4: e0012.

غیره) می‌باشد. پروتئین‌ها چندین سیمای ویژه دارند که آنها را از DNA متمایز نموده و آنالیز آنها را بیشتر پیچیده می‌سازند.

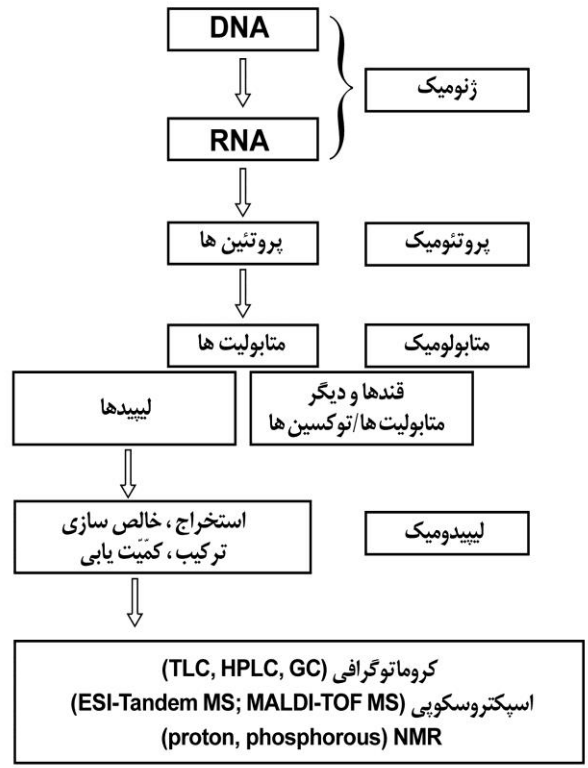
نخست آنکه DNA در ماهیت دیجیتالی است (برای مثال، کروموزوم‌ها، رشته‌های دیجیتالی Gs، Cs، As وTs با رخنمودی دیپلوئیدی در هسته هستند)؛ در حالیکه پروتئین‌ها، افزون بر اینکه ترجمان اطلاعات دیجیتالی از ژنوم را به صورت رشته‌های ۲۰ آمینواسیدی در خود دارند، با اطلاعات آنالوگ نیز توأم می‌باشند (برای مثال، آنها به ساختارهای سه بعدی پیچیده، تنیده می‌شوند و ممکن است در یک سازمان فضایی، مانند خون، به تعداد یک یا چند کپی و یا حتی 10^{10} کپی از آنها وجود داشته باشند). به زبان دیگر، در حالی که حدود ۲۰ هزار ژن کد کننده‌ی پروتئینی در ژنوم انسان وجود دارد، ممکن است میلیون‌ها پروتئین وجود داشته باشد، زیرا پروتئین‌ها (ترجمه شده از mRNA) می‌توانند توسط بسیاری از فرایندهای بیولوژیکی (پس از آنکه ژنوم نسخه برداری شد) مورد تغییر و تعدیل قرار گیرند (شامل ویرایش RNA، RNA splicing، فرآوری پروتئین و تعدیل شیمیایی).

همچنین پروتئین‌ها پویا هستند و اغلب ساختارهای سه بُعدی خود را در زمینه‌ی عملکرد بیولوژیک خود تغییر می‌دهند و از این روبه تغییرات محیطی پاسخ می‌دهند. پروتئین‌های همراه با ملکول‌های زیستی دیگر و متابولیت‌ها، حیات را معنا داده و از این رو، نسبت به DNA یا RNA به فنوتیپ نزدیک‌تر هستند.

یک رهیافت نیرومند جهت مطالعه‌ی کمّی و کیفی پروتئین‌ها در مخلوط‌های پیچیده (مانند بافت‌ها، خون، سلول‌ها و غیره)، به کارگیری اسپکتروسکوپی جرمی است. پروتئین‌ها از دیگر ترکیبات تخلیص می‌شوند و با آنزیم‌هایی مانند تریپسین هضم شده تا پپتیدها تولید شوند و سپس این پپتیدها مورد آنالیز (برای مثال توالی یابی) قرار گرفته و در اسپکترومتر جرمی بررسی کمّی می‌شوند.

در ابتدا از اسپکتروسکوپی جرمی به شیوه‌ی Shotgun جهت شناسایی و اندازه‌گیری پروتئین‌ها در مخلوط‌های پیچیده به کار برده می‌شد ولی سریعاً آشکار شد که اغلب موارد، بیشتر پپتیدهای آنالیز شده، آنهایی هستند که از پروتئین‌های غالب در مخلوط بر می‌خیزند.

