گرماسنجی روبش دمایی: ابزاری نوین در شناسایی و تشخیص بیماری‌ها

علی‌اکبر موسوی موحدی[۱و۲*]، راضیه کرم‌زاده[۱]، مجتبی امانی[۳]، سارا موسوی دوست[۱]

۱- تهران، دانشگاه تهران، مرکز تحقیقات بیوشیمی و بیوفیزیک

۲- تهران، دانشگاه تهران، قطب علمی بیوترمودینامیک

۳- اردبیل، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل

پیام نگار: **moosavi@ut.ac.ir**

چکیده

در علم پزشکی تشخیص زودرس، ارزان و سریع بیماری‌ها از اهمیت ویژه ای برخورداراست. از جمله روشهای تشخیصی که امروز توجه زیادی را به خود جلب کرده است، استفاده از نشانگرهای زیستی در قالب روشهای پروتئومیکس است. اگرچه بکارگیری این روشها، مشکلات بسیاری را حل کرده است، اما گران بودن و زمان‌بر بودن و همچنین عدم قابلیت شناسایی کمپلکس‌های پروتئینی از جمله نواقص این روشها است. روش گرماسنجی روبش دمایی به دلیل دقت و حساسیت بالا روشی مؤثر در تشخیص مراحل اولیه بیماری از طریق ردیابی نشانگرهای زیستی است. نمودار گرمایی نمونه افراد سالم، به عنوان امضای زیست‌شناختی اختصاصی بیانگر مجموع وزنی تغییرات ساختار پروتئین‌های تشکیل‌دهندهٔ نمونه در حالت سلامت و بیماری است. گرچه قضاوت قطعی درباره کارایی این روش نیازمند بررسیهای بیشتر است، اما مطالعات حاضر بیانگر کاربرد این روش در زمینه تشخیص نوع، مرحله بیماری و حتی بررسی روند بیماری‌ها بوده و مکمل مناسبی برای روشهای پروتئومیکس محسوب می‌شود. در این مقاله به کاربرد گرماسنجی روبش دمایی در پزشکی همراه با شرح مبانی نظری و عملی آن پرداخته می‌شود.

کلمات کلیدی: گرماسنجی روبش دمایی، سرطان، نشانگر زیستی، روش تشخیص حساس، تشخیص زود هنگام بیماری، تغییر ساختار پروتئین

۱- مقدمه

هدف پزشکی ارتقای سلامت، حفظ و باز گرداندن تندرستی و کاهش رنج و ناتوانی است. یکی از مهمترین مراحل نیل به این هدف، جلوگیری از گسترش بیماری در مراحل اولیه وقوع آن از طریق بکارگیری روش‌های پُربازده در تشخیص زودهنگام بیماری و اتخاذ راه‌های درمانی مناسب است. همواره تحقیقات وسیعی در زمینه شناسایی زودهنگام، کم هزینه، آسان و دقیق بیماری‌ها اتخاذ می‌شود [۱]. تشخیص زودهنگام بیماری در برخی بیماری‌ها از قبیل سرطان ها، در کیفیت زندگی و طول عمر بیمار تأثیر شگرفی خواهد داشت. مطالعات بسیاری دراین زمینه صورت پذیرفته است؛ با وجود این، امروزه روش‌های شناسایی معمول، فوری قادر به تشخیص مراحل اولیه سرطان‌ها نیستند. به عنوان نمونه در مورد شایع‌ترین شکل سرطان کبد، کارسینومای سلول‌های کبدی که سومین عامل مرگ ناشی از سرطان محسوب می‌شود، تنها ۵٪ از موارد درمان از

طریق جراحی با موفقیت روبه می‌شوند. این درحالی است کـه طـول عمر متوسط فرد بیمار از زمان تشخیص بیماری ۴ تـا ۸ مـاه اسـت. علت اصلی مرگبار بودن ایـن سـرطان تـشخیص دیرهنگـام بیمـاری است. روش‌های تشخیصی موجود نظیر رزونانس مغناطیـسی هـسته ای و اولتراسوند قادرند بدخیمی‌های نئوپلاستیک بزرگتر از ۲ سانتی متر را شناسایی کنند. به عبارت دیگر بیماری زمـانی تـشخیص داده می‌شود که تا حد زیادی پیشرفت کرده باشد [۲]. از این رو موسـسه ملی سرطان[1] آمریکـا کـه از موسـسات پیـشرو در زمینـه تحقیقـات سرطان است، هدف چالش برانگیز خود را تـا سـال ۲۰۱۵ ردیـابی و تشخیص زود هنگام سرطان‌ها قرار داده است. این بـدان معنـا اسـت کـه دانـش پزشـکی هنـوز بـا بکـارگیری فنـاوری‌هـایی کـه بتوانـد بدخیمی‌ها را در مراحل اولیه ردیابی و شناسایی کند فاصـله زیـادی دارد[۳]. در کنـار سـرطان هـا، تـشخیص زودهنگـام بـسیاری از بیماری‌های ژنتیکی، خود ایمن‌انـد و نقـص ایمنـی نیـز در افـزایش کیفیت زندگی افراد مبتلا مؤثر خواهد بود. از این بیماری‌ها می‌تـوان به روماتیسم مفصلی، بیماری لوپوس و لایم اشاره کرد[۳].

