# شناسایی لیپوکالین ۲ با استفاده از نانو ذرات طلا در سرم بیماران مبتلا به سرطان پروستات

• دکتر رضا نکوئیان
استادیار، گروه بیوتکنولوژی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران
rnekouian@gmail.com

• بهاره سادات رسولی
دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه بیوتکنولوژی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران

**خلاصه**

**زمینه و هدف:** طبق آخرین آمار منتشر شده در سال ۲۰۱۲، سرطان پروستات سومین سرطان شایع در ایران است و نرخ مرگ و میر آن حدود ۷ نفر در هر ۱۰۰۰۰۰ نفر است. به طور کلی نتایج حاکی از آن است که Lipocalin-2 نقش مهمی در پیشرفت سرطان پروستات با تنظیم Metalloproteinase 9 و Metalloproteinase 2 دارد و به عنوان یک انکوپروتئین موثر در تکثیر و تهاجم سرطان پروستات شناخته شده است. در این مطالعه از توانایی نانو ذرات طلا در اتصال به پروتئین ها استفاده شد تا امکان روش تشخیصی دقیق تر و حساس تری را فراهم آورد.

**روش بررسی:** نانو ذرات طلای سنتز شده در سایزهای مختلف، به آنتی بادی متصل شده و سرم بیماری حاوی Lipocalin-2 را تشخیص دادند. به کمک تغییر رنگ نمونه کلوییدی این برهمکنش مورد بررسی قرار گرفت.

**یافته ها:** تغییر رنگ در سرم بیماران به دنبال تجمع نانو ذرات طلا در اثر اتصال Anti- Lipocalin-2 و Lipocalin-2 مشاهده شد.

**بحث و نتیجه گیری:** بررسی ها نشان داد که Lipocalin-2 می تواند مارکر تشخیصی مناسبی برای تشخیص دقیق سرطان پروستات باشد که البته نیاز به مطالعات بیشتر و دقیق تری در این زمینه دارد.

**کلمات کلیدی:** سرطان پروستات، لیپوکالین۲، نانوذرات طلا، آنتی بادی

**مقدمه**

طبق آخرین آمار منتشر شده در سال ۲۰۱۲، سرطان پروستات سومین سرطان شایع در ایران است و نرخ مرگ و میر آن حدود ۷ نفر در هر ۱۰۰۰۰۰ نفر است به عبارت دیگر نیمی از افراد مبتلا به آن به دلیل تشخیص دیر هنگام (مراحل پیشرفته بیماری) جان خود را از دست می دهند (۱).

سرطان پروستات به گسترش سرطان در پروستات که غده ای در دستگاه تولید مثل مردان است، گفته می شود که اغلب رشد آهسته ای دارند. سلول های سرطانی ممکن است از پروستات به سایر نواحی بدن به ویژه گره های لنفاوی و استخوان گسترش یابند. در مراحل اولیه ممکن است هیچ علائمی دیده نشود ولی با پیشرفت آن علائمی مانند مشکل در دفع ادرار، خون در ادرار یا درد در ناحیه لگن وجود داشته باشد (۲).

مهم ترین روش های تشخیصی سرطان پروستات شامل: سونوگرافی داخل رکتالی (TURS)، معاینه انگشتی رکتال (DRE)، اندازه گیری مقادیر سرمی، ادرار و یا بافتی Prostate Specific Antigen (PSA) (آنتی ژن اختصاصی پروستات) و نهایتا بیوپسی همراه با بررسی هیستوپاتولوژیک است. دو روش اول (TURS و DRE) سرطان پروستات را در مراحل نهایی تشخیص می دهند و بنابراین قادر به افتراق هیپرپلازی خوش خیم پروستات و سرطان پروستات نیستند (۲). اندازه‌گیری مقادیر PSA علیرغم ارزش تشخیصی بالا دارای



[ Downloaded from labdiagnosis.ir on 2025-08-01 ]

محدودیت‌هایی می‌باشد که عبارتند از: اختصاصی بودن آنتی بادی های آنتی PSA و ترکیب کالیبراتور و مقادیر PSA که به کالیبراتور مربوط است و ایزوفرم های PSA که برای آماده سازی آنتی بادی های ضد PSA استفاده می شوند، طراحی آزمایش و ترکیب رقیق کننده ها است. به علاوه درصد زیادی از PSA سرم آزاد نیست و به صورت کمپلکس با مهارکننده های پروتئازی می باشد. بنابراین نیاز به روش های دقیق تر و حساس تری برای تشخیص زودهنگام این نوع سرطان وجود دارد (۳).

