مقاله پژوهشی

استخراج بافت سرطان پستان پس از رادیوتراپی حین جراحی و بررسی پروتئوم آن با استفاده از تکنیک پروتئومیکس

مینو شاهانی[1*] و فریده فیروزی[1]

۱- مرکز تحقیقات سرطان، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

*نویسنده مسئول: مینو شاهانی، دکتری تخصصی زیست پزشکی، shahani@gmail.com

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۸/۱۱/۲ تاریخ بازنگری: ۱۳۹۹/۲/۱ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۹/۴/۲۴

چکیده

پیشینه مطالعه و هدف: سرطان پستان شایع‌ترین سرطان در بین زنان ایرانی و جهان می‌باشد و در حال حاضر به عنوان دومین سرطان بدخیم بعد از سرطان ریه در زنان به شمار می‌آید. هدف از رادیوتراپی (پرتو درمانی) از بین بردن حد اکثرسلول‌های سرطانی با حداقل آسیب به بافت‌های سالم است. از روش رادیوتراپی حین عمل جراحی (IORT) می‌توان به طور دقیق و کنترل شده برای درمان ناحیه ی کوچکی از بافت، بدون آسیب به بافت و اندام‌های اطراف استفاده نمود. در این روش در اثر آسیب DNA و شروع روند آپوپتوز، سلول‌های ناحیه ی درمان (بافت هدف) تخریب و ادامه ی رشد و تقسیم غیر ممکن می‌شود.

روش مطالعه: در این مطالعه، چهار نمونه از بافت پستان بعد از پرتو دهی از بیماران که با ۲۱ گری اشعه تحت عمل جراحی پستان بودند بدست آمد. ژل الکتروفورز دوبعدی (2D-PAGE) و نرم افزار Progenesis Same Spots v3.2 جهت بررسی تغییر بیان پروتئین‌های قبل از پرتودهی و بعد از پرتودهی استفاده شد.

نتایج: تقریباً ۵۲۳ لکه بر روی ژل الکتروفورز دو بعدی مشخص شد. ۳۴۳ لکه با بیان متفاوت که دارای پارامترهای آماری معنادار ($P<۰/۰۵$) بودند تعیین شد. از این مقدار ۱۴۴ لکه کاهش در بیان داشت و ۱۷۹ لکه افزایش در بیان داشت.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد که Caspase3، BCL، BAX، BID و P53 پروتئین‌های کلیدی هستند که پس از استفاده از پرتودهی حین درمان در بافت تغییر می‌کنند.

واژه‌های کلیدی: سرطان پستان، رادیوتراپی، پروتئومیکس، الکتروفورز دو بعدی، آپوپتوز

مقدمه

امروزه سرطان یکی از عوامل اصلی مرگ و میر در جهان به شمار می‌رود و در واقع دومین مرگ غیر تصادفی دنیا بعد از مرگ‌های قلبی رده‌بندی شده است (Kontoghiorghe *et al.*, 2014). سرطان مجموعه‌ای از بیماری‌های مرتبط است که از سلول، مهم ترین واحد بدن شروع می‌گردد. در حالت عادی سلول‌ها رشد می‌کنند و زمانی که بدن به آنها نیاز دارد طی فرآیندهایی شروع به تقسیم می‌کنند و سلول‌های بیشتری را تولید می‌کنند که این رشد و تقسیم در یک فرآیند کنترل شده عملی می‌شود و سلول‌های قدیمی نیز طی فرآیند مرگ برنامه ریزی شده (آپاپتوز) از بین می‌روند. اما گاهی اوقات سلول‌ها حتی هنگامی که نیاز به سلول‌های جدید وجود ندارد، به تقسیم شدن خود ادامه داده و تشکیل یک توده از بافت به نام تومور را می‌دهند (Olsson, 2000). تومورها می‌توانند خوش خیم و یا بدخیم باشند. تومورهای خوش‌خیم دارای تکثیر کنترل شده بوده و به سایر قسمت‌های بدن گسترش نمی‌یابند و درصورت لزوم توسط جراحی از بدن خارج می‌شوند. اما تومورهای بدخیم با رشد و تکثیر غیرقابل کنترل، اعضای محل رشد خود را اشغال کرده و سپس به خارج از عضو اولیه و به اعضای هم جوار دست‌اندازی کرده و یا از راه خون ولنف گسترش و انتشار می‌یابند (Olsson, 2000). سرطان پستان شایع‌ترین سرطان در بین زنان ایرانی و جهان می‌باشد و درحال حاضر به عنوان دومین سرطان بدخیم بعد از سرطان ریه در زنان به شمار می‌آید. سرطان پستان

در زنان دارای فرکانس سنی با اوج شروع زودرس و دیررس به ترتیب ۵۲ و ۹۲ سالگی می‌باشد. اندازه، مرحله، نرخ رشد و سایر ویژگی‌های سرطان پستان نوع درمان را مشخص می‌کند. سرطان پستان در مردان در حدود ۱٪ از تمامی موارد سرطان پستان را به خود اختصاص داده است. بررسی ژن‌های مستعد ابتلا به سرطان پستان مردان محدود است، با اینحال نشان داده شده است که تقریباً ۱۰٪ از مردان مبتلا به سرطان پستان حامل جهش در ژن BRCA2 هستند در حالی که جهش در ژن BRCA1 بسیار نادر است (Ginsburg *et al.*, 2011). سرطان پستان در مراحل اولیه بدون نشانه است. پس از این که سرطان کمی پیشرفت می‌کند، ممکن است توده در پستان احساس شود (Phillips, 2007).