از آنجایی که در ابداع روش‌های تشخیصی مسئله غیرتهاجمی[2] بودن نیز مد نظر می‌باشد، در میان گسترهٔ روش‌هـای تـشخیص بیمـاری، معمول ترین روش تشخیص، بررسی مایعات زیستی از قبیـل خـون، مایع (مغزی- نخایی) است. پلاسمای خون انسان، بـا برخـورداری از بیش از ۳۰۰۰ پروتئین و پپتید، حاوی اطلاعات ارزشمندی از نـوع و میزان بیماری است. ۹۰٪ از پروتئین‌های پلاسما شامل ۱۰ پـروتئین اسـت کـه سـرآمد آنهـا آلبـومین، فیبرینـوژن، ترانـسفرین و ایمونوگلوبولین‌ها هستند و حدود ۹٪ از کل پروتئین‌هـای پلاسـما را ۱۲ پروتئین از جمله آپولیپوپروتئین‌های A و B تشکیل داده‌اند. ۱٪ از پروتئین‌های خون که اقلیت پروتئوم پلاسـما را تـشکیل داده‌انـد، شـامل مجموعـه‌ای از پپتیـدهای کوچـک موسـوم بـه "پپتیـدوم"[3] هستند که امروزه به عنوان نـشانگرهای زیـستی مهـم در تـشخیص بیماری‌ها به حساب می‌آیند. بررسـی ۹۹٪ از پـروتئین‌هـای فـراوان پلاسما از طریق روش‌هـای الکتروفـورز پـروتئین سـرم[4] و همچنـین ارزیابی ایمونوشیمیایی[5] امکان پذیر است [۴]. این روش‌ها با تفکیک پروتئین‌های فراوان پلاسما بـر اسـاس بـار، وزن مولکـولی و انـدازه، اطلاعات ارزشمندی را در زمینه میزان و توزیع پروتئین‌های پلاسـما در اختیار پزشکان قرار می‌دهد [۵]. تحقیقـات انجـام شـده بـر روی بیماری‌های مختلف نشان می‌دهد که بسیاری از پروتئین‌های فراوان پلاسما در مراحل اولیه بیماری‌ها از قبیل سرطان، تغییـر محـسوسی نمی‌کنند. بنابراین این روش‌ها برای تشخیص زودهنگـام سـرطان‌هـا مناسب نیستند. به همین دلیل، محققان بدنبال روش‌هـای جدیـدی برای بررسی تغییرات احتمالی در محتوای پلاسـما در مراحـل اولیـه بیماری‌هایی از قبیل سرطان مـی‌باشـند. اطلاعـات بدسـت آمـده بـا بکارگیری روش‌های طیف نگاری جرمی و الکتروفورز دو بعدی نشان داده است که ۱٪ از پروتئوم پلاسما، موسوم به پپتیـدوم، بـه هنگـام وقوع بیماری و حتی در مراحل اولیه آن، حاوی اطلاعات ارزشـمند و دقیقی در خصوص نوع و مرحله بیمـاری اسـت [۶]. از سـوی دیگـر مطالعات انجام شده توسط این دو روش بیانگر احتمال میانکنش این پپتیدها با پـروتئین‌هـای فـراوان پلاسـما (۹۹٪) مـی‌باشـد. اگرچـه بکارگیری روش‌های طیف نگـاری جرمـی[6] و الکتروفـورز[7] دو بعـدی بدلیل برخورداری از حد تفکیک بالا، رویکـرد جدیـدی را در زمینـه بررسی پپتیدوم به میان می‌آورد، اما این روش‌ها بطور کامل قادر بـه بررسی پپتیدوم نیستند[۸و۷]؛ چرا که حین تخلیص پپتیـدوم بـرای بررسی‌های طیـف نگـاری و الکتروفـورز دو بعـدی، بـسیاری از ایـن پپتیدها بدلیل میانکنش با پروتئین‌های غالب پلاسما به همراه آنها از محیط حذف می‌شوند. از سـوی دیگـر، بررسـی میـانکنش احتمـالی پپتیدوم با پروتئین‌های فراوان پلاسما موسوم بـه "interactome" از طریق این دو روش امکان‌پذیر نمی‌باشد[۵].

در سال ۲۰۰۷ میلادی، Garbett و همکـارانش بـا اسـتفاده از روش گرماسـنجی روبـش دمـایی رویکـرد نـوینی را در بررسـی پروتئـوم، پپتیدوم و اینترکتوم پلاسما معرفی نمودند[۹].

۲- گرماسـنجی روبـش دمـایی (DSC): روش جدیـد تشخیص بیماری‌ها

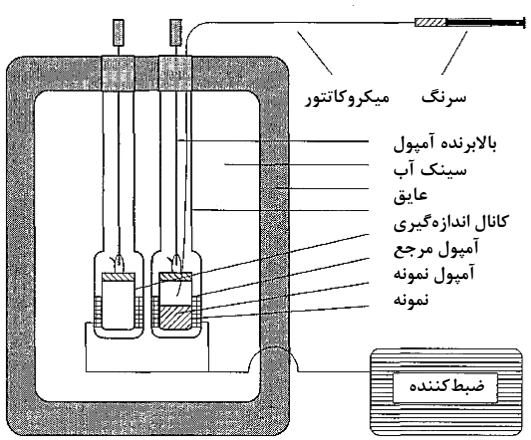
گرماسنجی روبش دمایی[8] از روش‌های بیوشیمی فیزیک بـه حـساب می‌آید[۱۰]. گرماسنجی روبش دمایی در سال ۱۹۶۰ توسط واتسون

1. National Cancer Institute (NCI)
2. Non-Invasive
3. Peptidome
4. Serum Protein Electrophoresis
5. Immuno-Chemical Assays
6. Mass Spectroscopy
7. 2D-Electrophoresis
8. Differential Scanning Calorimetry (DSC)

و اونیل [1] توسعه یافت و در سال ۱۹۶۳ در همایش شیمی تجزیه و طیف سنجی کاربردی در پیتزبورگ به صورت تجاری عرضه شد. این روش که یک روش تجزیه حرارتی (ترموآنالیتیکال) بسیار قدرتمند است، تغییرات کوچک دمایی بین نمونه و شاهد را به عنوان تابعی از دما نشان می‌دهد. گرماسنجی روبش دمایی با حساسیت بالا[2] روشی قدرتمند و جدید در ارزیابی انرژی، اندر کنش و ساختار بیوماکروملکول‌ها می‌باشد. این روش توسط پریوالو[3] جهت مطالعه تغییر ساختار فضایی متعاون بیوماکروملکول‌ها در محلول‌های خیلی رقیق بکارگرفته شد. امروز شرکت‌های مختلفی بر اساس روش پریوالو دستگاه‌های گرماسنجی روبش دمایی با حساسیت بالا را عرضه نموده‌اند. مزیت دیگر گرماسنجی روبش دمایی با حساسیت بالا مدت نسبتاً کوتاه آزمایش و مصرف نسبتاً کم مواد است. در اغلب موارد سرعت مناسب روبش در گرماسنجی روبش دمایی با حساسیت بالا امکان انجام آزمایش‌های واسرشتگی[4] بیو ماکروملکول‌ها و پروتئین‌ها در حالت نیمه ایستا را فراهم می‌آورد. بدین معنی که در طی روبش، توزیع تعادلی بیومولکول‌ها بین حالت‌های طبیعی و واسرشته در دماهای مختلف حاصل می‌شود. این وضع امکان پدید می‌آورد که از تئوری‌های اصیل و گسترده ترمودینامیکی، برای تفسیر داده‌های گرماسنجی روبش دمایی با حساسیت بالا استفاده شود. با استفاده از گرماسنجی روبش دمایی، مقدار "ظرفیت حرارتی جزئی"[5] یک پروتئین و یا مخلوطی از آنها به صورت تابعی از دما با دقت بالا تعیین می‌گردد. آنالیز این تابع در محدودهٔ واسرشتگی پروتئین این امکان را فراهم می‌آورد تا دمای واسرشتگی، آنتالپی و میزان افزایش ظرفیت حرارتی پروتئین و یا مخلوطی از آنها را در یک آزمایش بدست آید.

