

## روش غربالگری الیزا مستقیم سانددویچی جهت تشخیص آدنوکارسینومای معده

محمدرضا مهربانی<sup>۱</sup>، مسعود سلیمانی<sup>۲</sup>، محسن میرزایی<sup>۳</sup>، منوچهر میرشاهی<sup>۴</sup>

تاریخ دریافت ۱۳۹۳/۰۳/۰۱ تاریخ پذیرش ۱۳۹۳/۰۶/۰۲

## چکیده

**پیش زمینه و هدف:** تومورهای توپر در سیر تکاملی خود دارای مراحل دیسپلازی، سرطان درجا، رگزایی (آنژیوژنز)، تهاجم و متاستاز می‌باشند. در این روند قطعات پپتیدی با توانایی مهار رگزایی (آنژیواستاتین) تولید می‌گردد که به دلیل وزن مولکولی پایین در ادرار بیماران فیلتر می‌شوند. هدف از انجام این تحقیق بررسی امکان تشخیص اولیه آدنوکارسینومای معده در افراد بیمار با به‌کارگیری قطعات پپتیدی فیلتر شده در ادرار برای ارائه یک روش غیره تهاجمی و بی‌خطر هست.

**مواد و روش‌ها:** نمونه‌های اتفاقی ادرار ۲۰ بیمار مبتلا به آدنوکارسینومای معده با روش الیزا مستقیم سانددویچی (Sandwich Direct ELISA) بهینه‌سازی شده برای تشخیص قطعات آنژیواستاتینی در مقایسه با ۲۰ شاهد سالم ارزیابی گردید.

**یافته‌ها و نتایج:** حاصل در آزمون آماری T-test با سطح اطمینان ۹۵ درصد ( $P \text{ value} < 0.05$ ) ارتباط معنی‌داری را بین آدنوکارسینومای معده و وجود قطعات آنژیواستاتینی در ادرار نشان داد که کاملاً با نتایج آزمایشات آسیب‌شناسی بیماران مطابقت داشت.

**نتیجه‌گیری:** مقایسه نتایج این مطالعه نشان داد با یافتن قطعات آنژیواستاتینی در ادرار بیماران می‌توان روشی غیرتهاجمی و بی‌خطر جهت تشخیص اولیه آدنوکارسینومای معده در افراد مشکوک ابداع نمود که قبل از روش‌های تهاجمی (آسیب‌شناسی) قابل انجام است اما لازم است مانند هر روش غربالگری دیگر با آزمایشات تکمیلی تأیید گردد.

**لغات کلیدی:** آدنوکارسینوما، الیزا، آنژیواستاتین، آنژیوژنز، نئوپلاسم، معده

مجله پزشکی ارومیه، دوره بیست و پنجم، شماره دوازدهم، ص ۱۱۳۳-۱۱۲۸، اسفند ۱۳۹۳

آدرس مکاتبه: بروجرد میدان مدرس دانشکده پیراپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی گروه علوم آزمایشگاهی تلفن: ۰۶۶-۰۵۸۷۸-۴۲۵

Email: mehrabi.mehr@gmail.com

## مقدمه

تغذیه‌ای و محیطی است. این کاهش در انگلستان از سال ۱۹۷۱ تا ۱۹۷۵ در مردان از ۱/۱۴ به ۰/۸۴ و در همین زمان در زنان از ۱/۱۸ به ۰/۸۱ بوده است (۲، ۳).

امروزه، هدف اصلی برنامه‌های طراحی شده جهت کاستن مرگومیر ناشی از کارسینومای معده، تشخیص زودهنگام سرطان در مراحل ابتدایی هست تا تأثیرگذاری درمان بر طول عمر بیماران بیشتر شود. در ژاپن با غربالگری و تشخیص بیماری در مراحل اولیه و برداشتن معده، حدود ۳۰ درصد بیماران شانس ادامه حیات یافته‌اند، این آمار در اروپا و آمریکای شمالی ۱۰ درصد است (۴).

