

چندشکلی‌های ژن NOS2A و تأثیر آن بر میزان تولید نیتریک اکساید لکوسیت‌های خون محیطی افراد طبیعی

بهاره عبدنیک‌فرجام^{۱*}، زهرا امیرغفران^۲، اسکندر کمالی^۳

۱- مربی، گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران
۲- استاد، گروه ایمنی‌شناسی و مرکز تحقیقات بیماری‌های خود ایمن، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران
۳- استاد، گروه ایمنی‌شناسی و مرکز تحقیقات بیماری‌های خود ایمن، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران

دریافت مقاله: ۸۶/۱۱/۱۴

پذیرش مقاله: ۸۷/۳/۴

چکیده

هدف: در سلول‌های تک‌هسته‌ای و چندهسته‌ای خون محیطی نیتریک اکساید توسط آنزیمی به نام نیتریک اکساید سنتاز القایی تولید می‌شود. ژن کدکننده این آنزیم (NOS2A) روی کروموزوم 17q11.21 قرار دارد. نیتریک اکساید در پاسخ‌های التهابی آزاد می‌شود. در این مطالعه چندشکلی‌های ژن NOS2A در افراد طبیعی و تأثیر آن بر میزان تولید نیتریک اکساید در سلول‌های تک‌هسته‌ای و چندهسته‌ای خون محیطی افراد طبیعی بررسی شد.

مواد و روش‌ها: چندشکلی‌های موجود در موقعیت‌های C/T -۱۶۵۹ و C/T +۱۵۰ ژن NOS2A در ۲۳۲ فرد طبیعی به ترتیب با روش‌های PCR-Allele Specific و PCR-RFLP مورد بررسی قرار گرفت. برای بررسی اثر این چندشکلی‌ها بر میزان تولید نیتریک اکساید، سلول‌های تک‌هسته‌ای و چندهسته‌ای خون محیطی ۹۲ فرد طبیعی جدا شدند و با مایع رویی کشت حاصل از باکتری اشرشیاکلی (ATCC 25922) به‌منظور القای آنزیم نیتریک اکساید سنتاز القایی و تولید نیتریک اکساید تحریک شدند. پس از گذشت ۲۴ ساعت میزان تولید نیتریک اکساید در مایع رویی محیط کشت سلولی با روش گریس اندازه‌گیری شد و تأثیر این چندشکلی‌ها بر میزان تولید نیتریک اکساید در این افراد مورد مطالعه قرار گرفت.

نتایج: در میزان تولید نیتریک اکساید بین ژنوتیپ‌های مختلف حاصل از دو چندشکلی مذکور در سلول‌های تک‌هسته‌ای و چندهسته‌ای خون محیطی افراد طبیعی تفاوتی مشاهده نشد.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان‌دهنده عدم تفاوت در میزان تولید نیتریک اکساید در ژنوتیپ‌های مختلف NOS2A است. هیچ‌گونه شباهتی بین جمعیت طبیعی ایران با گامبیا و چین مشاهده نشد. این تفاوت‌ها ناشی از تفاوت‌های نژادی و ژنتیکی بین جمعیت‌های بررسی شده است. با توجه به اهمیت چندشکلی‌های NOS2A در میزان تولید نیتریک اکساید مطالعات بیشتر در سایر گروه‌های نژادی پیشنهاد می‌شود.

کلیدواژگان: نیتریک اکساید، سلول‌های تک‌هسته‌ای و چندهسته‌ای خون محیطی، چندشکلی ژن NOS2A.

۱- مقدمه

تا ۱۹۹۴ کلون و خالص سازی شدند. ایزوفرم‌های آنزیم NOS محصولات ژن‌های مختلف هستند و محل بروز، تنظیم و خصوصیات متفاوتی دارند. ساختار ژن‌های NOS مشابه است و از یک ژن اجدادی مشترک مشتق شده‌اند. این آنزیم‌ها از نظر

آنزیم‌های نیتریک اکساید سنتاز (Nitric Oxide Synthase: NOS) اولین بار در سال ۱۹۸۹ شناسایی شدند. سه ایزوفرم اصلی این آنزیم [نورونی (neural NOS: nNOS)، القایی (inducible NOS: iNOS)، اندوتلیالی (endothelial NOS: eNOS)] در فاصله سال‌های ۱۹۹۱

* نشانی مکاتبه:

Email: nikfarjamm@gmail.com

ساختاری متعلق به ابر خانواده سیتوکروم P450 هستند. بین ایزوفرم‌های انسانی ۵۱ تا ۵۷ درصد تشابه وجود دارد. NOS-I (nNOS) اولین بار در بافت عصبی یافت شد و متصل به غشای سلولی است. NOS-II (iNOS) در سیتوپلاسم برخی از سلول‌ها و بافت‌ها یافت می‌شود و در پاسخ‌های ایمنی و التهابی نقش دارد. NOS-III (eNOS) اولین بار در سلول‌های اندوتلیال عروق یافت شد؛ متصل به غشای سلولی است و باعث انبساط عروق می‌شود و در تنظیم فشار خون نقش دارد [۱-۳].

نیتریک اکساید (Nitric Oxide: NO) در پاسخ‌های التهابی که توسط محصولات میکروبی و برهم‌کنش‌های خودایمنی آغاز می‌شود، آزاد می‌شود و نقش آن در ایمنی غیراختصاصی ثابت شده است [۱].

نتیجه تعداد زیادی از بیماری‌ها به تعادل (سلول T کمکی) Th1 /Th2 (T helper1/T helper2) وابسته است NO در تنظیم تعادل پاسخ‌های ایمنی Th1 و Th2 نقش داشته و مهارکننده انتخابی تولید سایتوکاین‌های Th1 (Cytokines) در انسان است بنابراین از التهاب بیشتر جلوگیری می‌کند [۲-۶].

