تشخیص زود هنگام سرطان و پروتئومیکس

مونا زمانیان عضدی[1]، فرید عزیزی جلیلیان[2]*

1) مرکز تحقیقات پروتئومیکس، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تهران

2) دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام

تاریخ دریافت: 91/6/18 **تاریخ پذیرش: 91/12/7**

چکیده

شناخت ماهیت و روند سرطان همواره یکی از موضوعات مورد علاقه دانشمندان و پزشکان بوده است. این که چه تغییراتی در سلول و در نهایت موجود زنده می افتد که موجب سرطان می شود خود نیاز به بررسی های پایه ای و مولکولی دارد. پیشرفت های زیست شناسی مولکولی در دهه های اخیر به بالا بردن درک محققین از تقابل پیچیده تغییرات ژنتیکی، رونویسی و ترجمه در سرطان های انسانی بسیار کمک کننده بوده است. مطالعات پروتئومیکی نقش مهمی را در پیشگیری، تشخیص زود هنگام و درمان سرطان می تواند داشته باشد. یکی از نیازهای موجود در درمان سرطان های مختلف تشخیص زود هنگام آن در مراحل اولیه است. پیشرفت های صورت گرفته در زمینه تشخیص زود هنگام سرطان کمک شایانی به این موضوع کرده است اما هیچ کدام از این روش ها حساسیت و اختصاصیت روش های مولکولی نظیر پروتئومیکس را نشان نداده اند. با ظهور فناوری پروتئومیکس تلاش زیادی برای شناسایی و رده بندی پروتئین های مایعات بدن صورت گرفته است. آنالیزهای پروتئومیکی دریچه جدیدی را برای شناسایی تغییرات اتفاق افتاده در روند سرطانی شدن سلول ها به روی ما گشوده است. یکی از اهداف اصلی پروتئومیکس کشف بیومارکرهای مرتبط با سرطان و طراحی دارو است. پلاسما و ادرار یکی از بهترین منابع برای مطالعه این دسته از پروتئین ها می باشند. پروتئوم پلاسما به طور مرتب با تغییر وضعیت سرطان تغییر می کند. این تغییرات می توانند ناشی از افزایش بیان و یا کاهش بیان بعضی از پروتئین ها باشند. با پیشرفت های جدید در زمینه طیف سنجی جرمی و بیوانفورماتیک می توان بیومارکرهای جدیدی را در سرطان شناسایی کرد. امروزه پروتئومیکس یکی از مناسب ترین و کامل‌ترین ابزار برای آنالیز سیستم های بیولوژیک محسوب می شود.

واژه های کلیدی: سرطان، پروتئومیکس، بیومارکر، تشخیص زود هنگام

* **نویسنده مسئول:** دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام

Email: azizifarid@gmail.com

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

سرطان همواره یکی از اساسی‌ترین مشکلات جوامع بشری بوده است. در آمریکا سرطان هر ساله مسئول یک پنجم تمام مرگ و میرها به شمار می رود و در دنیا همه ساله بین 100 تا 350 نفر از 100/000 نفر در اثر ابتلاء به سرطان جان خود را از دست می دهند،(3-1). سرطان معمولاً در اثر نقص عملکرد مکانیسم های تنظیمی رشد و تقسیم سلولی است که این نقص عملکردی خود در اثر ایجاد آسیب های ژنتیکی که اغلب به وسیله مواد شیمیایی، هورمون ها و برخی اوقات ویروس ها به وجود می آید. بنا بر این سرطان زمانی اتفاق می افتد که مکانیسم های مسئول تثبیت روند رشد سلول ها دچار اشکال می شوند،(۴،۵). موتاسیون در دو رده از سلول های proto-oncogenes و tumor suppressor genes باعث شروع سرطان می شود. پروتوانکوژن ها ژن های نرمالی هستند که مسئول تحریک رشد سلولی بوده و با ایجاد موتاسیون در آن ها به ژن های انکوژنی مبدل می شوند که موجب تحریک بیش از حد رشد سلولی می شوند. ژن های سرکوبگر سبب مهار رشد می شوند در نتیجه موتاسیون در آن ها موجب تقسیم بیش از حد سلولی است. نوع سومی از ژن ها caretaker ها هستند که نقش مهمی در سرطان دارند. این دسته از ژن ها موجب یکپارچگی ژنوم می‌شوند که با غیر فعال شدن آن ها افزایش موتاسیون پیامد آن است،(6). پروتئومیکس عبارت است از مطالعه و بررسی پروتئوم موجود زنده در مقیاس زیاد. پروتئوم به مجموعه پروتئین های بیان شده ژنوم در یک موجود می گویند. پروتئین ها فنوتیپ موجود زنده را کنترل می کنند و بخش حیاتی سیستم موجود زنده را تشکیل می دهد که در ترکیب اصلی مسیرهای متابولیک فیزیولوژیک سلول ها نقش دارند،(۵،۷)، در انسان حدود 30/000 ژن مسئول سنتز 500/000 پروتئین هستند. بیشترین تنوعات موجود مربوط به پیرایش های متناوب و تغییرات بعد از ترجمه است. پروتئین های معیوب از عوامل اصلی ایجاد سرطان اند بنا بر این نشانه های مهمی برای تشخیص و درمان سرطان اند. به علاوه پروتئین ها هدف های اصلی برای بیشتر داروها می باشند و اساس اولیه برای طراحی انواع داروها به شمار می روند. در نتیجه مطالعه پروتئومیکس برای تشخیص نقش آن ها در ایجاد و کنترل سرطان بسیار سودمند است،(8). به کمک پروتئومیکس می توان درک بهتری از سلول و در نتیجه فعالیت های موجود زنده داشت. این روش بیشتر به بررسی ساختمان و عملکرد پروتئوم، ایزوفرم ها، تغییرات ساختاری، تغییرات بعد از رونویسی و ترجمه(فسفریلاسیون و گلیکوزیلاسیون)، برهم‌کنش با دیگر پروتئین ها و داروها می پردازد و به کمک آن می توان پروتئین های موتان را با نوع نرمال مقایسه کرد،(۹،۱۰). پروتئومیکس به علت آن که پروتئوم از سلولی به سلول دیگر و در زمان های متفاوت بیان متفاوت دارد و در نتیجه چون تنوع گونه های پروتئینی بسیار زیاد است، روش بسیار پیچیده تر وکارآمدتری نسبت به ژنومیکس است،(11). پروتئومیکس اغلب از تکنیک الکتروفورز برای جداسازی پروتئین ها استفاده می‌کند. در این روش می توان با جداسازی پروتئین ها از لحاظ بار و جرم، یعنی نقطه ایزوالکتریک و وزن مولکولی، می توان در مراحل بعدی تغییرات صورت گرفته در بیان و توالی های اسید آمینه ای که باعث به وجود آمدن ایزوفرم های جدید شده اند و یا تغییرات بعد از رونویسی و ترجمه نظیر فسفریلاسیون، گلیکوزیلاسیون، کانجوگاسیون و استیلاسیون را مطالعه کرد. یکی از کاربردهای پروتئومیکس در طراحی داروهای جدید با شناسایی و آنالیز پروتئوم سلول است. با شناخت پروتئین های مربوط به سرطان می توان آن ها را با داروهایی که به وسیله نرم افزارهای کامپیوتری طراحی شده اند مورد هدف قرار داد،(12). برای مثال اگر پروتئین معینی در سرطان دخیل باشد با شناخت ساختمان سه بعدی آن، داروی مؤثر ضد آن را که بتواند مانع فعالیتش شود طراحی می شود. از آن جایی که افراد مختلف دارای اطلاعات ژنتیکی متفاوتی هستند، لذا بیان پروتئینی مختلفی خواهند داشت. از این رو یکی از کاربردهای پروتئومیکس این است که با تعیین پروتئوم هر شخص، بتوان داروی اختصاصی تری برای درمان مؤثر هر فرد طراحی کرد.(۱۳،۱۴)

