مقاله مروری

تکنیک‌ها و روش‌های نوین در بررسی قدرت تهاجم، مهاجرت سلولی و فعالیت ماتریکس متالوپروتئینازها در محیط آزمایشگاه و مدل حیوانی

علی گلستان، راضیه عبدالهی پور حقیقی، محمد علی تخشید، ریتا عرب سلغار*

مرکز تحقیقات علوم و فناوری تشخیص آزمایشگاهی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۷/۰۱/۲۴ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۷/۰۹/۰۷

چکیده

زمینه و هدف: متاستاز علت اصلی مرگ‌ومیر ناشی از سرطان است و حدود ۹۰٪ مرگ‌ومیر ناشی از سرطان را تشکیل می‌دهد. میزان درمان سرطان به‌طور قابل‌توجهی بهبود یافته است، این پیشرفت عمدتاً به دلیل تشخیص زودهنگام و مهار تکثیر سلول سرطان است. مهم‌ترین ویژگی یک سلول توموری بدخیم، توانایی فعالیت تهاجم و مهاجرت سلولی است. مطالعه مهاجرت سلولی و فاکتورهای مؤثر در آن در تشخیص سرطان، پیش‌آگهی، توسعه دارو و درمان سرطان ارزشمند است. تکنیک‌ها و روش‌های نوینی جهت بررسی قدرت تهاجم و مهاجرت سلولی در محیط آزمایشگاه و نیز جهت بررسی فعالیت آنزیم‌های درگیر در فرآیند تهاجم وجود دارند. اثر و کارآمد بودن داروها و ترکیبات مختلف ضد سرطانی را با استفاده از این روش‌ها در محیط آزمایشگاه و مدل حیوانی می‌توان موردبررسی قرار داد.

نتیجه گیری: در این مقاله خلاصه‌ای از آزمون‌های مهاجرت در in-vitro شامل trans well migration assay، scratch wound assay، microfluidic chamber assay، exclusion zone assay، fence assay، micro carrier bead assay و spheroid migration assay و یک روش در in-vivo، Chick chorioallantoic membrane (CAM) assay ارائه می‌کنیم.در این مقاله همچنین روش‌های In situ Zymography، ELISA، FRET based measurement of MMP activity ، Substrate Zymography به‌منظور اندازه‌گیری میزان آنزیم ماتریکس متالوپروتئیناز به‌عنوان آنزیم اصلی در تخریب ماتریکس خارج سلولی توضیح داده شده است.

کلمات کلیدی: ماتریکس متالوپروتئیناز، بررسی مهاجرت سلولی، تومور بدخیم

مقدمه

متاستاز فرایندی است که در طی آن سلول‌های سرطانی از تومور اولیه منتشرشده و در محل دیگری غیر از محل تومور اولیه رشد می‌کنند (۱). متاستاز شامل مراحل جدایی، مهاجرت، تهاجم و چسبندگی است و توسط مسیرهای مختلف سیگنالینگ تنظیم‌شده و تحت تأثیر ماتریکس خارج سلولی اطراف (ECM) قرار دارد (۲). سه ویژگی اصلی رگ زایی (Angiogenesis)، تحرک سلولی (Cell motility)، توانایی تخریب ماتریکس خارج سلولی، می‌تواند یک سلول سرطانی را از حالت خوش‌خیم خارج و به حالت بدخیم تبدیل کند.

به فرایند تشکیل عروق خونی آنژیوژنسیس و یا رگ زایی گفته می‌شود. در شرایط پاتولوژیک مانند سرطان، آنژیوژنز بانفوذ به درون تومورها اکسیژن و مواد غذایی لازم برای سلول‌های توموری را فراهم می‌کند و مواد زائد را دفع می‌کند و به‌این‌ترتیب برای تکثیر و بقای تومور لازم است (۳). تحرک سلولی نیز از مراحل مهم در تهاجم تومورها و متاستاز به‌حساب می‌آید و سازمان‌دهی مجدد اسکلت سلولی اکتین از مکانیسم‌های اصلی تحرک سلولی به‌حساب می‌آید (۴).

*نویسنده مسئول: **ریتا عرب سلغار**، مرکز تحقیقات علوم و فناوری تشخیص آزمایشگاهی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران
Email: arabsolghar@sums.ac.ir
https://orcid.org/0000-0003-9725-8005

[Downloaded from jabs.fums.ac.ir on 2025-06-06]

[DOR: 20.1001.1.22285105.2019.8.4.1.7]

مطالعات اخیر نشان‌دهنده اهمیت بسیار زیاد ماتریکس خارج سلولی در پیشرفت سرطان است. ماتریکس خارج سلولی بخش مهمی از محیط اطراف سلول است و متشکل از پروتئین‌ها، گلیکوپروتئین‌ها، پروتئوگلیکان‌ها و پلی ساکاریدها است. تخریب ECM در مهاجرت سلولی توسط آنزیم‌های پروتئولیتیک انجام می‌شود (۵، ۶).

الف) آنزیم‌های پروتئولیتیک

آنزیم‌های متالوپروتئینازها (Metalloproteinase)، سیستئین پروتئازها (Cysteine Protease)، سرین پروتئازها (Serine Protease) از این قبیل آنزیم‌ها می‌باشند. فعالیت این آنزیم‌ها می‌توانند عواقب مخربی بر بافت‌ها داشته و موجب مرگ کل ارگانیزم شوند (۷).

۱) ماتریکس متالوپروتئیناز (MMP)

ماتریکس متالوپروتئینازها خانواده‌ای از آنزیم‌های وابسته به روی (Zinc-dependent) هستند و به دو صورت پروآنزیم و آنزیم فعال در محلول‌های بیولوژیکی وجود دارند (۸). این آنزیم‌ها در مواردی مانند بازسازی بافت، بهبود زخم و رشد جنین بیان می‌شوند و بیان نامعمول آن‌ها با شرایط پاتولوژیکی مانند آرتریت روماتوئید و تهاجم سلولی و متاستاز همراه است (۱۲-۹). تعدادی از ماتریکس متالوپروتئینازها مانند کلاژناز، ژلاتیناز و استرومولیزین‌ها محلول بوده و به بیرون ترشح می‌شوند (۱۳، ۱۴). تعدادی دیگر از این آنزیم‌ها متصل به غشای پلاسمایی هستند (Membrane Type (MT-MMP)) (۱۵، ۱۶). از مهم‌ترین MMPهایی که در فرآیند Invasion & Migration دخالت دارند MMP2 و MMP9 می‌باشند. این دو نوع MMP، کلاژن تیپ IV که ماده اصلی غشای پایه است را تخریب می‌کنند (۱۱، ۱۳، ۱۷). فعالیت MMP توسط مهارکننده‌های بافتی MMP (TIMMP) کنترل می‌شود (۱۸).

۲) سیستئین پروتئازها

این آنزیم‌های پروتئولیتیک توسط باقی‌مانده سیستئین در جایگاه فعال خود شناسایی می‌شوند. آن‌ها می‌توانند در لیزوزوم مانند (کاتپسین B، L، H و S) یا در سیتوزول (کالپین) قرار گیرند. تعداد زیادی از مطالعات همبستگی بین فعالیت سیستئین پروتئازهای لیزوزومی و پیشرفت تومور را نشان می‌دهند (۱۹، ۲۰). خانواده سیستئین پروتئازهای نوع کاتپسین می‌توانند هر دو پروتئین‌های ماتریکس داخل سلولی و خارج سلولی (ECM) را تجزیه کنند (۲۱، ۲۲). کاتپسین‌ها می‌توانند توسط مهارکننده سیستئین پروتئاز، به نام سیستاتین، در سلول‌ها و بافت‌های نرمال تنظیم شوند (۲۳).

