

معرفی روش غربالگری الیزا مستقیم ساندویچی برای تشخیص سرطان پستان

محمد رضا مهرایی^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 به ترتیب دارای مراحل دیسپلازی، اپیتلیالی، سرطان درجا، رگ زایی، تهاجم و متاستاز است. تشخیص سرطان پستان با روش آسیب شناسی، معمولاً محرز می شود در این تحقیق با اندازه گیری یکی از مهمترین قویترین مهارکننده های رگ زایی (آنژیواستاتین) در ادرار بیماران، روشی غیرتهاجمی برای تشخیص بیماری معرفی شد.

مواد و روشها: نمونه های ادرار اتفاقی ۱۵ بیمار مبتلا به سرطان با روش الیزا مستقیم ساندویچی^۱ بهینه سازی 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 ($Pvalue < 0.03$) ارتباط معنی داری را بین وجود آنژیواستاتین در ادرار و سرطان پستان نشان داد که کاملاً با نتایج آسیب شناسی بیماران مطابقت داشت. **بحث و نتیجه گیری:** اندازه گیری آنژیواستاتین در ادرار افراد مبتلا به سرطان پستان، روشی غیرتهاجمی برای تشخیص سرطان است.

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

۱- مقدمه

آنژیواستاتین^۲ مولکولی است که در سال ۱۹۹۴ از ادرار موشهای دارای نقص ایمنی توأم (SCID) که با نوعی سرطان موشی بنام سرطان ریه لوئیس^۳ پیوند زده شده بود، به وسیله اورلی^۴ و همکاران شناسایی شد. این گروه نشان دادند در این موشها علی رغم نبود سیستم ایمنی، تومورهای پیوندی به خودی خود محدود می شوند [۲].

آنژیواستاتین قطعه پروتئینی با وزن ۳۸ کیلویی دالتون است، که از پلاسمینوژن^۵ (اسید آمینه ۴۴۰-۷۹) مشتق می گردد. در روند تومورزایی، آنژیواستاتین حاصل از شکسته شدن پلاسمینوژن با

سرطان پستان بیماری شایع و وحشت انگیزی در جهان است. اگر چه پیشرفتهای اخیر در زمینه زیست شناسی 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 می باشد.

تشخیص زودهنگام سرطان پستان، به ظهور برنامه هایی برای غربالگری منجر شده اند که به منظور کشف سرطان پستان در مراحل ابتدایی اجرا می شوند؛ چرا که درمان در این مرحله بیشترین تأثیر را بر روی پیامد بالینی دارد [۱].

E-mail: mirshahi@modares.ac.ir

* نشانی مکاتبه: تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پایه، گروه بیوشیمی، تلفن ۸۸۰۱۱۰۰۱ داخلی ۴۴۰۸

1. (Sandwich Direct ELISA)
4. O'Reilly

2. Angiostatin
5. Plasminogen

3. Lewis lung carcinoma

Tween (۰/۰۵ درصد و ۰/۱M) شسته شدند و بافر شستشو اضافی باقی مانده در چاهکهای میکروپلیت با برگرداندن آن روی صفحه کاغذ صافی و زدن ضربات نسبتاً شدید (Tapping)، خارج شد.

۲-۴- به هر یک از چاهکها $100 \mu\text{L}$ از ادرار بیماران و گروه شاهد اضافه و یک ساعت در 37°C درجه سانتیگراد انکوباسیون شد. به چاهکهای انتهایی هر ردیف عمودی میکروپلیت نیز $100 \mu\text{L}$ 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 به طریق زیر ساخته شد:

۷/۲ میکرومول پلاسمینوژن و ۰/۱۴ میکرومول پلاسمین و ۳۰۰ میکرومول گلو تاتیون^۳ احیا شده در بافر تریس ۰/۰۵ مولار با $\text{PH}=8$ به مدت ۳۶ ساعت در 37°C درجه سانتیگراد انکوباسیون شد [۳].

طرز ساخت کنترل منفی: ادرار از ژل سفاروزلین^۴ عبور داده شد و ادرار فاقد آنژیواستاتین به دست آمد.

۲-۵- $100 \mu\text{L}$ از بهترین رقت آنتی بادی پلی کلونال ضد پلاسمینوژن متصل به آنزیم پراکسیداز (کونزوگه)، که قبلاً به کمک تیتراسیون تعیین شده بود (رقت ۱/۵۰۰۰)، به تمام چاهکها اضافه و مدت یک ساعت در 37°C درجه سانتیگراد انکوباسیون و سپس مرحله ۲-۳ تکرار شد.

