جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز
دوره ۲۹ شماره ۲ تابستان ۱۳۸۶ صفحات ۱۰۷-۱۰۱

بررسی ارتباط بیان ژن آنتی ژن اختصاصی پروستات و فعالیت آنزیم تلومراز در بیماران مبتلا به سرطان پستان در شهر تبریز

دکتر نصرت اله ضرغامی: دانشیار بیوشیمی بالینی، مرکز تحقیقات کاربردی دارویی دانشگاه علوم پزشکی تبریز: نویسنده رابط
E-mail: Zarghami@tbzmed.ac.ir
عباس مهاجری: دانشجوی ژنتیک ملکولی، مرکز تحقیقات سل و بیماریهای ریوی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز
دکتر امراله بیات: دانشیار جراحی عمومی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز
بهرنگ علنی: مربی پژوهشی، مرکز تحقیقات سل و بیماریهای ریوی دانشگاه علوم پزشکی تبریز

دریافت: ۸۵/۳/۱۰، **پذیرش**: ۸۵/۹/۱۳

چکیده

زمینه و اهداف: سرطان پستان متداول ترین بیماری در بین زنان است. در گسترش و پیشرفت سرطان پستان مجموعه ای از تومور مارکرهای مختلف از جمله آنتی ژن اختصاصی پروستات و آنزیم تلومراز مورد نظر می باشند. هدف از این مطالعه ارزیابی رابطهٔ بیان ژن آنتی ژن اختصاصی پروستات و تلومراز در بیماران مبتلا به سرطان پستان و گروه کنترل است.

روش بررسی: در این مطالعه موردی- شاهدی تعداد ۲۵ زن مبتلا به تومورهای خوش خیم پستان به عنوان گروه کنترل و ۳۵ زن مبتلا به سرطان پستان به عنوان گروه مورد وارد مطالعه شدند. میزان بیان mRNA آنتی ژن اختصاصی پروستات با تکنیک RT-PCR ، فعالیت تلومراز با روش PCR – ELISA و پروتئین آنتی ژن اختصاصی پروستات با تکنیکChemiluminescene در کلیهٔ تومورها اندازه گیری شد.

یافته ها: با بکار گیری روش TRAP فعالیت آنزیم تلومراز در تمام نمونه های سرطانی مبتلا به سرطان پستان مثبت ارزیابی شد. تفاوت مقادیر نسبی فعالیت آنزیم تلومراز در تمام مراحل و درجات توموری از لحاظ آماری معنی دار بود($p<۰/۰۵$). تنها در نمونه های خوش خیم و مرحله و درجه یک توموری mRNA آنتی ژن اختصاصی پروستات نمایان شد. تفاوت سطوح سیتوزول تومورال بین افراد مورد و شاهد و همچنین بین کلیهٔ مراحل و نیز درجات مختلف توموری کاملا معنی دار بود. در نهایت همبستگی معکوس بین سطح تومورال آنتی ژن اختصاصی پروستات و فعالیت آنزیم تلومراز در افراد بیمار مشاهده شد.

نتیجه گیری: نتایج بدست آمده از این مطالعه ارتباط معنی دار معکوس بین سطح بیان mRNA و افزایش بیان ژن تلومراز در توسعه و گسترش سرطان پستان نشان داد. بنابراین اندازه گیری فعالیت آنزیم تلومراز می تواند بعنوان یک مارکر بیولوژیکی مطلوب همراه با آنتی ژن اختصاصی پروستات در تشخیص سرطان پستان محسوب گردد.

کلید واژه ها: آنتی ژن اختصاصی پروستات، تلومراز، تومور مارکر، سرطان پستان

مقدمه

سرطان پستان یک مشکل فراگیر در همهٔ دنیا بوده و با بیش از یک میلیون مورد جدید در سال و ۱۸٪ کل بدخیمی ها، فراوانترین سرطان زنان را تشکیل می دهد. در دنیا سالیانه بیش از ۸ میلیون نفر به انواع سرطان مبتلا می شوند که در حدود یک میلیون مورد ازآن مربوط به سرطان پستان است. دردنیا سالیانه ۶/۳ میلیون نفر در اثر سرطان جان خود را از دست می دهند. که سرطان پستان با ۳۸۵۰۰۰ مورد در ردیف پنجم قرار دارد. براساس مطالعات انجام شده اخیر سرطان پستان فراوانترین بدخیمی زنان ایرانی است. مقایسه آمار دوره جدید با گزارشات قبلی مبین افزایش نسبتا سریع میزان بروز این بیماری در زنان ایرانی می باشد(۱).

تومورمارکرها محصولات سلولی هستندکه اغلب پروتئینی بوده و در پاسخ به وجود یا پیشرفت سرطان توسط تومور یا بدن میزبان تولید می شوند. تومورمارکرها را می توان در بافت ها ومایعات مختلف بدن و روی سطح سلولهای سرطانی ردیابی کرد. میزان تومورمارکرها معمولا انعکاسی ازحجم و فعالیت تومور می باشد. تشخیص منشاء تومور متاستازی، کنترل موفقیت آمیز بودن درمانهای شیمیایی یا جراحی، تشخیص نوع سرطان و همچنین غربالگری آن ازجنبه های مهم کاربرد تومورمارکرها در پزشکی می باشد(۲).