همان طور که می دانیم از جمله علومی که در طی چند سال گذشته به سرعت رشد کرده است، نانوتکنولوژی می‌باشد. فناوری نانو در زمینه سرطان در برگیرنده محدوده گسترده ای از مواد و روش ها است که متقابلا برای حل و برطرف نمودن تعداد زیادی از مسائل و مشکلات در این زمینه به کار می رود (٤).

اندازه نانو ذرات به طور تقریبی بین یک تا صد نانومتر بوده و به دلیل اینکه روش های اندازه گیری متعددی همچون جذب نوری، فلورسانس، پخش رامان، نیروی مغناطیسی و جریان الکتریکی می توانند برای تشخیص آن ها به کار روند، نشانگرهای خوبی در طراحی بیوحسگرها می باشند. از این ذرات در تشخیص DNA، پروتئین، میکروارگانیسم ها و غیره استفاده می شود (٥،٦). از جمله نانوذراتی که در علوم پزشکی مصرف به سزایی دارند نانو ذرات طلا می باشند. از خصوصیات نوری و دمایی پروب های نانوذرات طلای جدا از هم و مجتمع، به عنوان یک روش تشخیص استفاده می گردد. میان‌کنش ویژه موجود در بین اولیگونوکلئوتیدهای تثبیت شده (DNA Probe) روی نانو ذرات طلا و DNA هدف باعث تجمع (assembly) نانو ذرات طلا به شکل شبکه‌ای متصل به هم و در نتیجه تغییر رنگ می شود. این تغییر رنگ به واسطه خصوصیات پخش، میان‌کنش بین پلاسمون های سطح ذره و تغییر فاصله بین نانو ذرات طلا ایجاد می گردد. این تغییر رنگ نشان دهنده وجود مولکول هدف در نمونه بوده و به روش چشمی هم قابل مشاهده است (۷).

امروزه یکی از برتری های نانو ذرات طلا نسبت به دیگر ذرات نانو، سهولت اتصال آن ها به مولکول های زیستی است. نانو ذرات طلا قابلیت اتصال به پروتئین‌ها را دارند که نوع اتصال آن ها اتصال از نوع کوالانسی است و اتصال محکم و قابل اطمینانی است. در این گزارش از پروتئین لیپوکالین جهت تشخیص سرطان پروستات استفاده شد (۸).

لیپوکالین۲ که با نام Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL) نیز شناخته می شود، پروتئینی kDa25 است که توسط ژن LCN2 کد می شود. NGAL در ایمنی ذاتی با به دام انداختن آهن منجر به محدود کردن رشد باکتری ها می شود. به دنبال تهاجم باکتری گیرنده‌های Toll-like در سطح سلول‌های ایمنی ساخت و ترشح NGAL را تحریک می کنند. این پروتئین در نوتروفیل ها و به میزان کمی در کلیه، پروستات، اپتلیال دستگاه تنفسی و گوارش بیان می شود. NGAL به عنوان بیومارکر در آسیب های کلیوی استفاده می گردد. NGAL به عنوان یک فاکتور رشد نیز عملکرد دارد (۹).

اتصال NGAL به سایدروسفرهای باکتری در پاسخ ایمنی ذاتی به عفونت های باکتریایی حائز اهمیت می‌باشد. به دنبال تهاجم باکتریایی سنتز و ترشح NGAL تحریک می‌شود. NGAL به عنوان یک فاکتور رشد و همچنین تنظیم کننده رشد سلول و آپوپتوز عملکرد دارد (۱۰).

