مجلهٔ علوم پزشکی مدرس
دورهٔ ۹، شماره ۱: از ۴۹ تا ۵۳
تابستان ۱۳۸۵
Archive of SID

معرفی روش غربالگری الیزا مستقیم ساندویچی برای تشخیص سرطان پستان

محمدرضا مهرابی[۱]، منوچهر میرشاهی[۲*]، علی اکبر پورفتح الله[۳]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد گروه هماتولوژی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۲- استادیار گروه بیوشیمی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۳- استاد گروه ایمونولوژی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

چکیده

هدف: سرطان پستان یکی از شایعترین سرطانها در زنان است. این سرطان نیز مانند سایر تومورهای توپر، در سیر تکاملی خود به‌ترتیب دارای مراحل دیسپلازی، اپیتلیالی، سرطان درجا، رگ زایی، تهاجم و متاستاز است.
تشخیص سرطان پستان با روش آسیب‌شناسی، معمولاً محرز می‌شود در این تحقیق با اندازه‌گیری یکی از مهمترین و قویترین مهارکننده‌های رگ‌زایی (آنژیواستاتین) در ادرار بیماران، روشی غیرتهاجمی برای تشخیص بیماری معرفی شد.

مواد و روشها: نمونه‌های ادرار اتفاقی ۱۵ بیمار مبتلا به سرطان با روش الیزا مستقیم ساندویچی[۱] بهینه‌سازی شده از نظر وجود آنژیواستاتین در مقایسه با ۱۵ شاهد سالم ارزیابی شد.

نتایج: نتایج حاصل در آزمون آماری T-TEST با سطح اطمینان ۹۷ درصد (Pvalue<۰/۰۳) ارتباط معنی‌داری را بین وجود آنژیواستاتین در ادرار و سرطان پستان نشان داد که کاملاً با نتایج آسیب‌شناسی بیماران مطابقت داشت.

بحث و نتیجه‌گیری: اندازه‌گیری آنژیواستاتین در ادرار افراد مبتلا به سرطان پستان، روشی غیرتهاجمی برای تشخیص سرطان است.

کلید واژگان: آنژیواستاتین، آنژیوژنز (رگ‌زایی)، الیزا (ELISA)، تومورهای توپر، سرطان پستان.

۱- مقدمه

سرطان پستان بیماری شایع و وحشت‌انگیزی در جهان است. اگر چه پیشرفتهای اخیر در زمینه زیست‌شناسی مولکولی در حال روشن کردن علل سرطان پستان هستند، اما هنوز راهی برای پیشگیری از این سرطان وجود ندارد. تشخیص زودهنگام، همچنان زیربنای کاستن از مرگ و میر سرطان پستان می‌باشد.

تشخیص زودهنگام سرطان پستان، به ظهور برنامه‌هایی برای غربالگری منجر شده‌اند که به منظور کشف سرطان پستان در مراحل ابتدایی اجرا می‌شوند؛ چرا که درمان در این مرحله بیشترین تأثیر را بر روی پیامد بالینی دارد [۱].

آنژیواستاتین[۲] مولکولی است که در سال ۱۹۹٤ از ادرار موشهای دارای نقص ایمنی توأم (SCID) که با نوعی سرطان موشی بنام سرطان ریه لویس[۳] پیوند زده شده بود، به‌وسیلهٔ اورلی[٤] و همکاران شناسایی شد. این گروه نشان دادند در این موشها علی‌رغم نبود سیستم ایمنی، تومورهای پیوندی به‌خودی خود محدود می‌شوند [۲] .

آنژیواستاتین قطعهٔ پروتئینی با وزن ۳۸ کیلویی دالتون است، که از پلاسمینوژن[۵] (اسیدآمینه ٤٤۰-۷۹) مشتق می‌گردد. در روند تومورزایی، آنژیواستاتین حاصل از شکسته شدن پلاسمینوژن با

* **نشانی مکاتبه:** تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکدهٔ علوم پایه، گروه بیوشیمی، تلفن ۸۸۰۱۱۰۰۱ داخلی ٤٤۰۸
E-mail: mirshahi@modares.ac.ir

1. (Sandwich Direct ELISA)
2. Angiostatin
3. Lewis lung carcinoma
4. O'Reilly
5. Plasminogen

www.SID.ir

Archive of SID

مهار رگ‌زایی مانع دستیابی تومور در حال رشد به اکسیژن و مواد غذایی بیشتر می‌شود و رشد تومور را محدود می‌کند. از طرفی به‌علت وزن مولکولی کم، وارد جریان خون شده و در ادرار ظاهر می‌شود[۳].