سرطان معده چهارمین سرطان معمول و دومین علت مرگ‌های مرتبط با سرطان در دنیا است. تخمین زده می‌شود بیش از ۹۳۰۰۰۰ بیمار جدید در سال به این بیماری مبتلا شوند که حداقل ۷۰۰،۰۰۰ نفر از آنان می‌میرند. در ایران، این سرطان بیشتر در شمال و شمال غرب شیوع دارد. این شیوع در مناطق مختلف جغرافیایی از ۱۰/۴ تا ۴۹/۱ در مردان و از ۵/۱ تا ۲۵/۴ در زنان گزارش شده است (۱).

البته شیوع سرطان معده به سرعت در دهه‌های اخیر در دنیا کاهش یافته است. بخشی از این کاهش به دلیل تشخیص فاکتورهای خطر معین مانند هلیکوباکتر پیلوری و سایر عوامل

<sup>۱</sup> استادیار هماتولوژی و بانک خون آزمایشگاهی، گروه علوم آزمایشگاهی، واحد بروجرد، دانشگاه آزاد اسلامی، بروجرد، ایران (نویسنده مسئول)

<sup>۲</sup> دانشیار هماتولوژی و بانک خون آزمایشگاهی، گروه هماتولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

<sup>۳</sup> استادیار باکتری شناسی پزشکی، گروه علوم آزمایشگاهی، واحد بروجرد، دانشگاه آزاد اسلامی، بروجرد، ایران

<sup>۴</sup> دانشیار سلولی مولکولی، گروه بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

در هنگام نمونه‌گیری هنوز بیماران هیچ درمانی دریافت نکرده بودند. به‌عنوان گروه شاهد نیز از ۲۰ زن و مرد سالم بالای ۴۵ سال به‌صورت اتفاقی نمونه ادرار جمع‌آوری گردید. به ظروف جمع‌آوری ادرار قبل از نمونه‌گیری فنیل متیل سولفونیت فلوراید یک صدم درصد اضافه شد (۱۰). پس از حمل نمونه‌ها ادرارهای حاوی فنیل متیل سولفونیت در حرارت ۲۲-۳۰ درجه سانتی‌گراد به آزمایشگاه، نمونه‌ها با دور ۱۲۰۰ g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شدند و مایع فوقانی آن‌ها بطور جداگانه از رسوب جدا گردید و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان آزمایش نگهداری شد.

۲- بهینه‌سازی روش الیزای مستقیم ساندویچی Sandwich (Direct ELISA) جهت تشخیص وجود قطعات آنژیواستاتینی در نمونه‌های ادرار بیماران و گروه شاهد،

۱-۲- به کمک تیتراسیون رقت ایدال آنتی‌بادی مونوکلونال A1D12 (۷ µg/ml) تعیین و در بافر کرینات ۵۰mM با ۹/۶PH به هرچاهک میکروپلیت ۱۰۰ µL اضافه شد و مدت یک شب در ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد (Coating).

۲-۲- محتویات مرحله قبل از میکروپلیت‌ها تخلیه و ۱۵۰ µL آلبومین سرم گاوی ۱درصد در محلول بافر فسفات (PBS) ۰/۱ مولار به تمام چاهک‌ها اضافه شد و یکساعت میکروپلیت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوباسیون گردید (Blocking).

۲-۳- چاهک‌های میکروپلیت سه بار هر بار ۵ دقیقه با بافر شستشو توئین ۲۰ محلول بافر فسفات PBS Tween 20 (۰/۵درصد و ۰/۱ مولار) شسته شدند و بافر شستشوی اضافی باقیمانده در چاهک‌ها با برگرداندن پلیت بر روی صفحه کاغذ صافی و زدن ضربات نسبتاً شدید (Tapping) خارج شد.

۲-۴- پس از آنکه به هریک از چاهک‌ها ۱۰۰ µL از ادرار بیماران و گروه شاهد اضافه شد میکروپلیت‌ها یک ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوباسیون شدند.

به چاهک‌های انتهایی هر ردیف عمودی میکروپلیت نیز ۱۰۰ µL از کنترل مثبت، منفی و محلول بافر فسفات (PBS) اضافه شد و پس از اتمام زمان انکوباسیون مرحله ۲-۳ تکرار شد.