همان طور که در شکل (۱) نشان داده می‌شود دستگاه گرماسنجی روبش دمایی دارای دو محفظه می‌باشد. محفظه حاوی نمونه[6] که در آن نمونه زیست‌شناختی به صورت یک محلول آبی وارد می‌شود و محفظه شاهد[7] با بافر مشابه پر می‌شود. به هر دو محفظه با سرعتی مشابه که کاملا کنترل شده است، گرما داده می‌شود. با افزایش دما

1. E. S. Watson & M. J. O'Neill
2. High Sensitive Differential Scanning Calorimetry (HS-DSC)
3. Privalov, L.
4. Unfolding
5. Partial Heat Capacity
6. Sample Chamber
7. Reference Chamber



شکل ۱- طرح اجمالی ساده از یک گرماسنج جاروب تفاضلی [۸]

فرایندهایی که تحت القای دما می‌باشند، در محفظه حاوی نمونه زیست‌شناختی انجام می‌شود. این امر یک عدم تعادل گرمایی بین محفظه حاوی نمونه و محفظه شاهد بوجود می‌آورد که گرمکن‌های بازخوردی[8] آن را جبران خواهند کرد. این گرمکن‌ها با انرژی الکتریکی کار می‌کنند، بنابراین خروجی دستگاه یک توان الکتریکی است که با ظرفیت گرمایی ظاهری نمونه و شاهد ارتباط مستقیم دارد. پس از پیدا کردن خط پایه[9] و نرمالیزه کردن داده ها، نمودار رسم می‌شود که تغییرات ظرفیت گرمایی ویژه نمونه را در برابر دما نشان می‌دهد. چنین نموداری را نمودار گرمایی یا ترموگرام[10] می‌نامند. حجم نمونه لازم برای دستگاه DSC در حدود ۰/۵ میلی لیتر و غلظت پروتئین لازم (۲-۰/۲) میلی گرم بر میلی لیتر است. اغلب دستگاه‌های DSC زیست‌شناختی در محدودهٔ دمایی (۱۲۰-۱۰) درجه سلسیوس کار می‌کنند[۳،۱۱،۱۲].

در این مقاله، گرماسنجی، روبش دمایی به‌عنوان یک روش جدید و حساس برای شناسایی نشانگرهای زیستی پروتئینی و در نهایت تشخیص بعضی از بیماری‌ها معرفی می‌گردد.

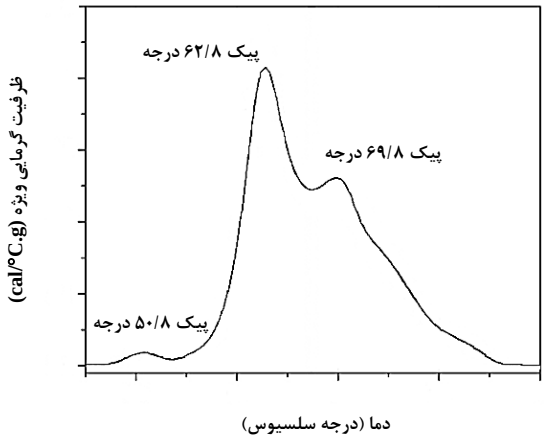
۳- کاربرد گرماسنجی روبش دمایی در بیماری‌ها از طریق بررسی پروتئوم پلاسمای خون:

در این قسمت بطور خلاصه به کاربردهای گرماسنجی روبش دمایی در بررسی پروتئوم پلاسما پرداخته می‌شود:

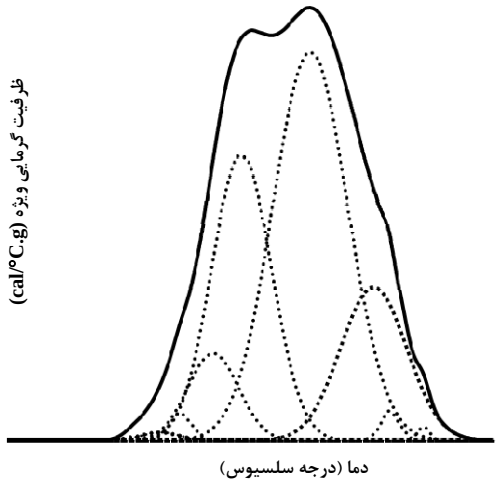
8. Feedback Heater
9. Baseline
10. Thermogram