Archive of SID

www.SID.ir

بیومارکر

در طی سال های اخیر توجه زیادی به نقش بیومارکر در تشخیص سرطان در مقطع مطالعات کلینیکی شده است،(15). در سال 2003 توجه ویژه‌ای به پروتئومیکس و جایگاه آن در تشخیص و درمان بیماری ها معطوف و رشته ای تحت عنوان پروتئومیکس بالینی بنیان گذاری و مطرح شد. بیومارکرها ابزار مهمی برای پیگیری و مطالعه سرطان محسوب می شوند. استفاده از پروتئومیکس برای تشخیص سرطان اولین بار بروی سرطان تخمدان انجام شد،(16). بیش از دو سوم مبتلایان به این نوع سرطان در مراحل پیشرفته سرطانشان آگاهی پیدا می کنند. این سرطان تا زمانی که به مرحله بدخیمی نرسیده است، علائم مشخصی از خود نشان نمی دهد و وقتی به مرحله پیشرفته خود رسید، امکان درمان آن مشکل تر می‌شود. اما اگر در همان مراحل اولیه (stage1) کنترل شود، شانس بیمار برای بقاء به بیش از 5 سال خواهد رساند. بنا بر این روشی مانند پروتئومیکس لازم است که با تشخیص زود هنگام سرطان بتوان به مقابله با آن پرداخت،(17). امروزه با پیشرفت های صورت گرفته در این زمینه می توان به شناسایی بیومارکرها در سرطان های مختلف و نیز طرح و عملکرد پروتئین ها پی برد. پیشرفت پروتئومیکس و ژنومیکس منجر به شناسایی طیف وسیعی از بیومارکرها با ارزش کلینیکی گردید. شناخت بیوماکر به تعیین stage بیماری و درمان اختصاصی آن کمک کنده است،(18). بیومارکر در واقع در تشخیص به موقع سرطان، بررسی روند پیشرفت بیماری، درمان موثر با به کارگیری موثرترین تکنیک های و هم چنین به عنوان فاکتور قابل ارزیابی بین جمعیت انسانی دارای اهمیت است. این مولکول های زیستی بیان کننده وضعیت فیزیولوژیک فرد هستند،(19). در واقع موتاسیون ژن ها و تغییراتی که در رونویسی و ترجمه پروتئین ها اتفاق می افتد، همه می توانند به عنوان بیومارکرهای سرطان تعریف شوند. تغییراتی که در پروتئوم سرم با روند سرطان اتفاق می افتد می تواند به عنوان بیومارکر آن سرطان قلمداد شود،(20). برای آنالیز یک سرطان شناسایی تنها یک بیومارکر اطلاعات کافی از آن سرطان را به ما نمی دهد، بلکه توجه به تغییرات سطح بیان پروتئین های مختلف است می تواند ارزشمند باشد،(۱۷،۲۱،۲۲). از جمله روش های به کار گرفته شده در زمینه مطالعه پروتئومیکی بیومارکرها روش های الکتروفورز دو بعدی و طیف سنجی جرمی است که با وجود آن که طیف سنجی روش ایده آلی برای برای شناسایی بیومارکرها است، اما یکسری آزمایشات تکمیلی دیگری در کنار الکتروفورز دو بعدی نیز برای تایید عملکرد طیف سنجی از جمله تست های high-density protein arrays, antibody arrays, small molecular arrays و LCM می تواند کمک کننده باشد،(23). همان طور که عنوان شد، طیف سنجی جرمی MS روشی مناسب برای آنالیز داده ای بیولوژیکی خصوصاً سرطان است،(24). دقت این تکنیک برای شناسایی بیومارکرها بسیار بالا است. از جمله روش(MALDI-TOF-MS) ابزار قدرتمندی برای آنالیزهای پروتئینی و پپتیدی است. این روش قادر به شناسایی تغییرات حتی در پروتئین های بسیار کوچک است. با در نظر گرفتن اهمیت پروتئومیکس در این گونه مطالعات، پیشرفت های انجام شده در زمینه ژنومیکس، اپی‌ژنوم، ترنسکریپتوم، متابولومیکس نیز در کنار پروتئومیکس بسیار در روند شناسایی بیومارکرها موثر بوده است،(۱۵،۲۲). از دیگر موضوعات مطرح در زمینه شناسایی بیوماکرها بررسی بهترین آن ها در جهت دریابی و مطالعه بیماری است که معتبرترین آن ها باید مورد مطالعه قرار گیرند،(۲۵،۲۶)، به همین ترتیب تا سال 2006 تنها 12 نوع بیومارکر سرطان های مختلف به تایید سازمان جهانی FDA رسیده است و در نتیجه بررسی‌های تکمیلی با کمک سایر تکنیک ها نیاز هست تا صحت تشخیص بیومارکرها از پروتئین های سلول های سالم، پیش سرطانی و نوع بدخیم تمییز داده شوند،(27). لیستی از برخی از بیومارکرهای شناسایی شده در سرطان های مختلف در جدول شماره 1 آورده شده است.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول شماره1: اسامی برخی از بیومارکرهای شناسایی شده توسط پروتئومیکس و سایر روش ها

