Archive of SID

# بررسی تهیه ماتریکس جایگزین سرم انسان برای تهیه استانداردهای کیت ایمونورادیومتریک اسی آنتی ژن ویژه پروستات

هاله فروتن[۱]، دکتر رضا نجفی[۲و۱]، دکتر محمد حسین بابائی[۲]

[۱]گروه رادیوایمونواسی، [۲]گروه بیومولکول هسته‌ای، بخش رادیوایزوتوپ، مرکز تحقیقات هسته‌ای،
سازمان انرژی اتمی ایران، تهران، ایران

(تاریخ دریافت: ۸۴/۸/۱۵، تاریخ اصلاح: ۸۴/۱۰/۲۵، تاریخ پذیرش: ۸۴/۱۱/۴)

## چکیده

***مقدمه:*** *کیت آنالیز ایمونورادیومتریک اسی (IRMA) یکی از روشهای معمول و دقیق اندازه‌گیری آنتی ژن ویژه پروستات (PSA) در آزمایشگاههای تشخیصی پزشکی است. در روش IRMA، PSA در سرم خون انسان اندازه‌گیری می‌شود. لذا باید ماتریکس استانداردها معادل با سرم خون انسان باشد. بعلت مشکلات عدیده‌ای از قبیل احتمال آلودگی سرم، عدم پایداری آنتی ژن در آن، میزان اتصال غیر اختصاصی (NSB) بالا، رسوب دهی بعد از گذشت زمان، عدم دسترسی همیشگی و آسان به سرم خون بدون آلودگی و... موجب گشت تا در این پژوهش، تحقیقاتی در زمینه تهیه ماتریکس مصنوعی بعنوان جایگزین سرم خون انسان صورت‌گیرد.*

***روش بررسی:*** *در این پژوهش ماتریکس‌های مختلف با استفاده از مواد با ترکیب درصدهای متفاوت جهت تهیه استانداردهای کیت، جایگزین سرم انسانی تهیه شد و اثرات آنها در روش اندازه‌گیری آنتی ژن ویژه پروستات در مقایسه با سرم خون انسان مورد مطالعه قرار گرفت. تکرار پذیری، دقت و صحت، شرایط نگهداری و میزان پایداری استانداردها و NBS بطور کامل بررسی شد.*

***یافته‌ها:*** *تنها غلظت بدست آمده با ماتریکس مصنوعی شماره ۸ (۰/۳۸ ± ۳۳/۲۰ میلی گرم بر میلی لیتر) به غلظت بدست آمده با سرم خون انسان(۰/۲۷ ± ۳۳/۶۰ میلی گرم بر میلی لیتر) نزدیک و ازنظر آماری قابل قبول بود. لذا این ماتریکس در تهیه استانداردها مشابهت خوبی با سرم انسانی دارد. ماتریکس شماره ۸ علاوه بر ایجاد منحنی کالیبراسیون مناسب از NSB ( ۰/۱۲٪ ) نسبتا خوبی نیز برخوردار است.*

***نتیجه‌گیری:*** *با توجه به نتایج بدست آمده این ماتریکس مشکلات سرم انسانی از قبیل عدم پایداری، رسوب دهی، احتمال آلودگی و عدم دسترسی آسان را ندارد و استانداردهای بدست آمده از آن تمامی خواص یک استاندارد مطلوب و ایده آل را دارا می‌باشند.*

***واژه‌های کلیدی:*** *پروستات، PSA ، RIA ، ماتریکس استاندارد، سرم انسانی*

---

***نویسنده مسئول:*** *هاله فروتن، تهران، خ کارگر شمالی، سازمان انرژی اتمی ایران، مرکز تحقیقات هسته ای، بخش رادیوایزوتوپ. E-mail: halehfroutan@yahoo.com*

www.SID.ir

Archive of SID

## مقدمه

سرطان پروستات ششمین سرطان رایج در دنیا و در مردان سومین نوع سرطان متداول و خطرناک محسوب می‌شود که بیشترین موارد آن در اروپا، آمریکای شمالی و آفریقا دیده شده است. در سال ۲۰۰۰ میلادی حدود پانصد هزار نفر در دنیا دچار این بیماری بوده اند که ۹/۷٪ از کل سرطان‌ها در مردان را شامل می‌شده است ( ۱۵/۳٪ از کشورهای توسعه یافته و ۴/۳٪ در کشورهای در حال توسعه) (۱). انجمن سرطان آمریکا گزارش داده است که در سال ۲۰۰۲ میلادی از ۱۸۹۱۰۰ مورد سرطان پروستات ۳۰۲۰۰ نفر از این بیماری جان خود را از دست داده اند (۲). از اینرو تشخیص بموقع قبل از پیشرفت و متاستاز به سایر نقاط بدن جهت پیشگیری و پیگیری بیماری بسیار حائز اهمیت می‌باشد.

آنتی ژن ویژه پروستات *(Prostate specific Antigen, PSA)* پروتئینی است با جرم مولکولی *KDa* ۳۴-۳۳ که انحصاراً توسط سلولهای اپی تلیال پروستات در حالتهای مختلف از بافت پروستات حتی در حالت عادی ترشح می‌شود (۳). ۳۰ تا ۵۰ درصد بیمارانی که دارای هیپرپلازی خوش خیم پروستات *(Benign Prostatic Hyperplasia, BPH)* هستند و ۲۵ تا ۹۰ درصد بیمارانی که سرطان پروستات بدخیم *(Prostatic Carcinoma)* دارند، دارای غلظت بالائی از *PSA* در سرم خون هستند (۴). از اینرو اندازه‌گیری میزان *PSA* در سرم خون می‌تواند حساس‌ترین شاخص در ردیابی و پیگیری سرطان پروستات و نیز جواب به درمان باشد (۵).

