

مقایسه حساسیت و ویژگی سیتولوژی و اندازه گیری فعالیت تلومراز در ادرار به روش Trap Assay جهت تشخیص سرطان مثانه

دکتر نصرت الله ضرغامی* ، دکتر بهمن فرشید** ، دکتر سعید صمدزاده*** ، دکتر بهزاد نجمی****
بهرنگ علنی***** ، جمال حلاج زاده*****

دریافت : ۸۴/۴/۸ ، پذیرش : ۸۴/۹/۱۶

چکیده:

مقدمه و هدف: تلومراز یک آنزیم ترانس کریپتازی معکوس است که جهت نامیرایی و سرطانزایی سلولهای سرطانی مورد نیاز می باشد و تشخیص فعالیت تلومراز یک روش امیدوار کننده جهت تشخیص زودرس سرطان مثانه و سایر تومورها می باشد. در این مطالعه حساسیت و ویژگی سیتولوژی ادراری و اندازه گیری فعالیت تلومراز در بیماران مبتلا به سرطان مثانه مقایسه گردید. **روش کار:** در این تحقیق از نوع موردی - شاهدی، تعداد ۳۳ بیمار مبتلا به سرطان مثانه بعنوان گروه مورد و ۳۳ بیمار فاقد سرطان مثانه بعنوان گروه شاهد مراجعه کننده به بخش اورولوژی بیمارستان امام خمینی ارومیه مورد بررسی قرار گرفتند. از همه بیماران دو نمونه اولین ادرار صبحگاهی قبل از انجام هر گونه مداخله درمانی گرفته شد تا جهت انجام سیتولوژی ادراری و اندازه گیری فعالیت تلومراز بر پایه واکنشهای زنجیره ای پلیمرز و الیزا مورد آزمایش قرار گیرند. **نتایج:** حساسیت سیتولوژی ادراری در تومورهای درجه یک ۳۰٪، درجه دو ۸۳٪ و درجه سه ۵۲٪ اندازه گیری شد در حالی که حساسیت اندازه گیری فعالیت آنزیم تلومراز در تومورهای درجه یک ۸۰٪ و در تومورهای با درجه دو و سه ۱۰۰٪ بود. حساسیت کلی سیتولوژی ادراری نیز ۵۱/۵٪ و حساسیت تلومراز ۹۳٪ اندازه گیری شد. همچنین ویژگی تست اندازه گیری آنزیم تلومراز ۸۷/۵٪ محاسبه گردید. فعالیت آنزیم تلومراز و سیتولوژی ادراری در هیچکدام از بیماران فاقد کانسر مثانه مثبت نبود. **نتیجه نهایی:** اندازه گیری فعالیت تلومراز در افراد مبتلا به سرطان مثانه نسبت به سیتولوژی ادراری از حساسیت بالاتری برخوردار بوده و یک روش مناسب جهت تشخیص و پیگیری بیماران مبتلا به سرطان مثانه می باشد.

کلید واژه ها: ادرار - سلول شناسی / تلومراز / سرطان مثانه

مقدمه:

۲/۵٪ تمام سرطانها را شامل می شود(۱).هماچوری شایعترین علامت و نشانه در بیماران مبتلا به سرطان مثانه است. اما یک یافته اختصاصی نبوده و در بسیاری از بیماریهای خوش خیم نیز مشاهده می شود. تشخیص علل بدخیم هماچوری از علل خوش خیم آن بخصوص از طریق

سرطان مثانه چهارمین سرطان شایع در مردان بعد از سرطانهای پروستات، ریه و کولورکتال می باشد و حدود ۶/۲٪ سرطانهای مردان را شامل می شود. در زنان نیز سرطان مثانه هشتمین سرطان شایع بوده و حدود

* دانشیار گروه بیوشیمی بالینی مرکز تحقیقات کاربردی دارویی دانشگاه علوم پزشکی تبریز (Zarghami@tbzmed.ac.ir)