۳) سرین پروتئازها

سرین پروتئازها که در تخریب ماتریکس خارج سلولی نقش دارند شامل پلاسمین، فعال‌کننده‌های پلاسمینوژن انواع بافتی و یوروکیناز (tPA) tissue type Plasminogen Activator و urokinase type Plasminogen Activator (uPA) می‌باشند (۲۴). پلاسمین قادر به تخریب بسیاری از اجزای ماتریکس خارج سلولی مانند ژلاتین، فیبرونکتین، لامینین است (۲۵). فعال‌کننده پلاسمینوژن نوع بافتی (tpa) یک آنزیم کلیدی در آبشار فیبرینولیتیک است درحالی‌که فعال‌کننده نوع یوروکیناز (uPA) از طریق فعال کردن پلاسمین منجر به تخریب پروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی می‌شود. فعالیت PA توسط مهارکننده‌های اختصاصی که برای فعال‌کننده‌ی پلاسمینوژن وجود دارد کنترل می‌شود، مهارکننده‌هایی که عضو خانواده مهارکننده سرین پروتئاز (serpin) هستند (۱۷، ۲۶، ۲۷).

تکنیک‌ها و روش‌های مختلفی وجود دارند که می‌توانند فرآیند تهاجم و مهاجرت سلولی را در محیط آزمایشگاه (in-vitro) و مدل حیوانی (in-vivo) موردبررسی قرار دهند (۲۸). خلاصه‌ای از ویژگی‌های این تست‌ها در زیر آورده شده است (۳۰-۲۸).

۱) سنجش برون غشایی (Trans membrane Assays)

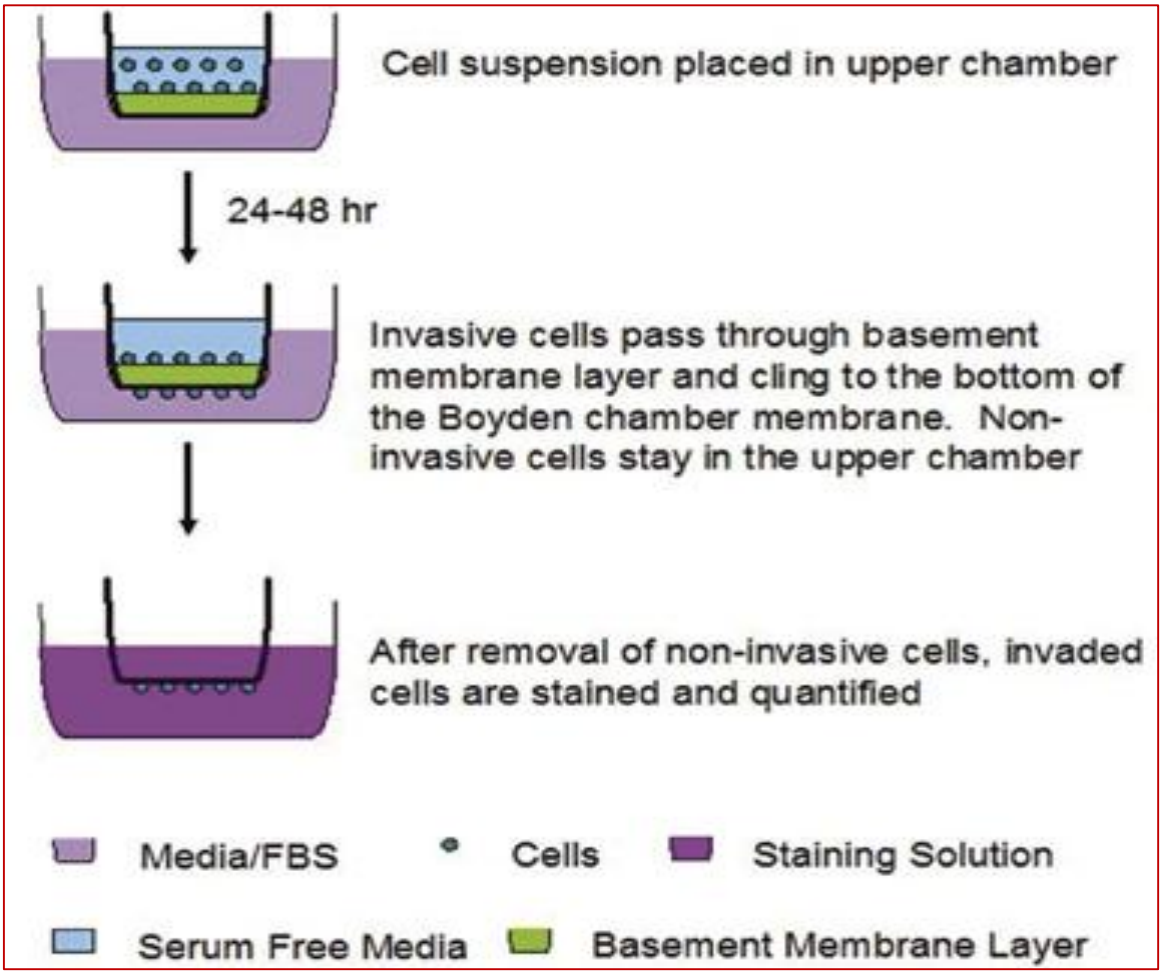
در این روش ابتدا یک درج غشایی (membrane insert) استفاده می‌شود که در آن چاهک به دو بخش تقسیم می‌شود. سوسپانسیون سلولی به بخش بالایی اضافه‌شده و سلول‌ها در طول غشا مهاجرت می‌کنند، مهاجرت سلول‌ها با شمارش سلول‌ها در قسمت پائینی غشا انجام می‌شود. سلول‌های چسبیده به قسمت پائینی غشا با متانول فیکس شده و بارنگ کریستال ویوله رنگ‌آمیزی و شمارش می‌شوند. جنس membrane insert فیلترهایی پلی‌کربناتی یا پلی‌استری است. جهت سنجش مهاجرت سلولی membrane insert به‌تنهایی استفاده می‌شود ولی در سنجش تهاجم سلولی membrane insert با ماتریژل پوشانده می‌شود. جنس ماتریژل کلاژن تیپ IV است که ماده‌ی اصلی تشکیل‌دهنده‌ی ماتریکس خارج سلولی است. درنتیجه سلول‌هایی که به سمت پائین غشا منتقل می‌شوند توانایی تولید آنزیم‌های تخریب‌کننده‌ی ماتریکس خارج سلولی را دارند. قبل از اضافه کردن سوسپانسیون سلولی به قسمت بالایی غشا، سلول‌ها به مدت 24h در محیط کشت بدون FBS نگهداری

[Downloaded from jabs.fums.ac.ir on 2025-06-06]
[DOR: 20.1001.1.22285105.2019.8.4.1.7]

می‌شوند تا به مرحله‌ی گرسنگی (Starve) برسند. به قسمت پائینی غشا سوپ سلولی 3T3 به‌عنوان ماده جاذب شیمیایی (Chemo attractant) اضافه می‌شود. بعد از انکوباسیون در یک مدت‌زمان مشخص در انکوباتور حاوی CO_2٪ ۵ و دمای ۳۷ ^{o}C مهاجرت و تهاجم سلولی موردبررسی قرار می‌گیرد. لازم به ذکر است که اندازه‌ی سوراخ‌های (pores) روی فیلترها متفاوت است که بستگی به نوع سلول دارد. اندازه این فیلترها می‌تواند ۱۲µM، ۱۰ µM، ۸ µM، ۵ µM و ۳ µM باشد (۳۰). (شکل ۱) از سلول‌ها بخصوص درزمانی که توزیع و رنگ‌آمیزی یکنواخت نباشد، اشاره کرد (۳۰).