اندازه‌گیری میزان *PSA* با روشهای بیوشیمیائی و ایمونواسی از قبیل رادیوایمونواسی *(Radioimmunoassay, RIA)* و الایزا *(Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)* قابل انجام می‌باشد (۶). در حال حاضر در آزمایشگاههای تشخیص پزشکی میزان *PSA* توسط روش ایمونورادیومتریک اسی *(IRMA)* که یکی از روشهای *RIA* است، اندازه‌گیری می‌شود. در یک کیت آنالیز *IRMA* چهار جزء اصلی وجود دارد:

۱- فاز جامد (برای مثال لوله‌هائی از جنس مواد پلیمری ) پوشش داده شده با آنتی بادی مونوکلونال

۲- جفت آنتی‌بادی مونوکلونال نشاندار با ید- ۱۲۵

۳- سری استانداردهای با غلظتهای مشخص *(۰-۱۰۰ ng/ml)*

۴- نمونه‌های کنترل لیوفیلیزه شده

یکی از اجزای مهم در یک کیت آنالیز، سری استانداردهای مناسب و پایدار می‌باشد که از حل کردن آنتی ژن خالص تهیه شده از مایع منی انسان *(Human Seminal Liquid)* در یک محیط مناسب (ماتریکس) در غلظتهای متفاوت بدست می‌آید. مشخصات یک ماتریکس ایده آل شامل مشابهت فیزیکی و شیمیائی آن با ماتریکس نمونه واقعی (سرم خون انسان)، هماهنگی و یکنواختی استاندارد تهیه شده از آن، بدون هر گونه مواد تداخل گر در واکنش اختصاصی آنتی بادی و آنتی ژن، پایداری آنتی ژن بمدت طولانی در آن، ایجاد منحنی کالیبراسیون مناسب و پایدار با استانداردهای تهیه شده، میزان کم واکنش غیر اختصاصی *(NSB)*، ارزان و قابل دسترس بودن ترکیبات سازنده آن و راحتی استفاده از آن برای کاربر می‌باشد.

در روش *IRMA*، *PSA* در سرم خون انسان اندازه‌گیری می‌شود. لذا باید ماتریکس استانداردها معادل با سرم خون انسان باشد. سرم خون بانوان (با میزان *PSA* در حد صفر) راحت‌ترین ماتریکس جهت ساخت استانداردها می‌باشد چون انواع زیادی از ترکیبات و پروتئین‌های مختلف درسرم خون وجود دارد که تهیه ماتریکس مصنوعی معادل سرم را مشکل می‌سازد. در ابتدا در آزمایشگاه جهت تهیه استانداردها از سرم خون بانوان استفاده می‌شد ولی بعلت مشکلات عدیده‌ای از قبیل احتمال آلودگی سرم، عدم پایداری آنتی ژن در آن، میزان *NSB* بالا، رسوب دهی بعد از گذشت زمان، عدم دسترسی همیشگی و آسان به سرم خون بدون آلودگی و... موجب گشت تا در این پژوهش، تحقیقاتی در زمینه تهیه ماتریکس مصنوعی بعنوان جایگزین سرم خون انسان صورت‌گیرد.

## روش بررسی

### مواد و دستگاه‌ها:

تمامی مواد شیمیائی به قرار زیر از شرکتهای *Merck*، *Aldrich* و *Fluka* با بالاترین درجه خلوص تهیه شدند.

- کلرید سدیم، سدیم آزید، تریس، تریتون *X-۱۰۰*، اوره، آلبومین سرم انسانی، آلبومین سرم گاوی.

- بافر تریس – گلایسین، بافر فسفات ( *PBS*)، محلول *Hank's*، بافر دیالیز فنیل متیل سولفونیل

www.SID.ir

Archive of SID

فلوراید
– Blue F3G-A immobilized on Sepharose) Affigel-Blue (Cibacron
– کیت رادیومتریک اسی با نام تجاری *Immunotech*
– دستگاه High Performance Liquid Gel- Filtration Chromatography ( مدل Pharmacia/ Uppsala/ Sweden)
– دستگاه گاماکانتر (مدل *Akfield Instruments LTD*)
– ترازو با دقت $10^{-5}$ گرم ( مدل *Mettler*)

## جمع آوری سرم خون و مایع منی انسان:

سرم خون بانوان که مقدار *PSA* در آن صفر می‌باشد از سازمان انتقال خون ایران تهیه شد. این سرم که عاری از آلودگی بود در آزمایشگاه در دمای ۴- درجه سانتیگراد و برای زمانهای طولانی تر در دمای ۷۰- درجه سانتیگراد بمنظور جلوگیری از فساد و رسوب دهی نگهداری شد. مایع منی انسان نیز از بیمارستان دی تهران تهیه گردید.

## تهیه آنتی ژن PSA خالص از مایع منی انسان:

خالص سازی آنتی ژن ویژه پروستات طی دو مرحله با دو روش کروماتوگرافی صورت گرفت. مایع منی جمع آوری شده بعد از دیالیز توسط بافر دیالیز فنیل متیل سولفونیل فلوراید ۰/۱ میلی مول بر لیتر، از ستون *Affigel-Blue* عبور داده شد و سپس ازطریق ژل فیلتراسیون کروماتوگرافی مایع با کارائی بالا خالص‌سازی شد(۷).

## روش اندازه‌گیری PSA با استفاده از روش IRMA:

*PSA* در نمونه‌ها و استانداردهای تهیه شده با استفاده از کیت *IRMA*، اندازه‌گیری می‌شود. در این روش یک جفت آنتی بادی مونوکلونال با دو اپی توپ متفاوت علیه مولکول *PSA* بصورت ساندویچی *PSA* را دربر می‌گیرند. یکی از آنتی بادیها بر روی فاز جامد پوشش داده می‌شود و دیگری با ید – ۱۲۵ نشاندار شده است. آنتی ژن ویژه پروستات در نمونه‌ها و استانداردها با این دو آنتی بادی پس از گذشت زمان انکوباسیون مناسب واکنش داده و پس از شستشو دادن آنتی بادی نشاندار واکنش داده شده از سطح لوله، میزان اکتیویته باقی مانده بر روی فاز جامد توسط دستگاه گاماکانتر اندازه‌گیری می‌شود. غلظت واقعی نمونه‌ها با استفاده از منحنی کالیبراسیون استانداردهای کیت بدست می‌آید. منحنی کالیبراسیون براساس میزان شمارش کلی *PSA* واکنش داده بر روی فاز جامد *[(شمارش بر دقیقه (CPM)]* بر حسب غلظت استانداردها *(ng/ml)* رسم می‌شود(۸).