** استادیار گروه ارولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی ارومیه

*** دانشیار گروه ارولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی ارومیه

**** دستیار گروه ارولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی ارومیه

***** مربی پژوهشی مرکز تحقیقات کاربردی دارویی دانشگاه علوم پزشکی تبریز

***** کارشناس ارشد بیوشیمی بالینی مرکز تحقیقات کاربردی دارویی دانشگاه علوم پزشکی تبریز

بعنوان گروه مورد و ۳۳ بیمار فاقد سرطان مثانه بعنوان گروه شاهد که از تیرماه ۸۱ تا تیرماه ۸۲ به بخش اورولوژی بیمارستان امام خمینی ارومیه مراجعه کرده بودند وارد مطالعه شدند. از این افراد دو نمونه اولین ادرار صبحگاهی (۳۰cc) تهیه شد. نمونه‌های ادراری به مدت ۵ دقیقه در ۳۰۰۰g در درجه حرارت ۴ درجه سانتیگراد سانتریفیوژ گردید و برای شستشوی سلولهای ته نشین شده بافر PBS اضافه و سانتریفیوژ مجدداً در همان شرایط تکرار شد. نمونه‌ها در دمای ۷۰- درجه فریز شد تا جهت انجام سیتولوژی ادراری و اندازه‌گیری فعالیت آنزیم تلومراز مورد استفاده قرار گیرند.

تشخیص مثبت بودن سیتولوژی ادراری نمونه‌ها پس از رنگ آمیزی بر روی لام به روش پاپانیکولا و مشاهده وجود سلول‌های سرطانی زیر میکروسکوپ نوری انجام گردید (۱۱). جهت اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم تلومراز از روش TRAP Assay (Telomeric Repeat Amplification Protocol) مبتنی بر دو تکنیک واکنشهای زنجیره ای پلیمرازی و الیزا (کیت شرکت رش آلمان) بر اساس روش هولت استفاده شد (۱۲). در ابتدا پس از جداسازی سلولهای ته نشین شده، جهت استخراج پروتئین، مقدار ۲۰۰ میکرولیتر بافر لیز سلولی (۱۰ میلی مولار Tris-HCl [pH ۸]، یک میلی مولار کلرید منیزیم، ۰/۱ میلی مولار بنزآمیدین، ۵ میلی مولار بتامرکاپتواتانل، ۰/۵ درصد chaps، ۱۰ درصد گلیسرول و ۱ میلی مولار EGTA) اضافه شده و به مدت ۲۰ دقیقه در ۱۵۰۰g سانتریفیوژ شد. فاز رویی به آرامی به اپندورف جدید منتقل شد. مقدار پروتئین استخراجی بر طبق روش برادفورد با استفاده از رنگ آبی کوماس ۲۵۰ و منحنی استاندارد آلومین سرم گاوی تعیین گردید (۱۳).

به منظور بهینه سازی شرایط TRAP-PCR، غلظت واکنش گر برای حجم ۵۰ میکرولیتر شامل ۱۰ میکروگرم نمونه پروتئین استخراجی حاوی آنزیم تلومراز، ۶۰ نانوگرم از آغازگر، dNTP با غلظت ۱۰ میلی مولار، ۵ میکرولیتر استاندارد حاوی نمونه DNA و ۱۶ میکرولیتر آب مقطر دو بار تقطیر استریل تنظیم و آماده شد. لازم به ذکر است که در این واکنش آنزیم تلومراز نقش Taq Polymerase را ایفا میکند. پس از آماده سازی واکنشگرها برنامه

روشهای غیر تهاجمی بسیار مفید می‌باشد (۲). سیتولوژی ادراری شایعترین روش غیر تهاجمی جهت تشخیص و مانیتورینگ سرطان مثانه می‌باشد. محدودیت مهم سیتولوژی ادراری ظاهر نرمال سلولهای تومورال کاملاً تمایز یافته می‌باشد. در ضمن چون سلولهای کاملاً تمایز یافته چسبندگی زیادی دارند به آسانی در ادرار دفع نمی‌شوند بنابراین حساسیت سیتولوژی ادراری در تومورهای درجه پایین کم می‌باشد (۳). سیتولوژی ادراری در تشخیص تومورهای مثانه با درجه بالا یا کارسینوم insitu حساس است با این وجود حتی در مورد تومورهای با درجه بالا نیز سیتولوژی ادراری در حدود ۲۰٪ موارد بصورت کاذب منفی می‌باشد. یک سیتولوژی مثبت حتی در حضور سیستوسکوپی منفی شدیداً مؤید سرطان مثانه می‌باشد اگر چه نتایج مثبت کاذب ممکن است در ۱۲-۱٪ بیماران مشاهده شود که اکثراً ناشی از التهاب، تغییرات ناشی از پرتودرمانی یا شیمی‌درمانی می‌باشد (۴). سیستوسکوپی روش استاندارد طلایی جهت بررسی هم‌چوری از نظر وجود یا عدم وجود کانسر مثانه می‌باشد ولی این روش یک روش مهاجم می‌باشد. روشهای غیر تهاجمی متعددی مانند فلوسیتومتری، آنالیز تصویری، هیالورونیک اسید و هیالورونیداز، آنتی ژنهای توموری مثانه، تلومراز و غیره جهت تشخیص غیر تهاجمی سرطان مثانه مورد مطالعه قرار گرفته است (۵).