فرا تنظیم iNOS منجر به القای سیکلواکسیژناز-۲ (Cyclooxygenase-2: COX-2) و تولید پروستاگلندین E2 (Prostaglandin E2: PGE2) می‌شود که باعث تغییر Th1 به Th2 و کاهش اینترلوکین-۲ (IL-2: Interleukin-2) و اینترفرون گاما (Interferon-gamma: IFN-γ) طی التهاب می‌شود و سیستم ایمنی را مهار می‌نماید [۷]. PGE2 با مهار فعال شدن عامل نسخه‌برداری NF-κB (Nuclear Factor-kappa B) تولید NO را مهار می‌نماید [۷]. در پاسخ التهابی حاد این مکانیسم پس‌خوراند از آسیب بافتی به واسطه میزبان پیشگیری می‌نماید، اما در شرایط مزمن، تأثیرات سرکوب‌گر ایمنی NO استعداد ابتلا به عفونت را افزایش می‌دهد [۲]. تولید مقادیر بالای NO به‌طور موضعی در آسیب بافتی در بیماری‌های روماتیک (مفاصل، کلیه، رگ‌های خونی و سیستم اعصاب مرکزی) شرکت می‌کند [۶]. iNOS در دفاع علیه ویروس‌ها، باکتری‌ها و انگل‌ها نقش دارد [۸]. iNOS در یک نقطه کنترلی مهم زیست‌شناختی قرار دارد و در حساسیت به بیماری‌های مختلف شرکت می‌کند. بنابراین با توجه به نقش‌های مهم و کلیدی NO و اهمیت آنزیم iNOS در سیستم ایمنی مطالعه این آنزیم

محصول آن یعنی NO ضروری به نظر می‌رسد؛ در این مطالعه تأثیر چندشکلی‌های (Polymorphisms) ژن NOS2A بر میزان تولید NO در سلول‌های تک‌هسته‌ای و چندهسته‌ای خون محیطی افراد طبیعی مورد بررسی قرار گرفت.

در موقعیت ۱۵۰+ اگزون ۱۶ ژن NOS2A یک جهش شناسایی شده است که باعث تبدیل نوکلئوتید سیتوزین (C) به نوکلئوتید تیمین (T) می‌شود. این جهش اسیدآمینه سرین (Ser) در موقعیت ۶۰۸ این آنزیم را تبدیل به اسیدآمینه لوسین (Leu) می‌نماید (Ser608Leu). این تغییر اسیدآمینه در اگزون ۱۶ ممکن است در عملکرد آنزیم نقش داشته باشد [۹-۱۱].

چندشکلی موجود در موقعیت ۱۶۵۹- راه‌انداز ژن NOS2A باعث تبدیل نوکلئوتید C به نوکلئوتید T می‌شود و اتصال پروتئین‌های هسته‌ای را تغییر می‌دهد. بنابراین ممکن است بر میزان بروز آنزیم iNOS تأثیر داشته باشد [۱۲، ۱۳].

برای اثبات اهمیت چندشکلی‌های C/T-۱۶۵۹ و C/T-۱۵۰+ و تأثیر آن‌ها بر میزان تولید NO در این مطالعه چندشکلی‌های ذکر شده در فوق در افراد طبیعی بررسی شدند. همچنین تأثیر این چندشکلی‌ها بر میزان تولید NO توسط NOS2A در سلول‌های تک‌هسته‌ای و چندهسته‌ای خون محیطی افراد طبیعی نیز مورد بررسی قرار گرفت.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- بررسی چندشکلی ژن NOS2A

۲-۱-۱- گروه مورد مطالعه

در این مطالعه ۲۳۲ فرد طبیعی و سالم با میانگین سنی ۴۰ ± ۹/۵۲ و محدوده سنی ۱۹-۷۴ سال که سابقه بیماری خاصی نداشتند بررسی شدند. نمونه‌گیری به‌صورت تصادفی از همه گروه‌ها و اقوام ایرانی انجام شد. فرمول محاسبه تعداد نمونه:

$$n = \frac{z^2 \sigma^2}{d^2}$$

از افراد مورد مطالعه، ۵ سی‌سی خون محیطی گرفته شد و به لوله‌های حاوی ۷۵ میکرولیتر EDTA (Ethylene Dinitro Tetra acetic Acid) (Merck) ۱۰ درصد انتقال داده شد.

غلظت DNA (میکروگرم در میلی لیتر) = $OD_{260} \times 50$ × فاکتور رقت
غلظت DNA مورد استفاده برای PCR ۰/۳ میکروگرم در میکرولیتر بود.

۲-۱-۴- روش PCR- Allele-Specific

در این روش برای هر نمونه DNA، دو اپندورف انتخاب شد. لوله شماره ۱ برای تکثیر آل نوع اول و لوله شماره ۲ برای تکثیر آل نوع دوم در نظر گرفته شد. به هر دو لوله مواد براساس مقادیر درج شده در جدول ۱ اضافه شد (تنها تفاوت لوله شماره ۱ و ۲ در آغازگر جلویی (Forward primer) بود). برای اطمینان از نتایج PCR از کنترل داخلی استفاده شد. کنترل داخلی ژن بتاگلوبین بود. محتویات لوله ها توسط چرخش سریع و کوتاه با میکروسانتریفوژ کاملاً مخلوط شد و برای انجام مراحل PCR در دستگاه ترموسایکلر (Eppendorf Master Cycler Gradient-5330) قرار گرفتند.