جهت ساخت کنترل مثبت که حاوی قطعات آنژیواستاتینی بود ۲/۷ میکرومول پلاسمینوزن و ۰/۱۴ میکرومول پلاسمین و ۳۰۰ میکرومول گلوکوتایون احیا شده را در بافر تریس ۰/۰۵ مولار با PH ۸ به مدت ۳۶ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوباسیون شد (۱۱).

جهت ساخت کنترل منفی از پلاسمای عبور داده شده از زل سفاروز لیزین که فاقد پلاسمینوزن بود استفاده شد.

۲-۵- به کمک تیتراسیون بهترین رقت آنتی‌بادی پلی کلونال ضد پلاسمینوزن متصل به آنزیم پراکسیداز (کونژوگه) تعیین شد

در سال ۱۹۹۴، با کشف آنژیواستاتین توسط او ریلی (O'Reilly) و همکارانش چشم‌انداز تازه‌ای در روش‌های بیولوژی مولکولی گشوده شد. آن‌ها گزارش کردند در موش‌های دارای نقص ایمنی توأم (SCID) که به آن‌ها نوعی سرطان موشی به نام Lewis Lung Carcinoma پیوند زده شده بود علی‌رغم عدم وجود سیستم ایمنی، تومورهای پیوندی به‌خودی‌خود محدود می‌شوند و در ادرار این موش‌ها قطعات پپتیدی با توانایی توقف رگزایی مشاهده شد (۵، ۶). قطعات پپتیدی کشف‌شده که شاخص‌ترین آن‌ها آنژیواستاتین نام دارد از نظر توالی اسیدهای آمینه شبیه بخشی از پلاسمینوزن (اسید آمینه ۷۱-۴۴۰) می‌باشد. در روند تومورزایی، قطعات حاصل از شکسته شدن پلاسمینوزن با مهار رگزایی مانع دستیابی تومور در حال رشد به مواد غذایی و اکسیژن بیشتر می‌شود و رشد تومور را محدود می‌کند. این قطعات به علت وزن پایین مولکولی پس از ورود به خون در ادرار ظاهر می‌شوند (۶). البته در این روند پلاسمین نیز تولید می‌گردد که از راه فعال نمودن آنژیوتنر، در پیشروی تومور نقش دارد و در واقع وضعیت پیشروی یا مهار تومور بستگی به تقابل این دو روند دارد (۷، ۸).

در این پژوهش برای اولین بار با استفاده از آنتی‌بادی A1D12 روش الیزا مستقیم ساندویچی جهت تشخیص قطعات پپتیدی آنژیواستاتینی در ادرار بیماران مبتلا به آدنوکارسینومای معده بهینه‌سازی شد. آنتی‌بادی A1D12 قادر است به انتهای آمینی آنژیواستاتین واکنش دهد (۹).

## روش‌ها و مواد

نوع مطالعه مورد شاهدهی

پلیت الیزا ساخت کمپانی گرینر بیو وان کشور آلمان، توئین ۲۰ و فتیل متیل سولفونیت فلوراید ساخت شرکت مرک آلمان، آب اکسیژنه و ارتو فنیلن دی آمین دی هیدروکلراید<sup>۱</sup> و آلبومین سرم گاوی ساخت شرکت سیگما آلد ریچ آمریکا، آنتی‌بادی پلی کلونال ضد پلاسمینوزن انسانی کونژوگه با پراکسیداز ساخت شرکت افینیتی بیولوژیکالس کانادا، آنتی‌بادی مونوکلونال A1D12 منوچهر میرشاهی، دستگاه الیزا ریدر مدل Elx800 شرکت بیوتک آمریکا.

۱- جمع‌آوری نمونه ادرار بیماران و گروه شاهد

از ۲۰ بیمار بستری در بخش سرطان شناسی بیمارستان امام خمینی که بیماری آن‌ها با آزمایش آسیب‌شناسی تأیید شده بود بصورت اتفاقی نمونه ادرار جمع‌آوری شد.

<sup>1</sup> o-Phenylenediamine dihydrochloride=OPD

شد. سنجش بصورت دوتایی ( Duplicate ) برای نمونه‌های شاهد و بیمار انجام گردید.