تکنیک IORT (Intraoperative Radiation Therapy) نوعی از روش‌های درمان سرطان با استفاده از اشعه‌درمانی (رادیوتراپی) است که در حین عمل جراحی انجام می‌پذیرد. در این روش تلاش می‌گردد تا دوز بیشتری به تومور داده شود و در عین حال بافت‌های سالم از معرض اشعه خارج باشند (Ruck and William, 1989). درمواردی که ضایعه سرطانی محدود به پستان و غدد لنفاوی ناحیه‌ای است، اقدام جراحی به امید درمان قطعی سرطان انجام می‌پذیرد. وظیفه جراح، خارج کردن سرطان از بدن است ولی هیچ جراحی نمی‌تواند ادعا کند که هیچ سلول سرطانی در بدن فرد بیمار پس از جراحی باقی نمانده است. در رادیوتراپی خارجی (External radiotherapy) به دلیل عدم ارتباط مستقیم رادیوتراپیست با تومور، همیشه این نگرانی وجود دارد که آیا تومور در معرض اشعه قرار گرفته است یا خیر؟ بنابراین همیشه سعی می‌شود که حاشیه‌های بزرگ‌تری از اطراف تومور در معرض اشعه قرار گیرد تا اطمینان حاصل شود که به محل تومور، اشعه درمان رسیده است. بنابراین سلول‌های بافت سالم بیشتری در معرض اشعه قرار می‌گیرند (Chadha *et al.*, 2009). این تکنیک اولین بار در درمان تومورهای گوارشی در سال ۱۹۱۵ میلادی استفاده شدکه درآن بیمار مبتلا به سرطان پیشرفته معده تحت عمل جراحی به همراه درمان با اشعه ایکس قرار گرفت ۷۸. در دهه ۱۹۳۰ استفاده از IORT توسط جراح‌ها و متخصصین رادیوتراپی انکولوژی پیشنهاد شد که در این روش از درمان اشعه ایکس با ۱۰۰-۵۰ کیلوولت انرژی استفاده شد. استفاده از این روش به روش مدرن در دانشگاه کیوتو برای اولین بار در سال ۱۹۶۰ شروع شد. این رادیوتراپی در ابتدا با کبالت ۹۱ شروع شد و در این روش بیمار با شکم باز از اتاق عمل به بخش رادیوتراپی منتقل شده و مجدداً به اتاق عمل باز می‌گشت (Zygogianni *et al.*, 2011). Kraus-Tiefenbacher و همکاران براین اساس که در پرتو درمانی خارجی بافت‌های سالم زیادی مورد تابش پرتو قرار می‌گیرند و ۷۱ ٪ از عودهای مجدد در پستان، در پرتو درمانی خارجی رخ می‌دهند، استفاده از تکنیک IORT را سودمند شمردند (Kraus-Tiefenbacher *et al.*, 2007). Christopher F.Njeh و همکاران در سال ۲۰۱۰، بیان کردند که از تکنیک IORT جهت پرتودهی حین جراحی لامپکتومی (جراحی برداشتن بافت پستان) می‌توان استفاده کرد. که در آن فقط بستر تودهی خارج شده به علاوه ۲-۱ سانتیمتر حاشیه ی سالم اطراف آن، به جای کل پستان درمان می‌شود (Bahadur and Constantinescu, 2012). Zhang و همکاران در سال ۲۰۱۵، به این نتیجه دست یافتند که تکنیک IORT جایگزینی مناسب برای درمان رادیوتراپی خارجی است (Zhang *et al.*, 2015).

در اواخر قرن بیستم و اوایل قرن حاضر، انقلاب اساسی در زمینه ی علم زیست‌شناسی به وجود آمد. محققین، علاوه بر آنکه هم چنان علاقه‌مند به شناسایی جزئیات فرآیندهای زیستی (در ابعاد سلولی و مولکولی) هستند، تلاش می‌کنند تا با استفاده از روش‌های جدید، اطلاعات جامعی از سیستم‌های زیستی به دست آورند. تکنولوژی‌هایی مانند مطالعات ژنوم (Genomics)، مطالعات مربوط به رونویسی ژن‌ها (Transcriptomics)، مطالعات پروتئوم (Proteomics) و مطالعه ی متابولیت‌ها (Metabolomics)، همگی در راستای شناسایی موجودات زنده در بررسی‌های فراگیر و جامع انجام می‌شوند. این مطالعات، در حقیقت انواعی از روش‌های زیست‌شناسی سیستم‌ها محسوب می‌شوند. در این مطالعات، محققان تلاش می‌کنند تا تمامی اجزای یک سیستم را به طور هم زمان مورد مطالعه قرار دهند. در مرحله ی بعد، می‌توان برخی از جزئیات را که از اهمیت بیشتری برخوردارند، انتخاب کرده و به طور دقیقتری با روش‌های دیگر مانند روش‌های بیوشیمیایی و زیست‌شناسی مولکولی مورد بررسی قرار داد. آنالیزهای پروتئومیک مارکرهای پروتئینی دراختیار می‌گذارند که می‌توان از آنها برای تکمیل نقشه ژنتیکی موجودات زنده استفاده کرد. بدین ترتیب محققین با یک حلقه بازگشتی مواجه هستند: ژنومیک به شناسایی پروتئوم کمک می‌کند و داده‌های پروتئومیک درتکمیل نقشه ژنوم کاربرد دارند (Vitzthum *et al.*, 2005).

جراحی از روش‌های همیشگی برای کنترل موضعی سرطان می‌باشد. اما از آنجائی که امکان درگیری حاشیه‌های توده سرطانی نیز وجود دارد. بنابراین رادیوتراپی یک روش معقول برای کنترل موضعی سرطان توسط رادیوتراپیست‌ها انجام می‌گیرد. هدف پزشکان رادیوتراپیست رساندن حداکثر دوز قابل تحمل با بیش‌ترین اثر بیولوژیک در یک جلسه و در کوتاه‌ترین زمان پس از جراحی است. در این پژوهش سعی شده است، به منظور تایید روش درمانی رادیوتراپی IORT با بهره گیری از روش پروتئومیک، افزایش بیان پروتئین‌های مداخله‌گر در آپوپتوز وکاهش بیان پروتئین‌های رشد در سلول‌های سرطانی بررسی گردد.