۳-۱ نمودار گرمایی پلاسمای افراد سالم

در سال ۲۰۰۷ میلادی برای اولین بار گروهی از دانشگاه لوئیزویل[1] از روش گرماسنجی روبش دمایی برای بررسی نمودار پروتئومیک پلاسمای خون افراد سالم استفاده کردند [۵]. منحنی نمودار گرمایی بدست آمده از سرم افراد سالم اگرچه به سن، جنس و نژاد افراد بستگی دارد، اما نمودار گرمایی پلاسما در افراد سالم از الگوی مشابهی پیروی می‌کند. در نمودار گرمایی پلاسمای افراد سالم که در شکل ۲ به طور نمونه نشان داده شده است همواره سه پیک مشاهده می‌شود؛ پیک اول دردمای ۵۰/۸ درجه، پیک دوم در دمای ۶۲/۸ درجه و پیک سوم در دمای ۶۹/۸ درجه سلسیوس می‌باشد. سطح زیر منحنی که آنتالپی واسرشته شدن پروتئین‌های پلاسما را در بازهٔ دمایی ۴۵ تا ۹۰ درجه سلسیوس نشان می‌دهد، (۰/۲۳ ± ۵/۰۲) کالری بر گرم می‌باشد. میانگین عددی پیک‌ها (ممان اول) برای منحنی نمودار گرمایی افراد سالم ۶۷/۵ درجه سلسیوس است [۱۳]. از آنجا که پلاسما مخلوطی پیچیده حدود ۳۰۰۰ پروتئین و پپتید می‌باشد، پس منحنی نمودار گرمایی مشاهده شده جمع نمودارهای گرمایی هر یک از پروتئین‌های تشکیل‌دهنده پلاسما است [۱۳]. بنابراین می‌توان نمودار گرمایی بدست آمده را به نمودارهای گرمایی مجزا برای هر پروتئین (بر اساس غلظت هر یک در پلاسما) تفکیک کرد. این کار با استفاده از آلگوریتمی به نام دکانوولوشن[2] (تجزیه پیک به زیر پیک) صورت می‌گیرد، این آلگوریتم اثر دکانوولوشن را بر داده‌ها نشان می‌دهد. این آلگوریتم یک اپراتور (عملگر) ریاضی است که در آن دو تابع f و g تابع سومی می‌سازند. شکل (۳) نمودار گرمایی تفکیک شده به نمودار گرمایی ۱۲ پروتئین پلاسما را برای افراد سالم، نشان می‌دهد. در این رویکرد فرض بر این است که هیچ اندرکنشی بین این پروتئین‌ها به گونه ای که بر واسرشته شدن آنها تأثیر گذار باشد، وجود ندارد. پیک ۵۰/۸ درجه سلسیوس مربوط به پروتئین فیبرینوژن[3] است، پیک بلند ناحیه ۶۲/۸ درجه سلسیوس واسرشته شدن سرم آلبومین[4] بدون لیگاند است و البته پروتئین هاپتوگلوبین[5] نیز در پیدایش این پیک سهیم می‌باشد. پیک ۶۹/۸ درجه سلسیوس و شانه‌هایی که در دماهای بالاتر دیده می‌شوند اساسا مربوط به ایمونوگلبولین G[6] می‌باشند[۱۳]. به طور کلی شدت پیک‌های نمودار گرمایی در مردان بیشتر از زنان است که به دلیل اختلاف در غلظت پروتئین‌های سرمی بین افراد مذکر و مونث می‌باشد. این نوع تفاوت‌ها در نژادهای مختلف نیز دیده می‌شود که از یک سو بیانگر دقت و حساسیت زیاد گرماسنجی روبش دمایی و از سوی دیگر بیانگر نیاز به انتخاب کنترل مناسب در بررسی بیماری‌ها با این روش است [۳].



شکل ۲- نمودار شماتیک: نمودار گرمایی افراد سالم [۹]



شکل ۳- نمودار گرمایی پلاسمای یک فرد عادی ایرانی (خط توپر)، این نمودار گرمایی به زیر پیک های پروتئین‌های فرضی (خطوط نقطه چین) تفکیک شده‌اند.

1. Louisville
2. Deconvolution
3. Fibrinogen
4. Human Serum Albumin (HSA)
5. Haptoglobin
6. IgG

۳-۲ نمودار حرارتی پلاسمای افراد بیمار

در مطالعه‌ای که توسط گاربت[1] و همکارانش در سال ۲۰۰۸ صورت گرفت، منحنی نمودار گرمایی پلاسمای بیماران مبتلا به ۷ بیماری مرتبط با ایمنی و بدخیمی مورد بررسی قرار گرفت. این بیماری‌ها شامل روماتیسم مفصلی[2]، لوپوس[3]، بیماری لایم[4]، سرطان‌های تخمدان، بافت رحم[5]، پوست (ملانوما[6]) و ریه بود [۳].

۳-۲-۱ نمودار گرمایی پلاسمای افراد مبتلا به روماتیسم مفصلی

بر اساس این مطالعه، نمودار گرمایی روماتیسم مفصلی اختلافات فاحشی با منحنی نمودار گرمایی پلاسمای افراد سالم نشان می‌دهد (برای مشاهده این نمودار گرمایی به مرجع ۱۳ رجوع شود). در افراد بیمار پیک دمای ۶۲/۸ درجه سلسیوس که مربوط به پروتئین آلبومین است به شدت کاهش می‌یابد و منحنی به سمت دماهای بالاتر جابه جا می‌شود[۱۳].

۳-۲-۲ نمودار گرمایی پلاسمای افراد مبتلا به لوپوس و بیماری لایم

در بررسی نمودار گرمایی افراد مبتلا به بیماری لوپوس نیز این نمودار گرمایی با نمودار مشابه سرم افراد سالم، ممان اول از دمای ۶۷/۵ درجه سلسیوس در افراد سالم به دمای ۷۱/۵ درجه سلسیوس در افراد مبتلا به لوپوس تغییر پیدا می‌کند. (برای مشاهده اختلاف بین نمودار گرمایی افراد مبتلا به بیماری لوپوس و افراد سالم به مرجع ۱۳ رجوع شود) پیک ناحیه دمای ۶۱ درجه سلسیوس با بالارفتن سطح پروتئین هاپتوگلوبین در پلاسمای افراد مبتلا به لوپوس تطابق دارد [۱۳و۳].

در افراد مبتلا به بیماری لایم شکل منحنی نسبت به افراد کنترل، و حتی دیگر بیماران، متفاوت است و ممان اول نمودار گرمایی بالاتر از حد معمول و برابر دمای ۷۳/۱۵ درجه سلسیوس است (برای مشاهده این نمودار گرمایی به مرجع ۱۳ رجوع شود) [۱۳].

1. Garbett
2. Rheumatoid Arthritis
3. Systemic Lupus Erythematosus
4. Lyme Disease
5. Endometrium
6. Melanoma

۳-۲-۳ انسداد ریوی مزمن[7]

بیماری انسداد ریوی مزمن، اصطلاحی است که برای انسداد مزمن مجاری هوایی ناشی از آمفیزم، برونشیت مزمن، آسم، یا ترکیبی از این اختلالات به کار می‌رود. بروز این بیماری بطور مرتب در حال افزایش است و مردان بیشتر از زنان دچار این بیماری می‌شوند (بدلیل اعتیاد بیشتر مردان به سیگار) [۱۵]. تغییرات در منحنی دمایی افراد مبتلا به بیماری انسداد ریوی مزمن ممکن است هم به دلیل تغییر در غلظت پروتئین‌های عمده سرم و هم اندرکنش بین پروتئین‌ها و لیگاندها باشد. در این بیماری نیز همانند بیماری‌های دیگر پیک دمایی حرارت زا به سمت دماهای بالاتر جابجا شده وهمزمان با کاهش پیک دمای ۶۲ درجه سلسیوس، افزایشی در پیک دمای ۷۰ درجه سلسیوس مشاهده می‌شود، بعلاوه در بیماری انسداد ریوی مزمن ممان اول نمودار گرمایی به سمت دماهای بالاتر حرکت می‌کند که این ممان در حالت خفیف بیماری در دمای ۶۵/۳ درجه سلسیوس و در حالت شدید بیماری در دمای ۶۷/۶ درجه می‌باشد [۱۵]. از آنجایی که غالبا افراد مسن به بیماری انسداد ریوی مزمن مبتلا می‌شوند افراد کنترل در این مطالعه با سن بالای ۴۹ سال انتخاب شده اند که به طور جزئی منحنی نمودار گرمایی سرم این افراد با منحنی گزارش شده توسط گابریت و همکارانش متفاوت است، این تفاوت ممکن است ناشی از عدم حضور فیبرینوژن در سرم، تفاوت در حلال بکار رفته جهت رقیق سازی سرم و یا سن بالای افراد کنترل باشد (برای مشاهده این نمودار گرمایی به مرجع ۱۵ رجوع شود).