### یافته‌ها

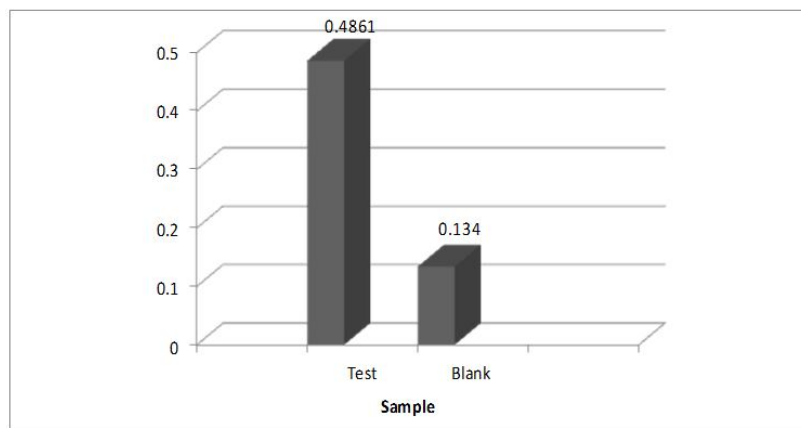
اطلاعات حاصل از میانگین جذب نوری نمونه‌های بیماران و گروه شاهد در آزمون آماری تی با سطح اطمینان ۹۵ درصد ( $P \text{ value} < 0.05$ ) تفاوت معنی‌داری بین وجود این سرطان و قطعات آنژیواسکتاتیسی موجود در ادرار بیماران را نشان داد (جدول ۱ و نمودار شماره ۱)

( رقت  $1/5000$  ) و به تمام چاهک‌ها  $100 \mu\text{L}$  از این رقت اضافه شد و مدت یک ساعت در  $37^\circ\text{C}$  درجه سانتی‌گراد انکوباسیون شد بعد مرحله ۲-۳ تکرار شد.

۲-۶-  $100 \mu\text{L}$  از سوبسترای آنزیم پراکسیداز (  $\text{OPD} + \text{H}_2\text{O}_2$  ) به چاهک‌ها اضافه گردید و بعد از ظهور رنگ با اضافه کردن  $100 \mu\text{L}$  از اسید سولفوریک ۵ درصد بعد از ۵ دقیقه واکنش متوقف و جذب نوری میکروپلیت در طول موج ۴۹۲ نانومتر قرائت

جدول (۱): مقایسه میانگین جذب نوری گروه شاهد و بیماران سرطانی

سرطان	تعداد	میانگین جذب نوری گروه بیمار	میانگین جذب نوری گروه شاهد	P value	t value
آدنوکارسینومای معده	۲۰	$0.486 (\pm 0.118)$	$0.134 (\pm 0.07)$	۰/۰۵	۲/۴۰۱



نمودار (۱): مقایسه جذب نوری در بیماران مبتلا به آدنوکارسینوما معده و گروه شاهد

به همین دلیل رگزایی در داخل تومورها با رساندن خون و مواد غذایی به سلول‌های توموری نقش مهمی در رشد و بزرگ شدن تومورها دارد. در واقع آنژیوژنز در گسترش تومورها همواره بر متاستاز است و همگام با تکثیر سلول‌های بدخیم در تومورها گسترش می‌یابد. امروز درمان‌های ضدسرطانی با ممانعت از رگزایی در داخل تومورها به منظور محدود ساختن آن‌ها متمرکز شده است. این درمان‌ها با استفاده از آنتی بادی‌های مونوکلونال ضدفاکتورهای محرک رگزایی یا گیرنده این فاکتورها و یا افزایش مواد آنتی آنژیوژنیک صورت می‌گیرد (۱۲، ۱۳). استفاده از این درمان‌ها می‌تواند باعث مخدوش شدن روش الیزای مستقیم ساندویچی طراحی‌شده در این پژوهش گردد لذا بایستی این آزمایش قبل از گرفتن این گونه درمان‌ها روی بیماران انجام گیرد.