یکی از مهم‌ترین آنزیمهایی که در پیشرفت سرطان از اهمیت خاصی برخوردار است آنزیم تلومراز می‌باشد. تلومراز یک ترانس کریپتاز معکوس است که مسئول بسط توالیهای TTAGGG تلومر است در نتیجه کوتاه شدن تلومرها را جبران می‌کند (۶). سلولهای سوماتیک طبیعی انسان دارای فعالیت تلومراز نیستند و این فعالیت تنها در سلولهای بنیادی و سلولهای توموری دیده می‌شود (۷،۸). وجود فعالیت تلومراز باعث ایجاد سلولهای نامیرا و مسئول تکثیر نامحدود سلولهای سرطانی می‌گردد (۹،۱۰). لذا در این تحقیق جهت دستیابی به یک روش غیر تهاجمی با حساسیت و ویژگی بالا در تشخیص سرطان مثانه، اندازه‌گیری فعالیت آنزیم تلومراز و حساسیت سیتولوژی در ادرار بیماران مبتلا به سرطان مثانه مورد بررسی و مقایسه قرار گرفت.

روش کار:

در این مطالعه ۳۳ بیمار مبتلا به سرطان مثانه

جهت تعیین ویژگی هردو تست علاوه بر افراد بیمار تعداد ۳۳ نفر بیمار فاقد سرطان مثانه (۲۵ مرد و ۸ زن) با میانگین سنی ۴۶/۱۳ سال (با محدوده سنی ۳۰-۶۲ سال) نیز انتخاب گردیدند. این بیماران شامل افراد دارای سنگهای کلیوی، التهاب مثانه، ناراحتیهای عفونی دستگاه ادراری و انسداد مجاری ادراری بودند.

سی تی اسکن شکم و لگن با کنتراست وریدی و خوراک و نیز رادیوگرافی سیستکتومی جهت مرحله بندی پاتولوژی سرطان مثانه نشان می داد که ۱۹ نفر در مرحله T1، ۵ نفر T2b، ۲ نفر مرحله T3a و ۷ نفر در مرحله T3b توموری قرار داشتند.

سیتولوژی ادراری تنها در ۸ نفر از ۱۹ نفر با مرحله T1 توموری مثبت بود. فعالیت آنزیم تلومراز تنها در ۲ نفر از این افراد منفی بود. در تومورهای با مرحله T2b سیتولوژی ادراری و فعالیت آنزیم تلومراز در هر ۵ بیمار مثبت بود. در افراد دارای تومورهای با مراحل T3a و T3b فعالیت آنزیم تلومراز به ترتیب در همه ۵ و ۷ نفر از این دو گروه مثبت بود ولی سیتولوژی ادراری به ترتیب یک و سه نفر از دو گروه مثبت بود.

حساسیت سیتولوژی ادراری در تشخیص سرطان مثانه در مرحله T1 برابر ۴۷٪، T2 ۱۰۰٪ و T3a ۵۰٪ و مرحله T3b برابر ۴۳٪ گردید در حالیکه حساسیت تلومراز در تشخیص سرطان مثانه در مرحله T1 ۸۹٪ و در سایر مراحل ۱۰۰٪ بود. میانگین فعالیت نسبی تلومراز در تومورهای مرحله T1 برابر 10.68 ± 4 ، در مرحله T2 برابر $23/8 \pm 6/3$ ، در مرحله T3a حدود $25/5 \pm 7/4$ و در مرحله T3b $26/8 \pm 8/5$ محاسبه شد که این اختلاف بین مرحله T1 با سایر مراحل از نظر آماری معنی دار بود ($P < 0.04$) ولی بین سایر مراحل این اختلاف قابل ملاحظه نبود (جدول ۱).