۲) سنجش زخم خراش یافته (Scratch wound assays)

در این روش، سلول‌ها در ظروف چند چاهکی (Multi well assay plate) کشت داده می‌شوند به این سلول‌ها اجازه داده می‌شود تا به کف چاهک بچسبند و یک ردیف لایه‌ی سلولی یکنواخت (confluent mono layer) را به وجود آورند. سپس از یک وسیله‌ی برنده مانند نیدل جهت ایجاد خراش و برداشت



شکل ۱- سنجش برون غشایی، بررسی فعالیت Invasion and migration

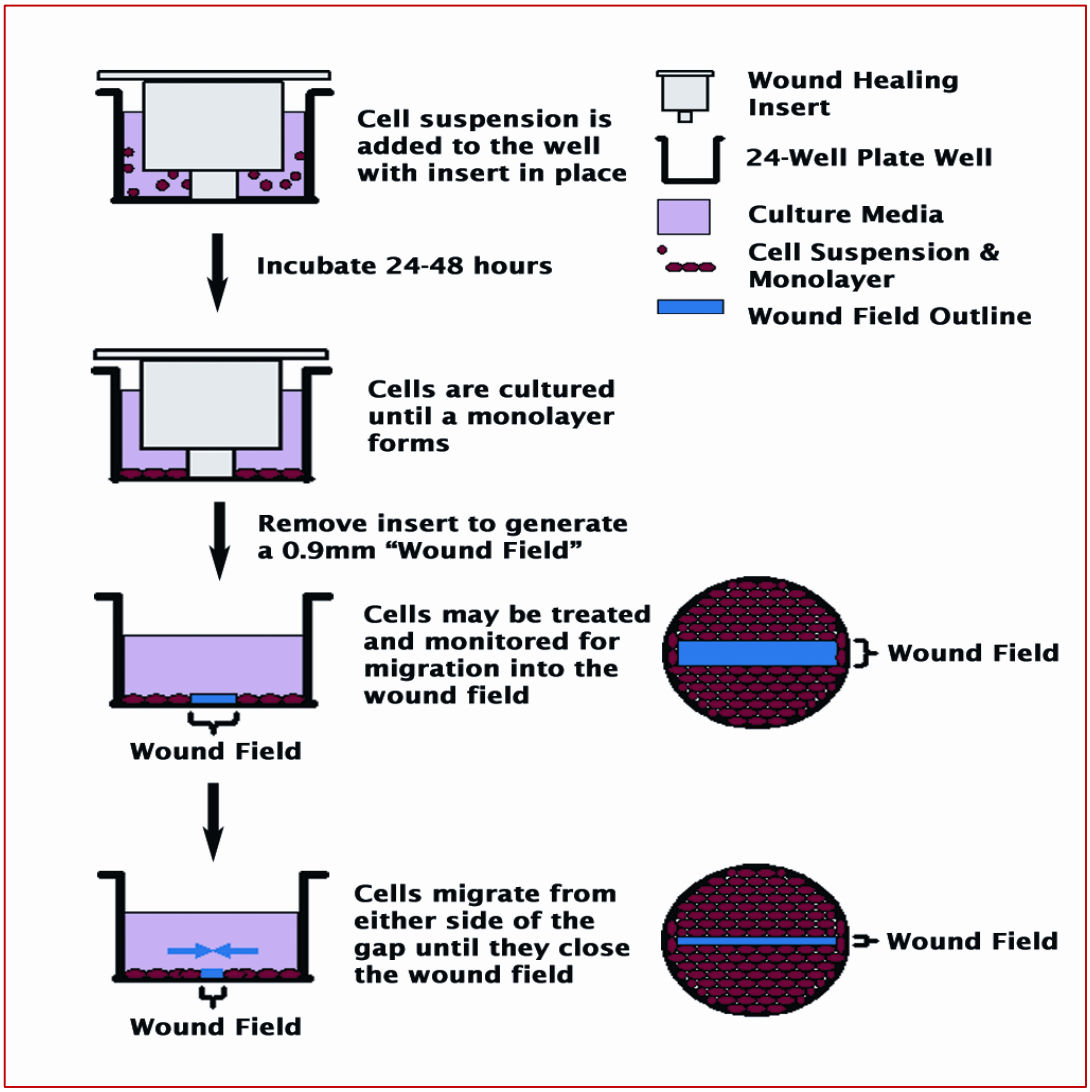
فواید این تکنیک به مواردی مانند سازگاری با سلول‌های چسبنده و غیر چسبنده، استفاده در بررسی مواد کموتاکسی، توانایی پوشاندن سطح فیلتر با هر ماتریکس خارج سلولی، جابجایی سلول‌ها در یک مسیر مشخص می‌توان اشاره کرد. از معایب این تکنیک نیز می‌توان به نیاز به چندین مرحله set up، مشکل در بررسی سلول‌ها و مشاهده مرفولوژی و شمارش سلول‌ها استفاده می‌شود و پس‌ازآن ترکیبات موردنظر به‌عنوان کاندیداهای درمانی اضافه می‌شوند و در فواصل زمانی منظم از حرکت سلول‌ها عکس گرفته می‌شود. به‌عنوان اهداف درمانی می‌توانیم داروهای تحریک‌کننده رشد و مهاجرت سلولی و یا داروهای مهارکننده‌ی تحرک سلولی استفاده کنیم. درنهایت سلول‌ها به سمت داخل مهاجرت نموده و فضاهای خالی را پر

[Downloaded from jabs.fums.ac.ir on 2025-06-06]
[DOR: 20.1001.1.22285105.2019.8.4.1.7]

می‌کنند. حرکت سلول‌ها می‌تواند از چندین ساعت تا چندین روز طول بکشد که بستگی به نوع سلول، شرایط محیطی و سطح خراشی که ایجادشده است، دارد.

از فواید این تکنیک می‌توان به مواردی ازجمله جابجایی سلول‌ها در یک مسیر مشخص، توانایی پوشاندن سطح فیلتر با هر ماتریکس خارج سلولی، توانایی مشاهده‌ی جابجایی و مرفولوژی سلول‌ها در طول آزمایش اشاره کرد. معایب این تکنیک نیز شامل مواردی ازجمله، متفاوت بودن روش‌های ایجاد خراش در آزمایشگاه‌های مختلف که می‌تواند منجر به تفاوت در اندازه، شکل و فضای خراش‌های ایجادشده در آزمایشگاه‌های متفاوت شود، حصول اطمینان از این‌که آیا گروه سلول‌های مورد درمان و گروه کنترل در یک درجه از هم‌ردیفی (Confluency) وجود دارند مشکل است. خراش می‌تواند به ماتریکس خارج سلولی زیرین آسیب بزند. نتایج به دلیل آزاد شدن فاکتورهایی از سلول‌های آسیب‌دیده می‌تواند تغییر کند و هم‌چنین این روش برای سلول‌های غیر چسبنده و مواد کموتاکسی مناسب نیست (۳۱).

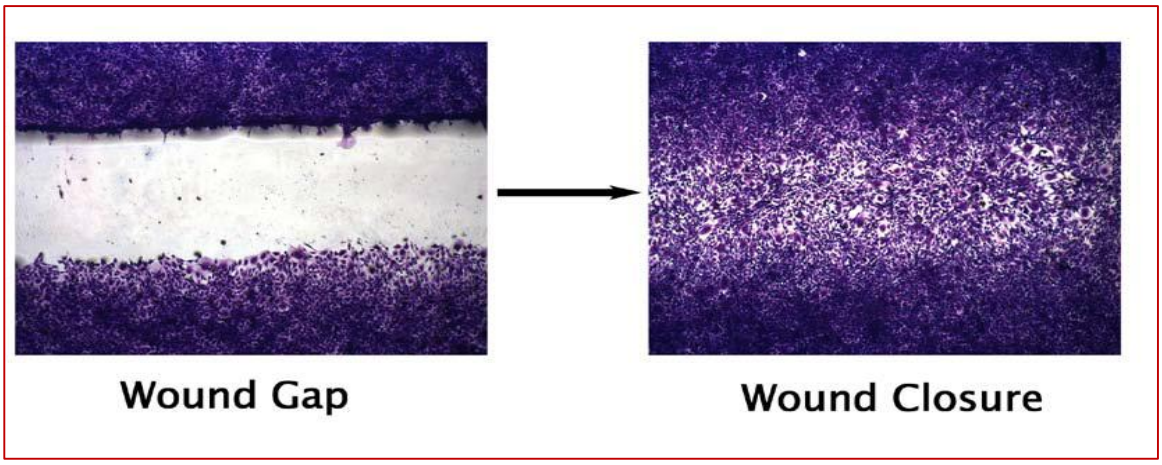
جهت برطرف شدن مشکلات و معایب این تکنیک، شرکت‌های تجاری کیت‌هایی را تهیه‌کرده‌اند، یکی از این کیت‌ها Cyto select Tm 24 well wound healing assay kit است. در این کیت از درج‌هایی (insert) استفاده می‌شود که برای اکثریت سلول‌ها و شرایط آزمایشگاهی مناسب است. درج‌ها، خراش‌هایی با یک فضای مشخص به‌اندازه 0.9mm ایجاد می‌کند که برای اندازه‌گیری قدرت تهاجم و مهاجرت سلولی مناسب است (۲۹, ۳۰). (شکل ۲ و ۳)