### بحث

اعتقاد بر این است که اغلب تومورهای توپر از یک مرحله مخفی یا کارسینومای درجا از نظر بالینی عبور می‌کنند که در خلال آن تعداد سلول‌های بدخیم بسیار کمتر از آن است که بتوان با مطالعات رایج، بدخیمی را تشخیص داد. با پیشرفت روند بدخیمی پتانسیل تکثیر سلول‌هایی سرطانی در نتیجه جهش‌های متعدد فزونی یافته و تومور به حدی بزرگ می‌شود که می‌توان آن را از طریق علائم بالینی، آندوسکوپی و بیوپسی تشخیص داد. در روند سرطانی‌زایی هرچند متاستاز دادن در تومورهای بسیار کوچک نیز امری محتمل است اما با بزرگتر شدن تومور احتمال اینکه کلون‌های متاستاتیک پدیدار شوند بطور پیشرونده ای افزایش می‌یابد (۱).

روش توانایی تشخیص و واکنش با توالی ۸۰-۶۸ پلاسمینوژن را دارد (۹). این توالی درست در ناحیه ای که پس از تخریب پلاسمینوژن توسط عوامل پروتئولیتیک هنگام تهاجم سلول‌های بدخیم ایجاد می‌شود واقع شده است. این قطعات براحتی به خون می‌ریزند و بدلیل وزن مولکولی کمی که دارند در ادرار افراد بیمار یافت می‌شوند.

یکی از مهم‌ترین محدودیت‌هایی که بیش از هر چیز دیگر هنگام معرفی روش‌های تشخیصی نوظهور، موجب نگرانی است موارد مثبت و منفی کاذب و صدمات جبران ناپذیر مادی و معنوی‌ای است که نتایج حاصل از این روش‌ها ممکن است بیار آورد. روش معرفی شده در این پژوهش، محدودیت‌هایی مشابه هر روش غربالگری دیگر دارد یعنی پس از مثبت شدن باید با آزمایشات اختصاصی‌تر تأیید گردد. لذا صرفاً با توجه به نتایج این آزمایش نباید روی بیمار تشخیص گذاشت. ضمن آنکه این روش می‌تواند بعنوان یک روش غیرتهاجمی ساده و فراگیر قبل از انجام بیوپسی که روشی تهاجمی بحساب می‌آید به پزشک جهت تشخیص زودهنگام بیماری کمک کند، هرچند تشخیص قطعی و حذف موارد مثبت کاذب ناشی از عوامل مخدوش کننده مانند سایر بدخیمی‌ها و یا بیماری‌های زمینه‌ای که می‌توانند باعث مثبت شدن نتایج گردند باید به کمک علائم بالینی، تومور مارکرها، آزمایش‌های مولکولی و نهایتاً آزمایش پاتولوژی صورت گیرد.

### نتیجه‌گیری

از آنجایی که این روش برای تشخیص بیماری در افراد مشکوک روشی کاملاً بی‌خطر و غیرتهاجمی می‌باشد می‌توان از آن جهت غربالگری بیماری و جایگزینی اولیه روش‌های تشخیصی تهاجمی مانند آسیب‌شناسی سود جست. از طرفی تصور می‌شود در صورت افزایش حساسیت و اختصاصیت این روش و تعریف یک کات-آف (Cut - Off) مناسب حتی قبل از روش‌های آسیب‌شناسی در مرحله سرطان درجا آدنوکارسینومای معده را بتوان تشخیص داد و شانس درمان بیماری را بالا برد.

### تقدیر و تشکر

این طرح تحقیقاتی با حمایت مالی معاونت محترم پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد بروجرد انجام شده است که بدین وسیله از زحمات این معاونت تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