جدول ۱: مقایسه حساسیت سیتولوژی ادراری و اندازه گیری

فعالیت تلومراز به روش Trap Assay در مراحل مختلف

مرحله T1	مرحله T2b	مرحله T3a	مرحله T3b	کلی
۸	۵	۱	۳	۱۷
۱۱	۰	۱	۴	۱۶
۴۷	۱۰۰	۵۰	۴۳	۵۱/۵
سیتولوژی				
مثبت	۵	۱	۳	۱۷
منفی	۰	۱	۴	۱۶
حساسیت (%)	۱۰۰	۵۰	۴۳	۵۱/۵
تلومراز				
مثبت	۵	۲	۷	۳۱
منفی	۰	۰	۰	۲
حساسیت (%)	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۹۳

لازم جهت انجام PCR در دستگاه ترموسایکلر شرکت اپندرف تنظیم گردید. در این برنامه یک دور به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد جهت آماده سازی آنزیم تلومراز برای شروع فعالیت و سپس یک دور جهت تک رشته ای شدن کلی DNA تلومری به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد، ۲۷ دور شامل مراحل مربوط به اتصال پرایمر به مدت ۳۰ ثانیه که دمای اتصال آن برای آغازگر در کیت ۳۰ درجه مشخص شده است، سنتز توالیهای تلومری به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۵۹ درجه، تک رشته ای شدن DNA های ساخته شده به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۹۴ درجه بر روی دستگاه ترموسایکلر تنظیم شد. پس از انجام PCR از تکنیک الیزا برای اندازه گیری میزان فعالیت آنزیم تلومراز بر اساس تکثیر توالی های تلومری در محصولات PCR به روش هیبریداسیون استفاده شد. در اولین قدم ۳ میکرولیتر از محصولات PCR از طریق اضافه شدن به پلیت پوشیده از توالیهای پلی نوکلئوتیدی مکمل آن غیر متحرک و ساکن شد. پس از انکوبه کردن پلیت به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق سه بار با استفاده از بافر مربوطه شستشو داده شد. سپس آنتی بادی نشاندار شده با بیوتین به کمپلکس حاصله افزوده شد. آنتی بادی مربوطه با پراکسیداز تریچه (Horseradish Peroxidase) کنژوگه شده بود. با اضافه کردن محلول سوپسترا که حاوی ۳۳ و ۵۵ و ۳۰ تترامتیل بنزن است، واکنش رنگی صورت گرفته و مقدار رنگ ایجاد شده در طول موج ۴۵۰ نانومتر در دستگاه الیزا ریدر قرائت گردید. با قرار دادن مقادیر جذب شده از نمونه ها در منحنی استاندارد بدست آمده میزان فعالیت نسبی آنزیم تلومراز در نمونه های مجهول بدست آمد (بدون واحد)، لازم به ذکر است که مقادیر بالای صفر مثبت و زیر صفر منفی در نظر گرفته شد).

آنالیز آماری: جهت تجزیه و تحلیل داده ها از آزمون تی مستقل استفاده شد. معنی دار بودن آماری برای $P < 0.05$ کلیه آزمونهای آماری دو دنباله ای در نظر گرفته شد. کلیه آزمونهای آماری با استفاده از نرم افزار آماری SPSS ۱۱/۵ انجام شد.

نتایج:

بیماری سرطان مثانه هر ۳۳ فرد (۳۱ مرد و ۲ زن) با میانگین سنی ۶۴/۱۱ سال (محدوده سنی ۴۴ تا ۹۰ سال) توسط روشهای تهاجمی تأیید شده بود.

اندازه‌گیری فعالیت تلومراز ۹۳٪ بود. بر این اساس ویژگی کلی اندازه‌گیری فعالیت آنزیم تلومراز ۸۷/۵ درصد محاسبه شد. در این مطالعه مشاهده گردید که فعالیت آنزیم تلومراز در تومورهای با درجه و مراحل بالا یک روند افزایشی را نشان می‌دهد. همچنین سیتولوژی ادراری و اندازه‌گیری فعالیت تلومراز در هیچکدام از افراد فاقد تومور مثانه مثبت نبود.