## تهیه ماتریکس مصنوعی:

ترکیبات اصلی این ماتریکس شامل محلول آبی کلرید سدیم *(۷۵ mmol/L)*، تریس *(۱۲/۵ mmol/L)*، بافر تریس – گلایسین *(۲۵mmol/L)*، تریتون X–۱۰۰ *(۰/۵ml/L)* و سدیم آزید *(۱g/L)* تعیین گردیدند و سپس آلبومین سرم انسانی *(HAS)* یا گاوی *(BSA)* در محدوده غلظت *(۲/۵ –۰ g/L)* و اوره با غلظت *(۳ –۰ mol/l)* به آن اضافه شدند. اثرات هر یک از این مواد در مقایسه با سرم انسانی مورد بررسی قرار گرفت و بهترین ترکیب جهت تهیه استاندارد ایده آل انتخاب شد. همچنین نتایج با استانداردهای تهیه شده با ماتریکس‌های حاوی بافر فسفات *(PBS)* *[شامل $PO_4$ (۰/۲g/L) – $NaCl$(۸/۰ g/L) - $KCl$ (۰/۲g/L) $KH_2$ و $Na_2HPO_4$ (۱/۱۵ g/L) ]* و محلول *Hank's* شامل *[ $KCl$ (۰/۴ g/L) – $MgSO_4.7H_2O$ (۰/۲ g/L) $PO_4^-$ (۰/۲g/L) – $NaN_3$(۱ ٪) – $NaCl$ (۸ g/L) $H_2O$ (۰/۱۵ g/L) – $KH_2PO_4$(۰/۶۰ g/L) – $Na_2$ $CaCl_2$.]* به همراه آلبومین سرم انسانی مقایسه شد.

## روش تهیه استانداردها:

ابتدا استاندارد اولیه *(master standard)* با استفاده از آنتی ژن خالص *PSA* در سرم خون انسانی تهیه شد و سایر استانداردهای رقیق تر با غلظتهای بین *ng/ml* ۱۰۰–۰ از استاندارد اولیه بدست آمدند. غلظت آنتی ژن خالص سازی شده با روش کروماتوگرافی توسط کیت ایمونوتک و استانداردهای تهیه شده تخمین زده شدند. سپس با توجه به غلظت بدست آمده استانداردهائی با ماتریکس مصنوعی تهیه شد. استانداردهای تهیه شده با ماتریکس مصنوعی توسط کیت ایمونوتک تعیین غلظت شده و بعد از بررسی نتایج، ماتریکس با شرایط ایده آل انتخاب شد و سایر مطالعات با این ماتریکس صورت گرفت.

www.SID.ir

Archive of SID

**بررسی میزان NSB ماتریکس‌ها:**

تمامی ماتریکس‌ها بدون آنتی ژن (استاندارد صفر) به منظور تعیین میزان *NSB* ( میزان واکنش غیر اختصاصی ) توسط کیت ایمونوتک اندازه‌گیری و میزان شمارش آنها با یکدیگر مقایسه شد.

**بررسی پایداری، شرایط نگهداری و تکرار پذیری استانداردها:**

استانداردهای کیت ایمونوتک، استانداردهای تهیه شده با سرم خون انسان و ماتریکس انتخابی در طی یکسال مورد بررسی قرار گرفت و میزان پایداری این استانداردها در شرایط متفاوت مقایسه شد.

استانداردها با ماتریکس مصنوعی در شرایط متفاوت در دمای اتاق( ٢٥ درجه سانتیگراد)، در یخچال (٨-٢ درجه سانتیگراد)، در فریزر( ۴- درجه سانتیگراد) و بصورت لیوفیلیزه در فریزر نگهداری شدند و بعد از گذشت چند ماه، بهترین و آسانترین شرایط جهت نگهداری استانداردها بدست آمد.

از آنتی ژن خالص *PSA* لیوفیزه شده چندین بار توسط ماتریکس مصنوعی، نمونه استاندارد تهیه شد و نتایج جهت تعیین میزان تکرار پذیری مورد ارزیابی قرار گرفت.

**اندازه‌گیری نمونه‌های کنترل و واقعی با استانداردهای تهیه شده از ماتریکس مصنوعی:**

نمونه‌های کنترل کیت ایمونوتک و نمونه‌های واقعی با استانداردهای تهیه شده از ماتریکس مصنوعی مورد ارزیابی قرارگرفت و سپس غلظت آنها بعد از رقیق سازی با این ماتریکس نیز اندازه‌گیری شد تا صحت و دقت روش اندازه‌گیری با این استانداردها مشخص گردد.

## یافته‌ها و بحث

**مقایسه ماتریکس‌های متفاوت با سرم خون انسان:**

محلول‌هایی در محدوده غلظت ٠-١٠٠*ng/ml* از ماتریکس‌های مصنوعی و سرم خون بانوان، با استفاده از استانداردهای اولیه تهیه شدند. در شکل ١ میزان تخمینی غلظت اولیه آنتی ژن خالص توسط این استانداردها بطور جداگانه نشان داده شده اند. در فاصله اطمینان ٩۵٪ میزان تورش (*bias*) قابل قبول برای غلظت آنتی ژن با استانداردهای تهیه شده از سرم خون انسان با سه بار تکرار مقدار ٠/٣٠ ± بدست آمد که با توجه به این میزان تورش تنها غلظت بدست آمده با ماتریکس مصنوعی شماره ٨ ( ٠/٣٨ ± ٣٣/٢٠ میلی گرم بر میلی لیتر) با غلظت بدست آمده با سرم خون انسان( ٠/٢٧ ± ٣٣/۶٠ میلی گرم بر میلی لیتر ) نزدیک و ازنظر آماری قابل قبول بود. لذا این ماتریکس در تهیه استانداردها مشابهت خوبی با سرم انسانی دارد.