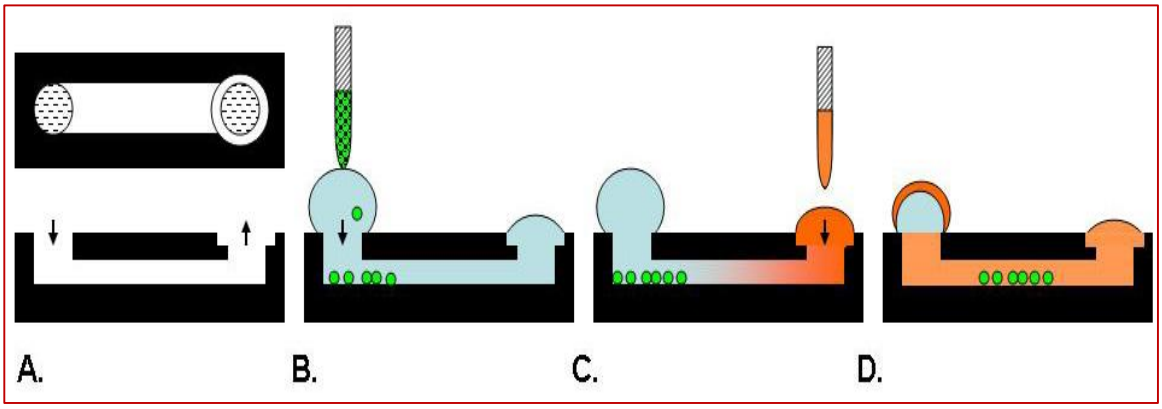
شکل ۲- نمای شماتیک از کیت تجاری Cyto select Tm 24 well wound healing assay kit

[Downloaded from jabs.fums.ac.ir on 2025-06-06]

[DOR: 20.1001.1.22285105.2019.8.4.1.7]



شکل ۳- نمای شماتیک از زخم خراش یافته



شکل ۴- سنجش با استفاده از اتاقک‌های ریز مایع

۳) سنجش با استفاده از اتاقک‌های ریز مایع (Micro fluidic chamber assays)

از این تکنیک جهت بررسی مهاجرت سلول‌های توموری در طول ماتریکس سه‌بعدی استفاده می‌شود. در این تکنیک از وسیله‌ای استفاده می‌شود که شامل دو قسمت برای ورود مواد است، سپس سلول‌ها به‌تنهایی یا درون یک ماتریکس از قسمت کوچک‌تر وارد وسیله می‌شوند و به کف اتاقک می‌چسبند. مواد مورد آزمایش از سمت قسمت بزرگ‌تر وارد و یک شیب غلظت درروی سطوح ایجاد می‌شود سپس سلول‌ها در جهت شیب غلظت به سمت مواد مورد آزمایش مهاجرت و در هرلحظه عکس‌برداری می‌شود (شکل ۴).

از فواید این تکنیک می‌توان به مواردی مانند، پر شدن اتاقک‌ها با ماتریکس خارج سلولی مناسب، نیاز به تعداد کمی سلول و میزان کمی از مواد معرف، سازگاری با سلول‌های چسبنده و غیر چسبنده، توانایی مشاهده جابجایی و مرفولوژی سلول‌ها در طول آزمایش، مشخص بودن مسیر جابجایی سلول‌ها اشاره کرد. معایب این تکنیک نیز شامل مواردی مانند، مشکلات تکنیکی در راه‌اندازی آن، بروز تبخیر، لزوم خارج کردن روزانه محیط کشت و ممانعت کننده‌ها و درنتیجه آن نیاز به نیروی کار بیشتر در این تکنیک است (۲۸، ۲۹، ۳۲).

۴) سنجش ناحیه‌ی منحصربه‌فرد (Exclusion Zone assays)

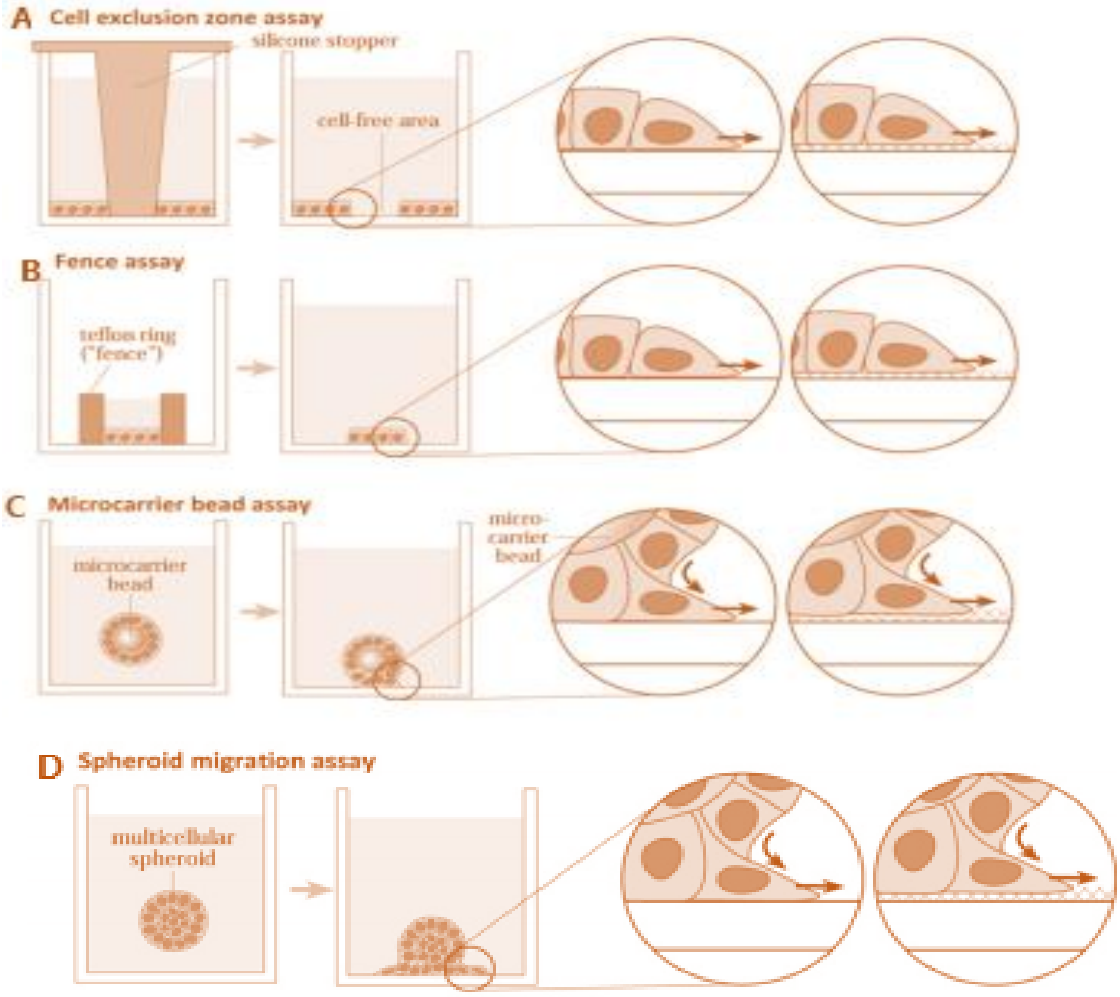
این تکنیک می‌تواند برآورد دقیقی از مهاجرت سلول‌ها و امکان ارزیابی آن‌ها را از طریق مشاهده سلول‌ها فراهم آورد. مشابه تست‌های خراش و آزمایش‌های میکرو فلوئیدیک، Exclusion Zone assays یک روش مهاجرت سلولی دوبعدی است که با استفاده از یک مانع از جذب سلول‌های کشت جلوگیری می‌کند. بعد از کشت کردن پروتئین‌های ECM، مانع در موقعیت قرار

[Downloaded from jabs.fums.ac.ir on 2025-06-06]
[DOR: 20.1001.1.22285105.2019.8.4.1.7]

می‌گیرد و سلول‌ها کشت می‌شود. هنگامی‌که سلول‌ها یکدست می‌شوند، مانع برداشته می‌شود و حرکت سلولی حاصل مشاهده می‌شود (۳۳).