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

آنتی ژن اختصاصی پروستات یک گلیکوپروتئین تک زنجیره ای با وزن مولکولی ۳۳ کیلودالتون است که توالی اصلی آن ۲۳۷ اسیدآمینه می باشد(۷). این تومور مارکر ابتدا در پروستات یافته شد که بعدا آنرا از این بافت جدا کردند. با توجه به اینکه تا آن زمان PSA فقط در پروستات یافت شده بود به نام آنتی ژن اختصاصی پروستات نامیده شده و به عنوان یک تومورمارکر در تشخیص سریع، تعیین مرحله وکنترل سرطان پروستات مطرح شد(۳و٤). مطالعات متعدد نشان داده است که PSA در خارج از غده پروستات دارای اعمال بیولوژیک و فیزیولوژیک نیز می باشد. غدد اطراف پیشابراهی یا غدد Skene اولین بافت زنانه ای بود که نشان داده شد قادر به تولید PSA می باشد. این بافت تقریبا حالتی مشابه عمل پروستات در زنان را داشته و منشاء تکاملی آن مشابه پروستات مردانه است(۵). تفاوت اساسی بین پروستات و دیگر بافت ها در تولید PSA این است که مقدار تولید آن در دیگر بافتها نسبتا کم است. بافت های سینه ،رحم و تخمدان از نظر بیان ژن و تولید پروتئین شبیه پروستات مقداری PSA تولید و رشد و تمایزشان توسط هورمونهای استروئیدی کنترل می شود(٦). بیان mRNA آنتی ژن اختصاصی پروستات درسرطان پستان اول بار توسط Diamandis و همکاران گزارش شد(۷و۸). PSA در تومورهای کولون، کبد ،کلیه، غده آدرنال و پاراتیروئید نیز یافت شده است (۹). یکی از مهمترین آنزیمهایی که در پیشرفت سرطان ازاهمیت خاصی برخوردار است آنزیم تلومراز می باشد. تلومراز یک ترانس کریپتاز معکوس است که مسئول بسط توالیهای تلومر بوده و در نتیجه کوتاه شدن تلومرها را TTAGGG جبران می کند. سلولهای سوماتیک طبیعی انسان دارای فعالیت تلومراز نبوده و این فعالیت تنها در سلولهای بنیادی و سلوهای توموری دیده می شود (۱۱). وجود فعالیت تلومراز باعث ایجاد سلولهای نامیرا و مسئول تکثیر نامحدود سلولهای سرطانی می گردد (۱۲).

امروزه درک ارتباط بین فعالیت عوامل ایجاد کننده سرطان در سطح ژنتیکی بعنوان یک مسئله مهم در تحقیقات بشمار رفته و با توجه به اینکه بیان ژن PSA و تلومراز توسط هورمون های استروئیدی تنظیم می شوند، هر دو به عنوان تومورمارکر در تشخیص انواع تومورهای خوش خیم و بدخیم سرطان پستان، تخمدان، پروستات و سایر سرطانها مطرح می باشند. بنابراین، در این تحقیق بیان ژن PSA و میزان تغییرات آن در سیتوزول توموری و همچنین بررسی میزان فعالیت آنزیم تلومراز به منظور تعیین رابطه بین بیان ژن آنتی ژن اختصاصی پروستات و فعالیت آنزیم تلومراز در بافت های تومورال پستان بررسی شد.

مواد و روش ها

در این مطالعه نمونه های توموری مورد نظر از بیمارانی که در مدت ۲۳ ماه در فاصله زمانی آبان ماه ۱۳۸۲ تا مهر ماه ۱۳۸٤ به بیمارستان امام تبریز مراجعه کرده بودند جمع آوری گردید. نمونه های مناسب پس از برداشت بافت توسط جراح در اتاق عمل و زیر نظر پاتولوژیست باتوجه به علائم پاتولوژیکی در دو گروه تومورهای خوش خیم و تومورهای بدخیم طبقه بندی شدند. در نهایت ۳۵ مورد تومور بد خیم (داکتال کارسینوما، لوبولار کارسینوما) و ۲۵ مورد تومور خوش خیم (فیبرو آدنوما، تغییرات فیبروکیستیک، آبسه و آدنوزیس) انتخاب شدند.

جهت استخراج سیتوزول توموری، ابتدا نمونه های بافت توموری با استفاده از دستگاه Tissue hammering که در آزمایشگاه طراحی شده بود در ازت مایع پودر، سپس مقدار ۲۰۰ میکرولیتر بافر لیز سلولی { ۱۰ میلی مولار Tris-HCl (pH ۸)، یک میلی مولار کلرید منیزیم، ۰/۱ میلی مولار بنزآمیدین، ۵ میلی مولار بتامرکاپتواتانل، ۰/۵ درصد CHAPS، ۱۰ درصد گلیسرول و ۱ میلی مولار EDTA } اضافه شده و به مدت ۲۰ دقیقه در ۱۵۰۰ دور سانتریفیوژ و فاز رویی به آرامی به میکروتیوب جدید منتقل شد(۱۲). مقدار پروتئین استخراجی بر طبق روش برادفورد با استفاده از رنگ آبی کوماس ۲۵۰ و منحنی استاندارد آلبومین سرم گاوی تعیین گردید(۱۳).

اندازه گیری سطح آنتی ژن اختصاصی پروستات در سیتوزول توموری با استفاده از تکنیک کمی لومینسانس از نوع ساندویچی با بکارگیری دو آنتی بادی اختصاصی(اختصاصی آنزیم کنژوگه و ثابت شده) با میل ترکیبی بالا (High Affinity) و دارای نواحی متفاوت و شاخص اپی توپی و با استفاده از سیستم بیوتین- استرپتوآویدین برای دو اپی توپ مختلف (کیت شرکت Monobind آمریکا با شماره کاتولوگ 2175-300) انجام گرفت (۱۴).