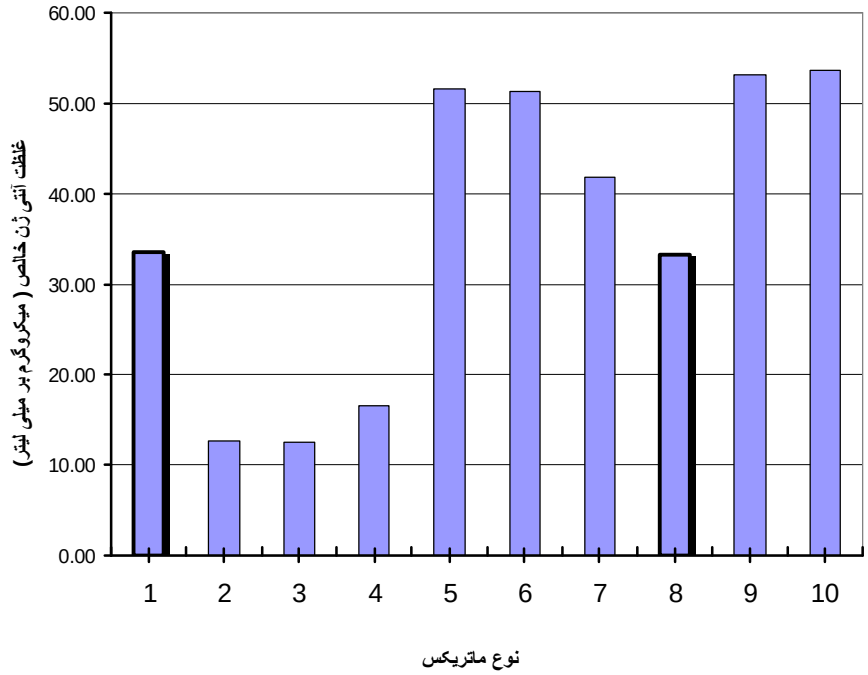
میزان شمارش ماتریکس بدون آنتی ژن (استاندارد صفر) می‌تواند شاخص خوبی جهت تخمین میزان *NSB* ماتریکس‌ها باشد. در جدول ١ میزان شمارش کلی و درصد *NSB* استانداردها آمده است. در واقع میزان *NSB* نشان می‌دهد که آنتی بادی و آنتی ژن تا چه حد اختصاصی واکنش می‌دهند و همانطور که از نتایج بر می‌آید ماتریکس شماره ٨ علاوه بر ایجاد منحنی کالیبراسیون مناسب (شکل ٢) از *NSB* (٠/١٢٪) خوبی برخوردار است. از اینرو ماتریکس مصنوعی شماره ٨ از نظر خواص فیزیکی و شیمیائی مشابهت و تطابق خوبی با ماتریکس سرم انسان دارد در صورتیکه شمارش استاندارد صفر سرم خون بانوان بطور نسبی بالا و از *NSB* بالاتری ( ٠/۴٠٪ ) برخوردار است و لذا نتایج بدست آمده از آن با خطا همراه می‌باشد.

**تأثیر ترکیبات مختلف در ماتریکس مصنوعی:**

طبق تحقیقات بعمل آمده هر یک از ترکیبات سازنده این ماتریکس نقش بسزائی در تطابق خواص آن با سرم خون ایفا می‌کنند. ترکیب کلرید سدیم جهت ایجاد محیط الکترولیتی مناسب و معادل با سرم انسان نقش دارد. بافرهای تریس و تریس گلایسین، تریتون *X*-١٠٠ و سدیم آزید به ترتیب بعنوان تنظیم کننده *pH* (*pH*= ٧/۴)، عامل ایجاد کشش سطحی مناسب و نگهدارنده جهت جلوگیری از رشد انواع میکروارگانیسم‌ها در محیط بکار می‌روند. آلبومین سرم انسانی یک پروتئین حامل بسیار مهم است، این ماده از پیوند اختصاصی آنتی بادی با محیط جلوگیری می‌نماید و آنتی بادی را پایدار نگه می‌دارد. اوره نیز به نظر می‌رسد با حفظ فشار اسمزی مناسب در واکنش اختصاصی آنتی بادی و آنتی ژن نقش مهمی ایفا می‌کند. همانطور که در شکل ١ نشان داده شده حضور

www.SID.ir

Archive of SID




**شکل - ۱: تخمین غلظت آنتی ژن خالص با استانداردهای تهیه شده از ماتریکس‌های متفاوت**

۱: Free serum

۲: Tris-glycine (۲۵ mmol/L)

۳: NaCl (۷۵ mmol/L) + Tris-glycine (۲۵ mmol/L)

۴: Tris (۱۲/۵ mmol/L)+ NaCl (۷۵ mmol/L) + Tris-glycine (۲۵ mmol/L)

۵: Tris (۱۲/۵ mmol/L)+ NaCl (۷۵ mmol/L) + Tris-glycine(۲۵ mmol/L) ( TritonX-100۰/۵ml/L)

۶: Tris (۱۲/۵ mmol/L)+ NaCl (۷۵ mmol/L) + Tris-glycine(۲۵ mmol/L) ( TritonX-100۰/۵ml/L) + HSA (۱/۲۵ g/L)

۷: Tris (۱۲/۵ mmol/L)+ NaCl (۷۵ mmol/L) + Tris-glycine(۲۵ mmol/L) ( TritonX-100۰/۵ml/L) + Urea (۰/۵ mol/L)

۸: Tris (۱۲/۵ mmol/L)+ NaCl (۷۵ mmol/L) + Tris-glycine(۲۵ mmol/L) ( TritonX-100۰/۵ml/L) + Urea (۰/۵ mol/L) + HSA (۱/۲۵ g/L)

۹: PBS (۱ mol/L ) + + HSA (۱/۲۵ g/L )