۲-۶- $100 \mu\text{L}$ از سوبسترای آنزیم ($\text{OPD} + \text{H}_2\text{O}_2$) به مجموعه فوق اضافه شد و پس از گذشت ۵ دقیقه از ظهور رنگ با افزودن $100 \mu\text{L}$ اسیدسولفوریک ۵ درصد به تمام چاهکها واکنش متوقف و جذب نوری میکروپلیت در طول موج ۴۹۲ نانومتر قرائت شد.

لازم به ذکر است سنجش به صورت دوتایی^۵ 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 ($P\text{value} < 0/03$) تفاوت معنی‌داری را بین وجود سرطان پستان و آنژیواستاتین موجود در ادرار بیماران نشان داد (جدول و نمودار ۱)

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 به صورت اتفاقی^۱ نمونه ادرار جمع‌آوری شد. این بیماران هنگام نمونه‌گیری، هیچ درمانی دریافت نکرده بودند. به‌عنوان گروه شاهد نیز از ۱۵ خانم جوان تا میانسال، به صورت اتفاقی، نمونه ادرار جمع‌آوری شد.

به نمونه‌های ادرار جمع‌آوری شده بلافاصله فینیل متیل سولفونیت^۲ (PMSF) اضافه شد و پس از حمل نمونه‌ها به آزمایشگاه، نمونه‌های ادرار با 1200 g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شدند و مایع فوقانی هر نمونه از رسوب جدا و در دمای 20°C 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} ($7 \mu\text{g}/\text{ml}$) به کمک تیتراسیون تعیین و پس از تهیه در بافر کربنات 50 mM به هر چاهک میکروپلیت $100 \mu\text{L}$ از آن اضافه شد و به مدت یک شب میکروپلیت‌ها در 4°C درجه سانتیگراد قرار داده شدند (coating).

۲-۲- پس از تخلیه میکروپلیت $150 \mu\text{L}$ آلبومین سرم گاوی ۱ درصد در بافر $0/1 \text{ PBS}$ مولار به تمام چاهکها اضافه و یک ساعت در 37°C درجه سانتیگراد انکوبه شد (Blocking).

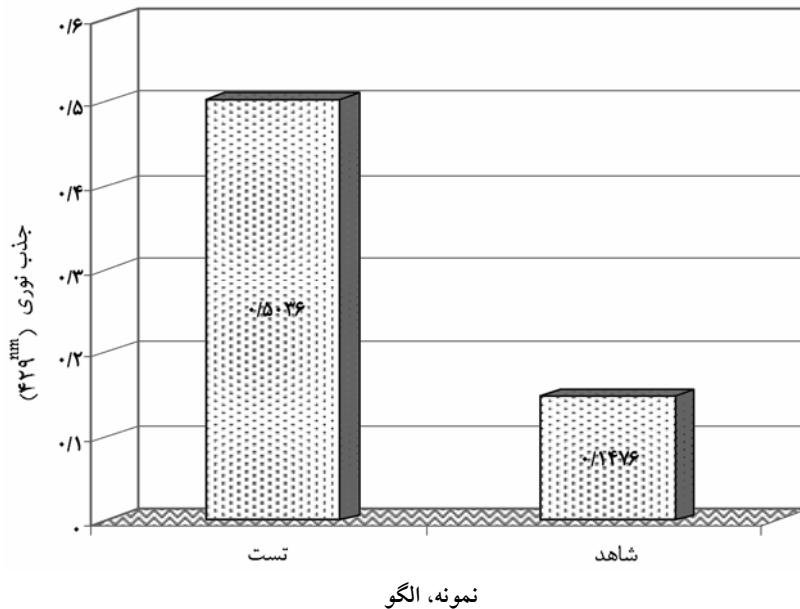
۲-۳- چاهکهای میکروپلیت چهار بار با بافر شستشو 200 PBS

3. Glutathione
4. Sepharoselysine
5. Duplicate

1. Random
2. Phenyl methyl sulfonate

جدول ۱ مقایسه 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	$(0/0445 \pm) 0/5036$	$(0/090 \pm) 0/1476$	۰/۰۳۳	۲/۴۹۱



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

۴- بحث

تصور بر این است که اغلب سرطانهای پستان از نظر بالینی از مرحله‌ای منفی (کارسینوما درجا) 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 [۱، ۴].