در این روش، موانع کوچکی از جنس سیلیکون طراحی شده است که می‌توانند در هر چاهک یک پلیت ۹۶ چاهکی قرار گیرند. این موانع قبل از کشت سلول‌ها قرارگرفته و یک منطقه ممنوعه با نوک خود ایجاد می‌کنند. پس‌ازاینکه سلول‌ها به‌طور کامل یکنواخت شدند، موانع برداشته می‌شوند و ناحیه‌ای به قطر ۲ میلی‌متر بدون سلول ایجاد می‌شود که سلول‌ها پس‌ازآن می‌توانند به آن ناحیه مهاجرت کنند. سپس، پس از رنگ‌آمیزی مناسب بارنگ‌های فلورسنت و بررسی میکروسکوپی آن، میزان مهاجرت به‌وسیله شمارش سلول‌هایی که به منطقه بدون سلول‌های دایره‌ای مهاجرت کرده‌اند، تعیین می‌شود (۳۴).

در حال حاضر، روش Exclusion Zone assays تنها روشی است که اجازه بررسی اثرات پروتئین ECM درحرکت سلولی را می‌دهد و دارای مزایای متفاوتی ازجمله، توانایی ارائه داده‌های قوی و قابل بازیابی مربوط به مورفولوژی، فاصله، سرعت و جهت مهاجرت سلول‌ها را فراهم کند. علاوه بر این، هیچ آسیبی به سلول‌ها از تخریب مکانیکی یا بریدن الکتریکی وارد نمی‌شود (۳۵) (شکل ۵).



شکل ۵- نمای شماتیک از تکنیک‌های cell exclusion zone assay،Fence assay، micro carrier bead assay ، Spheroid migration assay

۵) Fence assay (Ring assay)

اساس این آزمایش معکوس روش Exclusion Zone assays است. در آزمایش Fence assay سلول‌ها در حلقه قابل جابجایی که بر روی پلیت کشت سلول استاندارد قرار دارد، وارد می‌شوند. سلول‌ها تنها می‌توانند در بخش داخلی حلقه وصل شوند. پس از اتصال سلول‌ها، حلقه برداشته می‌شود و به سلول‌ها اجازه

[Downloaded from jabs.fums.ac.ir on 2025-06-06]
[DOR: 20.1001.1.22285105.2019.8.4.1.7]

می‌دهند از ناحیه دایره‌ای به خارج آن منتقل شوند. مهاجرت سلولی تحت نظارت قرار می‌گیرد و سرعت حرکت سلول‌های در هنگام حرکت به قسمت جدید با میکروسکوپ اندازه‌گیری می‌شود (۳۶). این روش از روش‌های راحت و اتوماتیک برای مطالعه مهاجرت سلولی است که مزایای متفاوتی مانند استریل نگه‌داشتن کشت سلول به مدت طولانی و اجازه مطالعه مهاجرت سلولی به یک ماتریکس مشخص را می‌دهد. همچنین این روش به دستگاه‌های گران‌قیمت نیاز ندارد و برای آزمایشگاه‌های بزرگ و کوچک یکسان است (۳۵).

۶) Micro carrier bead assay

این آزمایش، تحرک سلولی را بر اساس مهاجرت سلول‌ها از دانه‌های حامل به سطوح عروق کشت سلولی 2D اندازه‌گیری می‌کند، بنابراین دانه‌های حامل (به‌عنوان‌مثال دانه‌های Dextran DEAE؛ دانه‌های Cytodex) با سلول‌ها پوشیده می‌شوند. این سلول‌ها می‌توانند رشد کنند تا سطح دانه‌ها را بپوشانند. هنگامی‌که واکنش تکمیل می‌شود، دانه‌های پوشیده شده با سلول بر روی ظروف کشت سلولی برای مدت مشخص قرار می‌گیرند، سپس دانه‌ها توسط مکش حذف می‌شوند و سلول‌هایی که از دانه‌های حامل به سطح مخزن کشت منتقل‌شده‌اند، ثابت و رنگ‌آمیزی می‌شوند. این سلول‌های رنگ‌شده را می‌توان با میکروسکوپ شناسایی و ارزیابی کرد (۳۷). قطعاً، مهاجرت سلولی در این آزمون می‌تواند به‌راحتی توسط میکروسکوپ زنده سلولی بدون فیکساسیون و رنگ‌آمیزی سلول‌ها نظارت شود. از مزایای این روش این است که سلول‌ها بر روی دانه‌ها می‌توانند اتصالات سلولی را ایجاد کنند و شرایطی مشابه سلول‌ها در بافت را ایجاد کند. از جهت دیگر از معایب این روش این است که در این روش همیشه دانه‌هایی وجود دارد که سلول‌ها آن را پوشش نمی‌دهند یا به‌اندازه کافی پوشیده نیستند. این دانه‌ها باید شناسایی شوند و برای تجزیه‌وتحلیل استفاده نشوند. یکی دیگر از نقاط ضعف این روش این است که دانه‌های Cytodex نسبتاً گران هستند (۳۵).

۷) Sopheroid migration assay

این آزمایش با قرار دادن اسفروئیدهای سلول‌های تومور نوع خاصی بر روی یک ظرف کشت سلولی معمولی انجام می‌شود. اساس آزمایش مشابه به آزمون تست میکرو حامل‌های فوق است. پس از چسبیدن اسفروئید به سطح پلاستیکی، سلول‌ها شروع به مهاجرت می‌کنند و زمینه اتصال به‌طور محسوسی افزایش می‌یابد، همان‌طور که سلول‌ها حرکت می‌کنند می‌توان حرکت آن‌ها را در طول زمان با میکروسکوپ اندازه‌گیری کرد. یک مزیت عمده این روش در مقایسه با آزمایش‌های توصیف‌شده در فوق این است که ساختار 3D اسفروئید، مورفولوژی فیزیولوژیکی شبیه بافت را ایجاد می‌کند (۳۸).

تهاجم و مهاجرت سلولی در مدل حیوانی

بررسی تهاجم و مهاجرت سلول‌های سرطانی در محیط آزمایشگاه (In-vitro) محدودیت‌های خاصی دارد که باعث از دست دادن فرآیندهای مهمی می‌شود که در بدن (In-vivo) در هنگام متاستاز و آنژیوژنزیس روی می‌دهد. رویان جوجه (Chick embryo) مدل مناسبی برای مطالعه‌ی این فرآیندها در داخل بدن است. بررسی این فرآیندها با در دست داشتن غشای کوریوآلانتویک (یک بافت پر از عروق خونی که اطراف رویان را پوشانده است) انجام‌پذیر است. غشای کوریوآلانتوئیک Chorioallantoic membrane (CAM) یک غشای عروقی است که در تخم پرندگان و خزندگان وجود دارد. در پستانداران این ساختار جفت را به وجود می‌آورد (۳۹).

در این روش از چندین رنگ فلورسنت مختلف استفاده می‌شود که هم‌زمان عروق خونی رویان و سلول‌های سرطانی را نشانه‌گذاری می‌کند و درنهایت با عکس‌برداری نتایج، مورد آنالیز قرار می‌گیرد. غشای آلانتویک رویان مدل مناسبی برای سنجش‌های سریع است و ازلحاظ اقتصادی مدل مناسبی برای مطالعه‌ی سلول‌های سرطانی در شرایط فیزیولوژیک فراهم می‌کند (۴۰، ۴۱).