نوع بیومارکر		نوع سرطان
بیومارکرهای معمولی(28)	CA125	سرطان تخمدان
	آنتی‌ژن کارسینوامبریونیک	سرطان تخمدان
	α-فتوپروتئین	سرطان راست روده، پستان، ریه، پانکراس
	آنتی‌ژن ویژه پروستات(PSA)	هپاتوما و سرطان بیضه
بیومارکرهای شناسایی شده با پروتئومیکس(30-28، 12، 5)	انکسین1	سرطان پروستات
	PCNA,HSP90 HSP27RS/DJ1,HSP60	مراحل اولیه سرطان مری،معده و پروستات
	سایتوکراین‌ها	سرطان پستان
	HSP70 و انولاز1	سرطان ریه
	سارکوزین دهیدروژناز، لامین B1 وHcc	سرطان معده و آستروسیتوما
	Troponin I	کارسینومای هپاتوسلولار
	Rho-GDP	میوکاردیال
		Oligodendroglioma

روش‌ها و تکنیک های پروتئومیکس

استفاده از تکنیک های پروتئومیکس از دهه 70 آغاز گشته است. اما تا سال 1997 زمان برد تا اصطلاح پروتئومیکس رایج شود،(۳۱،۳۲). استفاده از تکنیک الکتروفورز دو بعدی ابتدا توسط O Farrel, Klose در سال 1975 صورت گرفت که توانستند 1100 نوع پروتئین اشرشیاکولی را بروی باندهای مجزا بر روی ژل جداسازی کنند. بعد از آن با کمک گرفتن از پدیده طیف سنجی انقلابی عظیم در زمینه پروتئومیکس صورت گرفت. روش های مختلفی برای استخراج پروتئین ها از بافت و سلول وجود دارد،(33). در این راستا فاکتورهای زیادی در به دست آوردن نتایج مطلوب آنالیزهای پروتئومیکی دخیل است از آن جمله وجود اطلاعات کلینیکی کافی و نمونه برداری مناسب می باشد. اگر نمونه برداری به طور غلط صورت گرفته باشد حتی پیشرفته ترین تکنولوژی ها از آنالیز اطلاعات به دست آمده عاجزند که متاسفانه مورد توجه لازم قرار نمی گیرد،(34). برخلاف اسیدنوکلئیک که با کمک تکنیک PCR می توان مقدار لازم را برای بررسی یک سلول تهیه نمود، در روش های پروتئومیکی به علت آن که قادر به تکثیر نمونه پروتئینی مورد نیاز برای بررسی نیستیم، لذا با محدودیت روبه رو بوده و نیاز به تهیه نمونه کـافی برای مطـــالعه داریـــم،(35).

پژوهـــش هـــای پروتئومیکی سرطان با مشکلاتی رو به رو است که علت آن این است که در بافت های سرطانی مخلوطی از سلول های سرطانی و سالم را داریم که برای مطالعه تومور به پروتئین های خالص توموری احتیاج است. مایعات بدن یکی از منابع مناسب برای تجزیه و تحلیل های پروتئومیکی است که به علت در دسترس بودن و راحتی نمونه برداری از مایعات بدن نقش مهمی را در بررسی های توموری و هم چنین تکرار آزمایش دارا هستند،(۳۶،۳۷). استفاده از مایعات بدن بیمار به بررسی های مکرر برای آگاهی یافتن از وضعیت بیمار سهولت بخشیده است. روش دیگر استفاده از سرم بیمار برای بررسی تشخیص و تحت نظر داشتن بیمار است. در واقع سرم یکی از بهترین منابع برای بررسی و جداسازی پروتئین های بدن است. با وجود امکانات موجود در استفاده از منبع سرم، یافتن بیومارکرها در سرم به علت وجـــود پروتئین های نظیر آلبومین با دشواری رو به رو و دانشمندان تکنیک هایی نظیر ایمونوسابتراکشن را برای سهولت یافتن پروتئین های مربوطه ابداع کرده اند. از دیگر منابع قابل استفاده برای مطالعات پروتئومیکی پلاسما است. پلاسما بستر مناسبی برای حضور انواع پروتئین های بدن است. اولین بار پروژه پروتئوم پلاسما