۱۰: HankK's solution + + ( HSA (۱/۲۵ g/L

* NaN 3 (۱g/L ) به تمام ماتریکس‌ها اضافه شده است.

www.SID.ir

Archive of SID

تمامی این مواد برای نیل به نتیجه مطلوب ضروری است ولی تاثیر میزان آلبومین سرم انسانی و اوره بسیار مهمتر مشاهده شد. در شکل ۳ تاثیر میزان آلبومین انسانی و در شکل ۴ تاثیر میزان اوره در تخمین صحیح غلظت آنتی ژن خالص اولیه مشخص شده اند. بهترین غلظت برای آلبومین سرم انسانی (۱/۲۵ گرم بر لیتر) و برای اوره (۰/۵ مول بر لیتر) بدست آمد. با افزایش غلظت، هردو ترکیب *HSA* و اوره در واکنش آنتی ژن و آنتی آبادی تداخل ایجاد می‌کنند و در تخمین غلظت آنتی ژن خالص خطای منفی خواهیم داشت. در شکل ۵ نشان داده شده که جایگزینی آلبومین سرم گاوی بجای آلبومین سرم انسانی امکان‌پذیر می‌باشد.

**جدول – ۱: مقایسه NSB ( پیوند غیر اختصاصی ) ماتریکس‌های مختلف و سرم خون انسانی**

| نوع ماتریکس | شمارش استاندارد صفر (*CPM*) | *[a] % NSB* |
|---|---|---|
| ۱ | ۵۷۴ | ۰/۴۰ |
| ۲ | ۴۱۳ | ۰/۲۸ |
| ۳ | ۴۱۱ | ۰/۲۸ |
| ۴ | ۳۸۲ | ۰/۲۵ |
| ۵ | ۳۷۰ | ۰/۲۵ |
| ۶ | ۲۳۵ | ۰/۱۴ |
| ۷ | ۲۴۰ | ۰/۱۵ |
| ۸ | ۲۱۲ | ۰/۱۲ |
| ۹ | ۴۰۲ | ۰/۲۷ |
| ۱۰ | ۵۰۲ | ۰/۳۵ |

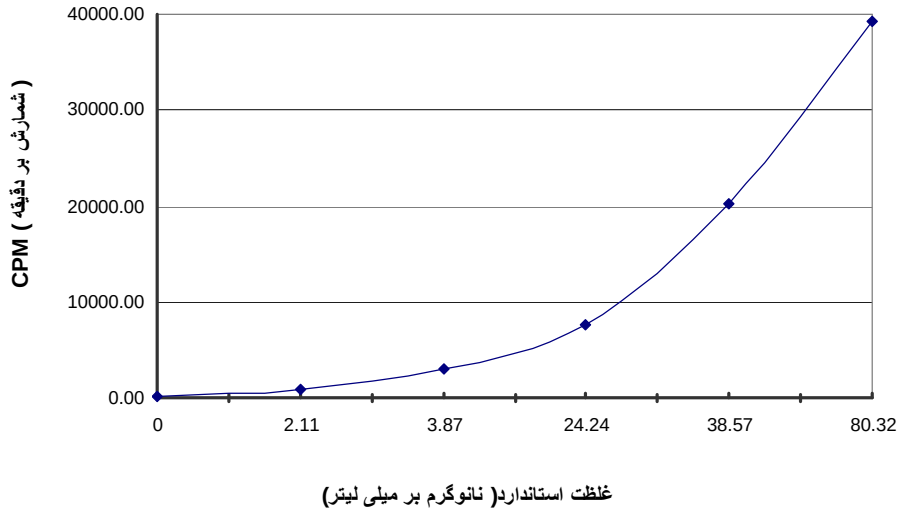
[a] (*cpm*) ۱۲۹۷۸۱ = شمارش کلی( بر حسب شمارش در دقیقه)

(*cpm*) ۵۰ = شمارش زمینه( برحسب شمارش بر دقیقه)

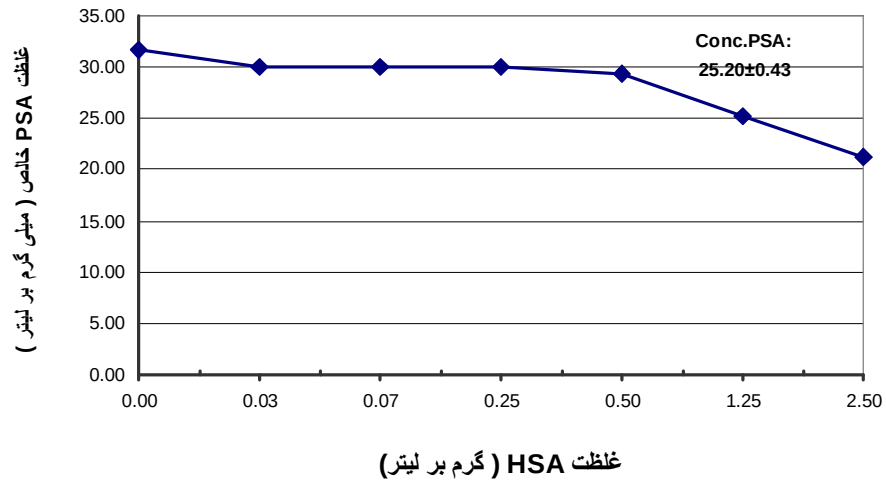
*%NSB*=(شمارش زمینه – شمارش استاندارد صفر) / (شمارش زمینه – شمارش کلی) ´ ۱۰۰