بر این بنیان، یک رهیافت نوین به نام



تصویر ۲۷ - گذار از ژنومیک به لیپیدومیک از طریق پروتئومیک و متابولومیک

پروتئومیکس هدفمند[1] طراحی گردید که می‌توان پپتیدهایی که به صورت ویژه یک پروتئین را تعریف می‌نمایند، مورد شناسایی قرار داد و راب موریتز[2] در بنیاد بیولوژی سیستمی با همکاری با رودی آبرسولد[3] در ETH، اخیراً ۳ تا ۶ آزمون پپتیدی[4] را برای هر ۲۰ هزار پروتئین انسانی شناسایی کرده‌اند. این آزمون‌ها در پایگاه داده‌ای که به صورت آزاد، دسترس پذیر برای همه‌ی دانشمندان است، گذاشته شده‌اند. از این رو، پروتئومیکس هدفمند (همانند پروژه‌ی ژنوم انسانی که منش دموکراتیک پیشه نموده بود) خط مشی دموکراتیک را از خود نمایان ساخته است. این آزمون‌های پروتئومیکس هدفمند، ابزارهای نیرومندی در آنالیز بیولوژیک و شناخت مکانیسم‌های بیماری‌ها خواهند بود و رهیافت‌های نیرومندی را برای شناخت مارکرهای زیستی بیماری‌ها فراهم خواهند آورد.

در آینده ما خواستار خلق آزمون‌های پروتئینی هستیم که قادر باشد هزاران پروتئین از یک بخش از یک قطره‌ی خونِ صدها میلیون بیمار را مورد آنالیز قرار دهد. اسپکتروسکوپی جرمی، قابلیت توسعه جهت چنین

[1] Targeted Proteomics
[2] Rob Moritz
[3] Ruedi Abersold
[4] Peptide Assays

ابعاد آنالیزی را ندارد. برای مثال، این گونه می‌توان تصور نمود که ما می‌توانیم احتمالاً ۵۰ پروتئین خونی ویژه‌ی ارگـانی را از هر ۵۰ ارگـان انســانی، در یک مقیاس دو سالانه[1] مورد آنالیز قرار دهیم. یک چیپ الیزای پروتئینی میکروفلوئیـدیک[2] که می‌تواند ۵۰ اندازه گیری را در ۵ دقیقه در ۳۰۰ نانولیتر خون به انجام برساند توسط یکی از پیشـگامان، به نام جیم هیس طراحی و سـاخته شده است. برای گسترش آن ۵۰ اندازه‌گیری به ۲۵۰۰ اندازه گیری (۵۰×۵۰)، ما به توســعه‌ی گونه‌های نوین عوامل تسخیر پروتئین[3] برای آزمون‌های الیزا نیاز داریم.[4]

متابولومیکس

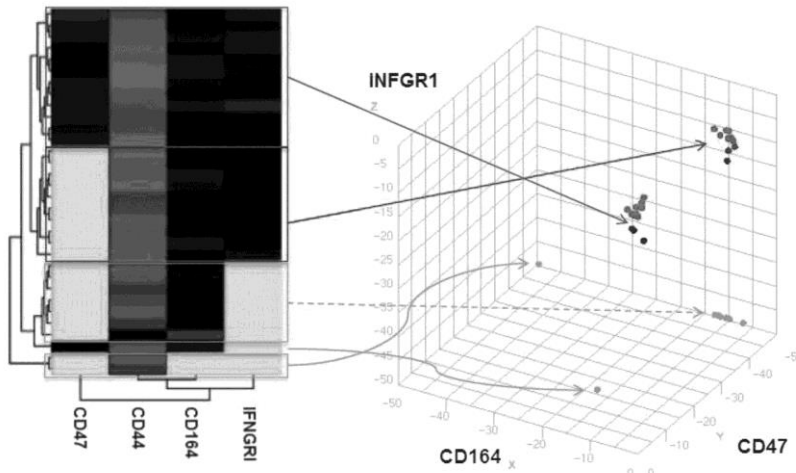
شیوه‌ی اسپکتروسکوپی جرمی، یک روش انتخابی برای تعیین متـابولوم افراد بیمـار اســـت. هم اکنون اســپکتروســکوپی جرمی یا LC ممزوج شــده با GC می‌توانند ۵۰۰ -۳۰۰ متابولیت مانند اسیدهای آمینه، اســـیدهـای چرب، نوکلئوتیدها و بســـیاری دیگر از ملکول‌های کوچک را آشکار نماینپد.