Archive of SID

www.SID.ir

در سال 2002 توسط سازمان HUPO با همکاری لابراتوارهای مختلفی انجام گرفت. بنا بر این استفاده از آن جایگزین مناسبی برای سرم می باشد. از دیگر منابع موجود برای تحقیق ادرار است. ادرار منبع مناسب تشخیصی برای انواع بیماری ها از جمله سرطان است. با آنالیز پروتئین های ادرار می توانیم به وجود یا عدم وجود بیومارکرهای سرطان های مرتبط با دستگاه ادراری و انواع دیگر از سرطان پی برد،(38). برای سال های متمادی از تکنیک هایی نظیر ELISA برای سنجش میزان بیان پروتئین ها استفاده شده است. مرحله اول پژوهش پروتئومیکی شامل نمونه برداری از بیمار است.کیفیت تهیه نمونه، تاثیر مستقیمی در نتایج حاصله دارد و محدودیت منابع انسانی وجود استفاده از رده های سلولی را افزایش داده است،(3). برخلاف نمونه های بافتی، رده های سلولی بسیار استاندارد و مناسب برای مطالعات بیولوژیکی و خصوصا پروتئومیکی است. ولی این روش نیز به علت نداشتن شرایط نرمال بدن، دارای محدودیت می باشد،(39). ترکیب پروتئینی سلول ها و یا بافت های لیز شده در نهایت باید بروی یک ژل الکتروفورز دو بعدی تشخیص داده شود. وضعیت مطلوب آن است که این پروتئین ها به طور کامل و بدون تغییر بروی ژل نمایان شوند. هم چنین باید مراقب بود که نمونه به پروتئین ها یا پپتیدهای که مربوط به آن سلول یا بافت نیستند آلوده نشوند. اگر مقدار پروتئین یک نمونه بیشتر باشد، دقت در آماده سازی آن از اهمیت بیشتری برخوردار است، چرا که به این ترتیب غلظت آلودگی هم افزایش یافته است. روشی که بر اساس آن نمونه پروتئینی جمع آوری شده، از اهمیت خاصی برخوردار است. به عنوان مثال، جداسازی پروتئین ها از محلول های همگن پروتئینی، نظیر مایعات بدن و یا سلول های لیز شده یک کشت سلولی نسبتاً ساده است، در حالی در هنگام مطالعه بافت های بدن، نوع سلولی که مورد تجزیه و تحلیل قرار می‌گیرد، باید به دقت انتخاب کنترل شود،(40). به منظور جلوگیری از تغییرات پروتئین، دمای نمونه باید بسیار پایین باشد، در عین حال، زمان آماده سازی نیز باید تا حد امکان کاهش یابد. برای مطالعه بافت ها، روش‌های بسیار اختصاصی مانند روش Micro Laser dissection به کار می رود. تکنیک پروتئومیکس ترکیبی از دو روش اصلی الکتروفورز دو بعدی 2D و طیف سنجی جرمی MS است. اولین مرحله از آنالیزهای پروتئومیکی را الکتروفورز دو بعدی شامل می شود. این روش اولین بار در سال 1970 برای شناسایی بیومارکرها مورد استفاده بوده است. در گذشته این تکنیک بسیار تخصصی و غیر قابل تکرار بود. اما امروزه با پیشرفت های صورت گرفته در تجهیزات و نرم افزارها این تکنیک قابل تکرار و کاربردی تر گشته است،(۴۱،۴۲). اگر چه برای آنالیزهای سرم عمدتاً از تکنیک های Laser capture micro dissection و Ionization time of flight (SELDI-TOF) و طیف سنجی جرمی استفاده می شود، اما با این وجود روش های دیگری نیز مانند برچسب های ایزوتوپی، آرایش پروتئین های فاز معکوس، شات گان و آنتی بادی میکروواری به طور متناوب استفاده می شود(43). اما به علت عدم تطابق ناچیز بین نتایج به دست آمده از این روش ها، استفاده از آن ها را محدود می کند و به طوری که تعداد کم بیماران، اطلاعات تکمیلی پایین، عدم وجود روش های نمونه برداری استاندارد، این روش ها با اشکالات بیشتری رو به رو می شوند. با وجود این موانع پروتئومیکس ایده آل ترین روش برای آنالیزها و دست یابی به اطلاعات با ارزش از وضعیت سرطان است،(44). اخیراً پیشرفت های صورت گرفته در تکنیک های مرتبط با الکتروفورز دو بعدی، دقت آن را بالا برده است. مرحله ابتدایی که تفکیک بر اساس بار است در ژل IEF و مرحله دوم در ژل سدیم دو دسیل سولفات SDS بر اساس اندازه آن ها انجام می‌گیرد و در نهایت پروتئین های رنگ آمیزی شده روی ژل را اسکن می کنند. یکی از تکنیک های همراهی کننده با الکتروفورز، تکنیک DIGE است که با استفاده از علامت گذاری فلورسانت از این تکنیک برای راحت تر یافتن پروتئین های بیان شده است،(45). در گذشته برای تعیین توالی پروتئین ها از روش ادمن استفاده می شد. در این روش توالی یابی، پروتئین ها را ابتدا در انتهای آمین به یک گروه جانبی متصل می کردند،

Archive of SID

www.SID.ir

سپس اسید آمینه انتهایی را با یک واکنش شیمیایی جدا نموده و از طریق زمان تاخیر در HPLC از مقایسه با یکسری نمودارهای استاندارد، نوع اسید آمینه را تعیین می کردند. مشکل اصلی این روش سرعت و حساسیت پایین آن بوده است. این ویژگی ها سبب شد که روش ادمن برای آنالیزهای پروتئومیکی مناسب نباشد. طیف سنجی روشی است که می تواند ذرات را بر اساس نسبت جرم به بار آن ها در یک میدان الکترومغناطیسی از هم تفکیک کند. استفاده از طیف سنجی جرمی ابتدا در قرن نوزدهم انجام گرفت. در یک طیف سنجی، ابتدا ذرات به یون های گازی تبدیل شده و سپس این ذرات از یکدیگر تفکیک و به وسیله یک آشکارساز تشخیص داده می شوند. دستگاه طیف سنج از 5 جزء تشکیل یافته است. بخشی که برای انتقال نمونه به داخل دستگاه طراحی شده، قسمت دیگر که در یون سازی مولکول ها نقش ایفا می کند، بخش دیگر آنالایزر است که مولکول ها را بر اساس نسبت جرم به بار جدا می‌کند، ناحیه آشکار کننده که وظیفه آن ثبت یون های جدا شده است و در نهایت وجود محیط خلاء که برای حرکت آسان یون ها تعبیه شده است. در طیف سنجی مولکول ها را به این علت باردار می کنند که کنترل و هدایت مولکول های باردار آسان تر از مولکول های بدون بار است. معمولاً این عمل با اضافه کردن گروه پروتون و یا بالعکس صورت می گیرد. این دو روش یون سازی مثبت و منفی نامیده می شود،(۳۷،۴۶). روش های مختلفی برای یونیزه کردن مولکول های بیولوژیک وجود دارد. اما دو روش اصلی Electrospray (ESI) و Ionization Asisted Laser Desorption Ionization (MALDI) بیشترین کاربرد را در پروتئومیکس دارند،(47). در مرحله بعدی استفاده از آنالیزکننده است. بعد از این که پروتئین ها و پپتیدها یونیزه شدند وارد بخشی می شوند که بر اساس بار و جرم خود توسط میدان های الکتریکی و مغناطیسی جدا می شوند. آنالیزکننده های مختلفی وجود دارد که معمولاً از Time of flight analyzer(TOF) استفاده می شود که در واقع TOF با MALDI همراه است. در این تکنیک یون ها بر اساس زمان حرکت یا پرواز خود از یک انتها به انتهای دیگر، شناسایی می شوند. آشکارکننده آخرین مرحله از طیف‌سنجی است. برخورد ذرات باردار را ثبت می کند اگر از یک ولتاژ ثابت برای شتاب دهی استفاده شود، می توان گفت که زمان پرواز متناسب با جذر نسبت جرم به بار ذره است که می توان پروتئین های به دست آمده را شناسایی کرد،(48). با کمک گرفتن از databank و نرم افزارهای مختلف می توان، توالی های اسید آمینه ای پروتئین ها را به دست آورد که در واقع اطلاعات این databank ها بر اساس توالی های نوکلئوتیدی و پروژه های ژنومی است.(49)