جدول ۱ حجم و غلظت مواد مورد استفاده در آزمون های PCR

ترکیبات	حجم		
	RFLP C/T-۱۶۵۹	RFLP +۱۵۰C/T	Allele Specific -۱۶۵۹ C/T
آب مقطر	۴/۸ میکرولیتر	۴/۱ میکرولیتر	۳ میکرولیتر
بافر PCR	۱ میکرولیتر	۱ میکرولیتر	۱ میکرولیتر
Mgcl ₂	۰/۹ میکرولیتر	۱/۶ میکرولیتر	۰/۷ میکرولیتر
dNTP	۰/۲ میکرولیتر	۰/۲ میکرولیتر	۰/۲ میکرولیتر
آغازگر جلویی	۱ میکرولیتر	۱ میکرولیتر	۱ میکرولیتر
آغازگر برگشتی	۱ میکرولیتر	۱ میکرولیتر	۱ میکرولیتر
جلویی درونی	-	-	۱ میکرولیتر
برگشتی درونی	-	-	۱ میکرولیتر
DNA	۱ میکرولیتر	۱ میکرولیتر	۱ میکرولیتر
پلی مراز Taq	۰/۱ میکرولیتر	۰/۱ میکرولیتر	۰/۱ میکرولیتر

۲-۱-۵- روش PCR- RFLP

(PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism)

برای هر نمونه DNA، به هر لوله مواد براساس مقادیر درج شده در جدول ۱ اضافه شد و محتویات لوله ها توسط چرخش سریع و کوتاه با میکروسانتریفوژ کاملاً مخلوط شد. روغن معدنی برای جلوگیری از تبخیر مواد در هنگام انجام PCR، اضافه شد و لوله ها برای انجام مراحل PCR در دستگاه ترموسایکلر قرار گرفتند.

۲-۱-۲- استخراج DNA به روش رسوب دهی با نمک (Salting out)

۱- به ۳ تا ۵ سی سی خون حاوی EDTA ۷ تا ۱۰ سی سی از تریس بافر-۱ برای حذف گلبولهای قرمز اضافه شد و به مدت ۱۰ دقیقه در ۳۰۰۰ دور سانتیفوژ شد. سپس مایع رویی دور ریخته شد و عمل فوق روی رسوب باقی مانده، ۲ تا ۳ بار تکرار شد تا مایع رویی شفاف شد.

۲- رسوب حاصل را با استفاده از ۱ سی سی محلول تریس بافر-۲ در ۵۶ درجه سانتی گراد به مدت ۲۵ دقیقه لیز نموده تا مایع شفاف به دست آمد.

۳- به منظور جداسازی پروتئین ها از DNA به نمونه ها ۰/۵ سی سی محلول اشباع کلرید سدیم (Merck) اضافه شد و به مدت ۱۵ دقیقه در ۳۵۰۰ دور سانتیفوژ شد.

۴- مایع رویی به لوله دیگری منتقل و ۱/۵ سی سی اتانول خالص (Merck) به آرامی به آن اضافه شد و لوله چند مرتبه سر و ته شد تا رشته های DNA به صورت کلاف قابل مشاهده درآمد.

۵- کلاف DNA در لوله اپندورف (Eppendorf) حاوی ۱ سی سی اتانول ۷۰ درصد به مدت ۵ دقیقه در ۵۰۰۰ دور سانتیفوژ شد و سپس اتانول ۷۰ درصد کاملاً دور ریخته شد.

۶- DNA در دستگاه Dri-block (Techne DB3A) با درجه حرارت ۶۰ درجه سانتی گراد خشک شد و ۱۰۰-۳۰۰ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه به آن اضافه شد و ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شد.

۲-۱-۳- تعیین غلظت DNA استخراج شده

۱۰ میکرولیتر محلول DNA با ۹۹۰ میکرولیتر آب مقطر رقیق شد. جذب نوری (Optical Density: OD) در طول موج های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر (به ترتیب طول موج های حداکثر جذب نور برای DNA و پروتئین) به کمک دستگاه UV اسپکتروفوتومتر (Pharmacia-Biothec) اندازه گیری شد. نمونه هایی که نسبت جذب نوری ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر آنها مساوی یا بالاتر از ۱/۵ بود، برای انجام مراحل بعدی مورد استفاده قرار گرفتند. غلظت DNA با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد:

(Amersham) ۲ درصد برده شد. در یکی از حفرات نشانگر (Marker) وزن مولکولی DNA ریخته شد. ولتاژ مورد استفاده ۱۰۰ ولت و مدت زمان الکتروفورز ۶۰ دقیقه بود. برای مشاهده نتایج، ژل روی دستگاه UV Trans Illuminator (Sigma chemical) انتقال داده شد. محصولات حاصل از هضم آنزیمی در روش PCR-RFLP در ژل آگارز ۳/۵ درصد الکتروفورز شدند.

جدول ۳ برنامه‌های PCR برای تکثیر ژن NOS2A

PCR	روش PCR	برنامه‌های PCR
Allele Specific -۱۶۵۹ C/T	واسرشتگی طولانی ۱. واسرشتگی ۲. جفت‌شدگی ۳. بسط	۹۵ درجه سانتی‌گراد ۵ دقیقه
		۹۵ درجه سانتی‌گراد ۳۰ ثانیه
		۶۵ درجه سانتی‌گراد ۳۰ ثانیه
		۷۲ درجه سانتی‌گراد ۴۵ ثانیه
RFLP -۱۶۵۹ C/T	۱. واسرشتگی ۲. جفت‌شدگی ۳. بسط	۷۲ درجه سانتی‌گراد ۵ دقیقه
		۹۵ درجه سانتی‌گراد ۵ دقیقه
		۶۲ درجه سانتی‌گراد ۳۰ ثانیه
		۶۲/۵ درجه سانتی‌گراد ۳۰ ثانیه
به روش Touchdown +۱۵۰ C/T	۱. واسرشتگی ۲. جفت‌شدگی ۳. بسط	۷۲ درجه سانتی‌گراد ۵ دقیقه
		۹۵ درجه سانتی‌گراد ۵ دقیقه
		۶۲ درجه سانتی‌گراد ۳۰ ثانیه
		۵۷ درجه سانتی‌گراد ۳۰ ثانیه
RFLP +۱۵۰ C/T	۱. واسرشتگی ۲. جفت‌شدگی ۳. بسط	۷۲ درجه سانتی‌گراد ۶۰ ثانیه
		۳۰ مرتبه تکرار چرخه
		۷۲ درجه سانتی‌گراد ۵ دقیقه
		۷۲ درجه سانتی‌گراد ۵ دقیقه

۳ میکرولیتر از محصول PCR برای اطمینان از انجام واکنش الکتروفورز شد و به ۷ میکرولیتر محصول باقی‌مانده طبق فرمول زیر آنزیم اضافه شد:

آنزیم محدودکننده (۱۰ واحد در میکرولیتر): ۰/۲ میکرولیتر

بافر B (۱۰X): ۱/۴ میکرولیتر

آب دیونیزه: ۵/۴ میکرولیتر

در موقعیت ۱۶۵۹- آنزیم (*FspBI* (MaeI) (Fermentas) توالی 5'...C[↓] T A G...3' را در صورت وجود، شناسایی و هضم می‌نمود. برای انجام واکنش در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۶ ساعت قرار داده شد.

