

گرماسنجی روبش دمایی: ابزاری نوین در شناسایی و تشخیص بیماری‌ها

علی اکبر موسوی موحدی^{۱*}، راضیه کرمزاده^۱، مجتبی امانی^۲، سارا موسوی دوست^۱

۱- تهران، دانشگاه تهران، مرکز تحقیقات بیوشیمی و بیوفیزیک

۲- تهران، دانشگاه تهران، قطب علمی بیوترمودینامیک

۳- اردبیل، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل

پیام نگار: moosavi@ut.ac.ir

چکیده

در علم پزشکی تشخیص زودرس، ارزان و سریع بیماری‌ها از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. از جمله روشهای تشخیصی که امروز توجه زیادی را به خود جلب کرده است، استفاده از نشانگرهای زیستی در قالب روشهای پروتئومیکس است. اگرچه بکارگیری این روشها، مشکلات بسیاری را حل کرده است، اما گران بودن و زمان‌بر بودن و همچنین عدم قابلیت شناسایی کمپلکس‌های پروتئینی از جمله نواقص این روشها است. روش گرماسنجی روبش دمایی به دلیل دقت و حساسیت بالا روشی مؤثر در تشخیص مراحل اولیه بیماری از طریق ردیابی نشانگرهای زیستی است. نمودار گرمایی نمونه افراد سالم، به عنوان امضای زیست‌شناختی اختصاصی بیانگر مجموع وزنی تغییرات ساختار پروتئین‌های تشکیل‌دهنده نمونه در حالت سلامت و بیماری است. گرچه قضاوت قطعی درباره کارایی این روش نیازمند بررسیهای بیشتر است، اما مطالعات حاضر بیانگر کاربرد این روش در زمینه تشخیص نوع، مرحله بیماری و حتی بررسی روند بیماری‌ها بوده و مکمل مناسبی برای روشهای پروتئومیکس محسوب می‌شود. در این مقاله به کاربرد گرماسنجی روبش دمایی در پزشکی همراه با شرح مبانی نظری و عملی آن پرداخته می‌شود.

کلمات کلیدی: گرماسنجی روبش دمایی، سرطان، نشانگر زیستی، روش تشخیص حساس، تشخیص زود هنگام بیماری،

تغییر ساختار پروتئین

۱- مقدمه

می‌شود [۱]. تشخیص زود هنگام بیماری در برخی بیماری‌ها از قبیل سرطان‌ها، در کیفیت زندگی و طول عمر بیمار تأثیر شگرفی خواهد داشت. مطالعات بسیاری در این زمینه صورت پذیرفته است؛ با وجود این، امروزه روش‌های شناسایی معمول، فوری قادر به تشخیص مراحل اولیه سرطان‌ها نیستند. به عنوان نمونه در مورد شایع‌ترین شکل سرطان کبد، کارسینومای سلول‌های کبدی که سومین عامل مرگ ناشی از سرطان محسوب می‌شود، تنها ۵٪ از موارد درمان از

هدف پزشکی ارتقای سلامت، حفظ و بازگرداندن تندرستی و کاهش رنج و ناتوانی است. یکی از مهمترین مراحل نیل به این هدف، جلوگیری از گسترش بیماری در مراحل اولیه وقوع آن از طریق بکارگیری روش‌های پُر بازده در تشخیص زود هنگام بیماری و اتخاذ راه‌های درمانی مناسب است. همواره تحقیقات وسیعی در زمینه شناسایی زود هنگام، کم هزینه، آسان و دقیق بیماری‌ها اتخاذ

طریق جراحی با موفقیت روبه می‌شوند. این درحالی است که طول عمر متوسط فرد بیمار از زمان تشخیص بیماری ۴ تا ۸ ماه است. علت اصلی مرگبار بودن این سرطان تشخیص دیرهنگام بیماری است. روش‌های تشخیصی موجود نظیر رزونانس مغناطیسی هسته ای و اولتراسوند قادرند بدخیمی‌های نئوپلاستیک بزرگتر از ۲ سانتی متر را شناسایی کنند. به عبارت دیگر بیماری زمانی تشخیص داده می‌شود که تا حد زیادی پیشرفت کرده باشد [۲]. از این رو موسسه ملی سرطان^۱ آمریکا که از موسسات پیشرو در زمینه تحقیقات سرطان است، هدف چالش برانگیز خود را تا سال ۲۰۱۵ ردیابی و تشخیص زود هنگام سرطان‌ها قرار داده است. این بدان معنا است که دانش پزشکی هنوز با بکارگیری فناوری‌هایی که بتواند بدخیمی‌ها را در مراحل اولیه ردیابی و شناسایی کند فاصله زیادی دارد [۳]. در کنار سرطان‌ها، تشخیص زودهنگام بسیاری از بیماری‌های ژنتیکی، خود ایمن‌اند و نقص ایمنی نیز در افزایش کیفیت زندگی افراد مبتلا مؤثر خواهد بود. از این بیماری‌ها می‌توان به روماتیسم مفصلی، بیماری لوپوس و لایم اشاره کرد [۳].

از آنجایی که در ابداع روش‌های تشخیصی مسئله غیرتهاجمی^۲ بودن نیز مد نظر می‌باشد، در میان گستره روش‌های تشخیص بیماری، معمول ترین روش تشخیص، بررسی مایعات زیستی از قبیل خون، مایع مغزی- نخایی) است. پلاسماي خون انسان، با برخورداری از بیش از ۳۰۰۰ پروتئین و پپتید، حاوی اطلاعات ارزشمندی از نوع و میزان بیماری است. ۹۰٪ از پروتئین‌های پلاسما شامل ۱۰ پروتئین است که سرآمد آنها آلبومین، فیبرینوژن، ترانسفرین و ایمونوگلوبولین‌ها هستند و حدود ۹٪ از کل پروتئین‌های پلاسما را ۱۲ پروتئین از جمله آپولیپوپروتئین‌های A و B تشکیل داده‌اند. ۱٪ از پروتئین‌های خون که اقلیت پروتئوم پلاسما را تشکیل داده‌اند، شامل مجموعه‌ای از پپتیدهای کوچک موسوم به "پپتیدوم"^۳ هستند که امروزه به عنوان نشانگرهای زیستی مهم در تشخیص بیماری‌ها به حساب می‌آیند. بررسی ۹۹٪ از پروتئین‌های فراوان پلاسما از طریق روش‌های الکتروفورز پروتئین سرم^۴ و همچنین ارزیابی ایمونوشیمیایی^۵ امکان پذیر است [۴]. این روش‌ها با تفکیک