کاربردهای پروتئومیکس در مطالعه سرطان

به علت پیچیدگی سیستم های بیولوژیکی(هر سلول به اندازه 10^7 پلی پپتید تولید می کند) بررسی این سیستم بسیار مشکل و در نتیجه نیاز به تحقیق و بررسی زیادی دارد که از تنها یک تحقیق حاصل نشده و نیاز به مطالعات مقایسه ای وسیع و جامعی دارد که باید توسط گروه های مطالعاتی صورت گیرد،(50). همان طور که اشاره شد از جمله کاربردهای پروتئومیکس شناسایی بیومارکرها در تشخیص زود هنگام بیماری ها هست. در این راستا می توان با مقایسه این اطلاعات که با بررسی تغییرات ایزوفرم ها، پیرایش های متنوع که در مولکول های پروتئین صورت می‌گیرد به وضعیت سرطان پی برد. تشخیص بیومارکرهای سرطان و تمیز دادن آن ها از ایزوفرم ها بسیار حائز اهمیت است،(51). قبل از دستیابی به تکنیک های جدید نظیر طیف سنجی و بیوانفورماتیک برای مطالعه پروتئین ها روش ادمن و بیدل و تائوم مورد استفاده بوده است. به تازگی استفاده از بر چسب های ایزوتوپ های ICAT در روش طیف سنجی جرمی برای اندازه گیری میزان پروتئین ها مورد توجه قرار گرفته است. یکی از کاربردهای پروتئومیکس patient monitoring است که می توان با بررسی پروتئین های سرم بیمار از روند تغییر سرطان و استفاده های درمانی و طراحی دارویی استفاده کرد،(52). یکی از اهداف درمانی در سرطان مورد هدف قرار دادن پروتئین های گلیکوپروتئینی اند که نقش اساسی در متاستاز و پاسخ های ایمنی دارند.

Archive of SID

www.SID.ir

انشعابات زنجیره قندی گلیکو پروتئین ها در سلول های سرطانی معمولاً افزایش می یابد که این افزایش انشعاب سبب برقراری اتصال این زنجیره‌ها با اسیدسیالیک شده که توسط لکتین شناسایی می‌شود و با آن میانکنش می دهد که این میانکنش ها بین اسید سیالیک و لکتین قابلیت متاستازی به سلول های سرطانی می دهد،(۵۳،۵۴). از دیگر کاربردهای پروتئومیکس در طراحی دارو است به این ترتیب که از علوم مختلفی مانند ژنومیکس، پروتئومیکس، متابولومیکس، بیوانفورماتیک، کریستالوگرافی X-ray شیمی سنتز، داروشناسی، میکروبیولوژی، بیوتکنولوژی و پزشکی مولکولی استفاده می شود و مراحل آن به این صورت است که که در اولین مرحله برای ساخت دارو، شناسایی عامل ایجادکننده سرطان است که توسط تکنیک های ژنومیکس، پروتئومیکس و متابولومیکس میسر خواهد شد. ژنومیکس می تواند در شناخت ژن های معیوب عامل سرطان موثر باشد و به تبع آن پروتئومیکس در آنالیز پروتئین‌های سرطان نقش دارد. از سوی دیگر متابولومیکس می تواند میانکنش های بیوشیمیایی بین ژن ها و از دست رفتن عملکرد پروتئین ها را معلوم کند. بنا بر این با شناخت عوامل موثر ایجاد سرطان خواهیم توانست داروهایی را به منظور درمان افراد طراحی کنیم. پروتئین ها خودشان از عوامل ایجادکننده سرطان هستند، بنا بر این هدف های مناسبی برای دارو به شمار می روند. با کمک بیوانفورماتیک می توانیم داروهای مورد نظر را طراحی کنیم که ابتدا برای تست های بیوشیمیایی و سمیت روی مدل های حیوانی تست شده و بعد روی انسان آزمایش شوند.(55)