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، EGF،

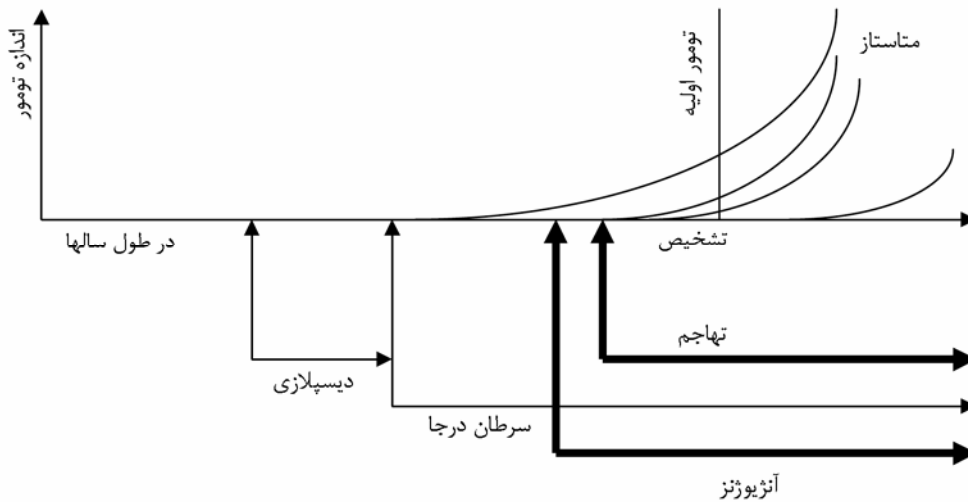
۸-II، HGF و عوامل مهاری مثل آنژیواستاتین، اندوستاتین^۴ و اینترفرون گاما^۵ می‌باشد [۵].

آنژیوزنز 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 رگ‌زایی یا گیرنده این فاکتورها و یا افزایش مواد آنتی آنژیوژنیک صورت می‌گیرد [۶].

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 [۷].

1. Carcinoma Insitu
2. Vascular Endothelial Growth Factor
3. Epithelial Growth Factor

4. Inter leukin-8
5. Hepatocyte Growth Factor
6. Endostatin
7. Interferony (Gamma)



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

بیماران مبتلا به سرطان پستان، از آنتی‌بادی مونوکلونال A₁D₁₂ در روش الیزا استفاده شد. این آنتی‌بادی توانایی تشخیص توالی ۱۶۴-۷۹ پلاسمینوزن را دارد [۹].

این توالی درست در ناحیه‌ای که پس از تخریب پلاسمینوزن به وسیله عوامل پرتولیتیک هنگام تهاجم سلولهای بدخیم، ایجاد می‌شود؛ یعنی در انتهای آمینی مولکول آنژیواستاتین واقع شده است. این مولکول براحتی به خون می‌ریزد و به دلیل وزن کم، در ادرار افراد مبتلا، فیلتر می‌شود؛ در حالی که پلاسمینوزن به دلیل 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^۱ بود که آنژیواستاتین موجود در آن جذب و خارج شده بود. کنترل مثبت نیز حاوی قطعات آنژیواستاتینی می‌باشد، این کنترل با قرار دادن پلاسمینوزن 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

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^۱ 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^۲ 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 لوئیس^۳ 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

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

4. Sepharoselysine

اختصاصیت آن حتی قبل از روشهای آسیب شناسی در مرحله سرطان درجا، سرطان پستان را با آن تشخیص و شانس درمان را افزایش داد.

برای روش تهاجمی (آسیب شناسی) باشد. با توجه به نتایج حاصل می توان گفت حداقل دقتی در حد تشخیص های پاتولوژی دارد و شاید بتوان با افزایش حساسیت و

جدول ۲ مقایسه عوامل مداخله گر در بیماران و افراد شاهد

افراد شاهد	افراد بیمار	عوامل مداخله گر
۳۵	۴۰	میانگین سنی
۱۹	۱۴	روز قاعدگی
۰	۵٪	سابقه فامیلی

۵- منابع

- 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 NH₂-Terminal region of native human plasminogen induces a modification of its functional properties. Fibrinolysis and proteolysis., 11 (3):155-163, 1997.
- [۱] قاضی جهانی، بهرام. اصول بیماریهای زنان کیستتر. چاپ اول. اشارت، صفحه ۲۳۴-۲۳۳، ۱۳۷۴.
- [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