www.SID.ir

Archive of SID



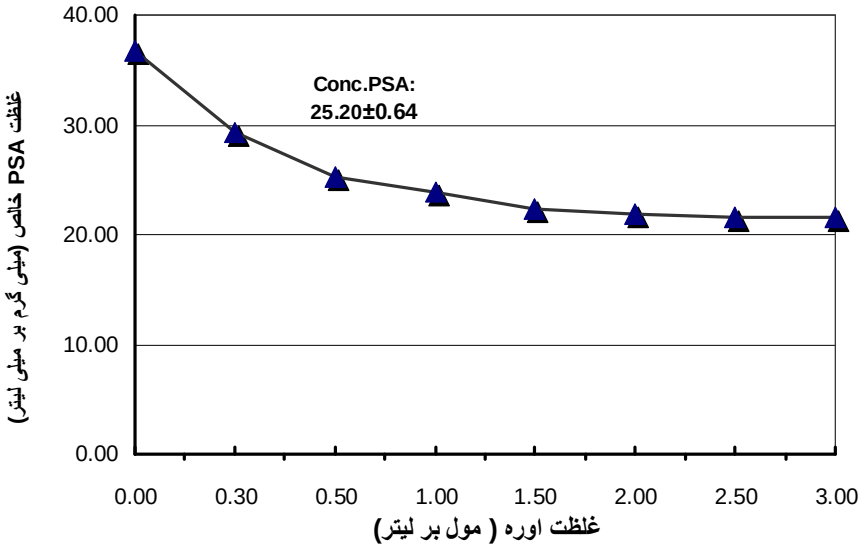

**شکل – ۲: منحنی کالیبراسیون استانداردهای تهیه شده با ماتریکس مصنوعی انتخابی**




**شکل – ۳: تأثیر میزان آلبومین سرم انسانی بر تخمین غلظت PSA خالص (با سرم انسانی غلظت PSA خالص ۰/۵۳ ± ۲۵/۲۸ میلی گرم بر لیتر بدست آمد. سایر ترکیبات موجود در ماتریکس‌ها یکسان و غلظت اوره ۰/۵ مول برلیتردر نظر گرفته شد).**

www.SID.ir

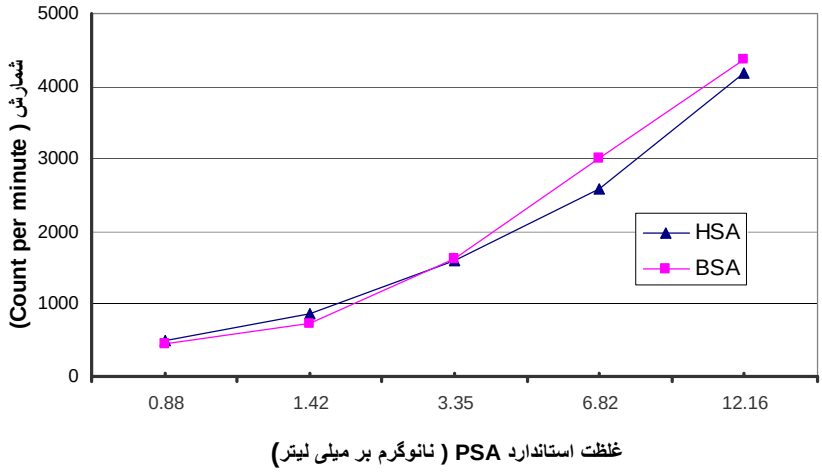
Archive of SID




**شکل – ۴: تأ ثیر میزان اوره بر تخمین غلظت PSA خالص**

– با سرم انسانی غلظت PSA خالص ۰/۵۳ ± ۲۵/۲۸ میلی گرم بر لیتر بدست آمد.

– سایر ترکیبات موجود در ماتریکس‌ها یکسان و غلظت HSA ۱/۲۵ گرم برلیتردر نظر گرفته شد.




**شکل – ۵: مقایسه اثر HSA و BSA در تهیه ماتریکس استاندارد**
**( غلظت اولیه آنتی ژن ۰/۶۱ میلی گرم بر لیتر بود)**

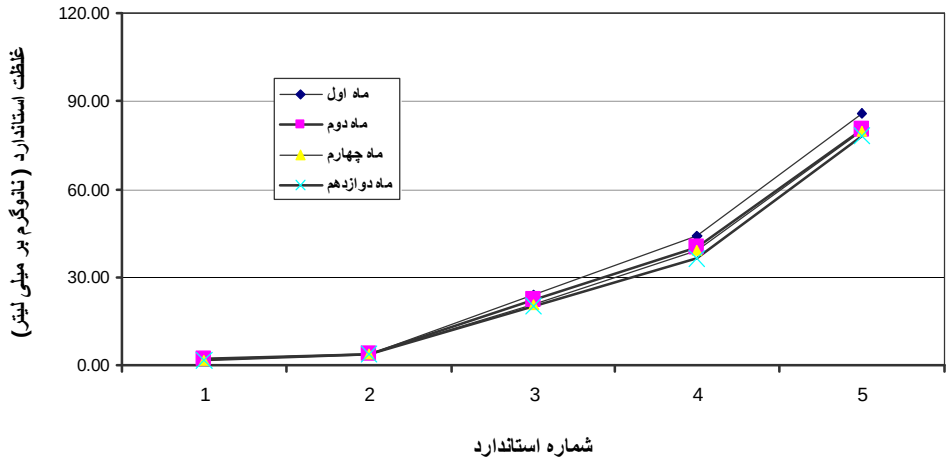
www.SID.ir

Archive of SID

## بررسی میزان پایداری و شرایط نگهداری استانداردها:

بمدت یکسال بفواصل مختلف استانداردهای کیت ایمونوتک و استانداردهای تهیه شده با ماتریکس سرم خون انسان و ماتریکس مصنوعی انتخابی که در یخچال در دمای ۲-۸ درجه سانتیگراد نگهداری شده بودند، همزمان مورد بررسی قرار گرفتند که در شکل‌های ۶و۷ به ترتیب نتایج استانداردهای تهیه شده با ماتریکس مصنوعی و سرم انسانی نشان داده شده اند و در جدول ۲ میزان افت غلظت اولیه آنتی ژن در استانداردهای کیت ایمونوتک، استانداردهای تهیه شده با ماتریکس مصنوعی و سرم انسانی مقایسه شده است. این یافته‌ها نشان می‌دهند که پایداری استانداردهای تهیه شده با سرم خون انسان در طی این مدت کاهش چشمگیری داشته است. به نظر می‌رسد آنتی ژن *PSA* بسیار حساس بوده و در سرم خون انسان که حاوی ترکیبات مختلفی است تجزیه شده و غلظت استانداردها بطور چشمگیری کاهش می‌یابد. این در حالی است که می‌توان از استانداردهای کیت ایمونوتک و استانداردهای تهیه شده با ماتریکس مصنوعی بمدت یکسال حتی بیشتر بدون تغییر در منحنی کالیبراسیون و نتایج نهائی استفاده نمود.