برخی از محدودیت های به کارگیری پروتئومیکس در تشخیص

با وجود مزایای الکتروفورز یکسری عیوبی در آن وجود دارد، از آن جمله برای استفاده از این تکنیک به مقدار زیادی پروتئین احتیاج است،(56). مقدار کم پروتئین منبع قابل اطمینانی برای الکتروفورز آزمایش نیست و به علاوه بافت‌های سالم و توموری به صورت مخلوطی از سلول های مختلف هستند که برای یافتن بیومارکرها و پژوهش های این زمینه نیازمند نمونه های خالص(حاوی تنها یک نوع سلول خاص) برای دست یابی به نتایج قابل اعتماد می باشد. در مطالعه سرطان به بافتی خالص احتیاج داریم که در این روش نمی توان پروتئین های سلول های سالم و بیمار را به طور کامل جدا کرد و نیاز به بکارگیری روش های مکمل نظیر Laser Capture Microdissection (LCM) است که روشی هایی دقیق برای جداسازی سلول های خالص از بافت های پیچیده بدون تماس دست و بدون ایجاد هر نوع آلودگی است،(57). با وجود وقت گیری و دشوار بودن LCM این تکنیک به طور گسترده انجام می شود و با استفاده از آن می توان سلول های جدا شده یا بخش های انتخاب شده بافت را بلند کرده و در ابزار جمع آوری به دام انداخت. از آن جا که تنها نور متمرکز در فرایند انتقال نقش دارد، این فرایند کاملا بدون دخالت دست خواهد بود. با خالص سازی سلول های مورد بررسی، این مشکل خالص سازی بافت حل شده است،(58). در مطالعات نمونه هایی مانند سرم حضور یکسری از پروتئین های پر مقدار نظیر آلبومین که مقدار آن 10^{6}-10^{9} برابر سایر پروتئین ها هست، می تواند در ردیابی سایر پروتئین ها مشکل ساز باشد،(59). این مسئله در سایر بافت ها نیز قابل مشاهده است بدین ترتیب که در بافت های نظیر پوست و غضروف فراوانی بالای گلیکوپروتئین ها در دستیابی به سایر پروتئین ها تداخلاتی ایجاد می کنند. از سوی دیگر وقت گیر بودن و هزینه بر بودن این روش از دیگر مشکلات این تکنیک است. از آن جایی که الکتروفورز دو بعدی تکنیک اصلی پروتئومیکس است، بررسی محدودیت های اختصاصی این روش نیز حائز اهمیت است که از جمله معایب آن عدم ردیابی یکسری پروتئین های خاص مانند پروتئین های بسیار اسیدی و بازی و هم چنین هیدروفوب است. از سوی دیگر تکرارپذیری پایین از جمله مشکلات این روش ها می باشد،(60). با وجود معایب و محدودیت های ذکر شده مطالعات پروتئومیکی بهترین گزینه با استفاده از تکنیک های مکمل برای شناسایی پروتئین های درگیر با بیماری محسوب می شود.(61)

Archive of SID

www.SID.ir

بحث و نتیجه‌گیری

پروتئومیکس به علت نقشی که در پیشگیری، تشخیص زود هنگام و درمان با طراحی دارویی دارد، تکنیک بسیار با ارزشی برای مطالعات سرطان شناسی محسوب می شود. بدین صورت که در بسیاری از موارد سرطان در مراحل بدخیمی تشخیص داده می شوند و بیمار زمانی از بیماری خود اطلاع پیدا می کند که بدخیمی به مراحل پیشرفته رسیده است. بنا بر این پروتئومیک با تشخیص به موقع بدخیمی امکان درمان و به کارگیری روش های موثر را بالا می برد. اطلاعاتی که از پروتئومیکس به دست می آید، شامل اطلاعاتی از پروسه های داخل سلولی که تقسیم سلول و تمایز را کنترل می کنند و یا اطلاعاتی در مورد آپوپتوز در سلول های نرمال و یا اطلاعاتی در رابطه با عوامل اختلال در عملکرد سلول های سالم و شروع سرطان باشد. روش هایی که در پروتئومیکس استفاده می شوند، برای کار آمدی بیش تر باید بهبود یابند. بدین صورت که از جمله چشم اندازهای پروتئومیکس آن است که با بالا بردن حجم و کیفیت پروتئین های استخراجی نمونه و کاهش مقادیر مورد بررسی آن، اتوماسیون(یعنی استفاده از ابزاری مانند روبات ها که در این پروسه جایگزین انسان شود)، استفاده از نرم افزارهایی با کارایی بیشتر و نیز هم چنین به کارگیری تکنیک های مکمل با حساسیت و اختصاصیت بالاتر به دقت بالاتری برای تشخیص بدخیمی سرطان دست یافت.(62)

References

1-Azodi MZ, Ardestani H, Dolat E, Mousavi M, Fayazfar S, Shadloo A. Breast Cancer: Genetics, Risk factors, Molecular Pathology and Treatment. J Paramed Sci 2013;4:2008-4978.

2-Khatib H, Rezaei-Tavirani M, Heidari KS, Zamanian AM, Omidi R, Biglarian M, et al. Flow cytometry analysis of Rosa Damascena effects on gastric cancer cell line (MKN45). Iran J Cancer Prevent 2013;6: 30-6.

3-Rezaie-Tavirani M, Fayazfar S, Heydari-Keshel S, Rezaee MB, Zamanian-Azodi M, Rezaei-Tavirani M, et al. Effect of essential oil of Rosa Damascena on human colon cancer cell line SW742. Gastroenterol Hepatol Bed Bench 2013;6:12-9.

4-Zali H, Rezaei-Tavirani M, Azodi M. Gastric cancer: prevention, risk factors and treatment. Gastroenterol Hepatol Bed Bench 2011;4:11-8.

5-Zamanian-Azodi M, Rezaie-Tavirani M, Heydari-Kashal S, Kalantari S, Dailian S, Zali H. Proteomics analysis of MKN45 cell line before and after treatment with Lavender aqueous extract. Gastroenterol Hepatol Bed Bench 2011;5:42-51.

6-Lodish H. Molecular cell biology. 6th ed; 2009.P.5-10.

7-Rédei GP. Encyclopedia of genetics, genomics, proteomics, and informatics. Springer; 2008.

8-Hayat MA. Methods of cancer diagnosis, therapy, and prognosis: liver cancer. 1th ed: Springer Verlag; 2009.P.14.

9-Aebersold R, Goodlett DR. Mass spectrometry in proteomics. Proteomics 2001;3:5-10.

10-Ave SB. Proteomic analysis in human fibroblasts by continuous exposure to extremely low-frequency electromagnetic fields. Pakistan J Biol Sci 2007;10:4108-12.