۳-۲-۴ سرطان رحم

در مورد سرطان رحم، ممان اول نمودار گرمایی مربوط به مرحله IV B سرطان رحم در مرجع ۱۴ دمای ۶۷/۸ درجه سلسیوس است. در این بیماران پیک دمایی مربوط به آلبومین کاهش یافته و یا به سمت دماهای بالاتر جابجا می‌شود.ازآنجایی که میزان آلبومین در محدودهٔ غلظت نرمال می‌باشد و الگوی الکتروفورزی نیز تغییر چندانی نشان نمی‌دهد، بنابراین، این جابجایی ممکن است ناشی از پایداری بیشتر آلبومین بواسطه اتصال لیگاندها باشد. پیک شاخص در دمای ۶۱ درجه سلسیوس که با جابجایی پیک مربوط به آلبومین ظاهر می‌شود احتمالاً مربوط به هاپتوگلوبین است [۱۴]

7. COPD: Chronic Obstructive Pulmonary Disease

شناسایی و تشخیص زودهنگام در سرطان رحم همانند همه سرطان‌ها از اهمیت بالایی برخوردار است. آیا گرماسنجی روبش دمایی قادر است بین فازهای مختلف یک بیماری تمایز قایل شود؟ برای پاسخ به این سؤال گاربت و همکاران در سال ۲۰۰۹ بر روی کارسینومای گردن رحم [1] که طبق آمار انجمن سرطان آمریکا [۳] دومین سرطان رایج در میان زنان است، متمرکز شدند. این سرطان از نوعی بدخیم به نام CIN [2] آغاز می‌شود، که بر اساس ویژگی‌های بافت شناسی به ۳ مرحله تقسیم می‌شود: CIN1 یا نوع خفیف، CIN2 یا نوع معتدل وCIN3 یا نوع شدید. قابلیت پیشرفت این نئوپلازی و تبدیل شدن به سرطان گردن رحم بر اساس درجه بندی CIN متفاوت است و CIN3 بالاترین احتمال تبدیل شدن به سرطان گردن رحم را داراست. CIN3 و CIN2 از آنجا که پتانسیل بیشتری برای تبدیل شدن به سرطان بدخیم را دارند به عنوان "ضایعه مرتبط با سلول‌های درون پوششی سنگفرشی با درجه بالا" یا در اصطلاح HSIL [3] طبقه بندی می‌شوند. در حال حاضر زنانی که آزمایش پاپ اسمیر [4] غیر طبیعی دارند برای اطمینان از اینکه در چه مرحله ای از CIN قرار دارند نیازمند انجام آزمون‌های تکمیلی نظیر نمونه برداری (کولپوسکوپی [5] یا بیوپسی) هستند. روش‌های تشخیصی کنونی نمی‌تواند به آسانی و به سرعت مراحل اولیه بیماری را شناسایی کند. جهت دست یابی به روشی که قادر به تشخیص میان مراحل اولیه و مراحل پیشرفته کارسینوما باشد، پلاسمای خون ۴۳ مراجعه کننده به مرکز سرطان براون [6] بوسیله گرماسنجی روبش دمایی مورد آنالیز قرار گرفت. (برای مشاهده نمودار گرمایی بدست آمده برای افراد سالم، HSIL و مبتلا به سرطان گردن رحم به مرجع ۳ مراجعه شود.) نتایج بدست آمده بیانگر تغییر نمودار گرمایی افراد مبتلا به HSIL یا کارسینومای گردن رحم نسبت به افراد طبیعی است و همانند سایر حالات بیماری، دامنه پیک در دمای ۶۲/۸ درجه سلسیوس کاهش یافته و در دمای ۶۹/۸ درجه سلسیوس افزایش پیدا می‌کند، با این وجود منحنی نمودار گرمایی برای هر یک از حالات HSIL و کارسینومای گردن رحم کاملا اختصاصی است به گونه‌ای که می‌توان دو حالت بیماری را از هم تفکیک کرد [۳].

گاربت و همکاران گرماسنجی روبش دمایی را در نمونه‌های پلاسمای مربوط به بیماران مبتلا به سرطان اندومتر، تخمدان، ریه و بیماری ALS نیز مورد بررسی قرار دادند. این تحقیقات افق‌های تازه ای در زمینه بررسی پروتئوم پلاسما گشود. نمودار گرمایی پلاسما مربوط به این بیماران را می‌توان در مرجع ۳ مشاهده کرد؛ براین اساس بطور خلاصه، نمودار گرمایی افراد بیمار بطور معنی داری به سمت دماهای بالاتر جابه جا شده است [۳].

۳-۲-۵ بیماری لوسمی لنفاتیک مزمن (CLL) [7]

روگالینسکا [8] و همکارانش در سال ۲۰۰۹، از روش گرماسنجی روبش دمایی در بررسی روند بهبود بیماری CLL قبل از و حین درمان با آنالوگ‌های پورینی استفاده نمودند [۱۶].