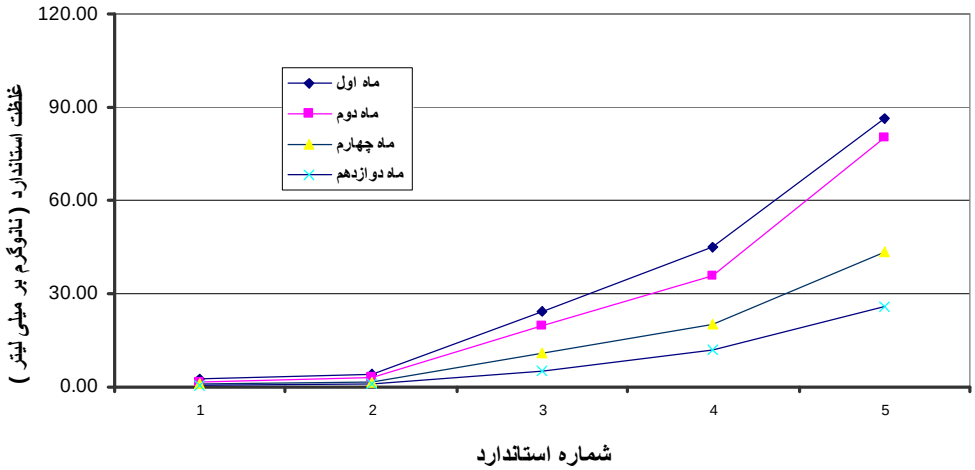
بهترین و آسانترین شرایط نگهداری از استانداردهای ماتریکس مصنوعی در یخچال(۸-۲ درجه سانتیگراد) می‌باشد( جدول ۲). البته در دمای ۴ - درجه سانتیگراد و بصورت لیوفیلیزه هم بدون مشکل می‌توان آنها را نگهداری کرد ولی نگهداری در یخچال برای کاربران ساده تر خواهد بود.




**شکل - ۶: بررسی پایداری استانداردهای تهیه شده از ماتریکس مصنوعی**

www.SID.ir

Archive of SID




**شکل – ۷: بررسی پایداری استانداردهای تهیه شده از سرم خون انسان**

**جدول – ۲: مقایسه پایداری استانداردهای کیت، استانداردهای تهیه شده با سرم خون و ماتریکس مصنوعی در شرایط مختلف بمدت یک سال**

| استاندارد | افت غلظت اولیه ( درصد ) |
|---|---|
| *Immunotec* | ۱۶/۳۴ ±۰/۳۴ |
| *F* | ۷۶/۷۵ ± ۰/۴۶ |
| $A_۱$ | ۱۳/۶۹ ± ۰/۵۶ |
| $A_۲$ | ۱۴/۲۷ ± ۰/۳۲ |
| $A_۳$ | ۱۳/۱۵ ± ۰/۲۹ |

Immunotec: استاندارد کیت ایمونوتک که در یخچال نگهداری شده است.

F: استاندارد تهیه شده با سرم خون انسان که در یخچال نگهداری شده است.

$A_۱$: استاندارد تهیه شده با ماتریکس مصنوعی نگهداری شده در یخچال ( دمای ۸-۲ درجه سانتیگراد)

$A_۲$: استاندارد تهیه شده با ماتریکس مصنوعی نگهداری شده در فریزر ( دمای ۴- درجه سانتیگراد )

$A_۳$: استاندارد تهیه شده با ماتریکس مصنوعی نگهداری شده بصورت لیوفیلیزه در دمای ۴- درجه سانتیگراد

$A_۴$: استاندارد تهیه شده با ماتریکس مصنوعی نگهداری شده در دمای اتاق (۲۵ درجه سانتیگراد)

www.SID.ir

Archive of SID

**بررسی تکرار پذیری استانداردها:**

جهت بررسی تکرار پذیری آزمایشات، با آنتی ژن خالص لیوفیلیزه شده که در دمای ۷۰- درجه سانتیگراد بمنظور جلوگیری از تجزیه شدن آن نگهداری شده بود، سه بار استاندارد با ماتریکس انتخابی تهیه شد که غلظت آنتی ژن از این آزمایشات با ضریب واریانس (*CV* = ٪۰/۳۱) ۰/۲۶ ± ۳۳/۴۳ میلی گرم برلیتر (با محدوده اطمینان ۹۵٪) بدست آمد که نشان می‌دهد تهیه استانداردها با این ماتریکس از تکرار پذیری خوبی برخوردار می‌باشد.

**تعیین صحت آزمایشات:**

نمونه‌های کنترل کیت که در واقع نمونه‌های واقعی و لیوفیلیزه شده می‌باشند و همچنین تعدادی نمونه‌های سرم انسانی تازه توسط استانداردهای تهیه شده با ماتریکس مصنوعی و کیت ایمونوتک اندازه‌گیری شدند و سپس این نمونه‌ها توسط این ماتریکس رقیق شده (نصف غلظت اولیه) و جوابها مورد بررسی قرار گرفت ( جدول ۳) نتایج نشان می‌دهد که آنالیز توسط این استانداردها از تکرارپذیری مناسب و جواب‌ها ی بدست آمده از دقت خوبی برخوردار می‌باشند. در نتیجه می‌توان نتیجه گرفت ماتریکس مورد نظر هیچ گونه تداخلی در واکنش آنتی بادی و آنتی ژن از خود نشان نمی دهد و از نظر شیمیائی و سنیتیکی و سایر خواص با سرم خون انسان مطابقت دارد.