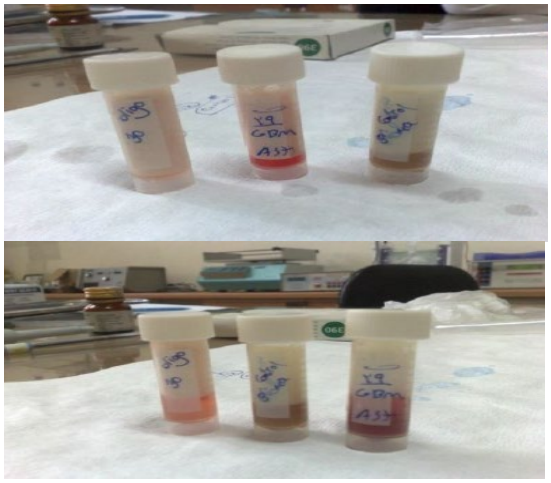
روش مطالعه

انتخاب بیماران: در این پژوهش در ابتدا کاندید درمان IORT شناسایی گردید. بیماران فوق همگی پس از معاینه فیزیکی پستان و تهیه ی تصاویر ماموگرافی، به وجود یک توده مشکوک در پستان خود پی برده و پس از انجام آزمایشات لازم و بیوپسی، آزمایشات پاتولوژیک از توده، تشخیص کارسینومای پستانی در آنها داده شده بود. از آنجا که بیماری وسرطان درکلیه این افراد در مراحل اولیه بود، بنابر تشخیص پزشک جراح، بر روی این بیماران عمل جراحی نگهدارنده پستانی انجام شد؛ در عمل جراحی، پزشک کل تومور و یک حاشیه سالم حدود ۲ سانتی‌متر از اطراف تومور (به دلیل احتمال بالای وجود سلول‌های میکروسکوپیک سرطانی در این ناحیه) را از پستان خارج نموده و سپس با درنظر گیری جواب پاتولوژی و دستور پزشک انکولوژیست، بیماران تحت درمان با دوز کامل (Radical) ۲۱ گری در اتاق عمل قرار گرفتند. بیماران همگی مونث بودند و سن ۴۵ یا بالاتر داشتند. اندازه اولیه تومور نیز ۳ سانتی‌متر و یا کمتر آن بود (شکل ۱).

شکل ۱– کارگذاری مولد پرتو دستگاه IORT در پستان بیمار

نمونه‌گیری: بلافاصله پس از تابش اشعه، ممکن است سیگنال‌های مرگ جهت آپوپتوز به راه نیافتد و پاسخ‌دهی به اشعه نیازمند زمان طولانی‌تری باشد. ط طبق مطالعات پیشین زمان لازم جهت بررسی سیگنال‌های مرگ آپوپتوزحداقل ۳۶ ساعت پس از تیمار کردن است بنابراین در این مطالعه نمونه گیری نه تنها بلافاصله بعد از پرتودهی به محل های ذکر شده انجام گرفت، بلکه ۳۶ ساعت پس از آن نیز نمونه‌گیری انجام پذیرفت. در این روش لازم است که ۳۶ ساعت پس از جراحی، مجدداً از مارجین تومور مورد پرتو دهی قرار گرفته شده و نیز نسج اطراف آن که تحت تاثیر اشعه قرار نگرفته است، نمونه گیری انجام شود. به منظور این که دسترسی به این نسوج پس از عمل، بتواند با حداقل دستکاری و با کمترین میزان بی حسی و بدون ارجاع بیمار به اطاق عمل انجام شود، لازم است که این نسج کاملا در زیر محل برش و در دسترس باشد لذا برای این کار توسط یک سوچور نایلون دو صفر در محل مارجین نزدیک تومور و یک سوچور در محل دو سانت دور از محل اشعه، نسوج علامت گذاری شد و نخ‌ها بلند نگه داشته شد و فقط پوست ترمیم شد. در حین عمل سعی شد تا این دو نخ که مربوط به محل نمونه‌گیری ۳۶ ساعت بعد هستند، در حد امکان از دو محل نزدیک به هم در انسیزیون جراحی، خارج شوند تا بی حس کردن زخم در موقع بازبینی آسان تر باشد و حداقل طول زخم جهت بیوپسی باز شود. ۳۶ ساعت پس از جراحی، زخم در محل خروج نخ‌ها با لیدوکایین دو درصد بی حس شد و نخ‌ها کشیده شد تا همراه با کشیده شدن نخ‌ها، نسج زخم در دسترس قرار گرفته و به راحتی با تیغ برداشته شود. پس از اطمینان از عدم خون‌ریزی زخم، نخ نایلون همراه آن‌ها قطع و نسج به داخل زخم رانده شد و زخم مجددا سوچور شد. پس از نمونه گیری توسط جراح، بلافاصله نمونه‌های بافتی در تانک ازت گذاشته شده و به مرکز تحقیقات پروتئومیکس دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی فرستاده شد. در این مطالعه تنها نمونه‌های مارژین قبل و بعد اشعه بررسی و آنالیز گردید.