استخراج Total RNA با استفاده از روش Trizol ™ (کیت شرکت Gibco BRL) انجام گردید. نمونه ها پس از استخراج در DEPC Water حل شد و برای استفاده بعدی در دمای ۷۰- درجه سانتیگراد نگهداری گردید. کیفیت RNA استخراج شده با روش اندازه گیری میزان جذب ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر تعیین گردید(۱۵).

طراحی پرایمر اختصاصی با استفاده از نرم افزار الیگو ویرایش پنجم بر اساس توالی حاصله در NCBI انجام گرفت. از آنجائی که برای مطالعه بیان ژن نیازمند استفاده از ژنهای خانه دار هستیم پرایمر اختصاصی بتا اکتین برای آن طراحی شد. استفاده از ژنهای خانه دار بدلیل بیان یکسان آنها در تمام بافتها در شرایط مختلف می باشد.

بمنظور بهینه سازی شرایط RT ، غلظت واکنشگرها بر اساس دستور العمل کیت شرکت Gibco BRL بر اساس بکار گیری از جفت پرایمرهای توالی ژن آنتی ژن اختصاصی پروستات به عنوان متغیر با توالی 5'-،PSAF: 5'-TGCGCAAGTTCACCCTCA-3' CCCTCTCCTTACTTCATCC-3' و بتا اکتین به عنوان کنترل با توالی Beta F : 5'-ACAATGAGCTGCGTGTGGCT -3'، Beta R :5'- TCTCCTTAATGTCACGCACGA -3' برای حجم ۲۵ میکرولیتر تنظیم و داخل لوله های میکروتیوب آماده شد(

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

۱۵). پس از آماده سازی واکنشگرهای PCR برنامه لازم جهت انجام PCR در دستگاه ترموسایکلر (شرکت اپندروف آلمان مدل AG) تنظیم گردید. بعد از اتمام PCR ، کلیه محصولات آن همراه با مارکر ملکولی DNA بر روی ژل اگارز ۱۰ درصد الکتروفورز شد. از ژلها پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید و رنگ زدایی با آب مقطر در زیر نور UV توسط دستگاه UVPDoc عکس برداری شد.

جهت اندازه گیری میزان فعالیت آنزیم تلومراز از روش[1] مبتنی بر دو تکنیک واکنشهای زنجیره ای پلیمرازی و الیزا بر اساس روش هولت استفاده شد(۱۲). به منظور بهینه سازی شرایط TRAP-PCR غلظت واکنشگر برای حجم ۵۰ میکرولیتر تنظیم و آماده شد .لازم به ذکر است که در این واکنش Taq Polymerase نقش آنزیم تلومراز را ایفا میکند. پس از آماده سازی واکنشگرها برنامه لازم جهت انجام PCR در دستگاه ترموسایکلر مدل شرکت اپندروف تنظیم گردید. پس از انجام PCR برای اندازه گیری میزان فعالیت آنزیم تلومراز از روش ELISA استفاده شد. با اندازه گیری مقادیر جذب شده نمونه ها در طول موج ٤٥٠ نانومتر و قرار دادن در منحنی استاندارد بدست آمده میزان فعالیت نسبی آنزیم تلومراز در نمونه های مجهول شناسایی شد(۱۲).

محاسبه آماری داده های حاصل با استفاده از ویرایش شماره ۱۱/۵ نرم افزاری آماری SPSS تجزیه و تحلیل شد. از آزمون T مزدوج جهت تجزیه و تحلیل داده های کمی استفاده. معنی دار بودن آماری به میزان$p< ۰/۰۵$ دو دنباله در نظر گرفته شد.تمام نتایج به صورت انحراف معیار± میانگین گزارش گردید.

یافته ها

نمونه های توموری از بیمارانی که در مدت ۲۳ ماه در فاصله زمانی آبان ماه۱۳۸۲ تا مهرماه۱۳۸۴ به بیمارستان امام تبریز مراجعه کرده بودند جمع آوری گردید. نمونه های مناسب پس از برداشت بافت توسط جراح در اتاق عمل و زیر نظر پاتولوژیست باتوجه به علائم پاتولوژیکی در دو گروه تومورهای خوش خیم و تومورهای بدخیم طبقه بندی شدند. در مجموع ۶۰ نفر زن با محدودهٔ سنی ۲۴ تا ۷۶ سال و با میانگین سنی۱۲/۷۲±۴۴/۱۲ سال مورد مطالعه قرار گرفتند که همگی مبتلا به بیماری تومور پستان بودند که ۳۵ نفر دارای تومور بدخیم (گروه مورد) و۲۵ نفر دارای تومور خوش خیم (گروه کنترل) بودند. محدودهٔ سنی گروه مورد۳۰ تا ۷۶ سال و با میانگین سنی ۱۲/۰۸±۳۸/۵۶ سال که۸۰ درصد کارسینومای داکتال و۲۰ درصدکارسینومای لوبولار بودند. محدودهٔ سنی گروه شاهد ۲۱ تا ۶۸ سال با میانگین سنی۱۱/۷۸±۴۸/۰۹ سال که ۲۴ درصد دارای تغییرات فیبروکیستیک و۲۴ درصد دارای آبسه و ۵۲ درصد دارای فیبروآدنوما بودند. ۷ نفر از این افراد دارای سرطان پستان با مرحله یک توموری، ۱۸ نفر دارای مرحله دو توموری و ۱۰ نفر دارای مرحله سه توموری بودند. همچنین از این ۳۵ نفر ۱۷ نفر دارای تومور با درجه یک، ۹ نفر با درجه دو و ۹ نفر درجه سه توموری بودند.