پروتئین‌های فراوان پلاسما بر اساس بار، وزن مولکولی و اندازه، اطلاعات ارزشمندی را در زمینه میزان و توزیع پروتئین‌های پلاسما در اختیار پزشکان قرار می‌دهد [۵]. تحقیقات انجام شده بر روی بیماری‌های مختلف نشان می‌دهد که بسیاری از پروتئین‌های فراوان پلاسما در مراحل اولیه بیماری‌ها از قبیل سرطان، تغییر محسوسی نمی‌کنند. بنابراین این روش‌ها برای تشخیص زودهنگام سرطان‌ها مناسب نیستند. به همین دلیل، محققان بدنبال روش‌های جدیدی برای بررسی تغییرات احتمالی در محتوای پلاسما در مراحل اولیه بیماری‌هایی از قبیل سرطان می‌باشند. اطلاعات بدست آمده با بکارگیری روش‌های طیف نگاری جرمی و الکتروفورز دو بعدی نشان داده است که ۱٪ از پروتئوم پلاسما، موسوم به پپتیدوم، به هنگام وقوع بیماری و حتی در مراحل اولیه آن، حاوی اطلاعات ارزشمند و دقیقی در خصوص نوع و مرحله بیماری است [۶]. از سوی دیگر مطالعات انجام شده توسط این دو روش بیانگر احتمال میانکنش این پپتیدها با پروتئین‌های فراوان پلاسما (۹۹٪) می‌باشد. اگرچه بکارگیری روش‌های طیف نگاری جرمی^۶ و الکتروفورز^۷ دو بعدی بدلیل برخورداری از حد تفکیک بالا، رویکرد جدیدی را در زمینه بررسی پپتیدوم به میان می‌آورد، اما این روش‌ها بطور کامل قادر به بررسی پپتیدوم نیستند [۷ و ۸]؛ چرا که حین تخلیص پپتیدوم برای بررسی‌های طیف نگاری و الکتروفورز دو بعدی، بسیاری از این پپتیدها بدلیل میانکنش با پروتئین‌های غالب پلاسما به همراه آنها از محیط حذف می‌شوند. از سوی دیگر، بررسی میانکنش احتمالی پپتیدوم با پروتئین‌های فراوان پلاسما موسوم به "interactome" از طریق این دو روش امکان پذیر نمی‌باشد [۵].

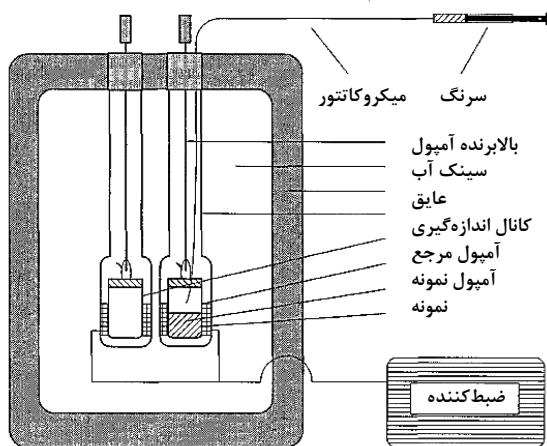
در سال ۲۰۰۷ میلادی، Garbett و همکارانش با استفاده از روش گرماسنجی روبش دمایی رویکرد نوینی را در بررسی پروتئوم، پپتیدوم و اینترکتوم پلاسما معرفی نمودند [۹].

۲- گرماسنجی روبش دمایی (DSC): روش جدید تشخیص بیماری‌ها

گرماسنجی روبش دمایی^۸ از روش‌های بیوشیمی فیزیک به حساب می‌آید [۱۰]. گرماسنجی روبش دمایی در سال ۱۹۶۰ توسط واتسون

1. National Cancer Institute (NCI)
2. Non-Invasive
3. Peptidome
4. Serum Protein Electrophoresis
5. Immuno-Chemical Assays

6. Mass Spectroscopy
7. 2D-Electrophoresis
8. Differential Scanning Calorimetry (DSC)



شکل ۱- طرح اجمالی ساده از یک گرماسنج جاروب تفاضلی [۸]

فرایندهایی که تحت القای دما می‌باشند، در محفظه حاوی نمونه زیست‌شناختی انجام می‌شود. این امر یک عدم تعادل گرمایی بین محفظه حاوی نمونه و محفظه شاهد بوجود می‌آورد که گرمکن‌های بازخوردی^۸ آن را جبران خواهند کرد. این گرمکن‌ها با انرژی الکتریکی کار می‌کنند، بنابراین خروجی دستگاه یک توان الکتریکی است که با ظرفیت گرمایی ظاهری نمونه و شاهد ارتباط مستقیم دارد. پس از پیدا کردن خط پایه^۹ و نرمالیزه کردن داده‌ها، نمودار رسم می‌شود که تغییرات ظرفیت گرمایی ویژه نمونه را در برابر دما نشان می‌دهد. چنین نموداری را نمودار گرمایی یا ترموگرام^{۱۰} می‌نامند. حجم نمونه لازم برای دستگاه DSC در حدود ۰/۵ میلی لیتر و غلظت پروتئین لازم (۲-۲۰) میلی گرم بر میلی لیتر است. اغلب دستگاه‌های DSC زیست‌شناختی در محدوده دمایی (۱۰-۱۲۰) درجه سلسیوس کار می‌کنند [۱۲، ۱۳].

در این مقاله، گرماسنجی، روبش دمایی به‌عنوان یک روش جدید و حساس برای شناسایی نشانگرهای زیستی پروتئینی و در نهایت تشخیص بعضی از بیماری‌ها معرفی می‌گردد.