11-Rozek W, Ciborowski PS. Proteomics and Genomics. Neuroimmune Pharmacology. 2th ed. Springer; 2008.P.725-41.

12-Pooladi M, Sobhi S, Khaghani RA, Hashemi M, Moradi A, Zali AR, et al. The Investigation of Heat Shock Protein (HSP70) Expression Change in Human Brain Asterocytoma Tumor. Iran J Cancer Prevent 2013;6:6-11.

13-Scarano E, Fiorita A, Picciotti P, Passali G, Calo L, Cabras T, et al. Proteomics of saliva: personal experience. Acta Otorhinolaryngologica Italica 2010;30:125.

14-Gottfries J, Sjögren M, Holmberg B, Rosengren L, Davidsson P, Blennow K. Proteomics for drug target discovery. Chemom Intell Lab Sys 2004;73:47-53.

15-Honda K, Ono M, Shitashige M, Masuda M, Kamita M, Miura N, et al. Proteomic approaches to the discovery of cancer biomarkers for early detection and personalized medicine. Japan J Clin Oncol 2013; 43:103-9.

Archive of SID

www.SID.ir

16-Rockhill B. Proteomic patterns in serum and identification of ovarian cancer. Lancet 2002;360:169-74.
17-Wulfkuhle JD, Liotta LA, Petricoin EF. Proteomic applications for the early detection of cancer. Nat Rev Cancer 2003;3:267-75.
18-Ludwig JA, Weinstein JN. Biomarkers in cancer staging, prognosis and treatment selection. Nat Rev Cancer 2005;5:845-56.
19-Srinivas PR, Verma M, Zhao Y, Srivastava S. Proteomics for cancer biomarker discovery. Clin Chem2002;48:1160-9.
20-Srinivas PR, Kramer BS, Srivastava S. Trends in biomarker research for cancer detection. Lancet Oncol 2001;2:698-12.
21-Safaei A, Rezaei-Tavirani M, Sobhi S, Akbari ME. Breast Cancer Biomarker Discovery: Proteomics and Genomics Approaches. Iran J Cancer Prevent 2013;6:45-53.
22-Rezaei-Tavirani M, Zali H, Rastgar Jazii F, Heidari MH, Hoseinzadeh-Salavati B, Daneshi-Mehr F, et al. Introducing aldolase C as a differentiation biomarker: A proteomics approach. J Paramed Sci 2010;1.33-39.
23-Bichsel VE, Liotta LA, Petricoin 3rd E. Cancer proteomics: from biomarker discovery to signal pathway profiling. Cancer J 2001;7:69-75.
24-Mechref Y, Hu Y, Garcia A, Hussein A. Identifying cancer biomarkers by mass spectrometry, based glycomics. Electrophoresis 2012;33:1755-67.
25-Pavlou MP, Diamandis EP, Blasutig IM. The Long Journey of Cancer Biomarkers from the Bench to the Clinic. Clin Chem 2013;59:147-57.
26-Uen Y-H, Lin K-Y, Sun D-P, Liao C-C, Hsieh M-S, Huang Y-K, et al. Comparative proteomics, network analysis and post-translational modification identification reveal differential profiles of plasma Con A-bound glycoprotein biomarkers in gastric cancer. J Proteom 2013;83:197-213.
27-Rodland KD. Proteomics and cancer diagnosis: the potential of mass spectrometry. Clin Biochem 2004;37:579-83.
28-Rezaei Tavirani M MA, Ghalanbar F, Mostafavi M,. Proteomics. 1thed. Tehran: Andishehzohoor; 2006.P.213.
29-Polanski M, Anderson NL. A list of candidate cancer biomarkers for targeted proteomics. Biomark Insights 2006;1:1-48.
30-Khaghani Razi Abad S, Pooladi M, Hashemi M, Moradi A, Sobhi S, Zali A, et al. Rho GDP Protein Expression Change and Investigation of Its Effect on GDP/GTP Cycle in Human Brain Oligodendroglioma. Iran J Can Prevent 2013;6:24-9.
31-James P. Protein identification in the post-genome era: the rapid rise of proteomics. Quart Rev Biophys 1997;30:279-331.
32-Wilkins MR, Pasquali C, Appel RD, Ou K, Golaz O, Sanchez JC, et al. From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and arnino acid analysis. Nat Biotechnol 1996;14:61-5.
33-Pooreydy B, Tajik F, Jafari M, Karimi M, Rezaei-Tavirani M, Ghassempour A, et al. Organelle Isolation for Proteomics: Mitochondria from Peripheral Blood Mononuclear Cells. J Paramed Sci 2013;4.78-86.
34-Cañas B, Piñeiro C, Calvo E, López-Ferrer D, Gallardo JM. Trends in sample preparation for classical and second generation proteomics. J Chromatogr A 2007; 1153:235-58.
35-Moon H, Wheeler AR, Garrell RL, Loo JA. An integrated digital microfluidic chip for multiplexed proteomic sample preparation and analysis by MALDI-MS. Lab Chip 2006;6:1213-9.
36-Zhou C, Simpson KL, Lancashire LJ, Walker MJ, Dawson MJ, Unwin RD, et al. Statistical considerations of optimal study design for human plasma proteomics and biomarker discovery. J Proteome Res 2012; 11:2103-13.
37-Zali H, Ahmadi G, Bakhshandeh R, Rezaei-Tavirani M. Proteomic analysis of gene expression during human esophagus cancer. J Paramed Sci 2011;2:2008-4978.
38-Albalat A, Franke J, Gonzalez J, Mischak H, Zürbig P. Urinary Proteomics Based on Capillary Electrophoresis Coupled to Mass Spectrometry in Kidney Disease. Clinical applications of capillary electrophoresis. Springer; 2013.P.203-13.
39-Geiger T, Wehner A, Schaab C, Cox J, Mann M. Comparative proteomic analysis of eleven common cell lines reveals ubiquitous but varying expression of most proteins. Mol Cell Proteom 2012;11:1-11.
40-Lamond AI, Uhlen M, Horning S, Makarov A, Robinson CV, Serrano L, et al. Advancing cell biology through proteomics