آیـا انـدازه‌گیری‌هـای کمّی هدفمند و غیرهدفمند متابولیت‌ها، نزدیک‌ترین نما را از فنوتیپ بازتاب خواهند داد؟ پاسخ این پرسش هنوز در پرده‌ی ابهام است.

هم اکنون در شــرایط in vivo، شــیوه‌هایی که ارگانیسم به صورت "کلی" مورد پژوهش قرار می‌گیرد، با کاربرد ایزوتوپ‌های پایدار که پیگیری ســرنوشــت و میزان نرخ متـابولیـت‌های هر فرد، اندازه‌گیری رفت و آمد متابولیت‌ها و میزان آنزیم‌ها امکان پذیر می‌نمایند، در حال توســعه می‌باشــند. این روش‌ها می‌توانند به صورت فزاینده‌ای اطلاعاتی را پیرامون پیشرفت بیماری و مکانیســم‌های فیزیولوژیک و پاتوفیزیولوژیک جبرانی و سازگارمند ارائه دهند. هم اکنون روش‌های بر پایه‌ی اسپکتروسکوپی جرمی با حس‌گرهای آرایه‌ای شناخت الگو[5] کـه ترکیبـات ارگـانیک فرّار را در هوای بازدمی

---

[1] Biannual
[2] Microfluidic Protein ELIZA Chip
[3] Protein-Capture Agents
[4] Agusti A, Sobradillo P, Celli B. Addressing the complexity of chronic obstructive pulmonary disease: from phenotypes and biomarkers to scale-free networks, systems biology, and P4 medicine. Am J Respir Crit Care Med 2011; 183: 1129-37.
[5] Pattern-Recognition Array-Sensors



تصـــویر ۲۸ - آنالیز تک ســـلولی (Single Cell Analysis) مربوط به ۳۲ ســـلول گلایو بلاســـتوما که نشـــانگر خوشـــه‌ی ترانس کریپتومی به سه گروه کوانتیده شده (Quantized) متمایز است.

شـــناســـایی می‌نمایند در حال تکمیل هســـتند و این شـــیوه‌های جدید می‌توانند امضـــاء ملکولی ویژه‌ی هر بیمـاری[1] را تعیین نمـایند. بینی‌هـای الکترونیکی[2]، ابزارهـای تشـــخیصـــی غیرتهـاجمی بوده کـه نتایج نویدگری را نشـــان داده‌اند (برای مثال در شـــناســـایی زودرس بیماری‌هایی همچون ســـرطان شـــُش و افتراق میان آسم و COPD).[3]

آنالیزهای تک سلولی[4]

هم اکنون جیم هیس[5] در کـالتـک[6] در حـال

---

[1] Disease-Specific Molecular Signature
[2] Electronic Noses
[3] Hood L, Balling R, Auffray C. Revolutionizing medicine in the 21st century through systems approaches. Biotechnol J 2012; 7: 992-1001.
[4] Single Cell Analyses
[5] J. Heath
[6] Caltech

توسعه‌ی یک ابزار میکروفلوئیدیک[1] است که می‌تواند نمونه‌ی خون را گرفته، گلبول‌های سفید را جدا کرده و سلول‌ها را به ۱۰ جمعیت ناهمبسته تقسیم نماید. با این فناوری، آنگاه ما می‌توانیم هر تیپ سلول جداگانه را با در نظر گرفتن ترانس کریپتوم‌ها و پروتئوم‌های آن مورد پژوهش قرار دهیم. گلبول‌های سفید که از این طریق جدا می‌شوند، می‌توانند به عنوان یک ابزار تشخیصی نیرومند برای پدیده‌های عمومی، التهاب، پاسخ‌های ایمنی و دیگر پاسخ‌های بیولوژیکی مانند پروتئین‌های خونی ویژه‌ی هر ارگان (که پیش از این گفته شد) به کار برده شوند.