۳- کاربرد گرماسنجی روبش دمایی در بیماری‌ها از طریق بررسی پروتئوم پلاسمای خون:

در این قسمت بطور خلاصه به کاربردهای گرماسنجی روبش دمایی در بررسی پروتئوم پلازما پرداخته می‌شود:

8. Feedback Heater
9. Baseline
10. Thermogram

و اونیل^۱ توسعه یافت و در سال ۱۹۶۳ در همایش شیمی تجزیه و طیف‌سنجی کاربردی در پیتزبورگ به صورت تجاری عرضه شد. این روش که یک روش تجزیه حرارتی (ترموانالیتیکال) بسیار قدرتمند است، تغییرات کوچک دمایی بین نمونه و شاهد را به عنوان تابعی از دما نشان می‌دهد. گرماسنجی روبش دمایی با حساسیت بالا^۲ روشی قدرتمند و جدید در ارزیابی انرژی، اندرکنش و ساختار بیوماکرومولکول‌ها می‌باشد. این روش توسط پریوالو^۳ جهت مطالعه تغییر ساختار فضایی متعادل بیوماکرومولکول‌ها در محلول‌های خیلی رقیق بکار گرفته شد. امروز شرکت‌های مختلفی بر اساس روش پریوالو دستگاه‌های گرماسنجی روبش دمایی با حساسیت بالا را عرضه نموده‌اند. مزیت دیگر گرماسنجی روبش دمایی با حساسیت بالا مدت نسبتاً کوتاه آزمایش و مصرف نسبتاً کم مواد است. در اغلب موارد سرعت مناسب روبش در گرماسنجی روبش دمایی با حساسیت بالا امکان انجام آزمایش‌های واسرشتگی^۴ بیوماکرومولکول‌ها و پروتئین‌ها در حالت نیمه ایستا را فراهم می‌آورد. بدین معنی که در طی روبش، توزیع تعادلی بیومولکول‌ها بین حالت‌های طبیعی و واسرشته در دماهای مختلف حاصل می‌شود. این وضع امکان پدید می‌آورد که از تئوری‌های اصیل و گسترده ترمودینامیکی، برای تفسیر داده‌های گرماسنجی روبش دمایی با حساسیت بالا استفاده شود. با استفاده از گرماسنجی روبش دمایی، مقدار "ظرفیت حرارتی جزئی"^۵ یک پروتئین و یا مخلوطی از آنها به صورت تابعی از دما با دقت بالا تعیین می‌گردد. آنالیز این تابع در محدوده واسرشتگی پروتئین این امکان را فراهم می‌آورد تا دمای واسرشتگی، آنالپی و میزان افزایش ظرفیت حرارتی پروتئین و یا مخلوطی از آنها را در یک آزمایش بدست آید.

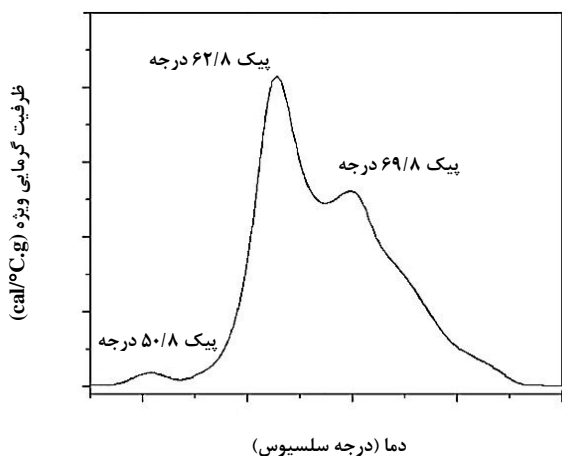
همان‌طور که در شکل (۱) نشان داده می‌شود دستگاه گرماسنجی روبش دمایی دارای دو محفظه می‌باشد. محفظه حاوی نمونه^۶ که در آن نمونه زیست‌شناختی به صورت یک محلول آبی وارد می‌شود و محفظه شاهد^۷ با بافر مشابه پر می‌شود. به هر دو محفظه با سرعتی مشابه که کاملاً کنترل شده است، گرما داده می‌شود. با افزایش دما

1. E. S. Watson & M. J. O'Neill
2. High Sensitive Differential Scanning Calorimetry (HS-DSC)
3. Privalov, L.
4. Unfolding
5. Partial Heat Capacity
6. Sample Chamber
7. Reference Chamber

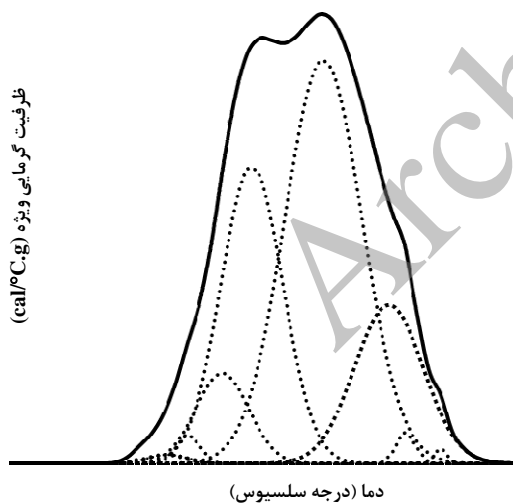
۳-۱ نمودار گرمایی پلاسمای افراد سالم

در سال ۲۰۰۷ میلادی برای اولین بار گروهی از دانشگاه لوئیزیولا^۱ از روش گرماسنجی روبش دمایی برای بررسی نمودار پروتئومیک پلاسمای خون افراد سالم استفاده کردند [۵]. منحنی نمودار گرمایی بدست آمده از سرم افراد سالم اگرچه به سن، جنس و نژاد افراد بستگی دارد، اما نمودار گرمایی پلاسمای افراد سالم از الگوی مشابهی پیروی می‌کند. در نمودار گرمایی پلاسمای افراد سالم که در شکل ۲ به طور نمونه نشان داده شده است همواره سه پیک مشاهده می‌شود؛ پیک اول در دمای ۵۰/۸ درجه، پیک دوم در دمای ۶۲/۸ درجه و پیک سوم در دمای ۶۹/۸ درجه سلسیوس می‌باشد. سطح زیر منحنی که آنتالپی واسرشته شدن پروتئین‌های پلاسمای را در بازه دمایی ۴۵ تا ۹۰ درجه سلسیوس نشان می‌دهد، $(5/02 \pm 0/23)$ کالری بر گرم می‌باشد. میانگین عددی پیک‌ها (ممان اول) برای منحنی نمودار گرمایی افراد سالم ۶۷/۵ درجه سلسیوس است [۱۳]. از آنجا که پلاسمای مخلوطی پیچیده حدود ۳۰۰۰ پروتئین و پپتید می‌باشد، پس منحنی نمودار گرمایی مشاهده شده جمع نمودارهای گرمایی هر یک از پروتئین‌های تشکیل‌دهنده پلاسمای است [۱۳]. بنابراین می‌توان نمودار گرمایی بدست آمده را به نمودارهای گرمایی مجزا برای هر پروتئین بر اساس غلظت هر یک در پلاسمای تفکیک کرد. این کار با استفاده از الگوریتمی به نام دکانوله شدن^۲ (تجزیه پیک به زیر پیک) صورت می‌گیرد، این الگوریتم اثر دکانوله شدن را بر داده‌ها نشان می‌دهد. این الگوریتم یک اپراتور (عملگر) ریاضی است که در آن دو تابع f و g تابع سومی می‌سازند. شکل (۳) نمودار گرمایی تفکیک شده به نمودار گرمایی ۱۲ پروتئین پلاسمای را برای افراد سالم، نشان می‌دهد. در این رویکرد فرض بر این است که هیچ اندرکنشی بین این پروتئین‌ها به گونه‌ای که بر واسرشته شدن آنها تأثیر گذار باشد، وجود ندارد. پیک ۵۰/۸ درجه سلسیوس مربوط به پروتئین فیبرینوژن^۳ است، پیک بلند ناحیه ۶۲/۸ درجه سلسیوس واسرشته شدن سرم آلبومین^۴ بدون لیگاند است و البته پروتئین هاپتوگلوبین^۵ نیز در پیدایش این پیک سهیم می‌باشد. پیک ۶۹/۸ درجه سلسیوس و شانه‌هایی که در دماهای بالاتر دیده می‌شوند اساساً