جدول ۲ آغازگرهای مورد استفاده برای تکثیر ژن NOS2A

PCR	روش PCR	توالی آغازگرها
Allele Specific -۱۶۵۹ C/T	۳'-CCT TGA ACA AGG CAG AAC T-۵' ۳'-CCT TGA ACA AGG CAG AAC C-۵'	جلوبی اختصاصی T جلوبی اختصاصی C
		۳'-GCT CTG GCT TAT GGA GCA TC-۵' برگشتی مشترک
RFLP -۱۶۵۹ C/T	۳'-GTG AAA GCA GCT ACA GGG GA-۵' ۳'-AAT CCT GGC CTT AGG GAG TG-۵'	جلوبی برگشتی
		۳'-TGT AAA CCA ACT TCC GTG-۵' جلوبی
RFLP +۱۵۰ C/T	۳'-GTC TCT GCG GGT CTG AGA AG-۵'	برگشتی

برای تعیین آلل‌ها در موقعیت +۱۵۰ آنزیم برای تکثیر ژن NOS2A (Fermentas) *TasI* (*TspEI*) استفاده شد. این آنزیم توالی 5'...A A T T...3' را در صورت وجود، شناسایی و هضم می‌نمود. برای انجام واکنش نمونه‌ها به مدت ۱۶ ساعت در انکوباتور ۶۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند.

حجم و غلظت مواد، توالی آغازگرها و برنامه‌های PCR مورد استفاده برای تکثیر ژن NOS2A در جدول‌های شماره ۱، ۲ و ۳ نمایش داده شده است.

۲-۱-۶ الکتروفورز محصولات PCR

در روش PCR-Alelle-Specific، ۵ میکرولیتر و در روش PCR-RFLP، ۳ میکرولیتر از محصولات PCR با ۴ میکرولیتر از رنگ بارگیری مخلوط و درون حفرات ژل آگارز

۲-۲-۲ بررسی میزان تولید NO در محیط کشت

سلول‌های تک‌هسته‌ای و چندهسته‌ای خون محیطی

۲-۲-۱-۱ گروه مورد آزمایش

از میان افراد طبیعی، ۹۲ فرد با میانگین سنی ۱۰/۹ ± ۳۳/۹ سال و محدوده سنی ۲۱ تا ۵۶ سال برای انجام کشت سلولی به صورت تصادفی انتخاب شدند. ۵ سی‌سی خون از افراد مورد مطالعه گرفته شد و به لوله‌های حاوی هپارین انتقال داده شد و در دمای ۱۸ تا ۲۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. سلول‌های تک‌هسته‌ای و چندهسته‌ای خون محیطی

ظرف مدت ۲ ساعت جداسازی شد.

۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی با ۱۰ میکرولیتر رنگ تریپان بلو (Trypan blue) ۰/۰۰۵ درصد (محلول در PBS) مخلوط شد و روی لام هموسیتمتر (Haemocytometer) ۲۵ خانه‌ای قرار داده شد. تعداد سلول‌ها در ۵ خانه گلبول قرمز با استفاده از میکروسکوپ نوری شمارش شدند و در فاکتور رقت (۲) و ۵۰۰۰۰ ضرب شد. رنگ تریپان بلو از غشای سلول‌های مرده عبور می‌نماید و این سلول‌ها به رنگ آبی دیده می‌شوند، سلول‌های زنده به دلیل عدم جذب رنگ شفاف می‌مانند.

۲-۲-۵- کشت و تحریک سلول‌ها برای تولید NO

سلول‌های تک‌هسته‌ای و چندهسته‌ای روی ۵۰۰۰۰۰ سلول در ۱۲۵ میکرولیتر محیط کشت RPMI-1640 (Gibco-BRL) حاوی ۲۰ درصد سرم گوساله (Fetal Calf Serum: FCS) (Gibco-BRL) یا محیط CM20 تنظیم شد و هر نمونه به صورت سه‌تایی در ظرف ۹۶ خانه‌ای کشت داده شد و ۷۵ میکرولیتر از محرکی که از قبل تهیه شده بود به آن اضافه شد (با استفاده از مقادیر مختلف محرک بهترین مقدار آن انتخاب شد). کنترل هر نمونه به صورت سه‌تایی و حاوی ۷۵ میکرولیتر محیط نوترینت برات به جای محرک بود. سلول‌ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد حاوی ۵ درصد CO₂ و ۹۵ درصد رطوبت نگهداری شدند.