سلول‌های توموری تزریق‌شده درون CAM به درون سلول‌های اپیتلیوم و بافت پیوند مزانشیمال زیر آن تهاجم می‌کنند. این محل پر از عروق خونی فشرده است؛ که بیش از ۸۰٪ سلول‌ها در آن زنده می‌مانند و بعد از یک تا سه روز به‌طور موفقیت‌آمیزی رگ زایی می‌کنند. فرآیند متاستاز منجر به رهایی سلول‌های توموری از بافت‌های پر از عروق خونی به بافت‌های دورتر می‌شود، جایی که در آن سلول‌های توموری گیر می‌افتند و رگ زایی می‌کنند (۴۲).

از فواید مدل CAM به‌عنوان یک مدل حیوانی در فرآیند متاستاز می‌توان به موارد زیر اشاره کرد، نابالغ بودن سیستم ایمنی رویان جوجه به دلیل عدم تکمیل عروق لنفاوی منجر به رشد و تکثیر سلول‌های سرطانی بدون پاسخ ایمنی اختصاصی یا

[Downloaded from jabs.fums.ac.ir on 2025-06-06]
[DOR: 20.1001.1.22285105.2019.8.4.1.7]

غیراختصاصی می‌شود. تغییرات در مرفولوژی سلول‌های سرطانی در رویان جوجه می‌تواند با میکروسکوپ موردبررسی و مشاهده قرار گیرد. برخلاف مدل‌های موشی استاندارد، اکثریت سلول‌های سرطانی بدون آسیب سلولی خاص می‌توانند رشد و تکثیر کنند و زنده بمانند و شروع به رگ زایی (Angiogenesis) کنند (۴۰، ۴۱).

سنجش و فعالیت‌های آنزیم ماتریکس متالوپروتئیناز، اهمیت زیموگرافی

MMP (ماتریکس متالوپروتئینازها)، اندوپپتیدازهایی هستند که توانایی تخریب ماتریکس خارج سلولی را دارند و در فرآیندهای فیزیولوژیکی مختلفی مثل تغییر شکل بافت، رگ زایی و ترمیم بافت نقش دارند (۳۲). عدم تنظیم فعالیت MMP در تعدادی از فرآیندهای پاتولوژیک مثل آرتریت، سکته قلبی، نارسایی مزمن قلب، بیماری‌های انسدادی ریوی، التهاب و متاستاز سرطان نقش دارد. MMP به‌عنوان هدف دارویی در درمان بیماری‌های فوق استفاده می‌شود. روش‌های مختلفی جهت سنجش فعالیت آنزیم‌های MMP در نمونه‌های بیولوژیک وجود دارد (۳۲، ۴۳).

۱) In situ Zymography

زیموگرافی پروتئین یکی از روش‌های رایج برای مطالعه فعالیت آنزیمی ماتریکس متالوپروتئیناز (MMPs) و مهارکننده‌های آن است (۴۴). یک تکنیک نسبتاً ارزان است که جهت شناسایی و بررسی موقعیت پروتئازهای اختصاصی در برش بافت‌های مختلف است. In situ Zymography، جزئیات از بافت را حفظ می‌کند و می‌تواند باعث تکمیل مطالعهٔ آنزیم با سایر تکنیک‌های میکروسکوپی، مانند ایمونوسیتوشیمی شود (۴۵). به‌طور خلاصه در این تکنیک سوبستراهای اختصاصی برای پروتئازهای خاص در سطح برش‌هایی از بافت قرار می‌گیرند. بعد از مدت‌زمان نگهداری، سوبسترا تجزیه خواهد شد که تجزیه شدن بستگی به دو فاکتور زمان و میزان فعالیت آنزیم در آن محل از بافت اختصاصی دارد. با استفاده از میکروسکوپ نوری یا فلورسنت بسته به نوع سوبسترا، میزان تجزیه شدن را بررسی می‌کنیم و با این تکنیک موقعیت آنزیم‌های پروتئاز را در برش بافت‌ها مشخص می‌کنیم. فواید این روش ارزان‌قیمت بودن و مشخص کردن موقعیت آنزیم‌های MMP و معایب آن حساسیت رنگ‌آمیزی کم و عدم بررسی آنزیم ازنظر کمی است (۲۹، ۳۲).

۲) ELISA

ـ به‌طور گسترده برای شناسایی MMPهای انسانی مورداستفاده قرار می‌گیرد. یونگ و همکاران به‌منظور بررسی خطاهای موجود در استفاده از خون، اندازه‌گیری MMP-9، TIMP-1 و TIMP-2 را در خون موردمطالعه قرار دادند. نتایج نشان داد که سرم نمی‌تواند یک نمونه مناسب برای تعیین گردش MMP9 و TIMP-1 باشد و همچنین هپارین منجر به ایجاد اختلال در اندازه‌گیری TIMP-2 می‌شود. به‌منظور جلوگیری از خطا در تجزیه‌وتحلیل، پلاسمای سیتراته به‌عنوان نمونه انتخابی برای اندازه‌گیری انتشار MMP-2 و MMP-9 پیشنهاد شده است (۴۶، ۴۷). از فواید این روش می‌توان نیاز به مقدار کم نمونه را اشاره نمود و معایب آن نیز شامل عدم توانایی شناسایی کمپلکس یا دایمرهای MMP با توجه به این‌که دایمرهای MMP نقش روبه رشدی در ارتباط با بیماری‌های MMP دارند، فعالیت آنزیم را نمی‌توان اندازه گرفت اما مقدار کمی از آنزیم را می‌توان اندازه گرفت.

۳) FRET based measurement of MMP activity

برای ارزیابی فعالیت آنزیم MMP از پپتیدهای سنتز شده کوتاهی (Short synthetic peptide) استفاده می‌شود. در یک سمت پپتید مواد فلورسنتی متصل شده است و در سمت دیگر مواد خاموش‌کننده (quencher) متصل است. وقتی‌که پپتید درنتیجه‌ی فعالیت آنزیم MMP برش داده می‌شود این گروه‌ها از هم جدا می‌شوند و درنتیجه سیگنال فلورسنت به‌طور مشخصی افزایش می‌یابد.

فواید این روش این است که یک روش نسبتاً ساده و مناسب برای پیگیری فعالیت اکثر آنزیم‌های MMP است و همچنین سنجش جهت غربالگری کلی می‌تواند مورداستفاده قرار گیرد. از معایب این روش این است که توالی پپتید می‌تواند متفاوت از توالی سوبسترای طبیعی باشد و همچنین درجنت‌ها می‌توانند روی نتیجه‌ی تست غربالگری تأثیرات منفی بگذارند اما باوجوداین عیوب، این روش به‌طور گسترده جهت غربالگری اولیه برای مشخص کردن عوامل مهارکننده‌ی MMP استفاده می‌شود. جهت تشخیص فعالیت آنزیم‌های MMP، واکنش آنزیمی درون چاهک‌های میکروپلیت انجام می‌شود. به‌منظور کاهش حداقلی واکنش بین آنزیم و سطح پلاستیکی آب‌گریز چاهک، درجنت‌ها به بافر واکنش‌دهنده اضافه می‌شوند که جهت جلوگیری از اتصال

[Downloaded from jabs.fums.ac.ir on 2025-06-06]
[DOR: 20.1001.1.22285105.2019.8.4.1.7]

غیراختصاصی به سطوح پلاستیکی است. یکی از بهترین دترجنت‌ها Brj-35 است (۲۹، ۴۸).