افزایش بیان NGAL در بسیاری از سرطان ها، از جمله: سرطان پستان، نئوپلاسم کلورکتال، سرطان تخمدان و اندومتریوم دیده شده است. به علاوه کاهش بیان آن در سرطان پانکراس و کارسینومای Hepatocellular نیز یافت شده است.

بررسی ها نشان داده است که لیپوکالین ۲ ممکن است نقش مهمی در رشد و تهاجم سلول های پروستات داشته باشد. لیپوکالین ۲ در شکل گیری فنوتیپ بدخیم سلول‌های توموری مانند تکثیر، تهاجم، مهاجرت، آپوپتوز و متاستاز داشته باشد. به علاوه بیان بیش از حد



[ Downloaded from labdiagnosis.ir on 2025-08-01 ]

لیپوکالین ۲ با بقای بیماران مبتلا به سرطان پروستات و پستان در ارتباط است (۱۰).

بیان لیپوکالین ۲ در بافت سرطانی پروستات بیش از بافت نرمال است و همچنین لیپوکالین ۲ با تمایز و Gleason's grade بافت های تومروی پروستات ارتباط نزدیکی دارد که اشاره به اهمیت لیپوکالین ۲ در پیشرفت سرطان پروستات دارد. کاهش بیان لیپوکالین ۲ باعث القای توقف چرخه سلولی در $G_0/G_1$ می شود که با کاهش بیان سایکلین $D_1$ و افزایش p21 و p53 همراه است. افزایش بیان p21 منجر به مهار شکل گیری کمپلکس سایکلین $D_1$ - cdk4، فعالیت کینازی cdk6 و همچنین پیشرفت چرخه سلولی در بسیاری از سرطان ها می شود. بیان بیش از حد LCN2، بیان مهار کننده های چرخه سلولی p53, p21 در سلول های سرطانی نخاعی SiHa کاهش می‌دهد. بنابراین لیپوکالین ۲ با هدف قرار دادن p21، p53 و سایکلین $D_1$ می تواند تکثیر و پیشرفت چرخه سلولی را در سلول های سرطان پروستات تحریک کند (۱۲).

لیپوکالین ۲ نقش های متفاوتی در متاستاز تومور بسته به نوع آن دارد. بررسی ها نشان داده که مهار لیپوکالین ۲ در سلول های سرطانی پروستات بیان متالوپروتئیناز ۹ و متالوپروتئیناز ۲ را کاهش و در نتیجه مهاجرت سلول‌های سرطانی را کاهش می دهد در حالی که مطالعات دیگر بیانگر ضعیف بودن نقش آن در ویژگی‌های تهاجمی تومور است. لیپوکالین ۲ یک کمپلکسی را با متالوپروتئیناز ۲، که در بسیاری از سرطان ها مانند سرطان پستان، مثانه، پانکراس و پروستات افزایش می یابد، تشکیل می دهد و همچنین به عنوان یک نشانه ای برای غیروابستگی به هورمون در سرطان پروستات و پستان است (۱۱). به طور کلی نتایج حاکی از آن است که لیپوکالین ۲ نقش مهمی در پیشرفت سرطان پروستات با تنظیم متالوپروتئیناز ۹ و متالوپروتئیناز ۲ دارد و به عنوان یک انکوپروتئین موثر در تکثیر و تهاجم سرطان پروستات شناخته شده است.

در این مطالعه از توانایی نانوذرات طلا در اتصال به پروتئین ها استفاده شد و سپس نانوذرات طلا به آنتی لیپوکالین متصل شدند و لیپوکالین ۲ موجود در سرم بیماران را تشخیص دادند.