بحث:

در بررسی‌های کلینیکی سرطان مثانه تشخیص تومورهای با درجه پایین و دستیابی به مارکرهای مولکولی جدید جهت شناسایی زودرس و فالوآپ سرطان مثانه هدف اصلی اکثر مطالعات می‌باشد (۲). سیستم اسکوپ سینگ بنای تشخیص سرطان مثانه باقی مانده است ولی این روش تهاجمی بوده و بخصوص در مواقع فالوآپ بیماران یک روش قابل قبول برای خیلی از بیماران نمی‌باشد. سیتولوژی ادراری یک روش ساده جهت تشخیص و مانیتور سرطان مثانه می‌باشد اما حساسیت این تست فقط در تومورهای با درجه بالا و کارسینوم insitu بالا می‌باشد (۳).

فعالیت تلومراز اخیراً در بافت اکثر سرطانهای انسانی با استفاده از Trap Assay قابل شناسایی می‌باشد و حساسیت اندازه‌گیری فعالیت تلومراز در بافتهای سرطانهای مختلف انسانی از ۲۰٪ تا ۱۰۰٪ گزارش شده است (۷). در مطالعات متعدد اندازه‌گیری فعالیت آنزیم تلومراز به روش Trap Assay در نمونه ادرار بیماران مبتلا به سرطان مثانه جهت تشخیص غیرتهاجمی سرطان مثانه حساسیت و ویژگی متفاوتی را ذکر شده است. بطوریکه در مطالعه کاوالر و همکاران ۷۹٪ تومورهای درجه یک، ۸۴٪ تومورهای درجه دو و ۸۷/۵٪ تومورهای درجه سه فعالیت مثبت تلومراز داشتند در حالیکه ۱۳٪ تومورهای درجه یک و ۴۴٪ تومورهای درجه دو و ۸۲٪ تومورهای درجه سه توسط سیتولوژی ادراری شناسایی شدند. با این حال هر ۵ بیمار مبتلا به کارسینوم insitu سیتولوژی ادراری و فعالیت تلومرازی مثبت داشتند (۱۵). در مطالعه راماکومار و همکاران حساسیت و ویژگی تستهای مختلف در ۵۷ بیمار مبتلا به سرطان مثانه و ۱۳۹ بیمار بدون سرطان مثانه از طریق اندازه‌گیری

درجه بندی تومورها طبق طبقه بندی Ash نشان داد (۱۴) که ۱۰ نفر دارای تومور درجه یک، ۶ نفر درجه دو و ۱۷ نفر دارای تومور درجه سه بودند. از تعداد ۱۰ نفر دارای مرحله یک توموری، سیتولوژی ادراری تنها قادر به شناسایی بیماری سه نفر گردید و فعالیت آنزیم تلومراز در ۸ نفر از این افراد مشاهده شد دو نفر از این افراد سیتولوژی ادراری و فعالیت آنزیم تلومرازی منفی بودند. در ۶ فرد دارای تومور با درجه دو تنها یک نفر سیتولوژی ادراری منفی داشت در حالیکه هر ۶ نفر فعالیت آنزیم تلومرازی مثبت بودند. همچنین سیتولوژی ادراری تنها در ۸ نفر از ۱۷ بیمار با تومورهای درجه سه مثبت بود با این حال فعالیت آنزیمی همه ۱۷ بیمار مثبت ارزیابی شد.

حساسیت سیتولوژی ادراری در تومورهای با درجات مختلف به ترتیب، درجه یک ۳۰٪ و درجه دو ۸۳٪ و درجه سه ۵۲٪ محاسبه شد در حالی که حساسیت تلومراز در تشخیص سرطان مثانه در تومورهای با درجه یک ۸۰٪ و در تومورهای با درجات دو و سه ۱۰۰٪ برآورد گردید. میانگین فعالیت نسبی تلومراز در تومورهای درجه یک $7/33 \pm 2/1$ ، درجه دو برابر $12 \pm 4/1$ و درجه سه برابر $25 \pm 2/1$ اندازه‌گیری شد که این اختلاف بین تومورهای با درجات یک و سه و نیز دو و سه قابل ملاحظه بود ($P < 0/005$) ولی این اختلاف بین تومورهای با درجات یک و دو قابل ملاحظه نبود (جدول ۲).