استخراج پروتئین‌ها از بافت: ابتدا نمونه‌ها از یخچال ۸۰ – درجه سانتی‌گراد خارج شد و در تمام مراحل استخراج پروتئین، دمای نمونه‌ها به وسیله قراردادن آنها بر روی یخ حفظ گردید. در اولین مرحله، بافت را به وسیله محلول PBS که دارای protease Inhibitor است شستشو داده شد. هدف از انجام این مرحله، حذف بافت‌های خونی از نمونه به منظور کاهش میزان خطا در نتایج می‌باشد (شکل ۲). بعد از این مرحله، هم چنان که دمای نمونه‌ها بر روی یخ حفظ شده و توسط دستگاهHemogenizer همگن سازی انجام شد و سپس تیوپ‌های حاوی محلول نمونه‌های همگن شده بوسیله دستگاه سیونیکاسیون که حاوی آب یخ است، به مدت ۳۰ ثانیه موردسونیکت قرار گرفتند. تیوپ‌های حاوی نمونه همگن شده را پس از ۴ دفعه سونیکت کردن، در چند تیوپ ۲ میلی‌لیتری تقسیم شدند. تیوپ‌های نمونه‌ها، به مدت ۳۰ دقیقه و با دورg ۲۰۰۰۰ سانتریفیوژ از نوع یخچال دار جداسازی شدند. مایع رویی را که حاوی پروتئین‌ها است، با دقت جدا شده و رسوب آن دور ریخته شد. تقریباً ۵ برابر نمونه استون ۱۰۰٪ به تیوپ‌ها اضافه شد. سپس آنها با شرایط ۳۰ دقیقه، دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و با دور g ۱۵۰۰۰ سانتریفوژ شدند. این کار چند بار تکرار شد و مایع رویی، تیوپ‌های حاوی رسوب پروتئین به مدت یک ساعت در دمای اتاق قرار داده شد تا استون آن خشک شود. هدف از انجام این مرحله حذف چربی‌ها از بافت می‌باشد. پس از خشک شدن کامل استون، به هریک از تیوپ‌های حاوی رسوب پروتئینی، مقدار ۱ میلی‌لیتر از محلول Rehydration buffer و ۵۰ لاندا از محلول protease Inhibition اضافه شد. سپس عمل ورتکس انجام شده و تا حلالیت کامل رسوب به آن زمان داده شد.



شکل ۲- نمونه‌های بافت استخراج شده پس از هموژنایز

جداسازی پروتئین‌ها با الکتروفورز دوبعدی: در بعد اول از نوارهای IPG Blue strip استفاده می‌شود. این نوارها در اندازه‌های مختلف ، ۱۷، ۱۸ ۲۴ و ۱۱سانتی‌متر وجود دارد. دستگاهی که در این مرحله مورد استفاده قرار گرفت Biorad protgan IEF cell می‌باشد. ابتدا میزان نمونه ی مورد نیاز با توجه به درصد پروتئین بدست آمده برای هر نمونه و اندازه strip مورد استفاده محاسبه گردید. تیوپ‌های حاوی نمونه ی کنترل و نمونه ی اصلی را از یخچال با دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد خارج نموده و برای همگن‌شدن آن عمل ورتکس انجام شده و سپس توسط سمپلر مقدار ۱۰۰ میکروگرم از تیوپ‌های حاوی نمونه برداشته و داخل میکروتیوپ دیگر وارد گردید. سپس ۱ میلی‌لیتر از محلول Rehydration Buffer داخل میکروتیوپ‌ها ریخته و به آن ۵ میلی‌لیتر IPG Buffer و ۰/۰۰۵ گرم DTT افزوده شد. پس از تهیه ی محلول ردیف سوم، این محلول به نمونه ی قبل از اشعه، بعد از اشعه، تومور، مارژین سالم دور از محل تومور قبل و بعد از اشعه، اضافه شده و به حجم ۳۱۰ میکرولیتر رسانده شد. برچسب strip را از سر مثبت آن جدا کرده و از سمتی که نوشته دارد، آن را بر روی محلول لود شده در سینی (Tray) قرار داده شد به طوری که سر مثبت strip در سمت مثبت سینی قرار گرفت و دقت گردید که هیچ گونه حبابی به وجود نیاید. پس از انجام الکتروفورز در بعد اول، ژل آکریل آمید (۳۰٪) تهیه شد. سپس فضای بین شیشه‌ها تا حدود ۱ سانتی‌متر از بالای آن، از ژل مذکور پر شد. دقت گردید که حباب ایجاد نشود زیرا حباب به دلیل عایق الکتریسیته بودن ایجاد اختلال در جریان می‌نماید. سریعا بر روی ژل محلول بوتانول ریخته شد، تا سطح ژل یکنواخت و صاف شود. سپس دور تا دور دستگاه را فویل پیچیده و اجازه داده شد در دمای اتاق کاملاً ژل بسته شود. بافر پایین را به تانک الکتروفورز انتقال داده شد. سپس نمونه را در جایگاه خود در داخل تانک قرار داده و محلول بافر بالا به تانک اضافه شد. ابتدا به مدت ۳۰ دقیقه دستگاه را با شرایط ۳۲ آمپر، ۴۰۰ ولت و ۱۲ وات تنظیم و سپس ۵ ساعت با شرایط ۴۸ آمپر، ۴۸۰ ولت و ۱۰ وات۱ اجازه داده شد تا بعد دوم run شود. پس از اتمام کار دستگاه ژل را از روی شیشه جدا کرده ۳ بار به مدت ۱۰ دقیقه ژل با آب سه بار تقطیر شستشو داده شد تا SDS از روی سطح ژل پاک شود.

رنگ‌آمیزی نیترات نقره: با پایان یافتن بعد دوم الکتروفورز، ژل ها را از روی شیشه های خود جدا کرده و برای مدت ۱ ساعت به سینی مخصوص رنگ آمیزی حاوی محلول ثابت کننده منتقل شدند. پس از این مرحله ژل‌ها ۲ دفعه با اتانول ۳۰ درصد و ۲ بار با آب سه بار تقطیر شستشو شدند. طی این مدت ژل‌ها به آرامی توسط شیکر تکان داده شدند. پس از انجام شستشو ژل‌ها جهت آماده شدن برای رنگ آمیزی با نیترات نقره به مدت یک دقیقه در محلول حساس کننده قرار داده شدند و سپس سه بار با آب سه بار تقطیر شستشو داده شدند. پس از شستشوی آخر، محلول نیترات نقره ۰/۲ درصد به روی ژل‌ها ریخته شد و عمل رنگ آمیزی حداقل ۳۰ دقیقه ادامه یافت. سپس محلول نیترات نقره از محیط حذف گردید و سپس سه بار با آب سه بار تقطیر شستشو داده شدند. پس از این مرحله جهت آشکارسازی نقاط روی ژل‌ها، از محلول Developer به مدت ۱۵ الی ۲۰ دقیقه استفاده شد. پس از این مدت با استفاده از محلول متوقف‌کننده، آشکارسازی نقاط متوقف شد و ژل ها ۳ دفعه با آب سه بار تقطیر شستشو داده شدند.