## روش بررسی

در این مطالعه در ابتدا نانو ذرات طلا به روش تورکویچ و با استفاده از(Sigma-Aldrich) HAuCl4 و Sodium citrate(Sigma-Aldrich) سنتز شد. در مرحله بعد نانو ذرات سنتز شده به غلظت دلخواه‌رسیدند و سپس Anti-lipocalin2 (Sigma-Aldrich) نیز به رقت ۱٤ میلی گرم بر میلی لیتر رسید. برای اتصال آنتی بادی به نانو ذرات طلا، همواره این عمل در شرایط، دما و pH یکسان انجام شد. ۱۰۰ میکرولیتر از آنتی بادی به ۱ میلی لیتر محلول حاوی نانو ذره اضافه شده و در دمای اتاق به مدت ۲۰ دقیقه روی روتاتور قرار گرفت و سپس برای حذف آنتی بادی های اضافه با دور 140000rpm به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ٤ درجه سانتی گراد سانتریفوژ می کنیم و رسوب به دست آمده را در بافر نگه دارنده حل می کنیم. نانوذرات طلای کانژوگه شده پایدار بوده و می‌توانند در یخچال نگهداری شوند.

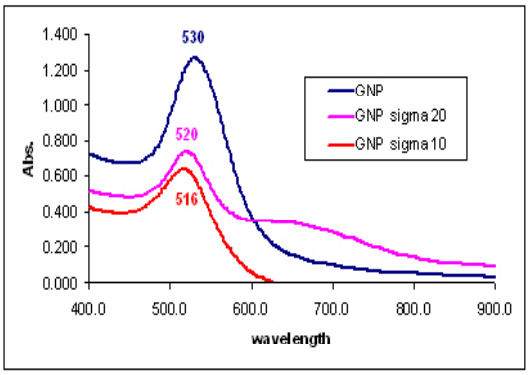
۲۰ نمونه از سرم افراد بیمار مبتلا به سرطان پروستات در لوله های مخصوص جمع آوری شده و سپس به آن‌ها نانو ذرات متصل به Anti-lipocalin2 را اضافه می‌کنیم. در اثر تجمع نانوذرات تغییر رنگ در محلول مشاهده می شود.

## نتایج

نانوذرات تهیه شده در این پروژه در سه سایز ۱۰، ۲۰ و ۳۵ نانومتر بودند که همگی به روش تورکویچ و در محیط آبی تهیه شدند. مهم ترین عامل تعیین کننده سایز نانو ذرات نیز رنگ محلول نهایی و جذب آن‌ها بود (نمودار ۱). رنگ نانوذرات طلا در سایز های مختلف متفاوت است همچنین جذب نانو ذرات نیز با افزایش سایز افزایش می یابد. با توجه به نمودار شماره ۱ نانوذرات با سایز ۳۵ نانومتر بهترین جذب را نشان دادند که در بقیه مراحل آزمایش از آن ها استفاده شد.

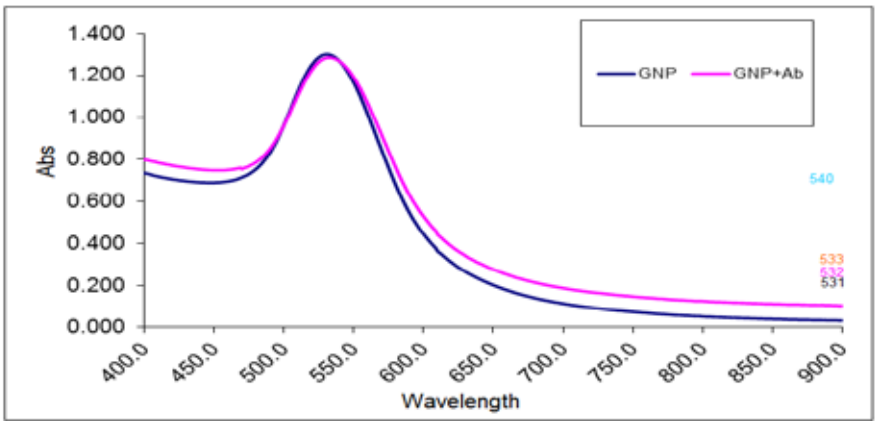


[ Downloaded from labdiagnosis.ir on 2025-08-01 ]