مربوط به ایمونوگلوبولین G^۶ می‌باشند [۱۳]. به طور کلی شدت پیک‌های نمودار گرمایی در مردان بیشتر از زنان است که به دلیل اختلاف در غلظت پروتئین‌های سرمی بین افراد مذکر و مونث می‌باشد. این نوع تفاوت‌ها در نژادهای مختلف نیز دیده می‌شود که از یک سو بیانگر دقت و حساسیت زیاد گرماسنجی روبش دمایی و از سوی دیگر بیانگر نیاز به انتخاب کنترل مناسب در بررسی بیماری‌ها با این روش است [۳].



شکل ۲- نمودار شماتیک: نمودار گرمایی افراد سالم [۹]



شکل ۳- نمودار گرمایی پلاسمای یک فرد عادی ایرانی (خط توپر)، این نمودار گرمایی به زیر پیک‌های پروتئین‌های فرضی (خطوط نقطه چین) تفکیک شده‌اند.

1. Louisville
2. Deconvolution
3. Fibrinogen
4. Human Serum Albumin (HSA)
5. Haptoglobin

6. IgG

۲-۳-۲ نمودار حرارتی پلاسمای افراد بیمار

در مطالعه‌ای که توسط گاربت^۱ و همکارانش در سال ۲۰۰۸ صورت گرفت، منحنی نمودار گرمایی پلاسمای بیماران مبتلا به ۷ بیماری مرتبط با ایمنی و بدخیمی مورد بررسی قرار گرفت. این بیماری‌ها شامل روماتیسم مفصلی^۲، لوپوس^۳، بیماری لایم^۴، سرطان‌های تخمدان، بافت رحم^۵، پوست (ملانوما)^۶ و ریه بود [۳].

۲-۳-۱ نمودار گرمایی پلاسمای افراد مبتلا به روماتیسم مفصلی

بر اساس این مطالعه، نمودار گرمایی روماتیسم مفصلی اختلافات فاحشی با منحنی نمودار گرمایی پلاسمای افراد سالم نشان می‌دهد (برای مشاهده این نمودار گرمایی به مرجع ۱۳ رجوع شود). در افراد بیمار پیک دمای ۶۲/۸ درجه سلسیوس که مربوط به پروتئین آلبومین است به شدت کاهش می‌یابد و منحنی به سمت دماهای بالاتر جابه جا می‌شود [۱۳].

۲-۳-۲ نمودار گرمایی پلاسمای افراد مبتلا به لوپوس و بیماری لایم

در بررسی نمودار گرمایی افراد مبتلا به بیماری لوپوس نیز این نمودار گرمایی با نمودار مشابه سرم افراد سالم، ممان اول از دمای ۶۷/۵ درجه سلسیوس در افراد سالم به دمای ۷۱/۵ درجه سلسیوس در افراد مبتلا به لوپوس تغییر پیدا می‌کند. (برای مشاهده اختلاف بین نمودار گرمایی افراد مبتلا به بیماری لوپوس و افراد سالم به مرجع ۱۳ رجوع شود) پیک ناحیه دمای ۶۱ درجه سلسیوس با بالارفتن سطح پروتئین هاپتوگلوبین در پلاسمای افراد مبتلا به لوپوس تطابق دارد [۱۳ و ۳].

در افراد مبتلا به بیماری لایم شکل منحنی نسبت به افراد کنترل، و حتی دیگر بیماران، متفاوت است و ممان اول نمودار گرمایی بالاتر از حد معمول و برابر دمای ۷۳/۱۵ درجه سلسیوس است (برای مشاهده این نمودار گرمایی به مرجع ۱۳ رجوع شود) [۱۳].

1. Garbett
2. Rheumatoid Arthritis
3. Systemic Lupus Erythematosus
4. Lyme Disease
5. Endometrium
6. Melanoma

۲-۳-۳ انسداد ریوی مزمن^۷

بیماری انسداد ریوی مزمن، اصطلاحی است که برای انسداد مزمن مجاری هوایی ناشی از آمفیزم، برونشیت مزمن، آسم، یا ترکیبی از این اختلالات به کار می‌رود. بروز این بیماری بطور مرتب در حال افزایش است و مردان بیشتر از زنان دچار این بیماری می‌شوند (بدلیل اعتیاد بیشتر مردان به سیگار) [۱۵]. تغییرات در منحنی دمایی افراد مبتلا به بیماری انسداد ریوی مزمن ممکن است هم به دلیل تغییر در غلظت پروتئین‌های عمده سرم و هم اندرکنش بین پروتئین‌ها و لیگاندها باشد. در این بیماری نیز همانند بیماری‌های دیگر پیک دمایی حرارت زا به سمت دماهای بالاتر جابجا شده و همزمان با کاهش پیک دمای ۶۲ درجه سلسیوس، افزایشی در پیک دمای ۷۰ درجه سلسیوس مشاهده می‌شود، بعلاوه در بیماری انسداد ریوی مزمن ممان اول نمودار گرمایی به سمت دماهای بالاتر حرکت می‌کند که این ممان در حالت خفیف بیماری در دمای ۶۵/۳ درجه سلسیوس و در حالت شدید بیماری در دمای ۶۷/۶ درجه می‌باشد [۱۵]. از آنجایی که غالباً افراد مسن به بیماری انسداد ریوی مزمن مبتلا می‌شوند افراد کنترل در این مطالعه با سن بالای ۴۹ سال انتخاب شده اند که به طور جزئی منحنی نمودار گرمایی سرم این افراد با منحنی گزارش شده توسط گابریل و همکارانش متفاوت است، این تفاوت ممکن است ناشی از عدم حضور فیبرینوژن در سرم، تفاوت در حلال بکار رفته جهت رقیق سازی سرم و یا سن بالای افراد کنترل باشد (برای مشاهده این نمودار گرمایی به مرجع ۱۵ رجوع شود).