جدول ۲: مقایسه حساسیت سیتولوژی ادراری و اندازه‌گیری فعالیت آنزیم تلومراز به روش Trap Assay در تشخیص سرطان مثانه در درجات مختلف

	درجه ۱	درجه ۲	درجه ۳	کلی
سیتولوژی مثبت	۳	۵	۹	۱۷
سیتولوژی منفی	۷	۱	۸	۱۶
حساسیت (%)	۳۰	۸۳	۵۲	۵۱/۵
تلومراز مثبت	۸	۶	۱۷	۳۱
تلومراز منفی	۲	۰	۰	۲
حساسیت (%)	۸۰	۱۰۰	۱۰۰	۹۳

حساسیت کلی سیتولوژی ادراری در تشخیص سرطان مثانه ۵۱/۵٪ محاسبه شد در حالی که حساسیت کلی

تلومراز در ادرار وجود داشته باشد. دوم: وجود RNAase یا پروتئازهایی که باعث نابودی زنجیره های RNA یا قسمت کاتالتیک (hTERT) آنزیم تلومراز می شود سوم: حساسیت تشخیص فعالیت تلومراز وابسته به تعداد سلولهایی است که این فعالیت را از خود نشان می دهند (۲۰). بطوریکه تعدادی از محققین معتقدند که حداقل ۵۰ سلول با فعالیت تلومراز جهت شناسایی این آنزیم به روش Trap Assay مورد نیاز می باشد (۶). چهارم اینکه چون نمونه ها در عرض ۲۴ ساعت بعد از جمع آوری شسته و آماده نمی شوند تخریب آنزیم تلومراز ممکن است مشاهده شود (۲۰).

نتیجه نهائی:

بر اساس این نتایج می توان پیشنهاد کرد که اندازه گیری فعالیت آنزیم تلومراز می تواند به عنوان یک تست حساس و غیر تهاجمی جهت تشخیص سرطان مثانه باشد و با توجه به حساسیت بالای این تست در تمامی درجات و مراحل مختلف توموری، روش مناسبتری نسبت به روش سیتولوژی ادراری جهت تشخیص سرطان مثانه باشد و این نیازمند بررسی بر روی نمونه های بیشتر می باشد.

سپاسگزاری:

از تشریک مساعی کارکنان بخش پیوند کلیه بیمارستان امام خمینی ارومیه و نیز آزمایشگاه تخصصی و فوق تخصصی پاتوبیولوژی مرکزی دانشگاه علوم پزشکی تبریز برای تمهید مقدمات این پژوهش قدردانی می شود.

منابع:

1. Campbell FM, Walsh CP, Retic BA. Urothelial Tumors: Etiology, Natural History, Pathology, Detection and Staging. Campbell's urology. 8th ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 2002
2. Brown FM. Urine cytology. It is still the gold standard for screening? Urol Clin North Am 2000; 27(1):25-37.
3. Harley CB: Telomere Loss: mitotic clock or genetic time bomb? Mutat Res 1991; 256 (2-6):271-82.
4. Yoshida K, Sugino T, Tahara H, Woodman A, Bolodeoku J, Nargund V, et al. Telomerase activity in bladder carcinoma and its implication for non-invasive diagnosis by detection of exfoliated cancer cells in urine. Cancer 1997; 79(2):362-9.

مارکرهای مختلف ادراری با هم مقایسه شدند. در این مطالعه حساسیت کلی سیتولوژی ادراری ۴۴٪ و تلومراز ۷۰٪ و BTA stat ۷۴٪ و FDP ۵۳٪ و hemoglobin dipstick ۴۷٪ گزارش شد. ویژگی تستهای سیتولوژی ادراری ۹۵٪، تلومراز ۹۹٪ FDP ۹۱٪، BTA stat ۷۳٪ و NMP22 ۶۰٪ و hemoglobin dipstick ۸۴٪ گزارش شد. در این مطالعه نتیجه گیری شد که در تمام مراحل و درجات تومور ارتباط بین فعالیت تلومراز و سرطان مثانه بیش از سایر تستها می باشد (۱۶). یانگ و همکاران نیز از روش سنجش TRAP جهت شناسایی فعالیت آنزیم تلومراز در نمونه ادرار ۲۳ بیمار مبتلا به سرطان مثانه استفاده کردند که تنها در یک نفر از بیماران فعالیت آنزیم تلومراز مشاهده نشد. همچنین سیتولوژی ادراری ۱۷ نفر از بیماران مثبت بود (۱۷). در مطالعه ما نیز حساسیت کلی سیتولوژی ادراری و اندازه گیری فعالیت آنزیم تلومراز در تشخیص سرطان مثانه به ترتیب ۵۱/۵٪ و ۹۳٪ محاسبه گردید. حساسیت Trap assay در تومورهای درجه یک تا سه به ترتیب ۸۰، ۱۰۰ و ۱۰۰ درصد و سیتولوژی ادراری به ترتیب ۳۰، ۸۳ و ۵۲ درصد محاسبه شد. همچنین ویژگی تست اندازه گیری فعالیت تلومراز در مطالعه ما ۸۷/۵ درصد محاسبه شد. با این حال برخی محققین حساسیت بسیار کمتر Trap Assay جهت شناسایی سرطان مثانه را گزارش کردند. دالبانگی و همکاران حساسیت کلی Trap Assay در تشخیص سرطان مثانه را در نمونه ادرار بیماران ۳۵٪ گزارش کردند در حالیکه حساسیت کلی سیتولوژی ادراری جهت تشخیص سرطان مثانه ۷۱٪ بود (۱۸). همچنین هاین و همکاران با بررسی نمونه ادرار ۳۰ بیمار مبتلا به سرطان مثانه نشان دادند که فعالیت آنزیم تلومراز تنها در ۲ بیمار قابل شناسایی بود در حالی حساسیت سیتولوژی ادراری به مراتب بهتر توانایی شناسایی تومورها را داشت (۱۹).