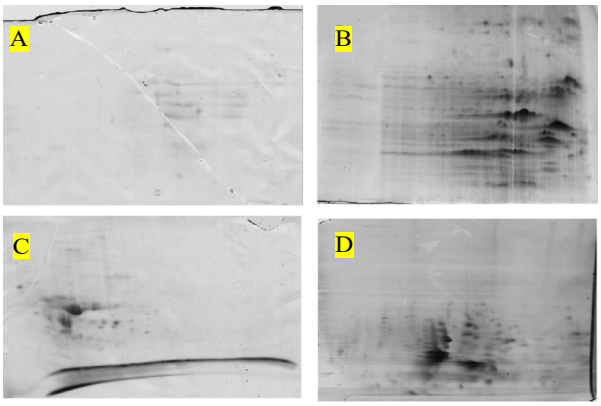
رنگ‌آمیزی کوماسی بلو: ابتدا آلومینیوم سولفات در کمی آب سه بار تقطیر حل شد سپس اتانول را به آن اضافه شد و هموژنز شد. سپس رنگ کوماسی بلو به آن افزوده گردید و در آخر اسید ارتوفسفریک به محلول افزوده شد. ژل‌ها با این رنگ نیز رنگ‌آمیزی شدند.

بیوانفورماتیک در آنالیز ژل‌های دوبعدی: ژل به وسیله اسکنر مدل BIO RAD با وضوح ۶۰۰ dp اسکن گردید. ویرایش اولیه تصویر با برنامه Quantity one انجام شد. از تصاویر ژل‌ها در ابعاد و با وضوح مختلف تصویر تهیه گردید. تصاویر اسکن شده به فرم تصویری IPG تبدیل شده و سپس به برنامه Progenesis Same Spots v3.2 منتقل شد. با استفاده از این نرم‌افزار، پروتئین‌هایی را که قبل و بعد از دریافت اشعه دارای تغییرات بیانی اعم از افزایش بیان، کاهش بیان، عدم بیان و یا اضافه بیان شده‌اند، مشخص گردید. این تغییرات بیان در هرکدام از لکه‌های ژل به پروتئینی خاص اطلاق می‌شود که با استفاده از بانک‌های اطلاعاتی پروتئین، بیومارکر موردنظر را مشخص نمود.

آنالیز آماری: از آزمون t-student در سطح خطای آزمون ۵ درصد ($P<۰/۰۵$) و توان آزمون ۸۰ درصد جهت آنالیز داده‌ها استفاده شد.

نتایج

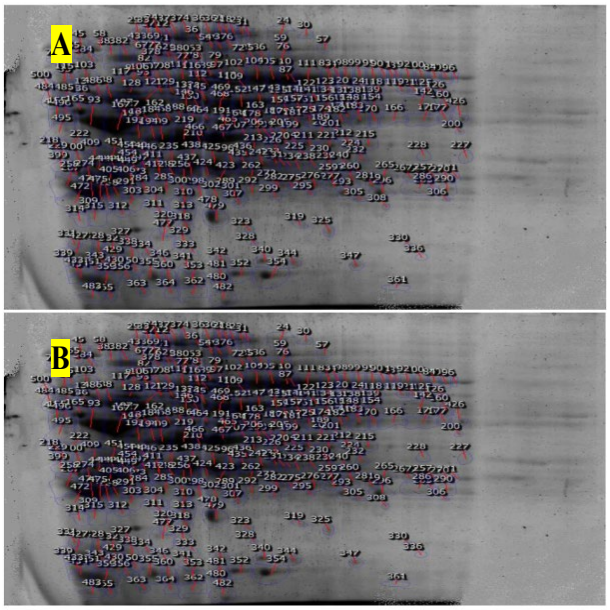
مقایسه دو روش رنگ آمیزی: میزان تغییر پروتئوم بافت‌ها، پس از استخراج پروتئین و جداسازی به روش الکتروفورز دوبعدی به وسیله دو روش رنگ آمیزی نیترات نقره و کوماسی بلو ، انجام شد. نتایج مشخص کرد که از بین این دو روش رنگ آمیزی، روش کوماسی بلو لکه‌های بیشتر با شفافیت بالاتر را مشخص می‌کند. با وجود حساسیت بیشتر روش رنگ آمیزی نقره بعضی از لکه‌ها بر روی ژل، به خوبی روش کوماسی بلو، رنگ را جذب نکرده‌اند. تصاویر ژل‌های رنگ شده در شکل ۲ نشان داده شده است.