۲-۳-۴ سرطان رحم

در مورد سرطان رحم، ممان اول نمودار گرمایی مربوط به مرحله IV B سرطان رحم در مرجع ۱۴ دمای ۶۷/۸ درجه سلسیوس است. در این بیماران پیک دمایی مربوط به آلبومین کاهش یافته و یا به سمت دماهای بالاتر جابجا می‌شود. از آنجایی که میزان آلبومین در محدوده غلظت نرمال می‌باشد و الگوی الکتروفورزی نیز تغییر چندانی نشان نمی‌دهد، بنابراین، این جابجایی ممکن است ناشی از پایداری بیشتر آلبومین بواسطه اتصال لیگاندها باشد. پیک شاخص در دمای ۶۱ درجه سلسیوس که با جابجایی پیک مربوط به آلبومین ظاهر می‌شود احتمالاً مربوط به هاپتوگلوبین است [۱۴]

7. COPD: Chronic Obstructive Pulmonary Disease

شناسایی و تشخیص زودهنگام در سرطان رحم همانند همه سرطان‌ها از اهمیت بالایی برخوردار است. آیا گرماسنجی روبش دمایی قادر است بین فازهای مختلف یک بیماری تمایز قایل شود؟ برای پاسخ به این سؤال گاربت و همکاران در سال ۲۰۰۹ بر روی کارسینومای گردن رحم^۱ که طبق آمار انجمن سرطان آمریکا [۳] دومین سرطان رایج در میان زنان است، متمرکز شدند. این سرطان از نوعی بدخیم به نام CIN^۲ آغاز می‌شود، که بر اساس ویژگی‌های بافت شناسی به ۳ مرحله تقسیم می‌شود: CIN1 یا نوع خفیف، CIN2 یا نوع معتدل و CIN3 یا نوع شدید. قابلیت پیشرفت این نوپلازی و تبدیل شدن به سرطان گردن رحم بر اساس درجه بندی CIN متفاوت است و بالاترین احتمال تبدیل شدن به سرطان گردن رحم را داراست. CIN3 و CIN2 از آنجا که پتانسیل بیشتری برای تبدیل شدن به سرطان بدخیم را دارند به عنوان "ضایعه مرتبط با سلول‌های درون پوششی سنگفرشی با درجه بالا" یا در اصطلاح HSIL^۲ طبقه بندی می‌شوند. در حال حاضر زنانی که آزمایش پاپ اسمیر^۴ غیر طبیعی دارند برای اطمینان از اینکه در چه مرحله ای از CIN قرار دارند نیازمند انجام آزمون‌های تکمیلی نظیر نمونه برداری (کولپوسکوپی^۵ یا بیوپسی) هستند. روش‌های تشخیصی کنونی نمی‌تواند به آسانی و به سرعت مراحل اولیه بیماری را شناسایی کند. جهت دست یابی به روشی که قادر به تشخیص میان مراحل اولیه و مراحل پیشرفته کارسینوما باشد، پلاسمای خون ۴۳ مراجعه کننده به مرکز سرطان براون^۶ بوسیله گرماسنجی روبش دمایی مورد آنالیز قرار گرفت. (برای مشاهده نمودار گرمایی بدست آمده برای افراد سالم، HSIL و مبتلا به سرطان گردن رحم به مرجع ۳ مراجعه شود). نتایج بدست آمده بیانگر تغییر نمودار گرمایی افراد مبتلا به HSIL یا کارسینومای گردن رحم نسبت به افراد طبیعی است و همانند سایر حالات بیماری، دامنه پیک در دمای ۶۲/۸ درجه سلسیوس کاهش یافته و در دمای ۶۹/۸ درجه سلسیوس افزایش پیدا می‌کند، با این وجود منحنی نمودار گرمایی برای هر یک از حالات HSIL و کارسینومای گردن رحم کاملاً اختصاصی است به گونه‌ای که می‌توان دو حالت

1. Invasive Carcinoma of Uterine Cervix
2. Cervical Intraepithelial Neoplasia
3. High Grade Squamous Intraepithelial Lesion
4. Pap Smear
5. Colposcopy
6. Brown Cancer Center

بیماری را از هم تفکیک کرد [۳].

گاربت و همکاران گرماسنجی روبش دمایی را در نمونه‌های پلاسمای مربوط به بیماران مبتلا به سرطان اندومتر، تخمدان، ریه و بیماری ALS نیز مورد بررسی قرار دادند. این تحقیقات افق‌های تازه‌ای در زمینه بررسی پروتئوم پلازما گشود. نمودار گرمایی پلازما مربوط به این بیماران را می‌توان در مرجع ۳ مشاهده کرد؛ برای این اساس بطور خلاصه، نمودار گرمایی افراد بیمار بطور معنی داری به سمت دماهای بالاتر جابه جا شده است [۳].

۳-۲-۵- بیماری لوسمی لنفاتیک مزمن (CLL)^۷

روگالینسکا^۸ و همکارانش در سال ۲۰۰۹، از روش گرماسنجی روبش دمایی در بررسی روند بهبود بیماری CLL قبل از و حین درمان با آنالوگ‌های پورینی استفاده نمودند [۱۶].