۲-۲-۶- سنجش میزان تولید NO در محیط کشت

سلول‌های تک‌هسته‌ای و چندهسته‌ای خون محیطی

گاز NO در محیط آبی تبدیل به نیتريت می‌شود که پس از واکنش با محلول گریس (Sigma) ایجاد رنگ صورتی می‌نماید. ۱۰۰ میکرولیتر از مایع رویی کشت سلولی با ۱۰۰ میکرولیتر محلول گریس در ظرف الیزا (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay: ELISA) مخلوط شد و پس از ۱۰ دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق میزان رنگ تولید شده با استفاده از دستگاه سنجش الیزا (ELISA Reader) (Titertek plus-MS2 Reader) در طول موج ۵۷۰ نانومتر سنجیده شد. غلظت NO تولید شده به کمک

۲-۲-۲- تهیه محرک برای تحریک سلول‌ها

باکتری اشرشیاکلی (ATCC 25922) در محیط کشت نوترینت برات (Nutrient broth) (Merck) به مدت ۲۴ ساعت به صورت استریل کشت داده شد. تعداد باکتری‌ها با استفاده از روش نفلومتری مک فارلند (Mc Farland) ۱۰^۸×۱۲ در هر میلی‌لیتر به دست آمد محیط کشت به فالتون استریل منتقل شد و در فریزر ۷۰- درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از انجماد در دمای اتاق ذوب شد و این مرحله ۵ تا ۶ مرتبه تکرار شد تا لیپوساکارید (Lipopolysaccharide: LPS) موجود در دیواره سلولی و پروتئین‌های باکتری در محیط کشت آزاد شوند. محیط کشت باکتری به مدت نیم ساعت در ۵۰۰۰ دور سانتریفوژ شدند از مایع رویی برای اندازه‌گیری میزان پروتئین با استفاده از کیت سنجش پروتئین (2-D Quant Kit-Amersham Biosciences AB) استفاده شد که ۱/۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به دست آمد. مایع رویی محیط کشت باکتری به عنوان محرک جمع‌آوری شد و تا زمان استفاده در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

۲-۲-۳- جداسازی سلول‌های تک‌هسته‌ای و چندهسته‌ای

خون محیطی

۵ سی‌سی خون به آرامی با پی‌پت پاستور به صورت لایه‌ای به لوله حاوی ۳ سی‌سی محلول دکستران Polymorphprep (AXIS- SHILD) منتقل شد و به مدت ۳۵ دقیقه در ۶۰۰ دور سانتریفوژ شد. گلبول‌های قرمز رسوب کردند و دو لایه مجزای سلولی تشکیل شد که اولین لایه سلول‌های تک‌هسته‌ای و لایه بعدی سلول‌های چندهسته‌ای بودند که به طور جداگانه به لوله‌های استریل منتقل شدند و با ۱۰ سی‌سی فسفات بافر سالین (Phosphate Buffered Saline: PBS) به مدت ۱۰ دقیقه در ۴۰۰ دور سانتریفوژ و شستشو شدند.

۲-۲-۴- شمارش سلول‌های زنده در سوسپانسیون سلولی

برای تعیین درصد و شمارش سلول‌های زنده

منحنی استاندارد تعیین شد.

پس از هضم با آنزیم *Tsp* EI (*Tas* I) در صورت وجود ژنوتیپ هموزیگوت CC دو باند به طول ۱۷۵ جفت باز و ۱۱۳ جفت باز و در صورت وجود ژنوتیپ هموزیگوت TT دو باند به طول ۱۴۲ جفت باز و ۱۱۳ جفت باز و در صورت وجود ژنوتیپ هتروزیگوت CT سه باند به طول ۱۷۵ جفت باز، ۱۴۲ جفت باز و ۱۱۳ جفت باز به وجود آمد. شکل ۳ الکتروفورز محصولات PCR روی ژل آکریل آمید ۱۲ درصد را نشان می‌دهد.

۳-۲- روش‌های آماری

رسم منحنی استاندارد و آنالیز آماری اطلاعات به‌دست آمده به کمک برنامه‌های آماری SPSS-12, Excel و EpiInfo-6 انجام گرفت.

۳- نتایج

۳-۱- نتایج حاصل از بررسی چندشکلی‌های NOS2A به روش PCR-Allele-Specific و PCR-RFLP

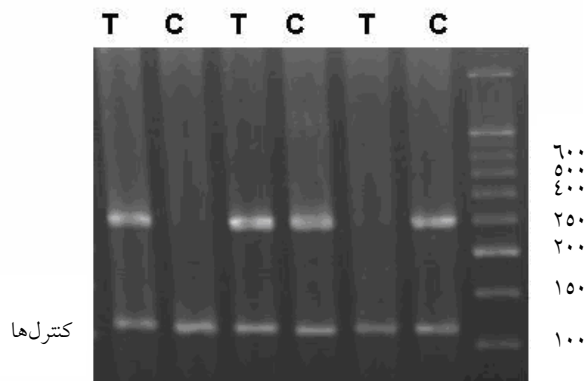
با انجام آزمایش PCR یک باند به طول ۲۵۰ جفت باز از تکثیر پرموتر ژن NOS2A و یک باند به طول ۱۰۰ جفت باز در اثر تکثیر ژن بتاگلوبین (کنترل داخلی) حاصل شد. در صورت وجود ژنوتیپ هموزیگوت CC یا TT واکنش PCR به ترتیب تنها در لوله حاوی آغازگر اختصاصی آلل C یا T و در صورت وجود ژنوتیپ هتروزیگوت CT واکنش PCR در هر دو لوله حاوی آغازگر اختصاصی C و T انجام می‌گرفت. شکل ۱ الکتروفورز محصولات PCR روی ژل آکریل آمید ۱۲ درصد را نشان می‌دهد. چندشکلی موجود در موقعیت C/T-۱۶۵۹ با روش PCR-RFLP نیز بررسی شد. از تکثیر اولیه این قطعه با کمک آغازگر اختصاصی باندی به طول ۲۰۰ جفت باز تشکیل شد که پس از هضم آنزیمی به کمک آنزیم محدودکننده *Fsp* BI (*Mae* I) در صورت وجود ژنوتیپ هموزیگوت CC محصول PCR به صورت دست‌نخورده باقی می‌ماند و در صورت وجود ژنوتیپ هموزیگوت TT دو باند و در صورت وجود ژنوتیپ هتروزیگوت CT سه باند به وجود می‌آمد. شکل ۲ الکتروفورز محصولات PCR روی ژل آکریل آمید ۱۲ درصد را نشان می‌دهد. چندشکلی موجود در موقعیت C/T+۱۵۰-اگزون ۱۶ ژن NOS2A به روش RFLP-PCR مورد بررسی قرار گرفت. از تکثیر اولیه این قطعه با آغازگر اختصاصی باندی به طول ۲۷۵ جفت باز تشکیل شد که