۴) Substrate Zymography

یکی از تکنیک‌هایی است که به‌طور گسترده جهت شناسایی فعالیت آنزیم MMP استفاده می‌شود. این تکنیک، تکنیکی الکتروفورتیک بر پایه‌ی SDS –Page است که حاوی سوبسترای آنزیم می‌باشد که درون ژل پلی آکریل آمید پلیمریزه شده است. در این تکنیک آنزیم‌های MMP بر پایهٔ وزن مولکولی جدا می‌شوند. آنزیم‌های MMP مختلف می‌توانند بسته به نوع سوبسترا با زیموگرافی مشخص شوند. شایع‌ترین سوبسترایی که برای سنجش فعالیت MMP2 و MMP9 استفاده می‌شود ژلاتین می‌باشد. حداقل مقدار برای شناسایی آنزیم MMP2 در ژلاتین زیموگرافی، 10pg می‌باشد. کازوئین زیموگرافی برای شناسایی آنزیم‌های MMP7، MMP1، MMP12، MMP13 استفاده می‌شود و کلاژن زیموگرافی برای شناسایی فعالیت آنزیم‌های MMP1، MMP13 استفاده می‌شود (۴۹، ۵۰).

ـ تعدادی از MMPها مانند MMP1، پروکلاژناز ۳، MMP13 قبل از الکتروفورز بایستی آماده شوند. آمینوفنیل مرکوریک استات (APMA) یا اندوپپتیدازهایی مثل تریپسین می‌توانند جهت فعال‌سازی این آنزیم‌ها استفاده شود (۲۹، ۴۸).

بحث و نتیجه‌گیری

در این مقاله روش‌های متعددی برای مطالعه مهاجرت سلولی ارائه شده است و هر روش مزایا و معایب خود را دارد. انتخاب یک روش مناسب بسیار مهم می‌باشد و باید سه مورد اصلی باشد در نظر گرفته شود. ۱) نوع سلول مورداستفاده در آزمایش ۲) ویژگی و کاربرد یک روش شناسایی مهاجرت سلولی خاص ۳) هدف آزمایش. تشخیص مهاجرت سلول در in-vitro برای کشف مکانیسم مولکولی که مهاجرت سلول را تنظیم می‌کند، ارزشمند است و همچنین می‌تواند مرجعی برای مطالعه in-vivo ارائه دهد. در حال حاضر روش Scratch wound assays یکی از پرکاربردترین روش‌های مورداستفاده در بررسی مهاجرت انواع مختلفی از سلول‌ها و نیز در شرایط متفاوت می‌باشد، بااین‌وجود، این روش و همچنین اکثر روش‌های فعلی مهاجرت سلولی را در in-vitro در سطح دوبعدی 2D شناسایی می‌کنند که نمی‌تواند شرایط فیزیولوژیکی in-vivo را تقلید کند و درنتیجه وضعیت واقعی مهاجرت سلول را به‌خوبی نشان نمی‌دهد. چالش اصلی که محققان با آن مواجه هستند، ایجاد یک شرایط سه‌بعدی 3D مشابه شرایط in- vivo است. به‌تازگی، تشخیص روش‌های مهاجرت سه‌بعدی 3D، توجه بیشتری به خود جلب کرده‌اند و در حال تبدیل‌شدن به یک‌روند اصلی در تعیین مهاجرت سلولی و مکانیسم آن در محیط in-vitro می‌باشد. روش Microfluidic می‌تواند یک ساختار پیچیده در مقیاس میکرو را فراهم کند و به محققان اجازه می‌دهد پارامترهای لازم برای تقلید شرایط in-vivo را کنترل کنند. درنتیجه، در این مقاله روش‌های تشخیص مهاجرت سلولی باهدف ارائه‌ی مرجع به محققان با تحلیل مزایا و محدودیت‌های هر روش بر اساس کاربرد آن‌ها خلاصه شده است.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله مراتب تشکر و قدردانی از حمایت‌های گروه علوم آزمایشگاهی و مرکز تحقیقات علوم و فناوری تشخیص آزمایشگاهی دانشکده پیراپزشکی شیراز اعلام می‌شود.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ‌گونه تعارض منافعی را اعلام نکرده اند.

References

1. Seyfried TN, Huysentruyt LC. On the origin of cancer metastasis. Critical reviews in oncogenesis. 2013;18(1-2):43.
2. Weber GF. Why does cancer therapy lack effective anti-metastasis drugs? Cancer letters. 2013;328(2):207-11.
3. Nishida N, Yano H, Nishida T, Kamura T, Kojiro M. Angiogenesis in cancer. Vascular health and risk management. 2006;2(3):213.
4. Yamazaki D, Kurisu S, Takenawa T. Regulation of cancer cell motility through actin reorganization. Cancer science. 2005;96(7):379-86.

[Downloaded from jabs.fums.ac.ir on 2025-06-06]
[DOR: 20.1001.1.22285105.2019.8.4.1.7]

5. Alizadeh AM ,Shiri S, Farsinejad S. Metastasis review: from bench to bedside. Tumor biology. 2014;35(9):8483-523.
6. Özbek S, Balasubramanian PG, Chiquet-Ehrismann R, Tucker RP, Adams JC. The evolution of extracellular matrix. Molecular biology of the cell. 2010;21(24):4300-05
7. Lu P, Weaver VM, Werb Z. The extracellular matrix: a dynamic niche in cancer progression. J Cell Biol. 2012;196(4):395-406.
8. Ray J, Stetler-Stevenson W. The role of matrix metalloproteases and their inhibitors in tumour invasion, metastasis and angiogenesis. European Respiratory Journal. 1994;7(11):2062-72.
9. Woessner Jr JF. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. The FASEB Journal. 1991;5(8):2145-54.
10. Kuo WH, Yang SF, Chu SC, Lu SO, Chou FP, Hsieh YS. Differential inductions of matrix metalloproteinase-2 and -9 in host tissues during the growth of ascitic sarcoma 180 cells in mice. Cancer letters. 2003;189(1):103-12.
11. Cheung LW, Leung PC, Wong AS. Gonadotropin-releasing hormone promotes ovarian cancer cell invasiveness through c-Jun NH2-terminal kinase-mediated activation of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9. Cancer research. 2006;66(22):10902-10.
12. Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. Nature Reviews Cancer. 2002;2(3):161.
13. Borkakoti N. Matrix metalloprotease inhibitors: design from structure. Biochemical Society transactions. 2004;32(Pt 1):17-20.
14. Overall CM, López-Otín C. Strategies for MMP inhibition in cancer: innovations for the post-trial era. Nature Reviews Cancer. 2002;2(9):657.
15. Rundhaug JE. Matrix Metalloproteinases, Angiogenesis, and Cancer: Commentary re: AC Lockhart et al. Reduction of Wound Angiogenesis in Patients Treated with BMS-275291, a Broad Spectrum Matrix Metalloproteinase Inhibitor. Clin. Cancer Res. 9: 00–00, 2003. Clinical Cancer Research. 2003;9(2):551-4.
16. Folgueras AR, Pendas AM, Sanchez LM, Lopez-Otin C. Matrix metalloproteinases in cancer: from new functions to improved inhibition strategies. The International journal of developmental biology. 2004;48(5-6):411-24.
17. Zucker S, Cao J, Chen WT. Critical appraisal of the use of matrix metalloproteinase inhibitors in cancer treatment. Oncogene. 2000;19(56):6642-50.
18. Folgueras AR, Valdes-Sanchez T, Llano E, Menendez L, Baamonde A, Denlinger BL, et al. Metalloproteinase MT5-MMP is an essential modulator of neuro-immune interactions in thermal pain stimulation. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.2009;106(38):16451-6
19. Jedeszko C, Sloane BF. Cysteine cathepsins in human cancer. Biological chemistry. 2004;385(11):1017-27.
20. Gocheva V, Joyce JA. Cysteine cathepsins and the cutting edge of cancer invasion. Cell cycle. 2007;6(1):60-4.
21. Herszènyi L, Plebani M, Carraro P, De Paoli M, Roveroni G, Cardin R, et al. The role of cysteine and serine proteases in colorectal carcinoma. Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society. 1999;86(7):1135-42.
22. Rakash S, Rana F, Rafiq S, Masood A, Amin S. Role of proteases in cancer: A review. Biotechnology and Molecular Biology Reviews. 2012;7(4):90-101.
23. Turk V, Bode W. The cystatins: protein inhibitors of cysteine proteinases. FEBS letters. 1991;285(2):213-9.
24. Schuliga M, Langenbach S, Xia YC, Qin C, Mok JS, Harris T, et al. Plasminogen-Stimulated Inflammatory Cytokine Production by Airway Smooth Muscle Cells is Regulated by Annexin A2. American journal of respiratory cell and molecular biology. 2013;49(5):751-8
25. Murphy G, Atkinson S, Ward R, Gavrilovic J, Reynolds JJ. The Role of Plasmhogen Activators in the Regulation of Connective Tissue Metalloproteinases a. Annals of the New York Academy of Sciences. 1992;667(1):1-12.
26. Thummarati P, Wijitburaphat S, Prasopthum A, Menakongka A, Sripa B, Tohtong R, et al. High level of urokinase plasminogen activator contributes to cholangiocarcinoma invasion and metastasis. World journal of gastroenterology: WJG. 2012;18(3):244-50.
27. Thapa B, Kim YH, Kwon HJ, Kim DS. Novel regulatory mechanism and functional implication of plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) expression in CpG-ODN-stimulated macrophages. Molecular immunology. 2012;49(4):572-81.
28. Albini A, Benelli R, Noonan DM, Brigati C. The "chemoinvasion assay": a tool to study tumor and endothelial cell invasion of basement membranes. The International journal of developmental biology. 2004;48(5-6):563-71.
29. De Wever O, Hendrix A, De Boeck A, Westbroek W, Braems G, Emami S, et al. Modeling and quantification of cancer cell invasion through collagen type I matrices. The International journal of developmental biology. 2010;54(5):887-96.
30. Hulkower KI, Herber RL. Cell Migration and Invasion Assays as Tools for Drug Discovery. 2011;3(1):107-24
31. Cory G. Scratch-wound assay.2011;769:25-30
32. Kupai K, Szucs G, Cseh S, Hajdu I, Csonka C, Csont T, et al. Matrix metalloproteinase activity assays: Importance of zymography. Journal of pharmacological and toxicological methods. 2010;61(2):205-9.
33. Gough W, Hulkower KI, Lynch R, Mcglynn P, Uhlik M, Yan L, et al. A quantitative, facile, and high-throughput image-based cell migration method is a robust