در بیماری CLL روند رشد و نمو لنفوسیت‌ها به درستی انجام نمی‌گیرد و تعداد بسیار زیادی از آنها تولید می‌شوند. اگر چه آنها ممکن است ظاهر طبیعی داشته باشند ولی مبارزه با عفونت‌ها را به طور مناسب انجام نمی‌دهند. لنفوسیت‌های نابالغ را می‌توان در خون و در مغز استخوان مشاهده نمود. تجمع لنفوسیت‌های نابالغ در بافت‌های لنفوی منجر به بزرگ شدن آنها می‌شود. نکته دیگر اینکه مقدار زیاد این سلول‌ها باعث کاهش سایر سلول‌های خونی می‌شود، بطوریکه کم خونی ناشی از کاهش تولید گلبول‌های قرمز (برای حمل اکسیژن) عارض می‌گردد. از سوی دیگر کاهش تعداد پلاکت‌ها منجر به اختلال در فرآیند انعقاد خون شده و باعث خونریزی و کبودی می‌گردد. لوسمی می‌تواند حاد (دارای رشد سریع و سلول‌های نابالغ زیاد) یا مزمن (رشد آهسته و سلول‌های بالغ دارای ظاهری طبیعی) باشد. لوسمی لنفوسیتی مزمن دارای رشد آهسته و معمولاً در افراد بالای ۶۰ سال اتفاق می‌افتد. مراحل اولیه بیماری معمولاً بدون علامت است و با گذشت زمان تعداد بیشتری لنفوسیت ساخته می‌شود و در نتیجه علائم بیماری ظاهر می‌گردد [۱۶]. از آنجائی که اغلب تغییرات در CLL مربوط به لنفوسیت‌های نوع B می‌باشد، این بیماری را CLL B می‌نامند. لازم به ذکر است که لنفوسیت نوع B در ایمنی همورال (عمدتاً سنتز آنتی بادی) نقش دارد. علائم بیماری CLL B خیلی متنوع است و علی‌رغم تلاش‌های

7. CLL: Chronic Lymphocytic Leukemia
8. Rogalinska

میزان این پروتئین‌ها و در نتیجه درمان با این داروهاست. در این افراد میزان پروتئین‌های ضد مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی (bcl-2) و (Mcl-1) با مصرف داروها نیز تغییر نیافت، این افراد کسانی بودند که نسبت به درمان مقاوم بودند. چنین تغییراتی در مطالعات آزمایشگاهی با اضافه کردن داروها به محیط کشت لئوسیت‌های مونونوکلئار نیز مشاهده شد که همزمان با این تغییرات، میزان بقای سلول‌ها نیز کاهش یافت. بنابراین استفاده از گرماسنجی روبش دمایی در کنار روش‌های دیگر می‌تواند یک ابزار مفید در تشخیص کارآیی درمان B CLL و انتخاب روش درمانی مناسب باشد [۱۶].

۴- کاربرد گرماسنجی روبش دمایی در بیماری‌های مغز و اعصاب روی پروتئوم مایع (مغزی- نخاعی)

در سال ۲۰۱۱، الکسیس و همکارانش روش گرماسنجی روبش دمایی را روی پروتئوم مایع (مغزی- نخاعی) (CSF)^۷ در تشخیص سرطان گلیوبلاستوما^۸ چند شکلی (GBM) مورد بررسی قرار دادند [۱۷]. مایع (مغزی- نخاعی) (CSF) اطراف مغز و نخاع را در بر گرفته و این دو ارگان حساس را از صدمات احتمالی محفوظ می‌دارد. روزانه حدود ۵۰۰ میلی لیتر CSF تولید می‌شود و به عبارت دیگر هر روز سه بار کل مایع (مغزی- نخاعی) بدن تعویض می‌گردد. دلیل ارتباط مستقیم مایع (مغزی- نخاعی) با ماتریکس خارج سلولی بافت مغز و نخاع، بررسی CSF کمک شایانی به تشخیص زودهنگام بیماری‌های مرتبط با مغز و اعصاب، خصوصاً بدخیمی‌ها، خواهد کرد. از سوی دیگر از لحاظ محتوای پروتئوم، علی‌رغم شباهت پروتئوم CSF به پروتئوم پلاسما، پروتئوم CSF حدود ۱۰۰ تا ۴۰۰ برابر رقیق‌تر از سرم خون بوده و در نهایت در بررسی‌های ترمودینامیکی نسبت (signal/noise) کمتری را برای تشخیص نشانگرهای زیستی فراهم می‌نماید [۱۷].

سرطان گلیوبلاستوما^۸ چندشکلی، یکی از سرطان‌های بدخیم مغز است که سلول‌های گلیال مغزی را درگیر می‌کند. روش مناسبی برای تشخیص این سرطان بطور کامل وجود ندارد و روش‌های تشخیصی معمول از قبیل MRI و CT اسکن نیز تشخیص مناسبی را ارائه نمی‌دهند. تنها روش شناسایی بیماری در مراحل عود آن و از طریق بایوپسی و بررسی بافت شناسی است [۱۷]. در این میان

وسیع در زمینه‌های تحقیقاتی و درمانی، این بیماری هنوز قابل درمان نیست و دلایل و مکانیسم تنوع وسیع علائم بیماری نیز مشخص نشده است. در این بیماری نسبت (CD19+/CD5+) افزایش می‌یابد که ناشی از تجمع زیاد سلول‌های نئوپلاستی است. عمر زیاد سلول‌های لوسمی بدلیل باقی ماندن سلول‌ها در مراحل (G0/G1) چرخه سلولی و مهار مرگ برنامه‌ریزی شده سلولها^۱ است. روشهای معمول شیمی درمانی B CLL با ورود آنالوگ‌های نوکلئوزید پورین مانند فلودارابین^۲، کلادربین^۳، ۲-دزوکسی کوفورمیسین^۴ پاسخ به درمان را ارتقاء داده است، به طوریکه تجویز ترکیبی این آنالوگ‌ها با سیکلوفسفامید^۵ یک روش معمول در درمان این بیماری بشمار می‌آید. بطور احتمال این آنالوگ‌ها با القاء مهار مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی اثرات سمی بودن سلولی خود را اعمال می‌کنند. آنالوگ‌های پورین با مهار آنزیم‌هایی چون DNA پلیمرز و ریبونوکلئوتید ردوکتاز سبب اختلال در سنتز DNA می‌شوند. روگالینسکا و همکارانش منحنی گرماسنجی هسته سلول‌های خون محیطی بیماران مبتلا به B CLL را قبل و حین درمان با آنالوگ‌های پورین بررسی نمودند؛ نمودار گرمایی حاصل نشان دهنده واسرشتگی ترکیبات اصلی هسته؛ مانند DNA، نوکلئوزوم و ماتریکس هسته‌ای است. این منحنی، چهار گذار عمده را نشان می‌دهد که شامل: گذار I مربوط به ترکیبات غیر کروموزومی در دمای ۶۰ درجه سلسیوس، گذار II مربوط به واسرشته شدن نوکلئوزوم‌ها در دماهای بین (۷۶-۷۳) درجه سلسیوس، گذار III مربوط به باز شدن DNA غیر متراکم^۶ و گذار چهارم مربوط به باز شدن DNA متراکم در دمای (۱۰۵-۹۳) درجه سلسیوس می‌باشد (برای مشاهده نمودار گرمایی به مرجع ۱۶ رجوع شود). مطالعات گرماسنجی روبش دمایی روی ۱۴ بیمار نشان داد که مصرف ترکیبی از داروها موجب کاهش چشمگیر و یا حذف در پیک دمایی ۹۵ درجه سلسیوس همزمان با افزایش پیک‌های دمایی (۸۶-۸۲) درجه سلسیوس و (۷۶-۷۳) درجه سلسیوس می‌شود. تعیین میزان پروتئین‌های ضد مهار مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی (bcl-2) و (Mcl-1) با استفاده از آنتی بادی‌های اختصاصی نشان‌دهنده کاهش