آنالیز تک سلولی که در انستیتو بیولوژی سیستمی انجام گردید نشان داد که در سلول‌های سرطانی، جمعیت‌های سلولی کوانتیده شده[2] وجود دارد. پژوهشگران این انستیتو، تک تک سلول‌های خط سلولی گلیوبلاستومای انسانی را برداشته و آنالیز تک سلولی بر روی آنها انجام دادند. آنها ۳۲ سلول را مورد پویش قرار دادند و ۲۴ نسخه‌ی گوناگون را کمّی‌سازی کردند و آنها را در فضای چند بعدی بر طبق کمّی‌سازی[3] ترانس کریپتوم‌های آنها نقشه بندی کردند (تصویر ۲۹). سه جمعیت کوانتیده شده مطلق مورد شناسایی قرار گرفتند که شامل ۳۰ سلول از ۳۲ سلول بررسی را شامل می‌شدند.

هنوز ایده‌ای در مورد اهمیت زیستی این سه خوشه‌ی کوانتیده وجود ندارد ولی اگر تمام تومور هوموژنیزه و مورد توالی قرار گیرد، سیگنال (پیام) در میان صدا[4] از دست می‌رود.

اخیراً پژوهشگران انستیتو بیولوژی سیستمی، تک سلول‌ها را در یک تومور گلیوبلاستوما مورد بررسی قرار دادند و وجود جمعیت‌های سلولی کوانتیده را مورد تأیید قرار دادند. در آینده نگاه به آنالیزهای تک سلولی برای سرطان و دیگر بیماری‌ها بسیار ضروری خواهد بود. این تیپ آنالیز تک سلولی را می‌توان در سطح پروتئین و همچنین در سطح رونوشت (ترانس کریپت) نیز انجام داد. این پژوهشگران در همکاری با جیم هیس، پروتئومیکس تک سلولی را

---

[1] Microfluidic
[2] Quantized Cell
[3] Quantification
[4] Noise

توسعه دادند. هیس توانسته است به ۱۰ هزار سلول تک نگریسته و حدود ۲۰ پروتئین ترشحی، به ازای هر سلول را در یک دوره‌ی زمانی نسبی، مورد کمّی‌سازی قرار دهد. در هر صورت یکی از پرسش‌های بنیادین که می‌توان با آنالیز تک سلولی پاسخ داد آن است که چه تعداد جمعیت ناهمبسته (کوانتیده شده) از سلول در یک بافت یا ارگان زیست می‌کنند. هنگامی که آنالیزهای تک سلولی انجام می‌شوند، ملکول‌های سطحی سلولی منحصر به فرد را می‌توان مورد شناسایی قرار داده و از این طریق جداسازی جمعیت‌های کوانتیده و گونه بندی سلولی امکان پذیر می‌گردد. آنگاه سلول‌های این جمعیت‌های کوانتیده شده را می‌توان مورد بررسی قرار داد تا یافت شود که چگونه آنها به پیام‌های محیطی و بر هم کنش‌های دیگرِ برخاسته از جمعیت‌های کوانتیده پاسخ می‌دهند.

می‌توان آنالیزهای تک سلولی (برای مثال چه مقدار از هر کدام جمعیت‌های کوانتیده شده در تومورها وجود دارند) و یا با جداسازی ده گانه‌ی گلبول‌های سفید را جهت شناخت بیماری‌ها به کار برد. شاید بتوان این را مورد جستجو قرار داد که چگونه این گونه تقسیم بندی‌ها می‌توانند در تشخیص بیماری‌ها مؤثر آیند. پیش بینی می‌شود که آنالیزهای تک سلولی، به شکل ژرفی، درک ما را از سلامت و بیماری دچار تحول سازند.[1]

سلول‌های بنیادی پرتوان القاء شده[2]

سلول‌های بنیادی پرتوان القاء شده (ips) را می‌توان از منابع گوناگونی، همچون فیبروبلاست‌ها و سلول‌های خونی سفید برداشت نمود و به شکل بی‌انتهایی آنها را بسط داد. یک شرکت سلول‌های بنیادی تحت عنوان "دینامیک سلولی[3]" به شکل رایج می‌تواند سلول‌های ips را از سلول‌های خونی سفید خلق کرده و سپس آنها را به چهار تیپ سلولی تمایز دهد (مانند سلول‌های عصبی، سلول‌های ماهیچه‌ای قلبی، سلول‌های اندوتلیالی و هپاتوسیتی) که ۹۹ درصد خالص هستند.