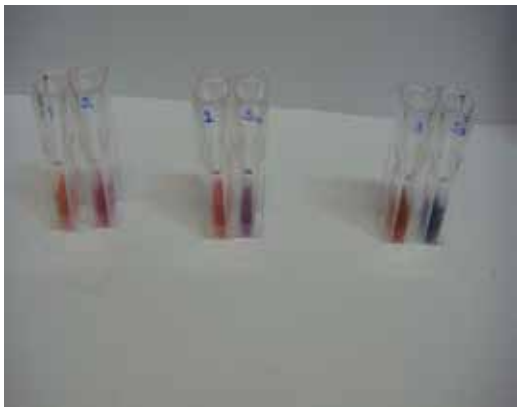

**نمودار ۱: نمودار جذب نانوذرات با سایز های مختلف. نمودار آبی رنگ مربوط به نانوذرات با سایز ۳۵ نانومتر، نمودار صورتی رنگ مربوط به نانوذرات با سایز ۲۰ نانومتر، نمودار قرمز رنگ مربوط به نانوذرات با سایز ۱۰ نانومتر**

**بررسی اتصال مناسب نانوذرات به آنتی بادی:** در صورت اتصال مناسب آنتی بادی به نانو ذرات شیفت کمتر از ۳ نانومتر انتظار می رود، شیفت بیشتر نشانه تجمع نانوذرات می باشد.




**نمودار ۲: بررسی اتصال مناسب Anti-Lipocalin2 به نانوذرات**

**بررسی برهمکنش نانوذرات متصل به آنتی بادی با لیپوکالین:** اتصال مناسب نانوذرات متصل به Anti-Lipocalin2 با سرم بیماران منجر به تغییر رنگ از قرمز به بنفش شد (شکل ۱) که نشانه انجام صحیح آزمایش می باشد.



**شکل ۱: تغییر رنگ مشاهده شده در اثر اتصال نانوذرات متصل به Anti-Lipocalin2 به لیپوکالین ۲**

## بحث و نتیجه گیری

در جوامع امروزی با پیشرفت روز افزون علم و صنعت، شاهد کثرت بیماری های گوناگون و بعضا غیر قابل تشخیص و درمان هستیم. از سرطان های گوناگون گرفته تا بیماری های عفونی که منشا ناشناخته ای دارند، همه نوع بشر را نگران خود ساخته و به همین علت همواره دانشمندان را به تحقیقات جدید مشغول داشته است.

برای تشخیص اکثر بیماری هایی که چند علته (Multi Factorial) هستند نمی توان از یک روش تشخیصی استفاده نمود. به طور مثال در تشخیص سرطان پروستات سونوگرافی داخل رکتالی (TURS)، معاینه انگشتی رکتال (DRE)، اندازه گیری مقادیر سرمی، ادرار و یا بافتی PSA (آنتی ژن اختصاصی پروستات) و نهایتا بیوپسی همراه با بررسی هیستوپاتولوژیک در کنار هم باعث تجمیع شواهد برای یک تشخیص صحیح می شود. ولی همیشه یک سوال باقی است. با وجود تمامی این آزمایش ها و معاینه ها، چرا هنوز در تشخیص، دارای نقاط ضعف و



[ Downloaded from labdiagnosis.ir on 2025-08-01 ]

گاها عدم تشخیص به موقع هستیم؟

در چند دهه اخیر استفاده از نانو ذرات، برای طراحی سیستمی که اولا دقیق تر و دوما ساده تر و ارزان قیمت‌تر باشد، در اولویت قرار داشته است. از این قبیل می توان از طراحی بیوسنسورها و بیومارکرهایی که با دخالت نانو ذرات موجبات تشخیص را فراهم می آورند، نام برد. یکی از نانو ذراتی که تا کنون بیشترین استفاده را به دلیل غیر سمی بودن و خصوصیات سنتزی و نوری داشته است، نانوذرات طلا (AuNPs) می باشد. نانو ذرات طلا به دلیل دقت در چگونگی ساخت و خصوصیات بسیار گسترده و خاص نوری، در تشخیص سرطان ها موفق بوده اند.