با بررسی RNA استخراجی به روش Trizol حاصل با روش اسپکتروفتومتری مشاهده شد که RNA استخراج شده نسبتاً خالص می باشد و OD نمونه ها ($\frac{OD_{۲۶۰}}{OD_{۲۸۰}}$)در محدودهٔ ۲- ۱/۸ می باشد. پس از انجام PCR، بررسی قطعات به دست آمده نشان داد که طبق پیش بینی دو قطعه به طول های ۷۵۳ bp مربوط به PSA و ۳۷۲ bp مربوط به بتا اکتین بدست آمد. اعداد مربوطه از طریق مقایسه باند های بدست آمده با مارکر ملکولی gene Ruler که دارای باندهای DNA با اندازه بین bp ۱۰۰۰ تا ۱۰۰ bp می باشند تعیین گردید.

باند های PSA و بتا اکتین در افراد بیمار با مراحل توموری مختلف در تصویر۱ قابل مشاهده می باشند. شرایط استخراج RNA ، انجام PCR و میزان لود نمونه PCR در تمامی موارد یکسان در نظر گرفته شد. مشاهده باندها در تصاویر فوق گویای این مطلب است که ژن PSA در افراد با مرحلهٔ توموری خوش خیم و نیز در بافت های توموری بدخیم با مرحلهٔ توموری ۱ بیان شده است ولی در بافت های توموری بدخیم با درجه توموری بالا باند مربوط به PSA قابل شناسایی نیست. از طرف دیگر ژن بتا اکتین در مراحل توموری مختلف بیان شده است (تصویر ۱). به عبارت دیگر عدم تغییر در بیان ژن بتا اکتین نشانگر صحت انجام مراحل بررسی بیان ژن PSA بعنوان متغیر می باشد.

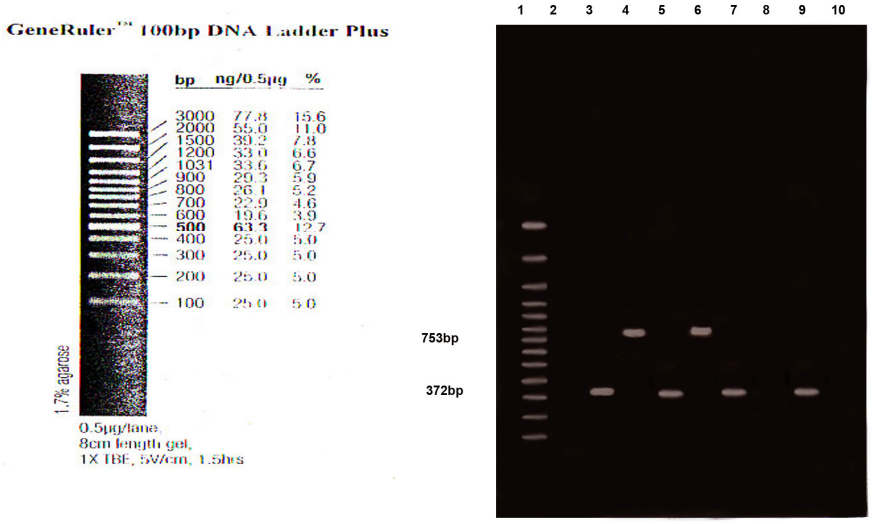
با استفاده از تکنیک کمی لومینسانس(Chemiluminescene) میزان پروتئین آنتی ژن اختصاصی پروستات در سطح سیتوزل توموری مورد ارزیابی قرار گرفت که میانگین میزان پروتئین در گروه مورد(تومورهای بدخیم) ۱/۷۷±٦/۸٦نانوگرم در گرم پروتئین تام و در گروه شاهد (تومورهای خوش خیم) ۳/۳٤ ± ۹۰/٤ نانوگرم در گرم پروتئین تام اندازه گیری شد که این اختلاف میزان پروتئین بین دو گروه از نظر آماری معنی دار بود (نمودار۱- الف). درضمن میانگین میزان آنتی ژن اختصاصی پروستات در درجه یک توموری ۲/٦ ± ۸/۲۳ نانوگرم در گرم پروتئین تام ، در درجه ۲ توموری٤/٦۳ ± ۷ نانوگرم در گرم پروتئین تام و در درجه ۳ توموری ۱/٦٦ ± ۳/۳۳ نانوگرم در گرم پروتئین تام که این افزایش بین درجات ۱ با ۲، ۲ با ۳ و ۱ با ۳ معنی دار بود($p<۰/۰۵$). در ضمن میانگین میزان پروتئین در مرحله۱ توموری ٤/۲۸ ± ۱۵/۷۱ نانوگرم در گرم پروتئین تام و در مرحله ۲ توموری ۲/۵۳± ۷/۲۲ نانوگرم در گرم پروتئین تام و در مرحله ۳ توموری صفر نانوگرم در گرم پروتئین تام بود که این اختلاف در مراحل ۲ با ۳ و ۱ با ۳ از نظر آماری معنی دار بود($p<۰/۰۵$) (نمودار۱- ب)