1. Apoptosis
2. Fludarabine
3. Cladribine
4. 2-Deoxycoformycin
5. Cyclophosphamide
6. Un-Stacking of Unconstrained DNA

7. Cerebrospinal Fluid
8. Glioblastoma Mutiform

براساس تحقیق انجام شده بررسی گرمایی CSF از طریق روش گرماسنجی روبش دمایی در تشخیص گلیوبلاستومای چند شکلی مفید بوده است. این گروه توانستند نمودار حرارتی مربوط به افراد مبتلا به گلیوبلاستومای چند شکلی را بدست آورند. الگوی نمودار گرمایی مربوط به CSF افراد بیمار تفاوت چشم گیری با نمودار گرمایی افراد سالم داشت. (برای مشاهده نمودار گرمایی می توان به مرجع ۱۵ مراجعه نمود).

۵- بحث

عامل تغییرات مشاهده شده در منحنی های نمودار گرمایی پلاسما در حالات بیماری چیست؟ اولین احتمالی که به ذهن می رسد تغییر در غلظت پروتئین های اصلی پلاسما است. آزمون های تکمیلی صورت گرفته توسط گاربت و همکارانش [۱۵] این فرضیه را منتفی کرد. آزمایش ها نشان دادند که غلظت پروتئین های اصلی پلاسما در حالات بیماری و سالم با هم تفاوتی ندارند. بررسی های الکتروفورز نیز تغییر در اندازه یا بار پروتئین های پلاسما را نشان ندادند. تنها استدلالی که برای توصیف تغییرات مشاهده شده در نمودار گرمایی باقی می ماند این است که مولکولی به پروتئین های پلاسما آنچنان متصل می شود که ساختار پروتئین های پلاسما را پایدار می کند. لذا نمودار گرمایی پروتئین های تغییر ساختار یافته پلاسما به سمت دماهای بالاتر جابه جا می شود. این دیدگاه با فرضیه اینتراکتوم تأیید می شود. بیومارکرهای پپتیدی یا پروتئینی اختصاصی یک بیماری (پپتیدوم) در پلاسما آزاد نیستند بلکه به اینتراکتوم یا پروتئین های اصلی نظیر آلبومین یا ایمونوگلوبین ها در اتصالند. بهترین حالت برای آزمایش این فرضیه این است که کمپلکس (اینتراکتوم- پپتیدوم) را بتوان به پپتیدوم و اینتراکتوم جدا و تخلیص کرد. آنگاه پپتیدوم خالص را به پلاسمای سالم اضافه کرد و تغییر ناشی از این افزایش را در نمودار گرمایی پلاسما مشاهده نمود. از آنجا که بیومارکرهای مورد بحث عملاً شناسایی نشده اند این آزمون در حد نظریه باقی مانده است. گاربت و همکاران [۱۳ و ۳] برای بررسی تغییرات نمودار گرمایی ناشی از اندرکنش پپتیدوم با اینتراکتوم، آزمایش جایگزینی را طراحی کردند. در این آزمایش آلبومین را به عنوان اینتراکتوم فرض و به جای پپتیدوم نیز از لیگاند اختصاصی آلبومین، برموکروزول سبز^۱، استفاده شد. برموکروزول با

میل ترکیبی 7×10^7 مولار به جایگاه اول آلبومین متصل می گردد و انتظار می رود که موجب پایداری آلبومین گردد. بررسی ها نشان می دهند در حضور برموکروزول سبز منحنی نمودار گرمایی چه برای پلاسما و چه برای آلبومین به منحنی نمودار گرمایی بیماری ها شبیه می شود و به سمت دماهای بالاتر جابه جا می گردد. این مشاهدات فرضیه اینتراکتوم را تقویت می کند و توصیفی محتمل برای تغییرات مشاهده شده در نمودار گرمایی بیماری ها ارائه می دهد. نشانگرهای زیستی پلاسما قادرند بسته به پروتئینی که با آن پیوند برقرار می کنند هزاران نمودار گرمایی ایجاد کنند. اندرکنش نشانگرهای زیستی با پروتئین های مختلف می تواند نمودارهای گرمایی منحصر به فردی ایجاد کند که بازتاب میزان پیچیدگی این اندرکنش ها هستند. گرماسنجی روبش دمایی نسبت به اندرکنش نشانگرهای زیستی با پروتئین های اصلی پلاسما حساس خواهد بود.

در زمینه مایع (مغزی- نخاعی) نیز، اینطور به نظر می رسد که انتقال گرمایی پیک نمودار گرمایی به سوی دمای بالاتر (۷۱ درجه سلسیوس) بدلیل افزایش و یا تغییر میانکنش نشانگرهای زیستی در حالت بیماری و در نهایت در پایدار نمودن پروتئین های غالب CSF است. این موضوع موجب می شود پروتئین های غالب CSF در دمای بالاتری ظاهر شوند.