در این پژوهش با بهینه سازی روش الیزا مستقیم ساندویچی با به‌کارگیری آنتی بادی مونوکلونال A_1D_{12}، که قادر به واکنش با آنژیواستاتین است، برای اولین بار نسبت به ارزیابی آنژیواستاتین در ادرار بیماران مبتلا به سرطان پستان اقدام کردیم.

۲- مواد و روشها

۱- تهیه نمونه از افراد بیمار و گروه شاهد

از ۱۵ بیمار مبتلا به سرطان پستان که بیماری آنها با آزمایش آسیب‌شناسی تأیید شده بود در بخش سرطان‌شناسی بیمارستان امام خمینی تهران به‌صورت اتفاقی[1] نمونه ادرار جمع‌آوری شد. این بیماران هنگام نمونه‌گیری، هیچ درمانی دریافت نکرده بودند.

به‌عنوان گروه شاهد نیز از ۱۵ خانم جوان تا میانسال، به‌صورت اتفاقی، نمونه ادرار جمع‌آوری شد.

به نمونه‌های ادرار جمع‌آوری شده بلافاصله فنیل متیل سولفونیت[2] (PMSF) اضافه شد و پس از حمل نمونه‌ها به آزمایشگاه، نمونه‌های ادرار با ۱۲۰۰ g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شدند و مایع فوقانی هر نمونه از رسوب جدا و در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد تا زمان آزمایش، نگهداری شد.

۲- آزمایش الیزا مستقیم ساندویچی

برای تشخیص وجود آنژیواستاتین در نمونه‌های ادرار بیماران و گروه شاهد از روش الیزا مستقیم ساندویچی بدین طریق استفاده شد:

۲-۱- ابتدا بهترین رقت آنتی بادی مونوکلونال A_1D_{12} ($7\mu g/ml$) به کمک تیتراسیون تعیین و پس از تهیه در بافر کربنات ۵۰ mM به هر چاهک میکروپلیت ۱۰۰ µL از آن اضافه شد و به مدت یک شب میکروپلیت‌ها در ٤ درجه سانتیگراد قرار داده شدند (coating).

۲-۲- پس از تخلیه میکروپلیت ۱۵۰ µL آلبومین سرم گاوی ۱درصد در بافر PBS ۰/۱ مولار به تمام چاهکها اضافه و یک ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شد (Blocking).

۲-۳- چاهکهای میکروپلیت چهار بار با بافر شستشو PBS-۲۰ Tween (۰/۰۵ درصد و ۰/۱M) شسته شدند و بافر شستشو اضافی باقی‌مانده در چاهکهای میکروپلیت با برگرداندن آن روی صفحه کاغذ صافی و زدن ضربات نسبتاً شدید (Tapping)، خارج شد.

۲-٤- به هر یک از چاهکها ۱۰۰ µL از ادرار بیماران و گروه شاهد اضافه و یک ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد انکوباسیون شد. به چاهکهای انتهایی هر ردیف عمودی میکروپلیت نیز ۱۰۰µL از کنترل مثبت، کنترل منفی و PBS اضافه و پس از اتمام انکوباسیون مرحله ۲-۳ تکرار شد.

طرز ساخت کنترل مثبت: محلول کنترل مثبت حاوی آنژیواستاتین بوده و در محیط احیا (SH~) از پلاسمینوژن به‌طریق زیر ساخته شد:

۷/۲ میکرومول پلاسمینوژن و ۰/۱٤ میکرومول پلاسمین و ۳۰۰ میکرومول گلوتاتیون[3] احیا شده در بافر تریس ۰/۰۵ مولار با PH=8 به مدت ۳٦ ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد انکوباسیون شد[۳].

طرز ساخت کنترل منفی: ادرار از ژل سفاروزلیزین[4] عبور داده شد و ادرار فاقد آنژیواستاتین به‌دست آمد.

۲-۵- ۱۰۰ µL از بهترین رقت آنتی بادی پلی کلونال ضد پلاسمینوژن متصل به آنزیم پراکسید از (کونژوگه)، که قبلاً به کمک تیتراسیون تعیین شده بود (رقت ۱/۵۰۰۰)، به تمام چاهکها اضافه و مدت یک ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد انکوباسیون و سپس مرحله ۲-۳ تکرار شد.

۲-٦- ۱۰۰µL از سوبسترای آنزیم ($OPD + H_2O_2$) به مجموعه فوق اضافه شد و پس از گذشت ۵ دقیقه از ظهور رنگ با افزودن ۱۰۰µL اسیدسولفوریک ۵ درصد به تمام چاهکها واکنش متوقف و جذب نوری میکروپلیت در طول موج ٤۹۲ نانومتر قرائت شد.