میانگین فعالیت نسبی تلومراز[2] در گروه توموری بدخیم (کنترل) ۸۱/ ۳ ± ٤۳/۳٤ درصد اندازه گیری شد. درضمن میانگین RTA در درجه یک ۲/۲۱±۱٤/۸۵ درصد در درجه دو ۰٤/ ۲± ۳۸/۵۰ درصد و در درجه سه ٤/۱٦±۷۲ درصد بود که این

1. Telomeric repeat amplification protocol, TRAP
2. Relative telomerase activity, RTA

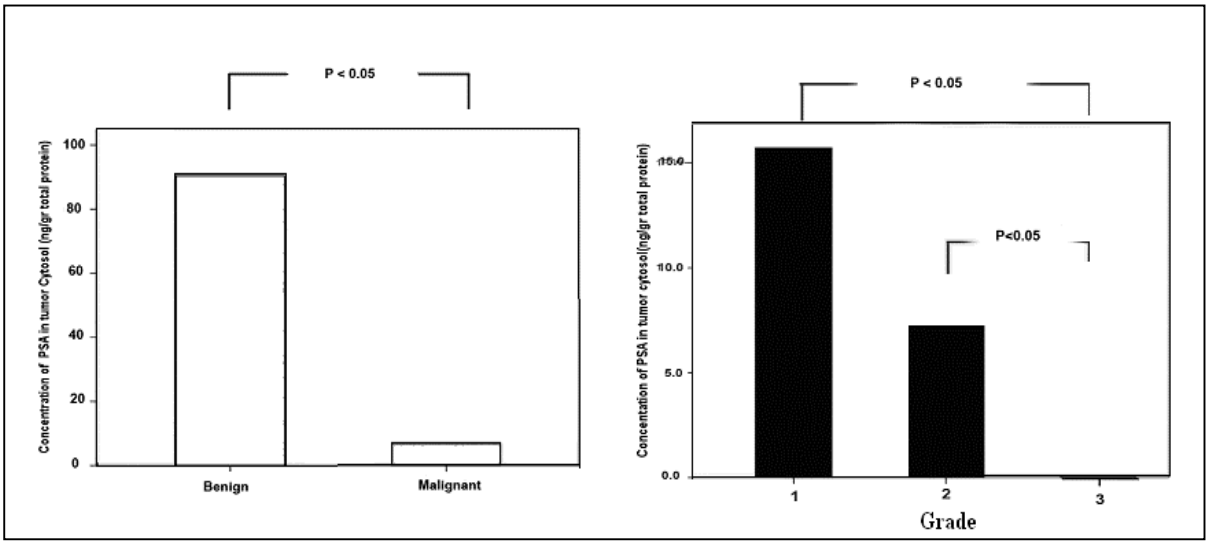
افزایش بین درجات یک با دو، درجات دو با سه و درجات یک با سه معنی دار بود(p<۰/۰۵) (نمودار۲- الف). میانگین فعالیت نسبی تلومراز RTA در مرحله یک توموری ۳/۹۶ ±۳۲/۱۱ و در مرحله ۲ توموری ۶/۵۸±۵۱/۲۲ و در مرحله ۳ توموری ۸/۸۵ ± ۵۶/۶۶ درصد بود که این اختلاف در بین مراحل ۱ با ۲ ، ۲ با ۳ و ۱ با ۳ از نظر آماری معنی دار بود(p<۰/۰۵) (نمودار۲- ب). در ۲۵ نمونهٔ گروه شاهد (تومورهای خوش خیم) فعالیت نسبی تلومراز مثبت نبود.

با بررسی میزان پروتئین آنتی ژن اختصاصی پروستات و فعالیت آنزیم تلومراز بافتهای توموری بیماران در تومورهای خوش خیم و بدخیم مشخص شد که در تومورهای خوش خیم میزان پروتئین آنتی ژن اختصاصی پروستات بالا بوده در حالیکه در این تومورها فعایت نسبی آنزیم تلومراز منفی است و با بدخیم تر شدن تومور این رابطه بالعکس شده و میزان پروتئین آنتی ژن اختصاصی پروستات کاهش یافته ولی در مقابل فعالیت نسبی آنزیم تلومراز افزایش می یابد. (نمودار ۳)



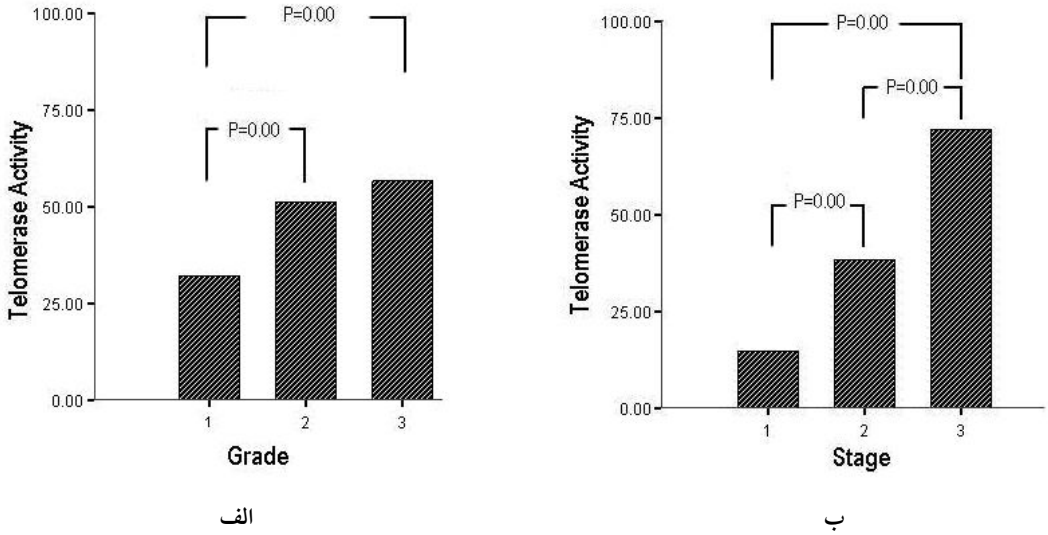
تصویر ۱: مقایسه بیان ژن PSA در بافت های توموری پستان،