در تمام مطالعات فوق نشان داده شده است که می توان فعالیت تلومراز را با استفاده از Trap Assay در نمونه ادرار بیماران مبتلا به سرطان مثانه جستجو کرد ولی حساسیت این تست در مطالعات گوناگون متفاوت ذکر شده است. اول: اینکه ممکن است مهارکننده های آنزیم

5. Kinoshita H, Ogawa O, Kakehi Y, Mishina M, Mitsumori K, Itoh N, et al. Detection of telomerase activity in exfoliated cells in urine from patients with bladder cancer. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89(10):724-30.
6. Blackburn EH. Telomeres and telomerase: their mechanisms of action and the effects of altering their functions. *FEBS Lett* 2005; 579(4): 859-62.
7. Ahmed A, Tollefsbol TO. Telomerase, telomerase inhibition, and cancer. *J Anti Aging Med* 2003; 6(4):315-25.
8. Smogorzewska A, de Lange T. Regulation of telomerase by telomeric proteins. *Annu Rev Biochem* 2004; 73: 177-208.
9. Muller M. Telomerase: its clinical relevance in the diagnosis of bladder cancer. *Oncogene*. 2002; 21(4):650-5.
10. Altshuler ML, Severin SE, Glukhov AI. The tumor cell and telomerase. *Biochemistry(Mosc)*2003;68(12):1275-83.
11. Papanicolaou NG. A new procedure for staining vaginal smears. *Science*, 1942, 5: 432.
12. Holt SE, Norton JC, Wright WE, Shay JW. Comparison of the telomeric repeat amplification protocol (TRAP) to the new TRAP-eze telomerase detection kit. *Methods in Cell Science* 1996; 18:237-248
13. Bradford MM. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal Biochem* 1976; 72:248-254.
14. Ash JE. Epithelial tumors of the bladder. *J Urol* 44:135-145, 1940.
15. Kavalier E, Landman J, Chang Y, Droller MJ, Liu BC: Detecting human bladder carcinoma cells in voided urine samples by assaying for the presence of Telomerase activity. *Cancer* 1998; 82:708-714.
16. Ramakumar S, Bhuiyan J, Besse JA, Roberts SG, Wollan PC, Blute ML et al: Comparison of screening method in detection of bladder cancer. *J urol* 1999; 161(2): 388-394.
17. Yang SC, Lee DH, Hong SJ, Chung, BH, Kim IY. Telomerase Activity a potential marker of bladder Transitional cell carcinoma in bladder washes. *Yonsei med J* 1997; 38(3): 155-159.
18. Dalbagni G, Han W, Zhang ZF, Cordon-Cardo C, Saigo P, Fair WR, et al: Evaluation of the Telomeric repeat Amplification protocol (Trap) assay for Telomerase as a diagnostic modality in recurrent bladder cancer *clin cancer Res* 1997; 3: 1593-98.
19. Heine B, Hummel M, Muller M, Heicappell R, Miller K, Stein H. Non-radioactive measurement of telomerase activity in human bladder cancer, bladder washings, and in urine. *J Pathol* 1998; 184(1):71-6.
20. Liu BCS and Loughlin KR. Telomerase in human bladder cancer. *Urologic Clinics of North America* 2000; 27: 115-123.