**جدول - ۳: مقایسه نتایج آنالیز با استفاده از استانداردهای کیت واستانداردهای داخلی تهیه شده با ماتریکس مصنوعی**

| نمونه | محدوده غلظت با استانداردهای کیت ایمونوتک ( نانوگرم بر لیتر) | غلظت با استانداردهای داخلی (نانوگرم بر میلی لیتر) |
|---|---|---|
| $C_1$ | ۳/۶۲ - ۷/۸۲ | ۴/۰۹ ± ۰/۱۱ |
| $C_2$ | ۱۳/۴۵ - ۲۰/۳۴ | ۱۵/۳۵ ± ۰/۲۲ |
| $C_{1/2}$ | ۱/۸۱ - ۳/۹۱ | ۱/۹۷ ± ۰/۳۴ |
| $C_{2/2}$ | ۶/۷ - ۱۰/۱۷ | ۷/۳۸ ± ۰/۵۱ |
| $S_1$ | ۰/۵۲ ± ۰/۰۱ | ۰/۴۹ ± ۰/۰۲ |
| $S_2$ | ۱/۲۲ ± ۰/۱۲ | ۱/۴۶ ± ۰/۲۱ |
| $S_3$ | ۳/۵۱ ± ۰/۴۱ | ۳/۶۰ ± ۰/۳۶ |
| $S_4$ | ۵/۳۳ ± ۰/۲۳ | ۵/۰۱ ± ۰/۴۲ |
| $S_5$ | ۱۰/۷۷ ± ۰/۵۶ | ۱۰/۰۶ ± ۰/۴۷ |

($C_1$ و $C_2$ نمونه‌های کنترل کیت بصورت لیوفیلیزه $C_{1/2}$ و $C_{2/2}$ نمونه‌های کنترل رقیق شده با ماتریکس مصنوعی، $S_1$ - $S_5$ نمونه‌های سرم انسانی تازه)

www.SID.ir

Archive of SID

## نتیجه‌گیری

استانداردهای تهیه شده از این ماتریکس دارای تمام خواص یک استاندارد مطلوب از قبیل مشابهت فیزیکی و شیمیائی با ماتریکس نمونه واقعی ( سرم خون )، محصولی یکنواخت با پایداری عالی، دقت و صحت در نتایج نهائی، میزان *NSB* پائین، شرایط نگهداری آسان و دسترسی و ارزانی ترکیبات سازنده آن می‌باشند.

## تشکر و قدردانی

بدینوسیله از زحمات همکاران محترم گروه بیومولکول هسته‌ای و گروه رادیوایمونواسی خصوصاً آقایان مسعود محرم زاده، موسی پورعبدی و شعبان هنرمند صمیمانه تشکر و قدردانی می‌شود.

## منابع

1. Gronberg H. Prostate cancer epidemiology, Prostate Cancer. Lancet. 2003; 361: 859-864.
2. Jemal A, Thomas A, Murray T, Thun M. Cancer statistics 2002. J Clin. 2002; 52: 23-47.
3. Nadji M , Tabei SZ, Castro A, Chu TM, Murphy GP, Wang MC, Morales AR. Prostate specific antigen: an immunohistologic marker for prostate neoplasmas. Cancer. 1981; 48(5):1229-1232.
4. Stamey TA, Yang N, Hay AR, Mc Neal JE, Freiha FS, Redwine E. Prostate specific antigen as a serum marker for adenocarcinoma of the prostate. Eng J Med. 1987; 317(5): 909-916.
5. Hudson MA, Bahnson RP, Catalona WJ. Clinical use of prostate specific antigen in patients with prostate cancer. J Urol.1989; 192(4): 1101-1107.
6. Gosling JP. A decade of development in immunoassay methodology (Review). Clin Chem. 1990; 36: 1408-1427.
7. Dario R, Anna B, Costante C , Benedetto T. Concomitant purification of prostatic carcinoma tumor markers from human seminal fluid under nondenaturing conditions. Clin Chem. 1988; 34(12): 2528-2532.
8. Kuriama M. Prostate specific antigen in prostate cancer. Int J Biol Mark. 1986; 1: 67.

www.SID.ir

Archive of SID



# Preparation of an Artificial Matrix to Replace Human Standards of Prostate Specific Antigen IRMA Assay Kit

**H. Foroutan BSc[1], R. Najafi PhD, M. Babaei PhD**

**[1]Radioimmunoassay Lab., [2]Nuclear Biomolecules Lab., Radioisotope Department, Nuclear Research Center, Atomic Energy Organization of Iran, Tehran, Iran**

## ABSTRACT

***Introduction:*** *Prostate specific antigen (PSA) is one of the most sensitive markers for diagnosis of prostate cancer. Immunoradiometric kit (IRMA) is a common and sensitive method for determination of PSA in clinical laboratories. This kit has four major components: solid phase coated with monocolonal antibody, pair antibody labelled with I-125, series of standards in different ranges of concentration and lyophilized control samples. In IRMA method, PSA is determined in human serum. Therefore, matrix of standards have to be similar to human serum. Using human serum as standard has many shortcomings namely biohazard contamination, instability, serum protein precipitation and unavailability. Artificial matrix however, is an ideal substitute for human serum.*

***Methods:*** *In this study, we used an artificial matrix as standard sample and evaluated its effects including reproducibility, sensitivity, precision and stability for determination of PSA in comparision to human serum.*

***Results:*** *The specificity, sensitivity, storage condition and the stability of these standards prepared with artificial matrix were studied. Similar results in comparison to human serum was observed.*

***Conclusion:*** *The prepared standards with this matrix had suitable and ideal properties and it can be used as standard in PSA assay kit.*

***Key words:*** *Prostate, PSA, RIA, Standard matrix, Human serum*

---

**Corresponding Author:** *Haleh Froutan, Radioimmunoassay Lab., Radioisotope Department, Nuclear Research Center, Atomic Energy Organization of Iran, North Kargar Ave., Tehran, Iran.*
*E-mail: halehfroutan@yahoo.com*

www.SID.ir