جدول ۴ فراوانی ژنوتیپ‌های C/T-۱۶۵۹ و C/T+۱۵۰-اگزون ۱۶ در افراد طبیعی

ژنوتیپ	کنترل (تعداد=۲۳۲) C/T+۱۵۰	کنترل (تعداد=۲۳۲) C/T-۱۶۵۹
CC	()	()
CT	(/)	(/)
TT	(/)	(/)

۳-۲- فراوانی ژنوتیپ‌ها و آلل‌های چندشکلی NOS2A در افراد طبیعی

از ۲۳۲ فرد مورد مطالعه ۱۷۴ نفر ژنوتیپ CC و ۴۶ نفر ژنوتیپ CT و ۱۲ نفر ژنوتیپ TT را دارا بودند (جدول ۴ و ۵). فراوانی ژنوتیپ‌ها در افراد طبیعی تابع تعادل هاردی-واینبرگ (Hardy-Weinberg) بود.



شکل ۱ الکتروفورز محصولات PCR-Allele Specific (C/T-۱۶۵۹) ژن NOS2A روی ژل آکریل آمید.

فراوانی ژنوتیپ‌ها در افراد طبیعی تابع تعادل هاردی-واینبرگ بود.

جدول ۶ میانگین میزان تولید NO در سلول‌های تک‌هسته‌ای و چندهسته‌ای خون محیطی افراد طبیعی

سلول (تعداد=۹۲)	انحراف معیار	میانگین	۵×۱۰ ^۵ سلول / ۱۲۵ میکرولیتر	
			حداکثر	حداقل
	/	/	/	/
	/	/	/	/

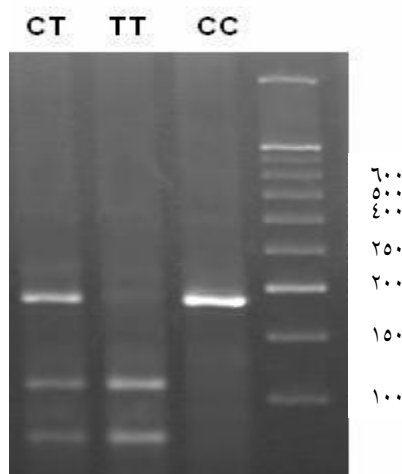
جدول ۷ میانگین میزان تولید NO در چندشکلی‌های ژن NOS2A در سلول‌های تک‌هسته‌ای و چندهسته‌ای خون محیطی افراد طبیعی

سلول (تعداد=۹۲)		۵×۱۰ ^۵ سلول / ۱۲۵ میکرولیتر	
		سلول تک هسته‌ای	سلول چند هسته‌ای
- C/T			
CC (=)		±	/ ±
CT (=)		± /	± /
TT (=)		/ ± /	±
+ C/T			
CC (=)		/ ± /	/ ±
CT (=)		±	/ ±
TT (=)		± /	± /

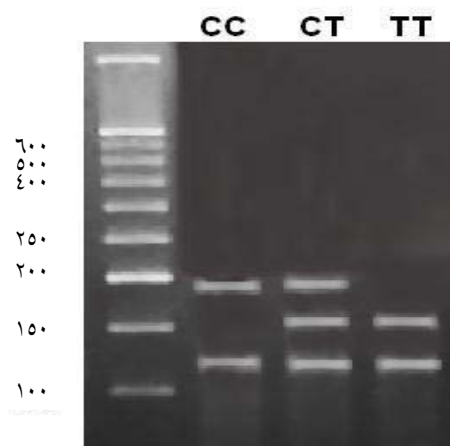
۳-۴- میزان تولید NO در سلول‌های تک‌هسته‌ای

و چندهسته‌ای خون محیطی

در این مطالعه میزان تولید NO در سلول‌های تک‌هسته‌ای و چندهسته‌ای خون محیطی ۹۲ فرد طبیعی اندازه‌گیری شد. چندشکلی‌های ژن NOS2A در موقعیت‌های C/T -۱۶۵۹- پروموتور و C/T +۱۵۰- اگزون ۱۶ در ۸۷ نفر از این تعداد بررسی شد و تأثیر آن‌ها بر میزان تولید NO مورد مطالعه قرار گرفت. میانگین میزان تولید NO در سلول‌های تک‌هسته‌ای و چندهسته‌ای خون محیطی افراد طبیعی به ترتیب ۷۹/۹ ± ۲۲۲/۸ میکرومول و ۶۹/۳ ± ۱۸۸/۲ میکرومول به دست آمد (جدول ۶). میانگین میزان تولید NO در ژنوتیپ‌های مختلف



شکل ۲ الکتروفورز محصولات PCR-RFLP (C/T -۱۶۵۹) ژن NOS2A روی ژل آکریل آمید.



شکل ۳ الکتروفورز محصولات PCR-RFLP (C/T +۱۵۰- اگزون ۱۶) ژن NOS2A روی ژل آکریل آمید.

جدول ۵ فراوانی آلل‌های C/T -۱۶۵۹ و C/T +۱۵۰- اگزون ۱۶ در افراد طبیعی

آلل	کنترل (تعداد=۲۳۲) C/T +۱۵۰	کنترل (تعداد=۲۳۲) C/T -۱۶۵۹
C	۳۷۲ (۸۰/۲ درصد)	۳۹۴ (۸۴/۹ درصد)
T	۹۲ (۱۹/۸ درصد)	۷۰ (۱۵/۱ درصد)

۳-۳- فراوانی ژنوتیپ‌ها و آلل‌های چندشکلی

موجود در موقعیت C/T +۱۵۰- اگزون ۱۶ ژن

NOS2A در افراد طبیعی

از ۲۳۲ فرد مورد مطالعه ۱۶۰ نفر ژنوتیپ CC و ۵۲ نفر ژنوتیپ CT و ۲۰ نفر ژنوتیپ TT را دارا بودند (جدول ۴ و ۵).