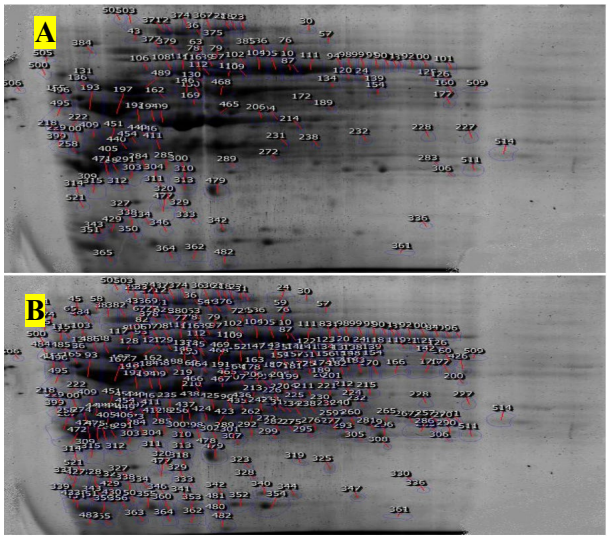
شکل ۲– تصاویر ژل الکتروفورز بافت پستان به دو روش رنگ‌آمیزی شده. (A) تصویر ژل الکتروفورز بافت پستان نزدیک محل تومور قبل از اشعه (کنترل) رنگ آمیزی شده به روش نیترات نقره، (B) تصویر ژل الکتروفورز مربوط به بافت پستان دور محل تومور قبل از اشعه (کنترل) رنگ آمیزی شده به روش کوماسی بلو، (C) تصویر ژل الکتروفورز مربوط به به بافت پستان نزدیک محل تومور بعد از اشعه رنگ آمیزی شده به روش نیترات نقره و (D) تصویر ژل الکتروفورز مربوط به بافت پستان (تومور) رنگ آمیزی شده به روش کوماسی بلو

بررسی آماری ژل‌ها: از ۲۲ بافتی که توسط عمل جراحی از بیماران مبتلا به سرطان پستان جدا شده بود، ۴ بافت بعد از اشعه برای استخراج پروتئین و الکتروفورز دوبعدی انتخاب شدند. همچنین ۲ نمونه کنترل نیز از حاشیه اطمینان تومور تحت عمل جراحی (قبل از اشعه) همان افراد انتخاب شد. به کمک نرم افزار Progenesis Same Spots v3.2 ۵۲۳ لکه مورد شناسایی قرار گرفتند که در شکل ۳ قابل مشاهده است. از نظر آماری ۳۴۳ لکه دارای معناداری بودند که در شکل ۳ قابل مشاهده هستند. این تعداد لکه ۶۶ درصد کل لکه‌ها را شامل می‌شوند. ۱۶۴ لکه دارای میزان fold بیش از ۲ بودند که در شکل ۴ نشان داده شده‌اند. براساس این تصاویر بیشترین میزان fold لکه شماره ۸۸ می‌باشد. این لکه دارای وزن ملکولی ۹۲ کیلودالتون و pH ایزوالکتریک ۷/۱ می‌باشد.

از میان ۱۷۹ لکه معنادار در ۱۱۱ لکه کنترل دارای بیان بیشتری نسبت به تومور بود (کاهش بیان). در ۸۴ لکه کنترل دارای بیان کمتر نسبت به بافت سرطانی بود (افزایش بیان).



شکل ۳– تصویر لکه های شناسایی شده. (A) تصویر مربوط به کل لکه‌های شناسایی شده و (B) تصویرمربوط به لکه های شناسایی شده با $P < ۰/۰۵$



شکل ٤– تصویر مربوط به لکه‌های بر اساس. (A) fold بیشتر از ۲ و (B) fold بیشتر از ۲ معنادار $P < ۰/۰۵$

شناسایی لکه‌ها: با استفاده از تصویر اسکن شده ژل الکتروفورز با تصاویر ژل‌ها در مقالات مختلف و مطابقت وزن ملکولی و pH ایزوالکتریک و همچنین با استفاده از سایت www.ebi.ac.uk/IPI چند لکه پروتئینی مورد شناسایی قرار گرفت. این لکه ها شامل لکه شماره ۸۸ با وزن ملکولی ۷۳ کیلودالتون و pH ایزوالکتریک ۷/۱ که مربوط

به خانواده کاسپازها می‌باشد. لکه شماره ۳۰۹ با وزن ملکولی ۴۲ کیلودالتون و pH ایزوالکتریک ۶/۱ که مربوط به خانواده P53 می‌باشد. لکه شماره ۳۴۳ با وزن ملکولی ۲۵ کیلودالتون و pH ایزوالکتریک ۵/۸ که مربوط به خانواده BID می‌باشد. لکه شماره ۳۶ با وزن ملکولی ۲۴ کیلودالتون و pH ایزوالکتریک ۶/۹ که مربوط به خانواده BCL2 می‌باشد. لکه شماره ۹۴ با وزن ملکولی ۲۵ کیلودالتون و pH ایزوالکتریک ۶/۸ که مربوط به خانواده BCL2-A1 می‌باشد.

بحث

Tanca و همکارانش در سال ۲۰۱۲ میلادی تحقیقاتی را بر روی تومور پستان با روش نگهداری فیکس کردن بافت انجام دادند. آنها در تحقیقاتشان حدود ۶۸۴ لکه را به روش FFPE (formalin-fixed, paraffin-embedded tissues) شناسایی کردند. حدود ۵۰ درصد از این لکه‌ها جداسازی شده دارای معناداری بودند (Tanca *et al.*, 2012). در این مطالعه روش نگهداری انجماد فوری بافت انجام شد و حدود ۵۲۳ لکه بر روی ژل الکتروفورز جداسازی شد که ۳۴۳ لکه دارای معناداری بودند که حدود ۷۰ درصد لکه‌ها را شامل می‌شود. دو نکته در این مقایسه نتایج قابل تأمل است. اول تعداد لکه‌های جداسازی شده که تقریباً ۳۰ درصد بیشتر از روش استخراج تحقیقات ما بوده است. علت این تفاوت در تعداد لکه‌ها بر می‌گردد به پروتکل استخراج پروتئین در روش FFPE و استفاده از ترپسین برای شکستن پپتیدها و در ادامه آنالیز آنها به روش طیف سنجی جرمی LC MS/MS که مقدار کمی پروتئین یا پپتید شناسایی شده را افزایش می‌دهد (Tanca *et al.*, 2012). در روش FFPE به علت توانایی و پتانسیلی که در جمع آوری و افزایش زمان نگهداری بافت‌ها وجود دارد. همچنین با استفاده از بافت‌های جداسازی شده بوسیله بیوپسی می‌توان تعداد نمونه‌های بیشتری را جمع‌آوری کرد. با این شرایطپتانسیل استفاده از روش‌های مثل LC MS/MS و Free gel به وجود می‌آید (Yamauchi *et al.*, 2009). نکته بعدی بازدهی پروتئین‌ها یا پپتیدهای جداسازی شده است. در مورد روش FFPE حدود ۵۰ درصد از لکه ها دارای معناداری بودند. در صورتی در روش انجماد فوری بافت حدود ۷۰ درصد از لکه ها این قابلیت آماری مناسب را داشته‌اند. بخشی از این تفاوت به علت تاثیراتی است که فیکس کردن بوسیله فرمالین بر روی ساختار بافت ایجاد می‌کند.