در این طرح پژوهشی استفاده از نانو ذرات طلا در تشخیص سرطان پروستات، از این واقعیت پیروی می نماید که لیپوکالین ۲ نقش مهمی در رشد و تهاجم سلول های پروستات، شکل‌گیری فنوتیپ بدخیم سلول های توموری مانند تکثیر، تهاجم، مهاجرت، آپوپتوز و متاستاز داشته است. به علاوه بیان بیش از حد لیپوکالین ۲ با بقای بیماران مبتلا به سرطان پروستات و پستان در ارتباط است. اگر آنتی لیپوکالین ۲ بتواند با نانو ذرات طلا که دارای خصوصیات معینی هستند اتصال (کانژوگه) برقرار کند، می توان انتظار داشت که نانو ذرات طلا در سرم بیماران مبتلا به سرطان پروستات با سطح بالای لیپوکالین تجمع پیدا کرده و باعث تغییر در خواص نوری شوند که همین واقعیت امکان آن را ایجاد می کند که بتوان به صورت چشمی و فقط با تغییر رنگ، این سرطان را تشخیص داد. این کیت تشخیصی توانایی تشخیص بدون نیاز به تجهیزات پیچیده آزمایشگاهی را دارا می باشد و هزینه تشخیص برای بیمار بسیار پایین خواهد بود و با توجه به این که در این پژوهش از آنتی بادی مونوکلونال استفاده شده است در نتیجه تنها توانایی اتصال به لیپوکالین ۲ را دارد و حساسیت کافی جهت تشخیص را دارد.

## References


*1- Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. CA: a cancer journal for clinicians. 2015;65(2):87-108.*

*2- Wolf A, Wender RC, Etzioni RB, Thompson IM, D'Amico AV, Volk RJ, et al. American Cancer Society guideline for the early detection of prostate cancer: update 2010. CA: a cancer journal for clinicians. 2010;60(2):70-98.*

*3- Carter HB, Albertsen PC, Barry MJ, Etzioni R, Freedland SJ, Greene KL, et al. Early detection of prostate cancer: AUA guideline. The Journal of urology. 2013;190(2):419-26.*

*4- Roszek, W.H. Ae jong, R.E. Geeitsma. Nanotechnology in Medical Application B RIVM Report.1999,5.*

*5- Wang ZG, Song C, Ding B. Functional DNA nanostructures for photonic and biomedical applications. Small. 2013;9(13):2210-22.*

*6- Hummel RE. Understanding Materials Science: History· Properties· Applications: Springer Science & Business Media; 2013.*

*7- Li M, Lin Y-C, Wu C-C, Liu H-S. Enhancing the efficiency of a PCR using gold nanoparticles. Nucleic acids research. 2005;33(21):e184-e*

*8- Jain KK. The handbook of nanomedicine: Springer Science & Business Media; 2012*

*9- Kjeldsen L, Johnsen AH, Sengeløv H, Borregaard N (May 1993). "Isolation and primary structure of NGAL, a novel protein associated with human neutrophil gelatinase". J. Biol. Chem. 268 (14): 10425–32.*

*10- Tsuchimoto A, Shinke H, Uesugi M, Kikuchi M, Hashimoto E, Sato T, et al. Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin: a useful biomarker for tacrolimus-induced acute kidney injury in liver transplant patients. 2014.*

*11- Ruiz-Morales JM, Dorantes-Heredia R, Arrieta O, Chávez-Tapia NC, Motola-Kuba D. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) prognostic value in lung adenocarcinoma. Tumor Biology. 2014:1-10*

*12- Tung MC, Hsieh SC, Yang SF, Cheng CW, Tsai RT, Wang SC, et al. Knockdown of lipocalin-2 suppresses the growth and invasion of prostate cancer cells. The Prostate. 2013;73(12):1281-90.*


[ Downloaded from labdiagnosis.ir on 2025-08-01 ]