لازم به ذکر است سنجش به‌صورت دوتایی[5] برای نمونه‌های شاهد و بیمار انجام گردید.

۳- نتایج

با اطلاعات حاصل از میانگین جذب نوری نمونه‌های گروه شاهد و بیماران در آزمون آماری t با سطح اطمینان ۹۷ درصد (Pvalue<۰/۰۳) تفاوت معنی‌داری را بین وجود سرطان پستان و آنژیواستاتین موجود در ادرار بیماران نشان داد (جدول و نمودار ۱)

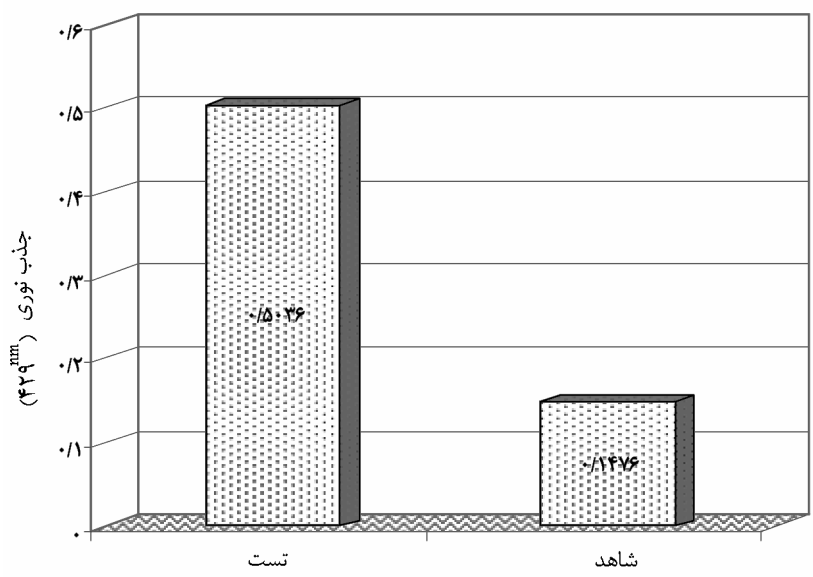
1. Random
2. Phenyl methyl sulfonate
3. Glutathione
4. Sepharoselysine
5. Duplicate

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱ مقایسهٔ میانگین گروه شاهد و بیماران سرطانی

سرطان	تعداد	میانگین جذب نوری گروه بیمار	میانگین جذب نوری گروه شاهد	p-value	مقدار t
سرطان پستان	۱۵	۰/۵۰۳۶(±۰/۰۴۴۵)	۰/۱۴۷۶(±۰/۰۹۰)	۰/۰۳۳	۲/۴۹۱



نمونه، الگو

نمودار ۱ مقایسهٔ میانگین جذب نوری آنژیواستاتین در سرطان پستان و گروه شاهد

٤- بحث

تصور بر این است که اغلب سرطانهای پستان از نظر بالینی از مرحله‌ای مخفی (کارسینومای درجا)[1] عبور می‌کنند که در خلال آن تعداد سلولهای بدخیم بسیار کمتر از آن است که بتوان با مطالعات تصویربرداری رایج و یا با معاینه فیزیکی، بدخیمی را کشف کرد. با پیشرفت بدخیمی، پتانسیل تکثیر سلولهای سرطانی و در نتیجه جهشهای متعدد فزونی یافته و ضایعه به حدی بزرگ می‌شود که می‌توان آن را از طریق تصویربرداری ماموگرافیک و در مراحل نهایی از طریق معاینه فیزیکی تشخیص داد، اگرچه متاستاز دادن حتی در تومورهای بسیار کوچک نیز امری محتمل است؛ اما با بزرگتر شدن تومور، احتمال ظهور کلونهای متاستاتیک، به طور پیشرونده‌ای افزایش می‌یابد [٤،١].

در این روند، رگزایی همواره بر متاستاز مقدم است. عوامل محرک و مهاری متعددی در رگزایی تومورها نقش دارند که رگزایی، حاصل تقابل بین عوامل محرک مثل VEG[2]، EGF[3]، Il-8[4]، HGF[5] و عوامل مهاری مثل *آنژیواستاتین*، *اندواستاتین*[6] و *اینترو فرون گاما*[7] می‌باشد [٥].