عامل عملکردهای ملکولی در سلول‌ها پروتئین‌ها هستند. الکتروفورز دو بعدی قابلیت جداسازی و شناسایی پروتئین‌های با وزن ملکولی ۱۰۰-۲۰ ۲ کیلودالتون را دارد (Deighton *et al.*, 2010). الکتروفورز دو بعدی معمولاً نمی‌تواند پروتئین‌های غشاء هیدروفوبیک را شناسایی کند. همچنین در شناسایی پروتئین‌های با وزن ملکولی بیشتر از ۱۰۰ کیلودالتون نیز دچار اشکال است. این تکنیک در بعد اول پروتئین‌ها را در محدوده PI بین ۱۰-۳ جداسازی می‌کند. محدودیت‌های الکتروفورز دو بعدی باعث می‌شود که بعضی از پروتئین‌های مهم و معروف مورد شناسایی قرار نگیرند، از جمله این پروتئین‌ها می‌توان به EGFR (epidermal growth factor receptor) مرتبط با فاکتور رشد و پروتئین گیرنده VEGF (Vascular endothelial growth factor) اشاره کرد (Matharoo-Ball *et al.*, 2008). آپوپتوز نوعی مرگ سلولی هدف‌دار و برنامه ریزی‌شده ی سلول است که فعال و وابسته به انرژی می‌باشد. در مسیر خارجی آپوپتوز، مرگ از خارج به سلول القاء می‌گردد. در مسیر داخلی آپوپتوز، با وارد شدن سیگنال مرگ از داخل به سلول، پروتئین کاسپاز ۸ فعال و موجب افزایش نفوذپذیری غشاء میتوکندری توسط پروتئین‌های BAX (Bcl-2-associated X protein) و BAK (Bcl-2 homologous antagonist killer) می‌شود. خروج سیتوکروم C از میتوکندری باعث فعال شدن پروتئین آغازگر کاسپاز ۷ و در ادامه کاسپازهای اجرایی می‌شود (Lee *et al.*, 2013). در این مطالعه بیان پروتئینی احتمالا در خانواده کاسپاز ها و با احتمال قوی کاسپاز ۳ پس از اشعه تغییر یافته است. جهت مطالعه کیفی و اسم دقیق پروتئین نیاز به طیف‌سنجی جرمی می‌باشد. کاسپازها نقش اساسی را در شروع و اجرای برنامه های مرگ سلولی بازی می‌کنند. لکه شماره ۸۸ مشابه پروتئین P73 است و نشان‌دهنده اثر اشعه بر القاء سیگنال‌های مرگ سلولی می‌باشد. این پروتئین ویژگی‌های ساختمانی و خصوصیات بیولوژیکی مشابه P53 دارد. لکه شماره ۳۴۳ تقریبا مشابه خانواده پروتئینی BID (BH3 interacting-domain death agonist) است. این پروتئین میان فعال شدن کاسپاز ۸ و نشت سیتوکروم C ارتباط برقرار می‌کند (Lee *et al.*, 2013). لکه ۳۶ مربوط به خانواده BCL2 می‌باشد و لکه شماره ۹۴ مربوط به خانواده BCL2-A1 می‌باشد. این پروتئین در زمان اتصال به BIM (Bcl-2-like protein 11) فعال می‌شود. پروتئین‌های این خانواده در مرحله رونوشت برداری کنترل می‌شوند. رونوشت برداری ژن‌های مختلف محرک حیات به وسیله ی ژن‌ها و سیتوکین‌های مشخصی تحریک می‌شوند. تحقیقات نشان می‌دهد BCL2 آزاد شدن سیتوکروم C را مهار می‌کند و پاسخ‌های خودکشی سلول با شکست مواجه می‌شود.

نتیجه‌گیری

پروتئین ها در طی آسیب‌های بیولوژیکی به بافت (در این مطالعه تابش الکترون با دوز ۲۱ گری) دچار تغییراتی می‌شوند، این تغییرات موجب ایجاد تغییراتی در ویژگی پروتئین‌ها می‌گردد. مثلاً تغییر که در وزن ملکولی و pH ایزوالکتریک در طی فسفردارشدن یا گلیکوزیله شدن

اتفاق می‌افتد. تغییر یک پروتئین می‌تواند به علت موتاسیون‌هایی که در ژنوم اتفاق می‌افتد باشد، یا اینکه پروتئین ها متحمل تغییرات پس از ترجمه شده باشند. در مورد اثر اشعه بر القاء سیگنال های مرگ (آپوپتوز) هر دو حالت اتفاق افتاده که بخش قابل توجه آن مربوط به تغییرات پس از ترجمه است. پروتئومیکس پروتئین‌های دخیل در آپوپتوز، نشان داد که تعداد زیادی از پروتئین‌ها (۱۴۳ پروتئین) دچار تغییرات fold بیش از ۲ شده‌اند. بنابراین پس از دریافت اشعه هنگام عمل جراحی، پروتئوم دچار تغییر شده، و دارای الگوی تقریبا مشابه با افزایش بیان پروتئین‌های کلیدی در القاء آپوپتوز مانند P53، BAX و BID و یا کاهش بیان پروتئین‌های سرکوب گر آپوپتوز مانند BCL2 است. البته تحقیقات با استفاده از طیف‌سنجی جرمی می‌تواند در درک این روند موثر باشد.