[Downloaded from jabs.fums.ac.ir on 2025-06-06]
[DOR: 20.1001.1.22285105.2019.8.4.1.7]

alternative to the scratch assay .Journal of biomolecular screening. 2011;16(2):155-63.
34. Vogt A. Advances in two-dimensional cell migration assay technologies.2010;5:26-9.
35. Kramer N, Walzl A, Unger C, Rosner M, Krupitza G, Hengstschläger M, et al. In vitro cell migration and invasion assays. Mutation Research/Reviews in Mutation Research. 2013;752(1):10-24.
36. Cai G, Lian J, Shapiro SS, Beacham DA. Evaluation of endothelial cell migration with a novel in vitro assay system. Methods in cell science. 2000;22(2-3):107-114
37. RosEN EM, Meromsky L, Setter E, Vinter DW, Goldberg ID. Quantitation of cytokine-stimulated migration of endothelium and epithelium by a new assay using microcarrier beads. Experimental cell research. 1990;186(1):22-31.
38. Vinci M, Gowan S, Boxall F, Patterson L, Zimmermann M, Lomas C, et al. Advances in establishment and analysis of three-dimensional tumor spheroid-based functional assays for target validation and drug evaluation. BMC biology. 2012;10(1):29.
39. Lokman NA, Elder AS, Ricciardelli C, Oehler MK. Chick chorioallantoic membrane (CAM) assay as an in vivo model to study the effect of newly identified molecules on ovarian cancer invasion and metastasis. International journal of molecular sciences. 2012;13(8):9959-70.
40. Ribatti D. Chick embryo chorioallantoic membrane as a useful tool to study angiogenesis. International review of cell and molecular biology. 2008;270:181-224.
41. Deryugina EI, Quigley JP. Chick embryo chorioallantoic membrane model systems to study and visualize human tumor cell metastasis. Histochemistry and cell biology. 2008;130(6):1119-30.
42. Deryugina EI, Quigley JP. Chick embryo chorioallantoic membrane model systems to study and visualize human tumor cell metastasis. Histochemistry and cell biology. 2008;130(6):1119-30
43. Hildenbrand R, Schaaf A. The urokinase-system in tumor tissue stroma of the breast and breast cancer cell invasion. International journal of oncology. 2009;34(1):15-23.
44. Walia V, Samuels Y. Analysis of Enzymatic Activity of Matrix Metalloproteinase (MMP) by Collagen Zymography in Melanoma. Proteases and Cancer: Springer; 2018. p. 97-106.
45. Galis ZS, Sukhova G, Libby P. Microscopic localization of active proteases by in situ zymography: detection of matrix metalloproteinase activity in vascular tissue. The FASEB journal. 1995;9(10):974-80.
46. Jung K, Gerlach RF, Tanus-Santos JE. Preanalytical pitfalls of blood sampling to measure true circulating matrix metalloproteinase 9 and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases. Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry. 2006;373(1-2):180-1; author reply 2.
47. Lein M, Nowak L, Jung K, Koenig F, Lichtinghagen R, Schnorr D, et al. Analytical aspects regarding the measurement of metalloproteinases and their inhibitors in blood. Clinical biochemistry. 1997;30(6):491-6.
48. Adanja I, Debeir O, Megalizzi V, Kiss R, Warzee N, Decaestecker C. Automated tracking of unmarked cells migrating in three-dimensional matrices applied to anti-cancer drug screening. Experimental cell research. 2010;316(2):181-93.
49. Ricci S, D'Esposito V, Formisano P, Di Carlo A. Substrate-zymography: a still worthwhile method for gelatinases analysis in biological samples. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM). 2016;54(8):1281-90.
50. Kupai K, Szucs G, Cseh S, Hajdu I, Csonka C, Csont T, et al. Matrix metalloproteinase activity assays: Importance of zymography. Journal of pharmacological and toxicological methods. 2010;61(2):205-9.

[Downloaded from jabs.fums.ac.ir on 2025-06-06]
[DOR: 20.1001.1.22285105.2019.8.4.1.7]

Review Article

New Techniques and Methods in the Study of the Invasion, Cell Migration and MMPs Activity in Vitro and in Animal Models

Golestani A, Abdollahipour Haghighi R, Takhshid MA, Arabsolghar R*

Diagnostic Laboratory Sciences and Technology Research Center, School of Paramedical Sciences, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

Received: 13 Apr 2018 Accepted: 28 Nov 2018

Abstract

Background & Objective: Cancer metastasis is the primary cause of cancer morbidity and mortality, it accounts for about 90% of cancer deaths. Cancer treatment has improved significantly, due to early detection and inhibition of cancer growth.

The ability to invade and migrate is important in malignant tumor cells. The study of cell migration is valuable in cancer diagnosis, prognosis, drug development and treatment. New methods are available to investigate the invasion, migration and the activity of enzymes involved in the invasion process in the laboratory. The effectiveness and efficacy of various anti-cancer drugs and compounds can be studied using these methods in laboratory and animal models.

Conclusion: In this paper, we offer a summary of in-vitro migration assays, including the transwell migration assay, scratch wound assay, microfluidic chamber assay, exclusion zone assay, fence assay, micro carrier bead assay, spheroid migration assay and in-vivo approach, Chick chorioallantoic membrane (CAM) assay.

This review also provides an overview of methods, In situ Zymography, ELISA, and FRET based measurement of MMP activity and Substrate Zymography for measuring the level of metalloproteinase enzyme as the major enzyme in the degradation of extracellular matrix.

Keywords: malignant tumor, matrix metalloproteinase enzyme, cell migration assays

***Corresponding Author: : Arabsolghar Rita,** Diagnostic Laboratory Sciences and Technology Research Center, School of Paramedical Sciences, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran
Email: arabsolghar@sums.ac.ir
https://orcid.org/0000-0003-9725-8005

[Downloaded from jabs.fums.ac.ir on 2025-06-06]

[DOR: 20.1001.1.22285105.2019.8.4.1.7]