۱- مارکر، ۲- کنترل منفی، ۳- تومور خوش خیم بتا اکتین مثبت، ٤- تومور خوش خیم PSA مثبت، ۵- تومور بدخیم(مرحلهٔ۱) بتا اکتین مثبت، ٦- تومور بدخیم(مرحلهٔ۱)PSA مثبت، ۷- ۹- تومورهای بدخیم(مرحلهٔ۲و۳) بتا اکتین مثبت،۸-۱۰- تومورهای بدخیم(مرحلهٔ۲و۳)PSA منفی

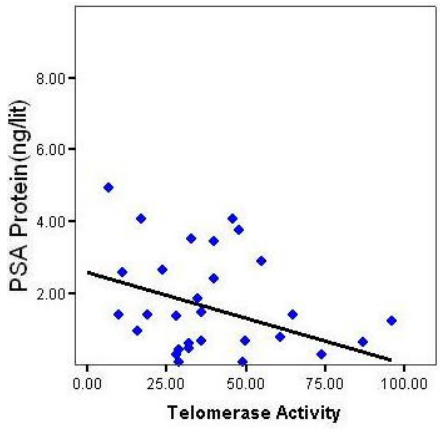


الف ب

نمودار ۱: مقایسه سطح سیتوزول تومورال آنتی ژن اختصاصی پروستات (الف) در افراد نرمال و بیماران مبتلا به سرطان پستان و (ب) در مراحل مختلف توموری



نمودار۲: مقایسه فعالیت آنزیم تلومراز (الف) در درجات مختلف تومور و (ب) در مراحل مختلف توموری.



r= -0.429*

نمودار۳: همبستگی بین سطح سیتوزول توموری بدخیم آنتی ژن اختصاصی پروستات و فعالیت آنزیم تلومراز(p<۰/۰۵)

بحث

سرطان یک مشکل فراگیر در همهٔ جوامع دنیا بوده مجموعه ای از تومورمارکرها در توسعه و پیشرفت راههای تشخیص آن نقش بسزایی دارند، از جمله آنتی ژن اختصاصی پروستات و آنزیم تلومراز که در این مطالعه با توجه به اهمیت تشخیص بافت های توموری پستان این دو مارکر مورد مطالعه قرار گرفتند.

در این مطالعه نیز با روش RT- PCR بیان ژن PSA در بافت های توموری مورد بررسی و مشاهده شد که در ۷۲ درصد بافتهای توموری خوش خیم ونیز در یک بافت از هفت بافت توموری بدخیم که در مرحلهٔ اولیه هستند، mRNA آنتی ژن اختصاصی پروستات قابل تشخیص است. بیان mRNA آنتی ژن اختصاصی پروستات درسرطان پستان اول بار توسط Diamandis و همکاران گزارش شد(۱۴). سپسMonne و همکاران در ۱۹۹۸ با کاربرد RT-PCR مشخص کردند، بیان mRNA آنتی ژن اختصاصی پروستات در تومورهای سینه ای که دارای PSA هستند موجود بوده ولی در تومورهای فاقد PSA وجود ندارد (۱۵). اما در این تحقیق بر خلاف نتایج Diamandis که بیان کرده بود mRNA در تمامی بافت های توموری دارای PSA، قابل تشخیص است، نتایج به عمل آمده نشان داد که mRNA فقط در بافتهای توموری خوش خیم و توموری بدخیم مرحلهٔ اول که میزان بالایی PSA (برابر یا بیشتر از ۰/۰۳ نانوگرم در میلی گرم پروتئین تام) دارند، قابل تشخیص است.

در این مطالعه با بکارگیری تکنیک Chemiluminescene وجود PSA در بافت های توموری خوش خیم و سرطانی پستان ثابت شد که موافق با نتایج مطالعات Howarth وDiamandis