چندشکلی‌های مذکور در سلول‌های تک‌هسته‌ای و چندهسته‌ای خون محیطی در جدول ۷ به نمایش درآمده است. برای بررسی ارتباط و تأثیر ژنوتیپ‌های C/T ۱۶۵۹- پروموتور و C/T ۱۵۰+ اگزون ۱۶ ژن NOS2A و میزان تولید NO در سلول‌های تک‌هسته‌ای و چندهسته‌ای خون محیطی از روش پارامتریک آنوای یک طرفه (One-Way ANOVA) و غیرپارامتریک کروسکال-والیس (Kruskal-Wallis Test) استفاده شد. نتایج نشان‌دهنده عدم تفاوت در میزان تولید NO بین ژنوتیپ‌های مختلف چندشکلی‌های C/T ۱۶۵۹- و C/T ۱۵۰+ در سلول‌های تک‌هسته‌ای و چندهسته‌ای بود (جدول ۸).

جدول ۸ ارتباط بین چندشکلی‌های ژن NOS2A و میزان تولید NO در سلول‌های تک‌هسته‌ای و چندهسته‌ای افراد طبیعی

آزمون آماری				سلول
آنوا یک طرفه*		کروسکال-والیس*		
- C/T	+ C/T	- C/T	+ C/T	
/	/	/	/	
/	/	/	/	

* مقدار ارزشی P درون جدول آورده شده است.

۴- بحث

توزیع فراوانی ژنوتیپ‌های C/T ۱۶۵۹- در جمعیت طبیعی گامبیا [۱۴] با فراوانی ژنوتیپ‌های حاصل از مطالعه حاضر در افراد طبیعی مقایسه شد. هیچ‌گونه شباهتی بین جمعیت طبیعی ایران و گامبیا مشاهده نشد. این تفاوت ناشی از تفاوت‌های نژادی و ژنتیکی بین دو جمعیت بررسی شده است. با توجه به تفاوت‌های موجود در این دو جمعیت و نقش مهم NO در سیستم ایمنی، پیشنهاد می‌شود که فراوانی ژنوتیپ‌ها و آلل‌های حاصل از چندشکلی C/T ۱۶۵۹- در جوامع مختلف مورد بررسی قرار گیرد. براساس نتایج حاصل از این مطالعه نمی‌توان پیش‌بینی نمود که کدامیک از آلل‌های حاصل از چندشکلی مذکور با تولید بیشتر یا کمتر NO همراهند. با توجه به حرکت ترجیحی قوی بین محل‌های چندشکلی (Polymorphic sites) در پروموتور ژن NOS2A [۱۲، ۱۳] پیشنهاد می‌شود که در مطالعات آینده تأثیر چندشکلی C/T ۱۶۵۹- به همراه دیگر چندشکلی‌های موجود در

پروموتور ژن NOS2A بر بروز NO مورد مطالعه قرار گیرد. چندشکلی C/T ۱۵۰+ باعث تبدیل اسیدآمینه سرین آنزیم iNOS در موقعیت ۶۰۸ به اسیدآمینه لوسین می‌شود (Ser608Leu) [۹]. این تغییر اسیدآمینه در اگزون ۱۶ ممکن است در عملکرد آنزیم نقش داشته باشد. چرا که اسیدآمینه قطبی سرین با گروه جانبی بدون بار به اسیدآمینه لوسین با گروه جانبی با بار مثبت تبدیل می‌شود. این تبدیل می‌تواند بر اتصال پیش‌ماده‌ها به آنزیم تأثیر داشته باشد.

توزیع فراوانی ژنوتیپ‌های C/T ۱۵۰+ در مطالعه حاضر با فراوانی ژنوتیپ‌ها در جمعیت طبیعی چین [۱۵] مقایسه شد که شباهت بسیار کمی بین جمعیت طبیعی ایران و چین مشاهده گردید.

با توجه به اهمیت احتمالی چندشکلی C/T ۱۵۰+ بر فعالیت آنزیم، تأثیر این چندشکلی بر بروز بیماری‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفته است [۹، ۱۵، ۱۶]. مطالعه تأثیر این چندشکلی بر میزان تولید NO ضروری به نظر می‌رسد. در این مطالعه ارتباطی بین میزان تولید NO در سلول‌های تک‌هسته‌ای و چندهسته‌ای خون محیطی (پس از تحریک توسط مایع رویی کشت باکتری اشرشیاکلی) و ژنوتیپ‌های C/T ۱۵۰+ و C/T ۱۶۵۹- ژن NOS2A مشاهده نشد. همچنین با مقایسه میانگین میزان تولید NO در سلول‌های تک‌هسته‌ای و چندهسته‌ای خون محیطی به تفکیک در زنان و مردان نیز تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. همچنین میزان تولید NO ارتباطی با سن افراد مورد مطالعه نشان نمی‌دهد. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که سن و جنس با القای iNOS و تولید NO ارتباطی ندارد. این مطالعه اولین تحقیق بر تأثیر این ژنوتیپ‌ها بر میزان تولید NO در سلول‌های تک‌هسته‌ای و چندهسته‌ای خون محیطی است. احتمالاً چندشکلی‌های موجود در دیگر محل‌های این ژن یا ژن‌های سایتوکاین‌های پیش‌التهابی و التهابی مختلف القاکننده این ژن بر میزان تولید NO تأثیر می‌گذارند. این موضوع نشان‌دهنده ارجحیت بررسی هاپلوتیپی پروموتور ژن NOS2A است. بنابراین برای تعیین نقش قطعی چندشکلی‌ها بر میزان بروز ژن NOS2A پیشنهاد می‌شود این ارتباط به‌صورت هاپلوتیپی بررسی شود. این مطالعه روی افراد طبیعی انجام گرفته است و با توجه به عدم مشاهده ارتباط بین میزان تولید NO و ژنوتیپ‌های C/T ۱۵۰+ و C/T ۱۶۵۹- ممکن است با

می‌شود. برای تعیین میزان بروز iNOS استفاده از روش‌های دقیق‌تری مثل فلوسایتومتری (Flocytometry) پیشنهاد می‌شود، تا نقش قطعی چندشکلی‌های موجود در این زن بر میزان بروز آنزیم بهتر مشخص شود.