طبق مطالعات انجام شده در افراد طبیعی نیز در موارد خاصی نظیر سیکل قاعدگی، ترمیم بافت‌ها و تشکیل جنین رگزایی مشاهده می‌شود (۱۴، ۱۵) که ممکن است این آزمایش را مثبت کند و از اختصاصیت آزمایش بکاهد، لذا باید در زمان انجام آن بر روی بیماران به این مسئله نیز توجه داشت. در این پژوهش این موارد هم در بیماران وهم گروه شاهد قبل از نمونه‌گیری و انجام آزمایش مد نظر قرار داشت. یکی دیگر از موارد مهم، مهار آنزیم‌های پروتئولیتیک موجود در ادرار بیماران هنگام نمونه‌گیری بود که به عنوان یکی از عوامل مداخله‌گر می‌تواند باعث تخریب قطعات دفعی در ادرار گردد به همین دلیل قبل از نمونه‌گیری به ظروف فنیل متیل سولفونیت فلوراید اضافه شد. این ماده می‌تواند علاوه بر مهار سرین پروتئازها مانند تریپسین و کموتریپسین، سیستمین پروتئازها مانند پاپائین و استیل کولین استراز را نیز مهار نماید (۱۰).

در روند سرطان، توده کوچک توموری در مرحله سرطان درجا (Ca. In situ) تکامل سرطانی، ممکن است ماه‌ها یا سال‌ها باقی بماند و اندازه‌اش تغییر نکند و حتی رگ‌هایی نیز در آن مشاهده شود. از آنجایی که رگزایی در تومورها مقدم بر مناساز است فرضیه ما در این پژوهش این است که می‌توان عدم رگزایی در مرحله سرطان درجا را با بالا بودن مقدار عوامل مهارکننده (قطعات آنژیواستاتینی) مربوط دانست. چن وهمکارانش برای اثبات تولید قطعات آنژیواستاتینی و نقش مهاری آن‌ها، دودمان سلولی تومورهای انسانی را به موش‌های دارای نقص ایمنی توأم پیوند زدند و بعد از تخلیص قطعات آنژیواستاتینی از ادرار موش‌ها آن را به یک مدل قرنیه ای که به منظور رگزایی با فاکتور رشد فیبروبلاستی تحریک شده و دچار پانوس گشته بود، اضافه کردند و وجود قطعات آنژیواستاتینی را از طریق مهار رگزایی در مدل قرنیه ای بخوبی نشان دادند. تا قبل از اینکه این گروه حاصل تحقیقات خود را منتشر کند تصور می‌شد قطعات آنژیواستاتینی فقط در کارسینومای موشی ریه لوئیس (Lewis Lung Carcinoma) تولید می‌شود (۱۶).

روش ابتکاری حاضر در این پژوهش توانست بدون نیاز به مدل قرنیه ای حیوان آزمایشگاهی، محیط کشت‌های سلولی، صرف وقت و هزینه زیاد بطور مستقیم در نمونه‌های ادرار بیماران مبتلا به آدنوکارسینومای معده قطعات آنژیواستاتینی را با روش الیزا ساندویچی مستقیم شناسایی کند. آنتی‌بادی بکار رفته در این

### References:

1. Malekzadeh R, Derakhshan MH, Malekzadeh Z. Gastric cancer in Iran: epidemiology and risk factors. Arch Iran Med 2009;12(6):576-83.