می باشد. Diamandis و همکاران نشان دادند در ۳۰ درصد سیتوزول سلولی سرطان پستان ، PSA وجود دارد (١٤). Howarth نیز بیان PSA در بیماریهای خوش خیم مانند فیبروآدنوم و در بافت های نرمال پستان و نیز در تومورها را گزارش کرده است (۱۶). در آزمایشات به عمل آمده در این تحقیق مشخص گردید که میزان پروتئین در بافتهای توموری خوش خیم (٣/٣٤ ±٤ /٩٠ نانوگرم در گرم پروتئین تام) نسبت به بافت های توموری بدخیم(١/٧٧±٦/٨٦ نانوگرم در گرم پروتئین تام) به طور معنی داری بالا بوده و در بافت های سرطانی با افزایش اندازه و پیشرفت تومور میزان PSA پائین می باشد. بطوریکه در مرحلهٔ یک، ٤/٢٨ ± ١٥/٧١ نانوگرم در گرم پروتئین تام، در مرحلهٔ دو، ٢/٥٣± ٧/٢٢ نانوگرم در گرم پروتئین تام، و در مرحلهٔ سه توموری صفر نانوگرم در گرم پروتئین تام بود که این اختلاف در بین مرحلهٔ۱و۲، مرحلهٔ ۱و۳، مرحلهٔ۳و۲ از نظر آماری معنی دار بوده (p<۰/۰۵) که موافق با نتایج تحقیق Zaviacic است. Zaviacic در ۱۹۹۳ نشان داد، بالاترین بیان PSA در بافت پستان در سطح پروتئین در بافتهای خوش خیم پستان و پایین ترین بیان PSA نیز در مراحل پیشرفته بافتهای سرطانی دیده می شود و این مطلب نشان می دهد که بیان PSA در بافتهای بدخیم پستان نسبت به بافتهای هایپرپلاستیک خوش خیم یا بافتهای سالم پایین تر است (۱۷). در حالیکه این اختلاف در درجات مختلف توموری معنی دار نمی باشد. در این تحقیق بیشترین میزان PSA در زنان مبتلا به فیبروآدنوما و کیست پستان مشاهده گردید(۷۶ نانوگرم در لیتر) در حالیکه در مطالعات Borchert ۵۵ نانو گرم در لیتر گزارش شده (۱۸) که این اختلاف می تواند به علت تفاوت شرایط استخراج سیتوزول و یا خطای آزمایش باشد. علت بالا بودن میزان PSA در بافت های توموری خوش خیم نسبت به بافت های سرطانی اینست که احتمالا منشا تولید PSA در بافت سینه سلول های نرمال باشند و به این دلیل در زنان دارای سرطان پستان، PSA افزایش نمی یابد(۱۹و۲۰) تلومراز یک DNA پلیمراز وابسته به RNA است که توالی های تلومری را سنتز می کند. تلومراز در اغلب سلول های سوماتیک طبیعی انسان فاقد فعالیت بوده اما در بیش از ۹۰ درصد سلول های سرطانی دارای فعالیت است(۲۲). در این تحقیق میزان فعالیت آنزیم تلومراز با استفاده از تکنیک TRAP Assay(PCR-ELISA) مورد ارزیابی قرار گرفت که مشابه با نظریهٔ Mokbel در سال ۲۰۰۰ میزان فعالیت تلومراز در بافت های سرطانی بالا (۳/۸۱ ±۴۳/۳۴ درصد) در حالیکه در بافت های خوش خیم فاقد فعالیت بود(۰،۰۰درصد) و اختلاف فعالیت تلومراز بین بافت های سرطانی و بافت های خوش خیم پستان از نظر آماری معنی دار بود و به این ترتیب اندازه گیری فعالیت تلومراز در بافت های توموری به تشخیص سرطان سینه کمک می کند که این مطلب نشان دهنده ارتباط بین فعالیت تلومراز و پیش آگهی بیماری می باشد(۲۳). در ۱۹۹۴ Harley و همکارانش گزارشاتی در ارتباط با سرطان و ظهور تلومراز منتشر کردند بطوریکه فعالیت آنزیم تلومراز در اغلب سلولهای سرطانی بدخیم دچار تنظیم افزایشی گردیده (۲۴) و ما نیز در این تحقیق مشاهده کردیم در بافت های سرطانی با افزایش اندازه و پیشرفت تومور میزان فعالیت تلومراز افزایش می یابد. میزان فعالیت تلومراز بافت های توموری بدخیم در مرحلهٔ یک ۲/۲۱±۱۴/۸۵ درصد، در مرحلهٔ دو ۲/۰۴±۵۰/ ۳۸ درصد و در مرحله سه ۴/۳۱۶±۷۲ درصد می باشد که این اختلاف در بین مرحلهٔ۱و۲، مرحلهٔ۱و۳، مرحلهٔ ۳و۲ از نظر آماری معنی دار است (p<۰/۰۵). میزان فعالیت تلومراز در درجهٔ اول ۳/۹۶±۳۲/۱۱، در درجهٔ دوم ۶/۵۸±۵۱/۲۲ درصد و در درجهٔ سوم ۸/۸۵±۵۶/۶۶ درصد می باشد که این اختلاف در بین درجهٔ ۱و۲، درجهٔ ۱و۳، درجهٔ۳و۲ از نظر آماری معنی دار است (p<۰/۰۵).

نتیجه گیری

بدین ترتیب می توان چنین نتیجه گرفت که تلومراز در تکثیر نامحدود سلولهای سرطانی نقش داشته و می تواند به عنوان یک ابزار تشخیصی و درمانی استفاده شود. فعالیت تلومراز از طریق نسخه نویسی ژن hTERT تنظیم می شود و بین میزان بیان ژن hTERT و فعالیت تلومراز رابطهٔ مستقیمی وجود دارد(۲۵). افزایش میزان فعالیت تلومراز با افزایش درجه و مرحلهٔ توموری نتیجهٔ افزایش میزان بیان ژن hTERT می باشد. مقایسهٔ میزان پروتئین و نیز بیان mRNA آنتی ژن اختصاصی پروستات با فعالیت آنزیم تلومراز در بافت های توموری نشان داد که یک رابطهٔ معکوس بین میزان پروتئین و نیز بیان mRNA آنتی ژن اختصاصی پروستات با فعالیت آنزیم تلومراز وجود دارد بطوریکه با افزایش سرطانی شدن ، فعالیت تلومراز افزایش یافته و در مقابل میزان آنتی ژن اختصاصی پروستات کاهش یافته بوده و نیز mRNA آنتی ژن اختصاصی پروستات قابل تشخیص نبود.