تقدیر و تشکر

از کلیه پرسنل محترم مرکز تحقیقات پروتئومیکس دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی کمال تشکر و قدردانی به عمل می‌آید

.

مراجع

Bahadur, Y.A. and Constantinescu, C.T. 2012. Tumor bed boost radiotherapy in breast cancer. Saudi Med J, 33(4): 353-366.

Chadha, M., Yoon, H., Feldman, S., Shah, N., Moore, E. and Harrison, L.B. 2009. Partial breast brachytherapy as the primary treatment for breast cancer diagnosed after mantle radiation therapy for hodgkin's disease. American journal of clinical oncology, 32(2): 132-136.

Deighton, R.F., McGregor, R., Kemp, J., McCulloch, J. and Whittle, I.R. 2010. Glioma pathophysiology: Insights emerging from proteomics. Brain Pathology, 20(4): 691-703.

Ginsburg, O., Dinh, N., To, T., Quang, L., Linh, N., Duong, B., Royer, R., Llacuachaqui, M., Tulman, A. and Vichodez, G. 2011. Family history, brca mutations and breast cancer in vietnamese women. Clinical genetics, 80(1): 89-92.

Kontoghiorghe, C.N., Andreou, N., Constantinou, K. and Kontoghiorghes, G.J. 2014. World health dilemmas: Orphan and rare diseases, orphan drugs and orphan patients. World journal of methodology, 4(3): 163.

Kraus-Tiefenbacher, U ,.Bauer, L., Scheda, A., Schoeber, C., Schaefer, J., Steil, V. and Wenz, F. 2007. Intraoperative radiotherapy (iort) is an option for patients with localized breast recurrences after previous external-beam radiotherapy. BMC cancer, 7(1): 178.

Lee, C.-L ,.Blum, J.M. and Kirsch, D.G. 2013. Role of p53 in regulating tissue response to radiation by mechanisms independent of apoptosis. Translational cancer research, 2(5): 412.

Matharoo-Ball, B., Miles, A., Creaser, C., Ball, G. and Rees, R. 2008. Serum biomarker profiling in cancer studies: A question of standardisation? Veterinary and comparative oncology, 6(4): 224-247.

Olsson, H. 2000. Tumour biology of a breast cancer at least partly reflects the biology of the tissue/epithelial cell of origin at the time of initiation—a hypothesis. The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 74(5): 345-350.

Phillips, L.S. 2007. Breast ductal carcinoma in situ (dcis): Reproductive and hormonal risk factors and reliability of histologic diagnoses.

Ruck, I. and William, R. 1989. Intraoperative radiation therapy: Characterization and application. AIR FORCE INST OF TECH WRIGHT-PATTERSON AFB OH SCHOOL OF ENGINEERING.

Tanca, A., Pagnozzi, D. and Addis, M.F. 2012. Setting proteins free: Progresses and achievements in proteomics of formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. PROTEOMICS–Clinical Applications, 6(1-2): 7-21.

Vitzthum, F., Behrens, F., Anderson, N.L. and Shaw, J.H. 2005. Proteomics: From basic research to diagnostic application. A review of requirements & needs. Journal of proteome research, 4(4): 1086-1097.

Yamauchi, H., Miyamura, K. and Abo, M. 2009. Proteomic assessment of important proteins for motor recovery in a rat model of photochemically-induced thrombosis. Journal of Applied Research, 9(4).

Zhang, L., Zhou, Z., Mei, X., Yang, Z., Ma, J., Chen, X., Wang, J., Liu, G., Yu, X. and Guo, X. 2015. Intraoperative radiotherapy versus whole-breast external beam radiotherapy in early-stage breast cancer: A systematic review and meta-analysis. Medicine, 94(27).

Zygogianni, G., Kyrgias, G., Kouvaris, J., Antypas, C., Skarlatos, J., Armpilia, C., Nikiteas, N. and Kouloulias, E. 2011. Intraoperative radiation therapy on pancreatic cancer patients: A review of the literature. Minerva chirurgica, 66(4): 361-369.

Research in Karyotic Cell &Tissue, Volume 1, Issue 1, 2020 Pages 26-33

Research Article

Extraction of the breast cancer tissue under intraoperative radiotherapy and investigating their proteome by proteomics technique

Minoo Shahani [1,*] and Farideh Firouzi [1]

[1] Cancer Research Center Shahid Beheshti Medical University

*Correspondence to Minoo Shahani, Ph.D., shahani@gmail.com

Received 22nd January 2019 Revised 20th April 2020 Accepted 14th July 2020

Abstract

Introduction and Aim: Breast cancer is the most common cancer among Iranian women and women in the world. The aim of radiotherapy (radiation therapy) is to eliminate the maximum of cancer cells with minimal damage to healthy tissue. Intraoperative radiation therapy (IORT) can be utilized to treat a small area of tissue without any damages. In this method, because of DNA damage and initiation of the apoptosis process, the tumor cells (target tissue) are destructed.

Methods: Four Breast Cancer (BC) patients as a pilot study were treated by 21 Gy (Radical dose). Two-dimensional electrophoresis (2D-PAGE) and Progenesis Same Spots v3.2 were performed to study the proteomic of the IORT-treated tumor bed.

Results: Approximately 523 protein spots were detected. A total of 343 protein spots showed different expression. among which, 141 spots decrease in-expression level, while, the remaining 191 spots were up-regulated.

Conclusion: Our findings indicate that Caspase3, P53, BID, BAX, and BCL2 may be key proteins in the IORT-treated tumor bed.

***Keywords*:** Breast cancer, Radiation therapy, proteomics, Two-dimensional electrophoresis, Apoptosis