2. Zhu AL, Sonnenberg A. Is Gastric Cancer Again Rising? *J Clin Gastroenterol* 2012;46(9):804-6.
3. Fitzsimmons D, Osmond C, George S, Johnson C. Trends in stomach and pancreatic cancer incidence and mortality in England and Wales, 1951–2000. *British J Surgery* 2007;94(9):1162-71.
4. Ritchie A. *Boyd's textbook of pathology*: Lea & Febiger Michigan; 1990.
5. O'Reilly MS, Holmgren L, Shing Y, Chen C, Rosenthal RA, Moses M, et al. Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *cell* 1994;79(2):315-28.
6. Price JT, Bonovich MT, Kohn EC, Welch DR, Hershey MS. The biochemistry of cancer dissemination. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* 1997;32(3):175-252.
7. O'Reilly MS, Wiederschain D, Stetler-Stevenson WG, Folkman J, Moses MA. Regulation of angiostatin production by matrix metalloproteinase-2 in a model of concomitant resistance. *J Biological Chemistry* 1999;274(41):29568-71.
8. Hatzia Apostolou M, Katsoris P, Papadimitriou E. Different inhibitors of plasmin differentially affect angiostatin production and angiogenesis. *European J pharmacol* 2003;460(1):1-8.
9. Mirshahi M, Soria J, Lijnen H, Fleury V, Bertrand O, Drouet L, et al. A monoclonal antibody directed against an epitope in the NH<sub>2</sub> sub-terminal region of native human plasminogen induces a modification of its functional properties. *Fibrinolysis Proteolysis* 1997;11(3):155-63.
10. James GT. Inactivation of the protease inhibitor phenylmethylsulfonyl fluoride in buffers. *Analytical biochemistry* 1978;86(2):574-9.
11. Gately S, Twardowski P, Stack MS, Cundiff DL, Grella D, Castellino FJ, et al. The mechanism of cancer-mediated conversion of plasminogen to the angiogenesis inhibitor angiostatin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94(20):10868–72.
12. Andreasson P, Carlsson R. Targeting angiogenesis with antibodies for the treatment of cancer. *IDrugs* 2005;8(9):730–3.
13. O'Byrne KJ, Steward WP. Tumour angiogenesis: a novel therapeutic target in patients with malignant disease. *Emerging Drugs* (null) 2001;6(1):155-74.
14. Fan X, Krieg S, Kuo CJ, Wiegand SJ, Rabinovitch M, Druzin ML, et al. VEGF blockade inhibits angiogenesis and reepithelialization of endometrium. *FASEB J* 2008;22(10):3571-80.
15. Reynolds L, Killilea S, Redmer D. Angiogenesis in the female reproductive system. *FASEB J* 1992;6(3):886-92.
16. Chen C, Parangi S, Tolentino MJ, Folkman J. A strategy to discover circulating angiogenesis inhibitors generated by human tumors. *Cancer Res* 1995;55(19):4230-3.

## DIRECT SANDWICH ELISA METHOD FOR DIAGNOSIS OF STOMACH ADENOCARCINOMA

Mohammad Reza Mehrabi<sup>1\*</sup>, Masoud Soleimani<sup>2</sup>, Mohsen Mirzaee<sup>3</sup>, Manochehr Mirshahi<sup>4</sup>

Received: 22 May, 2014; Accepted: 24 Aug, 2014

### Abstract

**Background & Aims:** Solid tumors in their course of development have the stages of dysplasia, carcinoma insitu, angiogenesis, invasion and metastasis. In this process, peptide components having the ability of angiogenesis inhibition (angiostatin) are produced and due to their low molecular weight, they are filtrated. The purpose of this study is to study the probability of primary diagnosis of stomach adenocarcinoma in patients by the application of the filtered peptides in urine to introduce a non-invasive and safe method.

**Materials & Methods:** The randomized urine samples of 20 patients with stomach adenocarcinoma were compared with normal urine samples of 20 healthy people by means of the optimized direct sandwich ELISA in order to diagnose the peptide components.

**Results:** The results by means of T-test (P value < 0.05) showed a significant correlation between stomach adenocarcinoma and finding of these peptides in urine and they were completely in accordance with the results of pathologic tests.

**Conclusion:** The comparison between results obtained in this study showed that by finding the peptides in patients' urine, a non-invasive and safe method was used for primary detection of stomach adenocarcinoma in suspicious patients which was performable before invasive methods (pathology); nevertheless, it is needed to confirm it with complementary tests similar to each screening method.

**Keywords:** Adenocarcinoma, Angiostatine, Angiogenesis, ELISA, Neoplasm, Stomach

**Address:** Department of Laboratory Sciences, Borujerd Branch, Islamic Azad University, Broujerd, Iran, Tel: +986642505878

**Email:** mehrabi.mehr@gmail.com

SOURCE: URMIA MED J 2015; 25(12): 1133 ISSN: 1027-3727

<sup>1</sup> Assistant Professor of Hematology and Blood Banking, Department of Laboratory Sciences, Borujerd Branch, Islamic Azad University, Broujerd, Iran (Corresponding Author)

<sup>2</sup> Associate Professor of Hematology and Blood Banking, Department of Hematology and Blood Banking, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

<sup>3</sup> Assistant Professor of Microbiology, Department of Laboratory Sciences, Borujerd Branch, Islamic Azad University, Broujerd, Iran

<sup>4</sup> Associate Professor of Cellular and Molecular, Department of Biochemistry, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran