

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، لیپوکالین ۲،

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 نهایتاً 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). اندازه گیری مقادیر PSA علیرغم ارزش تشخیصی بالا دارای



محدودیت‌هایی می‌باشد که عبارتند از: اختصاصی بودن آنتی بادی‌های آنتی PSA و ترکیب کالیبراتور و مقادیر PSA که به کالیبراتور مربوط است و ایزوفرم‌های PSA که برای آماده‌سازی آنتی بادی‌های ضد PSA استفاده می‌شوند، طراحی آزمایش و ترکیب دقیق کننده‌ها است. به علاوه درصد زیادی از PSA سرم آزاد نیست و به صورت کمپلکس با مهارکننده‌های پروتئازی می‌باشد. بنابراین نیاز به روش‌های دقیق تر و حساس تری برای تشخیص زودهنگام این نوع سرطان وجود دارد (۳).

همان‌طور که می‌دانیم از جمله علومی که در طی چند سال گذشته به سرعت رشد کرده است، نانوتکنولوژی می‌باشد. فناوری نانو در زمینه سرطان در برگزیده‌های محدوده گسترده‌ای از مواد و روش‌ها است که متقابلاً برای حل و برطرف نمودن تعداد زیادی از مسائل و مشکلات در این زمینه به کار می‌رود (۴).

اندازه نانو ذرات به طور تقریبی بین یک تا صد نانومتر بوده و به دلیل اینکه روش‌های اندازه‌گیری متعددی همچون جذب نوری، فلورسانس، پخش رامان، نیروی مغناطیسی و جریان الکتریکی می‌توانند برای تشخیص آن‌ها به کار روند، نشانگرهای خوبی در طراحی بیوسنسورها می‌باشند. از این ذرات در تشخیص DNA، پروتئین، میکروارگانیزم‌ها و غیره استفاده می‌شود (۵، ۶). از جمله نانوذراتی که در علوم پزشکی مصرف به‌سزایی دارند نانو ذرات طلا می‌باشند. از خصوصیات نوری و دمایی پروب‌های نانوذرات طلای جدا از هم و مجتمع، به عنوان یک روش تشخیص استفاده می‌گردد. میان‌کنش ویژه موجود در بین اولیگونوکلوئیدهای 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 می‌شود. این تغییر رنگ به واسطه خصوصیات پخش، میان‌کنش بین پلاسمون‌های سطح ذره و تغییر فاصله بین نانو ذرات طلا ایجاد می‌گردد. این تغییر رنگ نشان‌دهنده وجود مولکول هدف در نمونه بوده و به روش چشمی هم قابل مشاهده است (۷).

امروزه یکی از برتری‌های نانو ذرات طلا نسبت به دیگر ذرات نانو، سهولت اتصال آن‌ها به مولکول‌های زیستی است. نانو ذرات طلا قابلیت اتصال به پروتئین‌ها را دارند که نوع اتصال آن‌ها 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).

لیپوکالین ۲ که با نام

Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL)

نیز شناخته می‌شود، پروتئینی ۲۵ kDa است که توسط ژن LCN2 کد می‌شود. NGAL در ایمنی ذاتی با به دام انداختن آهن منجر به محدود کردن رشد باکتری‌ها می‌شود. به دنبال تهاجم باکتری‌گیرنده‌های Toll-like در سطح سلول‌های ایمنی ساخت و ترشح NGAL را تحریک می‌کنند. این پروتئین در نوتروفیل‌ها و به میزان کمی در کلیه، پروستات، اپتلیال دستگاه تنفسی و گوارش بیان می‌شود. NGAL به عنوان بیومارکر در آسیب‌های کلیوی استفاده می‌گردد. NGAL به عنوان یک فاکتور رشد نیز عملکرد دارد (۹).

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

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

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

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 توموری 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 می دهد. بنابراین لیپوکالین ۲ با هدف قرار دادن $p53$ ، $p21$ 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 سلول های سرطانی را کاهش می دهد در حالی که مطالعات دیگر بیانگر ضعیف بودن نقش آن در ویژگی های 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

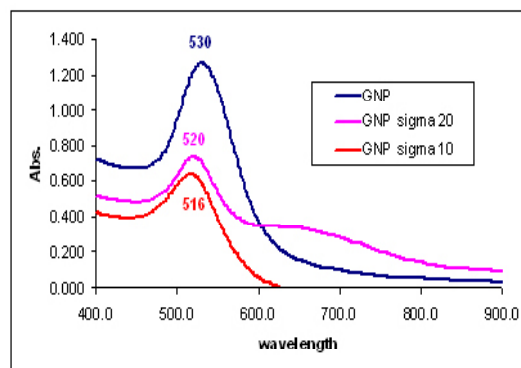
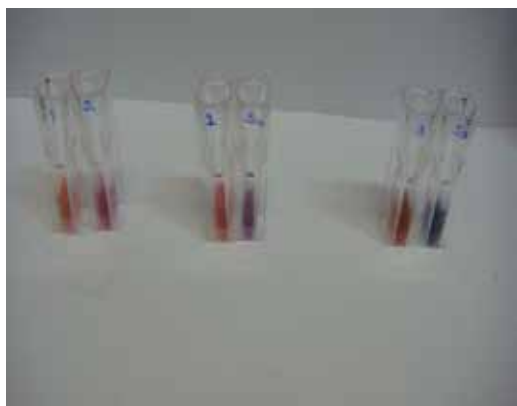
در این مطالعه در ابتدا نانو ذرات طلا به روش تورکوپیچ و با استفاده از $H AuCl_4$ (Sigma-Aldrich) و Sodium citrate (Sigma-Aldrich) سنتز شد. در مرحله بعد نانو ذرات سنتز شده به غلظت دلخواه رسیدند و سپس Anti-lipocalin2 (Sigma-Aldrich) نیز به رقت ۱۴ میلی گرم بر میلی لیتر رسید. برای اتصال آنتی بادی به نانو 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 ۴ 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 می توانند در یخچال نگهداری شوند.

۲۰ نمونه از سرم افراد بیمار مبتلا به سرطان پروستات در لوله های مخصوص جمع آوری شده و سپس به آن ها نانو ذرات متصل به Anti-lipocalin2 را اضافه می کنیم. 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 تورکوپیچ و در محیط آبی تهیه شدند. مهم ترین عامل تعیین کننده سایز نانو ذرات نیز رنگ محلول نهایی و جذب آن ها 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.





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

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

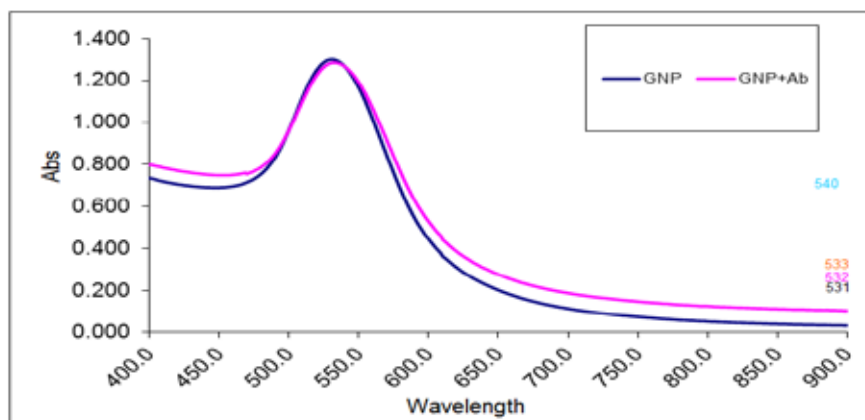
بررسی اتصال مناسب نانوذرات به آنتی بادی: در صورت اتصال مناسب آنتی بادی به نانوذرات شیفتر کمتر از ۳ نانومتر انتظار می رود، شیفتر بیشتر نشانه تجمع نانوذرات می باشد.

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 منشأ 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 علتی (Multi Factorial)

هستند نمی توان از یک روش تشخیصی استفاده نمود. به طور مثال در تشخیص سرطان پروستات سونوگرافی داخل رکتالی (TURS)، معاینه انگشتی



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.

تهاجم، مهاجرت، آپویتوز 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.

گاهها عدم تشخیص به موقع هستیم؟ در چند دهه اخیر استفاده از نانو ذرات، برای طراحی سیستمی که اولاً دقیق تر و دوماً ساده تر و ارزان قیمت تر 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 مهاجم سلول های پروستات، شکل گیری فنوتیپ بدخیم سلول های توموری مانند تکثیر،

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, Sengelov 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, Chavez-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.