Archive of SID

www.SID.ir

in space and time (PROSPECTS). Mol Cell Proteom 2012;11:1-12.
41-Barkla BJ, Vera, Estrella R, Pantoja O. Progress and challenges for abiotic stress proteomics of crop plants. Proteomics 2013. In Press.
42-Görg A, Weiss W, Dunn MJ. Current two, dimensional electrophoresis technology for proteomics. Proteomics 2004;4: 3665-85.
43-Jian L, Niu X, Xia Z, Samir P, Sumanasekera C, Mu Z, et al. A Novel Algorithm for Validating Peptide Identification from a Shotgun Proteomics Search Engine. J Proteome Res 2013;5:1-12.
44-Villar EL, Cho WS, Rcmp CU, Fhkimls F. Proteomics and cancer research. Bioinformatics of Human Proteomics. Springer; 2013.P.75-101.
45-Luca AD, Elia G, Hamill R, Mullen AM. 2□D DIGE proteomic analysis of early post mortem muscle exudate highlights the importance of the stress response for improved water, holding capacity of fresh pork meat. Proteomics 2013;13:1528-44.
46-Faraji M, Ahmadzadeh M, Behboudi K, Okhovvat SM, Ruocco M, Lorito M, et al. Study of proteome pattern of Pseudomonas fluorescens strain UTPF68 in interaction with Trichoderma atroviride strain P1 and tomato. J Paramed Sci 2013;4:2008-4978.
47-Bensimon A, Heck AJ, Aebersold R. Mass spectrometry-based proteomics and network biology. Ann Rev Biochem 2012; 81:379-405.
48-Moravej FH, Zali H, Rezaei Tavirani M. Proteomics Analysis of Gene Expression in Basal Cell Carcinoma. Iran J Dermatol 2010;13:112-7.
49-Canakoglu A, Ghisalberti G, Masseroli M. Integration of Biomolecular Interaction Data in a Genomic and Proteomic Data Warehouse to Support Biomedical Knowledge Discovery. Computational Intelligence Methods for Bioinformatics and Biostatistics. Springer; 2012.P.112-26.
50-Reymond MA, Sanchez JC, Hughes GJ, Günther K, Riese J, Tortola S, et al. Standardized characterization of gene expression in human colorectal epithelium by two, dimensional electrophoresis. Electrophoresis 1997;18:2842-8.
51-Krüger T, Lautenschläger J, Grosskreutz J, Rhode H. Proteome analysis of body fluids for amyotrophic lateral sclerosis biomarker discovery. Proteom Clin App 2013;7: 123-35.
52-Goldknopf IL. Blood-based proteomics for personalized medicine: examples from neurodegenerative disease. Proteomics 2008;5:1-8.
53-Blomme B, Van Steenkiste C, Callewaert N, Van Vlierberghe H. Alteration of protein glycosylation in liver diseases. J Hepatol 2009;50:592-603.
54-Kim YJ, Varki A. Perspectives on the significance of altered glycosylation of glycoproteins in cancer. Glycoconjugate J 1997;14:569-76.
55-Cheng Y, LeGall T, Oldfield CJ, Mueller JP, Van Y-YJ, Romero P, et al. Rational drug design via intrinsically disordered protein. Tren Biotechnol 2006;24:435-42.
56-Leth-Larsen R, Lund RR, Ditzel HJ. Plasma membrane proteomics and its application in clinical cancer biomarker discovery. Mol Cell Proteom 2010;9:1369-82.
57-Tavirani MR, Mozdarani H, Seyyedi S. Effect of low ferequency non-ionizng radition on protein expression of human fibroblast. Pajoohandeh J 2009;14:173-7.
58-Srinivasan R, Daniels J, Fusaro V, Lundqvist A, Killian JK, Geho D, et al. Accurate diagnosis of acute graft-versus-host disease using serum proteomic pattern analysis. Exp Hematol 2006;34:796-801.
59-Alaiya A, Al-Mohanna M, Linder S. Clinical cancer proteomics: promises and pitfallls. J Proteome Res 2005;4:1213-22.
60-Haynes PA, Yates JR. Proteome profiling-pitfalls and progress. Yeast 2000;17: 81-7.
61-Jafari M, Mirzaie M, Sadeghi M, Marashi S-A, Rezaei-Tavirani M. Exploring biological processes involved in embryonic stem cell differentiation by analyzing proteomics data. Prot Proteom 2013.1834: 1063-9.
62-Shi T, Su D, Liu T, Tang K, Camp DG, Qian WJ, et al. Advancing the sensitivity of selected reaction monitoring, based targeted quantitative proteomics. proteomics 2012; 12:1074-92.

Archive of SID

www.SID.ir

Early Detection of Cancer and Proteomics

Zamanian Azodi M[1], Azizi Jalilian F[2]*

(Received: 8 Sep. 2012 Accepted: 25 Feb. 2013)

Abstract

Study of cancer has been always in a great attention in the field of clinical studies. In order to decipher the nature of the disease, it is prominent to evaluate molecular level of it. Advances in molecular sciences have been assisting the evaluation of cancer disorders. Proteomics approaches can accelerate early detection, diagnosis and treatment of cancer. Early detection methods of cancer research have been very convenient, but not as practical as proteomics can provide the required sensitively and specificity. In addition, proteomics has been offered the expedient way to discover the whole proteome of the organelle. It is also applied for biomarker discovery, patient monitoring and drug design. Plasma and urine are one of the most beneficial sources for examining biomarkers due to their change as the tumor progresses; these changes are related to protein expression alternations. Collectively, by applying some recent advances in mass spectrometry and bioinformatics in this field, it is possible to account proteomics as one of the most promising methods for assessing biological systems.

Keywords: cancer, proteomics, biomarker, early detection

1. Proteomics Research Center, Faculty of Paramedical Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
2. Dept of clinical Microbiology, Faculty of Medicine, Ilam University of Medical Sciences, Ilam, Iran
**(corresponding author)*

Scientific Journal of Ilam University of Medical Sciences

Archive of SID

www.SID.ir