مزیت این مطالعه نسبت به سایر مطالعات صورت گرفته این است که اولا دو تومورمارکر به صورت موازی در تومورهای خوش خیم و سرطانی پستان مورد مطالعه قرار گرفته ثانیا بررسی این دوتومورمارکر به صورت موازی می تواند حساسیت تشخیص کلینیکی و پیش آگهی را بالا ببرد. جهت بررسی مکانیسم تنظیم این دو ژن در سرطان های وابسته به هورمونهای استروئیدی به ویژه سرطان پستان نیازمند مطالعات بیشتر می باشد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از حمایت مرکز تحقیقات کاربردی دارویی دانشگاه علوم پزشکی تبریز در جهت تامین اعتبارات این پژوهش با کد طرح ۹۳-۸۳، همکاران محترم در بیمارستان امام خمینی تبریز و نیز آزمایشگاه تخصصی و فوق تخصصی پاتوبیولوژی مرکزی دانشگاه علوم پزشکی تبریز برای تمهید مقدمات این پژوهش کمال تشکر و قدردانی را دارند.

References

1. Iranian medical student, http://www.breast–clinic.com/page5.htm
2. Watt KWK,Lee PJ, Mtimkulu T,Chan WP, Loor R. Human prostate- specific antigen: structural and functional similarity with serine proteases. *Proc Natl Acad Sci USA*.1986; 83: 3166-3170.
3. Lundwall A, Lilja H. Molecular cloning of human prostate specific antigen cDNA. *FEBS Lett*. 1987; **214**: 317-322.
4. Wang MC, Pasidero LD,Kuriyama M, Valenzuela LA, Murphy GP, Chu TM. Prostate specific antigen: a new potential marker for prostatic cancer. *Prostate*.1981; **2**: 89-96.
5. Partin AW, Oesterling JE.The clinical usefulness of prostate- specific antigen. *J Urol*.1994; **152**(5 Pt 1): 1358–68.
6. Diamandis E. P, Yu H. Nonprostatic sources of prostate-specific. *Antigen*. *Urol. Clin* N Am.1997; **24***:* 275–282.
7. Yousef GM, Ordon MH, Foussias G, Diamandis EP. Genomic organization of the siglec gene locus on chromosome 19q13.4 and cloning of two new siglec pseudogenes. *Gene*.2002; **286**: 259–70.
8. Diamandis E.P, Yu H, Sutherland D.J.A. Detection of prostate-specific antigen Immunore-activity in breast tumors. *Breast Cancer Res Trea*t.1994; **32**: 301–310.
9. Levesque M, Yu H, D'Costa M, Diamandis EP. Prostate -specific antigen expression by various tumors. *Clin Lab Anal*.1995; **9**:123-128.
10. Blackburn EH. Telomeres and telomerase: their mechanisms of action and the effects of altering their functions. *FEBS Lett* .2005; **579**(4): 859-62.
11. Ahmed A, Tollefsbol TO. Telomerase, telomerase inhibition, and cancer. *J Anti Aging Med*. 2003; **6**(4): 315-25.
12. Holt SE, Norton JC, Wright WE, Shay WJ. Comparison of the telomeric repeat amplification protocol (TRAP) to the new TRAP-eze telomerase detection kit. *Methods in Cell Science*. 1996; **18**: 237-248.
13. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-Dye binding. Anal. *Biochem* .1976; **72**: 248-254.
14. Diamandis E.P, Yu H, Sutherland D.J.A. Detection of prostate-specific antigen Immunore-activity in breast tumors. *Breast Cancer Res Treat*.1994; **32**: 301–310.
15. Monne M, Croce CM, Yu H, Diamandis EP. Molecular characterization of prostate- specific antigen mRNA expressed in breast tumors. *Cancer Res*.1998; **54**: 6344-6347
16. Howarth DJC, Aronson IB, Diamandis EP. Immunohistochemical localization of prostate-specific antigen in benign and malignant breast tissues. *British Journal of Cancer*.1997; **75**: 1646-1651.
17. Zaviacic M, Ablin RJ, Ruzickova M, Stvrtina S, Danihel L, Zaviacic T, Pohlodek K, Holoman K. The normal female and the male breast epithelium does not express prostate-specific antigen: preliminary immunohistochemical observations of autopsy breast tissues. *Gen Physiol Biophys*1999; **18**: 41–44.
18. Borchert G.H, Giai M, Diamandis E.P.Elevated levels of prostate-specific antigen in serum of women with fibro adenomas and breast cysts. *Journal of the National Cancer Inst*itute.1997; **89**: 587-588.
19. Diamandis E.P. New diagnostic applications and physiological functions of prostate specific antigen. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*.1995; **55** (21): 105-111.
20. Diamandis E.P. Prostate- specific antigen - new applications in breast and other cancers. *Anticancer Research*.1996; 16: 3983-3986.
21. Goldstein S. Replicative senescence: the human fibroblast comes of age. *Science*.1990; **249**:1129–1133.
22. Shay JW, Bacchetti S. A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur J Cancer*. 1997; **33**:787–791.
23. Mokbel K, Williams NJ. Telomerase and breast cancer: from diagnosis to therapy. *Int J Surg Investig*. 2000; **2**(1): 85 – 8.
24. Harley CB, Kim NW, Prowse KR,Weinrich SL,Hirsch KS,West MD, et al. Telomerase, Cell Immortality, and Cancer. *Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology*. 1994; **59**: 307 – 315
25. Muslin J and Xing H. 14–3–3 proteins: regulation of subcellular localization by molecular interference. *Cell Signal*. 2000; **12**:703–709.