۵- تشکر و قدردانی

این مطالعه با حمایت مالی دانشگاه علوم پزشکی شیراز در قالب طرح تحقیقاتی انجام گرفته است. بدین وسیله از مدیریت و کارکنان محترم سازمان انتقال خون شیراز به دلیل مساعدت در امر نمونه‌گیری و سایر همکاری‌ها که ما را در نمونه‌گیری و اجرای این طرح یاری کردند تشکر و قدردانی می‌نماییم.

افزایش تعداد نمونه‌ها بهتر بتوان روی نقش این چندشکلی‌ها بر میزان تولید NO قضاوت نمود. به‌علاوه این احتمال نیز وجود دارد که تأثیر چندشکلی‌ها بر تولید NO در افراد طبیعی و بیمار متفاوت باشد [۱۷]. در این مطالعه به‌منظور یافتن یک راه جدید با هزینه کمتر و امکان دست‌یابی و انجام آسان‌تر علاوه بر روش‌های معمول القای آنزیم iNOS توسط سایتوکاین‌های التهابی و LPS خالص از عصاره باکتری کامل استفاده شد و مشاهده شد که این عصاره نیز قادر به تحریک آنزیم iNOS است. در همین راستا پیشنهاد می‌شود که در مطالعات بعدی برای القای این آنزیم از محرک‌هایی مثل سایتوکاین‌ها استفاده شود. به‌دلیل این که امکان بررسی تولید NO در شرایط استاندارد و مقایسه نتایج با سایر محققین فراهم

۶- منابع

- [1] Batra J, Chatterjee R, Ghosh B. Inducible nitric oxide synthase (iNOS): role in asthma pathogenesis. *Indian J Biochem Biophys* 2007; 44(5): 303-9.
- [2] Kendall HK, Marshall RI, Bartold PM. Nitric oxide and tissue destruction. *Oral Dis* 2001; 7: 2-10.
- [3] Tripathi P. Nitric oxide and immune response. *Indian J Biochem Biophys* 2007; 44(5): 310-9.
- [4] Sato K, Ozaki K, Oh I, Meguro A, Hatanaka K, Nagai T, Muroi K, Ozawa K. Nitric oxide plays a critical role in suppression of T-cell proliferation by mesenchymal stem cells. *Blood* 2007; 109: 228-34.
- [5] Mariotto S, Suzuki Y, Persichini T, Colasanti M, Suzuki H, Cantoni O. Cross-talk between NO and arachidonic acid in inflammation. *Curr Med Chem* 2007; 14(18): 1940-4.
- [6] Manna I, Liguori M, Valentino P, Condino F, La Russa A, Clodomiro A, Nisticò R, Di Palma G, Quattrone A. Preliminary evidences of a NOS2A protective effect from relapsing-remitting multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 2008; 264(1-2): 112-7.
- [7] Bidwell J, Keen L, Gallagher G, Kimberly R, Huizinga T, McDermott MF, Oksenberg J, McNicholl J, Pociot F, Hardt C, D'Alfonso S. Cytokine gene polymorphism in human disease: on-line databases. *Genes Immun* 1999; 1: 3-19.
- [8] Malinski T. Nitric oxide and nitroxidative stress in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 2007; 11(2): 207-18.
- [9] Johannesen J, Pie A, Pociot F, Kristiansen OP, Karlsen AE, Nerup J; Danish Study Group of Diabetes in Childhood. The Danish Insulin-dependent Diabetes Mellitus Epidemiology and Genetics Group. Linkage of the Human Inducible Nitric Oxide Synthase Gene to Type 1 Diabetes. *J Clin Endocrinol Metabol* 2001; 86: 2792-6.
- [10] Murphy S, Gibson CL. Nitric oxide, ischaemia and brain inflammation. *Biochem Soc Trans* 2007; 35: 1133-7.
- [11] Mitchell JA, Ali F, Bailey L, Moreno L,

- Harrington LS. Role of nitric oxide and prostacyclin as vasoactive hormones released by the endothelium. *Exp Physiol* 2008; 93(1): 141-7.
- [12] Yee LJ, Knapp S, Burgner D, Hennig BJ, Frodsham AJ, Wright M, Thomas HC, Hill AV, Thursz MR. Inducible nitric oxide synthase gene (NOS2A) haplotypes and the outcome of hepatitis C virus infection. *Genes Immun* 2004; 5(3): 183-7
- [13] Cauwels A. Nitric oxide in shock. *Kidney Int*. 2007; 72(5): 557-65.
- [14] Burgner D, Usen S, Rockett K, Jallow M, Ackerman H, Cervino A, Pinder M, Kwiatkowski DP. Nucleotide and haplotypic diversity of the NOS2A promoter region and its relationship to cerebral malaria. *Hum Genet* 2003; 112(4): 379-86.
- [15] Shen J, Wang RT, Wang LW, Xu YC, Wang XR. A novel genetic polymorphism of inducible nitric oxide synthase is associated with an increased risk of gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2004; 10(22): 3278-83.
- [16] Barcellose FL, Begovich AB, Reynolds RL, Caillier SJ, Brassat D, Schmidt S, Grams SE, Walker K, Steiner LL, Cree BA, Stillman A, Lincoln RR, Pericak-Vance MA, Haines JL, Erlich HA, Hauser SL, Oksenberg JR. Linkage and association with the NOS2A locus on chromosome 17q11 in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2004; 55(6): 793-800.
- [17] Vuolteenaho K, Moilanen T, Knowles RG, Moilanen E. The role of nitric oxide in osteoarthritis. *Scand J Rheumatol* 2007; 36(4): 247-58.