در بیماری CLL روند رشد و نمو لنفوسیت‌ها به درستی انجام نمی گیرد و تعداد بسیار زیادی از آنها تولید می شوند. اگر چه آنها ممکن است ظاهر طبیعی داشته باشند ولی مبارزه با عفونت‌ها را به طور مناسب انجام نمی‌دهند. لنفوسیت‌های نابالغ را می‌توان در خون و در مغز استخوان مشاهده نمود. تجمع لنفوسیت‌های نابالغ در بافت‌های لنفاوی منجر به بزرگ شدن آنها میشود. نکته دیگر اینکه مقدار زیاد این سلول‌ها باعث کاهش سایر سلول‌های خونی می شود، بطوریکه کم خونی ناشی از کاهش تولید گلبول‌های قرمز (برای حمل اکسیژن) عارض می گردد. از سوی دیگر کاهش تعداد پلاکت‌ها منجر به اختلال در فرآیند انعقاد خون شده و باعث خونریزی و کبودی می گردد. لوسمی می‌تواند حاد (دارای رشد سریع و سلول‌های نابالغ زیاد) یا مزمن (رشد آهسته و سلول‌های بالغ دارای ظاهری طبیعی) باشد. لوسمی لنفوسیتی مزمن دارای رشد آهسته و معمولا در افراد بالای ۶۰ سال اتفاق می افتد. مراحل اولیه بیماری معمولا بدون علامت است و با گذشت زمان تعداد بیشتری لنفوسیت ساخته می‌شود و در نتیجه علائم بیماری ظاهر می‌گردد [۱۶]. از آنجائی که اغلب تغییرات در CLL مربوط به لنفوسیت‌های نوع B می‌باشد، این بیماری راB CLL می‌نامند. لازم به ذکر است که لنفوسیت نوع B در ایمنی همورال (عمدتاً سنتز آنتی بادی) نقش دارد. علایم بیماری B CLL خیلی متنوع است و علی رغم تلاش‌های

1. Invasive Carcinoma of Uterine Cervix
2. Cervical Intraepithelial Neoplasia
3. High Grade Squamous Intraepithelial Lesion
4. Pap Smear
5. Colposcopy
6. Brown Cancer Center
7. CLL: Chronic Lymphocytic Leukemia
8. Rogalinska

وسیع در زمینه‌های تحقیقاتی و درمانی، این بیماری هنوز قابل درمان نیست و دلایل و مکانیسم تنوع وسیع علایم بیماری نیز مشخص نشده است. در این بیماری نسبت (CD19+/CD5+) افزایش می‌یابد که ناشی از تجمع زیاد سلول‌های نئوپلاستی است. عمر زیاد سلول‌های لوسمی بدلیل باقی ماندن سلول‌ها در مراحل (G0/G1) چرخه سلولی و مهار مرگ برنامه ریزی شده سلولها[1] است. روشهای معمول شیمی درمانی B CLL با ورود آنالوگ‌های نوکلئوزید پورین مانندفلودارابین[2]، کلادریبین[3]، ۲-دزوکسی کوفورمیسین[4] پاسخ به درمان را ارتقاء داده است، به طوریکه تجویز ترکیبیِ این آنالوگ‌ها با سیکلوفسفامید[5] یک روش معمول در درمان این بیماری بشمار می‌آید. بطور احتمال این آنالوگ‌ها با القاء مهار مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی اثرات سمی بودن سلولی خود را اعمال می‌کنند. آنالوگ‌های پورین با مهارآنزیم‌هایی چون DNA پلیمراز و ریبونوکلئوتید ردوکتاز سبب اختلال در سنتز DNA می‌شوند. روگالینسکا و همکارانش منحنی گرماسنجی هسته سلول‌های خون محیطی بیماران مبتلا به B CLL را قبل و حین درمان با آنالوگ‌های پورین بررسی نمودند؛ نمودار گرمایی حاصل نشان دهنده واسرشتگی ترکیبات اصلی هسته؛ مانند DNA، نوکلئوزوم و ماتریکس هسته‌ای است. این منحنی، چهار گذار عمده را نشان می‌دهد که شامل: گذار I مربوط به ترکیبات غیر کروموزومی در دمای ۶۰ درجه سلسیوس، گذار II مربوط به واسرشته شدن نوکلئوزوم‌ها در دماهای بین دمای (۷۶-۷۳) درجه سلسیوس، گذار III مربوط به باز شدن DNA غیر متراکم[6] و گذار چهار مربوط به باز شدن DNA متراکم در دمای (۱۰۵-۹۳) درجه سلسیوس می‌باشد (برای مشاهده نمودار گرمایی به مرجع ۱۶ رجوع شود). مطالعات گرماسنجی روبش دمایی روی ۱۴ بیمار نشان داد که مصرف ترکیبی از داروها موجب کاهش چشمگیر و یا حذف در پیک دمایی ۹۵ درجه سلسیوس همزمان با افزایش پیک‌های دمایی (۸۶-۸۲) درجه سلسیوس و (۷۶-۷۳) درجه سلسیوس می‌شود. تعیین میزان پروتئین‌های ضد مهار مرگ برنامه ریزی شده سلولی (bcl-2) و (Mcl-1) با استفاده از آنتی بادی‌های اختصاصی نشان‌دهنده کاهش میزان این پروتئین‌ها و در نتیجه درمان با این داروهاست. در این افراد میزان پروتئین‌های ضد مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی (bcl-2) و (Mcl-1) با مصرف داروها نیز تغییر نیافت، این افراد کسانی بودند که نسبت به درمان مقاوم بودند. چنین تغییراتی در مطالعات آزمایشگاهی با اضافه کردن داروها به محیط کشت لنفوسیت‌های مونونوکلئار نیز مشاهده شد که همزمان با این تغییرات، میزان بقای سلول‌ها نیز کاهش یافت. بنابراین استفاده از گرماسنجی روبش دمایی در کنار روش‌های دیگر می‌تواند یک ابزار مفید در تشخیص کارآیی درمان B CLL و انتخاب روش درمانی مناسب باشد[۱۶].

۴- کاربرد گرماسنجی روبش دمایی در بیماری‌های مغز و اعصاب روی پروتئوم مایع (مغزی- نخاعی)

در سال ۲۰۱۱، الکسیس و همکارانش روش گرماسنجی روبش دمایی را روی پروتئوم مایع (مغزی- نخاعی)[7] (CSF) در تشخیص سرطان گلیوبلاستومای چند شکلی[8] (GBM) مورد بررسی قرار دادند [۱۷]. مایع (مغزی- نخاعی) (CSF) اطراف مغز و نخاع را در برگرفته و این دو ارگان حساس را از صدمات احتمالی محفوظ می‌دارد. روزانه حدود ۵۰۰ میلی لیتر CSF تولید می‌شود و به عبارت دیگر هر روز سه بار کل مایع (مغزی- نخاعی) بدن تعویض می‌گردد. بدلیل ارتباط مستقیم مایع (مغزی- نخاعی) با ماتریکس خارج سلولی بافت مغز و نخاع، بررسی CSF کمک شایانی به تشخیص زودهنگام بیماری‌های مرتبط با مغز و اعصاب، خصوصا بدخیمی‌ها، خواهد کرد. از سوی دیگر از لحاظ محتوای پروتئوم، علی رغم شباهت پروتئوم CSF به پروتئوم پلاسما، پروتئوم CSF حدود ۱۰۰ تا ۴۰۰ برابر رقیق‌تر از سرم خون بوده و در نهایت در بررسی‌های ترمودینامیکی نسبت (signal/noise) کمتری را برای تشخیص نشانگرهای زیستی فراهم می‌نماید[۱۷].