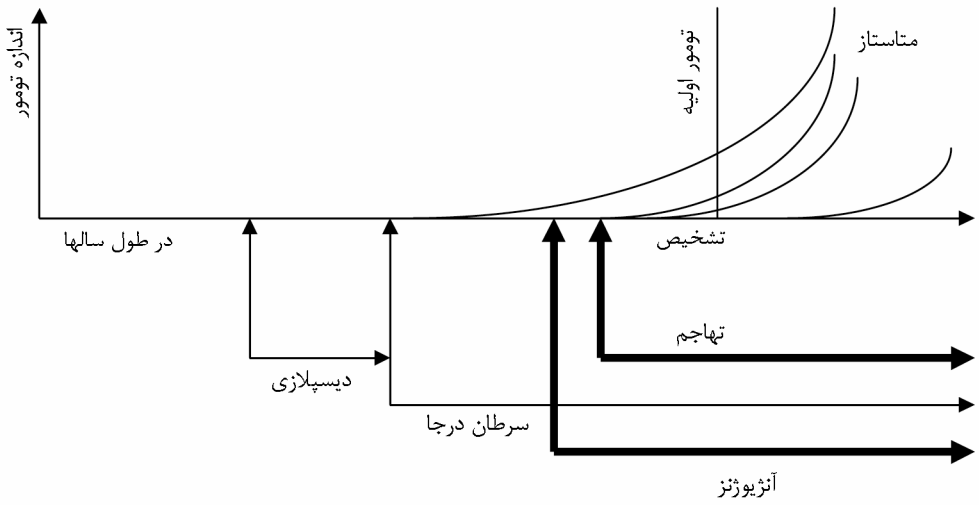
آنژیوژنز در گسترش تومورها، آنقدر اهمیت دارد که درمانهای ضد سرطان با جلوگیری از رگزایی در داخل تومورها به منظور جلوگیری از رسیدن خون و مواد غذایی به تومور و محدود ساختن آن متمرکز شده است. این درمانها با استفاده از آنتی‌بادیهای مونوکلونال ضد فاکتورهای محرک رگ زایی یا گیرنده این فاکتورها و یا افزایش مواد آنتی آنژیوژنیک صورت می‌گیرد [٦].

از زمان طرح وابستگی رشد تومورهای توپرو رگزایی، ۲۵ سال می‌گذرد. در افراد طبیعی مکانیزمهای رگزایی بجز در موارد خاصی چون سیکل قاعدگی خانمها، تشکیل جنین و بهبود زخمها خاموش می‌باشد[٧].

1. Carcinoma lnsitu
2. Vascular Endothelial Growth Factor
3. Epithelial Growth Factor
4. Inter leukin-8
5. Hepatocyte Growth Factor
6. Endostatin
7. Interferony (Gamma)

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۱ زمان و مراحل پیشروی تومور و ارتباط آنژیوژنز و تهاجم با متاستاز تومورها

توده کوچک توموری در مرحله سرطان درجا (Ca.Insitu) تکامل سرطانی، ممکن است ماهها یا سالها بدون تغییر اندازه باقی بماند؛ هرچند رگهایی نیز در آن مشاهده شود. از آنجا که رگزایی در تومورها بر متاستاز مقدم است، شاید بتوان عدم رگزایی در مرحله سرطان درجا را ناشی از بالا بودن مقدار عوامل مهار کننده تفسیر کرد. یکی از قویترین مهارکننده‌های رگزایی آنژیواستاتین است.

Chen و همکارانش برای اثبات تولید آنژیواستاتین و نقش مهاری آن، دودمان سلولی[1] تومورهای انسانی را به موشهای دارای نقص ایمنی توأم (SCID) پیوند زدند و پس از تخلیص آنژیواستاتین از ادرار موشها، آن را به مدل قرنیه‌ای که به منظور رگزایی با BFGF[2] تحریک شده بود، اضافه کردند و وجود آنژیواستاتین را از طریق نقش مهاری آن در رگزایی بخوبی نشان دادند. قبل از اینکه این گروه حاصل تحقیقات خود را منتشر کند، تصور می‌شد آنژیواستاتین فقط در سرطان ریه لویس[3] موشی تولید می‌شود[۸].

پس از این کشف ارزشمند، روش ابتکاری حاضر، اولین روشی است که در آن سعی شده بدون نیاز به مدل قرنیه‌ای حیوان آزمایشگاهی، محیط کشتهای سلولی، صرف وقت و هزینه زیاد به‌طور مستقیم در نمونه‌های ادرار بیماران مبتلا به سرطان پستان قطعات آنژیواستاتینی با روش الیزا ساندویچی مستقیم با حساسیت کمتر از ۱ mg/dl تشخیص داده شود.