۶- نتیجه گیری

گرماسنجی روبش دمایی افق های نوینی را به سوی پروتئوم پلاسما می گشاید. الگوی مشابه نمودار گرمایی در پلاسما و مایع (مغزی- نخاعی) افراد سالم به منزله یک امضای زیست شناسختی اختصاصی عمل می نماید که مجموع وزنی نمودار گرمایی تغییرات ساختار پروتئین های تشکیل دهنده (پلاسما/ مایع مغزی نخاعی) را در بیماری بیان می کند. نمودار گرمایی افراد بیمار تفاوت فاحشی با نمودار گرمایی افراد سالم دارد و برای هر بیماری کاملاً اختصاصی است. تغییرات مشاهده شده در نتیجه عوامل مختلف، از قبیل تغییر در غلظت پروتئین های اصلی و همچنین پپتیدوم و میانکنش آنها با پروتئین های اصلی، منجر به ایجاد الگوی نمودار گرمایی متفاوت و اختصاصی می گردد. در میان بررسی های انجام شده اکثر قریب به اتفاق نتایج حاصل از گرماسنجی روبشی دمایی نشان دهنده افزایش پایداری پروتئین های غالب پلاسمای خون و مایع مغزی نخاعی در

1. Bromocresol Green

مراجع

- [۱] ف. عزیزی، ح. حاتمی، م. جانقربانی اپیدمیولوژی و کنترل بیماریهای شایع در ایران، انتشارات خسروی، تهران، (۱۳۸۳).
- [2] Bottoni, P., Giardina, B., Vitali, A., Boninsegna, A., Scatena, R., "A proteomic approach to characterizing ciglitazone-induced cancer cell differentiation in Hep-G2 cell line", *Biochim. Biophys. Acta* 1794, 615-626, (2009).
- [3] Garbett, N., Mekmaysy, C., Helm, W., Jenson, A., Chaires, J., "Differential scanning calorimetry of blood plasma for clinical diagnosis and monitoring", *Experimental and Molecular Pathology* 86, 186-191, (2009).
- [4] Garbett, N. C., Miller, J. J., Jenson, A. B., Chaires, J. B., "Calorimetric analysis of the plasma proteome", *Semin Nephrol* 27, 621-626, (2007).
- [5] O'Connell TX, Horita TJ, Kasravi B. "Understanding and interpreting serum protein electrophoresis". *Am Fam Physician*. Jan 1;71(1):105-12, (2005).
- [6] Latterich, M., Abramovitz, M., Leyland-Jones, B., "Proteomics: New technologies and clinical applications", *European Journal of Cancer* 44, 2737-2741, (2008).
- [7] Zimmerman LJ, Li M, Yarbrough WG, Slebos R, Liebler DC. "Global stability of plasma proteomes for mass spectrometry-based analyses". *Mol Cell Proteomics*. Feb 1. [Epub ahead of print], (2012).
- [8] Marko-Varga, G., Nilsson J. and Laurel, T. "Proteome Analysis. Interpreting the Genome", Elsevier, Chapter 13, 327-370, (2004).
- [9] Garbett, N. C., Miller, J. J., Jenson, A. B., Miller, D. M., Chaires, J. B., "Interrogation of the plasma proteome with differential scanning calorimetry", *Clin Chem.*, 53, 11: 2012-4, (2007).
- [۱۰] جمشید خان چمنی و علی اکبر موسوی موحدی "بیوترمودینامیک" انتشارات دانشگاه تهران (۱۳۸۷).
- [11] Harding, S. E., Chowdhry, B. Z., Wadood, A. (Eds.), "Protein-ligand interactions: hydrodynamics and calorimetry: a hydrodynamic and calorimetry", Oxford University Press, New York, Chapter 11, 287-318, (2001).
- [12] Botcher, H., Furst, P., "Direct microcalorimetry as a technique in cell cultures", *Baillidre's Clinical Endocrinology and Metabolism* 11, 739-750, (1997).
- [13] Garbett, N., Miller, J., Jenson, A., and Chaires, J., "Calorimetry Outside the Box: A New Window into the Plasma Proteome", *Biophysical Journal* 94, 1377-1383, (2008).

مراحل نخست وقوع بیماری‌هاست که عموماً در نتیجه میانکنش پپتیدها با این پروتئین‌ها می‌باشد. بنابراین روش گرماسنجی روبش دمایی ابزار تشخیصی بالینی جدیدی در شناسایی زود هنگام بیماری‌ها عمل می‌کند و به عنوان روشی آسان، ارزان و دقیق، مکمل بسیار مناسبی برای روش‌های موجود از قبیل روش‌های طیف سنجی جرمی و الکتروفورز دو بعدی خواهد بود.

علاوه بر رویکرد تشخیصی، می‌توان از روش گرماسنجی روبش دمایی در گشودن رویکردهای جدیدی در زمینه علل وقوع بیماری‌ها و نحوه درمان آنها نیز بهره برد. بر طبق مطالعات انجام شده، بسیاری از بیماری‌های ژنتیکی ناشی از وقوع جهش در یک باز آلی و یا در نتیجه یک آمینو اسید در پروتئین است که موجب ناپایداری ساختار پروتئین در اثر این تغییر بسیار جزئی می‌گردد [۹ و ۱۸]. با توجه به مطالعات انجام شده توسط روش گرماسنجی روبش دمایی، افزایش پپتیدهای کوچک ناشناخته در خون به هنگام وقوع بیماری‌ها و در نتیجه میانکنش آنها با پروتئین‌های غالب خون از قبیل آلبومین و فیبرینوژن، پایداری این پروتئین‌های خونی متناسب با هر بیماری تغییر می‌کند [۱۳]. استفاده از روش گرماسنجی روبش دمایی، علاوه بر کاربرد تشخیص زود هنگام بیماری‌ها بطور اختصاصی، دیدگاه جدیدی را نیز در زمینه وجود رابطه احتمالی ممکن میان افزایش پایداری پروتئین‌های خونی و بیماری‌های مختلف به میان می‌آورد که نیازمند انجام تحقیقات بیشتر خواهد بود. به عبارت دیگر، آیا این احتمال وجود دارد که افزایش پایداری پروتئین‌های غالب خون و تغییر ساختار احتمالی در نتیجه میانکنش‌های جدید، در وقوع و یا تشدید برخی از بیماری‌ها دخالت داشته باشد؟ بر طبق مطالعات انجام شده مبنی بر افزایش پایداری برخی پروتئین‌های غالب خون [۱۳]، پرسش دیگری مطرح خواهد بود که در شرایط بیماری، پایداری پروتئین‌های خون (از قبیل پروتئین‌های حامل) تغییر می‌کند، آیا نحوه انتقال و دوز مؤثر بسیاری از داروها در شرایط بیماری در روند بهبود تأثیرگذار خواهد بود؟