سرطان گلیوبلاستومای چندشکلی، یکی از سرطان‌های بدخیم مغز است که سلول‌های گلیال مغزی را درگیر می‌کند. روش مناسبی برای تشخیص این سرطان بطور کامل وجود ندارد و روش‌های تشخیصی معمول از قبیل MRI و CT اسکن نیز تشخیص مناسبی را ارائه نمی‌دهند. تنها روش شناسایی بیماری در مراحل عود آن و از طریق بایوپسی و بررسی بافت شناسی است[۱۷]. در این میان

1. Apoptosis
2. Fludarabine
3. Cladribine
4. 2-Deoxycoformycin
5. Cyclophosphamide
6. Un-Stacking of Unconstrained DNA
7. Cerebrospinal Fluid
8. Gliobastoma Mutiform

براساس تحقیق انجام شده بررسی گرمایی CSF از طریق روش گرماسنجی روبش دمایی در تشخیص گلیوبلاستومای چند شکلی مفید بوده است. این گروه توانستند نمودار حرارتی مربوط به افراد مبتلا به گلیوبلاستومای چند شکلی را بدست آورند. الگوی نمودار گرمایی مربوط به CSF افراد بیمار تفاوت چشم گیری با نمودار گرمایی افراد سالم داشت. (برای مشاهده نمودار گرمایی می‌توان به مرجع ۱۵مراجعه نمود.)

۵- بحث

عامل تغییرات مشاهده شده در منحنی‌های نمودار گرمایی پلاسما در حالات بیماری چیست؟ اولین احتمالی که به ذهن می‌رسد تغییر در غلظت پروتئین‌های اصلی پلاسما است. آزمون‌های تکمیلی صورت گرفته توسط گاربت و همکارانش [۱۵] این فرضیه را منتفی کرد. آزمایش‌ها نشان دادند که غلظت پروتئین‌های اصلی پلاسما در حالات بیماری و سالم با هم تفاوتی ندارند. بررسی‌های الکتروفورز نیز تغییر در اندازه یا بار پروتئین‌های پلاسما را نشان ندادند. تنها استدلالی که برای توصیف تغییرات مشاهده شده در نمودار گرمایی باقی می‌ماند این است که مولکولی به پروتئین‌های پلاسما آنچنان متصل می‌شود که ساختار پروتئین‌های پلاسما را پایدار می‌کند. لذا نمودار گرمایی پروتئین‌های تغییر ساختار یافته پلاسما به سمت دماهای بالاتر جابه جا می‌شود. این دیدگاه با فرضیه اینتراکتوم تأیید می‌شود. بیومارکرهای پپتیدی یا پروتئینی اختصاصی یک بیماری (پپتیدوم) در پلاسما آزاد نیستند بلکه به اینتراکتوم یا پروتئین‌های اصلی نظیر آلبومین یا ایمونوگلوبین‌ها در اتصالند. بهترین حالت برای آزمایش این فرضیه این است که کمپلکس (اینتراکتوم- پپتیدوم) را بتوان به پپتیدوم و اینتراکتوم جدا و تخلیص کرد. آنگاه پپتیدوم خالص را به پلاسمای سالم اضافه کرد و تغییر ناشی از این افزایش را در نمودار گرمایی پلاسما مشاهده نمود. از آنجا که بیومارکرهای مورد بحث عملا شناسایی نشده اند این آزمون در حد نظریه باقی مانده است. گاربت و همکاران [۱۳ و ۳] برای بررسی تغییرات نمودار گرمایی ناشی از اندرکنش پپتیدوم با اینتراکتوم، آزمایش جایگزینی را طراحی کردند. در این آزمایش آلبومین را به عنوان اینتراکتوم فرض و به جای پپتیدوم نیز از لیگاند اختصاصی آلبومین، برموکرزول سبز[1]، استفاده شد. برموکرزول با میل ترکیبی ۷×۱۰۷ مولار به جایگاه اول آلبومین متصل می‌گردد و انتظار می‌رود که موجب پایداری آلبومین گردد. بررسی‌ها نشان می‌دهند در حضور برموکرزول سبز منحنی نمودار گرمایی چه برای پلاسما و چه برای آلبومین به منحنی نمودار گرمایی بیماری‌ها شبیه می‌شود و به سمت دماهای بالاتر جابه جا می‌گردد. این مشاهدات فرضیه اینتراکتوم را تقویت می‌کند و توصیفی محتمل برای تغییرات مشاهده شده در نمودار گرمایی بیماری‌ها ارائه می‌دهد. نشانگرهای زیستی پلاسما قادرند بسته به پروتئینی که با آن پیوند برقرار می‌کنند هزاران نمودار گرمایی ایجاد کنند. اندرکنش نشانگرهای زیستی با پروتئین‌های مختلف می‌تواند نمودارهای گرمایی منحصر به فردی ایجاد کند که بازتاب میزان پیچیدگی این اندرکنش‌ها هستند. گرماسنجی روبش دمایی نسبت به اندرکنش نشانگرهای زیستی با پروتئین‌های اصلی پلاسما حساس خواهد بود.

در زمینه مایع (مغزی- نخاعی) نیز، اینطور به نظر می‌رسد که انتقال گرمایی پیک نمودار گرمایی به سوی دمای بالاتر (۷۱ درجه سلسیوس) بدلیل افزایش و یا تغییر میانکنش نشانگرهای زیستی در حالت بیماری و در نهایت در پایدار نمودن پروتئین‌های غالب CSF است. این موضوع موجب می‌شود پروتیئن‌های غالب CSF در دمای بالاتری ظاهر شوند.