در این پژوهش برای بررسی وجود آنژیواستاتین در ادرار بیمارن مبتلا به سرطان پستان، از آنتی‌بادی مونوکلونال A_1D_{12} در روش الیزا استفاده شد. این آنتی‌بادی توانایی تشخیص توالی ۱٦٤-۷۹ پلاسمینوژن را دارد [۹].

این توالی درست در ناحیه‌ای که پس از تخریب پلاسمینوژن به‌وسیلهٔ عوامل پرتئولیتیک هنگام تهاجم سلولهای بدخیم، ایجاد می‌شود؛ یعنی در انتهای آمینی مولکول آنژیواستاتین واقع شده است. این مولکول براحتی به خون می‌ریزد و به‌دلیل وزن کم، در ادرار افراد مبتلا، فیلتر می‌شود؛ در حالی‌که پلاسمینوژن به‌دلیل وزن مولکولی بالا در ادرار ظاهر نمی‌شود.

در این آزمایش از کنترل منفی و مثبت به همراه نمونه بیماران استفاده شد. کنترل منفی در واقع ادرار عبور داده شده از روی ژل *سفارزلیزین*[4] بود که آنژیواستاتین موجود در آن جذب و خارج شده بود. کنترل مثبت نیز حاوی قطعات آنژیواستاتینی می‌باشد، این کنترل با قرار دادن پلاسمینوژن در بافر حاوی پلاسمین و مواد احیا کننده تهیه شد.

همچنین در جدول ۲ گروه بیماران و شاهد از نظر میانگین سنی، روز قاعدگی در هنگام نمونه‌گیری و سابقه فامیلی وجود بیماری، مقایسه شده‌اند.

نتایج حاصل از آزمایش الیزا ساندویچی مستقیم، در مقایسه با گروه شاهد در آزمون آماری t-test در سطح اطمینان (Pvalue<۰/۰۳) ۹۷ درصد نتایج قابل قبولی از ارتباط معنی دار بین وجود آنژیواستاتین در ادرار و سرطان پستان را نشان داد.

از آنجاکه این روش کاملاً بی‌خطر و غیر تهاجمی می‌باشد، برای تشخیص بیماری در افراد مشکوک می‌تواند جایگزین خوبی

1. Cell Line
2. Basic Fibroblast Growth Factor
3. Lewis lung carcinoma
4. Sepharoselysine

www.SID.ir

Archive of SID

برای روش تهاجمی (آسیب‌شناسی) باشد.

با توجه به نتایج حاصل می‌توان گفت حداقل دقتی در حد تشخیص‌های پاتولوژی دارد و شاید بتوان با افزایش حساسیت و اختصاصیت آن حتی قبل از روشهای آسیب‌شناسی در مرحله سرطان درجا، سرطان پستان را با آن تشخیص و شانس درمان را افزایش داد.

جدول ۲ مقایسهٔ عوامل مداخله‌گر در بیماران و افراد شاهد

عوامل مداخله‌گر	افراد بیمار	افراد شاهد
میانگین سنی	٤٠	٣٥
روز قاعدگی	١٤	١٩
سابقه فامیلی	٪٥	٠

۵- منابع

[۱] قاضی جهانی، بهرام. اصول بیماریهای زنان کیستنر. چاپ اول. اشارت، صفحه۲۳٤-۲۳۳، ۱۳۷٤.

[2] Price, J.T., etal. The biochemistry of cancer. Dissemination. crit.Rev. Biochem. Molecul. Biol., 32 (3):175-253,1997.

[3] Gately, s., etal. The mechanism of cancer mediated conversion of plasminogen to the angiogenesis inhibitor angiostatin. Proc. Natl. Acad. Sci.USA., 94:10868-10872, 1997.

[4] Cooper, G.M: Oncogen. publishers jones and Bartett,p.101-105,1994.

[5] Sato,T.N.A new approach to fighting cancer. pro. Natl. Acad. Sci. USA.,95:5843-5844,1998.

[6] Andreasson. P, Carlsson.R , Targeting angiogenesis with antibodies for the Treatment of cancer. Drugs. sep; s (9): 730-3, 2005.

[7] Colman, R.W., etal. Hemostasis and thrombosis Basic principles and clinical practice,3th ed. Lippincott company, p.1592-1622,1994.

[8] Chen, C., etal. A strategy to discover circulating angiogenesis inhibitors Generated by human tumor. cancer Res., 55:4230-4233,1995.

[9] Mirshahi, M., etal. A monoclonal antibody directed against an epitope in the NH_2-Terminal region of native human plasminogen induces a modification of its functional properties. Fibrinolysis and proteolysis., 11 (3):155-163, 1997.

www.SID.ir