پژوهشگران انستیتو بیولوژی سیستمی تمایل

---

[1] Hood L. Systems Biology and P4 Medicine: Past, Present, and Future. Rambam Maimonides Med J 2013; 4: e0012.
[2] Induced Pluripotent Stem Cells
[3] Cellular Dynamics, Inc. www.cellulardynamics.com

دارند تا آنالیز تک سلولی را جهت مطالعه‌ی فرایند تمایز سلول‌های عصبی، به صورت کامل به کار برند. آنان این سلول‌ها را در زمان تمایز سلولی در هشت نقطه‌ی زمانی، مورد آنالیز قرار می‌دهند. جمعیت‌های سلولی کوانتیده شده را با آنالیز تک سلولی شناسایی کرده و سپس آنالیز کامل امیکس[1] را بر روی هر جمعیت کوانتیده شده به انجام می‌رسانند. از این رو جهت انجام چنین پژوهش‌هایی آنها به مقادیر عظیمی از سلول‌های آغاز کننده نیاز دارند که می‌توانند آنها را از جمعیت‌های بزرگ سلول‌های ips که توان تمایز به یکی از چهار فنوتیپ دارند، به دست آورند.

پژوهشگران در تلاش هستند تا سلول‌های ips را از بیماران دچار دژانرسیون عصبی[2] خلق نموده و سپس سلول‌های ips بیماران را در شرایط آزمایشگاهی in vitro به نرون‌ها تمایز دهند. آنگاه تلاش می‌شود تا بیماری‌های پیچیده‌ای همچون آلزایمر را به ترتیب ویژه‌ای طبقه بندی نمایند. فرایند تمایز عمده‌ترین کلاس‌های نرونی را فراهم می‌آورد و سپس سلول‌ها با روش‌های دسته بندی سلولی پیشرفته دسته بندی می‌شوند. در پژوهش‌های آینده هرکدام از این جمعیت‌های سلول‌های عصبی کوانتیده از طریق پیام‌های محیطی، لیگاندها، RNAi و داروها تحت اثر قرار داده شده و مورد بررسی قرار می‌گیرند. فرضیه‌ی حاکم آن است که هر منظر کوانتیده‌ی بیماری آلزایمر، ترکیبی متفاوت از شبکه‌های آشوب زده با بیماری را نمایان خواهد کرد. از این رو، پیام‌های هر گروه از دیگر گروه‌ها متفاوت خواهد بود و به شکل منحصر به فردی تیپ ویژه‌ی آلزایمر را مورد شناسایی قرار می‌گیرد. با اتمام این روند، توالی یابی ژنوم خانوادگی جهت طبقه بندی بیماری آلزایمر به تیپ‌های گوناگون بیماری نیز انجام خواهد شد. سپس یافته‌های طبقه بندی، در دسترس شرکت‌های دارویی قرار خواهند گرفت تا این شرکت‌ها، داروهای گوناگون که هم اکنون در دسترس بیماران آلزایمری است را بر روی تیپ‌های ویژه این بیماری مورد آزمایش قرار دهند. امید بر آن است که داروهای ویژه بر روی یک یا چند زیرتیپ

[1] Omics
[2] Neurodegenerative Disease

بیماری بیشـــتر اثر گذار باشـــند و از این رو پیامدهای بهتری را برای بیماران فراهم کنند.[1]

تصویر برداری

اطلاعـات فضـــایی و زمـانی، کلیـد توســـعه‌ی مدل‌های بیماری خواهند بود که اجازه‌ی شـــناســـایی اجزاء "شـــبکه‌ی کارکرد پذیر[2]" را فراهم می‌آورند. به این دلیـل، فنـاوری تصـــویربرداری با محتوا و قدرت تشخیص بالا توسعه یافته تا تفسیر فرایندهای سلولی و ملکولی بیماری امکان پذیر گردیده و در نهایت این فناوری‌های پیشرفته با شیوه‌های تشخیصی ملکولی و سیستم‌های پشتیبانِ تصمیمات پزشکی نیز یکپارچه خواهند شد.[3]

[1] Hood L. Systems Biology and P4 Medicine: Past, Present, and Future. Rambam Maimonides Med J 2013; 4: e0012.
[2] Actionable Network
[3] Hood L, Balling R, Auffray C. Revolutionizing medicine in the 21st century through systems approaches. Biotechnol J 2012; 7: 992-1001.