۶- نتیجه‌گیری

گرماسنجی روبش دمایی افق‌های نوینی را به سوی پروتئوم پلاسما می‌گشاید. الگوی مشابه نمودار گرمایی در پلاسما و مایع (مغزی- نخاعی) افراد سالم به منزله یک امضای زیست‌شناختی اختصاصی عمل می‌نماید که مجموع وزنی نمودار گرمایی تغییرات ساختار پروتئین‌های تشکیل‌دهنده (پلاسما/ مایع مغزی نخاعی) را در بیماری بیان می‌کند. نمودار گرمایی افراد بیمار تفاوت فاحشی با نمودار گرمایی افراد سالم دارد و برای هر بیماری کاملا اختصاصی است. تغییرات مشاهده شده در نتیجه عوامل مختلف، از قبیل تغییر در غلظت پروتئین‌های اصلی و همچنین پپتیدوم و میانکنش آنها با پروتئین‌های اصلی، منجر به ایجاد الگوی نمودار گرمایی متفاوت و اختصاصی می‌گردد. در میان بررسی‌های انجام شده اکثر قریب به اتفاق نتایج حاصل از گرماسنجی روبشی دمایی نشان دهندهٔ افزایش پایداری پروتئین‌های غالب پلاسمای خون و مایع مغزی نخاعی در

1. Bromocresol Green

مراحل نخست وقوع بیماری‌هاست کـه عمومـاً در نتیجـه میـانکنش پپتیدها با این پروتئین‌ها می‌باشد. بنابراین روش گرماسنجی روبـش دمـایی ابـزار تشخیـصی بـالینی جدیـدی در شناسـایی زودهنگـام بیماری‌ها عمل می‌کنـد و بـه عنـوان روشـی آسـان، ارزان و دقیـق، مکمل بسیار مناسبی برای روش‌های موجود از قبیل روش‌های طیف سنجی جرمی و الکتروفورز دو بعدی خواهد بود.

علاوه بر رویکـرد تشخیـصی، مـی‌تـوان از روش گرماسـنجی روبـش دمایی در گشودن رویکردهای جدیدی در زمینه علل وقوع بیماری‌ها و نحوه درمان آنها نیز بهره برد. بر طبق مطالعات انجام شده، بسیاری از بیماری‌های ژنتیکی ناشی از وقوع جهش در یک بـاز آلـی و یـا در نتیجه یک آمینو اسید در پروتئین است که موجب ناپایداری ساختار پروتئین در اثر این تغییر بسیار جزئی می‌گردد [۱۹و۱۸]. با توجه به مطالعات انجام شده توسط روش گرماسنجی روبش دمـایی، افـزایش پپتیدهای کوچک ناشناخته در خون به هنگام وقوع بیمـاری‌هـا و در نتیجه میانکنش آنها با پروتئین‌های غالب خـون از قبیـل آلبـومین و فیبرینوژن، پایداری این پروتئین‌های خونی متناسب بـا هـر بیمـاری تغییر می‌کند [۱۳]. استفاده از روش گرماسنجی روبش دمایی، علاوه بر کاربرد تشخیص زودهنگام بیمـاری‌هـا بطـور اختـصاصی، دیـدگاه جدیدی را نیز در زمینه وجود رابطه احتمالی ممکـن میـان افـزایش پایداری پروتئین‌های خونی و بیماری‌های مختلف به میـان مـی‌آورد که نیازمند انجام تحقیقات بیشتر خواهد بود. به عبارت دیگر، آیا این احتمال وجود دارد که افزایش پایداری پروتئین‌هـای غالـب خـون و تغییر ساختار احتمالی در نتیجه میانکنش‌های جدید، در وقـوع و یـا تشدید برخی از بیماری‌ها دخالت داشته باشـد؟ بـر طبـق مطالعـات انجام شده مبنی بـر افـزایش پایـداری برخـی پـروتئین‌هـای غالـب خون[۱۳]، پرسش دیگری مطرح خواهد بود که در شـرایط بیمـاری، پایداری پروتئین‌های خـون (از قبیـل پـروتئین‌هـای حامـل) تغییـر می‌کند، آیا نحوه انتقـال و دوز مـؤثر بـسیاری از داروهـا در شـرایط بیماری در روند بهبود تأثیرگذار خواهد بود؟

مراجع

[۱] ف. عزیزی, ح. حـاتمی, م. جانقربـانی اپیـدمیولوژی و کنتـرل بیماریهای شایع در ایران, انتشارات خسروی, تهران, (۱۳۸۳).

[2] Bottoni, P., Giardina, B., Vitali,A. ,Boninsegna,A., Scatena, R., "A proteomic approach to characterizing ciglitazone-induced cancer cell differentiation in Hep-G2 cell line", Biochim. Biophys. Acta 1794, 615–626, (2009).

[3] Garbett, N., Mekmaysy, C., Helm, W.,Jenson, A., Chaires, J., "Differential scanning calorimetry of blood plasma for clinical diagnosis and monitoring", Experimental and Molecular Pathology 86 ,186–191, (2009).

[4] Garbett, N. C., Miller, J. J., Jenson, A. B., Chaires, J. B., "Calorimetric analysis of the plasma proteome", Semin Nephrol 27,621-626, (2007).

[5] O'Connell TX, Horita TJ, Kasravi B. "Understanding and interpreting serum protein electrophoresis". Am Fam Physician. Jan 1;71(1):105-12, (2005).

[6] Latterichm, M., Abramovitz, M., Leyland-Jones, B., "Proteomics: New technologies and clinical applications" , European Journal of Cancer 44, 2737-2741, (2008).

[7] Zimmerman LJ, Li M, Yarbrough WG, Slebos R, Liebler DC. "Global stability of plasma proteomes for mass spectrometry-based analyses". Mol Cell Proteomics. Feb 1. [Epub ahead of print], (2012).

[8] Marko-Varga, G., Nilsson J. and Laurrel, T. "Proteome Analysis. Interpreting the Genome", Elsevier, Chapter13, 327–370, (2004).

[9] Garbett, N. C., Miller, J. J., Jenson, A. B., Miller, D. M., Chaires, J. B., "Interrogation of the plasma proteome with differential scanning calorimetry", Clin Chem., 53, 11: 2012-4,(2007).

[۱۰] جمـشید خـان چمنـی و علـی اکبـر موسـوی موحـدی "بیوترمودینامیک" انتشارات دانشگاه تهران (۱۳۸۷).

[11] Harding, S. E., Chowdhry, B. Z., Wadood, A. (Eds.), "Protein-ligand interactions: hydrodynamics and calorimetry: a hydrodynamic and calorimetry", Oxford Niversity Press, New York, Chapter 11, 287-318, (2001).

[12] Bottcher, H., Furst, P., "Direct microcalorimetry as a technique in cell cultures", Baillidre's Clinical Endocrinology and Metabolism 11,739-750, (1997).

[13] Garbett, N., Miller,J., Jenson,A., and Chaires, J., "Calorimetry Outside the Box: A New Window into the Plasma Proteome", Biophysical Journal 94, 1377–1383, (2008).